View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

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

عنوان:

جداسازی و تعیین پارامترهای موثر بر رشد و شکوفایی جلبک‌های مضر از آب‌های خلیج‌فارس و دریای عمان

مجری:
کیومرث روحانی قادیکلایی

شماره ثبت
۵۲۶۰۸

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

عنوان طرح/پروژه: جداسازی و تعیین پارامترهای موثر بر رشد و شکوفایی جلبک‌های مضر از آب‌های خلیج‌فارس و دریای عمان
کد مصوب: ۹۱۱۲۰ -۱۲- ۷۵-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : کیومرث روحانی قادیکلایی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : کیومرث روحانی قادیکلایی
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عیسی عبدالعلیان، مریم معزی، حجت‌اله فروغی‌فرد، مسعود غریب‌نیا، رضا دهقانی ، مهناز ربانی‌ها
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان هرمزگان
تاریخ شروع : ۹۱/۴/۱
مدت اجرا : ۳ سال
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 : جداسازی و تعیین پارامترهای موثر بر رشد و شکوفایی جلبک‌های مضر از آب‌های خلیج‌فارس و دریای عمان

کد مصوب : ۹۱۱۲۰ -۱۲- ۷۵-۲

شماره ثبت (فروست) : ۵۲۶۰۸ تاریخ : ۹۶/۸/۳۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای کیومرث روحانی‌قادیکلایی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بیولوژی ماهیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اکولوژی منابع آبی در تاریخ ۹۵/۸/۱۸ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
مقدمه ۲
۱-کلیات ۳
۱-۱- شکوفایی جلبکی ۳
۱-۲- انواع شکوفایی جلبکی ۳
۱-۳- اثرات شکوفایی مضر جلبکی(HABs) بر چرخه غذایی دریا و انسان ۴
۱-۴- رده بندی گونه *Cochlodinium polykrikoides* ۴
۱-۵- کلیاتی درباره جلبک *N. scintillans* ۶
۱-۶- کلیاتی در باره جلبک داینوفلاژلای *Protoperidinium quinquecorne* ۷
۲- سوابق تحقیق در داخل و خارج از کشور ۱۱
۳- مواد و روشها ۱۳
۳-۱- نمونه برداری و خالص سازی جلبک ۱۳
۳-۲- تهیه محیط کشت های مختلف ۱۴
۳-۳- نمونه برداری و خالص‌سازی جلبک *C. polykrikoides* ۱۴
۳-۴- مراحل خالص‌سازی و کشت داینوفلاژلای *N. scintillans* ۱۵
۳-۵- مراحل خالص‌سازی و کشت داینوفلاژلای *P. quinquecorne* ۱۵
۳-۶- آزمایش‌های مربوط به تعیین اثر پارامترهای محیطی بر رشد دینوفلاژلا ۱۶
۳-۷- کشت و تولید انبوه جلبک *C. polykrikoides* ۱۷
۳-۸- تجزیه و تحلیل آماری ۱۷
۴- نتایج ۱۸
۴-۱- نتایج مربوط به آزمایشات خالص سازی و کشت دینوفلاژلای *C. polykrikoides* ۱۸
۴-۲- نتایج بدست آمده در راستای خالص‌سازی دینوفلاژلای *N. scintillans* ۲۴
۵- بحث ۲۶
۶- نتیجه‌گیری ۲۹
منابع ۳۱
پیوست ۳۴
چکیده انگلیسی ۴۴

چکیده

اگرچه بیشتر شکوفایی‌های جلبکی برای حاصل‌خیزی محیط‌های دریایی مفید می‌باشند ولی وقوع شکوفایی‌های ناشی از برخی از این جلبک‌ها مضر بوده و شواهد جدید نشان داده است، به عنوان یک پدیده جهانی، تعداد و شدت آن در حال افزایش می‌باشد. پس از وقوع شکوفایی گسترده جلبک *Cochlodinium polykrikoides* در آبهای خلیج‌فارس و دریای عمان در سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۸۸ و مرگ و میر آبزیان منطقه، فعالیت صید و صیادی تا حدودی مورد تهدید قرار گرفت و بیم آن می‌رفت که مشکلات زیست محیطی و اکولوژیک را در پی داشته باشد. در سال‌های پس از آن نیز شاهد شکوفایی برخی دیگر از گونه‌های دیگر جلبکی در آب‌های ساحلی استان هرمزگان بوده‌ایم. از اینرو به منظورتعیین پارامترهای بهینه رشد شکوفایی جلبکی مضر، نمونه‌برداری از آبهای ساحلی منطقه بندرعباس، جزایر هرمز و قشم در بازه زمانی اردیبهشت ۱۳۹۱ تا خردادماه ۱۳۹۴صورت گرفت. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه کشت فیتوپلانکتون پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان انتقال و در آب دریای فیلترشده آداپته گردید. برخی از نمونه‌ها با استفاده از ویژگی نورگرایی مثبت جداسازی و خالص گردید و به کمک محیط کشت‌های تغییر یافته F/2 با تیمارهای مختلف شوری ۳۰، ۳۲ و ppt ۳۵، دمایی ۲۰، ۲۳، ۲۶ و ۲۸°C و نوری ۳۵ ، ۷۰ و ۹۰ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ کشت گردید. در این مطالعه ۳ گونه از دینوفلاژلا که شکوفایی‌هایی را در آب‌های ساحلی استان هرمزگان ایجاد نمودند شناسایی گردیدند. گونه نخست از گروه دینوفلاژلا تحت نام *Noctiluca scintillans* شناسایی گردید. این گونه در محیط کشت تغییر یافته F (F/2 و F/4) و در غالب تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت که فقط در محیط کشت F/4 در شوری ppt ۳۲، درجه حرارت °C ۲۵ و ۱۳ ساعت تاریکی و ۱۱ ساعت روشنایی در طی چندین جابجایی به مدت ۴ ماه زنده ماندند. گونه *Protoperidinium quinquecorne* داینوفلاژلای دیگری بود شکوفایی‌های مقطعی را بدنبال داشته که امکان خالص‌سازی آن در محیط کشت مرسوم و تغییر یافته فراهم نگردید. گونه دیگری که شکوفایی های پراکنده‌ای را در مناطق ساحلی استان هرمزگان ایجاد نموده و امکان خالص‌سازی آن فراهم گردید دینوفلاژلای *Cochlodinium polykrikoides* بوده است. نتایج نشان داده است که بهترین محیط کشت جهت تولید انبوه این جلبک، محیط کشت A_2، شوری ppt ۳۲، درجه‌حرارت °C ۲۶ و شدت نور ۹۰ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ با ۱۳ ساعت تاریکی و ۱۱ ساعت روشنایی بدست آمده است. تراکم سلول‌های جلبکی درارلن های ۵ لیتری به تراکم تقریبی ۱/۶ میلیون سلول در لیتر و شامل زنجیره‌های ۱۲-۲ تایی و گاهاً ۱۶ تایی رسیده است. نتایج بدست آمده نشان داد که در صورت فراهم بودن شرایط مناسب، شکوفایی این جلبک از روز ۸ شروع و تا روز ۲۴ دوره پرورش ادامه خواهد یافت.

واژه‌های کلیدی: شکوفایی جلبکی مضر، خالص سازی، عوامل محیطی، خلیج فارس

مقدمه

خلیج‌فارس و دریای عمان از مهم‌ترین اکوسیستم‌های آبی کشور و منطقه محسوب شده و تغییرات جوی حاکم بر جهان از جمله گرم شدن کره زمین، آلودگی مناطق مختلف و طوفان‌های شدید اقیانوسی در سالیان اخیر این اکوسیستم آبی را تحت تاثیر قرار داده است. در بررسی‌های بعمل آمده در ارتباط با پایش شکوفایی جلبکی که از سال ۱۳۷۳ الی ۱۳۸۶ در منطقه صورت پذیرفته، عمده شکوفایی ها ناشی از بلوم گونه‌هایی مانند *Nitzschia* sp. ،*Noctiluca* sp. ،*Trichodesmium* sp. و *Oscilatoria* sp. بوده است (روحانی، ۱۳۷۷). شکوفایی جلبکی ناشی از تکثیر سریع گروه‌هایی از پلانکتون‌های گیاهی بوده که تحت تاثیر عوامل مختلفی همچون درجه‌حرارت، شوری و نور بعنوان فاکتورهای اصلی برای رشد و بقاء جلبکی، قرار داشته که کشند قرمز نام دارد (Sunda *et al*., 2006). وقوع شکوفایی جلبکی در اوایل پاییز ۱۳۸۷ در خلیج‌فارس و بخشی از دریای عمان که توسط جلبک تاژک‌دار *C. polkrikoides* صورت پذیرفت، باعث مرگ و میر فراوان آبزیان منطقه گردید. مطالعات آزمایشگاهی متعددی ثابت کرده که فاکتورهای محیطی همچون درجه‌حرارت، شوری و نور و همچنین جریانات دریایی مانند جذر و مد می‌توانند بطور معنی‌داری بر روی میزان رشد و پراکنش گونه های مضر جلبکی تاثیر گذاشته و همچنین نقش حیاتی را در تشکیل یا از بین رفتن شکوفایی ایفا نمایند (Nagasoe *et al*., 2006; Matsubara *et al*., 2007).

تاکنون شکوفایی *C. polkrikoides* عامل مرگ و میر زیادی از آبزیان پرورشی در مناطق مختلف دنیا از جمله سواحل ژاپن (Yuki and Yoshimatsu, 1989; Kumada *et al*.,1980)، خلیج کالیفرنیا در مکزیک (Garate-Lizarraya *et al*., 2000)، خلیج Quanshou در چین (Du *et al*.,1993) و گواتمالا (Rosales-Loessener *et al*.,1996) گردیده است. نخستین شکوفایی جلبکی در کره جنوبی در سال ۱۹۸۲ به ثبت رسید که بطور مکرر تا سال ۱۹۸۹ اتفاق افتاده است (Kim,1998). در کره جنوبی رایج‌ترین داینوفلاژی مسئول مرگ و میر ماهیان گونه *C. polkrikoides* بوده و تعداد دفعات شکوفایی این گونه از ۳ بار در سال ۱۹۸۲ تا ۲۸ بار در سال ۱۹۹۵ رسیده است (Kim,1997).

داینوفلاژلاها گروه مهمی از فیتوپلانکتون‌های دریایی بشمار می‌روند که شکوفایی ناشی از برخی از گونه‌های آنها مشکلات زیادی را برای اکوسیستم‌های آبی و آبزی‌پروری از طریق تولید سموم و کاهش اکسیژن محیط (Kim *et al*., 2002) ایجاد نموده و فعالیت صید و صیادی را مورد تهدید قرار داده که مشکلات زیست محیطی و اکولوژیک را به همراه خواهد داشت. از اینرو شناسایی گونه‌های مضر و جداسازی و خالص‌سازی آنها به منظور دست یافتن به راه حلی مناسب برای کنترل شکوفایی و عوامل موثر در بروز این شکوفایی‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار است. لذا برای نیل به این مهم، دستیابی به بیوتکنیک کشت خالص و تولید انبوه آن برای انجام طرح‌های مربوط به کنترل شکوفایی در درجه اهمیت قرار خواهد داشت. بنابراین هدف از انجام این مطالعه دستیابی به: ۱ – شرایط بهینه دمایی بر اساس شرایط آب و هوایی منطقه ۲– شرایط بهینه شوری بر اساس نوع محیط کشت تهیه شده ۳– شرایط بهینه نوری (روشنایی) بر اساس شرایط جغرافیایی منطقه بوده است.

۱-کلیات

۱-۱- شکوفایی جلبکی

تولیدومثل سریع پلانکتون‌های گیاهی که همراه با تغییر رنگ آب می‌باشد را شکوفایی (bloom) می‌نامند. تغییر رنگ آب بصورت قرمز، زرد، نارنجی، قهوه‌ای، سبز و ارغوانی در اثر حضور رنگدانه‌هایی است که در سلول‌های جلبکی بوجود آورنده کشند وجود دارد. پدیده کشند در اکثر آب‌های جهان دیده شده و همچنین در آب‌های خلیج فارس بارها مشاهده شده و گزارش‌های متعددی در مورد این پدیده وجود دارد (روحانی، ۱۳۷۷). وقوع این پدیده اگر به صورت موقت و ناپایدار باشد چندان نگران کننده نمی‌باشد ولی اگر بصورت پایدار در آید ممکن است خسارات جبران ناپذیری بر اکوسیستم آبی و آبزیان از طریق تولید سم وارد نماید. شکوفایی بصورت پایدار همچنین می‌تواند سبب کمبود اکسیژن شده و در نتیجه خفگی آبزیان را در بر داشته باشد و گاهاً ترشحات ژله ای آنها به حالت لزج و چسبنده نیز دیده که باعث مسدود شدن اندام‌های تنفسی آبزیان شده و در این مرحله بیشترین مرگ و میر موجودات دریایی اتفاق می‌افتد. در گذشته همه شکوفایی جلبکی را بدون در نظر گرفتن رنگ آب، تحت نام کشند قرمز (red tide) می‌شناختند، ولی امروزه دانشمندان ترجیح می‌دهند که اصطلاح شکوفایی مضر جلبکی (HABs) را بکار ببرند که همزمان با گرم شدن کره زمین و افزایش آلودگی آب‌های ساحلی، تناوب شکوفایی‌های مضر جلبکی همچنین بزرگی و مدت زمان پایداری آن در حال افزایش می‌باشد (Gobler *et al.*, 2008).

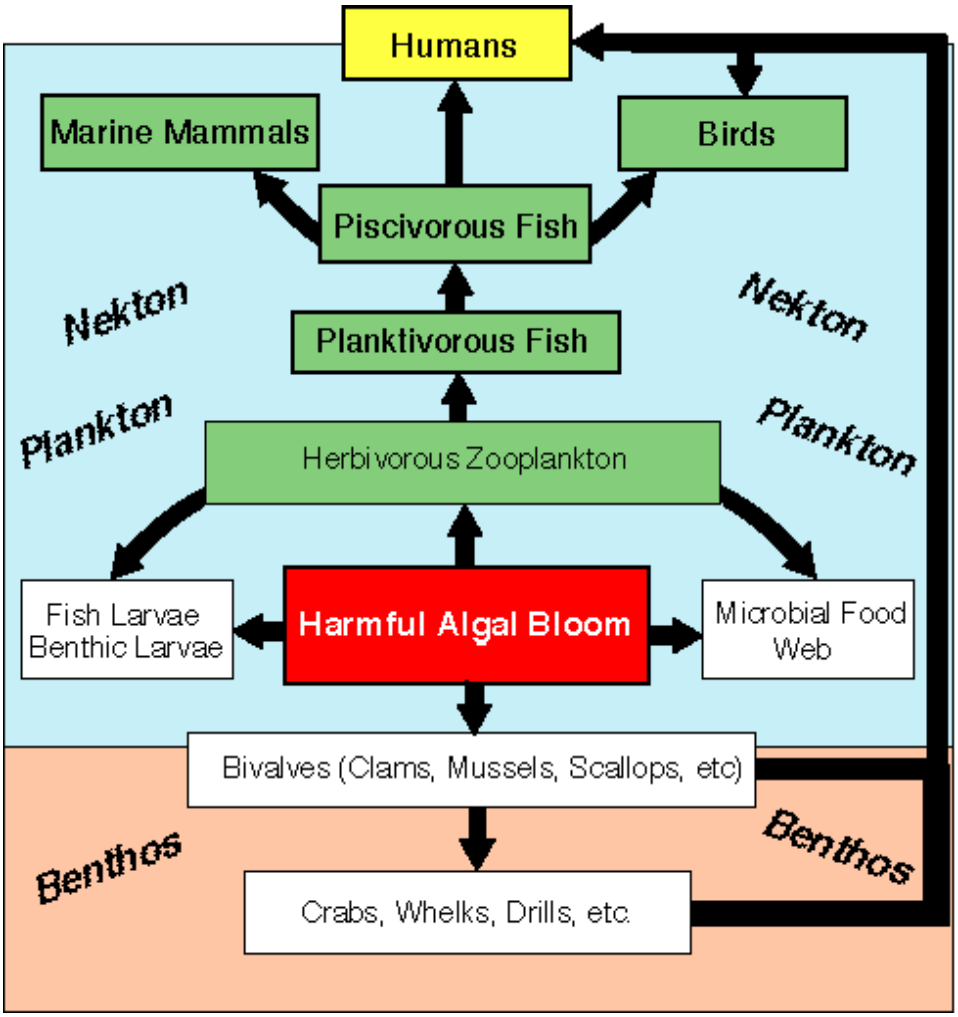
۱-۲- انواع شکوفایی جلبکی

از ۵۰۰۰ گونه جلبک دریایی شناخته شده، ۳۰۰ گونه باعث تغییر رنگ آب شده که حدود ۷۵ تای آن تولید سموم قوی می‌کنند.

- شکوفایی برخی از گونه‌هایی که اساساً بی ضرر بوده ولی باعث تغییر رنگ آب می‌شوند که در نتیجه آن عمق نفوذ نور کم شده و بی‌مهرگان بستر دریا در اثر افت اکسیژن می‌میرند.
- شکوفایی گونه‌هایی که تولید سموم قوی چون PSP, DSP, ASP, CFP, NSP و CTP می‌کنند که در زنجیره غذایی انباشته شده و باعث انواع بیماری‌های گوارشی و عصبی در انسان و جانوران می‌گردد.
- شکوفایی گونه‌هایی که در بیشتر موارد برای انسان غیرسمی بوده اما برای ماهیان و بی‌مهرگان (مخصوصا در کشت متراکم) با ایجاد مسمومیت، تخریب یا گرفتگی آبشش‌ها، باعث مرگ ماهیان می‌گردند.
- شکوفایی گونه‌هایی که تولید سمومی می‌کنند که برای انسان مضر بوده و بوسیله هوا و به صورت اسپری از مناطق شکوفایی به سواحل انتقال می‌یابد.

۳-۱- اثرات شکوفایی مضر جلبکی(HABs) بر چرخه غذایی دریا و انسان :

شکوفایی مضر جلبکی اثرات متفاوتی را بر زنجیره غذایی در دریا و انسان‌ها گذاشته، از یک طرف موجودات بنتیک از جمله دوکفه‌ای ها و خرچنگ‌ها را تحت تاثیر قرار داده و از طرف دیگر بر پلانکتون‌های گیاهی و جانوری شناور در آب که مورد تغذیه لارو ماهی‌ها قرار می‌گیرند اثر گذاشته که در نهایت این زنجیره به پرندگان، پستانداران دریایی و انسان ختم می‌گردد (شکل۱).



شکل ۱: اثرات شکوفایی مضر جلبکی بر چرخه غذایی دریا و انسان

با اندکی تغییر بر گرفته از (Matsuoka, 2006)

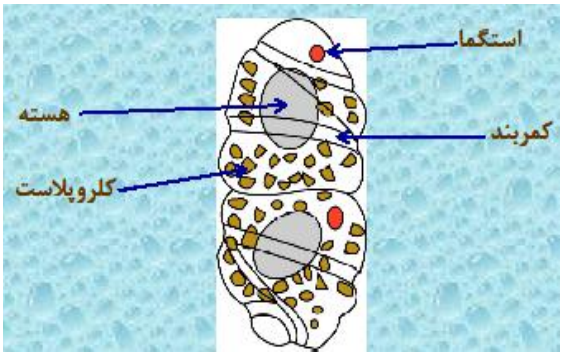
۴-۱- رده بندی گونه *Cochlodinium polykrikoides*:

Division: **Dinophya**
Class : **Dinophyceae**
Order : **Gymnodinales**
Family : **Gymnaceae**
Genus : **Cochlodinium**
Species: ***Cochlodinium polykrikoides*** **(margalef 1961)**

۱-۴-۱- زیست شناسی دینوفلاژلای *C. polykrikoides*:

جلبک *C. polykrikoides* یک گونه فتوسنتزی با تعداد زیادی کلروپلاست سبز متمایل به زرد یا قهوه‌ای بوده که دارای یک هسته در بخش جلویی و یک لکه چشمی قرمز رنگ نیز در بخش پشتی می‌باشد. یک کمربند به صورت ۱/۵ دور در اطراف سلول دیده می شود (شکل ۲) که گونه‌های مختلف بر اساس موقعیت و میزان چرخش این کمربند شناسایی می گردند (Matsuoka, 2006).

این جلبک اغلب تشکیل زنجیره‌های کوتاه ۲ ، ۴ و ۸ سلول (ندرتاً ۱۶ سلول) داده و گاهاً هم بصورت منفرد دیده می‌شوند (Gobler *et al.*, 2008). اندازه سلولی آن μm ۴۰–۲۵ می‌باشد. این جلبک برای اولین بار در سال ۱۹۶۱ توسط مارگا لف در دریای کارائیب و سواحل جنوبی Puerto Rico شناسایی گردید. در تراکم های بالا به رنگ قهوه‌ای تند (همانند قهوه) و در تراکم‌های پایین نیز به رنگ قهوه ای روشن در می‌آید.



شکل ۲ : شکل شماتیک جلبک *C. polykrikoides*. با اندکی تغییر بر گرفته از (Matsuoka, 2006)

دینوفلاژلای *C. polykrikoides* یک گونه میکسوتروف بوده که قادر است دیگرگونه‌های فیتوپلانکتونی با اندازه کمتر از ۱۱ میکرون از جمله *Isochrysis galbana* و *Rhodomonas salina* را مورد تغذیه قرار دهد (Jeong *et al.*, 2004). از سوی دیگر میزان چرندگی (تغذیه) *C. polykrikoides* از دیگر فیتوپلانکتون‌ها به میزان نور یا نوترینت‌های مورد دسترس آن بستگی دارد (Jeong *et al.*, 2004). مطالعات نشان داده که شکوفایی این دینوفلاژلا هنگامی اتفاق می‌افتد که ترموکلاین وجود ندارد و درجه‌حرارت رسوبات کف حدود ۲۰°C یا بیشتر می‌باشد. از نظر اکولوژیک این جلبک هم در آبهای مناطق گرم و هم سرد (۳۰°C -۱۱) و با شوری متوسط ppt ۳۴- ۳۰ پراکنش جهانی داشته و رشد و گسترش می‌یابد (Kudela *et al.*,2008).

۲-۴-۱- شرایط رشد جلبک *C. polykrikoides*:

این جلبک یک گونه همه جازی بوده و در آب‌های مناطق معتدل تا گرمسیری یافت می‌شود. در شرایط طبیعی این جلبک در آب‌هایی با شوری ppt ۳۶–۳۲ و درجه‌حرارت ۲۸°C–۲۵ دیده شده ولی در شرایط

آزمایشگاهی، شرایط بهینه برای بیشینه رشد، در شوری ppt ۳۵-۲۸ و درجه‌حرارت C°۲۷-۲۰ می‌باشد Kim *et al*.,2004).

۵-۱-کلیاتی در باره جلبک دینوفلاژلای *Noctiluca scintillans*

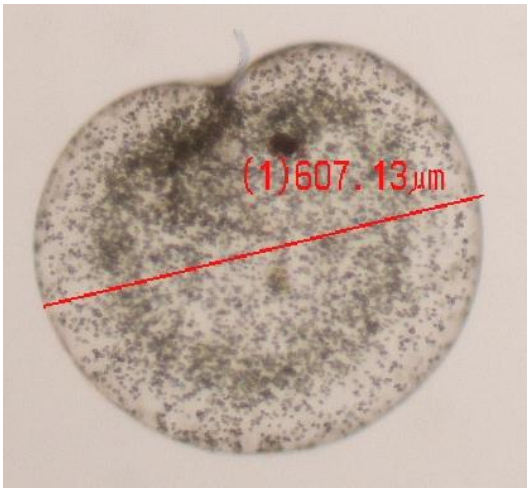
جلبک تک سلولی .*Noctiluca* sp یک دینوفلاژلای غیرزره‌دار دریایی بوده که به شکل پلانکتونی می‌باشد. سلول این گونه برخلاف دیگر گونه‌های دینوفلاژلا دو قسمتی (epitheca و hypotheca) نبوده و یکپارچه می‌باشد. این گونه تولید شکوفایی‌های گسترده نموده که می‌تواند باعث مرگ آبزیان همچون ماهی و بی‌مهرگان دریایی گردد. سلول خیلی بزرگ با قطر۲۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرون (عمدتا ۵۰۰ میکرون) و به شکل بالن مانند می‌باشند. شکاف پشتی عمیق و پهن بوده و دارای فلاژلا (تنها یک فلاژلا)، دندان و تنتاکل می‌باشد. این جلبک در آب‌های ساحلی دریای عرب تحت نام *Noctiluca scintillans* شناسایی گردیده که سبز رنگ بوده (به خاطر حضور فیتوپلانکتون همزیست *Pedinomonas noctilucae*) که با توجه به ویژگی‌های ساختاری و مرفولوژیکی گمان می‌شود که گونه شکوفا شده در منطقه خلیج‌فارس نیز همین گونه باشد.

۱-۵-۱- رده بندی گونه *Noctiluca scintillans*

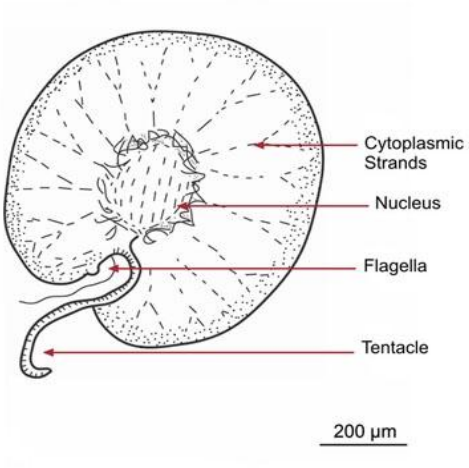
Division	Pyrrophycophyta (Dinoflagellates)
Class	Dinophyceae
Order	Noctilucales
Family	Noctilucaceae
Genus Species	Noctiluca *Noctiluca scintillans* Suriray, 1836

۲-۵-۱- مرفولوژی و ساختار دینوفلاژلای *Noctiluca scintillans*

جلبک یک گونه غیرفتوسنتزی هتروتروف و فاقد کلروپلاست بوده و سیتوپلاسم آن غالبا بی‌رنگ می‌باشد. حضور همزیست‌های فتوسنتزی در درون بدن این جلبک باعث می‌شود تا سیتوپلاسم به رنگ صورتی یا سبز درآید (شکل ۳). سلول جلبکی حاوی تعدادی واکوئل‌های غذایی در سیتوپلاسم بوده و همچنین یک هسته بزرگ یوکاریوت نیز در نزدیکی شکاف پشتی قرار گرفته است (شکل ۴).



شکل ۳ : نمونه طبیعی گونه *Noctiluca* sp.



شکل ۴ : شکل شماتیک از گونه *Noctiluca* sp.

۳-۵-۱-تولید و مثل دینوفلاژلای *Noctiluca scintillans*

تولید و مثل این جلبک به صورت غیر جنسی و از طریق تقسیم دوتایی یا جنسی و از طریق تشکیل ایزوگامت صورت می‌گیرد.

۴-۵-۱- اکولوژی دینوفلاژلای *N. scintillans*

این جلبک یک گونه پلانکتونی بوده که قابلیت شناوری دارد و در مناطق نرتیک و ساحلی پراکنش دارد. این گونه ویژگی بیولومینسانس را دارا بوده و دارای رنگ‌های صورتی، قرمز گوجه‌ای یا سبز می‌باشند. همچنین شکل سبز جلبک *Noctiluca* در آب‌های ساحلی بخش شمالی دریای سرخ ناشی از حضور فیتوپلانکتون *Pedinomonas noctilucae* که به شکل همزیست درونی آن هست می‌باشد. این جلبک بزرگ، یک گونه همه جازی بوده که ویژگی فاگوتروفی داشته و از فیتوپلانکتون‌های دیگر (عمدتا دیاتومه و دینوفلاژلاها)، کوپه‌پوداها همچون *Calanus* sp., *Temora* sp. و *Acartia* sp.، پروتوزوآها، دتریتوس و تخم ماهیان تغذیه می‌نماید. از سوی دیگر دیاتومه‌هایی چون *Chaetoceros*، *Navicula*، *Thalassiosira*، جلبک تاژکدار *D. galbana*، دینوفلاژلاهایی چون *Gyrodinium dorsum* و *Prorocentrum minimum* و همچنین جلبک سبز *Dunaliella tertiolecta* مورد تغذیه این جلبک قرار می‌گیرند (شکل ۵).

شکل ۵: نمونه طبیعی گونه *Noctiluca* sp. حاوی ایتم‌های غذایی

۵-۵-۱- سمیّت دینوفلاژلای *Noctiluca scintillans*:

اگرچه این گونه مستقیما تولید سم نمی‌نماید ولیکن می‌تواند مقادیر بالایی از آمونیوم سمی را به محیط آبی اطراف آزاد نموده که گمان می‌رود باعث مرگ ماهیان یا دیگر بی‌مهرگان آبزی از طریق کاهش اکسیژن، مسدود کردن آبشش به هنگام شکوفایی گردد. قابلیت دسترسی به فیتوپلانکتون یا به عبارتی حضور فیتوپلانکتون کافی در محیط به عنوان طعمه، یکی از فاکتورهای مهم برای حضور این جلبک در محیط دریا می باشد. بنابراین شکوفایی این دینوفلاژلا هنگامی اتفاق می‌افتد که پیش از آن گونه فیتوپلانکتونی (دیاتومه یا دیگر فیتوپلانکتون) شکوفایی نموده باشند.

۶-۱- کلیاتی در باره جلبک دینوفلاژلای *Protoperidinium quinquecorne*

داینوفلاژلای *Protoperidinium quinquecorne* بصورت لکه‌ای در آب‌های سواحل بندرعباس و جزایر قشم و هرمز در طی نمونه‌برداری‌های مختلف مشاهده گردید (شکل ۶). این گونه در آب‌های ساحلی بندرعباس در نیمه دوم مهرماه ۱۳۹۱و مهر تا آذر ۱۳۹۲ بصورت مقطعی و در شهریور ۱۳۹۳ بیش از ۱۱ میلیون سلول در لیتر شکوفا و گزارش گردید (صادقی و همکاران، ۱۳۹۵).

شکل ۶ : شکل طبیعی از گونه *Protoperidinium* sp.

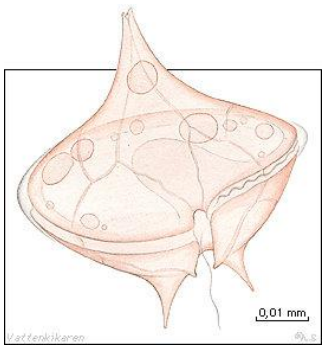
۱-۶-۱- رده بندی داینوفلاژلای *Protoperidinium quinquecorne*

این داینوفلاژلا از شاخه پیروفیکوفیتاها بوده و زیر مجموعه گروه آغازیان می‌باشد. این نام برای موجوداتی که اغلب نه باکتری، نه قارچ و نه گیاه و جانور هستند بکار برده می‌شود (Gómez, 2005).

Division	Pyrrophycophyta (Dinoflagellates)
Class	Dinophyceae
Order	Peridiniales
Family	Protoprediniacea
Genus	*Protoperidinium* sp.

۲-۶-۱- ریخت‌شناسی داینوفلاژلای *Protoperidinium quinquecorne*

این دینوفلاژلا از نظر رنگی بدون رنگ یا زرد مایل به قهوه‌ای می‌باشد و گهگاهی به رنگ صورتی و لکه‌های قرمزی درون سلول دیده می‌شود. اندازه این سلول حداکثر ۳۰۰ میکرون گزارش شده است (شکل ۷). این سلول الماسی شکل است. سلول اغلب دارای خار یا تیغ می‌باشد. سطح سلول توسط شیاری شکافته است که شامل دو زائده متحرک به نام فلاژلا می‌باشد. شیاری که دور تا دور سلول را شکافته است سلول را به دو بخش بالایی و پایینی تقسیم کرده است. در این مورد جایی که شکاف به طرف نیمه فوقانی سلول می‌رود کمی تورفتگی ایجاد شده است. در مورد پوششی که دور سلول را احاطه کرده است شامل صفحاتی است که برآمده شده و سخت و محکم می‌باشد (Naustvoll, 2000).



شکل ۷ : شکل شماتیک گونه *Protoperidinium* sp.

۳-۶-۱- تغذیه دایِنوفلاژلای *Protoperidinium quinquecorne*

این موجود توانایی شنا کردن را توسط دانوفلاژلا خود بدست می آورد. این موجود توانایی فتوسنتز را نداشته و قادر به تولید مواد مغذی مورد نیاز خود نمی‌باشد. این پلانکتون شکارچی بوده و از گونه های کوچک دیگر تغذیه می‌کند. این گونه خود نیز مورد تغذیه موجودات دیگر که در بستر و ستون آب زندگی می‌کنند، همچون کوپه‌پودها قرار می‌گیرند. همچنین این گونه قابلیت تغذیه انتخابی از بین گونه‌های فیتوپلانکتونی را دارا می باشد (; Menden-Deuer *et al.*, 2005Naustvoll, 2000).

۲- سوابق تحقیق در داخل و خارج از کشور

در سال‌های اخیر تغییرات قابل ملاحظه‌ای از نظر تنوع گونه‌ای پلانکتون‌های گیاهی و حتی شکوفایی آن‌ها در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان به خصوص استان هرمزگان مشاهده گردید. همانگونه که اشاره گردید، در بررسی‌های به عمل آمده در ارتباط با پایش شکوفایی فیتوپلانکتونی، پیش از سال ۱۳۸۷، عمده شکوفایی‌ها ناشی از بلوم گونه‌هایی مانند *Noctiluca* sp.، *Nitzschia* sp.، *Trichodesmium* sp. و *Oscillatoria* sp. بود. در خلیج فارس و دریای عمان طی سال‌های ۱۳۷۰ تا ۱۳۸۱ بیش از ۳۶ بار شکوفایی مضر جلبکی دیده شده است. اما جدی‌ترین شکوفایی در خلیج فارس در سال ۱۳۸۷ در آب‌های سواحل استان هرمزگان رخ داد که مربوط به دینوفلاژلای *C. polykrikoides* بوده است. شکوفایی این گونه در خلیج‌فارس همچون سایر نواحی دنیا موجب خسارات زیادی گشت (عبدالعلیان و همکاران، ۱۳۹۱).

در کشور کره جنوبی اولین کشند قرمز ثبت شده در سال ۱۹۸۲ بوده و بطور مکرر تا سال ۱۹۸۹ اتفاق افتاده است (Kim,1997). این داینوفلاژلا از طریق تولید ماده لزج و موکوس مانند وکاهش اکسیژن باعث مرگ و میر آبزیان دریای و آبزیان پرورشی در سطح وسیعی گردیده است و فعالیت صید و صیادی را مورد تهدید قرار داده و مشکلات زیست محیطی و اکولوژیک را به همراه داشته است (Kim *et al.*, 2002).

شکوفایی‌های ناشی از جلبک دینوفلاژلای *Noctiluca* sp. نیز در آب‌های خلیج‌فارس از اواخر پائیز ۱۳۹۰ مشاهده گردید. این دینوفلاژلا به رنگ سبز در آب‌های ساحلی دریای عرب تحت نام *N. scintillans* شناسایی گردیده که رنگ سبز آن به خاطر حضور فیتوپلانکتون همزیست *Pedinomonas noctilucae* در آن می‌باشد. از سویی با توجه به ویژگی‌های ساختاری و مرفولوژیکی مشابه جلبک دینوفلاژلای *Noctiluca sp.* در آب‌های خلیج‌فارس با گونه شناسایی شده در دریای عرب، گمان می‌شود که گونه شکوفا شده در منطقه خلیج‌فارس نیز همین گونه باشد.

گزارش شکوفایی دینوفلاژلای *Noctiluca scintillans* در دریای سرخ و سواحل جنوب غربی عربستان سعودی از فوریه ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ اعلام شده است (Mohamed & Mesaad, 2007). آنها بیان داشتند که شکوفایی این جلبک می‌تواند بطور غیرمستقیمی به افزایش یوتریفیکاسیون از طریق فراوانی طعمه که معمولاً گونه‌های فیتوپلانکتونی دیگر می‌باشند مرتبط باشد. همچنین در این مطالعه هیچگونه گزارشی از تلفات احتمالی آبزیان بر اثر وقوع این شکوفایی در منطقه ارائه نگردیده است. در مطالعه‌ای دیگر که توسط Tada و همکاران (۲۰۰۴) بر روی بررسی نوسانات فصلی جلبک *N. scintillans* در آب‌های ژاپن صورت گرفت نتیجه گرفتند که شکوفایی این جلبک در اواخر بهار یا اوایل تابستان با گرم شدن نسبی دما صورت می‌گیرد.

Steidinger & Tangen (۱۹۹۶) در مطالعه‌ای نشان دادند که جلبک *N. scintillans* یک گونه هتروتروف غیرفتوسنتزی بوده که غذای خود همانند دیاتومه‌ها، دیگر دینوفلاژلاها، تخم ماهی و باکتری‌ها را به شکل طعمه به روش فاگوتروفی می‌بلعد. در مطالعه‌ای دیگر که توسط Turkoglu and Erdogan (۲۰۱۰) در Dardanelles در

تنگه ترکیه انجام گرفت، شکوفایی این جلبک به شکل لکه‌های قرمز و نارنجی در ماههای می تا ژولای مشاهده گردید. از سوی دیگر نتایج نشان داده است که دیاتومه‌هایی چون *Chaetoceros, Navicula, Thalassiosira, Coscinodiscus* و *Nitzschia* غذای اصلی جلبک *N. scintillans* بوده و شکوفایی آن منوط به حضور این دیاتومه‌ها در محیط دریا می‌باشد(Padmakumar *et al.*, 2010) . از سویی جلبک *Noctiluca* سبز رنگ از نقطه نظر تاکسونومیکی در آب‌های مناطق معتدل به عنوان گونه *N. scintillans* در نظر گرفته می‌شود (Sweeney 1978). Hansen و همکاران (۲۰۰۴) اشاره داشته‌اند که گونه سبز جلبک *N. scintillans* یک گونه فاگوتروف اجباری بوده و فتوسنتزی که توسط فیتوپلانکتون همزیست صورت می‌گیرد تکافوی مواد آلی میزبان را نمی‌نماید. اما نتایج دیگر محققین نشان داده است که نژاد سبز جلبک می‌تواند به شکل فتواتوتروف رشد نموده و همچنین به صورت فاگوتروف اختیاری از دیگر فیتوپلانکتون‌ها تغذیه نماید و حضور گونه همزیست *P. noctilucae* تامین مواد آلی را برای میزبان تضمین نموده و بقای آن را در زمان نبود مواد غذایی تسهیل می‌نماید (Saito *et al.*, 2006).

۳- مواد و روشها

۱-۳- نمونه برداری و خالص سازی جلبک

با توجه به اینکه شکوفایی فیتوپلانکتونی پدیده‌ای دائمی نبوده و بسته به شرایط می‌تواند در مناطق یا زمان‌های مختلف صورت گیرد، از اینرو نمونه‌برداری از مناطق مختلف آب‌های ساحلی بندرعباس، جزایر قشم و هنگام (فاصله ۳۰۰- ۲۰۰ متری) در پی گزارش شکوفایی فیتوپلانکتونی انجام گرفت. نمونه‌برداری با استفاده از بطری‌های نمونه‌بردار یا به کمک سطل از آب‌های سطحی صورت گرفت. نمونه‌ها سپس از خلال تور پلانکتون ۱۰۰ میکرون عبور داده شده تا مواد زائد از نمونه اصلی جدا گردد. سپس آب محتوی جلبک به آرامی و بدون اینکه ضربات فیزیکی به آنها وارد شود، به آزمایشگاه کشت فیتوپلانکتون پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، محل انجام آزمایشات، منتقل گردید. پس از انتقال جلبک‌ها به آزمایشگاه، ابتدا عمل آداپتاسیون اولیه صورت گرفت. بدین منظور ابتدا به آرامی آب محتوی جلبک را در داخل لوله آزمایش بلند که تقریباً ۸۰٪ از حجم یا ارتفاع آن تیره شده ریخته و درب آن را بسته تا ارتباط آن با محیط بیرون قطع گردد. سپس بدون اینکه ظروف را جابجا نموده یا تکان داده شود، در مجاورت نور مهتابی (در مورد گونه هایی که نورگرایی مثبت دارند) به مدت ۷-۵ قرار داده سلول های ضعیف تر و آسیب دیده به ته ظرف رسوب نموده و سلول های سالم و فعال در فضای آب شناور گردند (Kim *et al.*,1998).

در مورد برخی گونه های دیگر، آداپتاسیون با آب دریا فیلتر شده صورت گرفت. بدین منظور ابتدا آب دریای تازه را به منظور حفظ فلور باکتریایی، بدلیل همزیستی احتمالی این جلبک با باکتری، از خلال کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده (بدون اتوکلاو شدن) و در داخل ظروف استریل که تقریباً ۸۰٪ از حجم یا ارتفاع آن تیره شده ریخته و نگهداری گردید (Kim *et al.*,1998; Lovejoy *et al.*,1998). در این مرحله سلول‌های جمع شده با کمک پیپت‌های نازک در ناحیه روشن به لوله‌های آزمایش منتقل شده و این عمل چند بار و به فاصله ۷-۵ روز تکرار گردید.

در مرحله بعد، آب دریای استریل شده را به همراه محیط کشت‌های مختلف در درون لوله‌های آزمایش استریل که ۸۰٪ ارتفاع آن تیره می‌باشد به همراه انواع مختلف آنتی‌بیوتیک (Ampicilin، Neomycin،Kanamycin)، ریخته و سپس سلول‌های جمع‌آوری شده از مرحله قبل را به این لوله‌ها انتقال یافت (Guillard,1975). در این مرحله بدلیل فضای محدود رقابتی برای دریافت نور از یک طرف و وجود آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در محیط آب از طرف دیگر باعث گردید تا سلول جلبکی در لایه بالایی (لوله آزمایش) به سرعت افزایش یافته و این عمل خود باعث جلوگیری از نفوذ نور به لایه های پایین‌تر شده و در نتیجه از تکثیر سایر فیتوپلانکتون‌ها از جمله دیاتومه ممانعت بعمل آید. فرایند جابجایی و انتقال پی در پی و مداوم (Kim *et al*, 2004) در فاصله زمانی ۷-۵ روز و در یک مدت زمان ۵-۴ ماه باعث تهیه استوک خالص گونه کوکلودینیوم گردید.

۲-۳- تهیه محیط کشت های مختلف

با توجه به اینکه یکی از مشکل‌ترین و پرهزینه‌ترین مرحله در خالص‌سازی و کشت جلبک‌های میکروسکوپی بویژه دینوفلاژلاها تهیه محیط کشت می باشد، از اینرو پس از دستیابی به تکنیک خالص‌سازی، اقدام به تهیه محیط کشت گردید. بدین منظور محیط کشت‌های مختلف موجود از جمله TMRL، Z ،Walen، محیط کشت جامد و نیمه جامد (آگار) و همچنین محیط کشت‌های تغییر یافته مختلف از محیط کشت F (Guillard,1975) تهیه و جهت کشت جلبک دینوفلاژلا مورد آزمایش قرار گرفت. از میان محیط کشت‌های مختلف، در نهایت ۳ محیط کشت (پی‌نوشت ۲، ۳ و ۴)، تغییر یافته از محیط کشت F، انتخاب و جهت انجام آزمایشات در داخل لوله‌های آزمایش و یک محیط کشت هم جهت تولید انبوه جلبک در آکواریوم‌ها (پی‌نوشت ۵) مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۳- نمونه‌برداری و خالص سازی جلبک *C. polykrikoides*

نمونه برداری از مناطق مختلف آب‌های ساحلی بندرعباس (فاصله ۳۰۰- ۲۰۰ متری ساحل) که شکوفایی رخ داده با استفاده از بطری‌های نمونه بردار صورت گرفت. نمونه‌ها سپس از از خلال تور پلانکتون ۱۰۰ میکرون عبور تا مواد زائد از نمونه اصلی جدا گردد. سپس آب محتوی جلبک به آرامی و بدون اینکه ضربات فیزیکی زیادی به آنها وارد شود، به آزمایشگاه منتقل و عمل آداپتاسیون اولیه صورت گرفت. بدین‌منظور ابتدا به آرامی آب محتوی جلبک را در داخل ظروف شیشه‌ای مختلف ریخته و درب آن را بسته تا ارتباط آن با محیط بیرون قطع شده، سپس بدون جابجایی یا تکان ظرف در مجاورت نور مهتابی قرار داده و دمای اتاق را دمای محیط یکسان‌سازی گردید. این مرحله معمولاً ۷-۵ روز طول کشیده که به دنبال آن سلول‌های ضعیف و آسیب دیده در ته ظرف رسوب نموده و سلول‌های سالم و فعال در فضای آب شناور گردیدند.

پس از اولین مرحله آداپتاسیون، مرحله دوم آداپتاسیون با آب دریای فیلتر شده صورت گرفت. بدین‌منظور ابتدا آب دریای تازه را به منظور حفظ فلور باکتریایی (بدلیل همزیستی احتمالی این جلبک با باکتری) از خلال کاغذ صافی ۴۵ ٪ میکرون عبور داده (بدون اتوکلاو شدن) و در داخل ظروف استریل که تقریباً ۸۰٪ از حجم یا ارتفاع آن تیره می باشد ریخته و نگهداری گردید. در این مرحله سلول‌های جمع‌آوری شده از مرحله قبل به ظروف جدید منتقل و این عمل چند بار و به فاصله ۷-۵ روز تکرار گردید. در مرحله بعد،آب دریای استریل شده را به همراه محیط کشت F/2 بدون سیلیس در لوله‌های آزمایش استریل شده ای که ۸۰٪ ارتفاع آن تیره است به همراه انواع مختلف آنتی‌بیوتیک ریخته و سپس سلول‌های جمع‌آوری شده از مرحله قبل به این لوله‌ها انتقال یافت. در این لوله‌ها بدلیل فضای محدود رقابتی جهت دریافت نور از یک طرف و وجود آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در محیط آب از طرف دیگر و همچنین بدلیل تحرک زیاد این جلبک (*C. polykrikoides*) و فتوتروپیسم مثبت آنها، باعث گردید تا تراکم سلول جلبکی در لایه بالایی آب (لوله آزمایش) به سرعت افزایش یافت

(Droop,1967). این فرایند به همراه جابجایی پی در پی در فاصله زمانی ۷-۵ روز و در یک دوره زمانی ۳-۲ ماه باعث گردید تا استوک خالص از این گونه بدست آید.

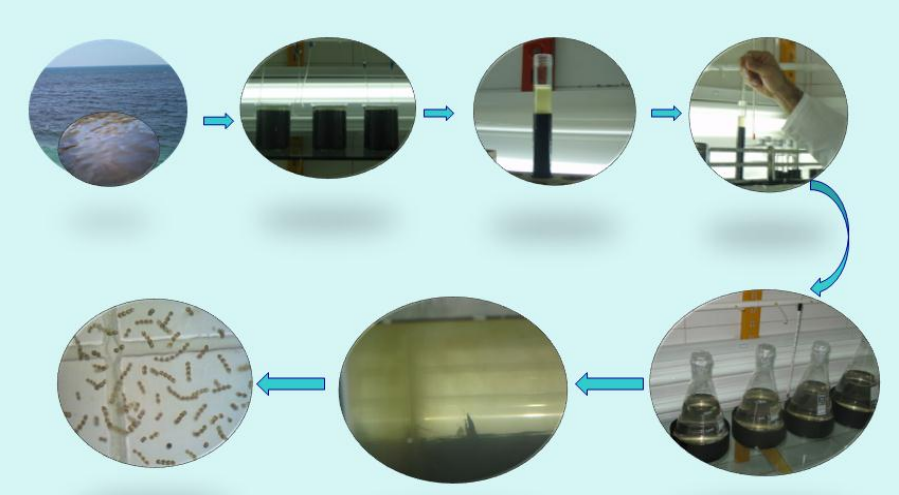
۴-۳- مراحل انجام شده جهت خالص سازی و کشت داینوفلاژلای *N. scintillans*

. در دی‌ماه سال ۱۳۹۲، وقوع شکوفایی پلانکتونی از آب‌های ساحلی جزیره هنگام گزارش و بدنبال آن از آب‌های منطقه نمونه‌برداری و نمونه‌ها تحت شرایط سرما به آزمایشگاه فایکولب انتقال گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا عمل آداپتاسیون صورت گرفت. سپس اقدام به جداسازی اولیه سلول‌های فعال گونه شکوفا از ستون آب با استفاده از میکروپیپت نموده و به لوله‌های آزمایش آب دریا با شوری‌های ۲۵ تا ۳۲ انتقال یافت. نمونه‌ها چند روزی در شرایط آزمایشگاه بدون افزودن هرگونه محیط کشت یا ایتم غذایی نگهداری شده تا با شرایط محیطی جدید سازگار گردند. جداسازی و خالص‌سازی سلول‌ها با استفاده از تکنیک کشت پی‌درپی و به کمک میکروپیپت صورت گرفت. نمونه‌ها در تیمارهای مختلف محیط کشت‌های تغییر یافته F/2 یا TMRL، ۴ تیمار دمایی (۲۰، ۲۳، ۲۶ ، ۲۸ °C) و ۳ تیمار شوری (۳۰، ۳۲ , ۳۵ ppt) و ۳ تیمار نوری (۳۵، ۷۰ و ۹۰ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) تحت شرایط استاندارد کشت داده شد. همچنین از ایتم‌های مختلف غذایی فیتوپلانکتونی نیز جهت تغذیه استفاده گردید.

۵-۳- مراحل خالص‌سازی و کشت داینوفلاژلای *Protoperidinium quinquecorne*

به منظور خالص‌سازی و کشت داینوفلاژلای *P. quinquecorne* نمونه‌برداری از آبهای ساحلی بندرعباس و جزیره قشم در زمان مشاهده شکوفایی یا گزارشات صورت گرفت. نمونه‌برداری توسط دبه‌های پلاستیکی و از لایه ۵۰-۲۰ سانتی‌متری سطح آب صورت گرفته و نمونه‌های تحت شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه ابتدا مراحل مقدماتی آدابتاسیون بر روی نمونه‌ها صورت پذیرفت و سپس در ظروف مخصوص که نیمه زیرین آن تاریک است انتقال یافت. روند جداسازی در چندین مرحله صورت گرفت. در مرحله نخست نیمه پایین ظروف کشت دینوفلاژلا (معمولاً لوله آزمایش) با استفاده از رنگ تیره یا نوار چسب پهن مشکی، تاریک نموده و سپس یک جریان هوای ملایم بصورت حباب (هر۲ ثانیه یک حباب) جهت جلوگیری از چسبندگی سلول‌های جلبکی بهم و همچنین تأمین اکسیژن مورد نیاز آنها برقرار گردید. جداسازی اولیه سلول‌های فعال از ستون آب با استفاده از میکروپیپت صورت گرفت. سلول‌های فعال به لوله‌های آزمایش حاوی آب دریا با شوری‌های مختلف (۳۵ppt-۳۲) انتقال یافت. همانند بخش بالا، نمونه‌ها چند روزی در شرایط آزمایشگاه بدون افزودن هرگونه محیط کشت یا ایتم غذایی نگهداری شده تا با شرایط محیطی جدید سازگار گردند. جداسازی و خالص‌سازی سلول‌ها با استفاده از تکنیک کشت پی‌درپی و به کمک میکروپیپت صورت گرفت. نمونه‌ها در تیمارهای مختلف محیط کشت‌های تغییر یافته f/2 یا TMRL، ۴ تیمار دمایی (۲۰، ۲۳، ۲۶، ۲۸ °C) و ۳ تیمار شوری (۳۰، ۳۲ , ۳۵ ppt) و ۳

تیمار نوری (۳۵، ۷۰ و ۹۰ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) تحت شرایط استاندارد کشت گردید. با توجه به عدم تخصیص هرگونه اعتبار برای این بخش از پروژه، عملیات آزمایشگاهی جداسازی *Protoperidinium* sp. متوقف گردید.



شکل ۸: مراحل خالص‌سازی و کشت انبوه دینوفلاژلای *C. polykrikoides* در اکواریوم‌های ۶۰ لیتری

۶-۳- آزمایشات مربوط به تعیین اثر پارامترهای محیطی بر رشد دینوفلاژلا

۱-۶-۳- آزمایشات دما، شوری و نور

آزمایشات در غالب طرح فاکتوریل شامل ۴ تیمار دمایی (۲۰، ۲۳ ، ۲۶ ، ۲۸ °C)، ۳ تیمار شوری (۳۰، ۳۲ , ۳۵ PPT) و ۳ تیمار تیمار نوری (۳۵، ۷۰ و ۹۰ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$) بدون هوادهی صورت گرفته است. شوری‌های کمتر از ۳۵ PPT با افزودن آب مقطر به آب دریا بدست آمد (Kim, 2004). برای کاهش شوک ناشی از تغییرات شوری و دما، ابتدا کشت‌های حاوی جلبک (استوک ها)، با استفاده از روش جابجایی گام به گام مطابق روش Yamaguchi و Honjo(۱۹۸۹) طی یک دوره ۱ ماهه و در شرایط آزمایشگاهی آداپته گردیدند. آزمایش ها در ۳ تکرار و در لوله‌های آزمایش شیشه‌ای در پوش‌دار هم اندازه (۱۰۰ mm ×۱۶) حاوی ۸ میلی لیتر محیط کشت F/2 تغییر یافته بدون سیلیکات (Guillard,1975) انجام گرفت.

میزان استوک اولیه برای تمامی تیمارها با تراکم ۵۰ سلول در میلی لیتر در نظر گرفته شده و برای جلوگیری از تجمع و لخته شدن سلولهای جلبکی، نمونه ها ۲ بار در روز به آرامی تکان داده شدند (Kim *et al.*, 2004). تیمارهای مختلف نوری توسط لامپ مهتابی فلورسنت سفید تامین و در یک سیکل روشنایی- تاریکی ۱۳:۱۱ (Kim *et al*, 2004 and Band-Schmidt, 2004) و میزان نور نیز بصورت روزانه با یک دستگاه نورسنج (flurometer) مدل LX-1108 کنترل و تنظیم گردید.

۲-۶-۳- تعیین نرخ رشد

به منظور تعیین نرخ رشد، پس از پایان دوره آزمایش از هر تیمار در شرایط کاملاً استریل و پس از همگن کردن محتویات لوله‌های آزمایش، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه داخل لوله را با استفاده از پیپت پاستور کاملا استریل

برداشت نموده و بر روی لام شمارش سدویک رافتر ریخته و با استفاده از یک قطره محلول لوگل آن را فیکس و سپس با کمک یک دستگاه میکروسکوپ اینورت TS100 و یک دستگاه شمارشگر دیجیتال (LABTRON مدل LC-10) اقدام به شمارش و ثبت تعداد سلول‌های جلبکی و همچنین وضعیت تعداد سلول‌های تشکیل دهنده زنجیره بصورت روزانه مورد بررسی قرار گرفت. میزان نرخ رشد جلبک از رابطه زیر بدست آمد:

$$\mu = (Ln_{N2} - Ln_{N1}) / (t_2 - t_1)$$

که N_1 و N_2 تعداد سلول فیتوپلانکتونی در زمان‌های t_1 (روز اول) و t_2 (روز آخر) می‌باشد.

۳-۷-کشت و تولید انبوه جلبک *C. polykrikoides*

از انجائیکه کشت انبوه جلبک دینوفلاژلا برای اجرای پروژه های دیگر طرح تهدیدات بیولوژیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده است، از اینرو با توجه به حساسیت زیاد جلبک دینوفلاژلا نسبت به تغییرات محیطی و همچنین عدم در اختیار داشتن فرمولی مناسب جهت کشت انبوه، تیمارهای مختلف محیط کشت و همچنین ظروف جهت کشت انبوه جلبک خالص‌سازی شده در نظر گرفته شد. بدین منظور ظروف مختلفی از جمله گالن‌های شفاف ۲۰ لیتری، تانک‌های ۳۰۰ و ۱۰۰۰ لیتری PVC و آکواریوم‌های ۸۰-۶۰ لیتری مورد آزمایش قرار گرفت و نهایتاً از آنجا که کشت و نگهداری جلبک دینوفلاژلا شرایط محیطی بخصوصی در جهت دریافت نور وکنترل دمای محیطی را طلب می‌نماید، کشت در آکواریوم بهترین نتیجه را در برداشته و کشت انبوه در آکواریوم‌هایی با حجم ۶۰ لیتری صورت گرفت. بدین منظور، ابتدا ظروف ۲۰ لیتری حاوی آب دریای ۳۲ppt را توسط اتوکلاو استریل نموده و پس از خنک شدن و رسیدن به شرایط دمایی آزمایشگاه به داخل آکواریوم تخلیه و پس از اضافه نمودن محیط کشت و استوک جلبکی آکواریوم با پلاستیک پوشیده گردید. برای کشت جلبک دینوفلاژلا، قسمت پایین آکواریوم را تا ارتفاع ۳۰-۲۰ سانتی‌متر با استفاده از رنگ تیره یا نوار چسب پهن مشکی، تاریک نموده و همچنین از روز سوم یک جریان هوای ملایم بصورت حباب (هر۲ ثانیه یک حباب) جهت جلوگیری از چسبندگی جلبک‌ها به یکدیگر، به هنگام ازدحام در لایه بالایی سطح آب و همچنین به جدار شیشه آکواریوم، برقرار گردید. پس از کشت جلبک چنانچه شرایط محیطی در طول دوره مساعد باشد و دچار نوسانات زیاد بخصوص حرارتی نشود، جلبک از روز ۱۰ الی ۱۵ شروع به شکوفایی می‌نماید.

۳-۸- تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات و داده‌های بدست آمده در نرم‌افزار Excel وارد شده و نتایج توصیفی بصورت جدول و نمودار تهیه گردید. آنالیز آماری نتایج در برنامه SPSS و با بکارگیری آزمون پارامتری (آنالیز و واریانس یک‌راهه) و جهت مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون تفریقی Duncan استفاده گردید. سطح معنی‌دار بودن برای داده‌ها $p< 0.05$ در نظر گرفته شد.

۴- نتایج

۴-۱- نتایج مربوط به آزمایشات خالص سازی و کشت دینوفلاژلای *C. polykrikoides*

۴-۱-۱- محیط کشت ۱

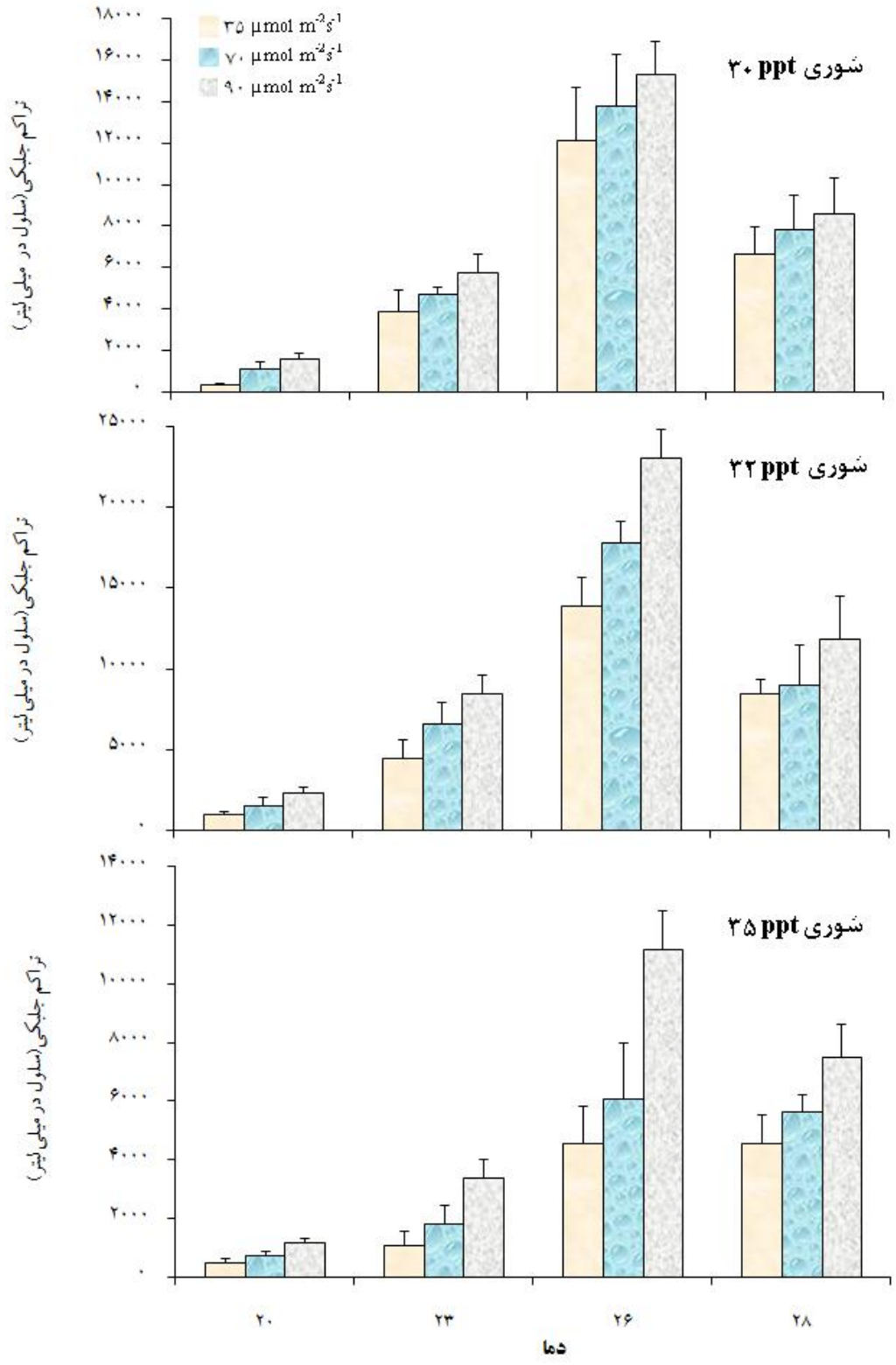
نتایج حاصل از بررسی میزان رشد جلبک *C. polykrikoides* در محیط کشت ۱ (پی‌نوشت ۳) و در معرض تیمارهای مختلف درجه حرارت، نور و شوری در شکل ۹ نشان داده شده است. میانگین تغییرات تراکم سلول جلبکی در این محیط کشت برابر با ۲۳۰۰۰ – ۱۰۰ سلول در میلی لیتر بوده که بیشترین آن در تیمار دمایی ۲۶ درجه سانتیگراد، شوری ۳۲ppt و نور ۹۰μmol $m^{-2}s^{-1}$ و کمترین آن در شوری ۳۰ppt و درجه حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد بدست آمده است. نتایج آنالیز واریانس یکراهه نیز نشان داد که در هر یک از تیمارهای مربوط به شوری و نورهای انتخابی بین تیمارهای دمایی از نظر میزان تراکم جلبکی اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$).

۴-۱-۲- محیط کشت ۲

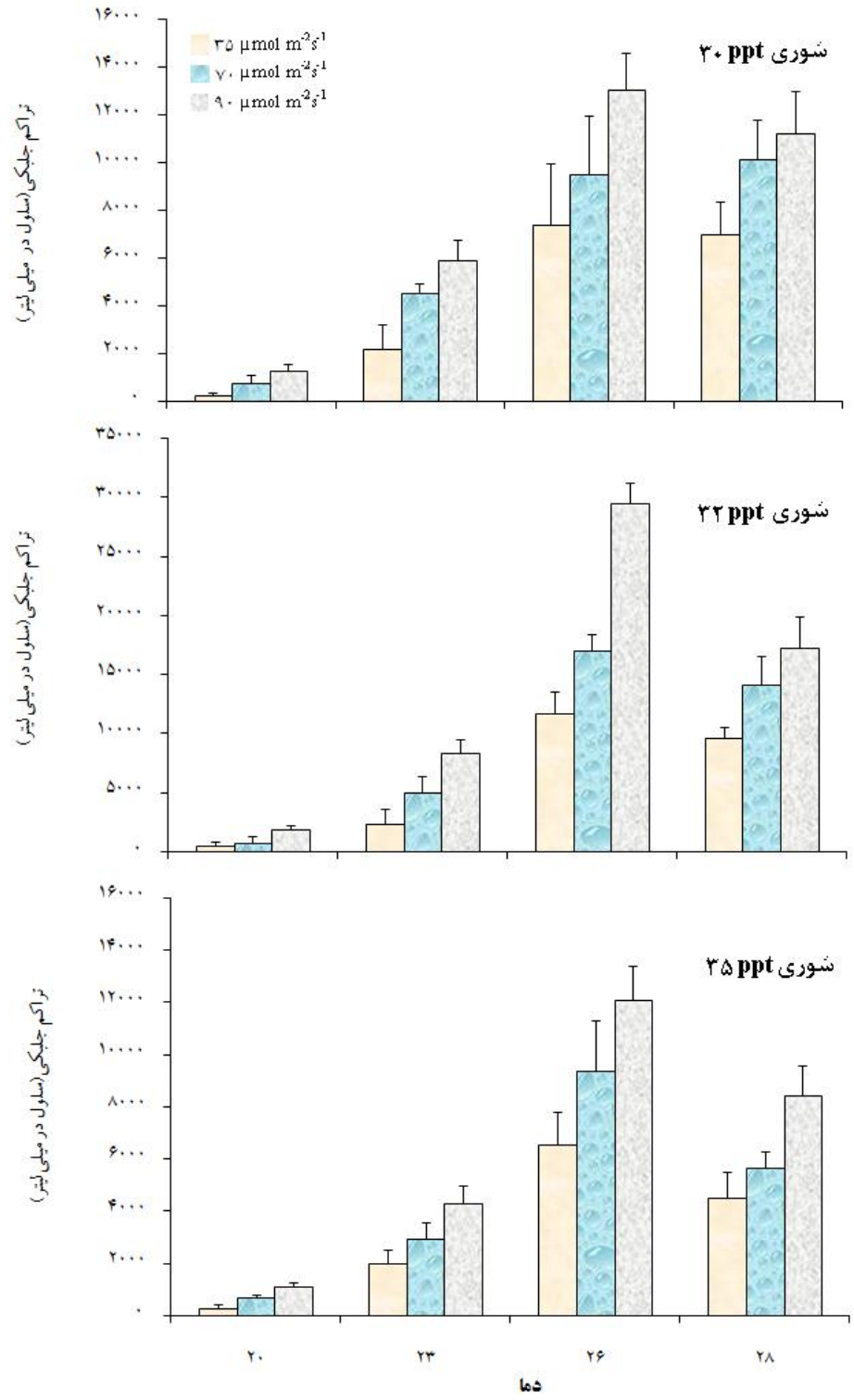
نتایج حاصل از بررسی اثر تیمارهای مختلف دمایی، نور و شوری بر روی میزان رشد جلبک دینوفلاژلای *C. polykrikoides* در محیط کشت ۲ (پی‌نوشت ۴) در شکل ۱۰ آمده است. نتایج نشان داد که در طی دوره بررسی، تغییرات تراکم سلول جلبکی در این محیط کشت برابر با ۲۹۰۰۰ – ۲۵۰ سلول در میلی لیتر بوده و بیشینه تراکم سلولی در تیمار دمایی ۲۶، شوری ۳۲ و نور ۹۰μmol $m^{-2}s^{-1}$ و کمترین آن در تیمار دمایی ۲۰، شوری ۳۰ ppt و نور ۳۵ μmol $m^{-2}s^{-1}$ مشاهده گردیده است.

۴-۱-۳- محیط کشت ۳

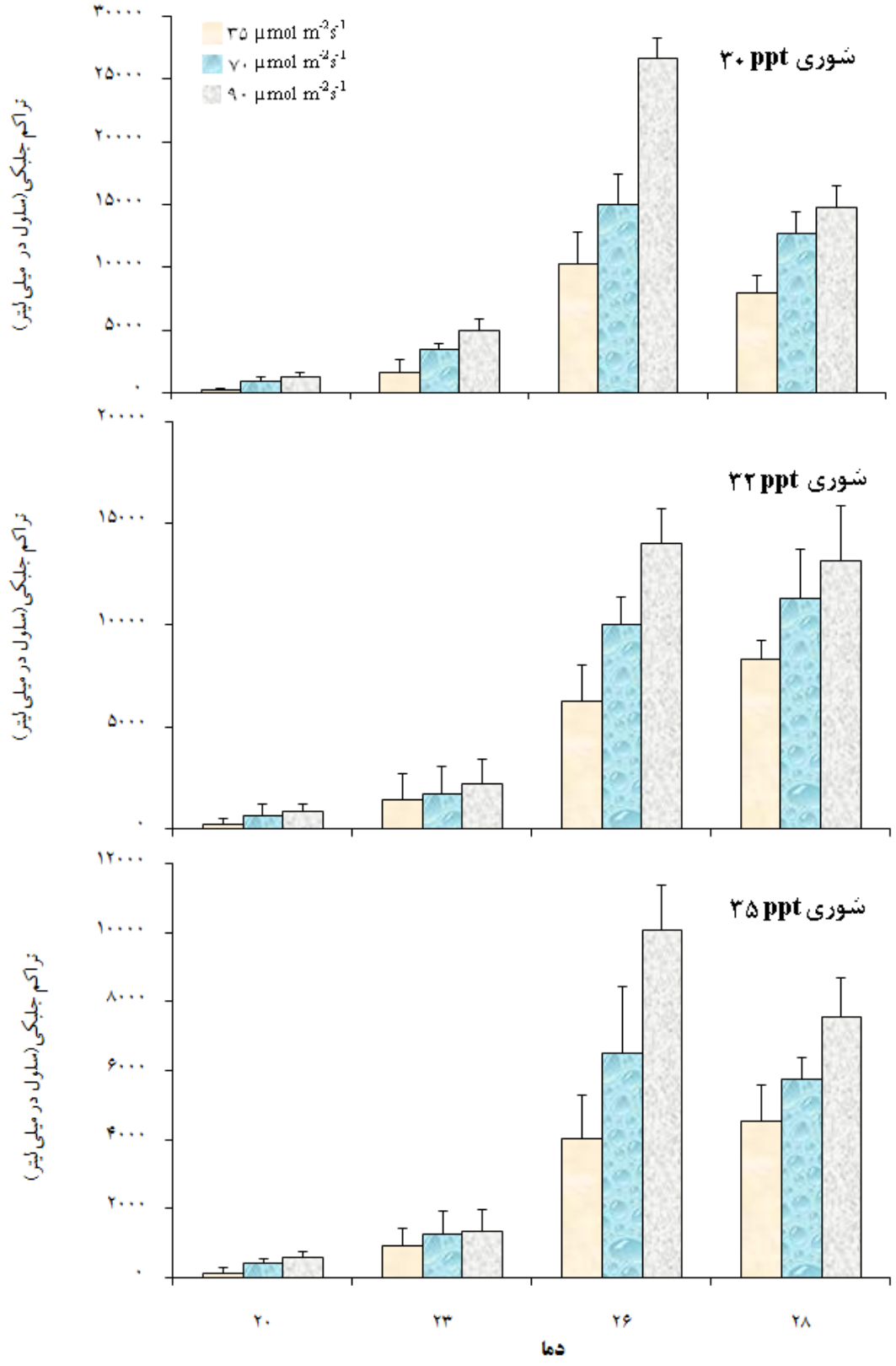
نتایج حاصل از بررسی اثر تیمارهای مختلف دمایی، نور و شوری بر روی میزان رشد جلبک دینوفلاژلای *C. polykrikoides* در محیط کشت ۳ (پی‌نوشت ۵) در شکل ۱۱ نشان داده است. محدوده تغییرات تراکم جلبکی بدست آمده در محیط کشت ۳ برابر با ۲۷۰۰۰ – ۱۰۰ سلول در میلی لیتر بوده که بیشترین آن در تیمار دمایی ۲۶، شوری ۳۰ ppt و نور ۹۰μmol $m^{-2}s^{-1}$ و کمترین آن در تیمار دمایی ۲۰، شوری ۳۵ppt و شدت نور mol $m^{-2}s^{-}$ ^{1} ۳۰μ بدست آمده است.



شکل ۹: تراکم سلول جلبک *C. polykrikoides* در تیمارهای مختلف دمایی، نوری و شوری در محیط کشت ۱



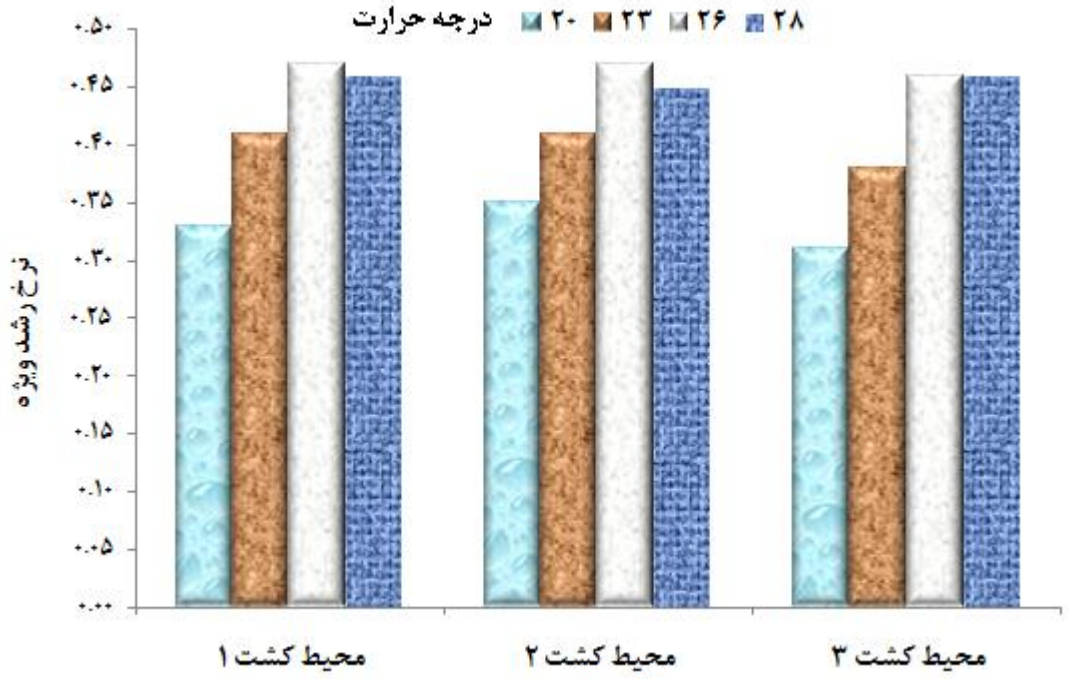
شکل ۱۰: تراکم سلول جلبک *C. polykrikoides* در تیمارهای مختلف دمایی، نوری و شوری در محیط کشت ۲



شکل ۱۱: تراکم سلول جلبک *C. polykrikoides* در تیمارهای مختلف دمایی، نوری و شوری در محیط کشت ۳

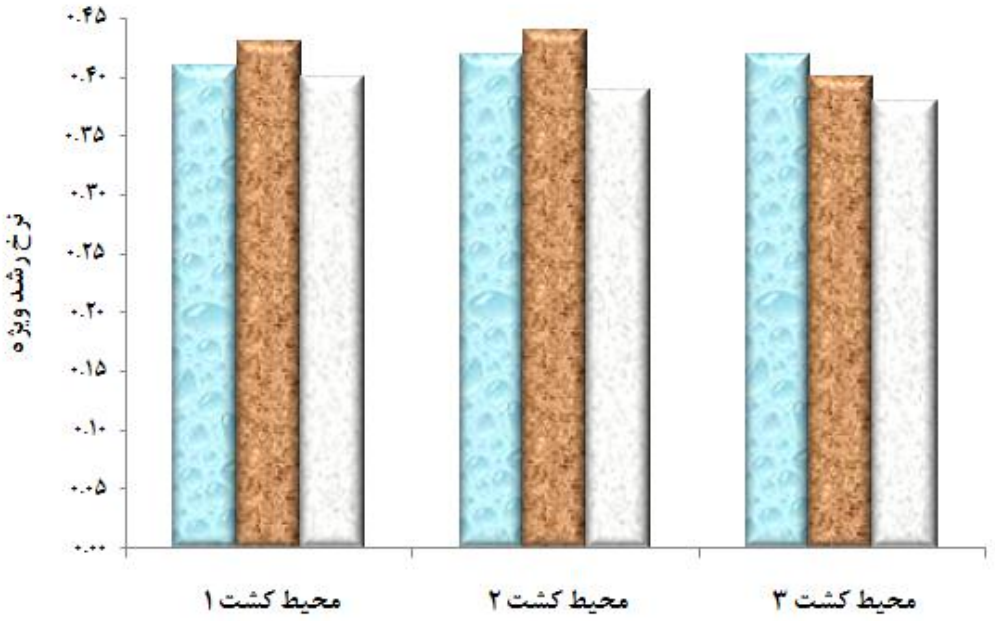
۴-۱-۴-نرخ رشد ویژه

شکل ۱۲ نتایج حاصل از نرخ رشد ویژه جلبک دینوفلاژلای *C. polykrikoides* در محیط کشت‌های مختلف و در معرض تیمار درجه‌حرارت را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، میانگین تغییرات نرخ رشد ویژه در طی دوره مورد مطالعه ۰/۴۸ – ۰/۳۱ بدست آمده است. بیشینه و کمینه نرخ رشد ویژه در تمام تیمارهای محیط کشت به ترتیب در دمای ۲۶ و ۲۰ درجه سانتیگراد بوده است.



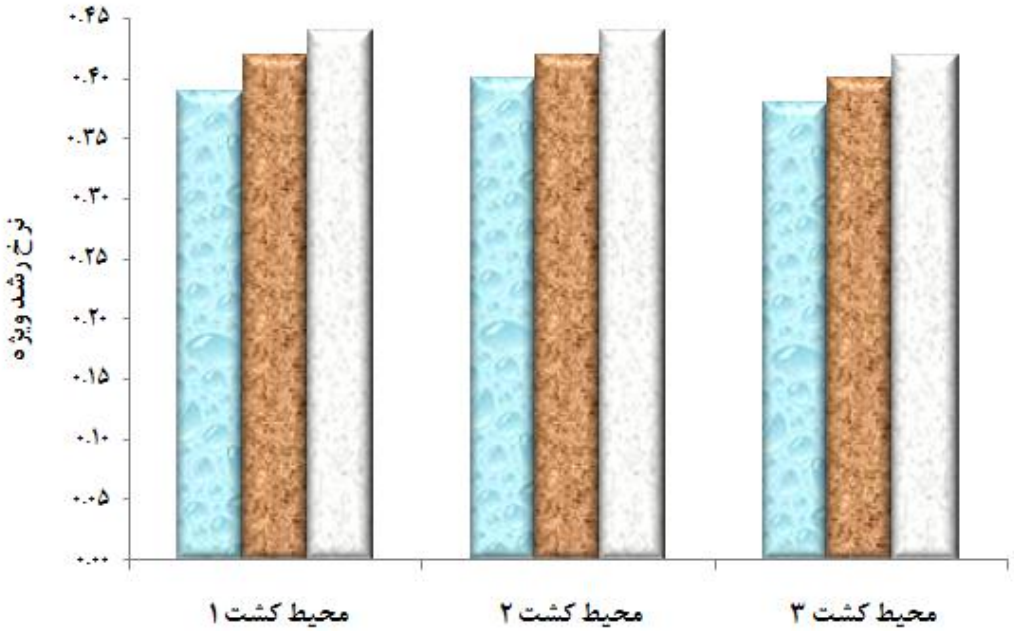
شکل ۱۲: نرخ رشد ویژه دینوفلاژلای *C. polykrikoides* در محیط کشت‌های مختلف و در معرض تیمار درجه‌حرارت

شکل ۱۳ نتایج حاصل از نرخ رشد ویژه جلبک دینوفلاژلای *C. polykrikoides* در محیط کشت‌های مختلف و در معرض تیمار شوری را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، بیشینه نرخ رشد ویژه در تیمار شوری ۳۲ و محیط کشت ۲ بدست آمده است.



شکل ۱۳: نرخ رشد ویژه دینوفلاژلای *C. polykrikoides* در محیط کشت‌های مختلف و در معرض تیمار شوری

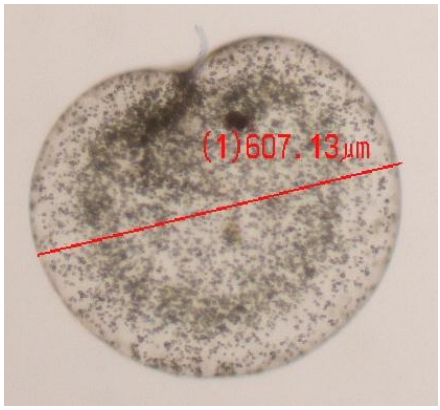
شکل ۱۴ نتایج حاصل از نرخ رشد ویژه جلبک دینوفلاژلای *C. polykrikoides* در محیط کشت‌های مختلف و در معرض تیمار نوری را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، بیشینه نرخ رشد ویژه در تیمار شدت نور ۹۰ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ بدست آمده است.



شکل ۱۴: نرخ رشد ویژه دینوفلاژلای *C. polykrikoides* در محیط کشت‌های مختلف و در معرض تیمار نور

۲-۴- نتایج بدست آمده در راستای خالص‌سازی دینوفلاژلای *N. scintillans*

این گونه از دینوفلاژلا تحت نام *Noctiluca scintillans* شناسایی گردیده است. رنگ این داینوفلاژلا سبز رنگ بوده که به خاطر حضور فیتوپلانکتون همزیست *Pedinomonas noctilucae* در آن می‌باشد. شکل سلول کروی و اندازه آن بیش از ۶۰۰ میکرون برآورد شده است (شکل ۱۵).



شکل ۱۵: شکل طبیعی دینوفلاژلای *Noctiluca scintillans*

با توجه به اینکه در منابع آمده است که این گونه از ریزجلبک‌های دیگری تغذیه می نماید، لذا اساس کار را پس از خالص‌سازی و کشت بر محور های زیر استوار گردید:

۱-۲-۴- خالص سازی همزمان این گونه با گونه همزیست داخل آن

در این مرحله ابتدا آب دریای تازه را از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده تا عاری از پلانکتون‌های احتمالی گردد. سپس آب را داخل ظروف استریل ریخته و سلول‌های جدا شده توسط پیپت به داخل این محیط جدید که حاوی محیط کشت های F ، $F/_2$ ، $F/_4$ و چند محیط کشت تغییر یافته از $F/_2$ که شامل A_1، A_2 و D_1 می‌باشد، در غالب تیمار های مختلف مورد بررسی قرار گرفت که فقط در محیط کشت $F/_4$ به مدت ۴ ماه و در طی چندین جابجایی زنده ماندند.

۲-۲-۴-خالص‌سازی این گونه بدون گونه همزیست

در این مرحله سعی بر این گردید تا هر کدام از این دو بصورت جدا گانه خالص‌سازی شود. بنابراین ابتدا پس از تهیه آب به روش بالا، در مرحله اول دینوفلاژلای *N. scintillans* محتوی گونه همزیست از آب دریا جدا شده و

به داخل آب دریای فیلتر شده منتقل گردید و پس از چند مرحله جابجایی زمانی که سلول جلبکی دینوفلاژلای *N. scintillans* تقریباً خالی از گونه همزیست گردید در این مرحله هر کدام از این دو گونه بصورت جداگانه به داخل آب دریای استریل شده به همرا محیط کشت های یاد شده بالا منتقل گردید که در این مرحله دینوفلاژلای *N. scintillans* بدون هیچ گونه تغییری در تعداد و با محیط کشت $F/_4$ تا ۳ هفته و گونه همزیست با همین محیط کشت بعد از ۱ ماه تقریباً به بلوم نسبی رسیده و بعد از آن به یکباره از بین رفت.

۳-۲-۴-خالص‌سازی همزمان این گونه با گونه همزیست به همراه هر یک از گونه‌های مذکور فوق

در این مرحله سلول‌های جلبکی دینوفلاژلای *N. scintillans* به همراه گونه داخل آن ابتدا طی ۴ مرحله و به فاصله یک هفته در داخل آب دریای فیلتر شده جابجا و کشت داده شد. سپس سلول‌های حاصل از این مرحله از کشت که تقریباً خالی از گونه همزیست بوده را در غالب تیمارهای مختلف از ۳ گونه جلبک آزمایشگاهی یاد شده به همراه محیط کشت $F/_4$ کشت داده شد که فقط به همراه ریزجلبک *Isocrysis galbana* به مدت تنها ۲ تا ۳ هفته زنده مانده و بعد از آن از بین رفتند.

در مجموع تلاش برای خالص‌سازی و کشت این گونه دینوفلاژلا به همراه گونه همزیست تا اواخر اسفند ۱۳۹۲ ادامه داشته و بعد از آن بدلیل گرم شدن هوا و عدم شکوفایی دوباره این جلبک در آب‌های ساحلی امکان ادامه کار میسر نگردید. از سویی دیگر پس از آن هیچگونه اعتباری برای اجرای پروژه پرداخت نشده و امکان ادامه کار میسر نگردید.

۵- بحث

در طی این مطالعه ۳ گونه از دینوفلاژلا *Noctiluca scintillans* ، *Protoperidinium* sp. و گونه *C. polykrikoides* که شکوفایی‌هایی پراکنده‌ای را در آب‌های ساحلی بندرعباس و جزیره قشم در پی داشت شناسایی گردید. از آنجائیکه آزمایشات مربوط به جداسازی و کشت دو گونه از دینوفلاژلا *Noctiluca scintillans* و *Protoperidinium* sp. بدلیل عدم تخصیص اعتبار لازم انجام نگرفته است از اینرو نتایج بدست آمده در ارتباط با جداسازی و کشت دینوفلاژلای *C. polykrikoides* مورد بحث قرار گرفته است.

از نقطه نظر اکولوژیک وقوع پدیده کشنده قرمز شامل ۳ مرحله می‌باشد. نخست افزایش تراکم سلول جلبکی، سپس عوامل محیطی مناسب از قبیل درجه حرارت، شوری، مواد مغذی عوامل که این پدیده را پشتیبانی می‌نمایند و درنهایت پایداری شکوفایی و جابجایی آن به وسیله جریانات باد و آب (Steidinger,1975). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیشینه میزان رشد جلبک *C. polykrikoides* در محیط کشت یک، در هر یک از تیمارهای انتخابی درجه حرارت، نور و شوری های مختلف به تیمار دمایی ۲۶ درجه سانتیگراد، شوری ۳۲ppt و نور μ۹۰mol $m^{-2}s^{-1}$ بوده است. این موضوع بیانگر آنست که این جلبک وابستگی شدید به عوامل محیطی بخصوص دما و شوری می باشد. Kim و همکاران (۲۰۰۴) نیز با اندکی اختلاف اپتیمم درجه‌حرارت ۲۵° C و شوری ۳۴ppt را برای این گونه بدست آورده و این عوامل محیطی را در بروز شکوفایی مهم دانسته‌اند. به نظر می‌رسد که این اختلاف اندک با توجه به شرایط اقلیمی خلیج‌فارس و آبهای دریایی کره امری کاملاً طبیعی باشد. نتایج آنالیز واریانس یکطرفه نیز نشان داد که در هر یک از تیمارهای مربوط به شوری و نور انتخابی بین تیمار های دمایی از نظر میزان تراکم جلبکی اختلاف معنی داری وجود دارد ($p<0/05$). همچنین نتایج فوق نشان داده است که مشارکت درجه حرارت از نقطه نظر معنی دار بودن، بیشتر از شوری و شوری نیز بیشتر از نور بوده است. نتایج مشابهی نیز توسط Kim و همکاران (۲۰۰۴) در مورد این گونه بدست آمده که درجه حرارت بیشترین تاثیر را بر روی رشد جلبک فوق الذکر داشته است. همچنین Xu و همکاران (۲۰۱۰) نتیجه مشابهی را بر روی گونه *Prorocentrum donghaiens* بدست آورده‌اند. نتایج حاصل در محیط کشت ۲ نیز همانند محیط کشت ۱ حاکی از این است که بیشینه تراکم سلول دینوفلاژلا در تیمار دمایی ۲۶، شوری ۳۲ و نور mol $m^{-2}s^{-}$ μ^{1}۹۰ به ثبت رسید است. در مطالعه ای که توسط Oh و همکاران در سال ۲۰۱۰ در رابطه با اثر درجه حرارت، شوری و نور بر روی داینوفلاژله *C. polykrikoides* صورت پذیرفت، به این نتیجه رسیدند که حداقل درجه حرارت برای زنده ماندن این گونه، ۱۵°C بوده و در شوری های پایین‌تر از ۲۵ و بالاتر از ppt ۳۵ قادر به رشد نمی باشند. همچنین Kim و همکاران (۲۰۰۴) با بررسی اثرات این سه فاکتور بر روی رشد این جلبک به این نکته اشاره نموده و بیان نمودند که این جلبک درجه‌حرارت و شوری‌های بالاتر را برای رشد ترجیح می‌دهد. نتایج آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد که نقش درجه حرارت در تولید بیشینه سلول جلبکی، بیشتر از شوری و شوری نیز بیشتر از نور بوده است. نتایج حاصل از بررسی میانگین های مربوط به میزان رشد جلبک *C.*

polykrikoides در محیط کشت ۳ در هر یک از تیمار ها ی انتخابی درجه حرارت، نور و شوری های مختلف نشان دادکه بیشترین تراکم سلول جلبکی در اینجا نیز مربوط به شوری ppt۳۰، درجه حرارت ۲۶ و نور $mol\ m^{-2}s^{-}$ ^{1}۹۰μ می‌باشد. از انجائیکه بیشترین تراکم سلول جلبکی در این محیط کشت در شوری ppt ۳۰ بدست آمده به نظر می‌رسد که این اختلاف می‌توند ناشی از متفاوت بودن محیط کشت ۳ با محیط کشت ۱و۲ از نظر نوع و مقادیر مواد تشکیل دهنده امری طبیعی بنظر برسد. به هرحال این گونه از نقطه نظر اکولوژیک می‌تواند در آبهای مناطق سردسیری و گرمسیری و در یک محدوده حرارتی و شوری مختلف پراکنش جهانی داشته و رشد و گسترش یابد (Kudela *et al*.,2008). این موضوع در مطالعه ای که توسط Yamaguchi و همکاران (۱۹۹۱) صورت گرفت بهترین درجه حرارت و شوری برای گونه *Chattonella antiqa* به ترتیب ۲۵ °C و ppt ۲۵ و برای گونه *Ch. Antique* ، ۲۵°C و ppt ۲۰ و برای گونه *Ch.verruculosa* ۱۵ °C و ppt ۲۵ توسط Yamaguchi و همکاران (۱۹۹۷) بدست آمد. از سویی دیگر علاوه بر شرایط محیطی برشمرده درجه‌حرارت، نور و شوری که می توانند در افزایش تراکم سلول و شکوفایی جلبک *C. polykrikoides* موثر باشد، نمی‌توان نقش مواد تشکیل دهنده محیط کشت در وقوع این پدیده را نادیده گرفت. Lee و Lee (۲۰۰۶) در مطالعه‌ای که بر روی بررسی فاکتورهای موثر بر پیدایش شکوفایی دینوفلاژلای *C. polykrikoides* انجام دادند، اظهار نمودند که ترکیبات مواد مغذی بکار رفته در محیط کشت F/2 همچون ویتامین‌های تیامین، biotin و B_{12}، املاح معدنی Mo ، Zn ، Cu ، Co ، Mn ، Fe، P و N هیچگونه دخالتی در شروع شکوفایی این جلبک نداشته و محیط کشت نمی‌تواند به تنهایی برای شکوفایی این دینوفلاژلا کارایی لازم را داشته باشد. با توجه به نتایج بدست آمده، از آنجائیکه در این مطالعه از ۳ نوع محیط کشت با مواد مغذی متفاوت استفاده شده است، بخصوص محیط کشت ۱و۲ که از تغییر محیط کشت F/2 حاصل شده و تمامی عناصر یاد شده را نیز در ترکیب خود دارا می‌باشد و تراکم‌های بالای از این جلبک را در بر داشته، استدلال Lee و Lee (۲۰۰۶) در آبهای خلیج‌فارس و دریای عمان چندان به واقعیت نزدیک باشد. از سوی دیگر یکی از ویژگی‌های متمایز گونه *C. polykrikoides* این است که در آبهای آزاد، جایی که آب کاملاً تمیز و دارای کمترین آلودگی باشد، وجود داشته و رشد و تکامل می‌یابند (Lee, 2006). این نکته در ارتباط با خلیج فارس، بخصوص نیمه شمالی آن که فعالیت های ناشی از صنایع نفت و گاز و پتروشیمی و دفع فاضلاب شهری و خانگی، یکی از مکان‌های نسبتاً آلوده از نظر فلزات سنگین و نیترات و فسفات می باشد به نظر درست نمی‌باشد چراکه شروع شکوفایی عظیم *C. polykrikoides* در سال ۱۳۸۷ در این مکان‌های آلوده از خلیج فارس رخ داده است. Lee و همکاران (۲۰۰۲) اظهار نمودند که شکوفایی داینوفلاژلاهای *Heterosigma akashiwo* و *Prorocentrum* Sp. عمدتاً در آب‌های آلوده صورت می‌گیرد. از سوی دیگر دینوفلاژلای *C. polykrikoides* یک گونه میکسوتروف بوده و علاوه بر استفاده از نوترینت‌های موجود در آب و انجام عمل فتوسنتز، از گونه‌های فیتوپلانکتونی با اندازه کمتر از ۱۱ میکرون از جمله دیاتومه *Isochrysis galbana* ، *Rhodomonas salina* ، دینوفلاژلای *Heterosigma akashiwo* و حتی *Amphidinium carterae* را نیز به شکل

هتروتروفی مورد تغذیه قرار داده و میزان تغذیه از این گونه‌های فیتوپلانکتونی نیز به میزان شدت نور یا نوترینت‌های قابل دسترس در آب بستگی دارد (Jeong *et al*.,2004; Stoecker,1999; Skovaard,2000). نتایج حاصل از بررسی و مقایسه نرخ رشد ویژه جلبک *C. polykrikoides* در محیط کشت‌های مختلف و تحت تیمارهای مختلف شوری نشان داد که اختلاف معنی‌داری در بین شوری ۳۰ ، ۳۵ در بین سه نوع محیط کشت از نظر میزان نرخ رشد ویژه وجود نداشته در صورتی که در شوری ۳۲ مابین محیط کشت ۳ با محیط کشت های ۱ و ۲ این اختلاف معنی دار بوده است ($p<0/05$). در مطالعه‌ای که بر روی *C. polykrikoides* بیشینه رشد ویژه توسط Oh و همکاران (۲۰۱۰) در شوری ۳۰ppt و توسط Kim و همکاران (۲۰۰۴) آن را در شوری ppt ۳۴ بدست آمده است. همچنین در مطالعه ای که توسط Matsubara و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی داینوفلاژلای *Akashiwo sanguine* صورت گرفت، بیشینه رشد ویژه این جلبک را در شوری ppt ۲۰ بدست آمده است. بررسی و مقایسه میانگین های مربوط به تغییرات نرخ رشد ویژه نشان داد که در هر یک از تیمار های دمایی (بجز دمای ۲۰درجه) هیچ اختلاف معنی داری مابین محیط کشت ها از نظر میزان نرخ رشد وجود ندارد. به هرحال نتایج نشان داد که بیشینه میزان نرخ رشد محاسبه شده مربوط در تمام محیط کشت‌ها در دمای ۲۶ درجه بدست آمده است. kim و همکاران (۲۰۰۴) بیشینه رشد ویژه جلبک *C. polykrikoides* را در درجه حرارت °C ۲۵ بدست آوردند که اندکی کمتر از مقدار بدست آمده در این مطالعه بوده است. همچنین Oh و همکاران (۲۰۰۷) بیشیه رشد ویژه را برای گونه *C. polykrikoides* در دمای °C ۲۰ و Matsubara و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای داینوفلاژلای *Akashiwo sanguine* را در دمای °C ۲۵ بدست آورده‌اند. بررسی نتایج حاصل از اثرات متقابل تیمارهای نوری مربوط به تغییرات نرخ رشد ویژه نشان داد که بیشترین میزان نرخ رشد بدست آمده متعلق به تیمار نوری ۹۰ در تمامی محیط کشت‌ها می‌باشد ولی اختلاف معنی‌داری در بین محیط کشت‌های مختلف مشاهده نگردید. از اینرو بطور کلی نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج بدست آمده توسط kim و همکاران (۲۰۰۴) که حداکثر رشد ویژه را در دمای °C ۲۵ و شوری ۳۴ و شدت نور $90 \mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ بدست آوردند با اندکی تفاوت قابل مقایسه می‌باشد. Xu و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیشینه رشد ویژه را برای گونه *Prorocentrum donghaiens*، در درجه حرارت °C ۲۷ بدست آورده است. همچنین Yamaguchi و همکاران (۱۹۹۷) مقدار رشد ویژه را برای داینوفلاژله *Heterocapsa circularisquama* در دمای °C ۳۰ و Yamamoto و همکاران (۲۰۰۲) برای گونه *Gymnodinium catenatum* در دمای °C ۲۵ و شوری ppt ۳۰ بدست آورده اند. در مطالعه دیگر Matsubara و همکاران (۲۰۰۷) بیشینه مقدار رشد ویژه را در درجه حرارت °C ۲۵ و شوری ppt ۲۰ و همچنین Oh و همکاران (۲۰۱۰) بیشیه این مقدار را در دمای °C ۲۰ و شوری ppt ۳۰ بدست آوردند. درجه حرارت می‌تواند تعیین کننده ویژه‌گی اکوتیپ‌های مختلف باشد (Hallegraeff and Fraga ,1998). به عنوان مثال بیشینه درجه‌حرارت ثبت شده برای گونه *Gymnodinium catenatum* در سواحل Colina، ۲۵ –۲۳ درجه سانتیگراد (Morales –Blake, 2000) و برای همین گونه در خلیج مکزیک °C ۲۹ –۲۱ گزارش شده است (Band-Schmidt *et al* .,2004).

۶-نتیجه‌گیری

نتایج حال از مطالعه اخیر نشان داد که دو گونه دینوفلاژلا *N. scintillans*، *Protoperidinium* sp. بر خلاف گونه *C. polykrikoides* با روش‌های مرسوم و محیط کشت‌های تغییر یافته موجود قابل کشت و جداسازی نمی‌باشد و از اینرو نیاز به روش جداسازی و خالص‌سازی و محیط کشت متفاوتی می‌باشد. دینوفلاژلای *C. polykrikoides* با توجه به حساس و نازک و ظریف بودن پوسته با استفاده از نورگرایی مثبت این دینوفلاژلا قابل جداسازی و در محیط کشت F/2 تغییر یافته با هوادهی حبابی و در ارلن‌هایی با حجم ۵-۰/۵ لیتری و همچنین در اکواریوم‌های ۶۰ لیتری قابل کشت و تولید انبوه می‌باشد.

با توجه به تراکم های نوری بررسی شده در این تحقیق، بهترین تراکم نوری برای رشد مناسب این جلبک برابر با $۹۰\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ (۶۵۰۰ لوکس) با دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بوده که توسط لامپ مهتابی سفید تامین می‌گردد. بر اساس نتایج بدست آمده ، بهترین درجه حرارت برای رشد و به تراکم رسیدن این جلبک، ۲۶-۲۵ درجه سانتی گراد می باشد. همچنین نتایج نشان داد که شوری بهینه برای رشد و شکوفایی این دینوفلاژلا در شرایط آزمایشگای شوری ppt ۳۲ می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نگارنده از جناب آقای دکترمحمد صدیق مرتضوی، ریاست محترم و همچنین مهندس رضا دهقانی معاونت محترم پژوهشی وقت پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان بخاطر حمایت های همه جانبه شان در جهت اجرای پروژه صمیمانه تشکر می نماید. از مشاور محترم پروژه آقای دکتر مرتضوی به خاطر راهنمایی‌های ارزنده‌شان کمال تشکر را دارم. از همکاران محترم بخش آبزی پروری و بخش آکولوژی که در در مراحل نمونه‌برداری و اجرای پروژه از ابتدا تا انتها نقش ویژه و موثری را داشته اند کمال تشکر را دارم. از رییس محترم وقت بخش آبزی پروری پژوهشکده جناب آقای مهندس حجت اله فروغی فرد به جهت هماهنگی و همکاری صمیمانه تشکر می نمایم. از همکاران محترم مالی آقایان غلام محسنی و سعید محمدی، قاسم حبیب اله زاده و سرکار خانم روشن و همچنین همکاران طرح و برنامه آقای محمد علی کریمی و سرکار خانم فخریه راهگل و همچنین همه عزیزان همکار اداری که به نوعی در اجرای این پروژه دخیل بوده از همگی آنها تشکر می نمایم.

منابع

- روحانی قادیکلایی،ک.، ۱۳۷۷. مطالعه کمی (کلروفیل a)، کیفی(ترکیب گونه ای) و نوسانات فصلی فیتوپلانکتون های آب های ساحلی جزیره لاوان . پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد شمال. کتابخانه پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان.

- Anderson, D.M.,1997. Turning back the harmful red tide. *Nature*, 388:513–514
- Band-Schmidt C.J.; Morquech L.; Lechuga-Deveze C.H. and Anderson D.M. 2004. Effect of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth *Gymnodinium Catenatum* from Bahia concepcion, Gulf of California, Mexico. *J. Plank. Res.*, 26:1459-1470.
- Beaulieu, S. E;Sengco,M.R and Anderson,D.M., 2005. Using clay to control harmful algal blooms: deposition and resuspension of clay/algal flocs. elsevier.com/locate/hol,17.09.2011.123-138.
- Chang M. and Kim W.S. 1997. Prologue and epilogue to the first international symposium on plankton blooms. *Ocean Res.*, 19:135–137.
- Cho E.S.; Kim C.S.; Lee S.G. and Chung Y.K. 1999. Binding of alcian blue applied to harmful Microalgae from Korean coastal waters. *Bull Natl Fish Res. Dev. Inst*., 55:133–138.
- Droop M.R. 1967. A procedure for routine purtification of algal cultures with antibiotics. *Brit. Phycol. Bul*, 3: l295-297.
- Du Q.; Huang Y. and Wang X. 1993. Toxic dinoflagellate red tide by a *Cochlodinium* sp. along the coast of Fujian, China. In Smayda, T. J. and Shimizu, Y. (eds), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. *Elsevier, New York*, 235–238.
- Garate-Liza´rraga L.; Bustillos-Guzma´n; J.J.; Morquecho L. and Lechuga-De´veze C. 2000. First outbreak of *Cochlodinium polykrikoides* in the Gulf of California. Harmful Algae News, *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO*, 21: 7.
- Gobler C.J.; Berry D.L.; Anderson O.R.; Burson A.; Koch F.; Rodgers B.S.; Moore L.K.; Goleski J.A.;Allam B Bowser P.; Tang Y.Z. and Nuzzi R. 2008. Characterization, dynamics, and ecological impacts of harmful *Cochlodinium polykrikoides* blooms on eastern Long Island, NY, USA. *Harmful Algae*, 7: 293–307.
- Guillard R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, W. L. and Chanley, M. H. (eds.), Cultures of Marine Invertebrate Animals. *Plenum Press, New York*, 29–60.
- Hallegraeff G. M. and Fraga S. 1998. Bloom dynamics of the toxic dinoflagellate Gymnodinium catenatum, with emphasis on Tasmanian and Spanish coastal waters. In Anderson, D. M., Cembella, A. D. and Hallegraeff, G. M. (eds.) *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, 41: 59–80.
- Imai I.; Ishida Y. and Hata Y. 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium Cytophaga sp., isolated from the coastal sea of Japan. *Mar Biol*, 116:527–532.
- Imai I.; Ishida Y.; Sakaguchi K. and Hata Y. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from northern Hiroshima Bay, Japan. *Fish Sci.*, 61:628–636.
- Jeong H.J.; Yoo Y.D.; Kim J.S.; Kim T.H.; Kim J.H.; Kang N.S. and Yih W. 2004. Mixotrophy in the Phototrophic Harmful Alga *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophycean): Prey Species, the Effects of Prey Concentration, and Grazing Impact. *J. Eukaryot Microbiol*, 51: 563–569.
- Kim C.H.; Cho H.J.; Shin J.B.; Moon C.H. and Matsuoka K. 2002. Regeneration from hyaline cysts of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae), a red tide organism along the Korean coast. *Phycologia*, 41, 667–669.
- Kim C.J.; Kim H.G.; Kim C.H. and Oh H.M. 2007. Life cycle of the ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Korean coastal waters. *Harmful Algae*, 6:104–111
- Kim D.I.; Matsuyama Y.; Nagasoe S.; Yamaguchi M.; Yoon Y.H.; Oshima Y.; Imada N. and Honjo T. 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate Cochlodinium polykrikoides Margalef (Dinophyceae). *J.plankton.Res*, 26: 61-66.
- Kim H.G. 1997. Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea. *Ocean Res.*, 19:185–192.
- Kim H.G. 1998. Harmful algal blooms in Korean coastal waters focused on three fish-killing dinoflagellates. In Kim, H. G., Lee, S. G. and Lee, C. K. (eds.), Harmful Algal Blooms in Korea and China. *National Fisheries Research and Development Institute, Pusan, Republic of Korea*, 1–20.

- Kim M.C.; Yoshinaga I. Imai I.; Nagasaki K. Itakura S. and Ishida Y. 1998. A close relationship between algicidal bacteria and termination of Heterosigma akashiwo (Raphidophyceae) bloom in Hiroshima Bay, Japan. *Mar Ecol Prog Ser*, 170:25–32.
- Kudela R.M.; Ryan J.P.; Blakely M.D.; Lane J.Q. and Peterson T.D. 2008. Linking the hysiology and ecology of *Cochlodinium* to better understand harmful algal bloom events: A comparative approach, *Harmful Algae*, 7: 278–292.
- Lee S.G.; Kim H.G.; Bae H.M.; Kang Y.S.; Jeong C.S.; Lee C.K.; Kim S.Y.; Kim C.S.; Lim W. A. and Cho U.S. 2002. Handbook of Harmful Marine Algal Blooms in Korean Waters. *Nat. Fish. Res. Devel. Inst., Republic of Korea*, 172p.
- Lee Y.S. and Lee S.Y. 2006. Factors affecting outbreaks of *Cochlodinium polykrikoides* blooms in coastal areas of Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 52: 626–634.
- Lovejoy C.; Bowman J.P. and Hallegraeff G.M. 1998. Algicidal effects of a novel marine Pseudoalteromonas isolate on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol*. , 64:2806–2813.
- Margalef R. 1961. Hidrografı´a y fitoplancton de un a´rea marina de lacosta meridional de Puerto Rico. Invest. *Pesq. Tomo*, 18: 33–96.
- Matsubara T.; Nagasoe S.; Yamasaki Y.; Shikata T.; Shimasaki Y.; Oshima Y. and Honjo T. 2007. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of thedinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 342: 226–230.
- Morales-Blake A.; Herna´ndez-Becerril D. and Cavazos-Guerra C. 2000. Registros de mareas rojas en las bahı´as de Manzanillo, Colima,Me´xico. In Rı´os-Jara, E., Jua´rez-Carillo, E., Pe´rez-Pen˜a,M., Lo´pez-Uriarte, E., Robles-Jarero, E. G., Herna´ndez-Becerril, D. U. and Silva-Briano, M. (eds), Estudios sobre el plancton en Me´xico y el Caribe. Sociedad *Mexicana de Planctologıay Universidad de Guadalajara, Guadalajara*, 81–82.
- Nagasoe S.; Kim D.; Shimasaki Y.; Oshima Y.; Yamaguchi M. and Honjo T. 2006. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the red tidedinoflagellate *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee. *Harmful Algae,* 5: 20–25.
- Oh S.J.; Kim C.H.; Kwon H.K. and Yang H.S. 2010. Effects of water temperature, salinity, and irradiance on the growth of harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Science,* 43:715-722.
- Rohani-ghadikolaei K.; Abdulalian E.; Aghajari N.; Aftabsavar Y. and Ng W.K. 2011. The effect of seaweed extracts, as a supplement or alternative culture medium, on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana. Aquacul. Res.*, 43:1487-1498.
- Rosales-Loessener F.; Matsuoka K.; Fukuyo Y. and Sanchez E. H. 1996. Cysts of harmful dinoflagellates found from Pacific coastal waters of Guatemala. In Yasumoto, T., Oshima, Y. and Fukuyo, Y. (eds), Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Sendai, 193–195.
- *Saito, H.; Furuya, K. and Lirdwitayaprasit, T. (2006). Photoautotrophic growth of* Noctiluca scintillans *with the endosymbiont* Pedinomonas noctilucae. *Plankton Benthos Res.* 2: 97–101.
- Skovgaard, A. 2000. A phagotrophically derivable growth factor in the plastidic dinoflagellate *Gyrodinium resplendens* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, 36:1069–1078.
- Steidinger, K.A. 1975. Basic factors influencing red tides. In LoCicero, V. R. (ed.), Proceedings of the First International Conference on Toxic Dinoflagellates. Massachusetts Science and Technology Foundation, Massachusetts, 153–162.
- Stoecker, D.K. 1999. Mixotrophy among dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46:397–401.
- Sunda W.G.; Graneli E. and Gobler C.J. 2006. Positive feedback and the developmentand persistence of ecosystem disruptive algal blooms. *J. Phycol.* 42: 963–974.
- Sweeney BM (1978) Ultrastructure of *Noctiluca scintillans* with green flagellate symbionts. *J. Phycol*., 14: 116–120.
- Tada, K., Pithakpol, S. and Montani, S. (2004) Seasonal variation in the abundance of *Noctiluca scintillans* in the Seto Inland Sea, Japan. Plank. Biol. Ecol., 51: 7–14
- Turkoglu M. and Erdogan Y. (2010) Diurnal variations of summer phytoplankton and interactions with some physicochemical characteristics under eutrophication in the Dardanelles. *Turkish Journal of Biology*, 34: 211–225.
- Xu N.; Duan S.; Li A.; Zhang C.; Cai Z.; Cai Z. and Hu Z. 2010. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful dinoflagellate Prorocentrum donghaiense Lu. *J. harmful algae,* 9: 13-17.

- Yamaguchi M. and Honjo T. 1989. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the noxious red tide flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 2029–2036.
- Yamaguchi M.; Imai I. and Honjo T. 1991. Effect of temperature, salinity and irradiance on the growth of the noxious red tide flagellate *Chattonella antiqua* and C. marina (Rhaphidophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 1277–1284.
- Yamaguchi M.; Itakura S.; Nagasaki K.; Matsuyama Y.; Uchida T.and Imai I. 1997. Effect of temperature and salinity on the growthof the red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and *Chattonella verruculosa* (Rhaphidophyceae). *J. Plankton Res.*, 19:1167–1174.
- Yamamoto T.; Oh S. and Kataoka Y. 2002. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay Japan. *Fisheries Science*, 68: 356-363.
- Yuki K. and Yoshimatsu S. 1989. Two fish-killing species of *Cochlodinium* from Harima Nada, Seto Inland Sea, Japan. In Okaichi, T., Anderson, D. M. and Nemoto, T. (eds), *Red Tides: Bio. Enviro. Sci., and Toxico.*, 451–454.

پیوست

پیوست ۱ : ترکیب و آماده سازی محیط کشت گیلارد

با اندکی تغییر بر گرفته از(Smith *et al.*, 1993)

Component	Stock Solution	Quantity	Conc. in Final Medium
$NaNO_3$	75 g L^{-1} dH_2O	1 mL	8.82×10^{-4} M
NaH_2PO_4 H_2O	5 g L^{-1} dH_2O	1 mL	3.62×10^{-5} M
Na_2SiO_3 $9H_2O$	30 g L^{-1} dH_2O	1 mL	1.06×10^{-4} M
trace metal solution	(see recipe below)	1 mL	---
vitamin solution	(see recipe below)	0.5 mL	---

Trace metal solution

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Conc. in Final Medium
$FeCl_3$ $6H_2O$	---	3.15 g	1.17×10^{-5} M
Na_2EDTA $2H_2O$	---	4.36 g	1.17×10^{-5} M
$CuSO_4$ $5H_2O$	9.8 g L^{-1} dH_2O	1 mL	3.93×10^{-8} M
Na_2MoO_4 $2H_2O$	6.3 g L^{-1} dH_2O	1 mL	2.60×10^{-8} M
ZnSO4 $7H_2O$	22.0 g L^{-1} dH_2O	1 mL	7.65×10^{-8} M
$CoCl_2$ $6H_2O$	10.0 g L^{-1} dH_2O	1 mL	4.20×10^{-8} M
$MnCl_2$ $4H_2O$	180.0 g L^{-1} dH_2O	1 mL	9.10×10^{-7} M

Vitamin solution

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
Thiamine HCl (vit. B_1)	---	200 mg	2.96×10^{-7} M
Biotin (vit. H)	0.1 g L^{-1} dH_2O	10 mL	2.05×10^{-9} M
Cyanocobalamin (vit. B_{12})	1.0 g L^{-1} dH_2O	1 mL	3.69×10^{-10} M

پیوست ۲ : ترکیب و آماده سازی محیط کشت والن (با اندکی تغییر بر گرفته از Laing, 1991)

Constituents	**Quantities**
Solution A (at 1 ml per liter of culture)	
Ferric chloride ($FeCl_3$)	0.8 g[(a)]
Manganous chloride ($MnCl_2$, $4H_2O$)	0.4 g
Boric acid (H_3BO_3)	33.6 g
EDTA[(b)], di-sodium salt	45.0 g
Sodium di-hydrogen orthophosphate (NaH_2PO_4, $2H_2O$)	20.0 g
Sodium nitrate ($NaNO_3$)	100.0 g
Solution B	1.0 ml
Make up to 1 litre with fresh water[(c)]	Heat to dissolve
Solution B	
Zinc chloride ($ZnCl_2$)	2.1 g
Cobaltous chloride ($CoCl_2$,6 H_2O)	2.0 g
Ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$)	0.9 g
Cupric sulphate ($CuSO_4$, $5H_2O$)	2.0 g
Concentrated HCl	10.0 ml
Make up to 100 ml fresh water[(c)]	Heat to dissolve
Solution C (at 0.1 ml per liter of culture)	
Vitamin B_1	0.2 g
Solution E	25.0 ml
Make up to 200 ml with fresh water[(c)]	
Solution D (for culture of diatoms-used in addition to solutions A and C, at 2 ml per liter of culture)	
Sodium metasilicate (Na_2SiO_3, $5H_2O$)	40.0 g
Make up to 1 litre with fresh water[(c)]	Shake to dissolve
Solution E	
Vitamin B_{12}	0.1 g
Make up to 250 ml with fresh water[(c)]	
Solution F (for culture of *Chroomonas salina* - used in addition to solutions A and C, at 1 ml per liter of culture)	
Sodium nitrate ($NaNO_3$)	200.0 g
Make up to 1 litre with fresh water[(c)]	

پیوست ۳ : ترکیب و مواد تشکیل دهنده محیط کشت F/2 تغییر یافته (محیط کشت۱)

محلول p_1	
آب مقطر	۱۰۰۰ ml
EDTA	۰/۸ gr
$MnCl_2.4H_2O$	۰/۷ gr
$CoCL_2.6H_2O$	۰/۰۰۵ gr
$ZnCL_2$	۰/۰۶ gr
H_2SeO_3	۲۰۰ µgr
محلولp_2	
آب مقطر	۱۰۰۰ ml
H_3BO_3	۱۳ gr
محلول ویتامین	
آب مقطر	۱۰۰۰ ml
B_1	۲ gr
B_{12}	۰/۲ mg
Biotin	۰/۲ mg
محلولP_3	
Sea water	۲۰۰۰ ml
$NaNO_3$	۰/۴ gr
$NaH_2PO_4.2H_2O$	۰/۰۴ gr
Na_3EDTA	۰/۰۳ gr
FeEDTA	۰/۰۰۲ gr
Tris (hydroxymethyl amino methane)	۰/۸ gr
P_1	۱۶ ml
P_2	۸ ml
Vitamin mixture solution	۱ ml

پیوست ۴ : ترکیب و مواد تشکیل دهنده محیط کشت F/2 تغییر یافته (محیط کشت۲)

محلول p_1	
آب مقطر	۱۰۰۰ ml
EDTA	۰/۸ gr
$MnCl_2.4H_2O$	۰/۷ gr
$CoCL_2.6H_2O$	۰/۰۰۵ gr
$ZnCL_2$	۰/۰۶ gr
H_2SeO_3	۲۰۰ µgr
محلول p_2	
آب مقطر	۱۰۰۰ ml
H_3BO_3	۶/۵ gr
محلول ویتامین	
آب مقطر	۱۰۰۰ ml
B_1	۲ gr
B_{12}	۰/۲ mg
Biotin	۰/۲ mg
محلول P_3	
Sea water	۲۰۰۰ ml
$NaNO_3$	۰/۴ gr
$NaH_2PO_4.2H_2O$	۰/۰۴ gr
Na_3EDTA	۰/۰۳ gr
FeEDTA	۰/۰۰۲ gr
Tris (hydroxymethyl amino methane)	۰/۸ gr
P1	۸ ml
P2	۴ ml
Vitamin mixture solution	۰/۵ ml
Ampicilin	۴۰۰ µg
Kanamycin	۱/۶ mg
Neomycin	۱/۶ mg

پیوست ۵ : ترکیب و مواد تشکیل دهنده محیط کشت F/2 تغییر یافته (محیط کشت۳)

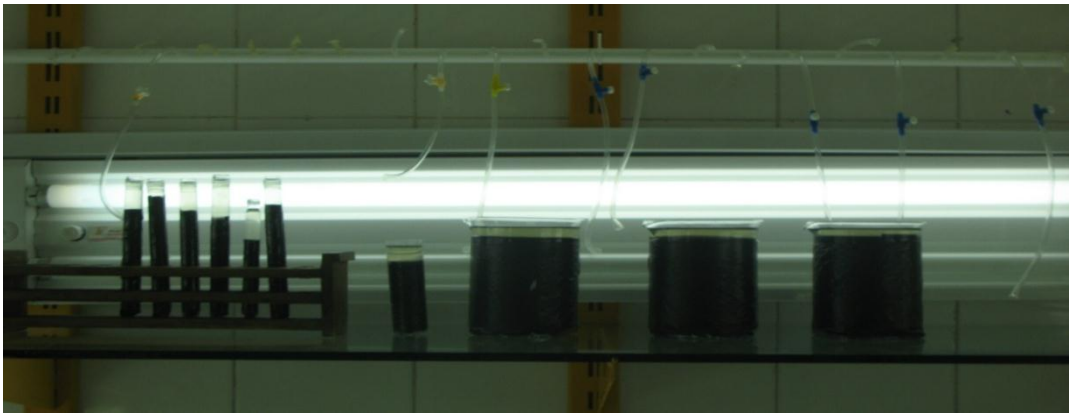
محلول p_1	
آب مقطر استریل	۵۰۰ ml
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$	۳۵۱ ml
Na - EDTA	۳۰۰ ml
محلول p_2	
آب مقطر استریل	۱۰۰ ml
Na_2EDTA	۱۰۰ mg
H_3B0_3	۱۱۴ mg
$FeCl_3.6H_2O$	۴/۹ mg
$MnSO_4.H_2o$	۱۶/۴ mg
$ZnSO_4.7H_2o$	۲/۲ mg
$CoSO_4.7H_2o$	۰/۴۸ mg
محلول p_3	
$NaNo_3$	۳۵۰ mg
Na glycerophosphate.$5H_2o$	۵۰ mg
P_1	۲۵ ml
P_2	۲۵ ml
Vitamin B_{12}	۱۰ µg
Thimine	۰/۵ mg
biotin	۵ µg
Tris	۵۰۰ mg

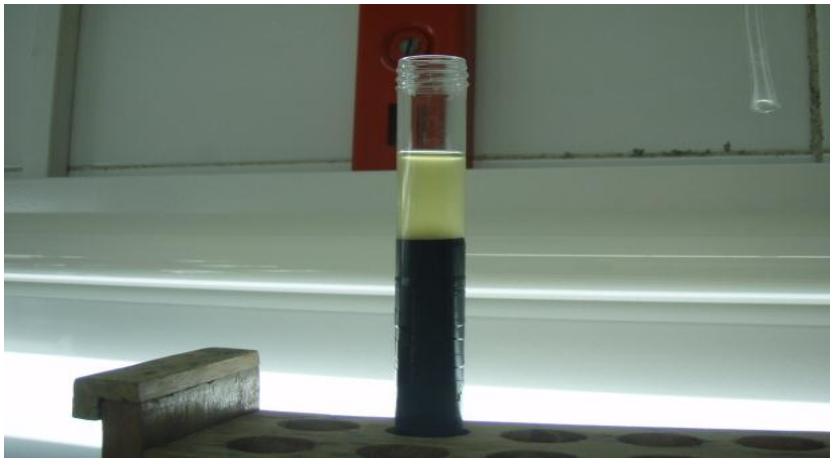
۲۰ میلی لیتر از محلول p_3 به ۱ لیتر آب دریای استریل شده اضافه می شود.

پیوست ۶ : ترکیب و مواد تشکیل دهنده محیط کشت F/2تغییر یافته جهت کشت انبوه در داخل آکواریوم

محلول p_1	
آب مقطر	۱۰۰۰ ml
EDTA	۰/۰۵ gr
$MnCl_2.4H_2O$	۰/۴ gr
$CoCL_2.6H_2O$	۰/۰۳ gr
$ZnCL_2$	۰/۰۵ gr
H_2Seo_3	۲۰۰ µg
محلولp_2	
آب مقطر	۱۰۰۰ ml
H_3BO_3	۱۸/۶ gr
محلول ویتامین	
آب مقطر استریل	۵۰۰ ml
B_1	۱ gr
B_{12}	۱۵۰ µg
Biotin	۱۵۰ µg
محلولP_3	
Sea water	۱۰۰۰ ml
$NaNO_3$	۰/۲ gr
$NaH_2PO_4.2H_2O$	۰/۰۲ gr
Na_3EDTA	۰/۰۱۵ gr
FeEDTA	۰/۰۰۱ gr
Tris (hydroxymethyl amino methane)	۰/۰۲ gr
P1	۱۲ ml
P2	۵ ml
Vitamin mixture solution	۰/۵ ml

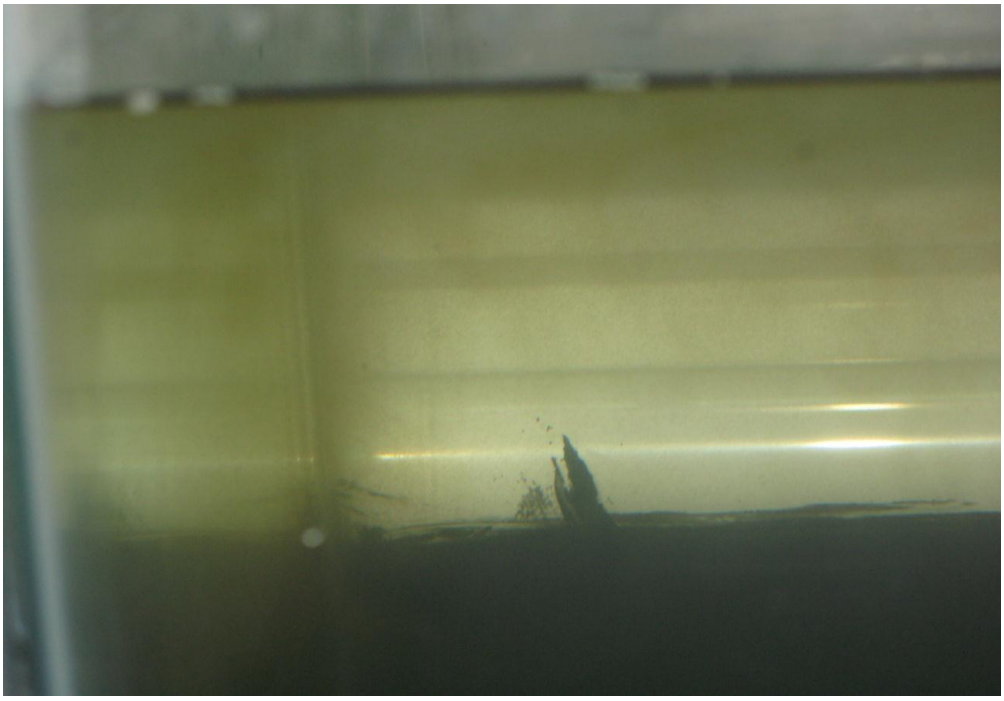
پیوست۷: ظروف تیره شده جهت خالص سازی جلبک *Choclodinium polykrikoides*

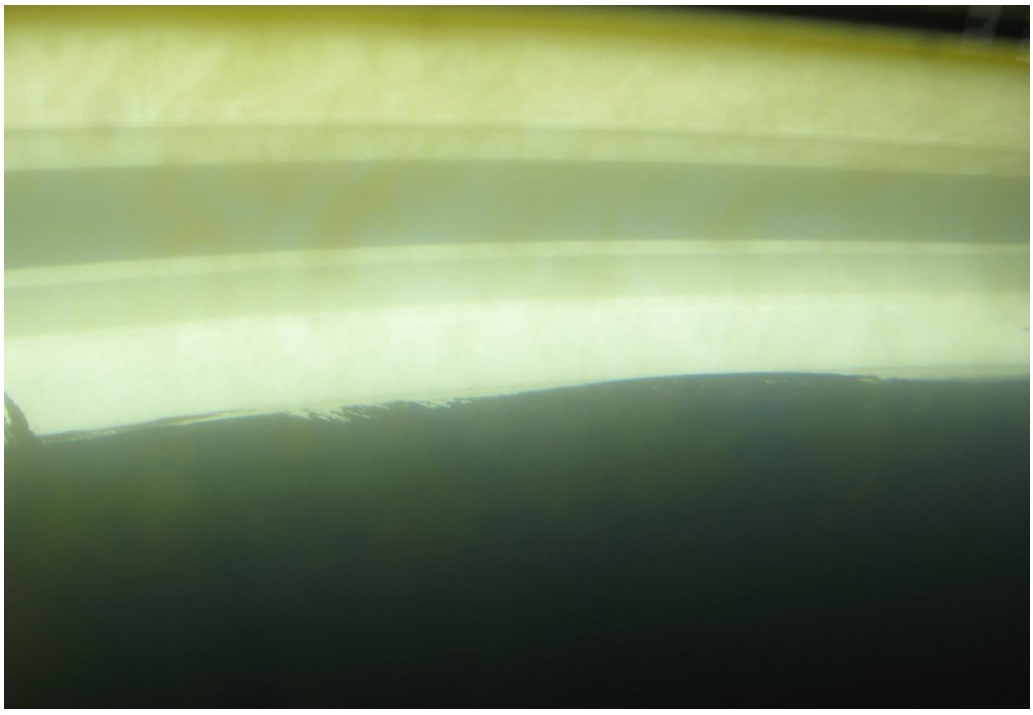


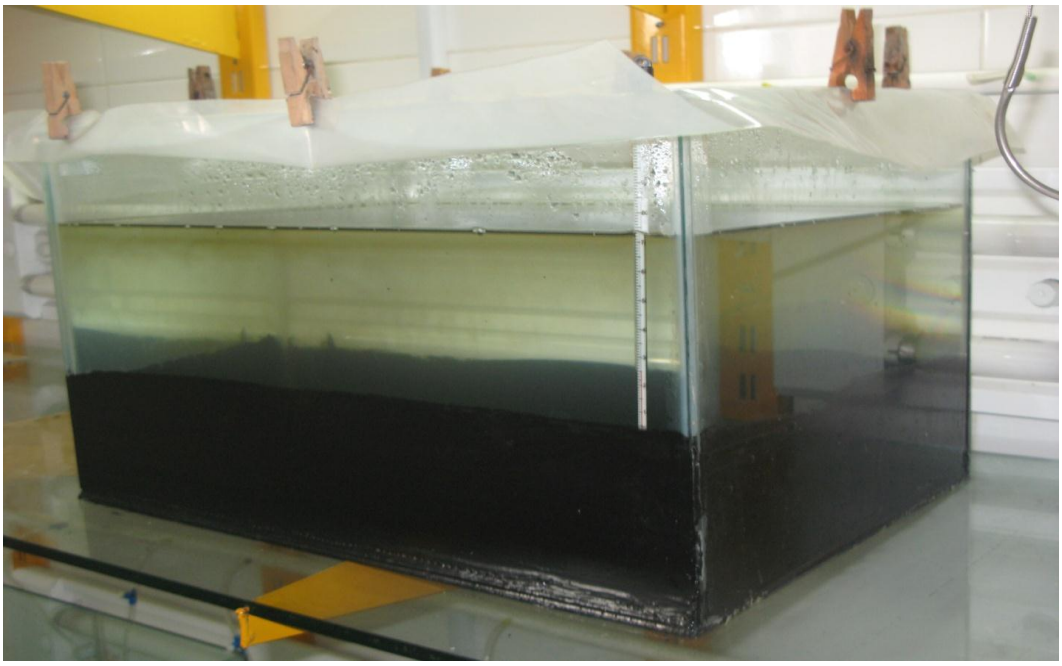


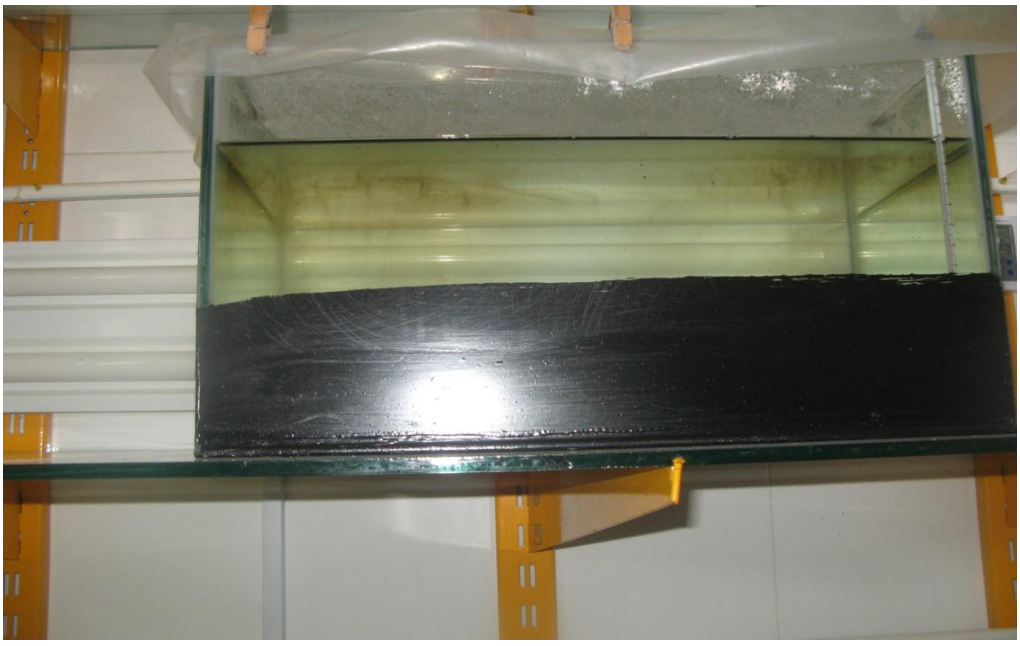
سلول های حاصل از خالص سازی و کشت در محیط آزمایشگاه *Choclodinium polykrikoides*

پیوست ۸ : آکواریوم های محتوی جلبک بلوم کرده *Choclodinium polykrikoides*









Abstract:
Although the most alga blooms usually provide positive impacts on marine ecosystems, but blooming of certain species of algae may also have negative impacts which evidence suggests that over the past few decades the frequency and duration of Harmful Algal Blooms (HABs) have been increasing both nationally and worldwide. Harmful algal blooms of *Cochlodinium polykrikoides* in the Persian Gulf and Oman Sea were first observed in 2008. In order to provide optimum growth and bloom forming, *C. polykrikoides* cells were sampled during the bloom conditions in the coastal waters of Bandar Abbass, Qeshm and Hourmoz Islands from March 2012 to June 2015. After sampling, the samples transferred to Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute phytoplankton Lab and adapted to filtered seawater. In Phycolab, they isolated and purified by positive phototropism characteristic of species to light. They were grown in modified media culture at different salinities (30, 32 and 35ppt), temperatures (20, 23, 26 and 28ºC) and intensities (35, 70 and 90 µmol $m^{-2}s^{-1}$). During this study 3 Dinoflagellates species were identified in Hormozgan Coastal waters. The first species was *Noctiluca scintillans*. This species was alive in F/4 media culture and under the 32ppt salinity, 25°C temperature, and an 11h light: 13h dark photoperiod regime only for 4 months. The second species was *Protoperidinium quinquecorne* and produced temporal blooms that could not be isolated under usual and modified media cultures. The last Dinoflagellates species that caused spreading blooms in Hormozgan Coastal waters and could be possible to isolate was *Cochlodinium polykrikoides*. The results clearly showed that the best media culture for growth of this species is A2 and the highest alga biomass was obtained following culture under the 32ppt salinity, 26°C temperature, and under an 11h light: 13h dark photoperiod regime at a light intensity of 90 µmol $m^{-2}s^{-1}$ provided by cool white fluorescent tubes. Maximum cell density of *C. polykrikoides* in a 5 liter Erlenmeyer for 12 days reached to 1.6×10^6 cell L^{-1} with 2-12 and occasionally to 16 cells chain. Based on the results from the present study, providing suitable media culture and physical condition, bloom forming of *C. polykrikoides* start from day 8 and will be continued until day 24.

Keywords: Harmful algae blooms, isolation, Dinoflagellates, Persian Gulf

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

---

Project Title : Determination of effective parameters on growth and bloom forming of *Cochlodinium polykrikoides*
Approved Number: 2-75-12-91120
Author: Kiuomars Rohani Ghadikolaei
Project Researcher : Kiuomars Rohani Ghadikolaei
Collaborator(s) *:* Eesa Abdolalian, Maryam Moezzi, Hojatolah Fourooghi fard, Masoud Gharibnia, Reza Dehghani, Mahnaz Rabbaniha
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Hormozgan province
Date of Beginning : 2012
Period of execution : 3 Years
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2018

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 - Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center

Project Title :

Determination of effective parameters on growth and bloom forming of *Cochlodinium polykrikoides*

Project Researcher :

Kiuomars Rohani Ghadikolaei

Register NO.
52608