علوم و تکنولوژی محیط زیست ، دوره هفدهم، شماره دو، تابستان ۹۴

تعیین نسبت ازت به فسفر در شکوفایی جلبک سبز-آبی *Anabaena flos- aquae* دریای خزر در محیط آزمایشگاه

مریم فلاحی[۱]
سید محمد رضا فاطمی[۲]
علی ماشینچیان[۳]
آتوسا نوری کوپائی[۴*]
atoosa.noori.koupaei@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۲ تاریخ پذیرش:۸۸/۹/۲۱

چکیده

مقدمه: طی این مطالعه نسبت وزنی از ازت به فسفر که منجر به حداکثر شکوفایی و عدم شکوفایی جلبک سبز- آبی *Anabaena flos-aquae* می گردد، تعیین گردید. جهت تکمیل مطالعات، تاثیر غلظت‌های متفاوت فسفر بر میزان رشد مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: آزمایشات طی زمان ۹۶ ساعت در شرایط آزمایشگاهی (شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس و درجه حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد)، انجام شد. تیمارهای متفاوت با نسبت های مختلف ازت به فسفر یا غلظت‌های مختلف فسفر(بر اساس نوع آزمایش) همراه با شاهد (محیط کشت استاندارد زایندر)، هر یک در ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در ابتدا و انتهای آزمایش تعداد رشته‌های جلبک آنابنا با استفاده از لام توما شمارش شد و درصد رشد محاسبه گردید.

نتایج: آنابنا در محلول شاهد (زایندر) با نسبت ازت به فسفر ۱: ۰/۰۰۳۳ ، غلظت ازت $\mu g.L^{-1}$ ۹/۹ و غلظت فسفر $mg.L^{-1}$ ۲/۹۶ تشکیل شکوفایی داد لیکن نسبت ازت به فسفر در دامنه ی ۱: ۱۵ تا ۱: ۲۲ منجربه حداکثر شکوفایی گردید. بیشترین میزان درصد رشد در نسبت ازت به فسفر ۱: ۱۸/۱۵ با غلظت ازت $mg.L^{-1}$ ۵۳/۷۲ و غلظت فسفر $mg.L^{-1}$ ۲/۹۶ مشاهده شد و در این نسبت به ۱۴۸۶/۶۹ ±۵۲۱۹/۸۴ رسید. با افزایش هر چه بیشتر نسبت ازت به فسفر درصد رشد کاهش یافت. از نسبت ۲۱۸/۸۶:۱به بالا شکوفایی متوقف گردید. آزمایشات مطالعه بر روی غلظت فسفر نشان داد که غلظت فسفر در محیط کشت زایندر (۲/۹۶ میلی گرم در لیتر) مناسب ترین غلظت برای شکوفایی آنابنا است.

۱ - دانشیار، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، بندر انزلی
۲ - استادیار، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، دانشکده علوم و فنون دریایی،گروه بیولوژی دریا
۳ - استادیار، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، دانشکده علوم و فنون دریایی،گروه بیولوژی دریا
۴- دکتری، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، دانشکده علوم و فنون دریایی،گروه بیولوژی دریا *(مسئول مکاتبات)

Archive of SID
www.SID.ir

بحث و نتیجه گیری: بر اساس این نتایج هنگام وجود فسفر به میزان بهینه، آنابنا با کمک گرفتن از توانایی خود در تثبیت ازت اتمسفری قادر است در غلظت‌های پایین ازت تشکیل شکوفایی دهد (محلول شاهد) لیکن حضور مقادیر کافی هر دو نوترینت ازت و فسفر در نسبت ازت به فسفر پایین برای دستیابی به حداکثر شکوفایی لازم است.

واژه های کلیدی: جلبک سبز، آبی *Anabaena flos- aquae*، نسبت ازت به فسفر، شکوفایی جلبکی، درصدرشد، فراوانی هتروسیست

مقدمه

تجمع بیومس سیانوباکترها (جلبک های سبز- آبی) به صورت شکوفایی در آب های شیرین، لب شور یا شور یکی از آشکارترین و مشکل سازترین نشانه‌های غنی شدن پیکره‌های آبی با مواد مغذی انسان ساز است(۱). شکوفایی سیانوباکتریایی معمولاً در نتیجه‌ی افزایش مواد مغذی یعنی ازت و فسفر روی می‌دهد(۲).

فسفر و ازت مواد مغذی محدود کننده در سیستم‌های آبی هستند اما احتمال این که رشد فیتوپلانکتون توسط این عناصر محدود شود بسیار کم است چون معمولاً مقادیر این عناصر در اکوسیستم‌های دریایی بیش از حد مورد نیاز است. این عناصر از طریق پساب‌های صنعتی، کشاورزی و خانگی وارد اکوسیستم‌های آبی شده و نتیجه‌ی آن افزایش روز افزون شکوفایی سیانوباکتریایی است (۳). سیانوباکترها در تراکم‌های بالا منجر به تغییر رنگ آب (۴) و ایجاد طعم و بو در آب می‌گردند. در نتیجه به زیبایی اکوسیستم آسیب رسانده و به سبب شرایطی که پس از تجزیه شدنشان به وجود می‌آید (کاهش اکسیژن محلول و غلظت آمونیاک بالا) و یا تولید سم سبب مرگ جانداران آبزی می‌گردند (۵).

ورود مواد مغذی به پیکره های آبی سبب تغییر در نسبت ازت به فسفر می گردد. نسبت $\frac{N}{P}$ به عنوان عامل مهمی در ارتباط با حضور جلبک‌های سیانوباکتر عنوان می‌شود(۴).

وقوع شکوفایی‌ها از گذشته مرتبط با نسبت ازت به فسفر پایین بوده است که در نتیجه‌ی غلظت بالای فسفر در لایه‌ی پایینی فاقد اکسیژن یا دارای اکسیژن محلول بسیار کم روی می‌دهد. دنیتریفیکاسیون ازت معدنی را از سیستم بر می‌دارد در حالی که شرایط بی هوازی جریان جداسازی فسفات از رسوبات بستر را تحریک می‌کند (۶). از آن جایی که کمبود ازت مانع از رشد فیتوپلانکتونی که تثبیت ازت نمی‌کند می گردد، نسبت ازت به فسفر پایین شاخص خوبی برای شکوفایی سیانوباکترهای تثبیت کننده ازت است (۴، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱).

Smith و همـــکاران در سال ۱۹۹۵ طی بررسی بر روی دریاچه های متفاوت در سراسر جهان دریافتند که سیانو-باکترهای تثبیت کننده ازت در دریاچه هایی با نسبت ازت به فسفر زیر ۲۲:۱ غالب می شوند(۵).

برخلاف سایر فیتوپلانکتون سیانوباکترهای تثبیت کننده ازت مستقل از منبع ازت مانند نیترات و آمونیوم هستند(۸). سیانوباکترها دارای سلول های ویـژه ای به نـــام هتروسیست می باشند. هتروسیست در این رشته‌های سیانوباکتریایی حاوی آنزیم نیتروژناز بوده که می تواند ازت مولکولی هوا را در غیاب اکسیژن به آمونیاک تبدیل نماید (۱۲) در نتیجه از آن جایی که سیانوباکترها توسط ازت محدود نمی‌شوند آغاز شکوفایی آن‌ها در جایی که فسفر در دسترس باشد روی می‌دهند (۱۳) . افزایش فسفر عامل اصلی و عمده بروز پدیده شکوفایی سیانوباکتریایی است (۶، ۷، ۸ ، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۴، ۱۵).

ســـال‌های زیـادی است که ارتباط قوی بین ورود فسفر به پیکره های آبی و شکوفایی‌های سیانوباکتریایی شناخته شده است (۱۶).

زمانی که ازت رشد جلبکی را محدود کند افزایش در فراوانی هتروسیست ها به منظور تثبیت ازت مشاهده می گردد(۵). لیکن سیانوباکترها هنگام دسترسی به آمونیوم هتروسیست‌های بسیار کمی تولید می‌کنند. زیرا تثبیت ازت نیازمند انرژی فراوان است (۱۲ مول ATP برای هر مول ازت تثبیت شده) که این

Archive of SID

www.SID.ir

هزینه را هنگامی که نیازی به ازت نباشد، مصرف نمی‌کنند (۱۷).

فسفر برای همه‌ی فرآیندهای متابولیکی لازم است، از آن جایی که تثبیت ازت نیازمند انرژی فراوان است فسفر با تولید ATP انرژی لازم جهت تثبیت ازت را فراهم کرده در نتیجه با افزایش فسفر در دسترس، تثبیت ازت تحریک شده و افزایشی در فراوانی هتروسیست ها مشاهده می گردد(۱۸).

امروزه مشکلات مرتبط با سیانوباکترها در مناطقی که رشد جمعیت شدید بوده، فعالیت‌های کشاورزی وجود داشته و نظارت دقیقی هم بر فاضلاب‌های ورودی آن‌ها به منابع آبی دیده نمی‌شود، افزایش یافته است(۷). دریای خزر نیز یکی از این اکوسیستم‌های آبی است که به دلایل ذکر شده و بر پایه تحقیقات انجام شده (۱۹) میزان مواد مغذی آن طی سال های اخیر افزایش یافته که این امر موجب تغییر در نسبت ازت به فسفر گردیده است. از آن جائی که تا کنون دوبار کشند سرخ سیانوباکتر تثبیت کننده ازت نودولاریا در دریای خزر روی داده است لزوم بررسی بر روی نسبت $\frac{N}{P}$ به عنوان عامل مهم ایجاد کننده شکوفایی سیانوباکتریایی در این اکوسیستم احساس می شود.

پیش از این مطالعات غنی سازی با مواد مغذی در محیط آزمایشگاه برای فهم نقش مواد مغذی کلیدی تحت شرایط طبیعی مهم است (۱۸). کشت‌های تک جلبکه نیز تاکنون برای مطالعه بر روی چندین فاکتور مؤثر بر رشد سیانوباکتریایی در آزمایشگاه انجام شده است (۹).

طی این مطالعه از کشت تک جلبکه سیانوباکتر تثبیت کننده ازت *Anabaena flos-aquae* ایزوله شده از آب‌های دریای خزر جهت تعیین نسبت وزنی از ازت به فسفر که منجر به حداکثر شکوفائی و عدم شکوفایی در این جلبک می گردد، استفاده شد. جهت تکمیل مطالعات، تاثیر غلظت های مختلف فسفر بر رشد آنابنا بررسی گردید.

مواد و روش کار

به منظور انجام کشت و پرورش آزمایشگاهی آنابنا در آزمایشگاه جلبک پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی از روش (Miller, 1978) استفاده شد. استانداردهای انجام آزمایشات براساس OECD (۲۱) در نظر گرفته شد. استوک جلبک *flos-Anabanea aquae* ایزوله شده از آب‌های دریای خزر از پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی دریافت و در محیط کشت زایندر کشت داده شد.

۲-۱- مطالعه بر روی نسبت ازت به فسفر:

جهت مطالعه بر روی نسبت ازت به فسفر، ۶ تیمار پایه با نسبت های مختلف ازت به فسفر و یک شاهد هر یک در ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

شاهد درواقع محیط کشت استاندارد زایندر منفی بود لیکن در تیمارها نسبت ازت به فسفر تغییر داده شد.

نسبت ازت به فسفر تیمارها بر اساس محاسبات لگاریتمی(۲۲) تعیین گردید. به منظور ساخت نسبت‌های تعیین شده، غلظت فسفر و ازت موجود در محیط کشت محاسبه گردید. سپس غلظت فسفر در محیط کشت زایندر ثابت و غلظت ازت بر اساس نسبت های محاسبه شده تغییر داده شد. جهت تغییر میزان ازت محیط کشت از محلول نیترات سدیم استفاده گردید. آزمایشات مطالعه نسبت ازت به فسفر در دو گروه جداگانه، آزمایشات تعیین حداکثر شکوفایی و عدم شکوفایی انجام گرفت. شایان ذکر است که آزمایشات متعددی با ۶ تیمار انجام شد و دامنه‌ی نسبت‌ها در هر آزمایش نسبت به آزمایش پیشین کمتر شد.

۲-۲- مطالعه بر روی غلظت فسفر :

در محیط کشت زایندر فسفر به صورت KH_2PO_4 وجود دارد. جهت مطالعه بر روی غلظت فسفر، KH_2PO_4 از محلول کشت حذف گردید و به صورت جداگانه بر اساس غلظت‌های تعیین شده توسط محاسبات لگاریتمی (۲۲) به هر یک از تیمارها اضافه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایشات پایه در این مطالعه در ۶ تیمار و ۱ شاهد انجام گرفت لیکن آزمایش نهایی در ۹ تیمار و ۱ شاهد هر یک در ۳ تکرار انجام شد. شاهد محیط کشت زایندر منفی بود.

۲-۳- کشت جلبک:

هر ۱ لیتر محیط کشت زایندر به میزان ۲۵۰ میلی‌لیتر در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری تقسیم شد. سپس ازت یا فسفر براساس نوع آزمایش به هر یک از ارلن‌ها اضافه گردید. بر مبنای وزن خشک توده جلبک میزان ۱ میلی گرم جلبک از استوک خالص به هر ارلن اضافه شد. پس از کشت ۲ میلی‌لیتر نمونه از هر تیمار و شاهد جهت شمارش جلبک‌ها برداشت و توسط فرمالین ۴٪ فیکس گردید. سپس ارلن‌ها توسط پیپت های هوا به هواده های واقع بر روی میز کشت جلبک که به لامپ‌های فلورسنت مجز هستند متصل گردیده و در شرایط آزمایشگاهی مناسب رشد جلبک یعنی میزان نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس که به صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی تنظیم گردیده و درجه حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۲۲). آزمایشات تعیین رشد طی زمان ۹۶ ساعت (۴ روز) انجام شد.

پس از سپری شدن ۹۶ ساعت مجددا ۲ میلی‌لیتر نمونه از تیمارها و شاهد برداشت و توسط فرمالین ۴٪ فیکس گردید.

سپس جذب نوری ۱۰ میلی لیتر از هر تیمار و شاهد توسط دستگاه طیف سنج مدل DR- 2000 در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. همچنین pH نیز توسط دستگاه pH متر مدل HANA HI 9025 قرائت گردید.

۲-۴- شمارش:

شمارش با استفاده از لام توما و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰× انجام گرفت . بر اساس تعداد رشته‌های محاسبه شده در نمونه‌های پیش و پس از ۹۶ ساعت هر تیمار، درصد رشد محاسبه گردید.

۲-۵- روش های آماری مورد استفاده درتجزیه و تحلیل داده ها:

در این تحقیق با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها ، جهت مقایسه میانگین درصد رشد در تیمارهای مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه جفتی تیمارها و تعیین اختلاف معنی‌دار آماری از آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد. برای ترسیم نمودارها و جداول آماری، نرم افزار SPSS و اکسل مورد استفاده قرار گرفت.

۳- نتایج

۳-۱- آزمایشات مطالعه بر روی نسبت ازت به فسفر:

دامنه ی نسبت های ازت به فسفر مورد بررسی در آزمایشات پایه بین ۱:۱ تا ۶۴:۱ در نظر گرفته شد.

شاهد محیط کشت زایندر با غلظت ازت ۹/۹ میکروگرم در لیتر، غلظت فسفر ۲/۹۶ میلی گرم در لیتر و نسبت ازت به فسفر ۱: ۰/۰۰۳۳ بود که خود پس از ۹۶ ساعت منجر به شکوفایی گردید.

از نسبت ۱:۱تا ۵:۱ هیچ گونه افزایشی نسبت به شاهد مشاهده نگردید. اما از نسبت ۱: ۵ به بالا درصد رشد به طور آشکاری نسبت به شاهد افزایش یافت و سپس در حدود نسبت ۱: ۲۲ تا ۱: ۶۴ درصد رشد کاهش یافت.

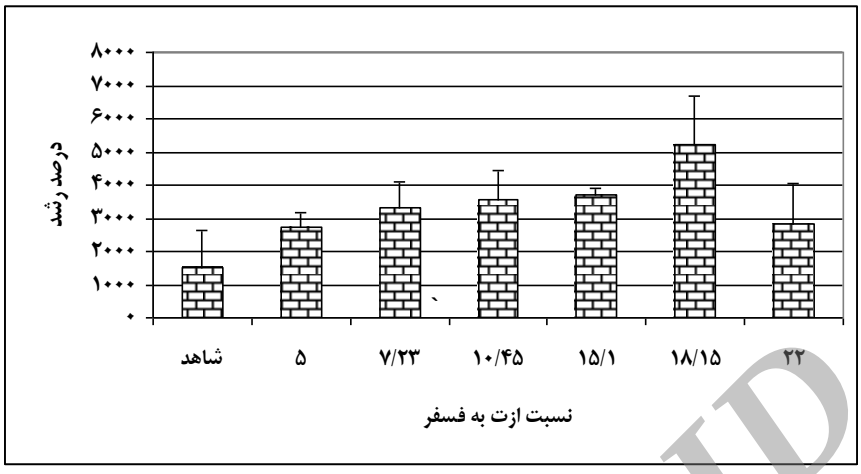
در نتیجه آزمایش نهایی حداکثر شکوفایی در *Anabaena flos – aquae* با ۶ تیمار در دامنه‌ی بین ۵:۱ تا ۲۲:۱ انجام گرفت. درصد رشد در شاهد ۱۱۲۳/۴۴±۱۵۰۵/۱۲ و جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر ۰/۰۷۱ محاسبه گردید نتایج نشان داد که نسبت ازت به فسفر در دامنه‌ی ۱۵:۱ تا ۲۲:۱ منجر به حداکثر شکوفایی در *Anabaena flos – aquae* می‌شود.(نمودار ۱) بالاترین درصد رشد در نسبت ازت به فسفر ۱: ۱۸/۱۵ با غلظت ازت ۵۳/۷۲ میلی گرم در لیتر و غلظت ازت ۲/۹۶ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. (نمودار۱) درصد رشد در این نسبت ۱۴۸۶/۶۹ ±۵۲۱۹/۸۴ یعنی۳/۵ برابر شاهد بود. میانگین تعداد رشته های جلبک آنابنا در این نسبت از ۵۳۰۰ به ۲۷۵۱۷۲/۵۳ رشته در میلی لیتر افزایش یافت. جذب نوری نیز ۰/۲۵۵ بود. (جدول ۱)

آزمون چند دامنه دانکن نشان داد در نسبت ازت به فسفر ۵:۱ درصد رشد اختلاف معنی داری با شاهد نداشت ($P > ۰/۰۵$) اما در نسبت های بالاتر از ۵:۱ درصد رشد به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت($P < ۰/۰۵$) تا این که در نسبت ۲۲:۱ مجدداً کاهش یافته و دیگر اختلاف

Archive of SID

www.SID.ir

معنی‌داری درصد رشد این نسبت با شاهد مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$).



نمودار۱- رابطه درصد رشد با نسبت ازت به فسفر در آزمایش حداکثر شکوفایی

جدول ۱- جذب نوری و pH هر تیمار در آزمایش حداکثرشکوفایی

نسبت ازت به فسفر	غلظت ازت (میلی گرم در لیتر)	غلظت فسفر (میلی گرم در لیتر)	جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر	pH
شاهد (۱: ۰/۰۰۳۳)	۰/۰۰۹۹	۲/۹۶	۰/۰۷۱	۸/۰۶
۵:۱	۱۴/۸	۲/۹۶	۰/۲۱۷	۱۰/۰۸
۷/۲۳ :۱	۲۱/۴	۲/۹۶	۰/۱۷۵	۹/۸۷
۱۰/۴۵ :۱	۳۰/۹۳	۲/۹۶	۰/۲۵۱	۱۰/۰۳
۱۵:۱	۴۴/۴	۲/۹۶	۰/۲۲۶	۱۰/۰۶
۱۸/۱۵ :۱	۵۳/۷۲	۲/۹۶	۰/۲۵۵	۱۰/۳۳
۲۲:۱	۶۵/۱۲	۲/۹۶	۰/۲۳۰	۱۰/۱۵

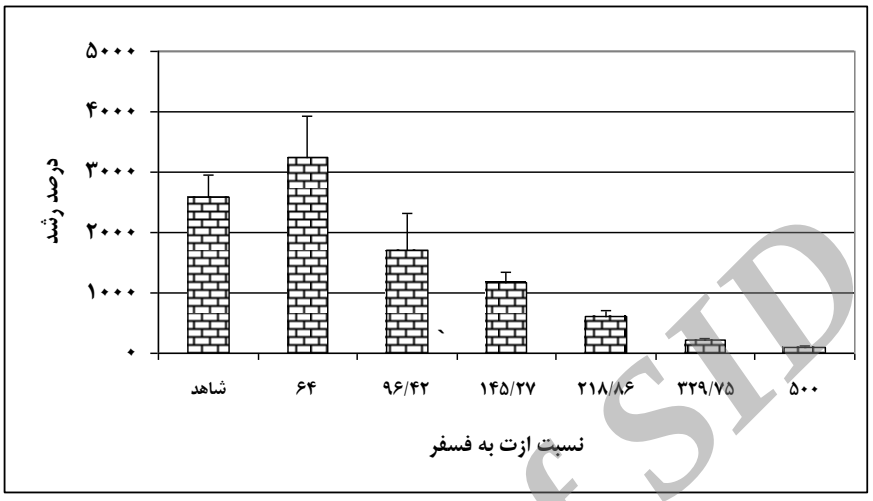
نتایج آزمایشات عدم شکوفایی نشان داد که درصد رشد تا نسبت ۶۴:۱ همچنان از شاهد بیشتر بود (نمودار ۲) اما اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت. ($P > ۰/۰۵$) با افزایش بیشتر غلظت ازت و نسبت ازت به فسفر درصد رشد از شاهد کمتر شد (جدول و نمودار ۲). از نسبت ۱: ۲۱۸/۸۶ به بالا تغییر رنگ آشکاری در مقایسه با شاهد مشاهده نشده و شکوفایی متوقف گردید. میانگین تعداد رشته های آنابنا از ۸۶۰۰ به ۶۱۵۰۵/۴۸ تعداد در میلی لیتر رسید. درصد رشد در این نسبت به ۶۱۵/۱۸±۸۶/۲۴ یعنی $\frac{۱}{٤}$ درصد رشد شاهد (۲۵۸۴/۲۹±۳۵۹/۵۱) کاهش یافت. میزان جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر در نسبت ۱: ۲۱۸/۸۶ به ۰/۰۹۰ کاهش یافت (جدول ۲). در نسبت‌های بالاتر از ۱: ۲۱۸/۸۶ درصد رشد همچنان کاهش یافت تا جایی که در نسبت ۵۰۰:۱ به ۹۹/۳۲±۱۴/۱۳ یعنی $\frac{۱}{۲٦}$ شاهد رسید. (نمودار ۲) میانگین درصد رشد در نسبت ۱: ۲۱۸/۸۶ از درصد رشد در شاهد و نسبت ۶۴:۱ به طور معنی داری کمتر بود. ($P < ۰/۰۵$)

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش غلظت ازت علاوه بر تأثیر بر درصد رشد منجر به کاهش در تعداد هتروسیست و افزایش اندازه سلول های رویشی گردید.

همچنین همان طور که در جداول و نمودارهای ۱و ۲ مشخص است pH محیط کشت نیز پس از ۹۶ ساعت متناسب با افزایش درصد رشد افزایش و با کاهش درصد رشد کاهش یافت.



نمودار۲- رابطه درصد رشد با نسبت ازت به فسفردر آزمایش عدم شکوفایی *Anabaena flos- aquae*

جدول ۲- جذب نوری و pH هر تیمار در آزمایش عدم شکوفایی

نسبت ازت به فسفر	غلظت ازت (میلی گرم در لیتر)	غلظت فسفر (میلی گرم در لیتر)	جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر	pH
شاهد (۱: ۰/۰۰۳۳)	۰/۰۰۹۹	۲/۹۶	۰/۲۲۸	۹/۹۴
۶۴:۱	۱۸۹/۴۴	۲/۹۶	۰/۲۶۲	۱۰/۲۷
۱: ۹۶/۴۲	۲۸۵/۴	۲/۹۶	۰/۱۶۵	۹/۷۲
۱: ۱۴۵/۲۷	۴۲۹/۹۹	۲/۹۶	۰/۱۴۴	۹/۴۸
۱: ۲۱۸/۸۶	۶۴۷/۸۲	۲/۹۶	۰/۰۹۰	۹/۴۴
۱: ۳۲۹/۷۵	۹۷۶/۰۶	۲/۹۶	۰/۰۵۳	۸/۷۷
۱:۵۰۰	۱۴۸۰	۲/۹۶	۰/۰۶۴	۸/۷۳

۳-۲- آزمایشات بررسی تاثیر غلظت فسفر:

دامنه ی غلظت های مورد بررسی از ۰/۰۰۱ میلی گرم در لیتر تا ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در نظر گرفته شد. بیشترین میانگین درصد رشد در شاهد با غلظت فسفر ۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید. میانگین درصد رشد در غلظت ۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر (شاهد) ۱۰۰۳/۴±۳۳۵۰/۷۳ و جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر ۰/۲۶۰ بود (جدول و نمودار ۳). تعداد رشته ها از ۱۰۹۰۰رشته در میلی لیتر به ۳۷۶۱۲۹/۵۷ رشته در میلی لیتر افزایش یافت. در غلظت های فسفر کمتر از ۱/۴ میلی گرم در لیتر تغییر رنگ آشکاری نسبت به شاهد مشاهده نشده و شکوفایی متوقف گردید (نمودار ۳). با کاهش غلظت فسفر به ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر، درصد رشد به

Archive of SID

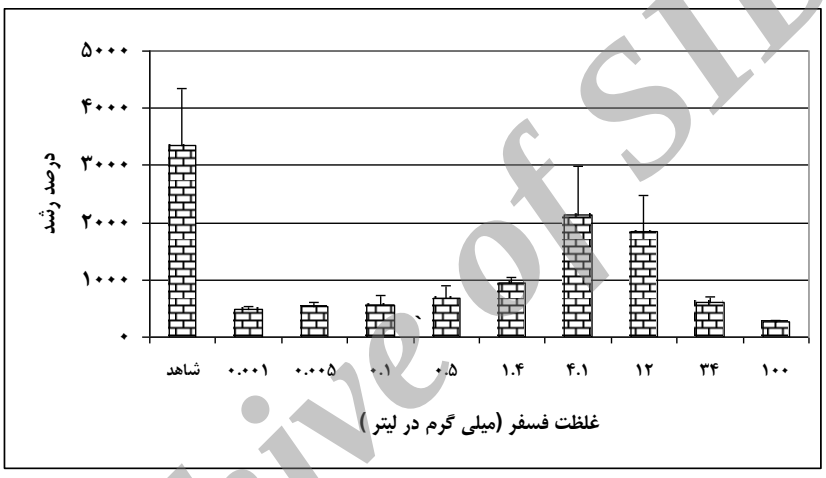
www.SID.ir

۴۹۲/۵۳±۴۴/۳ یعنی حدود ۰/۱۴ شاهد کاهش یافت. جذب نوری در این غلظت ۰/۰۵۰ بود. از غلظت فسفر ۳۴ میلی گرم در لیتر نیز شکوفایی متوقف گردید.

در غلظت فسفر ۳۴ میلی‌گرم در لیتر درصد رشد به $\frac{۱}{۵}$ شاهد کاهش یافت. جذب نوری نیز در این غلظت ۰/۱۱۵ بود. با افزایش غلظت فسفر تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر درصد به ۲۶۹/۴۶±۲۱/۹۲ یعنی ۰/۰۸ شاهد کاهش یافت. جذب نوری نیز در این غلظت ۰/۰۴۰ بود. نتایج آماری نشان داد که درصد رشد در شاهد به طور معنی‌داری از همه غلظت‌های فسفر مطالعه شده (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱/۴، ۴/۱ ، ۱۲، ۳۴ و ۱۰۰) بالاتر بود (نمودار ۳)($P< ۰/۰۵$).

طی این آزمایش تغییر در غلظت فسفر سبب تغییر در تعداد هتروسیست ها گردید. کاهش غلظت فسفر نسبت به شاهد سبب کاهش در تعداد هتروسیست شد. با افزایش غلظت فسفر تعداد هتروسیست ها افزایش یافت.

همان طـــور که در نمـودار و جدول ۳ مشخص است pH محیط کشت نیز متناسب با افزایش در درصد رشد افزایش و با کاهش درصد رشد کاهش یافت.



نمودار۳- رابطه درصد رشد با غلظت فسفر

جدول ۳- جذب نوری و pH هر تیمار در آزمایش مطالعه بر روی غلظت فسفر

غلظت فسفر (میلی گرم در لیتر)	غلظت ازت (میکروگرم در لیتر)	جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر	pH
شاهد(۲/۹۶)	۹/۹	۰/۲۶	۸/۷۹
۰/۰۰۱	۹/۹	۰/۰۵۰	۷/۵
۰/۰۰۵	۹/۹	۰/۰۵۴	۷/۵۷
۰/۱	۹/۹	۰/۰۷۲	۷/۶۲
۰/۵	۹/۹	۰/۰۸۳	۷/۶۳
۱/۴	۹/۹	۰/۰۸۵	۷/۷۱
۴/۱	۹/۹	۰/۱۹۸	۸/۱۸
۱۲	۹/۹	۰/۱۳۲	۶/۸۶
۳۴	۹/۹	۰/۱۱۵	۶/۴
۱۰۰	۹/۹	۰/۰۴۰	۵/۹۱

Archive of SID

www.SID.ir

۴- بحث

در آزمایشات مطالعه بر روی نسبت ازت به فسفر بین درصد رشد در شاهد با درصد رشد در نسبت‌های ازت به فسفر ۱: ۷/۲۳ ، ۱: ۱۰/۴۵، ۱۵:۱ با ۱: ۱۸/۱۵ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد(P<۰/۰۵). تنها بین شاهد و نسبت ۲۲:۱ و ۵:۱ اختلاف معنی‌دار وجود نداشت(۰۵/ ۰<P). لیکن درصد رشد در نسبت ۱: ۱۸/۱۵ با درصد رشد در نسبت ۲۲:۱ و ۵:۱ اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). یعنی افزایش نسبت ازت به فسفر تا ۵:۱ منجر به افزایش معنی داری در درصد رشد نسبت به شاهد نگردید لیکن پس از این نسبت درصد رشد به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت(P<۰/۰۵). درصد رشد مجددا در نسبت ازت به فسفر ۲۲:۱ کاهش یافت و دیگر اختلاف معنی داری با شاهد مشاهده نشد(۰۵/ ۰<P). از آن جایی که درصد رشد در ۱: ۱۸/۱۵ با غلظت ازت ۵۳/۷۲ میلی‌گرم در لیتر با درصد رشد در نسبت ۱۵:۱با غلظت ازت ۴۴/۴ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری نداشت(P<۰/۰۵)، از نسبت ۱۵:۱ به بالا حداکثر شکوفایی محسوب گردید. مطالعات بیشتر این بررسی نشان داد که درصد رشد تا نسبت ۶۴:۱ با غلظت ازت ۱۸۹/۴۴ میلی گرم در لیتر با وجود عدم اختلاف معنی دار (۰۵/ ۰<P) همچنان از شاهد بیشتر بود. با افزایش بیشتر غلظت ازت و نسبت ازت به فسفر درصد رشد به طور معنی داری نسبت به شاهد کاهش یافت(P<۰/۰۵). درنهایت از نسبت ۱: ۲۱۸/۸۶ با غلظت ازت ۶۴۷/۸۲ میلی‌گرم در لیتر به بالا شکوفایی متوقف گردید.

پیش از این Stockner و Shorteed (۱۹۸۸) طی ۹ سال به صورت هوایی کودهای شیمیایی ازته و فسفاته را بر روی دریاچه کندی بریتیش کلمبیا ریختند. در سال ۱۹۸۱ زمانی که نسبت N:P به ۱۵:۱ رسید شکوفایی بزرگی از *Anabaena circinalis* روی داد. با افزایش نسبت N:P شکـــوفایی کوچک تری از *Anabaena circinalis* در سال ۱۹۸۲ رخ داد. کنترل و حذف شکوفایی آنابنا در سال ۱۹۸۳ با افزایش نسبت N:P به انجام رسید. Stockner و Shorteed بیان کردند که در آغاز جمعیت آنابنا با اضافه شدن ترکیبات ازته افزایش یافت ولی همچنان که ازت در دسترس در سال‌های متوالی افزایش پیدا کرد شرایط دیگر برای آنابنای تثبیت کننده ازت مساعد نبود.

نتایج حاصل از این آزمایش نظریه اسمیت و همکاران (۱۹۹۵) را نیز تایید می کند که نسبت ازت به فسفر ۲۲:۱ مرز مشخصی بین دریاچه‌هایی که سیانوباکترهای تثبیت کننده ازت در آن غالب هستند و دریاچه‌هایی که میزان پایینی از این جلبک‌ها وجود دارد، می‌باشد.

نتایج مطالعه بر روی تاثیر تغییرات غلظت فسفر نشان داد که درصد رشد در شاهد با غلظت فسفر ۲/۹۶ میلی گرم در لیتر به طور معنی داری از دیگر غلظت‌های فسفر مطالعه شده (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱/۴، ۴/۱، ۱۲، ۳۴ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بالاتر بود (P<۰/۰۵). این نتیجه بیانگر آن است که غلظت فسفر در محلول شاهد مناسبترین غلظت جهت دستیابی به رشد اپتیموم در آنابنا می‌باشد زیرا درصد رشد در این غلظت به طور معنی‌داری از غلظت‌های فسفر کمتر و بیشتر از شاهد بالاتر بود. از غلظت فسفر ۱/۴ میلی گرم در لیتر به پایین شکوفایی متوقف گردید. درصد رشد در این غلظت حدود $\frac{۱}{٤}$ درصد رشد شاهد بود.

مجموع نتایج این آزمایشات حاکی از آن است که افزایش غلظت ازت تا حدی معین رشد آنابنا را افزایش می‌دهد گرچه آنابنا به سبب داشتن توانایی تثبیت ازت، در محیط کشت زایندر منفی با غلظت ناچیز ازت (۹/۹ میکروگرم در لیتر) و نسبت ازت به فسفر ۱: ۰/۰۰۳۳، شکوفایی تشکیل می‌دهد لیکن افزایش غلظت ازت و در نتیجه بالاتر رفتن نسبت ازت به فسفر تا حدی برای رشد آنابنا مطلوب است. Rinne و Tarkiainea در سال ۱۹۷۸ بیان کردند که در خلیج فنلاند فسفر برای رشد سیانوباکتر نودولاریا مهمتر از ازت بود اما در بخش‌های بسیار یوتروفیک ازت نیز تأثیر افزایشی بر رشد داشت (۹) . Jacobsn و Simonse در سال ۱۹۹۳ بیان کردند که ازت برای گسترش سیانوباکترهای تثبیت کننده ازت لازم است.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات آن‌ها نشان داد که شکوفایی سیانوباکترهای تثبیت کننده ازت در غلظت بالای ازت نیز روی می‌دهد (۱۷).

نتایج حاصل از آزمایشات عدم شکوفایی طی مطالعه حاضر نیز نشان داد شکوفایی آنابنا در نسبت و غلظت بالایی از ازت به فسفر (نسبت ۱ :۲۱۸/۸۶ با غلظت ازت ۶۴۷/۸۲ میلی گرم در میلی لیتر) برطرف گردید. Berman در سال ۲۰۰۱ عنوان کرد که فرضیه‌ی نسبت ازت به فسفر پایین بیانگر این مطلب است که میزان ازت در دسترس بسیار پایین شرایط را تنها برای تثبیت کنندگان ازت مساعد می‌کند لیکن هنگام وجود منابع خارجی ازت معدنی یا آلی همراه با سایر شرایط لازم جهت شکوفایی سیانوباکترها بدون کمک گرفتن از توانایی تثبیت ازت خود به خوبی رشد می کنند.

با وجود این که نتایج این مطالعه اهمیت تاثیر غلظت ازت بر رشد آنابنا را روشن کرد لیکن منطبق با تحقیقات پیشین (۶-۱۱، ۱۴ و ۱۵) مشخص شد که فسفر عامل اصلی شکوفایی در آنابنا است. زیرا کاهش در غلظت فسفر سبب کاهش درصد رشد و توقف شکوفایی گردید اما آنابنا حتی در غلظت های بسیار پایین ازت (شاهد) نیز به سبب توانایی تثبیت ازت تشکیل شکوفایی داد.

Vuorio و همکاران در سال ۲۰۰۵ عنوان کردند سیانوباکترهای هتروسیست دار که قادر به تثبیت ازت اتمسفری برای تکمیل نیاز ازت خود هستند اصولاً به وسیله عدم در دسترس بودن فسفر محدود می‌شوند.پیش از این Niemi وKononen در سال ۱۹۸۴ بیان کردند که غلظت بالای فسفر و نسبت ازت به فسفر پایین رشد سیانوباکترهای هتروسیست دار را در خلیج فنلاند افزایش داده است(۹). Schindler نیز در سال ۱۹۷۷ بیان کرد که سیانوباکترها به سبب داشتن توانایی تثبیت ازت در پیکره‌های آبی با میزان ازت محلول کم غالب می‌شوند چنانچه فسفر در پیکره آبی در حال افزایش باشد، سیانوباکترها فسفر دریافت شده را با ازت تثبیت شده ترکیب کرده و بیومس بالایی تشکیل می‌دهند (۱۷). Ahern و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که غنی شدن با مواد مغذی بر شدت شکوفایی تأثیرگذار است. مجموعه نتایج مطالعات حاضر نیز نشان داد که حضور مقادیر کافی از هر دو نوترینت ازت و فسفر در نسبت ازت به فسفر پائین برای دستیابی به حداکثر شدت شکوفایی مؤثر است. از آن جایی که غلظت فسفر در محیط کشت زایندر غلظتی اپتیموم است برای رسیدن به حداکثر شکوفایی تنها نیازمند اضافه کردن ازت می‌باشد. لیکن اضافه شدن ازت بیش از حد سبب افزایش نسبت ازت به فسفر و در نتیجه کاهش رشد تا توقف کامل شکوفایی گردید.

تغییرات غلظت ازت و فسفر طی آزمایشات علاوه بر تاثیر بر درصد رشد، سبب تغییر در فراوانی هتروسیست ها گردید.

در تمامی آزمایشات تعداد هتروسیست‌ها در محلول شاهد با غلظت ازت ۹/۹ میکروگرم در لیتر فراوان بود. همان طور که پیش از این عنوان شد سیانوباکترها هنگام کمبود ازت به تثبیت ازت تکیه کرده و برای این منطور فراوانی هتروسیست‌ها افزایش خواهد یافت.Horne و Comminus در ۱۹۸۷ عنوان کردند که ازت معدنی محلول کمتر از ۱۰۰-۵۰ میکروگرم در لیتر میزان محدود کننده ازت کافی برای تحریک تثبیت ازت می‌باشد (۲۳). Horstmann نیز در سال ۱۹۷۵ مشاهده کرد زمانی که غلظت ازت کم بود افزایش در فراوانی هتروسیست‌ها مشاهده شد که منجر به توانایی بالاتر تثبیت ازت گردید (۹). لیکن با افزایش غلظت ازت طی آزمایشات مطالعه بر روی نسبت ازت به فسفر فراوانی هتروسیست ها کاهش یافت. کیان مهر نیز در سال ۱۳۷۱ عنوان کرد که اضافه نمودن ازت به محلول های کشت سیانوباکترها تشکیل هتروسیست ها را کند می نماید. همچنین Lindahl و همکاران در سال ۱۹۷۸ بیان کردند که فراوانی هتروسیست *Aphanizomenon flos-aquae* در طول مطالعه در دریای بالتیک به سبب غلظت بالای ازت کاهش یافت (۹). از آن جایی که تثبیت ازت نیازمند انرژی فراوان است، سیانوباکترها این هزینه را هنگامی که نیازی به ازت نباشد مصرف نمی کنند (۱۷). افزایش غلظت فسفر در بررسی های انجام شده بر روی تغییرات غلظت فسفر ، منجر به افزایش فراوانی هتروسیست ها گردید. فسفر با تولید ATP انرژی لازم جهت تثبیت ازت را فراهم می‌کند در نتیجه با افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

فسفر در دسترس، تثبیت ازت تحریک و در نتیجه فراوانی هتروسیست ها افزایش می یابد(۱۸). نتایج تحقیقات Ahern و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز نشان داد که اضافه نمودن فسفر به خصوص در مناطقی با کمبود ازت سبب تحریک تثبیت ازت می‌گردد. نتایج آزمایشات غنی سازی با فسفر نیز که توسط Tonno در دریاچه Vortsjarv انجام شد نشان داد که افزایش غلظت فسفر منجر به تحریک تثبیت ازت و افزایش فراوانی هتروسیست می‌گردد. از آن جایی که در مطالعه حاضر طی بررسی بر روی غلظت فسفر، غلظت ازت در محیط کشت زایندر ثابت و بسیار پایین بود (۹/۹ میکروگرم در لیتر)، افزایش غلظت فسفر تاثیر به سزایی در فراوانی هتروسیست‌ها داشت. آنابنا به سبب غلظت پایین ازت محیط کشت نیازمند استفاده از توانایی تثبیت ازت خود بود و در دسترس بودن فسفر کافی انرژی لازم برای تثبیت ازت را فراهم آورده و در نتیجه تعداد هتروسیست ها به شدت افزایش یافت.همچنین کاهش غلظت فسفر محیط کشت منجر به کاهش انرژی در دسترس جهت تثبیت ازت و در نتیجه کاهش درصد رشد گردید.

افزایش غلظت ازت در طول آزمایشات علاوه بر کاهش فراوانی هتروسیست ها سبب افزایش اندازه سلول ها گردید. تحقیقات Doyoe و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که با افزایش میزان ازت اندازه سلولی جلبک *Aueroumbra lagunensis* افزایش یافت. این محققین عنوان کردند که افزایش اندازه سلول‌ها فضای بیشتری برای ذخیره ازت فراهم می‌کند.

در تمامی آزمایشات این پروژه pH محیط کشت در پایان طول آزمایشات متناسب با افزایش رشد آنابنا افزایش و با کاهش رشد آنابنا کاهش یافت.(جداول و نمودارهای ۱، ۲، ۳). Stockner و Shortreed در سال ۱۹۸۸ بیان کردند که هنگام شکوفایی آنابنا در دریاچه کندی، pH به ۸/۹ و ۹/۵ افزایش یافت و با حذف آنابنا در سال بعد pH به نزدیک ۷ افت کرد. آن‌ها نتیجه گرفتند که تولیدات اولیه بالا میزان pH را افزایش داد.

pH با فعالیت‌های فتوسنتزی شکوفایی سیانوباکتریایی مرتبط است. سیانوباکترها هنگام دریافت CO_2 تمایل به افزایش pH دارند (۲۷).

در طی تحقیقات Feber و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز همزمان با کاهش CO_2 آزاد در نتیجه افزایش تولیدات اولیه pH افزایش یافت. pH در طول رشد سیانوباکترها ۹/۲-۸/۲ بود.

سپاسگزاری

از همکاری کلیه کارکنان محترم پژوهشکده آبزی پروری کشور تشکر و قدردانی می نمایم.

منابع

1. Paerl, H. 2008. Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the Science and Research Needs. Chapter 10: Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial bloom along the fresh- marine continuum. Springer NewYork. 217-238 pp.
2. Butler, M., Farrugia, D., Johnson, R., and Murray, C. 2000. The nutrient impact Wakehurst Golf Course on Manly Dam In: UTS Freshwater Ecology Report Of 2000, Dept Environmental Science, university of Technology, Sydney. 20p.
3. Paerl, H. 1996. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environment. Phycologia 35, 25- 35.
4. Venter, A., Vurren, S. J. V., and Pieterse, AJH. 2003. Oscillatoria simplicissima: An autecological study. Water SA VOL.29 NO. 1, 105- 112.
5. Havens, K. E., James, R. T., East, T. L., and Smith, V. H. 2003. N: P ratios, Light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. Environment pollution 122, 379- 390.

Archive of SID

www.SID.ir

6. Lips, A. I., 2005. Abiotic factors controlling the cyanobacterial bloom occurrence in the Gulf of Finland. Dissertation Biologicae universitatis Tartuensis 108. Tartu university press 47.
7. WHO, 1999. Toxic cyanobacteria in water: a Guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon. 416p.
8. Stal, L. J., Albertano, P., Bergman, B., Brockel, K, V., Gallon, J. R., Hayes, P. K., Sivonen, K., and Walsby, A. E. 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.
9. Lehtimaki, J. 2000. Characterisation of cyanobacterial strains originating from the Baltic Sea with Emphasis on *Nodularia* and its toxin, Nodularine. Academic Dissertation in microbiology. Department of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helinski. Finland.
10. Vuoria, K., Lagus, A., Lehtimaki, J. M., Suomela, J., and Helminen, H. 2005. Phytoplankthon community responses to nutrient and iron enrichment under different nitrogen to phosphorus ratio in the northern Baltic sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 322, 39- 52.
11. Stockner, J. G., and Shortreed, K. S. 1988. Response of *Anabaena* and *Synechococcus* to manipulation of nitrogen: phosphorus ratios in a lake fertilization experiment. Limnol. Oceanogr 33 (6, part1), 1348- 1361.
۱۲. ریاحی، ح. ۱۳۸۲. تالوفیت ها (جلبک ها- قارچ ها- گلسنگ ها). انتشارات آدنا. ص ۱۷۶
13. Plinski, M., and Jozwiak, T. 1999. Temperature and N: P ratio as factors causing blooms of blue-green algae in the Gulf of Gdansk. Oceanologia 41(1), 73- 80.
14. Falconer, I. R. 1998. Toxic Cyanobacteria in drinking water supply. Harmful Algae. International Oceanographic commission of Unesco, 37- 38.
15. Lilover, M. –J., and Stips, A. 2008. The variability of parameters controlling the cyanobacterial bloom biomass in the Baltic Sea. Journal of Marine Systems. Article in press.
16. Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dortch, Q., Gobler, C. J., Heil, C. A., Humphries, E.,Lewitus, A., Magnien, R., Marshall. H. G., Sellner, K., Stockwell, D. A., Stockner, D. K., and Suddleson, M. 2008. Eutrophication and harmful algal Blooms: A scientific consensus. Harmful Algae 8, 3- 13.
17. Feber, L. R., Levine, S. N., Lini, A., and Livingston, G. P. 2004. Do Cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? Freshwater Biology 49, 690- 708.
18. Ahern, K. S., Ahern, C. R., and Udy, J.W. 2008. In situe field experiment shows *Lyngbya majuscule* (cyanobacterium) growth by added iron, phosphorus and Nitrogen. Harmful algae7, 389- 404.
19. Nasrollahzadeh, H. S., Din, Z. B., Foong, S. Y., and Makhlough, A. 2008. Trophic status of the Iranian Caspian Sea based on water quality

Archive of SID

www.SID.ir

parameters and phytoplankton diversity. Continental Shelf Reasearch 28, 1153-1165.

20. Miller, W. E., Green, J. C., and Shiro, T. 1978. The *Selenastrum capricornatum* printz algal assay bottle test. Application and interperation protocol, Us Epa 600/ 9. 126p.
21. TRC, 1984. OECD guidelines for testing of chemicals. Section 2, effects on biotic systems. 1- 39 pp.
22. Piri, Z. M., and Ordog. V. 1997. Effect of some herbicides commonly used in Iranian agriculture on aquatic food chain. 9- 30 pp.
23. Berman, T. 2001. The role of DON and the effect of N:P ratios on occurrence of cyanobacterial blooms: Implications from the outgrowth of *Aphanizomenon* in Lake Kinnert. Limnol. Oceanogr 46(2). 443- 447.

۲۴. کیان مهر، ه. ۱۳۷۱. مبانی جلبک شناسی. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه مشهد.

25. Tonno, I. 2004. The impact of nitrogen and phosphorus concenteration and N/P ratio on cyanobacterial dominance and N2 fixation in some Estonian lakes. Dissertarions biologicae universitatis Tartuensis 100. Tartu university press.
26. Doyoe, H. R., Buskey, E. J., and Jochem, F. J. 2007. Physiological responses of *Aureoumbra lagunensis* and *Synechococcus sp*. To nitrogen addition in mesocosm experiment. Harmful Algae 6, 48-55.
27. Sotero- Santos, R. B., Carvalho, E. G., Dellamano- Oliveira, M. J., and Rocha, O. 2008. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom on a tropical reservoir (Southeast Brazil) Harmful Algae 7, 590- 598.

Archive of SID

www.SID.ir