مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر
سال پنجم، شماره اول، بهار ۹۰

تاثیر نسبت ازت به فسفر و غلظت فسفر بر شکوفائی سیانوباکتر *Nostoc sp.* دریای خزر در محیط آزمایشگاه

*آتوسا نوری[۱]، مریم فلاحی[۲]، سیدمحمدرضا فاطمی[۳] و علی ماشینچیان[۳]
[۱]کارشناس‌ارشد شیلات، باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، [۲]پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی، بندرانزلی،
[۳]دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیولوژی دریا

چکیده

نسبت‌های متفاوت ازت به فسفر و غلظت‌های مختلف فسفر بر اساس محاسبات لگاریتمی تعیین و تأثیر تغییر این عوامل بر شکوفائی سیانوباکتر *Nostoc* sp. بررسی گردید. مطالعات طی ۹۶ ساعت در محیط آزمایشگاه با شدت نور ۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس و درجه حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در ۳ تکرار انجام شد. شاهد محیط کشت زایندر منفی در نظر گرفته شد، لیکن در تیمارها نسبت ازت به فسفر و غلظت فسفر تغییر داده شد. در ابتدا و انتهای آزمایش تعداد رشته‌های جلبک نوستوک با استفاده از لام توما شمارش شده و درصد رشد محاسبه گردید. نتایج آزمایشات نشان داد که غلظت فسفر در محیط کشت زایندر (۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر) مناسب‌ترین غلظت برای شکوفایی نوستوک بود. حداکثر شکوفایی در دامنه نسبت ازت به فسفر ۱: ۲/۵ تا ۱:۱۰ روی داد. بالاترین درصد رشد در نسبت ازت به فسفر ۱:٤ با غلظت ازت ۱۱/۸٤ میلی‌گرم در لیتر و غلظت فسفر ۲/۹٦ میلی‌گرم در لیتر روی داد که این میزان ۷٤۰/۱۸±۳٤۹۷/۱۷ درصد بود. با افزایش بیشتر غلظت ازت و بالاتر رفتن نسبت ازت به فسفر درصد رشد کاهش یافت و از نسبت ازت به فسفر ۱: ۱٤٥/۲۷ به بالا شکوفایی مشاهده نگردید. بر اساس این نتایج حضور مقادیر کافی هر دو نوترینت ازت و فسفر در نسبت ازت به فسفر پائین برای رسیدن به حداکثر شکوفایی لازم است.

واژه‌های کلیدی: درصد رشد، شکوفائی سیانوباکتریایی، نسبت ازت به فسفر، *Nostoc* sp.

مقدمه

فواید و آسیب‌های ناشی از سیانوباکترها هر دو اهمیت قابل ملاحظه‌ای دارند. سیانوباکترها تولید کننده اولیه مهم بوده و ارزش غذایی بالایی دارند. برخی محتوی پروتئین بالا، ویتامین و دیگر فاکتورهای لازم برای رشد هستند. گونه‌های تثبیت کننده ازت به باروری خاک و آب کمک می‌کنند (WHO، ۱۹۹۹). لیکن سیانوباکترها در تراکم‌های بالا منجر به تغییر رنگ آب (Venter و همکاران، ۲۰۰۳) و ایجاد طعم و بو در آب می‌گردند. به زیبایی اکوسیستم آسیب رسانده و به سبب شرایطی که پس از تجزیه‌شدنشان به وجود می‌آید (کاهش اکسیژن محلول و غلظت آمونیاک بالا) و یا تولید سم سبب مرگ جانداران آبزی می‌گردند (Havens و همکاران، ۲۰۰۳). شکوفایی‌های سیانوباکتریایی در نتیجه یوتریفیکاسیون روی می‌دهد. با افزایش ورود مواد مغذی به پیکره‌های آبی فراوانی نسبی سیانوباکترها افزایش می‌یابد (Feber و همکاران، ۲۰۰٤). نسبت N به P به‌عنوان عامل مهمی در ارتباط با حضور جلبک‌های سیانوباکتر عنوان می‌شود (Venter و همکاران، ۲۰۰۳). بسیاری از محققین عنوان کردند که

* مسئول مکاتبه atousanouri@yahoo.com

گسترش شکوفایی جلبک‌های سیانوباکتر وابسته به نسبت N به P پایین است. (Stal و همکاران، ۲۰۰۳؛ WHO، ۱۹۹۹؛ Lehtimaki، ۲۰۰۰؛ Stockner و Shorteed، ۱۹۸۸؛ Vuorio و همکاران؛ ۲۰۰۵؛ Lips، ۲۰۰۵).

Eynard و همکاران در سال ۲۰۰۰ نسبت‌های ازت به فسفر سه دریاچه مختلف از ناحیه Baltezers را محاسبه کردند. در دریاچه Sudrabezers جایی که نسبت محاسبه شده همیشه بالاتر از ۵۰ بود، سیانوباکترها فقط در مقایر کمی حضور داشتند، در حالی که در دریاچه‌های Mazais Baltezers و Lielais Baltezeres شکوفایی‌ها هنگامی که این نسبت پایین‌تر از ۱۰ بود بسیار مهم بودند. برخلاف سایر فیتوپلانکتون‌ها سیانوباکترهای تثبیت کننده ازت مستقل از منبع ازت مانند نیترات و آمونیوم هستند. هتروسیست در این رشته‌های سیانوباکتریایی دارای آنزیم نیتروژناز است. آنزیمی که تثبیت ازت را کاتالیز می‌کند (Stal و همکاران، ۲۰۰۳). در نتیجه از آن جایی که آن‌ها توسط ازت محدود نمی‌شوند آغاز شکوفایی آن‌ها در جایی که فسفر در دسترس باشد، روی می‌دهد (Plinski و Jozwiak، ۱۹۹۹). زمانی که ازت رشد جلبکی را محدود کند افزایش در فراوانی هتروسیست‌ها به‌منظور تثبیت ازت مشاهده می‌گردد. 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 هزینه را هنگامی که نیازی به ازت نباشد، مصرف نمی‌کنند (Feber و همکاران، ۲۰۰٤). Lindahl و همکاران در سال ۱۹۷۸ بیان کردند که فراوانی هتروسیست *Aphanizomenon flos-aquae* در طول مطالعه در Baltic proper به سبب غلظت بالای ازت کاهش یافت (Lehtimaki، ۲۰۰۰). لیکن Lindahl و Wallstrom در سال ۱۹۸۸ عنوان کردند که در دریای بوتنیان فعالیت هتروسیست و فراوانی آن با افزایش غلظت فسفر افزایش یافت (Lehtimaki، ۲۰۰۰).

ورود فسفر اضافی به پیکره آبی سبب تکثیر سیانوباکترها تا حد شکوفایی می‌گردد. در بسیاری از پیکره‌های آبی، فسفات ماده مغذی محدودکننده برای رشد سیانوباکترها است. افزایش فسفر عامل اصلی و عمده بروز پدیده شکوفایی سیانوباکتریایی است (Stockner و Stal و همکاران، ۲۰۰۰؛ Shortreed، ۱۹۹۸؛ Falconer، ۱۹۹۸؛ Lilover و Stips، ۲۰۰۸). 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. افزایش غلظت ازت و فسفر در اکوسیستم‌های آبی به‌واسطه تخلیه پساب‌های خانگی، صنعتی و کشاورزی در حال افزایش است. دریای خزر نیز یکی از این اکوسیستم‌های آبی است که بر پایه تحقیقات انجام شده (Nasrollahzadeh و همکاران، ۲۰۰۳) میزان مواد مغذی آن طی سال های اخیر افزایش یافته است. لیکن مطالعاتی برروی پدیده شکوفائی در جلبک‌های بومی منطقه صورت نگرفته است. لذا لزوم بررسی بر روی نسبت N به P به‌عنوان عامل مهم ایجاد کننده شکوفایی سیانوباکتریایی در این اکوسیستم احساس می‌شود. *Nostoc* sp. یکی از سیانوباکترهای رشته‌ای تثبیت‌کننده ازت در دریای خزر است. کشت تک‌جلبکه جهت بررسی تاثیر عوامل مهم بر رشد سیانوباکترها در آزمایشگاه استفاده می‌شود (Lehtimaki،۲۰۰۰). طی این مطالعه از کشت تک جلبکه *Nostoc* sp. جهت تعیین نسبتی از ازت به فسفر که منجر به حداکثر شکوفائی و عدم شکوفائی در این جلبک می‌گردد، استفاده شد.

همچنین جهت تکمیل مطالعات، تأثیر غلظت‌های مختلف فسفر بر رشد نوستوک بررسی شده است.

مواد و روش کار

به منظور انجام کشت و پرورش آزمایشگاهی نوستوک در آزمایشگاه جلبک پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی از روش Miller (۱۹۷۸) استفاده شد. استوک جلبک نوستوک ایزوله شده از آب‌های دریای خزر از پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی دریافت و در محیط کشت زایندر منفی (Z-8-N) کشت داده شد.

مطالعه بر روی نسبت ازت به فسفر: آزمایشات مطالعه نسبت N:P در دو گروه جداگانه، آزمایشات حداکثر شکوفایی و عدم شکوفایی انجام گرفت. شاهد محیط کشت استاندارد زایندر منفی (Z-8-N) بود لیکن در تیمارها نسبت ازت به فسفر تغییر داده شد. جهت مطالعه بر روی حداکثر شکوفایی ۸ تیمار و عدم شکوفائی ٦ تیمار با نسبت‌های متفاوت ازت به فسفر (تعیین شده بر اساس محاسبات لگاریتمی (Piri و Ordog، ۱۹۹۷) و یک شاهد هر یک در ۳ تکرار در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که تعداد تیمارها و دامنه نسبت‌های بررسی شده پس از آزمایشات متعددی به‌دست آمد.

مطالعه بر روی غلظت فسفر: پس از آزمایشات متعدد جهت دستیابی به دامنه غلظت مناسب آزمایش نهایی در ۹ تیمار با غلظت‌های تعیین شده توسط محاسبات لگاریتمی Piri و Ordog (۱۹۹۷) و ۱ شاهد (Z-8-N) هر یک در ۳ تکرار انجام شد.

کشت جلبک: هر لیتر محیط کشت زایندر به‌میزان ۲۵۰ میلی‌لیتر در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری تقسیم شد سپس محلول نیترات سدیم (جهت تغییر در نسبت ازت به فسفر) و فسفات پتاسیم (جهت تغییر غلظت فسفر) به هر ارلن اضافه گردید. سپس بر مبنای وزن خشک توده جلبک میزان ۱ میلی‌گرم 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 ٤ درصد فیکس شد (Miller، ۱۹۷۸).

ارلن‌ها توسط پیپت‌های هوا به هواده‌های واقع بر روی میز کشت جلبک که به لامپ‌های فلورسنت مجهز هستند متصل گردیده و در شرایط آزمایشگاهی مناسب رشد جلبک یعنی میزان نور۳۵۰±۳۵۰۰ لوکس که به صورت ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی تنظیم گردیده و درجه حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. (Piri و Ordog، ۱۹۹۷). آزمایشات تعیین رشد طی زمان ۹٦ ساعت (٤ روز) انجام شد. پس از سپری شدن ۹٦ ساعت مجدداً ۲ میلی‌لیتر نمونه از تیمارها و شاهد برداشت و توسط فرمالین ٤ درصد فیکس گردید. سپس جذب نوری ۱۰ میلی لیتر از هر تیمار و شاهد جهت مشخص شدن تراکم محلول توسط دستگاه طیف سنج مدل DR-2000 در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. همچنینpH نیز توسط دستگاه pH متر مدل HANA HI 9025 قرائت گردید. لازم به ذکر است که میزان تغییر رنگ محلول بیرنگ زایندر به رنگ سبز-آبی پس از ۹٦ ساعت شاخص کیفی شکوفایی در آزمایشات حاضر بود.

شمارش: شمارش با استفاده از لام توما و میکروسکوپ نوری انجام گرفت. لام توما از دو مربع بزرگ تشکیل شده است که حجم هر مربع ۰/۰۰۰۱ سانتی‌متر مکعب است. جهت شمارش تعداد جلبک یک قطره از هر نمونه توسط پیپت پاستور برداشت و روی مربع بزرگ ریخته شد. سپس بر روی قطره لامل گذاشته و پس از یک دقیقه که قطره‌ها رسوب کردند، تعداد رشته‌ها شمارش گردید. با توجه به این که حجم هر مربع ۰/۰۰۰۱ سانتی‌متر مکعب است، میانگین تعداد رشته‌ها در یک میلی‌لیتر به‌دست آمد (فلاحی، ۱۳۷۹). بر اساس تعداد رشته‌های محاسبه

شده در نمونه‌های پیش و پس از ۹۶ ساعت هر تیمار، درصد رشد محاسبه گردید.

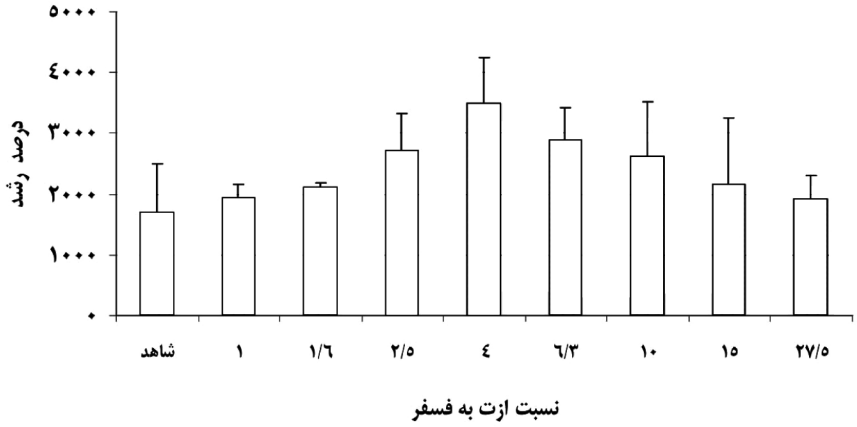
روش‌های آماری مورد استفاده در تجزیه و تحلیل داده‌ها: در این تحقیق جهت مقایسه میانگین درصد رشد در تیمارهای مختلف با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها در آزمایش حداکثر شکوفائی و مطالعه بر روی غلظت فسفر از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و با توجه به غیر نرمال بودن توزیع داده‌ها در آزمایش عدم شکوفائی از آزمون کروسکال- والیس استفاده شد. برای مقایسه جفتی تیمارها و تعیین اختلاف معنی‌دار آماری از آزمون چند دامنه دانکن استفاده گردید. جهت ترسیم شکل‌ها و جدول‌های آماری، نرم‌افزار SPSS و مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

آزمایشات مطالعه بر روی نسبت ازت به فسفر: آزمایش نهایی حداکثر شکوفایی در *Nostoc* sp. با ۸ تیمار در دامنه بین ۱N:۱ P تا۲۷/۵N: P انجام گرفت. در محلول شاهد غلظت ازت ۹/۹ میکروگرم در لیتر، غلظت فسفر ۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر و نسبت ازت به فسفر ۱: ۰/۰۰۳۳ بود که پس از ۹۶ ساعت منجر به شکوفایی گردید. میانگین درصد رشد در شاهد ۷۸۱/۶۶±۱۷۰۸/۰۸ و جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر ۰/۲۶۳ محاسبه گردید. نتایج نشان داد که نسبت ازت به فسفر در دامنه ۱: ۲/۵ تا ۱:۱۰ منجر به حداکثر شکوفایی در نوستوک می‌گردد. (شکل ۱) بالاترین درصد رشد در نسبت ۱:٤ با غلظت ازت ۱۱/۸٤ میلی‌گرم در لیتر و غلظت فسفر ۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر، مشاهده شد. درصد رشد در این نسبت ۷٤۰/۱۸±۳٤۹۷/۱۷ بود که این میزان ۲ برابر شاهد می‌باشد (شکل ۱). همچنین تغییر رنگ محلول به سبز تیره و میزان جذب نوری نیز در این نسبت مشاهده شد (جدول ۱). آزمون چند دامنه دانکن نشان داد که درصد رشد در نسبت ازت به فسفر ۱:٤ به‌طور معنی‌داری از درصد رشد در شاهد و نسبت‌های ۱:۱، ۱: ۱/٦، ۱:۱۵ و ۱:۲۷/۵ بالاتر بود ($P<0/1$)، اما با درصد رشد در نسبت‌های ۱: ۲/۵، ۱: ٦/۳ و ۱:۱۰ اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0/1$).

جدول ۱- جذب نوری و pH هر تیمار در آزمایش حداکثر شکوفائی *Nostoc sp.*

نسبت ازت به فسفر (N:P)	غلظت ازت (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت فسفر (میلی‌گرم در لیتر)	جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر	pH
شاهد (۱: ۰/۰۰۳۳)	۰/۰۰۹۹	۲/۹٦	۰/۲٦۳	۷/۷٤
۱:۱	۲/۹٦	۲/۹٦	۰/۲۸٤	۷/۷٦
۱: ۱/٦	٤/۷٤	۲/۹٦	۰/۲۹۳	۷/۸۰
۱: ۲/۵	۷/٤	۲/۹٦	۰/۳۰۹	۷/۹۸
۱:٤	۱۱/۸٤	۲/۹٦	۰/۳۸٤	۸/۲۱
۱: ٦/۳	۱۷/۷٦	۲/۹٦	۰/۳۲۹	۸/۱۲
۱:۱۰	۲۹/٦	۲/۹٦	۰/۳٤۰	۷/۹٦
۱:۱۵	٤٤/٤	۲/۹٦	۰/۳۰٦	۷/۸۲
۱: ۲۷/۵	۸۱/٤	۲/۹٦	۰/۲۷۰	۷/۷٤



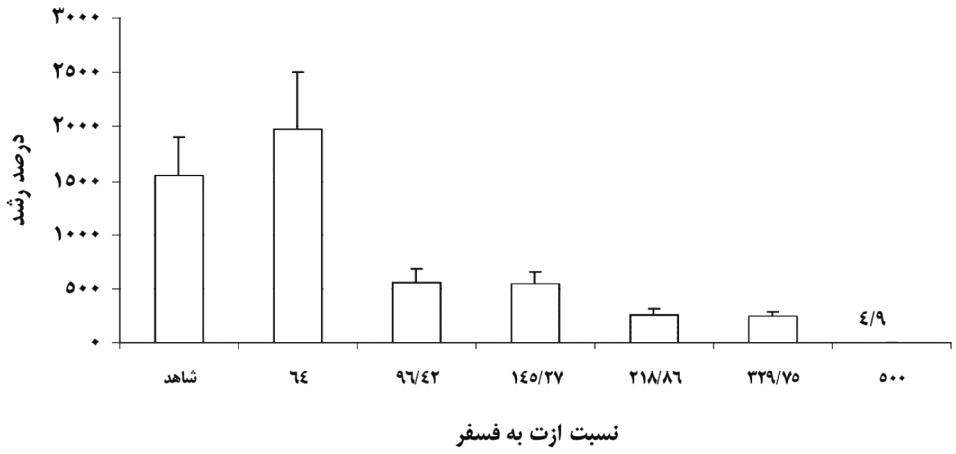
شکل ۱- رابطه درصد رشد با نسبت ازت به فسفر در آزمایش حداکثر شکوفایی *Nostoc* sp.

نتایج آزمایشات عدم شکوفائی نشان داد که درصد رشد تا نسبت ۶۴:۱ با وجود عدم اختلاف معنی‌دار (P>۰/۰۵) همچنان از شاهد بیشتر بود (شکل ۲) اما با افزایش بیشتر غلظت ازت و بالاتر رفتن نسبت ازت به فسفر درصد رشد نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل و جدول ۲). از نسبت ۱: ۱۴۵/۲۷ با غلظت ازت ۴۲۹/۹۹ میلی‌گرم در لیتر و غلظت فسفر ۲/۹۶ میلی‌گرم در لیتر به بالا شکوفایی متوقف گردید.

از این نسبت هیچ گونه تغییر رنگی در محلول مشاهده نشد و محیط کشت کاملاً بی‌رنگ باقی ماند. درصد رشد شاهد در آزمایش نهائی عدم شکوفائی ۱۵۵۳/۰۸±۳۵۸/۶۶ بود و در نسبت ۱: ۱۴۵/۲۷ به $\frac{۱}{۳}$ این میزان یعنی ۵۳۴/۴۴±۱۲۳/۴۲ کاهش یافت. (شکل ۲). در نسبت‌های بالاتر از ۱: ۱۴۵/۲۷ درصد رشد همچنان کاهش یافت و در نسبت ۵۰۰:۱ به ۴/۸۹±۱/۱۳ یعنی ۰/۰۰۳ شاهد رسید (شکل ۲). میزان جذب نوری نیز متناسب با کاهش رشد کاهش یافت (جدول ۲). درصد رشد در نسبت های بالاتر از ۶۴:۱ به‌طور معنی‌داری از شاهد و نسبت ۶۴:۱ کمتر بود (P<۰/۰۵). افزایش غلظت ازت علاوه بر تأثیر بر درصد رشد منجر به کاهش در تعداد هتروسیست و افزایش اندازه سلول‌های رویشی شد. همچنین همان طور که در جداول و شکل‌های ۱ و ۲ مشخص است pH محیط کشت نیز پس از ۹۶ ساعت متناسب با افزایش درصد رشد افزایش و با کاهش درصد رشد کاهش یافت.

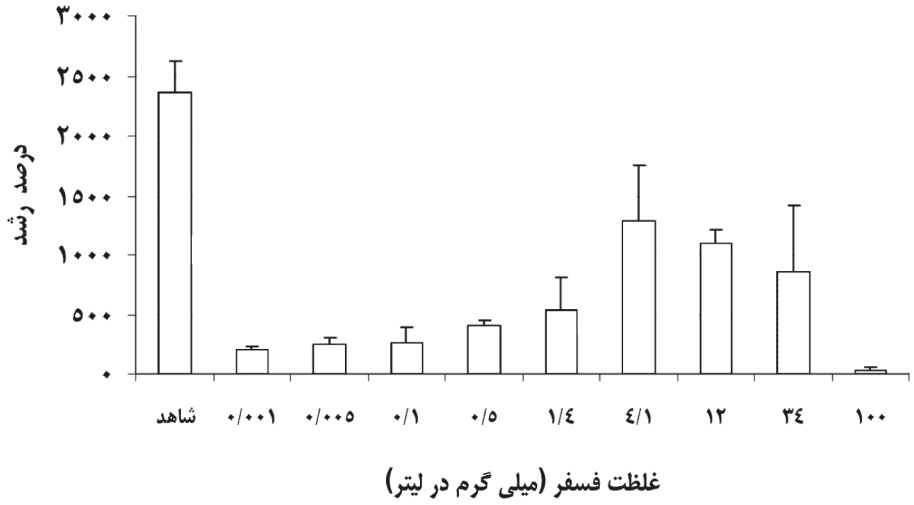
جدول ۲- جذب نوری و pH هر تیمار در آزمایش عدم شکوفایی *Nostoc sp*

نسبت ازت به فسفر (N:P)	غلظت ازت (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت فسفر (میلی‌گرم در لیتر)	جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر	pH
شاهد (۱: ۰/۰۰۳۳)	۰/۰۰۹۹	۲/۹۶	۰/۲۴۰	۱۰
۶۴:۱	۱۸۹/۴۴	۲/۹۶	۰/۲۲۰	۹/۹۹
۱: ۹۶/۴۲	۲۸۵/۴	۲/۹۶	۰/۲۲۶	۹/۷۴
۱: ۱۴۵/۲۷	۴۲۹/۹۹	۲/۹۶	۰/۱۸۵	۹/۵۷
۱: ۲۱۸/۸۶	۶۴۷/۸۲	۲/۹۶	۰/۱۲۵	۹/۵۳
۱: ۳۲۹/۷۵	۹۷۶/۰۶	۲/۹۶	۰/۱۱۴	۹/۳۴
۵۰۰:۱	۱۴۸۰	۲/۹۶	۰/۰۳۴	۹/۱۱



شکل ۲- رابطه درصد رشد با نسبت ازت به فسفر در آزمایش عدم شکوفایی *Nostoc sp.*

آزمایشات بررسی تأثیر غلظت فسفر: بیشترین میانگین درصد رشد در شاهد با غلظت فسفر ۲/۹٦ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. میانگین درصد رشد در شاهد ۲۳٦٤/۱±۲٥۲/٤٤ و جذب نوری در طول موج ۷٥۰ نانومتر ۰/۲۷٥ بود. (جدول و شکل ۳) از غلظت فسفر ۱/٤ میلی گرم در لیتر به پائین شکوفایی متوقف گردید و محیط کشت بی‌رنگ باقی ماند. درصد رشد در این غلظت ٥۳٦/۳٤±۲۷۷/۳٦ محاسبه گردید که این میزان حدود $\frac{۱}{۵}$ درصد رشد شاهد بود (شکل ۳). جذب نوری نیز در این غلظت ۰/۱۱۷ بود (جدول ۳). با کاهش غلظت فسفر به ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر درصد رشد به ۲۰٥/۹۳±۲۳/۷۳ یعنی حدود $\frac{۱}{۱۱}$ شاهد کاهش یافت (شکل ۳). جذب نوری در این غلظت ۰/۰۹۰ بود (جدول ۳). آزمون چند دامنه دانکن نشان داد که درصد رشد در غلظت‌های فسفر کمتر از شاهد (۰/۰۰۱، ۰/۰۰٥، ۰/۱، ۰/٥ و ۱/٤ میلی‌گرم در لیتر) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P>$ ۰/۰٥). درصد رشد در غلظت‌های فسفر بالاتر از شاهد (٤/۱، ۱۲، ۳٤ میلی‌گرم در لیتر) به‌طور معنی‌داری از شاهد کمتر بود ($P<$۰/۰٥) اما از غلظت‌های فسفر کمتر از شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P<$۰/۰٥). اما درصد رشد با افزایش غلظت فسفر به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر درصد رشد به ۲٥/٥۹±۲۸/۹۷ یعنی $\frac{۱}{۹۲}$ شاهد کاهش یافت (شکل ۳). طی این آزمایش تغییر در غلظت فسفر سبب تغییر در تعداد هتروسیست‌ها گردید. کاهش غلظت فسفر نسبت به شاهد سبب کاهش در تعداد هتروسیست شد. با افزایش غلظت فسفر تعداد هتروسیست‌ها افزایش یافت. همان طور که در شکل و جدول ۳ مشخص است، pH محیط کشت نیز متناسب با افزایش درصد رشد افزایش و با کاهش درصد رشد کاهش یافت.



شکل ۳- رابطه درصد رشد با غلظت فسفر در *Nostoc sp.*

جدول ۲- جذب نوری و pH هر تیمار در آزمایش مطالعه بر روی غلظت فسفر *Nostoc* sp.

غلظت فسفر (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت ازت (میکروگرم در لیتر)	جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر	pH
شاهد(۲/۹٦)	۹/۹	۰/۲۷۵	۸/۳٦
۰/۰۰۱	۹/۹	۰/۰۹۰	٦/۹۵
۰/۰۰۵	۹/۹	۰/۰۹۳	۷/٤۲
۰/۱	۹/۹	۰/۰۹٦	۷/۵۱
۰/۵	۹/۹	۰/۱۱۱	۷/٦٤
۱/٤	۹/۹	۰/۱۱۷	۷/۸٤
٤/۱	۹/۹	۰/۲۵۲	۷/۹۷
۱۲	۹/۹	۰/۲	٦/۸۸
۳٤	۹/۹	۰/۱۳٦	٦/٤۳
۱۰۰	۹/۹	۰/۰۵۹	٦/۱۸

بحث و نتیجه‌گیری

از آن جائی که سیانوباکتر نوستوک به سبب داشتن رنگدانه فیکوسیانین (کیان‌مهر، ۱۳۸٤) هنگام شکوفائی به محیط کشت بی‌رنگ زایندر رنگ سبز- آبی می‌بخشد، لذا طی مطالعه حاضر تغییر رنگ به‌عنوان شاخص کیفی شکوفایی در نظر گرفته شد. لیکن درصد رشد محاسبه شده از اختلاف تعداد رشته‌های نوستوک در آزمایشات پیش و پس از ۹٦ ساعت به‌عنوان شاخص کمی در نظر گرفته شد و آنالیزهای آماری، تفاوت درصد رشد معنی‌داری در تیمارها را آشکار کرد.

نتایج این مطالعات نشان داد که غلظت فسفر در محیط کشت زایندر مناسب‌ترین غلظت برای شکوفایی نوستوک است. این آزمایشات مشخص کرد هنگامی که فسفر به میزان بهینه وجود دارد، نوستوک با کمک گرفتن از توانایی خود در تثبیت ازت

اتمسفری قادر است در غلظت های پائین ازت (۹/۹ میکروگرم در لیتر در محلول شاهد)، تشکیل شکوفایی دهد. Schindler 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 (Feber و همکاران، ۲۰۰٤). لیکن شدت شکوفائی با افزایش غلظت ازت محیط کشت افزایش یافت. Rinne و Tarkianiea در سال ۱۹۷۸ بیان کردند که در خلیج فنلاند فسفر برای رشد نودولاریا مهمتر از ازت بود، اما در بخش‌های بسیار یوتروفیک ازت نیز تأثیر افزایشی بر رشد داشت (Lehtimaki، ۲۰۰۰).

حداکثر شکوفایی در جلبک *Nostoc* sp. در دامنه‌ی نسبت ازت به فسفر ۱: ۲/۵ تا ۱:۱۰ روی داد. پیش از این Schindler (۱۹۷۷)، Seip (۱۹۹٤)، Michard و همکاران (۱۹۹٦)، Bulgakov و Levich (۱۹۹۹) نسبت ازت به فسفر مناسب برای غالب شدن سیانوباکترها را بین ۱:۵ تا ۱:۱۰ ذکر کردند (Tonno، ۲۰۰٤).

بیشترین میزان درصد رشد در این دامنه در نسبت ازت به فسفر ۱:٤ با غلظت ازت ۱۱/۸٤ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. درصد رشد در این نسبت ۲ برابر شاهد محاسبه گردید. طبق مطالعات Rorig و همکاران در سال ۱۹۸۸ نیز هنگام شکوفایی فصلی *Trichodesmium* spp. در سال ۱۹۹٤ در آب‌های جنوبی برزیل نسبت ازت به فسفر ۱:٤ بود. نتایج نشان داد که افزایش میزان غلظت ازت تا ۱۱/۸٤ میلی‌گرم در لیتر و نسبت ازت به فسفر تا ۱:٤ منجر به بیشتر شدن درصد رشد و افزایش شکوفایی گردید. این افزایش به‌طور معنی‌داری از شاهد با نسبت ازت به فسفر ۱: ۰/۰۰۳۳ و نسبت‌های پس از آن یعنی ۱:۱ و ۱: ۱/٦ بیشتر بود ($P<۰/۱$).

همچنین درصد رشد در نسبت ۱: ٦/۳ با غلظت ازت ۱۷/۷٦ میلی‌گرم در لیتر نیز به طور معنی‌داری از شاهد بیشتر است ($P<۰/۱$). از آنجایی که نسبت ۱:٤ با ۱: ۲/۵، ۱: ٦/۳ و ۱:۱۰ اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>۰/۱$). حداکثر شکوفایی در این دامنه ذکر گردید. با افزایش هر چه بیشتر غلظت ازت و نسبت ازت به فسفر، درصد رشد کاهش یافت، به‌طوری‌که در نسبت ۱:۱۵ با غلظت ٤٤/٤ میلی‌گرم در لیتر و ۱ :۲۷/۵ با غلظت ۸۱/٤ به‌طور معنی‌داری از نسبت ۱:٤ کمتر بود ($P<۰/۱$). پس از آن با افزایش بیشتر غلظت ازت و نسبت ازت به فسفر در آزمایش عدم شکوفائی، شکوفائی متوقف گردید (شکل و جدول ۲).

مجموعه این آزمایشات ثابت کرد که حضور مقادیر کافی از هر دو نوترینت ازت و فسفر در نسبت ازت به فسفر پایین برای دستیابی به حداکثر شکوفایی مؤثر است. همان طور که نتایج آزمایشات نشان داد شکوفایی نوستوک در نسبت‌های بالایی از ازت به فسفر برطرف گردید. Berman در سال ۲۰۰۱ عنوان کرد که فرضیه 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 می‌کنند.

تغییرات غلظت ازت و فسفر طی آزمایشات حاضر علاوه بر تأثیر بر درصد رشد سبب تغییر در فراوانی هتروسیست گردید و مشخص شد هنگام کمبود ازت (۹/۹ میکروگرم در شاهد) تعداد هتروسیست‌ها افزایش می‌یابد، زیرا در این هنگام سیانوباکترها به تثبیت ازت تکیه می‌کنند. Horne و Comminus در سال ۱۹۸۷

عنوان کردند که ازت معدنی محلول کمتر از ۵۰-۱۰۰$\mu g.L^{-1}$ میزان محدود کننده ازت کافی برای تحریک تثبیت ازت می‌باشد (Berman، ۲۰۰۱). Horstmann در سال ۱۹۷۵ مشاهده کرد زمانی که غلظت ازت در دریای بالتیک کم بود افزایشی در فراوانی هتروسیست‌ها مشاهده شد که منجر به توانایی بالاتر تثبیت ازت گردید (Lehtimaki، ۲۰۰۰). طی آزمایشات حاضر با افزایش غلظت ازت تعداد هتروسیست‌ها کاهش یافت. از آن جایی که تثبیت ازت نیازمند انرژی فراوان است، سیانوباکترها این هزینه را هنگامی که نیازی به ازت نباشد، مصرف نمی‌کنند (Feber و همکاران، ۲۰۰٤). لیکن با افزایش فسفات پتاسیم به محیط کشت زایندر منفی که غلظت ازت آن بسیار پائین است، تعداد هتروسیست‌ها افزایش یافت. فسفر برای همه 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 می‌نماید. در نتیجه با افزایش فسفر در دسترس، تثبیت ازت، تحریک شده و افزایشی در فراوانی هتروسیست‌ها مشاهده می‌گردد (Ahern و همکاران، ۲۰۰۰). همان‌طور که بیان شد افزایش غلظت ازت علاوه بر کاهش هتروسیست‌ها سبب افزایش اندازه سلول‌ها گردید. Doyoe و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ بیان کردند 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 تحقیق pH متناسب با افزایش رشد افزایش و با کاهش رشد کاهش یافت (جداول و شکل‌های ۱، ۲ و ۳). pH با فعالیت‌های فتوسنتزی شکوفایی سیانوباکتریایی مرتبط است. سیانوباکترها هنگام دریافت CO_2 تمایل به افزایش pH دارند (Sotero-Santos و همکاران، ۲۰۰۸). در طی تحقیقات Feber و همکاران در سال ۲۰۰٤ 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.

تشکر و قدردانی

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

منابع

۱- فلاحی، م.، ۱۳۷۹. پلانکتون شناسی مقدماتی. دوره آموزشی کوتاه مدت. مرکز تحقیقات شیلات استان گیلان. ۵۰ صفحه.

۲- کیان‌مهر، ه.، ۱۳۸٤. بیولوژی جلبکها. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۳۳٤ صفحه.

3.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.

4.Deyoe, 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.

5.Eynard, F., Mez, K., and Walter, J.L., 2000. Risk of Cyanobacterial Toxins in Riga Waters (Lativa). Water Research 34, 2979-2988.

6.Falconer, I.R., 1998. Toxic Cyanobacteria in drinking water supply. Harmful Algae. International Oceanographic commission of Unesco, 37- 38.

7.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.

8.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.
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. Dept. of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helinski. Finland.
10.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.
11.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.
12.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.
13.Nasrollahzadeh, H.S., Din, Z.B., Foong, S.Y., and Makhlough, A., 2008. Trophi status of the Iranian Caspian Sea based on water quality parameters and phytoplankton diversity. Continental Shelf Reasearch 28, 1153-1165.
14.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.
15.Piri, Z.M., and Ordogm, V., 1997. Effect of some herbicides commonly used in Iranian agriculture on aquatic food chain. 9- 30.
16.Rorig, L. R., Yunes, J.S., Kuroshima, K.M., Schetinni, C.A.F., Pezzuto, P.R., and Proenca, L.A.O., 1998. Studies on the ecology and toxicity of *Trichodesmium spp*. Blooms in southern coastal waters. Harmful Algae. International Oceanographic Commission of Unesco, 22-25.
17.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.
18.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.
19.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, part 1), 1348-1361.
20.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.
21.TRC, 1984. OECD guidelines for testing of chemicals. Section 2, effects on biotic systems. 1-39.
22.Venter, A., Vurren, S.J.V., and Pieterse, A.J.H., 2003. *Oscillatoria simplicissima:* An autecological study. Water SA 29 (1), 105-112.
23.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.
24.WHO., 1999. Toxic cyanobacteria in water: a Guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon: 416.

Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 5, No. 1, Mey 2011

Effect of N: P ratio and phosphorus concentration on cyanobacterial bloom of *Nostoc sp*. In Caspian Sea, Iran in situ

***A. Nouri[1], M. Fallahi[2], S.M.R. Fatemi[3] and A. Mashinchian[3]**
[1]M.Sc. in Fisheries, Young Researchers Club, Lahijan branch, Islamic Azad University, [2]Inland Water Aquaculture Institute, Bandar Anzali, [3]Dept. of Marine Brology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran

Abstract

Different N: P ratios and varying phosphorus concentrations were considered based on the logarithmic calculations and the effects of these factors on cyanobacterial bloom of *Nostoc sp.* were inspected. The study was performed in situ while the temperature and light intensity were kept at 25± 2°C and 3500±350 lux respectively. The laboratory tests lasted 96 hours. Zinder media was used as the control medium however different N: P ratios and P concentrations were applied as treatments. Visual counting at the start and end of the experiments were carried out to assess the growth percentage. The results showed that phosphorus concentrations in Zinder media (2.96 mg.L) are the optimum value for *Nostoc* bloom. *Nostoc* achieved its optimum growth at the range of 2.5N: 1P to 10N:1P. The maximum level of growth percentage was reached to 3497.17±746.18 percent in 4N: 1P ratio with 11.84 mg.L of nitrogen and 2.96 mg.L of phosphorus. The bloom was eliminated at 145.27: 1. The whole results confirmed that in the presence of enough nitrogen and phosphorus concentrations with low N: P ratio, the maximum bloom intensity observes.

***Keywords**: Nostoc* sp.; N:P ratio; Cyanobacterial bloom; Growth percentage

*Corresponding Author; Email: atousanouri@yahoo.com