بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر تراکم ریزجلبک‌های (*Chaetoceros* sp.) و (*Skeletonema* sp.) در شرایط آزمایشگاهی

سیده مینا هاشمی خالقی[1]*، رضا قربانی واقعی [2]

Mina.hashemi66@yahoo.com

۱ - دانش آموخته مقطع کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندر عباس

۲ - پژوهشکده میگوی کشور- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت : آبان ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۴

چکیده

با وجود مزایای فراوان شکوفایی برخی گونه‌های جلبکی در آبزی پروری، افزایش مفرط آنها می‌تواند مشکل ساز بوده و باید با روش‌های مختلف نسبت به کاهش تراکم آنها اقدام نمود، که یکی از روش‌ها، استفاده از سولفات مس می‌باشد. تحقیق با ۵ تیمار و ۳ تکرار در هر تیمار، در سال ۱۳۹۳ درآزمایشگاه کشت جلبک ایستگاه بندرگاه انجام گرفت. تغییرات تراکم جلبک‌های کیتوسروس و اسکلتونما در غلظت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر از سولفات مس (CuSO4.5H2O) در مدت زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۸۴ و ۹۶ ساعت در شرایط آزمایشگاهی تعیین شد. نتایج حاصله نشان داد که، استفاده از غلظت‌های ۱/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر از سولفات مس، پس از گذشت ۲ ساعت از مواجهه، موجب کاهش تراکم در ریزجلبک‌های کیتوسروس و اسکلتونما می‌شود. به طوری که در ۴۸ ساعت پس از مواجهه تراکم سلول‌ها به شدت کاهش یافت. ریزجلبک‌های کیتوسروس و اسکلتونما در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به طور معنی داری از تیمارهای غلظت ۱/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر کاهش تراکم کمتری داشتند ($P<0.05$). بعد از گذشت ۶ و ۲۴ ساعت از زمان مواجهه، به دلیل حضور یون مس در محیط، تراکم سلول‌های ریزجلبک کیتوسروس و اسکلتونما به ترتیب در تیمارهای غلظت ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر به طور معنی داری در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت ($P<0.05$). همچنین به دلیل اختلافات گونه‌ای و مقاومت ریزجلبک اسکلتونما در برابر نفوذ یون مس به داخل سلول، تراکم ریزجلبک اسکلتونما تا ۴۸ ساعت پس از مواجهه از ریز جلبک کیتوسروس بیشتر و نسبت به هم اختلاف معنی دار آماری داشتند ($P<0.05$). لیکن پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان مواجهه به دلیل افزایش نفوذ مس به داخل سلول‌های ریزجلبک اسکلتونما تراکم آنها به شدت کاهش یافت. از این رو می‌توان عنوان نمود که حساسیت ریزجلبک اسکلتونما نسبت به غلظت‌های مختلف سولفات مس پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان مواجهه بیشتر از ریزجلبک کیتوسروس می‌باشد.

کلمات کلیدی: جلبک تک سلولی، کیتوسروس (*Chaetoceros* sp.)، اسکلتونما (*Skeletonema* sp.)، تراکم سلولی، سولفات مس

* **نویسنده مسئول**

۱. مقدمه

بیش از ۴۰ گونه مختلف ریز جلبکی در قسمت‌های مختلف دنیا جداسازی و به طور رایج در روش کشت انبوه مورد استفاده قرار می‌گیرند. این جلبک‌ها به عنوان غذا برای پرورش مراحل لاروی و جوانی گونه‌های مختلفی از نرمتنان، لارو سخت پوستان و ماهیان، پلانکتون‌های جانوری، روتیفرها، پاروپایان، کلادوسرها و آرتمیاها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). امروزه برای جلوگیری از رشد بیش از حد جلبک‌های تک سلولی و رشته‌ای از روش‌های متعددی استفاده می‌شود که از جمله این روش‌ها می‌توان به کاهش مواد مغذی وارد شده به منابع آبی با هدف جلوگیری از غنی شدن محیط و اصلاح نمودن شرایط فیزیک و شیمیایی آب اشاره نمود (۲۳). از دیگر روش‌های پرکاربرد، استفاده از داروها و عوامل شیمیایی می‌باشد. عملکرد این مواد بدین صورت است که علاوه بر جلوگیری از رشد فیتوپلانکتون‌ها، موجب از بین رفتن آنها نیز می‌گردند (۹). از مهمترین مواد شیمیایی که به عنوان قارچ کش در مزارع کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد، سولفات مس می‌باشد (۳۰). با وجود اینکه مس به عنوان یک ماده معدنی در اکثر آب‌های شور به صورت فلز یافت می‌شود از یک سو سمیت بالایی داشته و از سوی دیگر برای آبزیان به عنوان یک ماده مغذی محسوب می‌شود (۱۶). لیکن امروزه از این ماده به منظور ریشه کنی جلبک‌های تک سلولی و رشته‌ای و علف‌ها در استخرهای مزارع پرورش آبزیان استفاده می‌گردد (۱۰،۳۲ و۱۴). در دهه‌های اخیر به دلیل سرازیر شدن مواد مغذی و نوترینت‌ها به منابع آبی و وقوع بلوم جلبکی از اثرات بازدارندگی فلزات سنگین به منظور کنترل رشد و فتوسنتز جلبک‌ها استفاده می‌گردد (۲۹). از این رو با توجه به حضور جلبک‌های تک سلولی کیتوسروس و اسکلتونما در استخرهای پرورش آبزیان بویژه میگو، این امکان وجود دارد که با افزایش تراکم آنها بویژه در ساعات پایانی شب علاوه بر کاهش شدید اکسیژن محلول در آب، این مزارع را با تلفات شدید و زیان‌های اقتصادی فراوان مواجهه سازند. لیکن با توجه به نقش جلبک‌های تک سلولی در تغذیه آبزیان، تعیین غلظت مناسب از سولفات مس به منظور از بین بردن موقتی تراکم فیتوپلانکتون‌ها در استخر بدون اینکه خللی در چرخه غذایی موجودات آبزی ایجاد نماید ضروری به نظر می‌رسد. از سوی دیگر بسته به گونه جلبک تک سلولی، حساسیت آنها به غلظت‌های مختلف سولفات مس متفاوت می‌باشد (۲۷). لذا در این مطالعه سعی شد تا علاوه بر تعیین تراکم ریزجلبک‌های کیتوسروس و اسکلتونما، غلظت مناسب این ماده جهت جلوگیری از رشد و تراکم ریزجلبک‌های تک سلولی فوق تعیین گردد. از سوی دیگر همزمان حساسیت جلبک‌های تک سلولی کیتوسروس و اسکلتونما در مواجهه با غلظت‌های مختلف سولفات مس نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

تحقیق در آزمایشگاه کشت جلبک ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه وابسته به پژوهشکده میگوی کشور واقع در ۲۵ کیلومتری شهرستان بوشهر با ۵ تیمار و ۳ تکرار در هر تیمار با استفاده از سولفات مس در غلظت‌های صفر، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر انجام گرفت. به منظور تیماربندی سلول‌های ریزجلبک کشت داده شده در ظروف ۱۰ لیتری، پس از سپری کردن مرحله رشد کند و انفجاری زمانی که وارد مرحله رشد ثابت شدند، از ظروف ۱/۵ لیتری شفاف پلاستیکی استفاده گردید. پس از همگن نمودن محیط کشت کانوی (Convay)، به ازای هر لیتر آب دریا، ۱۰ میلی لیتر استوک ریزجلبک کیتوسروس و اسکلتونما به هر کدام از ظروف ۱/۵ لیتری مربوط به تیمارهای مختلف افزوده گردید (۱۶، ۱۲ و۲۶). همچنین دوره نوری، شدت تابش نور، درجه حرارت، شوری و pH در تیمارهای مختلف به ترتیب ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی با شدت روشنایی

۳۰۰±۲۰۰۰ لوکس، ۱±۲۳ درجه سانتیگراد، ۲۵ قسمت در هزار و ۰/۲±۸/۱ مد نظر قرار گرفت (۲).

کشت ریزجلبک های کیتوسروس و اسکلتونما در ظروف ۱۰ لیتری به صورت جداگانه انجام گردید (۲۲،۱۷ و۱۳). جهت آماده سازی سولفات مس، با توجه به جرم مولکولی سولفات مس، براساس حجم ۱/۵ لیتری محیط کشت هر کدام از تکرارهای تیمارهای مختلف، غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس تهیه گردید (انتخاب این غلظت‌های سولفات مس به این دلیل بوده است که میانگین غلظت کشنده سولفات مس برای جلبک‌های تک سلولی ۱ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. چون هدف انتخاب غلظت‌ها با عدم آسیب رساندن به موجودات آبزی و در عین حال از بین بردن جلبک می‌باشد سعی گردید تاثیر غلظت‌های کمتر از ۱، ۱ و۱/۵ میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گیرد تا در صورت امکان از غلظت‌های کمتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر برای مبارزه با جلبک‌ها مورد استفاده قرار گیرد). در ادامه زمانی که ریزجلبک‌ها وارد مرحله رشد ثابت شدند، (روز چهارم) پس از افزودن غلظت‌های فوق به تیمارهای آزمایشی ، به منظور بررسی اثرات غلظت‌های مختلف یون مس، بر ریزجلبک‌های کیتوسروس و اسکلتونما، شمارش سلول‌های ریزجلبک هر تیمار در فواصل زمانی ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۸۴ و ۹۶ ساعت پس از مواجهه با سولفات مس صورت پذیرفت (۳ و۶). تعداد سلول‌های ریزجلبک در کشت اولیه ریزجلبک‌های کیتوسروس و اسکلتونما به ترتیب ۱۰۴×۲۶/۰ و ۱۰۴×۳۵/۰ سلول در هر میلی‌لیتر تعیین گردید. در ادامه شمارش سلول‌های ریزجلبک کیتوسروس و اسکلتونما در هر میلی‌لیتر به صورت جداگانه بعد از همگن نمودن محیط کشت ریزجلبک و تثبیت ۱ میلی‌لیتر نمونه ریزجلبک با استفاده از فرمالین ۱۰ درصد به صورت روزانه توسط لام هموسیتومتر و با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل (ECLIPSE 9 (TE2000-U, Nikon Corporation, Japan

با بزرگنمائی ۱۰۰× از طریق معادله ۱ صورت پذیرفت (۱،۵). لازم به ذکر است پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های تثبیت شده به قسمت H شکل لام هموسیتومتر، روی آن با لامل پوشانده شد. پس از آن نمونه در زیر میکروسکوپ بررسی و از ۴ خانه ۱۶ تائی واقع در گوشه‌های لام (A, B, C, D) جهت شمارش استفاده گردید (۱ و ۵).

$$\text{تعداد سلول در هر میلی‌لیتر} = \frac{\text{تعداد کل سلولهای شمارش شده}}{\text{تعداد بولوک ها}} \times 10^4$$

معادله۱– تعیین تعداد سلولهای ریزجلبک کیتوسروس واسکلتونما در هر میلی‌لیتر با استفاده از لام هموسیتومتر

در پایان تحقیق، بر اساس تعیین میانگین تعداد جلبک در ساعات مختلف، با استفاده ازآزمون تجزیه واریانس (ANO-VA) وجود و یا عدم وجود اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها مشخص و سپس با استفاده از آزمون Duncan تعیین گردید که بین کدامیک از تیمارها اختلاف معنی دار آماری وجود دارد ($P<0.05$).

۳. نتایج

جدول شماره ۱ تراکم ریزجلبک کیتوسروس را در مواجهه با غلظت‌های مختلف سولفات مس و زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. در رابطه با تراکم سلول های ریز جلبک کیتوسروس در غلظت‌های مختلف سولفات مس، کمترین

میزان تراکم سلولی ریزجلبک پس از ۲ ساعت مواجهه در تیمار غلظت‌های ۱/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس حاصل گردید به گونه‌ای که به طور معنی داری از تراکم‌های بدست آمده در غلظت های ۰/۵ و۰/۲۵ میلی گرم در لیتر تراکم کمتری داشت ($P<0.05$). همچنین در ۴، ۶، ۱۲ و۲۴ ساعت پس از اثر دهی سولفات مس، کمترین میزان تراکم در تیمار غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر حاصل گردیدکه به طور معنی داری از سایر غلظت‌ها کاهش بیشتری داشت ($P<0.05$). پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت کمترین میزان تراکم سلولی در تیمارهای غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیترسولفات مس و تیمار شاهد ایجاد شد که نسبت به تیمارهای غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر سولفات مس به طور معنی داری تراکم کمتری داشت ($P<0.05$). این در حالی بود که در ۸۴ و ۹۶ ساعت پس از اثر دهی سولفات مس، تراکم سلولی ریزجلبک در تیمار شاهد به طور معنی داری کاهش یافت ($P<0.05$). با این وجود هیچگونه تفاوت معنی دار آماری علیرغم کاهش شدید تراکم در تیمار غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر نسبت به تیمار غلظت ۱ میلی گرم ۵ در لیتر تا ۴۸ ساعت پس از مواجهه مشاهده نگردید ($P>0.05$). از سوی دیگر سلول‌های ریزجلبک کیتوسروس در تیمارهای غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان را در ۲ ساعت پس از مواجهه و کمترین میزان در۹۶ ساعت پس از مواجهه داشتند (جدول۱)

جدول ۱- تراکم سلول‌های ریزجلبک کیتوسروس (.Chaetoceros sp) پرورش یافته در غلظت‌های مختلف سولفات مس (انحراف معیار± میانگین) با ۹۵ درصد اطمینان

ساعت	غلظت ۰ میلی‌گرم در لیتر	۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر	۱ میلی‌گرم در لیتر	۱/۵ میلی‌گرم در لیتر
۲	۲۶/۰×۱۰^{۴}±۱/۷	۲۴/۲×۱۰^{۴}±۲/۰	۲۶/۲×۱۰^{۴}±۴/۲	۲۰/۸×۱۰^{۴}±۰/۶	۱۸/۲×۱۰^{۴}±۱/۶
۴	۲۲/۷×۱۰^{۴}±۱/۹	۲۱/۴×۱۰^{۴}±۵/۹	۲۳/۱×۱۰^{۴}±۰/۲	۲۰/۵×۱۰^{۴}±۱/۰	۱۶/۹×۱۰^{۴}±۱/۳
۶	۲۲/۱×۱۰^{۴}±۳/۲	۲۰/۸×۱۰^{۴}±۱/۵	۲۲/۲×۱۰^{۴}±۰/۴	۲۰/۴×۱۰^{۴}±۰/۸	۱۶/۵×۱۰^{۴}±۱/۸
۱۲	۲۱/۴×۱۰^{۴}±۳/۶	۱۹/۲×۱۰^{۴}±۱/۲	۲۱/۹×۱۰^{۴}±۲/۱	۱۹/۶×۱۰^{۴}±۱/۶	۱۶/۴×۱۰^{۴}±۰/۴
۲۴	۱۸/۴×۱۰^{۴}±۳/۹	۱۸/۲×۱۰^{۴}±۴/۹	۱۹/۶×۱۰^{۴}±۲/۰	۱۸/۷×۱۰^{۴}±۲/۰	۱۶/۰×۱۰^{۴}±۲/۱
۴۸	۱۴/۳×۱۰^{۴}±۲/۴	۱۷/۸×۱۰^{۴}±۱/۶	۱۹/۶×۱۰^{۴}±۱/۶	۱۷/۰×۱۰^{۴}±۲/۸	۱۴/۰×۱۰^{۴}±۱/۵
۷۲	۱۳/۸×۱۰^{۴}±۲/۱	۱۶/۹×۱۰^{۴}±۰/۹	۱۸/۷×۱۰^{۴}±۱/۸	۱۵/۱×۱۰^{۴}±۲/۲	۱۳/۴×۱۰^{۴}±۱/۷
۸۴	۱۱/۶×۱۰^{۴}±۰/۸	۱۵/۸×۱۰^{۴}±۱/۳	۱۶/۸×۱۰^{۴}±۰/۳	۱۴/۱×۱۰^{۴}±۱/۵	۱۳/۰×۱۰^{۴}±۱/۳
۹۶	۹/۰×۱۰^{۴}±۰/۸	۱۳/۷×۱۰^{۴}±۱/۳	۱۴/۶×۱۰^{۴}±۲/۰	۱۳/۵×۱۰^{۴}±۱/۵	۱۱/۲×۱۰^{۴}±۱/۹

(حروف مشترک در هر ردیف نشاندهنده معنی دار نبودن است)

از سوی دیگر نتایج حاصل از شمارش ریزجلبک کیتوسروس در ساعات مختلف نشان داد که تراکم سلول‌های ریزجلبک کیتوسروس در ۲ ساعت پس از اثر دهی، کاهش معنی داری پیدا نمود ($P<0.05$). علیرغم کاهش سلول‌ها در ۶ و ۱۲ ساعت نسبت به ۴ ساعت پس از اثر دهی، هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ($P>0.05$). تراکم سلول‌ها در ۲۴ ساعت پس از شروع مطالعه مجدداً به طور معنی داری کاهش پیدا کرد ($P<0.05$). همچنین با وجود کاهش شدید و معنی دار سلول‌های ریزجلبک در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اثر دهی هیچگونه تفاوت معنی داری در تراکم سلول‌های ریزجلبک مشاهده نگردید ($P>0.05$). لیکن تراکم سلول‌ها در ۸۴ و ۹۶ ساعت پس از اثر دهی به طور معنی داری کاهش پیدا کرد ($P<0.05$).

در تیمار غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر از سولفات مس، تراکم سلول‌های ریزجلبک پس از گذشت ۴ ساعت، به طور معنی داری کاهش یافت ($P<0.05$). لیکن با وجود کاهش تراکم سلول‌ها تا ۱۲ ساعت پس از مواجهه با ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس، هیچگونه تفاوت معنی داری در تراکم سلول‌ها مشاهده نگردید ($P>0.05$). همچنین با وجود کاهش تراکم سلول‌ها در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۸۴ ساعت پس از اثر دهی سولفات مس، هیچگونه تفاوت معنی داری در تراکم سلول‌ها در ساعات فوق مشاهده نگردید. لیکن به طور معنی داری نسبت به ساعت ۶ تراکم کمتری داشت ($P<0.05$). با این وجود کمترین میزان تراکم سلول در غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر در ۹۶ ساعت پس از زمان مواجهه حاصل گردید ($P<0.05$). بیشترین کاهش تراکم سلول‌های ریزجلبک کیتوسروس در تیمار غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس در ۲۴ ساعت پس از زمان مواجهه با سولفات مس مشاهده گردید که به طور معنی داری نسبت به تراکم‌های محاسبه شده در ساعات ۱۲، ۶، ۴ و ۲ تراکم کمتری داشت ($P<0.05$). لذا علیرغم کاهش تراکم سلول در ساعات ۲۴ و ۴۸ هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ($P<0.05$) و پس از آن تراکم به صورت معنی داری در ساعات ۷۲، ۸۴ و۹۶ کاهش یافت ($P<0.05$). در رابطه با نتایج بدست آمده در تیمار غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس در طی ساعات مختلف، علیرغم کاهش تراکم سلول در طول ۲، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت، هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ($P>0.05$). لذا تراکم سلول ها در ساعات ۸۴ و ۹۶ بطور معنی داری کاهش پیدا کرد($P<0.05$). همچنین با وجود کاهش تراکم سلول‌ها در ساعت ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ تیمارهای غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سولفات مس تفاوت معنی داری در این خصوص مشاهده نگردید ($P>0.05$). از سوی دیگر بیشترین کاهش تراکم در ۴۸، ۷۲، ۸۶ و ۹۶ ساعت پس از مواجهه با سولفات مس رخ داد ($P<0.05$).

جدول شماره ۲ تراکم ریزجلبک اسکلتونما را در مواجهه با غلظت‌های مختلف سولفات مس و زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. در رابطه با تراکم ریز جلبک اسکلتونما در غلظت‌های مختلف سولفات مس نتایج نشان داد که پس از گذشت ۲ ساعت از زمان مواجهه با سولفات مس در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر تراکم سلول‌های ریزجلبک به طور معنی داری نسبت به تراکم بدست آمده در تیمارهای غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر و تیمار شاهد مقدار کمتری داشت ($P<0.05$). همچنین تراکم سلول‌های ریزجلبک در ساعات ۴ و ۶ در غلظت‌های ۱ و ۱/۵ به طور معنی داری از تراکم بدست آمده در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۲۵ و صفرکاهش بیشتری داشت ($P<0.05$). لیکن با وجود کاهش تراکم سلول‌ها در ساعات ۱۲، ۲۴ و ۴۸ غلظت‌های ۰/۵، ۱ و۱/۵ میلی گرم در لیتر سولفات مس هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ($P>0.05$). از سوی دیگر مشاهده شد که تراکم سلول‌های ریزجلبک اسکلتونما در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر پس از ۷۲ ساعت از زمان مواجهه با سولفات به طور معنی داری از تیمارهای غلظت ۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ کاهش بیشتری

یافت ($P<0.05$). (جدول۲).

جدول ۲- تراکم سلول‌های ریزجلبک اسکلتونما (*Skeletonema sp.*) پرورش یافته در غلظت‌های مختلف سولفات مس (انحراف معیار± میانگین) با ۹۵ درصد اطمینان

غلظت / ساعت	۰ میلی‌گرم در لیتر	۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر	۰/۵ میلی‌گرم در لیتر	۱ میلی گرم در لیتر	۱/۵ میلی‌گرم در لیتر
۲	۳۵/۰×۱۰^{۴}±۱/۱	۳۲/۵×۱۰^{۴}±۱/۵	۳۰/۸×۱۰^{۴}±۲/۸	۳۰/۷×۱۰^{۴}±۵/۲	۳۰/۵×۱۰^{۴}±۰/۷
۴	۳۳/۶×۱۰^{۴}±۰/۱	۳۱/۳×۱۰^{۴}±۳/۲	۲۸/۲×۱۰^{۴}±۲/۶	۲۵/۱×۱۰^{۴}±۱/۱	۲۵/۶×۱۰^{۴}±۱/۲
۶	۲۴/۷×۱۰^{۴}±۱/۶	۲۹/۳×۱۰^{۴}±۴/۲	۲۷/۰×۱۰^{۴}±۱/۳	۲۲/۶×۱۰^{۴}±۳/۷	۲۲/۳×۱۰^{۴}±۳/۳
۱۲	۲۳/۰×۱۰^{۴}±۲/۸	۲۷/۵×۱۰^{۴}±۴/۴	۲۱/۵×۱۰^{۴}±۳/۶	۲۱/۸×۱۰^{۴}±۲/۴	۲۰/۸×۱۰^{۴}±۱/۳
۲۴	۱۹/۸×۱۰^{۴}±۱/۶	۲۷/۲×۱۰^{۴}±۱/۳	۱۸/۸×۱۰^{۴}±۲/۶	۱۸/۵×۱۰^{۴}±۲/۷	۱۸/۴×۱۰^{۴}±۲/۴
۴۸	۱۴/۹×۱۰^{۴}±۲/۵	۱۴/۵×۱۰^{۴}±۰/۵	۱۳/۵×۱۰^{۴}±۲/۴	۱۲/۵×۱۰^{۴}±۴/۹	۱۲/۲×۱۰^{۴}±۲/۰
۷۲	۴/۰×۱۰^{۴}±۰/۲	۶/۵×۱۰^{۴}±۰/۴	۵/۲×۱۰^{۴}±۰/۱	۴/۱×۱۰^{۴}±۰/۳	۲/۳×۱۰^{۴}±۰/۲
۸۴	۱/۱×۱۰^{۴}±۰/۱	۱/۵×۱۰^{۴}±۰/۷	۱/۴×۱۰^{۴}±۰/۱	۱/۰×۱۰^{۴}±۰/۴	۰/۵×۱۰^{۴}±۰/۲
۹۶	۰/۵×۱۰^{۴}±۰/۱	۱/۰×۱۰^{۴}±۰/۷	۱/۲×۱۰^{۴}±۰/۱	۰/۹×۱۰^{۴}±۰/۵	۰۰/۱×۱۰^{۴}±۰/۱

(حروف مشترک در هر ردیف نشاندهنده معنی دار نبودن است)

همچنین نتایج نشان داد که بیشترین کاهش تراکم سلول‌های ریزجلبک اسکلتونما در تیمار شاهد پس از گذشت ۶ ساعت از زمان شروع مطالعه ایجاد گردید به گونه‌ای که این میزان به طور معنی داری از تراکم محاسبه شده در ساعات ۲ و ۴ تراکم کمتری داشت ($P<0.05$). از سوی دیگر تراکم سلول ریزجلبک اسکلتونما به طور معنی داری از ساعت ۲۴ تا ۹۶ کاهش یافت به گونه‌ای که کمترین تراکم سلول در ساعت ۹۶ حاصل گردید($P<0.05$). همچنین نتایج حاصل از تراکم سلول‌های ریزجلبک در تیمار غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس بدین صورت بود که علیرغم کاهش تراکم سلول‌ها بیشترین کاهش تراکم در ۴۸ ساعت پس از مواجهه با سولفات مس حاصل گردید که به طور معنی داری نسبت به تراکم سلول‌های ریزجلبک در ساعت ۲۴ کاهش بیشتری یافت ($P<0.05$). از سوی دیگر تراکم سلول‌ها به طور معنی داری از ساعت ۷۲ تا ۹۶ ساعت پس از مواجهه با سولفات مس کاهش معنی داری داشت ($P<0.05$). در رابطه با بررسی تراکم سلول‌ها در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید که پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان مواجهه با سولفات مس تراکم سلول ریزجلبک در مقایسه با ساعات ۲، ۴، ۶ و ۱۲ بطور معنی داری کاهش بیشتری یافت ($P<0.05$). از سوی دیگر در ساعت ۹۶ تراکم سلول به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر سلول‌ها در ۴۸ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت پس از زمان مواجهه به طور معنی تراکم کمتری داشتند ($P<0.05$). لذا

در نهایت تراکم سلول‌ها به طور معنی داری در ساعت ۹۶ کاهش یافت. از سوی دیگر سلول‌ها در ۴۸ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت پس از مواجهه، در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس به طور معنی داری تراکم کمتری داشتند ($P<0.05$). همچنین تراکم سلول ریزجلبک در ساعت ۸۴ و ۹۶ به طور معنی داری به شدت کاهش یافت که در نهایت به کمترین میزان در ساعت ۹۶ رسید.

۴. بحث

با توجه به اینکه افزودن مس در محیط‌های آبی همواره با مخاطراتی از جمله از بین رفتن جلبک‌های تک سلولی همراه می‌باشد (۲۶)، در مطالعه حاضر سعی گردید اثرات غلظت‌های مختلف سولفات مس بر روی رشد و تراکم ریزجلبک‌های تک سلولی کیتوسروس و اسکلتونما مورد بررسی قرار گیرد. نتایج حاصله از تحقیق حاضر نشان داد که به دنبال مواجهه ریزجلبک‌های کیتوسروس و اسکلتونما با غلظت‌های مختلف سولفات مس در طی ساعات مختلف، بیشترین کاهش تراکم ریزجلبک‌ها در غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر حاصل شد. همچنین مشاهده گردید که در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس علی رغم اینکه تراکم ریزجلبک‌ها نسبت به تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیترکمتر بود لیکن هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ($P>0.05$). با توجه به اینکه مواجهه ریزجلبک‌ها با سولفات مس در مرحله تثبیت نمودار رشد صورت گرفته بود، مشاهده گردید که در مقایسه با غلظت‌های فوق کاهش تراکم ریزجلبک‌ها در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتردر طول مدت مطالعه از لحاظ آماری به میزان کمتری صورت گرفت ($P<0.05$). از مهم‌ترین دلایل تفاوت در میزان تراکم ریزجلبک در تیمارهای فوق الذکر، می‌توان به نوسانات ایجاد شده در فاکتورهای غیرحیاتی از قبیل شوری، کربن آلی محلول،pH و فاکتورهای حیاتی همانند اندازه و سن ریزجلبک، میزان سم جذب شده توسط ریزجلبک و اختلال در فرآیندهای سم زدائی موجود در ریزجلبک‌ها اشاره نمود (۱۱). از انجائیکه در مطالعه حاضر، فاکتورهای فیزیک و شیمیایی در کلیه تیمارها یکسان در نظر گرفته شده است، می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که تنها عامل محدود کننده رشد ریزجلبک ها در مقایسه با تیمار شاهد می‌تواند افزایش غلظت یون مس در محیط بویژه در ساعات اولیه مواجهه باشد، به طوری که همزمان با افزایش غلظت سولفات مس در محیط بعد از گذشت ۲ ساعت از زمان مواجهه علاوه بر مرگ سریع سلول‌ها با کاهش تراکم سلول‌ها در تیمارهای آزمایشی همراه گردید.

با توجه به گزارشات Sunda and Guillard (1976) مبنی بر اینکه بدلیل قابلیت عبور مس از دیواره سلولی و غشاء پلاسمائی، در اثر افزایش یون مس در محیط، جذب این عنصر به داخل سلول به میزان بیشتری صورت می‌پذیرد که علاوه بر افزایش تخریب و مرگ سلول‌ها با کاهش آنها نیز همراه است، در تحقیق حاضر هم با افزایش یون مس جذب آن به داخل سلول به میزان بیشتری صورت گرفت. در نتیجه مشاهده شد که میزان تراکم غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر در سلول‌های هر دو گونه ریز جلبک کیتوسروس و اسکلتونما بیشتر کاهش یافت (۳۳). از سوی دیگر گزارش شد که مس جزء فلزات کمیاب بوده و نقش مهمی در عملکرد بیوشیمیایی موجودات فتوسنتز کننده دارد (۸). لذا افزایش غلظت این یون در محیط همانند افزایش سایر فلزات سنگین، علاوه بر افزایش سمیت، با ایجاد اختلال در انتقال الکترون‌ها از طریق غشاء سلولی موجب کاهش رشد و تراکم فیتوپلانکتون‌ها می‌گردد (۱۸، ۳۴ و۲۸). در این مطالعه مشاهده گردید که در هر دو گونه ریزجلبک کیتوسروس و اسکلتونما کاهش تراکم در کلیه تیمارهای آزمایشی صورت پذیرفت با این تفاوت که تیمارهای غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ در مقایسه با تیمارهای غلظت ۱ و ۱/۵ کاهش کمتری یافت. با توجه به مطالعات Verho-

even & Eloff (1979) و Buchwalter & Cain (2005) با افزایش غلظت سولفات مس در محیط و در پی انتقال بیشتر مس به داخل سلول‌های ریزجلبک علاوه بر اختلال در انتقال الکترون‌ها، یون مس قادر است که با تجمع فیبرهای ماده ژنتیکی DNA و پارگی دیواره های تیلاکوئید موجب مرگ سلول‌های ریزجلبک گردد (۱۱ و۳۵). از سوی دیگر در مطالعه کنونی، در تیمارهای آزمایشی غلظت ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس تراکم سلول‌های ریزجلبک‌های کیتوسروس و اسکلتونما نسبت به تیمار شاهد به ترتیب پس از گذشت ۲۴ و ۶ ساعت به طور معنی داری افزایش یافت ($P<0.05$). با توجه به اینکه در مطالعات گذشته عنوان شد که سولفات مس به عنوان یک ماده مغذی و میکروالمنت جهت رشد ریزجلبک‌ها به محیط کشت کانوی افزوده می‌شود (۲۲،۱۷ و ۱۳)، این حالت ممکن است ناشی از بالا بودن یون مس در محیط کشت تیمارهای آزمایشی نسبت به شاهد باشد. Joux-Arab و همکاران (۲۰۰۰)، Levy و همکاران (۲۰۰۷) عنوان نمودند که تفاوت‌های درون گونه‌ای می‌تواند در حساسیت ریزجلبک‌ها نسبت به فلزات سنگین بویژه مس نقش داشته باشند (۲۴ و ۲۶). بنابراین در این تحقیق، با توجه به اینکه ریزجلبک‌های استفاده شده جزء جلبک قهوه‌ای یا دیاتومه ها می‌باشند، به دلیل اختلافات درون گونه‌ای، حساسیت و مقاومت دو ریز جلبک کیتوسروس و اسکلتونما نسبت به مس متفاوت بوده است. در این مطالعه، اختلاف ایجاد شده در تراکم سلول ها طبق تحقیقات (۱۵، ۱۹ و۹)، ممکن است ناشی از تفاوت در مقدار سیلیس موجود در دیواره سلولی ریزجلبک های کیتوسروس و اسکلتونما باشد، به طوری که حضور این ماده در دیواره سلولی ریزجلبک اسکلتونما باعث شده بود که پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان مواجهه با غلظت‌های مختلف سولفات مس همچنان تراکم آنها بیشتر از سلول‌های ریزجلبک کیتوسروس باشد لذا به دنبال نفوذ بیشتر یون مس به داخل سلول مرگ سلول‌های ریزجلبک اسکلتونما به سرعت ایجاد شد. (۱۹۹۵) Sar-raf-El و Taha عنوان نمودندکه حساسیت جلبک‌های دریایی به یون مس علاوه بر تنوع، ارتباط مستقیمی با دوره زمانی جذب مس توسط این ریزجلبک‌ها نیز دارد به گونه‌ای که سمیت مس به طور معکوسی با غلظت مواد مغذی موجود در محیط مرتبط است (۱۶). با توجه به مطالب فوق، از آنجایی که در مطالعه حاضر افزودن غلظت‌های مختلف سولفات مس در مرحله تثبیت نمودار رشد ریزجلبک‌ها صورت گرفته بود لذا مشاهده شد که همزمان با کاهش مواد مغذی موجود در محیط، در تیمارهایی که غلظت سولفات مس بیشتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر بود به دلیل افزایش نفوذ یون مس به داخل سلول و افزایش سمیت آن، تراکم ریزجلبک‌ها پس از گذشت ۲ ساعت از زمان مواجهه نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر به شدت کاهش یافت. با این وجود عنوان شده که غلظت استفاده شده از سولفات مس برای کنترل بلوم جلبکی ۱ میلی‌گرم در لیتر است که سمیت آن برای ماهیان بسیار کم بوده لیکن برای بی مهرگان بسیار کشنده می باشد بنابراین دوز سفارش شده سولفات مس برای سخت پوستان به طور معمول کمتر از ۰/۵ – ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و برای اکثر ماهیان ۱ – ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (۱۰). در تحقیق دیگری جهت کنترل بلوم جلبکی در استخرهای پرورش آبزیان از غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس و از غلظت‌های ۰/۰۵ تا ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر به صورت یون مس نیز جهت کنترل جلبک‌های سبز _ آبی در شرایط آزمایشگاهی استفاده می شود، در حالی که در شرایط محیط بیرون می بایست از غلظت‌های ۰/۴ – ۰/۲ میلی گرم در لیتر سولفات مس استفاده شود (۲۵). در تحقیق حاضر نیز از غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۱/۵ میلی گرم در لیتر در شرایط آزمایشگاهی استفاده گردید. با توجه به مطالب فوق الذکر، در دهه‌های اخیر به دلیل سرازیر شدن مواد مغذی و نوترینت‌ها به بدنه‌های آبی و وقوع بلوم جلبکی می‌توان

از اثرات بازدارندگی فلزات سنگین به منظور کنترل عمدی رشد و فتوسنتز ریزجلبک‌ها استفاده نمود (۲۹). از سوی دیگر به دلیل حضور جلبک‌های تک سلولی سبز و قهوه‌ای در استخرهای پرورش آبزیان بویژه میگو در بسیاری از مواقع به دنبال رشد و تراکم بیش از حد آنها بویژه در ساعات پایانی شب به دلیل مصرف بیش از حد اکسیژن در پی فرآیند فتوسنتز می‌توانند موجب ایجاد مرگ و میر در استخرهای پرورش میگو شوند. از این رو با توجه به نقش جلبک‌های تک سلولی در تغذیه آبزیان تعیین غلظت مناسب از سولفات مس به منظور از بین بردن موقتی فیتوپلانکتون‌ها در استخر، بدون اینکه خللی در چرخه غذایی موجودات آبزی ایجاد نماید ضروری به نظر می‌رسد. نتایج حاصل از مطالعه حاکی از آن بود مناسب‌ترین غلظت سولفات مس به منظور کنترل موقتی ریزجلبک‌های کیتوسروس و اسکلتونما در شرایط آزمایشگاهی به ترتیب ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد، در حالی که استفاده از غلظت‌های بالاتر از ۱ میلی‌گرم در لیتر سولفات مس در هر دو گونه علاوه بر کاهش شدید تراکم سلولی ریزجلبک‌ها با مرگ سریع آنها همراه است. از این رو استفاده از غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر علاوه بر کاهش تراکم سلول‌های ریزجلبک مانع از تجمع یون مس در محیط و افزایش سمیت آن برای موجودات آبزی می شود لذا پس از گذشت چند روز از دوره پرورش به واسطه کم شدن غلظت یون مس در محیط و در صورت فراهم شدن شرایط، ریزجلبک‌ها مجدداً افزایش پیدا خواهند کرد. همچنین به دلیل اختلافات گونه‌ای و مقاومت ریزجلبک اسکلتونما در برابر نفوذ یون مس به داخل سلول، آنها تا ۴۸ ساعت پس از مواجهه به طور معنی داری از تیمارهای ریزجلبک کیتوسروس تراکم بیشتری داشتند ($P<0.05$). لیکن پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان مواجهه به دلیل افزایش نفوذ مس به داخل سلول‌های ریزجلبک اسکلتونما تراکم آنها به شدت کاهش یافت از این رو می‌توان عنوان نمود که حساسیت ریزجلبک اسکلتونما نسبت به غلظت‌های مختلف سولفات مس پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان مواجهه بیشتر از ریزجلبک کیتوسروس می‌باشد.

سپاسگزاری

از استاد گرامیم آقای دکتر رضا قربانی واقعی و سایر اساتیدی که مرا در این راه یاری نمودند کمال تشکر وقدردانی به عمل می آید.

منابع

۱- پای گذار، ا.، پذیر، م. خ. ۱۳۹۰. بررسی تأثیر شدت نور بر رشد و تراکم جلبک تتراسلمیس در شرایط آزمایشگاهی. پایان نامه کارشناسی دانشگاه جامع علمی کاربردی، مرکز آموزش جهاد کشاورزی خلیج فارس. ۶۶ صفحه.

۲- قباد آذری تاکامی و محمد امینی چرمهینی.، ۱۳۸۷. دستورالعمل تکثیر و پرورش پلانکتون‌ها (ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران. ۳۴۲ صفحه.

۳- قربانی واقعی، ر.، سامانی، ن.، شریعتی، ف. و فقیه، غ. ح. ۱۳۸۵. تعیین غلظت کشنده مس بر میگوی پاسفید (*Litopenaeus vannamei*) در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی شیلات ایران. سال پانزدهم، شماره ۴. ص ۱۰۳.

۴- قربانی واقعی، ر: داودی،ر.، ۱۳۹۳. تغذیه در آبزی پروری (ترجمه). انتشارات بین المللی شمس. ۹۱ ص.

۵-کازرونی، ن.، محمدی، م.، جواهری بابلی، م. و پذیر، م. خ. ۱۳۹۱. پایان نامه کارشناسی ارشد. شناسایی بهینه رشد جلبک *Tetraselmis suecica* و ترکیب اسید چرب در دامنه نوری و شوری‌های مختلف. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات خوزستان. ۸۰ ص.

۶- مهدی نژاد، ک.، مهدی نژاد، م. ۱۳۹۰. شریعتی فیض آبادی، ف. بررسی اثر آلودگی غلظت‌های مختلف علف

کش مزارع برنج (اکسادیارژل) بر تولیدکنندگان (جلبک سبز سندسموس) در منابع آبی. همایش آبزی پروری ایران.. ص ۵۲۴.

7- Alix J.H. and Wikfors G.H., 2004.A flow-cytometric method for counting microalge and bacterial cells in the same sample.Journal Shellfish Research, 23, 631 - 633.

8- Baron, M., Arellano, J.B., Gorge, J.L., 1995. Copper and photosystem II: a controversial relationship. Physiol. Plant. 94, 174–180.

9- Barrington, D.J. and Ghadouani, A., 2008.Application of hydrogen peroxide for the removal of toxic cyanobacteria and other phytoplankton from wastewater.Environ. Sci. Technol. 42, 8916–8921

10- Boyd, C.E., 1990.Water quality in ponds for Aquaculture.Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama.482 pp.

11- Buchwalter, B. and Cain, D,. 2005. Species-specific responsesto environmental contaminants: A case for comparative physiology. Setac Globe; -May-Jun:31.

12- Chen, J. Ch. and Lin, Ch. H., 2001. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, Penaeusmonodon.Aquaculture 192, 55–65.

13- Coêlho, A.A.da C., Gonçalves Barros M.U., Cavalcante Bezerra J.H., Alves da Silva J.W., Lafaiete Moreira R. and Lobo Farias, W.R., 2013.Growth of the microalgae Tetraselmistetrathele and nitrate depletion in culture medium Guillard f/2 and Conway.Acta Scientiarum.Biological Sciences, 35:163 - 168.

14- De Schamphelaere, K.A.C., Stauber, J.L., Wilde, K.L., Markich, S.J., Brown P.L., Francklin,N.M., Creighton,N.M. and Janssen, C.R., 2005. Toward a biotic ligand model for freshwater green algae: surface-bound and internal copper are better

predictors of toxicity than freeCu2+-ion activitywhen pHis varied. Environ. Sci. Technol. 39, 2067–2072.

15- Drábková, M., Admiraal, W. and Marsálek, B., 2007.Combined exposure to hydrogen peroxide and light–selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. Environ. Sci. Technol. 41, 309–314.

16- EL-Sarraf Wagdy, M. and Taha Ola E. 1995.Effects of Copper on Phytosynthetic Activity and Chlorophyll-a Content of ChaetocerosRadicans Schutt.Bullentin of high Institute of Public Health, 25, 2, 439-446.

17- Ershad Langroudi, H., Kamali, M. and Falahatkar, B., 2010.The independent effects of ferrous and phosphorus on growth and development of Tetraselmissuecica; an invitro study.Caspian J. Env. Sci. 8, 109 - 114.

18- Extension Toxicology Network, 1996. Copper sulfate. Http://extoxnet.orst.edu/pips/coppersu.htm

19- Franklin, NM., Stauber, JL. and Lim, RP., 2004. Development of multispecies algal bioassays using flow cytometry. Environ Toxicol Chem;23,1452-1462.

20- Ghezelbash F., Farboodnia T., Heidari R. and Agh N. 2008a.Biochemical Effects of Different Salinities and Luminance on Green Microalgae Tetraselmischuii.Research Journal of Biological Sciences, 3, 217-221.

21- Ghezelbash F., Farboodnia T., Heidari R. and Agh N., 2008b.Effects of Different Salinities and Luminace on Growth Rate of the Green Microalgae Tetraselmis chuii. Research Journal of Biological Sciences, 3, 311 - 314.

22- Guillard R.R.L. 1975.Culture of phytoplakton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanle MH (eds) Culture invertebrate animals. Plenum, New York, pp. 26-60.

23- Hrudey, S., Burch, M.D., Drikas, M. and Gregory, R., 1999.Remedial measures. In: Cho-rus, I., Bartram, J. (Eds.), Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management.E&FNSpon, NewYork, pp. 275–312.

24- Joux-Arab L., Berthet B. and Robert J.M., 2000. Do toxicity and accumulation of copper change during size reduction in the marine pennate diatom Haslea ostrearia? Mar Biol.136,323-330.

25- Kaewsarn, P., 2002. Biosorption of copper (II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine algae Padina sp., Chemosphere. 47, 1081–1085

26-Levy, J. L., Stauber, J. L. and Jolley, D.F., 2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. Science of the T otal Environment, 387 (1-3), 141-154.

27- Overnell J., 1975.The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga. Pesticide Biochemistry and Physiology.; 5(1):19-26.

28-Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitao, M.A.S., Okamoto, O.K., Morse, D.,Colepicolo, P., 2003.Heavy metal-induced oxidative stress in algae.J. Phycol. 39, 1008–1018.

29-Qian H., Yu S., Sun Z., Xie X., Liu W. and Fu Z., 2010. Effects of copper sulfate, hydrogen peroxide and N-phenyl-2-naphthylamine on oxidative stress and the expression of genes involved photosynthesis and microcystin disposition in Microcystis aeruginosa. Aquatic Toxicology. 99(3),405-12.

30-Rosslenbroich, H.J. and Stuebler, D., 2000.Botrytis cinerea – history of chemical control and novel fungicides for its management.Crop Prot. 19, 557–561.

31-Shannon L.M., Jennifer H.A. and Gary H.W., 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, Tetraselmischui (PLY429). Aquaculture,

246.393-404.

32-Soldo, D., Hari, R., Sigg, L. and Behra, R., 2005.Tolerance of Oocystis nephrocytioides to copper: intracellular distribution and extracellular complexation of copper. Aqua.Toxicol. 71, 307–317.

33-Sunda W. and Guillard R.R.L., 1976. The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. J Mar Res,34.511-529.

34-Verdisson, S., Couderchet,M. and Vernet, G., 2001.Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants. Chemosphere,. 44, 467–474.

35- Verhoeven, R.L. and Eloff, J.N., 1979.Effect of lethal concentrations of copper on the ultrastructure and growth of Microcystis. Proc. Electron. Microsc. Soc. S. Afr. 9,161–162.