

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 پذیرش: ۸۸/۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۲

چکیده

مقدمه: طی این مطالعه نسبت وزنی 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 غلظت های متفاوت فسفر بر میزان رشد مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار:** آزمایشات طی زمان ۹۶ ساعت در شرایط آزمایشگاهی (شدت نور 350 ± 350 لوکس و درجه حرارت 25 ± 2 درجه سانتی گراد)، انجام شد. تیمارهای متفاوت با نسبت های مختلف ازت به فسفر یا غلظت های 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 رشته های 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 ۱:۰/۰۳۳، غلظت ازت $9/9 \mu\text{g.L}^{-1}$ و غلظت فسفر $2/96 \text{ mg.L}^{-1}$ تشکیل شکوفایی داد لیکن نسبت ازت به فسفر در دامنه ۱:۱۵ تا ۱:۲۲ منجر به حداکثر شکوفایی گردید. بیشترین میزان درصد رشد در نسبت ازت به فسفر ۱:۱۸/۱۵ با غلظت ازت $53/72 \text{ mg.L}^{-1}$ و غلظت فسفر $2/96 \text{ mg.L}^{-1}$ مشاهده شد و در این نسبت به $5219/84 \pm 1486/69$ رسید. با افزایش هر چه بیشتر نسبت ازت به فسفر درصد رشد کاهش یافت. از نسبت ۱:۸۶ تا ۱:۲۱۸ به بالا شکوفایی متوقف گردید. آزمایشات مطالعه بر روی غلظت فسفر نشان داد که غلظت فسفر در محیط کشت زایندر ($2/96$ میلی گرم در لیتر) مناسب ترین غلظت برای شکوفایی آنابنا است.

۱ - دانشیار، پژوهشکده آبی پروری آبهای داخلی، بندر انزلی

۲ - استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه بیولوژی دریا

۳ - استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه بیولوژی دریا

۴ - دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه بیولوژی دریا* (مسئول مکاتبات)

بحث و نتیجه گیری: بر اساس این نتایج هنگام وجود فسفر به میزان بهینه، آنانبا 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

را تحریک می‌کند (۶). از آن جایی که کمبود ازت مانع از رشد فیتوپلانکتونی که تثبیت ازت نمی‌کند می‌گردد، نسبت ازت به فسفر پایین شاخص خوبی برای شکوفایی سیانوباکترهای تثبیت کننده ازت است (۴، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱).

Smith و همکاران 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 می‌شوند (۵).

برخلاف سایر فیتوپلانکتون سیانوباکترهای تثبیت کننده ازت مستقل از منبع ازت مانند نیترات و آمونیوم هستند (۸). سیانوباکترها دارای سلول های ویژه ای به نام 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).

سال‌های زیادی 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 می‌گردد (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

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 آبی می‌گردند (۵).

ورود مواد مغذی به پیکره های آبی سبب تغییر در نسبت ازت به فسفر می‌گردد. 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 بی‌هوازی جریان جداسازی فسفات از رسوبات بستر

مواد و روش کار

به منظور انجام کشت و پرورش آزمایشگاهی آنابنا در آزمایشگاه جلبک پژوهشکده آبی پروری آب‌های داخلی از روش (Miller, ۱۹۷۸) 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 آبی پروری آب‌های داخلی دریافت و در محیط کشت زایندر کشت داده شد.

۱-۲- 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.

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 می‌گردد (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 سال‌های اخیر افزایش یافته که این امر موجب تغییر در نسبت ازت به فسفر گردیده است. از آن جایی که تا کنون دوبار کشت 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 می‌شود.

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 ازت به فسفر که منجر به حداکثر شکوفایی و عدم شکوفایی در این جلبک می‌گردد، استفاده شد. جهت تکمیل مطالعات، تاثیر غلظت های مختلف فسفر بر رشد آنابنا بررسی گردید.

اختلاف معنی دار 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 ۱:۰۰۳۳ بود که خود پس از ۹۶ ساعت منجر به شکوفایی گردید.

از نسبت ۱:۱ تا 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 دامنه ی بین ۵:۱ تا ۲۲:۱ انجام گرفت. درصد رشد در شاهد $1123/44 \pm 150.5/12$ و جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر 0.071 محاسبه گردید نتایج نشان داد که نسبت ازت به فسفر در دامنه ی ۱:۱۵ تا ۱:۲۲ منجر به حداکثر شکوفایی در *Anabaena flos - aquae* می شود. (نمودار ۱) بالاترین درصد رشد در نسبت ازت به فسفر ۱:۱۵/۱۸ با غلظت ازت $53/72$ میلی گرم در لیتر و غلظت ازت $2/96$ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. (نمودار ۱) درصد رشد در این نسبت $1486/69 \pm 5219/84$ یعنی $3/5$ برابر شاهد بود. میانگین تعداد رشته های جلبک آنابنا در این نسبت از 5300 به $275172/53$ رشته در میلی لیتر افزایش یافت. جذب نوری نیز 0.255 بود. (جدول ۱)

آزمون چند دامنه دانکن نشان داد در نسبت ازت به فسفر ۵:۱ درصد رشد اختلاف معنی داری با شاهد نداشت ($P > 0.05$) اما در نسبت های بالاتر از ۵:۱ درصد رشد به طور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$) تا این که در نسبت ۱:۲۲ مجدداً کاهش یافته و دیگر اختلاف

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.

۳-۲- کشت جلبک:

هر ۱ لیتر محیط کشت زایندر به میزان ۲۵۰ میلی لیتر در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی لیتری تقسیم شد. سپس ازت یا فسفر براساس نوع آزمایش به هر یک از ارلن ها 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 میلی لیتر نمونه از هر تیمار و شاهد جهت شمارش جلبک ها برداشت و توسط فرمالین ۴٪ فیکس گردید. سپس ارلن ها توسط پیپت های هوا به هواده های واقع بر روی میز کشت جلبک که به لامپ های فلورسنت مجز هستند متصل گردیده و در شرایط آزمایشگاهی مناسب رشد جلبک یعنی میزان نور 350 ± 350 لوکس که به صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی تنظیم گردیده و درجه حرارت 25 ± 2 درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۲۲). آزمایشات تعیین رشد طی زمان ۹۶ ساعت (۴ روز) انجام شد. پس از سپری شدن ۹۶ ساعت مجدداً ۲ میلی لیتر 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-۲۰۰۰ در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. همچنین pH نیز توسط دستگاه pH متر مدل HANA HI ۹۰۲۵ قرائت گردید.

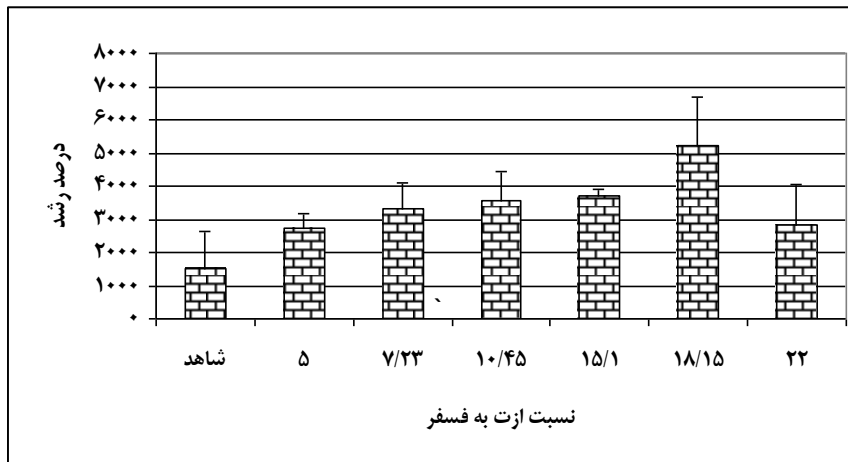
۳-۴- شمارش:

شمارش با استفاده از لام توما و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $40 \times$ انجام گرفت. بر اساس تعداد رشته های محاسبه شده در نمونه های پیش و پس از ۹۶ ساعت هر تیمار، درصد رشد محاسبه گردید.

۳-۵- روش های آماری مورد استفاده در تجزیه و تحلیل داده ها:

در این تحقیق با توجه به نرمال بودن توزیع داده ها، جهت مقایسه میانگین درصد رشد در تیمارهای مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه جفتی تیمارها و تعیین

معنی‌داری درصد رشد این نسبت با شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$).



نمودار ۱- رابطه درصد رشد با نسبت ازت به فسفر در آزمایش حداکثر شکوفایی

جدول ۱- جذب نوری و pH هر تیمار در آزمایش حداکثر شکوفایی

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

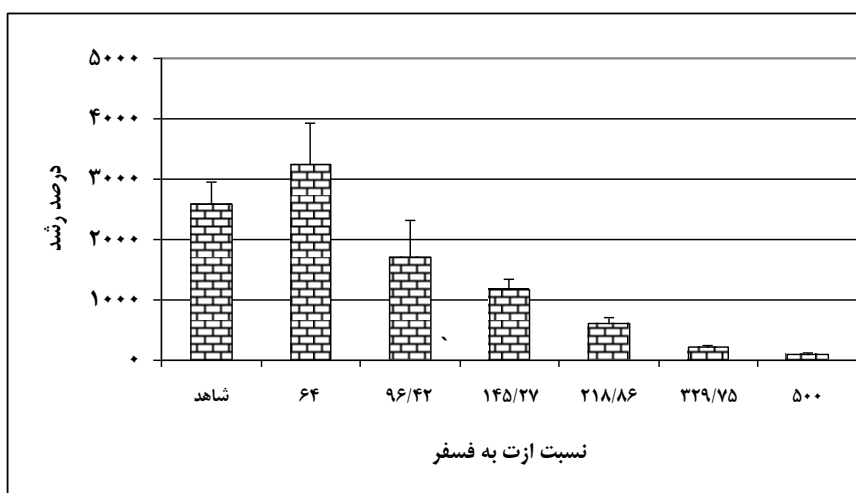
(۲۵۸۴/۲۹±۳۵۹/۵۱) کاهش یافت. میزان جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر در نسبت ۱: ۲۱۸/۸۶ به ۰/۰۹۰ کاهش یافت (جدول ۲). در نسبت‌های بالاتر از ۱: ۲۱۸/۸۶ درصد رشد همچنان کاهش یافت تا جایی که در نسبت ۱: ۵۰۰ به $\frac{1}{26}$ یعنی $99/32 \pm 14/13$ شاهد رسید. (نمودار ۲) میانگین درصد رشد در نسبت ۱: ۲۱۸/۸۶ از درصد رشد در شاهد و نسبت ۱: ۶۴ به طور معنی‌داری کمتر بود. ($P < 0.05$)

نتایج آزمایشات عدم شکوفایی نشان داد که درصد رشد تا نسبت ۱: ۶۴ همچنان از شاهد بیشتر بود (نمودار ۲) اما اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت. ($P > 0.05$) 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 $\frac{1}{4}$ یعنی $615/18 \pm 86/24$ درصد رشد شاهد

همچنین همان طور که در جداول و نمودارهای 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.

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



نمودار ۲- رابطه درصد رشد با نسبت ازت به فسفر در آزمایش عدم شکوفایی

Anabaena flos-aquae

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

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

موج ۷۵۰ نانومتر ۰/۲۶۰ بود (جدول و نمودار ۳). تعداد رشته ها از ۱۰۹۰۰ رشته 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 میلی گرم در لیتر، درصد رشد به

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 میلی گرم در لیتر مشاهده گردید. میانگین درصد رشد در غلظت ۲/۹۶ میلی گرم در لیتر (شاهد) $3350/73 \pm 1003/4$ و جذب نوری در طول

معنی‌داری از همه غلظت‌های فسفر مطالعه شده (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۵، ۱/۴، ۴/۱، ۱۲، ۳۴ و ۱۰۰) بالاتر بود (نمودار ۳) ($P < 0.05$).

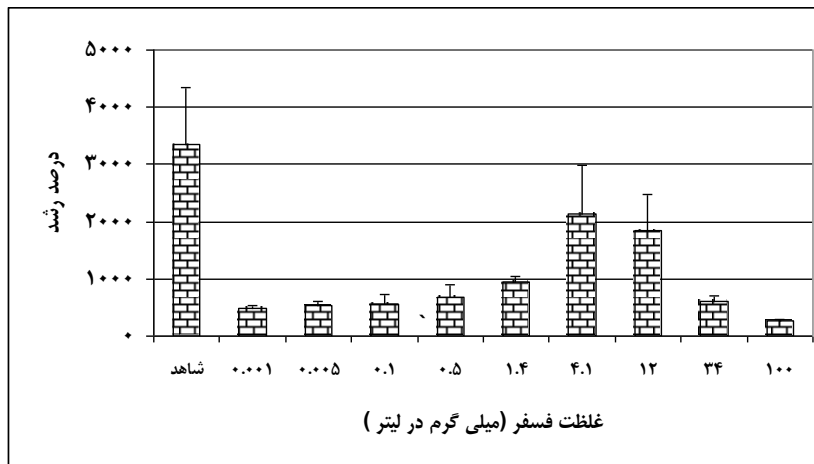
طی این آزمایش تغییر در غلظت فسفر سبب تغییر در تعداد هتروسیست ها گردید. کاهش غلظت فسفر نسبت به شاهد سبب کاهش در تعداد هتروسیست شد. با افزایش غلظت فسفر تعداد هتروسیست ها افزایش یافت.

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

۴۴/۳±۴۹۲/۵۳ یعنی حدود ۰/۱۴ شاهد کاهش یافت. جذب نوری در این غلظت ۰/۵۰ بود. از غلظت فسفر ۳۴ میلی گرم در لیتر نیز شکوفایی متوقف گردید.

در غلظت فسفر ۳۴ میلی‌گرم در لیتر درصد رشد به ۱/۵ شاهد کاهش یافت. جذب نوری نیز در این غلظت ۶۰۳/۷۴±۹۶/۰۱

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 ۰/۴۰ بود. نتایج آماری نشان داد که درصد رشد در شاهد به طور



نمودار ۳- رابطه درصد رشد با غلظت فسفر

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

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

۴- بحث

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، ۰/۰۱، ۰/۵، ۱/۴، ۴/۱، ۱۲، ۳۴ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) بالاتر بود ($P < 0.05$). این نتیجه بیانگر آن است که غلظت فسفر در محلول شاهد مناسبترین غلظت جهت دستیابی به رشد ایتیموم در آنابنا می‌باشد زیرا درصد رشد در این غلظت به طور معنی داری 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 $\frac{1}{4}$ 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 زاینده منفی با غلظت ناچیز ازت (۹/۹ میکروگرم در لیتر) و نسبت ازت به فسفر ۱:۰/۰۳۳، 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). Simonse و Jacobsn در سال ۱۹۹۳ بیان کردند که ازت برای گسترش سیانوباکترهای تثبیت کننده ازت لازم است.

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، ۱: ۱۵، ۱: ۱۸/۱۵ اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < 0.05$). تنها بین شاهد و نسبت ۲۲:۱ و ۵:۱ اختلاف معنی دار وجود نداشت ($P > 0.05$). لیکن درصد رشد در نسبت ۱: ۱۸/۱۵ با درصد رشد در نسبت ۲۲:۱ و ۵:۱ اختلاف معنی دار داشت ($P < 0.05$). 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 ($P < 0.05$). درصد رشد مجدداً در نسبت ازت به فسفر ۲۲:۱ کاهش یافت و دیگر اختلاف معنی داری با شاهد مشاهده نشد ($P > 0.05$). از آن جایی که درصد رشد در ۱: ۱۸/۱۵ با غلظت ازت ۵۳/۷۲ میلی گرم در لیتر با درصد رشد در نسبت ۱: ۱۵ با غلظت ازت ۴۴/۴ میلی گرم در لیتر اختلاف معنی داری نداشت ($P < 0.05$), از نسبت ۱۵:۱ به بالا حداکثر شکوفایی محسوب گردید. مطالعات بیشتر این بررسی نشان داد که درصد رشد تا نسبت ۱: ۶۴ با غلظت ازت ۱۸۹/۴۴ میلی گرم در لیتر با وجود عدم اختلاف معنی دار ($P > 0.05$) 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 ($P < 0.05$). در نهایت از نسبت ۱: ۲۱۸/۸۶ با غلظت ازت ۶۴۷/۸۲ میلی گرم در لیتر به بالا شکوفایی متوقف گردید.

پیش از این Stockner و Shorteed (۱۹۸۸) طی ۹ سال به صورت هوایی کودهای شیمیایی ازته و فسفات‌ها 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 شکوفایی 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

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 زاینده 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 منظور 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 هتروسیست‌ها کاهش یافت. کیان مهر نیز در سال ۱۳۷۱ عنوان کرد که اضافه نمودن ازت به محلول‌های کشت سیانوباکترها تشکیل هتروسیست‌ها را کند می‌نماید. 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 نمی‌کنند (۱۷). افزایش غلظت فسفر در بررسی‌های انجام شده بر روی تغییرات غلظت فسفر، منجر به افزایش فراوانی هتروسیست‌ها گردید. فسفر با تولید ATP انرژی لازم جهت تثبیت ازت را فراهم می‌کند در نتیجه با افزایش

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 می‌کنند.

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 غلظت‌های 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 و Kononen 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

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 ۸/۲-۹/۲ بود.

سپاسگزاری

از همکاری کلیه کارکنان محترم پژوهشکده آبی پروری کشور تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

1. Paerl, H. ۲۰۰۸. Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the Science and Research Needs. Chapter ۱۰: Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial bloom along the fresh- marine continuum. Springer New York. ۲۱۷-۲۳۸ pp.
2. Butler, M., Farrugia, D., Johnson, R., and Murray, C. ۲۰۰۰. The nutrient impact Wakehurst Golf Course on Manly Dam In: UTS Freshwater Ecology Report Of ۲۰۰۰, Dept Environmental Science, university of Technology, Sydney. ۲۰p.
3. Paerl, H. ۱۹۹۶. A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environment. *Phycologia* ۳۵, ۲۵- ۳۵.
4. Venter, A., Vurren, S. J. V., and Pieterse, AJH. ۲۰۰۳. *Oscillatoria simplicissima*: An autecological study. *Water SA* VOL.۲۹ NO. ۱, ۱۰۵- ۱۱۲.
5. Havens, K. E., James, R. T., East, T. L., and Smith, V. H. ۲۰۰۳. N: P ratios, Light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-

فسفر در دسترس، تثبیت ازت تحریک و در نتیجه فراوانی هتروسپیست‌ها افزایش می‌یابد(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 هتروسپیست می‌گردد. از آن جایی که در مطالعه حاضر طی بررسی بر روی غلظت فسفر، غلظت ازت در محیط کشت زاینده ثابت و بسیار پایین بود (۹/۹ میکروگرم در لیتر)، افزایش غلظت فسفر تاثیر به سزایی در فراوانی هتروسپیست‌ها داشت. آنانبا 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 هتروسپیست‌ها 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 هتروسپیست‌ها سبب افزایش اندازه سلول‌ها 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 آنانبا افزایش و با کاهش رشد آنانبا کاهش یافت. (جداول و نمودارهای ۱، ۲، ۳). Shortreed در سال ۱۹۸۸ بیان کردند که هنگام شکوفایی آنانبا در دریاچه کندی، pH به ۸/۹ و ۹/۵ افزایش یافت و با حذف آنانبا 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).

- Synechococcus* to manipulation of nitrogen: phosphorus ratios in a lake fertilization experiment. *Limnol. Oceanogr* ۳۳ (۶, part 1), ۱۳۴۸- ۱۳۶۱.
۱۲. ریاحی، ح. ۱۳۸۲. تالوفیت ها (جلبک ها- قارچ ها- گلسنگ ها). انتشارات آدنا. ص ۱۷۶
۱۳. Plinski, M., and Jozwiak, T. ۱۹۹۹. Temperature and N: P ratio as factors causing blooms of blue-green algae in the Gulf of Gdansk. *Oceanologia* ۴۱(۱), ۷۳- ۸۰.
۱۴. Falconer, I. R. ۱۹۹۸. Toxic Cyanobacteria in drinking water supply. *Harmful Algae. International Oceanographic commission of Unesco*, ۳۷- ۳۸.
۱۵. Lilover, M. -J., and Stips, A. ۲۰۰۸. The variability of parameters controlling the cyanobacterial bloom biomass in the Baltic Sea. *Journal of Marine Systems*. Article in press.
۱۶. 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. ۲۰۰۸. Eutrophication and harmful algal Blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* ۸, ۳- ۱۳.
۱۷. Feber, L. R., Levine, S. N., Lini, A., and Livingston, G. P. ۲۰۰۴. Do Cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? *Freshwater Biology* ۴۹, ۶۹۰- ۷۰۸.
۱۸. Ahern, K. S., Ahern, C. R., and Udy, J.W. ۲۰۰۸. In situe field experiment point source nutrient pollution. *Environment pollution* ۱۲۲, ۳۷۹- ۳۹۰.
۶. Lips, A. I., ۲۰۰۵. Abiotic factors controlling the cyanobacterial bloom occurrence in the Gulf of Finland. *Dissertation Biologicae universitatis Tartuensis* ۱۰۸. Tartu university press ۴۷.
۷. WHO, ۱۹۹۹. Toxic cyanobacteria in water: a Guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon. ۴۱۶p.
۸. Stal, L. J., Albertano, P., Bergman, B., Brockel, K, V., Gallon, J. R., Hayes, P. K., Sivonen, K., and Walsby, A. E. ۲۰۰۳. 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* ۲۳, ۱۶۹۵- ۱۷۱۴.
۹. Lehtimaki, J. ۲۰۰۰. 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.*
۱۰. Vuoria, K., Lagus, A., Lehtimaki, J. M., Suomela, J., and Helminen, H. ۲۰۰۵. 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* ۳۲۲, ۳۹- ۵۲.
۱۱. Stockner, J. G., and Shortreed, K. S. ۱۹۸۸. Response of *Anabaena* and

- of cyanobacterial blooms: Implications from the outgrowth of *Aphanizomenon* in Lake Kinnert. *Limnol. Oceanogr* ۴۶(۲). ۴۴۳- ۴۴۷.
۲۴. کیان مهر، ه. ۱۳۷۱. مبانی جلبک شناسی. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه مشهد.
۲۵. Tonno, I. ۲۰۰۴. The impact of nitrogen and phosphorus concentration and N/P ratio on cyanobacterial dominance and N₂ fixation in some Estonian lakes. *Dissertationes biologicae universitatis Tartuensis* ۱۰۰. Tartu university press.
۲۶. Doyoe, H. R., Buskey, E. J., and Jochem, F. J. ۲۰۰۷. Physiological responses of *Aureoumbra lagunensis* and *Synechococcus sp.* To nitrogen addition in mesocosm experiment. *Harmful Algae* ۶, ۴۸-۵۵.
۲۷. Sotero- Santos, R. B., Carvalho, E. G., Dellamano- Oliveira, M. J., and Rocha, O. ۲۰۰۸. Occurrence and toxicity of an *Anabaena* bloom on a tropical reservoir (Southeast Brazil) *Harmful Algae* ۷, ۵۹۰- ۵۹۸.
- shows *Lyngbya majuscula* (cyanobacterium) growth by added iron, phosphorus and Nitrogen. *Harmful algae* ۷, ۳۸۹- ۴۰۴.
۱۹. Nasrollahzadeh, H. S., Din, Z. B., Foong, S. Y., and Makhloogh, A. ۲۰۰۸. Trophic status of the Iranian Caspian Sea based on water quality parameters and phytoplankton diversity. *Continental Shelf Research* ۲۸, ۱۱۵۳-۱۱۶۵.
۲۰. Miller, W. E., Green, J. C., and Shiro, T. ۱۹۷۸. The *Selenastrum capricornatum* printz algal assay bottle test. Application and interpretation protocol, Us Epa ۶۰۰/ ۹. ۱۲۶p.
۲۱. TRC, ۱۹۸۴. OECD guidelines for testing of chemicals. Section ۲, effects on biotic systems. ۱- ۳۹ pp.
۲۲. Piri, Z. M., and Ordog. V. ۱۹۹۷. Effect of some herbicides commonly used in Iranian agriculture on aquatic food chain. ۹- ۳۰ pp.
۲۳. Berman, T. ۲۰۰۱. The role of DON and the effect of N:P ratios on occurrence

