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

عنوان:

مطالعه کنترل زیستی شکوفایی جلبکی مضر با استفاده از باکتریهای دریایی بومی خلیج فارس در شرایط آزمایشگاهی

مجری:
محسن گذری

شماره ثبت
۵۳۹۶۳

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

عنوان طرح/پروژه : مطالعه کنترل زیستی شکوفایی جلبکی مضر با استفاده از باکتریهای دریایی بومی خلیج فارس در شرایط آزمایشگاهی
کد مصوب: ۹۰۰۲۷-۱۲-۷۵-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محسن گذری
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محسن گذری
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : رامین کریم زاده، عیسی عبدالعلیان، سیده لیلی محبی نوذر، احمد زاهدی، مریم معزی، علی آرمیده، حجت الله فروغی فرد، منصور صدریان، سیامک بهزادی، محمود ابراهیمی، محسن ملکوتی،جواد حامدی، امیر رضا جاسبی، سهراب رضوانی گیل کلایی، حبیب الله اسلامی، فرشته اسلامی، فریبا اسماعیلی، محمدرضا صادقی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان هرمزگان
تاریخ شروع : ۹۰/۱۰/۱
مدت اجرا : ۳ سال و ۳ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۷
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه : مطالعه کنترل زیستی شکوفایی جلبکی مضر با استفاده از باکتریهای دریایی بومی خلیج فارس در شرایط آزمایشگاهی

کد مصوب : ۹۰۰۲۷-۱۲-۷۵-۲

شماره ثبت (فروست) : ۵۳۹۶۳ تاریخ : ۱۳۹۷/٤/۱۸

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محسن گذری دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته میکروبیولوژی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۹۶/۹/۲۹ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت کارشناس در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان مشغول بوده است.

عنوان	فهرست مطالب	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۳
۱-۱-تعریف شکوفایی جلبکی مضر ۳
۱-۲- شکوفایی جلبکی مضر در خلیج فارس و دریای عمان ۴
۱-۳- شکوفایی *Cochlodinium polykrikoides* ۴
۱-۳-۱-پراکنش شکوفایی *Cochlodinium polykrikoides* ۵
۱-۳-۲- تاکسونومی و فایلوژنی *Cochlodinium polykrikoides* ۶
۱-۴- پیامدهای زیستی، اقتصادی و اجتماعی شکوفایی جلبکی مضر ۷
۱-۵- روشهای پیشگیری، کاهش و کنترل شکوفایی جلبکی مضر ۸
۱-۵-۱- برنامه های کاهش اثرات شکوفایی جلبکی مضر ۹
۱-۵-۲- روش های کنترل شکوفایی جلبکی مضر ۹
۱-۶- اهداف پروژه ۱۷
۲- مروری بر منابع ۸
۳- مواد و روشها ۲۴
۳-۱- تجهیزات و مواد غیر مصرفی ۲۴
۳-۲- مواد مصرف شدنی ۲۵
۳-۳- روشها ۲۵
۳-۳-۱- نمونه برداری از منابع دریایی ۲۵
۳-۳-۲- جداسازی و خالص سازی باکتریها ۲۸
۳-۳-۳- شناسایی اولیه جدایه ها ۲۸
۳-۳-۴- غربالگری فعالیت ضد جلبکی ۲۸
۳-۳-۵- سنجش فعالیت ضد جلبکی ۲۸
۳-۳-۶- بررسی طیف اثر جدایه های منتخب در مقابل جلبک های مفید ۲۹
۳-۳-۷- بررسی طیف اثر جدایه های منتخب در مقابل باکتریها و قارچ های بیماریزا ۲۹
۳-۳-۸- بررسی سمیت متابولیت های تولید شده ۳۰
۳-۳-۹- بررسی کینتیک رشد جدایه های باکتری و جلبک هدف ۳۱

عنوان	فهرست مطالب	صفحه

۱۰-۳-۳- استخراج متابولیت های ثانویه ۳۱
۱۱-۳-۳- شناسایی پلی فازی باکتریهای منتخب مولد ترکیب جلبک کش..... ۳۲
۱۲-۳-۳- خالص سازی ترکیب جلبک کش..... ۳۶
۱۳-۳-۳- آنالیزهای آماری..... ۳۸
۴- نتایج..... ۳۹
۱-۴- جداسازی باکتریها..... ۳۹
۱-۱-۴- جداسازی باکتریها از رسوبات خلیج فارس..... ۳۹
۲-۱-۴- جداسازی باکتریها از نمونه های آب..... ۳۹
۳-۱-۴- جداسازی باکتریها از نمونه های اسفنج..... ۴۰
۴-۱-۴- جداسازی باکتریها از نمونه های مرجان..... ۴۱
۲-۴- بررسی تنوع زیستی جدایه های بدست آمده در نمونه های مختلف..... ۴۲
۱-۲-۴- بررسی تنوع زیستی جدایه های بدست آمده از نمونه های رسوب..... ۴۲
۲-۲-۴- بررسی تنوع زیستی جدایه های نمونه های آب..... ۴۳
۳-۲-۴- بررسی تنوع زیستی جدایه های بدست آمده از نمونه های اسفنج..... ۴۴
۴-۲-۴- تنوع زیستی جدایه های نمونه های مرجان..... ۴۵
۳-۴- غربالگری فعالیت ضد جلبکی جدایه های منتخب..... ۴۵
۱-۳-۴- غربالگری فعالیت ضد جلبکی جدایه های بدست آمده از نمونه های رسوب..... ۴۵
۲-۳-۴- غربالگری فعالیت ضد جلبکی جدایه های بدست آمده از نمونه های آب..... ۴۶
۳-۳-۴- غربالگری فعالیت ضد جلبکی جدایه های بدست آمده از نمونه های اسفنج..... ۴۶
۴-۳-۴- غربالگری فعالیت ضد جلبکی جدایه های بدست آمده از نمونه های مرجان..... ۴۷
۵-۳-۴-الگوی فعالیت ضد جلبکی جدایه های مرتبط با نمونه های مختلف..... ۴۸
۴-۴- سنجش فعالیت جلبک کشی متابولیت های ثانویه استخراج شده از جدایه های منتخب ۴۹
۱-۴-۴- سنجش فعالیت ضد جلبکی متابولیت های ثانویه استخراج شده از جدایه های رسوبات ۴۹
۲-۴-۴- سنجش فعالیت ضد جلبکی متابولیت های ثانویه استخراج شده از جدایه های بدست آمده از آب..... ۵۰
۳-۴-۴- سنجش فعالیت ضد جلبکی متابولیت های ثانویه جدایه های بدست آمده از اسفنج..... ۵۱

عنوان	فهرست مطالب	صفحه

۴-۴-۴- سنجش فعالیت ضد جلبکی متابولیت های ثانویه استخراج شده از جدایه های بدست آمده از نمونه های مرجان..... ۵۶
۴-۵- بررسی طیف فعالیت زیستی متابولیت های ثانویه استخراج شده از جدایه های برتر..... ۵۹
۴-۵-۱- فعالیت جلبک کشی در مقابل گونه های جلبکی مفید..... ۵۹
۴-۵-۲- سنجش فعالیت ضد قارچی جدایه های برتر..... ۶۱
۴-۵-۳- سنجش فعالیت ضد باکتریایی جدایه های برتر..... ۶۲
۴-۶- بررسی سمیت متابولیت های تولید شده توسط جدایه های برتر..... ۶۳
۴-۶-۱-تعیین سمیت متابولیت های تولید شده توسط جدایه های برتر در مقابل *Artemia salina*..... ۶۳
۴-۶-۲- تعیین سمیت متابولیت های تولید شده توسط جدایه های برتر در مقابل لارو میگو..... ۶۴
۴-۶-۳- تعیین اثر سیتوتوکسیک متابولیت های تولید شده توسط جدایه های برتر در مقابل رده سلولی نرمال انسانی..... ۶۴
۴-۷- کینتیک رشد جدایه های باکتری و جلبک هدف و فعالیت جلبک کشی..... ۶۶
۴-۷-۱-بررسی کینتیک رشد جدایه *S 202* و *C. polykrikoides* و فعالیت جلبک کشی..... ۶۶
۴-۷-۲- بررسی کینتیک رشد جدایه *SP 149* و *C. polykrikoides* و فعالیت جلبک کشی..... ۶۷
۴-۷-۳- بررسی کینتیک رشد جدایه *SC 77* و *C. polykrikoides* و فعالیت جلبک کشی..... ۶۹
۴-۷-۴- بررسی کینتیک رشد جدایه *W12* و *C. polykrikoides* و فعالیت جلبک کشی..... ۷۰
۴-۷-۵- بررسی کینتیک رشد جدایه *SC 41* و *C. polykrikoides* و فعالیت جلبک کشی..... ۷۲
۴-۷-۶- بررسی کینتیک رشد جدایه *SP 158* و *C. polykrikoides* و فعالیت جلبک کشی..... ۷۳
۴-۸- شناسایی پلی فازی جدایه های منتخب..... ۷۵
۴-۸-۱- شناسایی ویژگی های مورفولوژیک جدایه های منتخب..... ۷۵
۴-۸-۲- شناسایی ویژگی های فیزیولوژیک جدایه های منتخب..... ۷۸
۴-۸-۳- شناسایی ویژگی های بیوشیمیایی و کموتاکسونومیک جدایه های منتخب..... ۷۹
۴-۸-۴- شناسایی ویژگی های ژنتیک جدایه های منتخب..... ۸۱
۴-۹- جداسازی و خالص سازی ترکیبات جلبک کش..... ۹۳
۴-۹-۱-آنالیز متابولیت های استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک..... ۹۳
۴-۹-۲- غربالگری شیمیایی متابولیت های ثانویه استخراج شده..... ۹۷
۴-۹-۳- خالص سازی متابولیت های استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی ستونی..... ۱۰۵

عنوان	فهرست مطالب	صفحه

۴-۹-۴- آنالیز متابولیت های استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک تهیه ای و زیست سنجی فراکسیون های جداشده..... ۱۰۸

۵-۹-۴- آنالیز متابولیت های استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک تهیه ای و زیست سنجی فراکسیون های جداشده..... ۱۰۹

۵- بحث ۱۱۳

۵-۱- جداسازی باکتریها از نمونه های دریایی..... ۱۱۳

۵-۲- بررسی الگوی تنوع زیستی جدایه های بدست آمده..... ۱۱۶

۵-۳- غربالگری فعالیت ضد جلبکی باکتریهای جدا شده ۱۱۹

۵-۴- سنجش فعالیت ضد جلبکی متابولیت های ثانویه استخراج شده از جدایه های برتر ۱۲۰

۵-۵- بررسی طیف فعالیت زیستی متابولیت های ثانویه استخراج شده..... ۱۲۱

۵-۶- بررسی سمیت متابولیت های تولید شده توسط جدایه های برتر..... ۱۲۳

۵-۷- بررسی کینتیک رشد باکتری و جلبک..... ۱۲۴

۵-۸- شناسایی پلی فازی جدایه های منتخب..... ۱۲۶

۵-۹- خالص سازی متابولیت های تولید شده..... ۱۲۸

۶- نتیجه گیری..... ۱۳۱

پیشنهادها..... ۱۳۲

منابع ۱۳۳

چکیده انگلیسی..... ۱۴۱

چکیده

شکوفایی جلبکی مضر (HABs) پدیده‌ای فزاینده، جهانی و دارای اثراتی شدید بر سلامت انسان، ساختار و عملکرد اکوسیستم و صنایع مختلف می باشد. کنترل زیستی این پدیده با استفاده از باکتریهای دریایی به عنوان یکی از روشهای مطرح در استراتژی مدیریت تلفیقی این پدیده مورد توجه می باشد. پروژه حاضر با هدف دستیابی به باکتریهای بومی عامل کنترل زیستی شکوفایی جلبکی مضر در خلیج فارس در مقیاس آزمایشگاهی برنامه ریزی و اجرا گردید. در این مطالعه نمونه برداری از رسوبات و آب دریا بصورت فصلی از ده ایستگاه واقع در مناطق ساحلی استان هرمزگان، چهار گونه اسفنج های دریایی و ۳ گونه مرجان به عنوان منبع جداسازی باکتریهای عامل کنترل زیستی مورد مطالعه قرار گرفتند. بررسی الگوی فراوانی فصلی باکتریها در نمونه های آب و رسوب بیانگر کمینه فراوانی باکتریها در فصل زمستان و بیشینه آن در فصل بهار و تابستان بود. الگوی تنوع باکتریهای جداشده نشان داد تنوع زیستی بالاتری در نمونه های رسوب نسبت به نمونه های آب وجود دارد. فلور غالب باکتریها در رسوبات و آب شامل *Vibrionacea*، *Enterobacteriaceae* ، *Pseudomonadaceae* و *Bacillaceae* بود درحالیکه در نمونه های اسفنج و مرجان بترتیب خانواده های *Streptomycetaceae* و *Alteromonadaceae* حضور غالبی نشان دادند. الگوی فعالیت جلبک کشی باکتریهای جداشده از منابع مختلف در مقابل گونه *Cochlodinium polykrikoides* به عنوان شاخص غربالگری بیانگر بیشترین نسبت جدایه های دارای فعالیت ضد جلبکی بالا (٪۹۰<) در نمونه های اسفنج و مرجان بترتیب معادل ۴۰٪ و ۲۸٪ بود. سنجش فعالیت جلبک کشی متابولیت های ثانویه ۳۰ جدایه منتخب بیانگر فعالیت جلبک کشی ۲۶ جدایه با LC_{50} کمتر از ۱mg/ml در مقابل *C. polykrikoides* بود. به منظور دستیابی به باکتریهای با طیف اثر انتخابی از استراتژی غربالگری مرحله ای در مقابل طیفی از ارگانیسم های مختلف استفاده گردید. از اینرو سنجش فعالیت ضد جلبکی جدایه های برتر در مقابل گونه های جلبکی مفید *Isochrysis galbana* و *Chlorella vulgaris* ۹ جدایه فاقد سمیت گزارش شد. متابولیت های استخراج شده از بترتیب ۹۰، ۵۵ و ۳۵ درصد جدایه ها در مقابل *Candida albicans*، *Aspergillus niger* و *Penicillium chrysogenum* فعالیت ضد قارچی در محدوده µg/ml ۶۴ تا ۱۰۲۴ نشان دادند. همچنین بترتیب ۶۵، ۴۰، ۸۰ و ۲۵ درصد جدایه ها در مقابل باکتریهای *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Micrococcus luteus* و *Pseudomonas aeroginosa* فعالیت ضد باکتریایی متغیر از µg/ml ۳۲ تا ۱۰۲۴ ارائه نمودند. بررسی سمیت متابولیت های ثانویه جدایه های منتخب در مقابل *Artemia salina* نشان داد ۳۰ درصد تا غلظت µg/ml ۱۰۰۰ فاقد سمیت بودند. همچنین در آزمون سنجش میزان کشندگی لارو میگو ۶ جدایه اثر سمیتی نشان ندادند. بررسی اثر سیتوتوکسیک متابولیت های ثانویه جدایه های برتر منتخب در مقابل رده سلولی انسانی HUVEC نشان داد ۵ جدایه بدون اثر سیتوتوکسیک و یک جدایه سمیت پایینی بروز داد. در نهایت ادامه مطالعه روی این ۶ جدایه برتر انجام شد. کینتیک رشد جدایه های برتر ارتباط تعداد باکتریها و فعالیت جلبکی کشی را در کشت توام نشان داد. همچنین مکانیسم فعالیت جلبکی کشی جدایه های برتر متاثر از متابولیسم ثانویه و ترشح

عوامل زیست فعال تعیین گردید. نتایج شناسایی پلی فازی نشان داد جدایه های S 202، SP 149، SC 77 ، SP 158 و SC 41 بترتیب سویه های جدیدی از *Streptomyces rochei* ،*Streptomyces olivaceus*، *Streptomyces cavourensis*، *Pseudomonas azotoformans*، *Vibrio alginolyticus* بوده و جدایه W12 متعلق به *Vibrio rotiferianus* بود. مطالعات فیلوژنتیک سیر تکاملی، فاصله ژنتیکی و میزان واگرایی سویه های مورد بررسی را ارائه نمود. پروفایل و ماهیت شیمیایی متابولیت های ثانویه استخراج شده از ۶ سویه منتخب طی غربالگری شیمیایی بیانگر حضور گروه های عاملی ترپنوئیدی، فلاوونوئیدی،پپتیدی، ایندول آلکالوئیدی و فنولی در عصاره متابولیت های ثانویه مورد بررسی بود. ماهیت شیمیایی فراکسیون جلبک کش سویه های S 202 ،SP 149، SC 77، SC 41 ترپنوئیدی یا فلاونوئیدی ، سویه SP 158 فنولی و سویه W 12 پپتیدی شناسایی شد. پس از خالص سازی ترکیبات جلبک کش تولید شده با استفاده از روش های کروماتوگرافی لایه نازک،تهیه ای، ستونی و مایع با کارایی بالا زمان بازداری سویه های SC 41 و SP 149 ۱۰/۵۸ و ۱۱/۰۰ دقیقه ثبت گردید. اجرای پروژه حاضر منجر به اکتشاف ۶ سویه باکتری بومی خلیج فارس با فعالیت انتخابی در مقابل*C. polykrikoides* عامل اصلی شکوفایی اخیر جلبکی در خلیج فارس و دریای عمان گردید. این سویه های بومی از پیش نیازهای عوامل کنترل زیستی در شرایط آزمایشگاهی برخوردار بوده و می توانند به صورت بالقوه در محیط های دریایی یا مزارع و قفس های پرورش آبزی در مطالعات میدانی مطرح گردند. همچنین این پروژه درک جدیدی از الگوی پراکنش فصلی و تنوع زیستی باکتریهای قابل کشت در آب و رسوبات دریایی منطقه مورد مطالعه و همچنین الگوی فراوانی و تنوع زیستی باکتریهای قابل کشت در چهار گونه اسفنج و سه گونه مرجان بومی خلیج فارس را ایجاد نمود.

واژه های کلیدی: کنترل زیستی، شکوفایی جلبکی مضر، باکتریهای دریایی ، *Cochlodinium polykrikoides*، خلیج فارس، ترکیبات جلبک کش