



ارزیابی فعالیت ضد جلبکی باکتری‌های موجود در آب و رسوبات ساحلی استان هرمزگان در مقابل *Cochlodinium polykrikoides*

محسن گذری^{۱*}، سعید تمدنی جهرمی^۱، عیسی عبدالعلیان^۱، سجاد پورمظفر^۲، رامین کریم‌زاده^۱، احمد زاهری^۳، مریم معزی^۱

^۱ پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

^۲ ایستگاه تحقیقات نرم‌تنان خلیج فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران

^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

چکیده

نوع مقاله:

پژوهشی

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۸/۱۱/۲۲

اصلاح: ۱۴۰۰/۰۲/۰۶

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۸

کلمات کلیدی:

باکتری

جلبک

رسوبات دریایی

شکوفایی جلبکی

کنترل زیستی

Cochlodinium

کنترل زیستی با استفاده از باکتری‌های دریایی بخشی از روش‌های مدیریت تلفیقی پدیده شکوفایی جلبکی مضر می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی فراوانی و تنوع باکتری‌ها در مناطق ساحلی دارای سابقه مواجهه با این پدیده در استان هرمزگان و بررسی فعالیت آن‌ها در مقابل میکروجلبک *Cochlodinium polykrikoides* به‌عنوان عامل اصلی کشند قرمز بود. فراوانی فصلی باکتری‌ها در نمونه‌های آب و رسوبات جمع‌آوری شده از ۱۰ ایستگاه در مناطق ساحلی جزیره هرمز، بندرعباس و بندرلنگه نشان داد باکتری‌ها در فصل بهار و در ایستگاه‌های St1، St6، St10 و St10 بیشترین فراوانی را داشتند. ۱۰ خانواده از باکتری‌ها غالباً متعلق به خانواده‌های *Vibrionaceae*، *Entrobacteriaceae* و *Pseudomonadaceae* با فراوانی به ترتیب ۲۹، ۱۴ و ۱۲ درصد در رسوبات شناسایی شدند. از ۶ خانواده شناسایی شده در نمونه‌های آب، خانواده‌های *Entrobacteriaceae* و *Vibrionaceae* هرکدام ۲۳ درصد جدایه‌ها را تشکیل دادند. ۱۳/۳۳ درصد باکتری‌های جداشده از رسوبات و ۹/۰۹ درصد از باکتری‌های جداشده از آب، توانایی حذف کامل سلول‌های جلبکی را داشتند. میزان LC₅₀ متابولیت‌های استخراج شده از این باکتری‌ها در محدوده غلظت ۹۰/۲۸±۳/۱۴ تا ۱۰۲۹±۴۵/۹۴ μg/ml بود. این مطالعه ضمن ایجاد چشم‌اندازی از فراوانی و تنوع باکتری‌ها در مناطق مورد بررسی، ۸ جدایه باکتری جلبک‌کش را جهت انجام مطالعات تکمیلی کنترل شکوفایی جلبکی مضر معرفی نمود.

مقدمه

شکوفایی جلبکی مضر (HABS^۱)، پدیده‌ای فصلی است که در نتیجه تجمع فیتوپلانکتون‌های میکروسکوپی و یا سیانوباکتری‌ها در زمان کوتاه و در شرایط مساعد ایجاد می‌گردد. انتشار این پدیده به‌صورت جهانی است و دارای اثراتی شدید بر سلامت

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: M_gozari@yahoo.com

¹ Harmful algal blooms

انسان، ساختار و عملکرد اکوسیستم و صنایع مختلف می‌باشد (Watson and Molot, 2013; Berdalet et al., 2016). به دلیل شرایط اقلیمی و افزایش آلودگی محیطی، روند فزاینده وقوع این پدیده به‌ویژه در مناطق ساحلی مشاهده شده است (Wells et al., 2020; Griffith and Gobler, 2015; al., 2015). در یکی از شدیدترین رخداد‌های شکوفایی جلبکی طی سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ در خلیج فارس و دریای عمان، تلفات گسترده ماهیان، مرگ آبسنگ‌های مرجانی و خسارات به تأسیسات آب‌شیرین‌کن در جمهوری اسلامی ایران، عربستان سعودی و امارات متحده عربی گزارش گردید (Richlen et al., 2010). گونه غالب ایجادکننده این پدیده *Cochlodinium polykrikoides* گزارش شد. این داینوفلاژله در آب‌های ساحلی جنوب شرق آسیا و آمریکای شمالی برای دهه‌ها شکوفایی جلبکی مضر ایجاد نموده است (Gárate-Lizárraga et al., 2004; Cortes et al., 2019). شکوفایی این میکروجلبک مناطقی تا صدها کیلومتر را در بر گرفته است به‌طوری‌که تراکم سلولی به بیش از ۱۰۰۰ سلول بر میلی‌لیتر و با پراکندگی ناهمگون می‌رسد. این شکوفایی شدیداً ایکتیوتوکسیک بوده و می‌تواند موجب تلفات بسیاری از ارگانسیم‌های دریایی گردد. از این‌رو از جنبه‌های اقتصادی و اجتماعی نیز حائز اهمیت است (Griffith and Gobler, 2016).

موفق‌ترین راهبرد مقابله با پدیده شکوفایی جلبکی مضر، اعمال یک استراتژی تلفیقی دربرگیرنده روش‌های پیشگیری، کاهش و کنترل است. در این استراتژی، نقش کنترل زیستی به‌ویژه استفاده از باکتری‌های بومی به‌عنوان یک راهکار عملی پیشنهاد شده است (Lee et al., 2018; Ndlela et al., 2018; Barrington et al., 2015). استفاده از جمعیت‌های بومی باکتری‌ها به دلیل برهم‌کنش‌های تکاملی با جلبک‌ها موجب به حداقل رساندن ملاحظات اکولوژیک خواهد شد (Sun et al., 2018). تنوع گسترده‌ای از باکتری‌های جلبک‌کش شناسایی شده و عمدتاً متعلق به گاماپروتئوباکتری‌ها، آلفا پروتئوباکتری‌ها، اکتینوباکتری‌ها، سایتوفاگا، فلاوی باکتری‌ها، باکترئوئیدس می‌باشند (Rooney-Varga et al., 2005).

تحقیقات بسیاری در زمینه کنترل زیستی شکوفایی جلبکی مضر با استفاده از باکتری‌های دریایی انجام شده است؛ اما مقاله حاضر نخستین مطالعه منتشرشده در این زمینه در خلیج فارس است. در مطالعه Jeong و همکاران (2003)، ۵ باکتری جلبک‌کش را از نمونه‌های آب جمع‌آوری‌شده از آبراهه Yeosu در کره جنوبی جداسازی نمودند. شناسایی این جدایه‌ها تعلق آن‌ها را به گروه آلفا پروتئوباکتری‌ها (*Nautella* sp., *Sagittula* sp., *Thalassobius* sp.) و گاما پروتئوباکتری‌ها (*Alteromonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp.) نشان داد (Oh et al., 2011). در مطالعه دیگری Seong و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند سویه‌ای از باکتری *Vibrio parahaemolyticus* می‌تواند فعالیت *C. polykrikoides* را مهار نماید.

در مطالعه حاضر میکروجلبک *C. polykrikoides* به دلیل وقوع شکوفایی مکرر در سواحل خلیج فارس به‌عنوان شاخص غربالگری فعالیت ضد جلبکی انتخاب شد. هدف از مطالعه حاضر، جداسازی و بررسی تنوع زیستی باکتری‌های ساکن در آب و رسوبات مناطق ساحلی استان هرمزگان و ارزیابی پتانسیل فعالیت ضد جلبکی آن‌ها در مقابل میکروجلبک *C. polykrikoides* بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از آب و رسوبات ساحلی

بر اساس گزارش‌های موجود از سابقه انتشار شکوفایی جلبکی مضر، ۱۰ ایستگاه نمونه‌برداری در مناطق ساحلی شهرستان‌های بندرعباس، بندرلنگه و هرمز تعیین گردید. نمونه‌برداری طی گشت‌های تحقیقاتی توسط پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان به‌صورت فصلی طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ انجام شد. مختصات جغرافیایی و عمق هر ایستگاه به‌وسیله دستگاه GPS ثبت گردید (جدول ۱). نمونه‌برداری از رسوبات با استفاده از یک دستگاه نمونه‌بردار رسوبات سطحی (Van Veen Grab) انجام شد. محتویات رسوب داخل نمونه‌بردار بلافاصله به درون بطری‌های استریل منتقل شد. نمونه‌های آب دریا از ۳۰

سانتی‌متری سطح با استفاده از بطری‌های وینکلر استریل جمع‌آوری شد. پس از نمونه‌برداری کلیه نمونه‌ها در داخل جعبه یخ با دمای حدود 4°C نگهداری گردید و پس از اتمام گشت دریایی، کلیه نمونه‌ها بلافاصله جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند (Stephenson, 1994).

جدول ۱. مختصات و عمق ایستگاه‌های نمونه‌برداری رسوبات و آب

ایستگاه	عمق (متر)	عرض جغرافیایی (شمالی)			عرض جغرافیایی (شرقی)		
		ثانیه	دقیقه	درجه	ثانیه	دقیقه	درجه
۱	۲/۵	۳۴	۱۰	۲۷	۷	۱۹	۵۶
۲	۲/۵	۲۲	۱۰	۲۷	۲۹	۲۰	۵۶
۳	۷/۵	۴۷	۰۴	۲۷	۵۷	۲۳	۵۶
۴	۲۰	۲۷	۰۱	۲۷	۰۴	۲۱	۵۶
۵	۱۸	۵۴	۰۳	۲۷	۱۰	۱۵	۵۶
۶	۳	۴۹	۰۹	۲۷	۵۸	۱۴	۵۶
۷	۵	۱۰	۱۰	۲۷	۲۶	۱۶	۵۶
۸	۴/۵	۳۴	۱۰	۲۷	۳۱	۱۷	۵۶
۹	۵	۲۰	۰۴	۲۵	۵۰	۴۵	۵۷
۱۰	۱۰	۳۷	۰۱	۲۵	۳۷	۴۴	۵۷

جداسازی و شمارش باکتری‌ها از نمونه‌های محیطی

فراوانی باکتری‌های موجود در نمونه‌های آب و رسوب جمع‌آوری‌شده، بر اساس روش شمارش تعداد کل باکتری‌های قابل‌کشت محاسبه شد. بدین منظور رقت‌های متوالی از نمونه‌های آب و رسوب جمع‌آوری‌شده در آب دریای استریل تهیه گردید. سپس به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط کشت مارین زوبل آگار (HiMedia M384) ریخته و با استفاده از لوله شیشه‌ای خمیده با روش پخش کردن در سطح پلیت، پخش شدند. پلیت‌های تلقیح‌شده به‌صورت وارونه درون گرمخانه با دمای 28°C تا دو هفته گرماگذاری و از لحاظ رشد مورد بررسی قرار گرفتند (Epstein, 1995; Starr *et al.*, 2013). تعداد کلنی‌های ایجادشده پس از ۴۸ ساعت شمارش گردید و واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر آب دریا یا یک گرم رسوب تعیین شد. این آزمون با ۳ تکرار انجام شد.

شناسایی مقدماتی باکتری‌ها

شناسایی جدایه‌های به دست آمده پس از خالص‌سازی تا سطح خانواده انجام شد. بدین منظور ویژگی‌های مورفولوژیک آن‌ها شامل خصوصیات ماکروسکوپی از قبیل رنگ، شکل، حالت و اندازه کلنی و همچنین خصوصیات میکروسکوپی مانند شکل، اندازه، آرایش اسپورهای احتمالی و رنگ باکتری در رنگ‌آمیزی گرم، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین آزمون‌های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز، اکسیداسیون-تخمیر، آزمون تخمیر قندها در محیط Triple sugar iron agar (TSI) و آزمون‌های اندول، متیل رد، وژ-پروسکوئر و مصرف سیترات (IMVIC) انجام شد (Goldman and Green, 2015).

غربالگری فعالیت ضد جلبکی

به‌منظور کشت *Cochlodinium polykrikoides* ابتدا سوسپانسیون حاوی جلبک خالص‌شده از بخش آبی‌پروری پژوهشگاه اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان تهیه شد. سلول‌های جلبکی در محیط کشت F/2 تغییر یافته (Guillard, 1975) به همراه مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۲۰۰ mg/ml)، کانامایسین (۷۸۰ mg/ml)، نئومایسین (۷۸۰ mg/ml) تلقیح شدند.

ارلن‌های تلقیح شده در دمای °C ۲۶ و شدت نور ۹۰ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) با تناوب ۱۳ ساعت تاریکی و ۱۱ ساعت روشنایی گرما گذاری گردیدند (Abdolalian et al., 2012). غلظت‌های یکسان به میزان $10^6 \times 1/5$ CFU/ml از جدایه‌های باکتری خالص شده مورد آزمون با تهیه غلظت نیم مک فارند آماده شد. به دنبال آن، ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های باکتریایی تهیه شده از هر باکتری به ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبک *Cochlodinium polykrikoides* با غلظت $10^6 \times 5$ cell/ml در محیط کشت جلبک اضافه شد. پس از طی مدت ۵ روز تعداد سلول‌های جلبکی با استفاده از روش شمارش مستقیم ثبت و میزان فعالیت ضد جلبکی هر جدایه به صورت درصد محاسبه شد. این آزمون با سه تکرار انجام شد. از آب دریای استریل به‌عنوان کنترل استفاده گردید (Seong and Jeong, 2011).

سنجش فعالیت ضد جلبکی

پس از تعیین جدایه‌های دارای فعالیت ضد جلبکی، کشت آن‌ها در محیط کشت نوترینت براث انجام شد. گرماگذاری جدایه‌ها بر اساس سرعت رشد آن‌ها از ۴۸ ساعت (برای باکتری‌های سریع‌الرشد) تا ۱۲۰ ساعت (برای باکتری‌های کند رشد) متغیر بود. ارلن‌های تلقیح شده در شیکر با دور ۱۸۰ دور بر دقیقه و در °C ۲۸ گرماگذاری گردید. پس از اتمام گرماگذاری، مایع تخمیر با استفاده از روش فیلتراسیون از زیست‌توده جدا شد. استخراج متابولیت‌های تولیدشده از مایع تخمیر با به‌کارگیری روش استخراج مایع-مایع و با استفاده از حجم برابر از حلال آلی اتیل استات انجام شد. اتیل استات جمع‌آوری شده تحت خلأ تبخیر گردید و عصاره متابولیت‌ها، جمع‌آوری و توزین شد. بر اساس روش رقت‌سازی دو برابری، غلظت‌های اولیه متفاوت از هر عصاره به صورتی تهیه گردید که در هر ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی غلظت‌های نهایی ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ ایجاد گردد. به دنبال آن ۱۰۰ μL از هر غلظت به ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبک *Cochlodinium polykrikoides* با غلظت $10^6 \times 5$ cell/ml اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت میزان فعالیت ضد جلبکی متابولیت‌های موردبررسی با شمارش سلول‌های جلبک به روش مشاهده مستقیم ثبت شد. جهت محاسبه درصد فعالیت ضد جلبکی در هر غلظت از معادله ذیل استفاده شد. از عصاره محیط کشت تلقیح نشده باکتری به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (Wang et al., 2012). میزان LC_{50} نمونه‌ها با رسم منحنی دوز- پاسخ با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism 6 تعیین شد. نتایج به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SE) ارائه گردید.

$$\text{درصد فعالیت ضد جلبکی} = \frac{(N_{\text{control}}) - (N_{\text{test}})}{(N_{\text{control}})} \times 100$$

N_{test} : تعداد سلول‌های جلبکی زنده در چاهک تیمار شده

N_{control} : تعداد سلول‌های جلبکی زنده در چاهک تیمار نشده

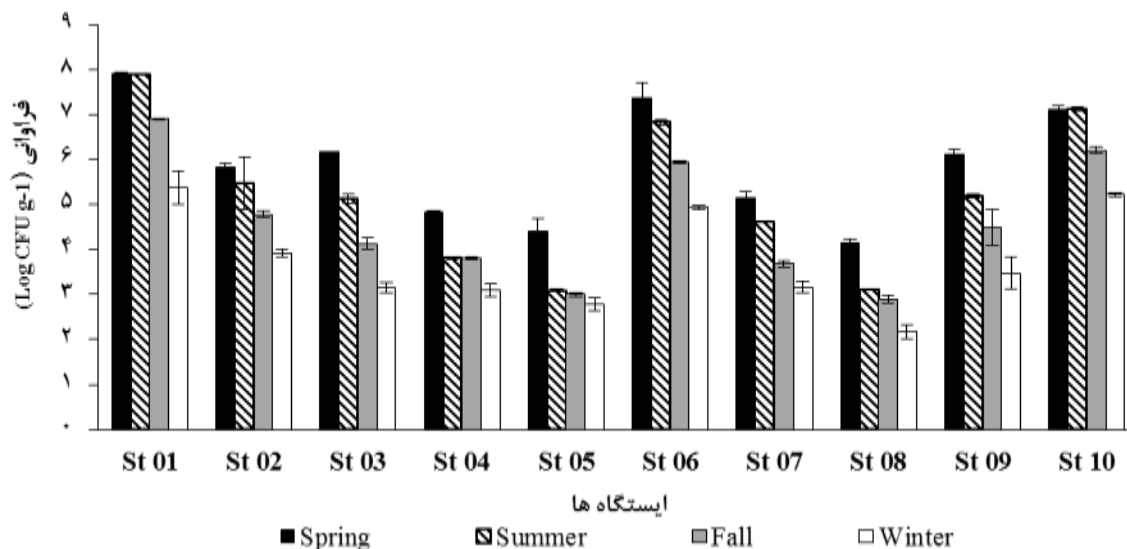
آنالیز آماری

تمامی آزمون‌ها با سه بار تکرار انجام گردید. نتایج جداسازی باکتری‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف استاندارد بیان شد. نتایج بررسی الگوی تنوع زیستی به‌صورت درصد فراوانی ارائه گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excell 2013 انجام شد (Microsoft, Seattle, WA). جهت بررسی معنادار بودن اختلاف میانگین‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح $p < 0.05$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS 24 انجام شد. نتایج سنجش فعالیت ضد جلبکی به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SE) ارائه گردید. LC_{50} در سطوح اطمینان ۹۵٪ به‌وسیله رگرسیون غیرخطی با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Software, (Inc. Graphpad prism 6 محاسبه شد.

نتایج

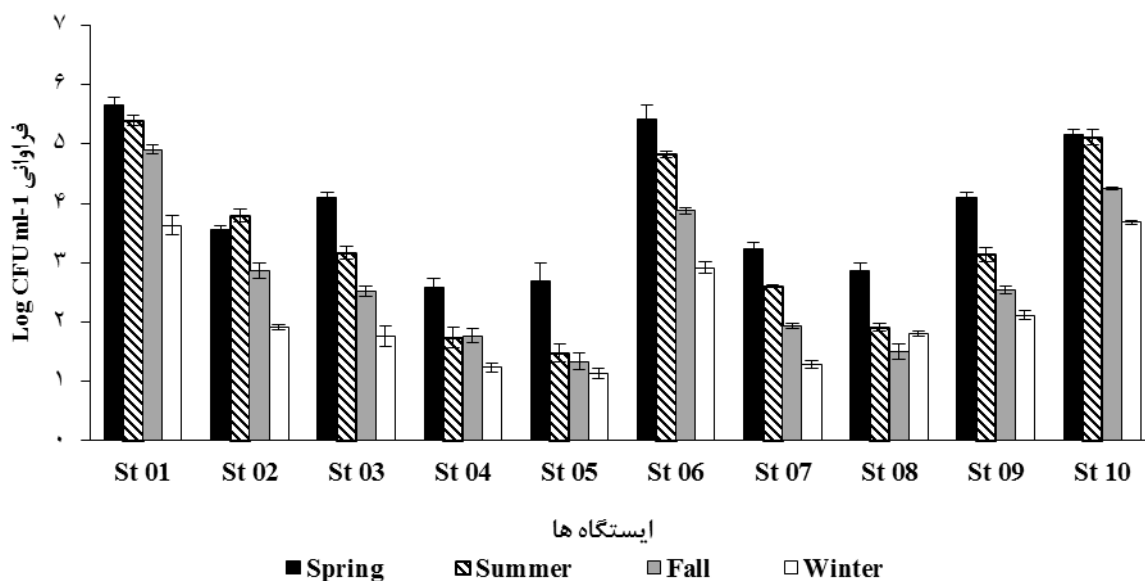
نتایج میزان فراوانی باکتری‌ها در نمونه‌های رسوب جمع‌آوری شده از ۱۰ ایستگاه مختلف بیانگر بیشترین فراوانی باکتری‌های ساکن در ایستگاه‌های St۱، St۶ و St۱۰ بود. فراوانی باکتری‌ها در فصل زمستان کمترین و در فصل بهار بیشترین تعداد را

نشان داد. بر اساس نتایج آنالیز واریانس، میانگین فراوانی باکتری‌ها در اکثر ایستگاه‌ها در سطح $p < 0.05$ طی فصول مختلف دارای اختلاف معناداری بود. اگرچه در ایستگاه‌های St1 و St10 اختلاف معناداری در فراوانی باکتری‌ها در فصول بهار و تابستان مشاهده نشد (شکل ۱).



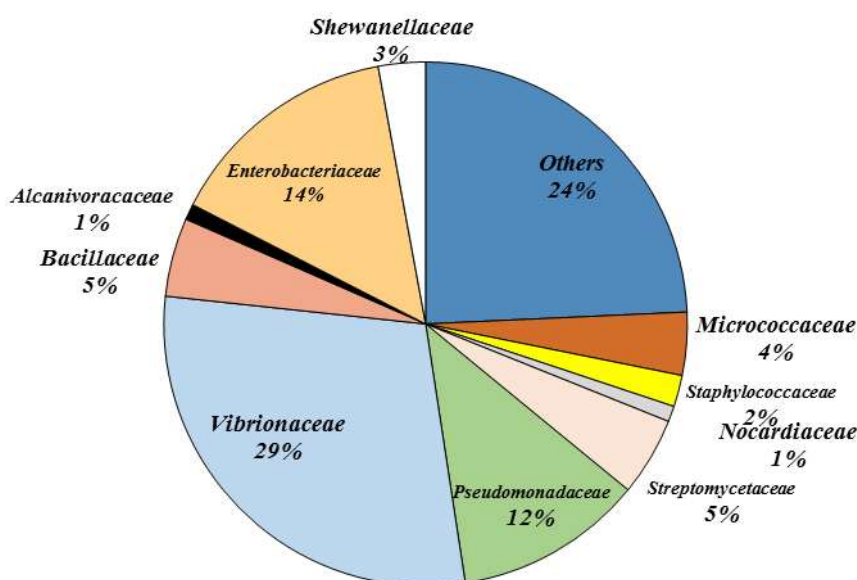
شکل ۱. فراوانی فصلی باکتری‌های قابل کشت در رسوبات جمع‌آوری‌شده

نتایج بررسی میزان فراوانی باکتری‌ها در نمونه‌های آب، بیانگر بیشترین فراوانی در ایستگاه‌های St1، St6 و St10 بود. فراوانی باکتری‌ها در فصل زمستان کمترین و در فصل بهار بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند. اگرچه در ایستگاه St2 فراوانی باکتری‌ها در تابستان بیشتر از فصل بهار ثبت شد. فراوانی باکتری‌ها در اکثر ایستگاه‌ها در سطح $p < 0.05$ دارای اختلاف معناداری بود. باین‌حال در ایستگاه St4 اختلاف معناداری در فراوانی باکتری‌ها میان فصول تابستان و پاییز و در ایستگاه St10 در فصول بهار و تابستان مشاهده نشد (شکل ۲).

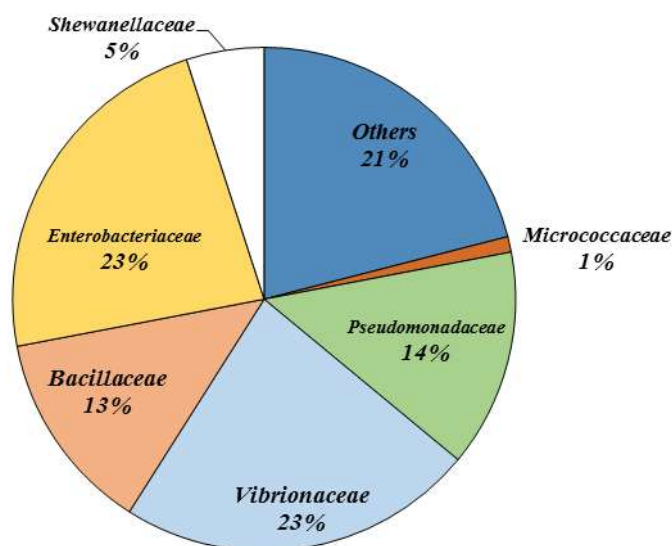


شکل ۲. فراوانی فصلی باکتری‌های قابل کشت در نمونه‌های آب جمع‌آوری‌شده

الگوی تنوع زیستی جدایه‌های به دست آمده از نمونه‌های رسوب، بیانگر تعلق آن‌ها به ۱۰ خانواده مختلف بود. بیشترین جدایه‌های به دست آمده به خانواده *Vibrionaceae* با ۲۹ درصد تعلق داشت و پس از آن خانواده‌های *Enterobacteriaceae* با ۱۴ درصد و *Pseudomonadaceae* به میزان ۱۲ درصد در نمونه‌های رسوب حضور داشتند (شکل ۳). الگوی غالب به دست آمده در نمونه‌های آب دربرگیرنده ۶ خانواده باکتریایی بود. بیشترین جدایه‌های به دست آمده متعلق به خانواده *Enterobacteriaceae* و *Vibrionaceae* هرکدام به میزان ۲۳ درصد و به دنبال آن خانواده‌های *Pseudomonadaceae* و *Bacillaceae* با ۱۴ و ۱۳ درصد به ترتیب جدایه‌های موجود در نمونه‌های آب را تشکیل دادند (شکل ۴).



شکل ۳. الگوی تنوع زیستی باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های رسوب



شکل ۴. الگوی تنوع زیستی باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های آب

غربالگری فعالیت ضد جلبکی ۴۵ جدایه متمایز به دست آمده از نمونه‌های رسوب، نشان داد شش جدایه معادل ۱۳/۳۳ درصد جدایه‌ها در مواجهه با میکروجلبک *C. polykrikoides* ۱۰۰ درصد سلول‌های جلبکی را از بین بردند. درحالی‌که ۲۰ جدایه معادل ۴۴/۴۴ جدایه‌ها بین ۵۰ تا ۹۰ درصد سلول‌های جلبکی هدف را تخریب نمودند (جدول ۲).

جدول ۲. غربالگری فعالیت ضد جلبکی باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های رسوب

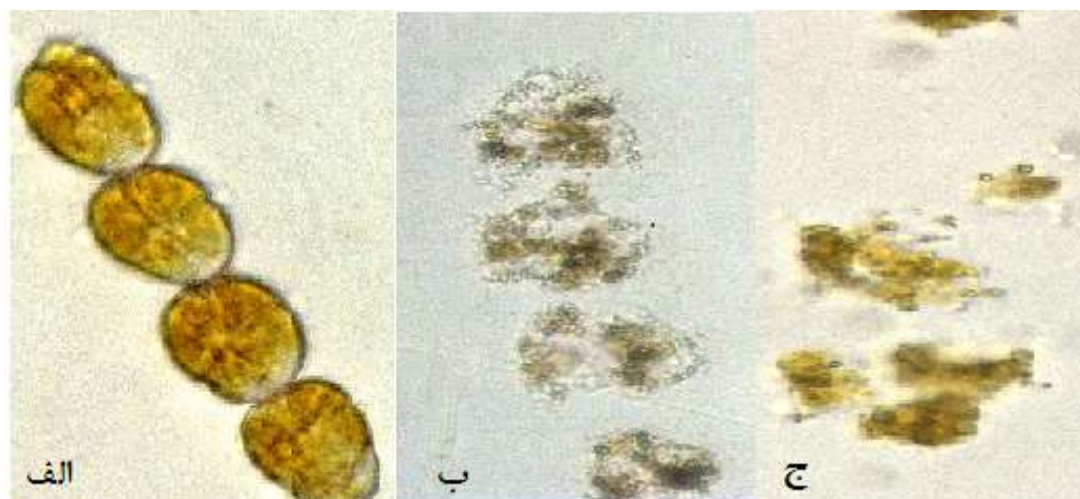
جدایه	فعالیت ضد جلبکی (%)	جدایه	فعالیت ضد جلبکی (%)	جدایه	فعالیت ضد جلبکی (%)
S 02	۹۱/۹±۰/۶۱	S 134	۲۲/۵۶±۰/۶۱	S 273	۵۹/۲۳±۱/۷۴
S 05	۲۲/۴۴±۱/۸۲	S 145	۱۹/۲۹±۱/۲۸	S 284	۴۳/۵۴±۰/۸۵
S 13	۱۰۰/۰۰	S 150	۳۵/۶۹±۱/۸۹	S 311	۸۰/۴۹±۰/۹۸
S 17	۵۴/۲۷±۲/۴۴	S 151	۳۲/۵۶±۱/۴۸	S 315	۷۷/۸۵±۰/۳۵
S 22	۱۰۰/۰۰	S 163	۸۱/۴۰±۰/۶۹	S 324	۱۹/۳۱±۱/۹۶
S 33	۱۰۰/۰۰	S 172	۸۱/۹۹±۰/۶۷	S 330	۴۶/۹۱±۱/۶۸
S 38	۱۸/۹۰±۱/۸۳	S 183	۷۷/۴۴±۰/۶۱	S 331	۶۰/۳۷±۱/۶۱
S 52	۱۰/۴۵±۰/۷۴	S 190	۶۸/۷۴±۰/۵۱	S 333	۵۲/۶۶±۰/۲۹
S 58	۶/۹۱±۱/۸۶	S 202	۱۰۰/۰۰	S 347	۷۰/۴۵±۲/۱۳
S 63	۴۶/۵۴±۲/۲۲	S 207	۶۰/۳۷±۰/۶۱	S 355	۷۶/۵۹±۱/۴۱
S 75	۱۰۰/۰۰	S 212	۱۲/۴۰±۱/۲۷	S 361	۱۰۰/۰۰
S 88	۶۹/۷۲±۰/۷۹	S 218	۲۳/۳۹±۰/۸۰	S 368	۸۷/۸۳±۰/۶۵
S 93	۷۹/۶۷±۱/۵۳	S 219	۲۸/۹۴±۰/۸۷	S 374	۷۹/۸۴±۲/۱۳
S 115	۶۸/۶۶±۰/۷۶	S 245	۳۹/۷۲±۱/۴۷	S 380	۷۲/۶۸±۱/۱۶
S 121	۵۹/۶۷±۲/۵۶	S 256	۱۲/۶۸±۰/۸۰	S 385	۳۲/۶۰±۰/۷۸

غربالگری فعالیت ضد جلبکی ۲۲ جدایه متمایز به دست آمده از نمونه‌های آب نشان داد ۲ جدایه معادل ۹/۰۹ درصد از جدایه‌های مورد بررسی، توانایی از بین بردن ۱۰۰ درصد سلول‌های میکرو جلبک *C. polykrikoides* را داشتند. همچنین ۳ جدایه معادل ۱۳/۶۳ جدایه‌ها بین ۵۰ تا ۹۰ درصد سلول‌های جلبکی را تخریب نمودند (جدول ۳).

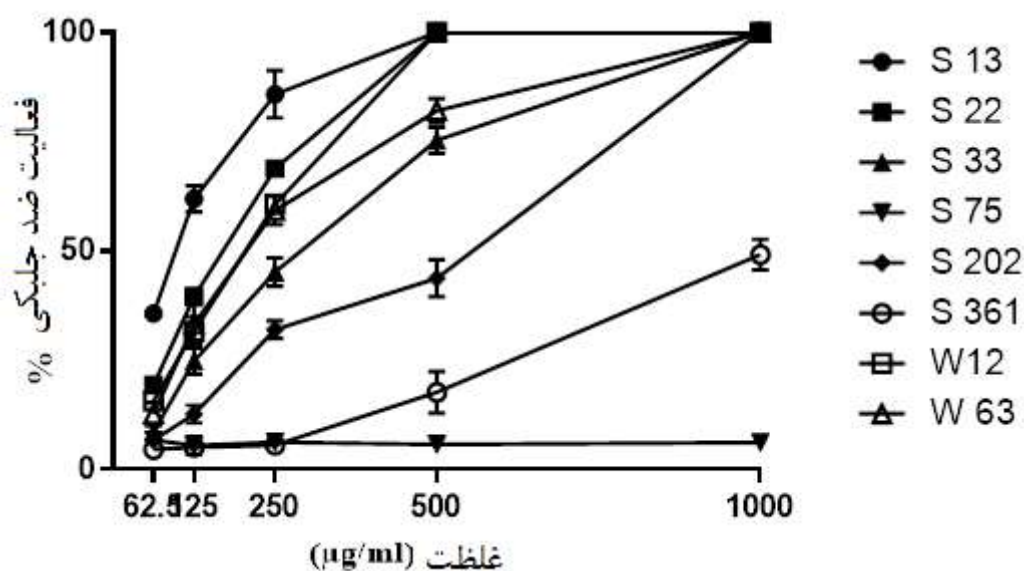
با توجه به نتایج غربالگری، ۶ جدایه دارای بیشترین فعالیت ضد جلبکی از نمونه‌های رسوب، شامل ۵ جدایه متعلق به خانواده *Streptomycetaceae* و یک جدایه متعلق به خانواده *Shewanellaceae* بودند. دو جدایه دارای بیشترین فعالیت ضد جلبکی به دست آمده از نمونه آب متعلق به خانواده *Vibrionaceae* بودند. سنجش فعالیت ضد جلبکی متابولیت‌های استخراج شده از این جدایه‌های منتخب بیانگر فعالیت تمام متابولیت‌های مورد بررسی به جز جدایه S۷۵ بود. منحنی دوز- پاسخ نشان داد فعالیت ضد جلبکی متابولیت‌های مؤثر به صورت وابسته به غلظت بوده و از منحنی دوز- پاسخ پیروی نمود (شکل ۶). تعیین میزان LC₅₀ نشان داد متابولیت‌های استخراج شده در محدوده غلظت ۹۰/۲۸±۳/۱۴ تا ۹۴/۹۴±۴۵/۲۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت ضد جلبکی نشان دادند. متابولیت‌های استخراج شده از جدایه S۱۳ با LC₅₀ معادل ۹۰/۲۸±۳/۱۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین فعالیت ضد جلبکی را نشان داد (جدول ۴).

جدول ۳. غربالگری فعالیت ضد جلبکی باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های آب

جدایه	فعالیت ضد جلبکی (%)	جدایه	فعالیت ضد جلبکی (%)	جدایه	فعالیت ضد جلبکی (%)
W 11	۶۷/۴۹±۰/۹۴	W 33	۲۲/۵۶±۱/۱۸	W 52	۱۹/۱۳±۰/۷۹
W 12	۱۰۰/۰۰	W 37	۴۴/۳۱±۱/۱۱	W 58	۴۳/۶۲±۲/۴۷
W 14	۲۰/۸۲±۱/۳۸	W 40	۴۶/۳۶±۱/۱۹	W 63	۱۰۰/۰۰
W 18	۲۷/۸۵±۲/۵۹	W 41	۲۹/۲۳±۰/۷۷	W 67	۴۴/۱۵±۱/۶۶
W 23	۷۲/۶۷±۰/۳۹	W 44	۳۰/۴۶±۱/۲۶	W 75	۲۶/۹۲±۲/۳۱
W 27	۶۶/۵۱±۰/۹۰	W 45	۱۹/۷۹±۱/۲۴	W 81	۱۴/۰۵±۱/۰۹
W 28	۴۵/۶۹±۱/۱۶	W 48	۲۳/۷۹±۱/۳۱	W 88	۳۴/۵۹±۰/۶۵
W 31	۳۵/۶۴±۰/۴۴				



شکل ۵. فرایند تجزیه سلول‌های *C. polykrikoides* به وسیله باکتری جلبک‌کش. الف. در زمان تلقیح باکتری ب. ۱۲ ساعت پس از تلقیح باکتری ج. ۲۴ ساعت پس از تلقیح باکتری



شکل ۶. نمودار دوز- پاسخ فعالیت ضد جلبکی متابولیت‌های استخراج‌شده از جدایه‌های برتر

جدول ۴. میزان LC_{50} فعالیت ضد جلبکی متابولیت‌های استخراج‌شده از جدایه‌های منتخب

جدایه	$LC_{50} \pm SE$ ($\mu g/ml$)	سطوح اطمینان ۹۵%
S 13	$3/14 \ 90/28 \pm$	۸۳/۷۳-۹۷/۳۴
S 22	$6/65 \ 149/8 \pm$	۱۳۶/۱۰-۱۶۴/۹۰
S 33	$11/41 \ 256 \pm$	۲۳۲/۵-۲۸۱/۹
S 75	بدون تأثیر	-
S 202	$421/1 \ 39/89 \pm$	۳۴۳/۲-۵۱۶/۸
S 361	$45/94 \ 1029 \pm$	۹۳۴/۳-۱۱۳۳
W 12	$9/73 \ 178/6 \pm$	۱۵۸/۷-۲۰۰/۹
W 63	$6/89 \ 193/5 \pm$	۱۷۹/۲-۲۰۹/۰

بحث

روش‌های کنترل زیستی جایگاه برجسته‌ای را در چارچوب استراتژی مدیریت تلفیقی شکوفایی جلبکی مضر به خود اختصاص داده است. دستیابی به عوامل کنترل زیستی مؤثر و کارآمد با کمترین تغییر در اکوسیستم و به حداقل رساندن ملاحظات زیست‌محیطی مستلزم جداسازی عوامل کنترل زیستی از منابع بومی است. بدین منظور در مطالعه حاضر منابع جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های آب و رسوب از یک اکوسیستم مواجه با پدیده HABs انتخاب شد. از این رو به دلیل میان‌کنش‌های بیوشیمیایی احتمالی میان میکروارگانیسم‌های ساکن در آب و رسوبات با میکروجلبک‌های عامل پدیده HABs شانس دستیابی به باکتری‌های عامل کنترل زیستی ارتقاء می‌یابد (Singh and Thakur, 2016). مطالعات مختلف نیز افزایش جمعیت باکتری‌های جلبک‌کش را پس از خاتمه این پدیده ثبت نموده‌اند (Landa et al., 2016; Demuez et al., 2015). بررسی فراوانی فصلی باکتری‌ها در آب و رسوبات نشان داد در تمامی ایستگاه‌ها فراوانی باکتری‌ها در فصل زمستان کمترین میزان و در فصل بهار بیشترین فراوانی را ایجاد نمودند (شکل ۱و۲). این الگوی فراوانی فصلی باکتری‌ها می‌تواند با عوامل مختلف محیطی مانند فاکتورهای اکولوژیک و بیوژئوشیمیایی از جمله کاهش قابل‌ملاحظه فعالیت چرخه‌های هیدرودینامیک در فصول بهار و تابستان مرتبط باشد. به نظر می‌رسد بارندگی، آلاینده‌های صنعتی و خانگی و همچنین دما نقش تعیین‌کننده‌ای در ایجاد این الگوی خاص از فراوانی داشته باشد (Vignesh et al., 2014). اگرچه میزان فراوانی باکتری‌ها در نمونه‌های رسوب تا ۱۰۰ برابر بیشتر از فراوانی آن‌ها در نمونه‌های آب ثبت شد. این نتیجه می‌تواند به دلیل بار بالای ترکیبات مغذی آلی در نمونه‌های رسوب و وجود میکرو محیط‌های مساعد در ذرات و لابه‌های مختلف رسوبات نسبت به ستون آب باشد. در یک‌روال معمول مواد آلی موجود در ستون آب ته‌نشین شده و با افزایش مواد مغذی فراوانی جمعیت‌های باکتریایی موجود در رسوبات افزایش چشمگیری می‌یابد (Bonaglia et al., 2014). در مطالعه Gouda و همکاران نیز بیشترین تراکم باکتریایی در فصل بهار و پس‌از آن تابستان ثبت شد درحالی‌که کمترین تنوع در پاییز و زمستان گزارش شد. در مطالعه مذکور تراکم باکتری‌ها از $1/4 \times 10^4$ تا $1/4 \times 10^7$ CFU/gr در رسوبات دریایی نوسان نشان داد. (Gouda et al., 2006). مطالعات متعدد ارتباط فراوانی باکتری‌ها در آب و رسوبات را با دما نشان داده‌اند. این مطالعات نوسان فصلی و مکانی بیومس باکتری‌های هتروتروف را در رسوبات در اثر تغییرات دمایی را تأیید نمودند (Morán et al., 2017). همچنین نقش فاکتورهای نظیر میزان رس، غلظت آمونیوم و pH از دیگر عوامل تعیین‌کننده جمعیت‌های باکتریایی در رسوبات گزارش شده است (Dang and Lovell, 2016; Harrison et al., 2014).

از پیامدهای نامطلوب پدیده HABs تغییر تنوع زیستی میکروارگانیسم‌های موجود در اکوسیستم است (Park et al., 2015). نتایج بررسی الگوی تنوع زیستی باکتری‌های قابل‌کشت ساکن در رسوبات بیانگر شناسایی حداقل ۱۰ خانواده باکتریایی بود. در این میان خانواده‌های *Vibrionaceae*، *Entrobacteriaceae* و *Pseudomonadaceae* غالب باکتری‌ها را تشکیل دادند. اگرچه ۲۴ درصد جدایه‌های به‌دست‌آمده از نمونه‌های رسوب با استفاده از روش‌های مورد استفاده در این مرحله شناسایی نشدند. در میان خانواده‌های شناسایی‌شده خانواده‌های متعلق به رده اکتینوباکتریها مجموعاً ۱۰ درصد ایزوله‌های مورد بررسی را تشکیل دادند (شکل ۳). حضور اکتینوباکتریها در رسوبات خلیج فارس و دریای عمان در چندین مطالعه توسط گذری و همکاران گزارش شده است (Gozari et al., 2018; Gozari et al., 2019a; Gozari et al., 2016; Gozari et al., 2019b). در این مطالعات الگوی پراکنش گونه‌های *Streptomyces* در رسوبات خلیج فارس به صورت وابسته به عمق گزارش شد. این مطالعات الگوی پراکنندگی را پیامد روند ورود جریان‌های ساحلی به دریا و حضور گونه‌های *Streptomyces* خاکریزی در رسوبات کم‌عمق اعلام نمودند. در این زمینه مطالعه دیگری روی الگوی تنوع زیستی باکتری‌های ساکن در رسوبات دریای عرب جنس *Pseudomonas* با ۵۲/۶ درصد فراوانی غالب را شامل شده و گونه‌های متعلق به جنس *Bacillus* با ۳۱ درصد در رتبه بعدی قرار داشتند (Anas et al., 2016). در مطالعه حاضر نتایج الگوی تنوع زیستی جدایه‌های به‌دست‌آمده از آب دریا، حضور غالب خانواده‌های *Entrobacteriaceae* و *Vibrionaceae* به میزان ۲۳ درصد و پس‌از آن خانواده‌های *Pseudomonadaceae* و *Bacillaceae* با به ترتیب ۱۴ و ۱۳ درصد در نمونه‌های آب دریا ثبت شد. حضور غالب خانواده *Entrobacteriaceae* می‌تواند

به دلیل آلودگی آب‌های ساحلی به پساب‌های شهری باشد (Lipp *et al.*, 2001). در مطالعه Feng و همکاران (2009) نیز آلفا پروتئوباکتریها و گاما پروتئوباکتریها در نمونه‌های آب دریا جمع‌آوری شده از منطقه چانگ جیانگ در چین جمعیت غالب را تشکیل دادند. اگرچه ۲۱ درصد جدایه‌های مورد بررسی از نمونه‌های آب شناسایی نشد، اما نتایج بیانگر تنوع زیستی پایین‌تر باکتری‌ها در آب دریا بود. این نتایج می‌تواند به دلیل شرایط الیگوتروفیک موجود در ستون آب و پایین بودن غلظت مواد مغذی و نبود تکیه‌گاه برای کلونیزاسیون باکتری‌ها باشد (Thiele *et al.*, 2015).

نتایج غربالگری جدایه‌های به‌دست‌آمده از رسوبات نشان داد ۱۳/۳۳ درصد جدایه‌های مورد بررسی پس از مواجهه با جلبک *C. polykrikoides* ۱۰۰ درصد سلول‌های جلبکی در محیط کشت را از بین بردند (جدول ۲). بخشی از چرخه زیستی میکروجلبک *C. polykrikoides* در حالت سیست و در رسوبات جریان دارد. این وضعیت در طی تکامل، موجب توسعه جمعیت‌های باکتریایی دارای مسیرهای متابولیک تجزیه سلول‌های جلبکی و مقاوم به سموم جلبکی در رسوبات شده است (Amin *et al.*, 2015). از این رو به نظر می‌رسد جمعیت‌های باکتریایی ساکن در رسوبات، گزینه‌ای مناسب برای هدف قرار دادن چرخه زیستی این میکروجلبک باشد. نتایج غربالگری جدایه‌های متمایز به‌دست‌آمده از نمونه‌های آب نشان داد ۹/۰۹ درصد از جدایه‌ها پس از مواجهه ۱۰۰ درصد، سلول‌های *C. polykrikoides* را از بین بردند (جدول ۳). نمونه‌های موجود در ستون آب به دلیل نوع زندگی آزاد زی و توانایی تحرک بالا و کلونیزه شدن در ذرات آلی معلق، گزینه‌های مناسبی برای کنترل زیستی HABS می‌باشند (Calle, 2017). به نظر می‌رسد فیزیولوژی ضعیف و تنوع کمتر این باکتری‌ها دلیل پایین‌تر بودن فراوانی باکتری‌های جلبک‌کش باشد.

به‌منظور مقایسه کمی اثرات ضد جلبکی جدایه‌ها، متابولیت‌های آن‌ها استخراج و مورد سنجش قرار گرفت. از ۶ جدایه برتر به‌دست‌آمده از نمونه‌های رسوب فعالیت ضد جلبکی، ۵ جدایه تأیید شد. متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از جدایه S 75 متعلق به خانواده *Shewanellaceae* علی‌رغم از بین بردن ۱۰۰ درصد سلول‌های جلبکی در مرحله غربالگری فعالیت جلبک‌کشی نشان نداد (شکل ۶ و جدول ۲)؛ بنابراین اعمال فرایند جلبک‌کشی توسط این جدایه را می‌توان به‌واسطه سایر مکانیسم‌های جلبک‌کشی مانند تولید متابولیت‌های اولیه از قبیل آنزیم‌ها محتمل دانست. متابولیت‌های استخراج شده دارای مقادیر LC_{50} در محدوده $90/28 \mu\text{g/ml}$ تا $1029 \mu\text{g/ml}$ بودند. فعالیت جلبک‌کشی متابولیت‌های استخراج شده به‌صورت وابسته به غلظت بود و تأثیر تعیین‌کننده متابولیت‌های استخراج شده تأیید نمود. در سایر مطالعات نیز فعالیت متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری‌های دریایی مورد ارزیابی قرار گرفته است. برای نمونه Jeong و همکاران (2003) ترکیب جلبک‌کش Bacillamide را از یک باکتری دریایی استخراج نموده و فعالیت جلبک‌کشی آن را در مقابل *C. polykrikoides* با LC_{50} به میزان $3/2 \mu\text{g/ml}$ گزارش دادند. پیشنهاد شد این ترکیب می‌تواند شکوفایی گونه‌های مضر از جمله *C. polykrikoides* را کنترل نماید (Jeong *et al.*, 2003). در مطالعه دیگری فعالیت جلبک‌کش ترکیب 2-undecen-1'-yl-4-quinolone تولید شده توسط باکتری دریایی *Alteromonas sp.* KNS-16 در مقابل *C. polykrikoides* و *Alexandrium tamarense* با LC_{50} در محدوده $0/5\text{mg/L}$ تا $1/1 \text{mg/L}$ گزارش شد (Cho, 2012). در مطالعه دیگری فعالیت جلبک‌کشی ترکیب β -Cyanoalanine تولید شده توسط یک باکتری دریایی در مقابل سیانوباکتریها از $0/4 \text{mg/L}$ تا 25mg/L ثبت گردید (Yoshikawa *et al.*, 2000).

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه چشم‌اندازی از فراوانی و تنوع زیستی باکتری‌ها در آب و رسوبات چند منطقه ساحلی در استان هرمزگان را ارائه نمود. همچنین پتانسیل فعالیت ضد جلبکی باکتری‌های بومی موجود در این اکوسیستم را در مقابله با میکروجلبک *C. polykrikoides* نشان داد. باکتری‌های جلبک‌کش جداسازی شده در این مطالعه می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای مطالعه کنترل زیستی شکوفایی جلبکی مضر به‌ویژه در اکوسیستم‌های بسته مانند مزارع پرورش آبزیان باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله پژوهشی بخشی از نتایج پروژه مصوب با عنوان "کنترل زیستی شکوفایی جلبکی مضر با استفاده از باکتری‌های بومی خلیج فارس" است که در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان با کد تخصیصی ۲۷-۹۰-۱۲-۷۵-۲ تصویب و اجرا شده است.

منابع

- Abdolalian, E., Rohani-Ghadikolaei, K., Moezi, M., Foroghifard, H., Mortazavi, M.S., Akbarzadeh, G.A., Deghani, R., Gharibnia, M., Banaroei, F. 2012. Determination of effective parameters on growth and bloom forming of *Cochlodinium polykrikoides*. Iranian Scientific Fisheries Journal. 21(2): 31-40.
- Amin, S., Hmelo, L., Van Tol, H., Durham, B., Carlson, L., Heal, K., Morales, R., Berthiaume, C., Parker, M., Djunaedi, B. 2015. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. Nature. 522(7554): 98-101.
- Anas, A., Nilayangod, C., Jasmin, C., Vinothkumar, S., Parameswaran, P., Nair, S. 2016. Diversity and bioactive potentials of culturable heterotrophic bacteria from the surficial sediments of the Arabian Sea. 3 Biotech. 6(2): 1-8.
- Barrington, D.J., Xiao, X., Coggins, L.X., Ghadouani, A. 2015. 10 Control and management of Harmful Algal Blooms. In: Botana, L.M., Louzao, M.C., Vilariño, N. (eds.). Climate Change and Marine and Freshwater Toxins. De Gruyter, Berlin, Germany. pp. 313-358.
- Berdalet, E., Fleming, L.E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L.C., Moore, S.K., Hoagland, P., Enevoldsen, H. 2016. Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 96(1): 61-91.
- Bonaglia, S., Nascimento, F.A., Bartoli, M., Klawonn, I., Brüchert, V. 2014. Meiofauna increases bacterial denitrification in marine sediments. Nature communications. 5(1): 1-9.
- Calle, F. 2017. Marine microbiome as source of natural products. Microbial Biotechnology. 10(6): 1293-1296.
- Cho, J.Y. 2012. Algicidal activity of marine *Alteromonas* sp. KNS-16 and isolation of active compounds. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 76(8): 1452-1458.
- Cortes, D.L., Nuñez Vazquez, E., Dorantes-Aranda, J., Band-Schmidt, C., Sandoval, F.H., Bustillos-Guzman, J., Leyva Valencia, I. 2019. The state of knowledge of harmful algal blooms of *Margalefidinium (Cochlodinium) polykrikoides* in Latin America. Frontiers in Marine Science. 6: 463.
- Dang, H., Lovell, C.R. 2016. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 80(1): 91-138.
- Demuez, M., González-Fernández, C., Ballesteros, M. 2015. Algicidal microorganisms and secreted algicides: New tools to induce microalgal cell disruption. Biotechnology Advances. 33(8): 1615-1625.
- Epstein, S.S. 1995. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. Marine Ecology Progress Series. 117: 289-298.
- Feng, B.-W., Li, X.-R., Wang, J.-H., Hu, Z.-Y., Meng, H., Xiang, L.-Y., Quan, Z.-X. 2009. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. FEMS Microbiology Ecology. 70(2): 236-248.
- Gárate-Lizárraga, I., López-Cortés, D., Bustillos-Guzmán, J., Hernández-Sandoval, F. 2004. Blooms of *Cochlodinium polykrikoides* (*Gymnodiniaceae*) in the gulf of California, Mexico. Revista de Biología Tropical. 52: 51-58.
- Goldman, E., Green, L.H. 2015. Practical handbook of microbiology. CRC Press. pp. 150-200.
- Gouda, M.K., Jammo, K.M., Awad, H.E. 2006. Distribution of heterotrophic aerobic marine bacteria in sediment in Eastern Harbour of Alexandria. Annals of Microbiology. 56(4): 295-304.
- Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A.R., Eftekhari, E. 2018. Isolation and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of bioactive metabolites of cultured actinobacteria in Persian Gulf marine sediments. Journal of Aquatic Ecology. 7(4): 57-67.
- Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A.R., Mortazavi, M.S., Hamzehei, S., Eftekhari, E. 2019a. Isolation, distribution and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of cultivable actinobacteria from the Oman Sea sediments. Acta Oceanologica Sinica. 38(12): 84-90.
- Gozari, M., Mortazavi, M., Ebrahimi, M., Deghani, R. 2016. Isolation, Identification and Evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes from marine sediments of Persian Gulf (Hormozgan Province). Iranian Scientific Fisheries Journal. 25(1): 81-94.

- Gozari, M., Zaheri, A., Jahromi, S.T., Gozari, M., Karimzadeh, R. 2019b. Screening and characterization of marine actinomycetes from the northern Oman Sea sediments for cytotoxic and antimicrobial activity. *International Microbiology*. 22: 521-530.
- Griffith, A.W., Gobler, C.J. 2016. Temperature controls the toxicity of the ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *Marine Ecology Progress Series*. 545: 63-76.
- Griffith, A.W., Gobler, C.J. 2020. Harmful algal blooms: a climate change co-stressor in marine and freshwater ecosystems. *Harmful Algae*. 91: 1-12.
- Guillard, R.R. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of marine invertebrate animals*. Springer. pp. 29-60.
- Harrison, J.P., Schratzberger, M., Sapp, M., Osborn, A.M. 2014. Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiology*. 14(1): 232.
- Jeong, S.-Y., Ishida, K., Ito, Y., Okada, S., Murakami, M. 2003. Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, *Bacillus* sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. *Tetrahedron Letters*. 44(43): 8005-8007.
- Landa, M., Blain, S., Christaki, U., Monchy, S., Obernosterer, I. 2016. Shifts in bacterial community composition associated with increased carbon cycling in a mosaic of phytoplankton blooms. *The ISME Journal*. 10(1): 39-50.
- Lee, C., Jeon, M.S., Vo, T.-T., Park, C., Choi, J.-S., Kwon, J., Roh, S.W., Choi, Y.-E. 2018. Establishment of a new strategy against *Microcystis* bloom using newly isolated lytic and toxin-degrading bacteria. *Journal of Applied Phycology*. 30(3): 1795-1806.
- Lipp, E.K., Farrah, S.A., Rose, J.B. 2001. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Marine Pollution Bulletin*. 42(4): 286-293.
- Morán, X.A.G., Gasol, J.M., Pernice, M.C., Mangot, J.F., Massana, R., Lara, E., Vaqué, D., Duarte, C.M. 2017. Temperature regulation of marine heterotrophic prokaryotes increases latitudinally as a breach between bottom-up and top-down controls. *Global Change Biology*. 23(9): 3956-3964.
- Ndlela, L.L., Oberholster, P.J., Van Wyk, J., Cheng, P. 2018. Bacteria as biological control agents of freshwater cyanobacteria: is it feasible beyond the laboratory? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(23): 9911-9923.
- Oh, J.-I., Kim, M.-J., Lee, J.-Y., Ko, I.-J., Kim, W., Kim, S.W. 2011. Isolation and characterization of algicidal bacteria from *Cochlodinium polykrikoides* culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 16(6): 1124-1133.
- Park, B.S., Kim, J.-H., Kim, J.H., Gobler, C.J., Baek, S.H., Han, M.-S. 2015. Dynamics of bacterial community structure during blooms of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) in Korean coastal waters. *Harmful Algae*. 48: 44-54.
- Richlen, M.L., Morton, S.L., Jamali, E.A., Rajan, A., Anderson, D.M. 2010. The catastrophic 2008–2009 red tide in the Arabian Gulf region, with observations on the identification and phylogeny of the fish-killing dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *Harmful Algae*. 9(2): 163-172.
- Rooney-Varga, J.N., Giewat, M.W., Savin, M.C., Sood, S., LeGresley, M., Martin, J. 2005. Links between phytoplankton and bacterial community dynamics in a coastal marine environment. *Microbial Ecology*. 49(1): 163-175.
- Seong, K.A., Jeong, H.J. 2011. Interactions between the pathogenic bacterium *Vibrio parahaemolyticus* and red-tide dinoflagellates. *Ocean Science Journal*. 46(2): 105-115.
- Singh, A., Thakur, N.L. 2016. Significance of investigating allelopathic interactions of marine organisms in the discovery and development of cytotoxic compounds. *Chemico-Biological Interactions*. 243: 135-147.
- Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. 2013. *The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer Science & Business Media.
- Stephenson, G.L. 1994. Guidance document on collection and preparation of sediments for physicochemical characterization and biological testing. *Environmental Protection Series report EPS 1/RM/29*. Environment Canada. 132 p.
- Sun, R., Sun, P., Zhang, J., Esquivel-Elizondo, S., Wu, Y. 2018. Microorganisms-based methods for harmful algal blooms control: a review. *Bioresource Technology*. 248: 12-20.

- Thiele, S., Fuchs, B.M., Amann, R., Iversen, M.H. 2015. Colonization in the photic zone and subsequent changes during sinking determine bacterial community composition in marine snow. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(4): 1463-1471.
- Vignesh, S., Dahms, H.-U., Emmanuel, K.V., Gokul, M.S., Muthukumar, K., Kim, B.-R., James, R.A. 2014. Physicochemical parameters aid microbial community? A case study from marine recreational beaches, Southern India. *Environmental Monitoring and Assessment*. 186(3): 1875-1887.
- Wang, B., Yang, X., Lu, J., Zhou, Y., Su, J., Tian, Y., Zhang, J., Wang, G., Zheng, T. 2012. A marine bacterium producing protein with algicidal activity against *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae*. 13: 83-88.
- Watson, S.B., Molot, L. 2013. Harmful algal blooms. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer. pp. 575-596.
- Wells, M.L., Trainer, V.L., Smayda, T.J., Karlson, B.S., Trick, C.G., Kudela, R.M., Ishikawa, A., Bernard, S., Wulff, A., Anderson, D.M. 2015. Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future. *Harmful Algae*. 49: 68-93.
- Yoshikawa, K., Adachi, K., Nishijima, M., Takadera, T., Tamaki, S., Harada, K.-i., Mochida, K., Sano, H. 2000. β -Cyanoalanine production by marine bacteria on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2): 718-722.