مقایسه روش‌های مختلف کشت دینوفلاژله مضر *Cochlodinium polykrikoides* در شرایط آزمایشگاهی

رضا قربانی واقعی[1*]
علیرضا اسدی[2]
اکبر پای گذار[3]

۱، ۲ و ۳. پژوهشکده میگوی کشور، بوشهر، ایران.

***مسئول مکاتبات:**
Ghorbani_v2@Yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۳۰
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

چکیده

کوکلودینیوم (*Cochlodinium polykrikoides*) یک دینوفلاژل مضر بوده که با شکوفایی خود در آب‌های ساحلی جهان بعنوان یکی از عوامل مرگ و میر ماهیان شناخته شده و از سال ۱۳۸۶ در آب‌های خلیج فارس مشاهده شده است. کشت جلبک کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت‌های مختلفی شامل f/2 (تغییر یافته)، گیلارد (f/2-Si)، TMRL، Conway و ESM انجام شد. کشت کوکلودینیوم در لوله‌های آزمایش، ارلن‌های ۱۰۰۰-۱۰۰ میلی‌لیتری و آکواریوم‌های ۱۶ لیتری (هر یک با ۱۰ لیتر آبگیری) با ۳ تکرار در هر تیمار، در آب باشوری ۳۲ قسمت در هزار، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۵۰۰۰ لوکس و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی انجام گرفت. با استفاده از محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته)، حداکثر تعداد شمارش شده در تیمارها (میانگین ۳ تکرار در هر تیمار) در لوله آزمایش ۳۲۸۳۰۰۰ سلول در لیتر و با استفاده از محیط کشت TMRL در لوله آزمایش ۳۶۸۳۰۰۰ سلول در لیتر بود. با استفاده از محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته)، در ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری ۶۳۹۳۰۰۰ سلول در لیتر، در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ۲۸۳۳۰۰۰ سلول در لیتر و با استفاده از محیط کشت TMRL در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ۳۲۰۷۰۰۰ سلول در لیتر، در ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری ۳۰۴۰۰۰۰ سلول در لیتر، در ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری ۲۳۲۵۰۰۰ سلول در لیتر شمارش گردید. فقط محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) امکان کشت انبوه این گونه را در حد آکواریوم میسر ساخت. کشت کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت TMRL در آکواریوم نتایج مطلوبی را نداشته و فقط در یک آکواریوم از ۳ آکواریوم تراکم تا ۹۱۰۰۰۰ سلول در لیتر رسید. با استفاده از محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته)، میانگین ۳ تکرار در هر تیمار در آکواریوم ۳۶۰۰۰۰۰ سلول در لیتر، و با استفاده از محیط کشت TMRL در آکواریوم ۵۵۰۰۰۰ بوده است. تکثیر کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت های Conway و گیلارد (f/2-Si) کاملا ناموفق بود. محیط کشت ESM، از اثرات مثبت کمتری برخوردار و فقط در لوله های آزمایش و ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری تا حدودی موفق بود. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که شکوفایی و کشت انبوه کوکلودینیوم نیازمند شرایط خاص و محیط کشت ویژه‌ای است که فقط با استفاده از محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) تحقق یافته است.

واژگان کلیدی: *Cochlodinium polykrikoides*، محیط کشت، تراکم سلولی، شرایط آزمایشگاهی، خلیج فارس.

مقدمه

شکوفایی جلبک‌های مضر رخ داده در سطح جهان، توسط گونه‌های مختلفی از جلبک‌های میکروسکوپی ایجاد می‌شوند (Secher, 2009). *Cochlodinium polykrikoides* یک دینوفلاژل بوده که موجب شکوفایی در آب‌های ساحلی جهان گردیده و به‌عنوان عامل مرگ و میر ماهیان شناخته شده است (Mulholland *et al*., 2009). جنس *Cochlodinium* از شاخه Dinoflagellata، رده

Dinophyceae، راسته Gymnodinales و خانواده Gymnodiniaceae می‌باشد (Algaebase, 2011). دینوفلاژل‌ها عمدتاً در آب شناورند و از این‌رو بعنوان پلانکتون شناخته شده‌اند (Algaebase, 2011). برای اولین بار در مردادماه سال ۱۳۸۶ شکوفایی جلبک *C. polykrikoides* باعث تغییر رنگ در منطقه وسیعی از آب‌های ساحلی خلیج فارس و بخشی از دریای عمان و مرگ و میر فراوان آبزیان منطقه گردیده است (عبدالعلیان و همکاران، ۱۳۹۱). برخی دینوفلاژل‌ها کلروفیل دارند و لذا فیتوپلانکتون محسوب شده و برخی از آن‌ها از گیاهان و حیوانات کوچک تغذیه نموده و بنابراین زئوپلانکتون محسوب می‌شوند. اندازه سلول‌های *C. polykrikoides* از ۴۰-۳۰ میکرومتر طول تا ۳۰-۲۰ میکرومتر عرض متغییر است (Fukuyo *et al*., 1990). جنس کوکلودینیوم میکسوتروفیک است. آن‌ها حاوی پیگمان‌های متمایل به قرمزاند که در تراکم‌های زیاد موجب ایجاد رنگ متمایل به قرمز می‌گردند. *C. polykrikoides* پلانکتونی دریایی و فاقد پوشش محافظتی و دارای تاژک مشخص به شکل حلزونی است (Fukuyo *et al*., 1990). در مناطقی که شکوفایی کوکلودینیوم رخ می‌دهد، موجب مرگ ماهیان در نتیجه مصرف تمام اکسیژن آب گشته و لذا مضر می‌باشند. ماهیانی که تحت تاثیر شکوفایی جلبک کوکلودینیوم قرار می‌گیرند، دچار کاهش اکسیژن یا خفگی می‌گردند (Vicente *et al*., 2002). گزارش گردیده که بوسیله سلول‌های *C. polykrikoides*، انوع اشکال اکسیژن واکنش‌گر (پراکسید هیدروژن H_2O_2 و آنیون سوپر اکسید -O_2) تولید شده و ممکن است یکی از عوامل مرگ و میر ماهیان باشند (Tang and Gobler, 2009).

Bilgrami و Saha در سال ۲۰۰۴ افزایش مواد مغذی همراه با کاهش شوری آب ساحلی را عامل پدید آمدن کشند گزارش و همچنین به نقش درجه حرارت آب، جریانات آبی، نور و مواد غذایی غیر آلی (عمدتاً فسفر و ازت) بر شکوفایی جلبکی نیز اشاره نموده‌اند. همچنین گزارش گردیده که میکروالمنت‌هایی مثل روی نقش مهمی را در تشکیل شکوفایی جلبکی ایفا می‌کنند. شکوفایی دینوفلاژل‌ها با شسته شدن کوبالامین (ویتامین ب ۱۲) از خاک‌ها و ورود آن‌ها به دریا و تامین مقادیر کافی از آن مرتبط می‌باشد (Bilgrami and Saha, 2004). Lee (۲۰۰۶) افزایش شدت نور خورشید و افزایش مواد مغذی ناشی از بارندگی شدید را عامل شکوفایی زیاد کوکلودینیوم عنوان نموده است. بسیاری از دینوفلاژل‌ها در شرایط نامناسب محیط به سیست تبدیل می‌گردند. در زمان شکوفا شدن آب و ایجاد بلوم، آب به رنگ قرمز، قهوه‌ای یا زرد تبدیل شده و این تغییر رنگ گاهی در وسعت چندین کیلومتر مربع قابل رویت است (ریاحی، ۱۳۸۱). Richlen و همکاران (۲۰۱۰) به شکوفایی طولانی مدت کوکلودینیوم در خلیج فارس و دریای عمان اشاره و گزارش نموده‌اند که موجب مرگ و میر هزاران تن ماهی، محدودیت فعالیت صیادی و صدمه زدن به صخره های مرجانی گردیده‌اند.

Kudela و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی *C. polykrikoides* گزارش نموده‌اند که این گونه در آب‌های سرد و گرم (۳۰-۱۱ درجه سانتی‌گراد) و در شوری ۳۴-۳۰ قسمت در هزار یافت شده اند. یک مهاجر عمودی قوی بوده و قادر است از منابع نیتروژن عالی و غیر عالی تغذیه نماید. Kim و همکاران (۲۰۱۰) نیز به مهاجرت عمودی *C. polykrikoides* در زمان کشند اشاره و عامل آنرا احتمالاً نور دانسته‌اند. سلول‌ها در ساعت ۵ صبح و قبل از طلوع خورشید به سمت بالا آمده و در ساعت ۱۶ مجدداً به اعماق می‌روند.

در سطح جهان تلاش‌هایی برای کشت جلبک کوکلودینیوم در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از محیط کشت های مختلف انجام گردیده و در مواردی تاثیر آن‌ها بر ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است. Lee (۲۰۰۸) نسبت به کشت آزمایشگاهی *C. polykrikoides* با استفاده محیط کشت f/2 (تغییر یافته) اقدام نموده است. Kim و همکاران (۲۰۰۴) اثرات درجه حرارت، شوری و پرتوتابی بر رشد *C. polykrikoides* را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده اند. Kim و همکاران (۲۰۰۸) جهت بررسی اثرات سمی برخی اشکال اکسیژن واکنش گر بر ماهی گونه Damselfish (*Chromis caerulea*) نسبت به کشت *C. polykrikoides* با استفاده از محیط کشت ESM و Sun و همکاران (۲۰۰۴) از محیط کشت گیلارد (f/2-Si) جهت کشت *C. polykrikoides* در شرایط آزمایشگاهی استفاده نموده‌اند. هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی امکان کشت جلبک *C. polykrikoides* در محیط کشت‌های مختلف و بررسی حداکثر تراکم حاصله بوده است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه ساختمان تحقیقاتی پژوهشکده میگوی بوشهر انجام گرفت. از ۶ آکواریوم برای کشت کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت f/2 (تغییر یافته) استفاده شد. از ۶ آکواریوم ذکر شده، ۳ آکواریوم با آب جوشانیده شده به‌مدت ۲۰ دقیقه و ۳ آکواریوم با آب اتوکلاوشده بمدت ۱۵ دقیقه پر گردید. از ۳ آکواریوم دیگر برای کشت کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت TMRL استفاده شد (گنجایش آب هر آکواریوم ۱۴ لیتر بود که در هریک ۱۰ لیتر آب باشوری ۳۲ قسمت در هزار ریخته شد). از لوله‌های آزمایش درب دار و ارلن‌های با حجم ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌لیتری برای کشت کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت‌های مختلف استفاده گردید. از یک دستگاه تایمر جهت تنظیم زمان‌های روشنایی (۱۲ساعت) و خاموشی (۱۲ساعت) و از ۲ لامپ فلورسنت و شدت نور ۵۰۰ لوکس، جهت تامین روشنایی مورد نیاز کشت جلبک استفاده شد. یک لامپ UV در آزمایشگاه نصب و بطور میانگین روزانه ۲-۱ ساعت مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت کوکلودینیوم از آب با شوری ۳۲ قسمت در هزار استفاده شد (Toshifum, 2003). برای ایجاد این مقدار شوری، آب خلیج فارس با شوری ۴۰ قسمت در هزار، پس از عبور از فیلترهای شنی و حوضچه‌های رسوبگیر، با آب مقطر ترکیب و در نتیجه آب با شوری ۳۲ قسمت در هزار تهیه شد. ابتدا آب مورد استفاده در لوله‌های آزمایش و ارلن‌ها، با دستگاه پمپ خلاء (ساخت تایوان مدل TC-63)، از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شده و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو (مدل Iran Tab Zaeem-87419) قرار داده شده و پس از رسیدن به درجه حرارت آزمایشگاه جهت کشت کوکلودینیوم مورد استفاده قرار گرفتند. آب مورد استفاده در آکواریوم ها، از فیلتر ۱ میکرونی عبور داده شدند.

خالص‌سازی کوکلودینیوم در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان انجام و بدین منظور، آب خلیج فارس که در آن شکوفایی جلبک کوکلودینیوم رخ داده از تور پلانکتون‌گیری ۷۰ میکرونی عبور و آنچه باقی مانده بود، سریعاً و با حداقل تکان خوردن به آزمایشگاه منتقل گردید. برای جداسازی کوکلودینیوم، از خاصیت جلب کوکلودینیوم به سمت نور استفاده شد (Diwan *et al*., 2009). نمونه‌های حمل شده را در محیط آزمایشگاه در یک بشر ۱ لیتری ریخته و ۳ قسمت از ۴ قسمت ارتفاع بشر را با کاغذ سیاه پوشانده و سپس در مقابل نور ۲ مهتابی با نور سفید قرار داده شدند. هفته‌ای یک بار سلول‌های بالا آمده جلبک کوکلودینیوم، با پی‌پت به لوله‌های آزمایشی که ۳ قسمت از ۴ قسمت آن تیره شده بود، منتقل می‌گردید (Diwan *et al*., 2009). در مرحله بعد جهت آماده‌سازی محیط کشت، آب خلیج فارس از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی عبور و در اتوکلاو به‌مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس محیط کشت گیلارد f2 (تغییر یافته) تهیه و کشت متوالی کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت فوق در لوله‌های آزمایش انجام گرفت.

جهت اجرای پروژه از محیط کشت‌های مختلفی استفاده شد که شامل موارد ذیل بوده‌اند.

تیمار ۱: کشت جلبک کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت f/2 (تغییر یافته). تیمار ۲: کشت جلبک کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت TMRL. تیمار ۳: کشت جلبک کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت Conway. تیمار ۴: کشت جلبک کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت ESM. تیمار ۵: کشت جلبک کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت گیلارد (f/2-Si).

پس از انتقال جلبک کوکلودینیوم از پژوهشکده اکولوژی بندر عباس از طریق ۳ لوله آزمایش با استفاده از وسیله نقلیه، کشت آن‌ها ابتدا با محیط کشت‌های مختلف در لوله‌های آزمایش انجام و پس از افزایش تراکم در لوله‌های آزمایش، به ارلن‌های ۱۰۰ سی‌سی و سپس ارلن‌های با حجم‌های بیش‌تر (تا ۱۰۰۰ سی‌سی) و در آکواریوم‌ها انجام گرفت. مواد مورد نیاز با استفاده از یک ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین گردید. جهت کشت کوکلودینیوم، افزودن کوکلودینیوم به هر یک از محیط کشت‌ها در حد ۲ درصد حجم محیط کشت و با استفاده از پی پت‌های استریل انجام شد.

برای تهیه محیط کشت f/2 (تغییر یافته)، ابتدا ۳ محلول اولیه آماده و سپس محیط کشت نهایی تهیه گردید. این محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در لیتر)، کانامایسین (۳۰۰ میکروگرم در لیتر) و نئومایسین (۳۰۰ میکروگرم در لیتر) بود.

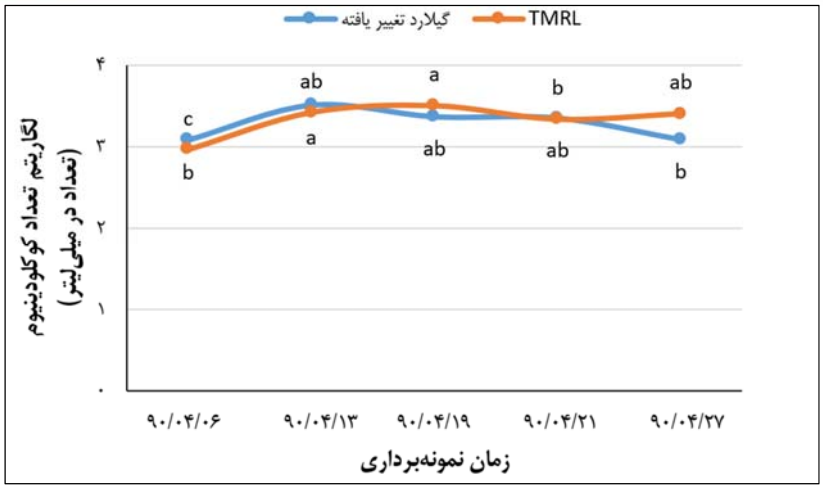
شمارش جلبک کوکلودینیوم با استفاده از لام سدویک و در زیر میکروسکوپ انجام شد. جهت شمارش، ابتدا عمل همزدن محیط کشت انجام و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی جلبک کوکلودینیوم در داخل لام ریخته شد. در این مرحله شمارش در زیر میکروسکوپ و با استفاده از خانه های لام انجام گردید.

جهت بررسی وجود و یا عدم وجود اختلاف آماری بین تیمارها ابتدا از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده، و پس از مشخص شدن وجود اختلاف آماری بین تیمارها، با استفاده از آزمون دانکن مشخص گردید که بین کدام یک از تیمارها در سطح اعتماد ۹۵ درصد اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد.

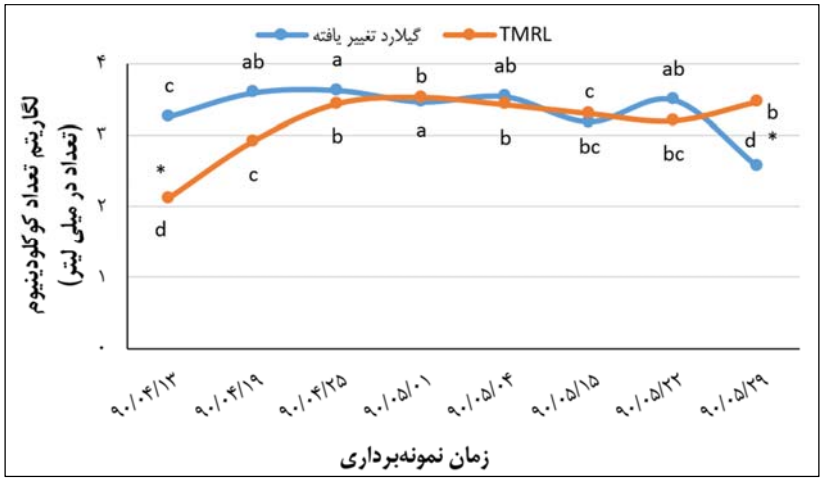
نتایج

در مجموع با توجه به نتایج حاصله می‌توان اظهار داشت که محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) و TMRL بهتر از سایر محیط‌های کشت شامل ESM و گیلارد (f/2- Si) بوده و محیط کشت گیلارد (تغییر یافته) از محیط کشت TMRL نیز بهتر می‌باشد. حداکثر تعداد کوکلودینیوم تولید شده ۶/۵ میلیون سلول در لیتر در آکواریوم شماره ۱ با استفاده از محیط کشت گیلارد (تغییر یافته) حاصل شده است. در مجموع می‌توان اظهار داشت که محیط کشت ESM و گیلارد (f/2- Si) محیط مناسبی را برای کشت انبوه جلبک کوکلودینیوم فرآهم نمی‌سازند. کشت جلبک با محیط کشت TMRL در آکواریوم و ارلن‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتری نیازمند مدت زمان بیشتری نسبت به محیط کشت گیلارد (اصلاح شده) بوده و نمی‌تواند تراکم جلبکی همانند آن را ایجاد نماید.

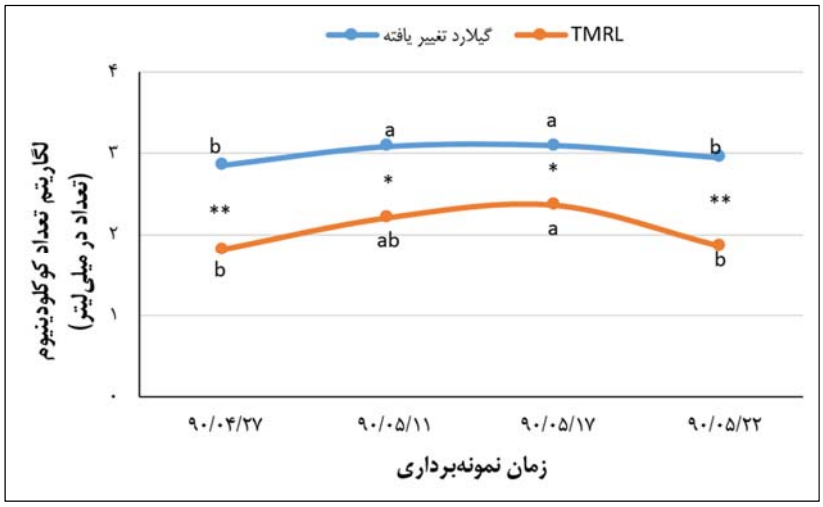
فقط محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) امکان کشت انبوه این گونه را در حد آکواریوم میسر ساخت. کشت کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت TMRL در آکواریوم نتایج مطلوبی را نداشته و فقط در یک آکواریوم از ۳ آکواریوم تراکم تا ۹۱۰۰۰۰ سلول در لیتر پس از ۴۲ روز از آغاز کشت جلبک رسید. استفاده از محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) در لوله آزمایش و ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتری موجب شکوفایی مناسب کوکلودینیوم گردید که حداکثر تعداد شمارش شده در تیمارها (با ۳ تکرار در هر تیمار) لوله آزمایش ۳۲۸۳۰۰۰ سلول (در مدت ۱۵ روز)، در ارلن ۱۰۰ میلی لیتری ۲۹۰۳۰۰۰ سلول، در ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری ۶۳۹۳۰۰۰ سلول (در مدت ۲۲ شبانه روز)، در ارلن ۵۰۰ سی‌سی ۲۸۳۳۰۰۰ سلول، در ارلن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری ۲۶۵۰۰۰۰ سلول و در آکواریوم ۳۶۰۰۰۰۰ سلول در ۱ میلی‌لیتر اندازه‌گیری گردید. البته کشت جلبک با استفاده از محیط کشت TMRL در لوله‌های آزمایش و ارلن‌ها با موفقیت انجام گردید ولی با افزایش حجم ارلن‌ها سرعت تکثیر و شکوفایی کوکلودینیوم کمتر از محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) بود. بیشترین میانگین حاصله با استفاده از محیط کشت TMRL در لوله آزمایش ۲۶۸۳۰۰۰ سلول، در ارلن ۱۰۰ سی‌سی ۳۲۰۷۰۰۰ سلول، در ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری ۳۰۴۰۰۰۰ سلول، در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ۳۹۷۳۰۰۰ سلول، در ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتری ۲۳۲۵۰۰۰ سلول و در آکواریوم حداکثر ۵۵۰۰۰۰ سلول در ۱ میلی‌لیتر بوده است. کشت کوکلودینیوم در محیط کشت‌های Conway و گیلارد (f/2-Si)، کاملا ناموفق بود. با افزایش اندازه ارلن، محیط کشت ESM از اثرات مثبت کمتری برخوردار و فقط در لوله‌های آزمایش و ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری تا حدودی موفق بود. نتایج حاصله از کشت کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت‌های مختلف در نمودارهای ۱ تا ۳ مشاهده می‌گردد. همان گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد تغییر تعداد کوکلودینیوم در لوله‌های آزمایش در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری نسبت به هم تقریباً مشابه و فاقد اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($p>۰/۰۵$). در شکل ۲ مقایسه تعداد کوکلودینیوم در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در ارلن‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری نشان داده شده است. فقط در اولین و آخرین شمارش نسبت به هم دارای اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشند ($P<۰/۰۵$). در شکل ۳ مقایسه تعداد کوکلودینیوم در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در آکواریوم‌های حاوی ۱۰ لیتر محیط کشت نشان داده شده است. در اولین و آخرین شمارش دارای اختلاف آماری زیاد معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) و در دومین و سومین شمارش دارای اختلاف معنی دار آماری ($P<۰/۰۵$) می‌باشند. اولین شمارش ۳ روز پس از کشت انجام گردید.



شکل۱: میانگین تعداد کوکلودینیوم (*Cochlodinium polykrikoides*) در لوله‌های آزمایش با استفاده از محیط کشت گیلارد تغییر یافته و TMRL.



شکل ۲: میانگین تعداد کوکلودینیوم (*Cochlodinium polykrikoides*) در ارلن‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری با استفاده از محیط کشت گیلارد تغییر یافته و TMRL.



شکل ۳: میانگین تعداد کوکلودینیوم (*Cochlodinium polykrikoides*) در آکواریوم‌های ۱۰ لیتری با استفاده از محیط کشت گیلارد تغییر یافته و TMRL.

بحث و نتیجه‌گیری

بطور کلی خالص‌سازی و کشت انبوه گونه‌های جلبکی، مستلزم شناخت کافی از اختصاصات زیستی آن‌ها است. آنچه تاکنون محرز گردیده این است که از بین روش‌های مختلف خالص‌سازی، با توجه به حرکت سریع آن و رفتار جذب به نور *C. polykricoides*، استفاده از نور روش موثری جهت خالص‌سازی می‌باشد. این روش توسط Diwan و همکاران (۲۰۰۹) برای خالص‌سازی جلبک‌ها توصیه شده است. به دلیل سرعت زیاد کوکلودینیوم جداسازی با استفاده از میکروپیپت میسر نبوده و خطر انتقال سایر جلبک‌های ناخواسته با آن زیاد می باشد.

آنچه در زمینه کشت انبوه این جلبک باید ذکر نمود این است که کشت انبوه آن همانند سایر جلبک‌ها نیازمند رعایت اصول بهداشتی در زمینه‌های مختلف می‌باشد. همچنین ایجاد، حفظ و تنظیم عوامل موثر بر کشت آن از اهمیت زیادی برخوردار است. یکی از معضلات شمارش کوکلودینیوم‌ها، نیاز به هم زدن محیط کشت آن‌ها در لوله آزمایش، ارلن و آکواریوم بود. با توجه به این‌که کوکلودینیوم‌ها در لوله آزمایش و ارلن بصورت تجمعی وجود دارند، لذا شمارش آن‌ها مستلزم تکان دادن آن‌ها بصورت سروته نمودن ظروف می‌باشد. در آکواریوم نیز کوکلودینیوم‌ها اغلب در یک قسمت تجمع یافته و برای شمارش آن‌ها نیاز است ابتدا محیط کشت هم زده شده و سپس نمونه‌گیری با پی پت انجام شود. هم زدن و تکان دادن ظروف موجب بر هم خوردن مواد رسوبی در ته ظروف گشته و در نتیجه موجب کاهش تراکم کوکلودینیوم‌ها در مراحل بعدی می‌گردد. همچنین بنظر می‌رسد که کوکلودینیوم‌ها نسبت به همزدن حساس بوده و این کار می‌تواند موجب کاهش تراکم آن‌ها در شمارش‌های بعدی گردد. در تحقیق حاضر برای شمارش و نمونه‌گیری از کوکلودینیوم‌ها در ظروف کشت، نسبت به هم زدن آکواریوم‌ها و تکان دادن (سرو ته نمودن) لوله‌های آزمایش و ارلن‌ها اقدام شده است. در زمان شمارش، جهت جلوگیری از مرگ و میر کوکلودینیوم‌ها و حفظ قابلیت رشد و تکثیر آن‌ها، تکان دادن‌ها و هم زدن‌ها در حد زیادی انجام نگرفت. البته رفتار شناگری کوکلودینیوم‌ها، بر دشواری شمارش آن‌ها می‌افزاید.

همان‌گونه که در قسمت نتایج نیز ذکر گردید، کشت جلبک کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت‌های مختلفی انجام شد. فقط محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) امکان کشت انبوه این گونه را در حد آکواریوم میسر ساخت. می‌توان اظهار داشت که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیب خاص این محیط کشت در موفقیت کشت کوکلودینیوم تاثیر عمده‌ای داشته است. کشت کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت

TMRL در آکواریوم نتایج مطلوبی را نداشته است. با توجه به نتایج حاصله از تحقیق حاضر، می‌توان به ارجحیت محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) نسبت به محیط کشت TMRL و سایر محیط‌های کشت مورد استفاده پی برد.

تکثیر ناموفق کوکلودینیوم در محیط کشت Conway و گیلارد (f/2-Si) حتی در لوله‌های آزمایش، نشانگر عدم مناسب بودن محیط‌های ذکر شده می‌باشد. البته استفاده از آب و رسوبات ساحلی قسمتی از دریا که در آن شکوفایی مفرط کوکلودینیوم رخ داده بدین منظور توصیه گردیده است (Kitto and Regunathan, 2005). با توجه به عدم شکوفایی کوکلودینیوم در زمان انجام تحقیق در محدوده آب‌های بوشهر، این کار میسر نگردید. لذا نمونه‌برداری از رسوبات ساحلی که در ناحیه شهری قرار گرفته بود انجام شد. با افزایش اندازه ارلن، محیط کشت ESM از اثرات مثبت کمتری برخوردار و فقط در لوله‌های آزمایش و ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری تا حدودی موفق بود. در واقع می‌توان نتیجه گرفت که شکوفایی و کشت انبوه کوکلودینیوم نیازمند شرایط خاص و محیط کشت ویژه‌ای است که فقط با استفاده از محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) تحقق یافته است. این امر با تحقیقات Lee در سال ۲۰۰۶ که مواد موجود در محیط کشت گیلارد (f/2-Si) (N, P, Fe, Mn, Co, Cu, Zn, Mo, Biotin, thiamin) را برای شکوفایی جلبک کوکلودینیوم در اغلب آب‌های مورد استفاده ناکافی گزارش نموده‌اند، همخوانی دارد. در تحقیق ذکر شده، در زمانی که کشت جلبک های جمع‌آوری شده از محل وقع شکوفایی انجام شده، تراکم در لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی لیتری از۳۲۰±۱۹۰۰ سلول در میلی لیتر، پس از ۵ روز به ۲۹۰۰±۲۳۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر رسیده است. این موضوع را می‌توان به استفاده از آب منطقه‌ای که شکوفایی کوکلودینیوم بصورت طبیعی در آن رخ داده و در نتیجه از شرایط مناسب شکوفایی برخوردار بوده ربط داد. موارد ذکر شده نشانگر نقش هر یک از مواد مورد استفاده در یک محیط کشت، جهت کشت موفق کوکلودینیوم می‌باشد.

در تحقیق انجام شده بوسیله Lee در سال ۲۰۰۸ کشت جلبک گونه *C. polykricoides* در محیط کشت گیلارد (f/2-Si) با مقادیر مختلفی از نیتروژن، فسفر و سلنیوم، جهت بهبود شرایط کشت این گونه جلبک انجام شده است. در این تحقیق نیز سعی گردیده تا شرایط این نوع محیط کشت جهت کشت انبوه کوکلودینیوم بهبود داده شود. عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و فراهم نشدن محیطی مناسب (از نظر مواد مورد نیاز کشت کوکلودینیوم)، می‌تواند دلیل این موضوع باشد. در محیط کشت f/2 (تغییر یافته) از آمپی‌سیلین، کانامایسین و نئومایسین جهت مقابله با باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار گرفته است. این آنتی بیوتیک‌ها وسیع الطیف بوده و بر علیه بسیاری از باکتری‌ها موثر می‌باشند.

همان‌گونه که در قسمت نتایج ارائه گردید، حداکثر تراکم ایجاد شده در تحقیق حاضر ۶۵۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر در یک آکواریوم دارای محیط کشت f/2 (تغییر یافته) بوده است. در تحقیق انجام شده توسط Bok و همکاران در سال ۲۰۱۰، حداکثر تراکم تولید شده از سلول‌های *C. polykrikoides* را ۸۵۰ سلول در هر میلی‌لیتر در شرایط آزمایشگاهی گزارش نموده‌اند (بدون ذکر نوع محیط کشت مورد استفاده) که تراکم سلولی ایجاد شده در تحقیق حاضر به‌مراتب بیشتر از تحقیق ذکر شده می‌باشد.

در تحقیقی که توسط Kim و همکاران در سال ۲۰۰۸ در زمینه بررسی سیکل زندگی *C. polykrikoides* در آب‌های ساحلی کشور کره انجام شده، گزارش نموده‌اند که شکوفایی این گونه از سال ۱۹۸۲ بصورت سالانه مشاهده و در سال ۲۰۰۳ به مدت ۶۲ روز، شکوفایی ادامه و حداکثر تراکم سلولی در مدت زمان فوق ۴۸۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر اندازه‌گیری گردیده است. در تحقیق حاضر چنین تراکمی در محل تجمع سلول‌های کوکلودینیوم در آکواریوم در زمان استفاده از محیط کشت f/2 (تغییر یافته) مشاهده شد. در زمان کشت کوکلودینیوم در آکواریوم تجمع سلول‌های کوکلودینیوم در یک قسمت از آکواریوم مشاهده گردید. در زمان شمارش کوکلودینیوم ابتدا محیط کشت همزده شده و سپس با استفاده از پی‌پت استریل نمونه‌برداری انجام و در زیر میکروسکوپ و با استفاده از لام سدویک شمارش انجام گردید. در محل تجمع کوکلودینیوم که همراه با حرکات ملایم کوکلودینیوم‌ها بود، تعداد در هر میلی‌لیتر ۵۰۰۰۰ سلول شمارش شد. تراکم‌های متفاوتی از کوکلودینیوم در سطح جهان گزارش گردیده است. در همین ارتباط Anton و همکاران (۲۰۰۸) در ارائه گزارش اولین شکوفایی *C. polykrikoides* در کشور مالزی عنوان نموده‌اند که در خلیجی واقع در شرق مالزی تراکم گونه *C. polykrikoides* بین ژانویه ۲۰۰۵

تا ژوئن ۲۰۰۶، ۶×۱۰۶ سلول در لیتر در محل استقرار قفس‌های پرورش ماهی بوده و موجب مرگ و میر ماهیان گردیده است. تراکم ذکرشده با حداکثر تراکم حاصله در تحقیق حاضر که ۶/۵ میلیون سلول کوکلودینیوم در لیتر از آکواریوم شماره ۱ با محیط کشت f/2 (تغییر یافته) بوده همخوانی دارد.

Garate-Lizarrage و همکاران (۲۰۰۴) شکوفایی *C. polykrikoides* را در خلیج کالیفرنیا در مکزیک مورد بررسی قرار داده و گزارش نموده اند که شکوفایی *C. polykrikoides* در مقابل تعداد زیادی از مزارع پرورش ماهی و میگو رخ داده و تراکم آنها به ۸×۱۰۶ سلول در لیتر رسیده بود. در مزرعه‌ای که شکوفایی جلبکی بدان راه یافته بود، آسیب آبششی در ماهیان مشاهده گردیده است. در تحقیق فوق هیچ اشاره‌ای به اثرات شکوفایی کوکلودینیوم بر مزارع پرورش میگو نشده است. احتمالاً اثرات تخریبی شکوفایی کوکلودینیوم بر مزارع پرورش میگو مشاهده نشده است. لازم به ذکر است که گزارشات متعددی در زمینه اثرات کشندگی کوکلودینیوم بر ماهیان گونه‌های مختلف منتشر شده، ولی گزارشی مبنی بر اثرات کشندگی کوکلودینیوم بر سخت‌پوستان و بویژه میگوها گزارش نگردیده است.

Bilgrami و Saha (۲۰۰۴) گزارش نموده‌اند که وقتی تراکم برخی جلبک‌های عامل کشند مثل Gymnodinium و Gonyaulax (دینوفلاژلات‌ها) زیاد باشد (تا ۱۰۷ سلول در لیتر) ممکن است رنگ آب به قرمز یا زرد متمایل به قهوه‌ای تبدیل گردد. در تحقیق حاضر در زمان کشت کوکلودینیوم با وجود رسیدن تراکم به ۵۰ میلیون سلول در هر لیتر در محل تجمع سلول‌ها در آکواریوم، فقط رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای مشاهده شده است.

Cho و Costas در سال ۲۰۰۳ گزارش نموده اند که *C. polykrikoides* در شرایط آزمایشگاهی و در طبیعت در زمان رشد تصاعدی تشکیل زنجیره می دهد. اما در طبیعت بیشتر سلول‌ها قبل از شکوفایی به صورت تک سلولی می‌باشند. در تحقیق حاضر نیز در زمان مناسب بودن شرایط و در زمان رشد تصاعدی، سلول‌های کوکلودینیوم به‌صورت زنجیره (عمدتاً ۴-۲ تایی و گاهی ۸ تایی) بوده‌اند. محققین فوق از محیط کشت f/۲ حاوی مخلوط آنتی‌بیوتیکی در ۲۰ درجه سانتی‌گراد با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با استفاده از لامپ فلورسنت جهت کشت *C. polykrikoides* استفاده نموده‌اند. همچنین Honjo و همکاران در سال ۲۰۰۲ کشت *C. polykrikoides* را هر دو هفته یکبار با محیط کشت گیلارد f/2 بدون سیلیکات در درجه حرارت ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام داده‌اند. در تحقیق حاضر از محیط کشت f/۲ (تغییر یافته) با استفاده از لامپ فلورسنت و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی جهت کشت کوکلودینیوم استفاده و از نظر موارد فوق با تحقیق ذکر شده همخوانی دارند. آنچه در این بین باید مورد توجه قرار گیرد نقش نور طبیعی در کشت انبوه کوکلودینیوم می باشد. در تحقیق حاضر این‌طور بنظر می‌رسد که وجود نور طبیعی با شدت کم و با زاویه تابش غیرمستقیم (زمانی که آکواریوم‌ها در پناه دیوار و از دو طرف تحت تابش نور طبیعی قرار داشتند) می‌تواند به شکوفایی کوکلودینیوم کمک نماید. زیرا شکوفایی کوکلودینیوم در آکواریوم‌هایی که از تابش نور طبیعی با شدت کم و غیر مستقیم همراه با نور مهتابی برخوردار بودند، از آکواریوهایی که در معرض تابش نور طبیعی و مستقیم تر (مقابل پنجره) قرار داشته‌اند بهتر بود.

در تحقیق حاضر در تمام مراحل کشت *C. polykrikoides* در ارلن‌ها و به‌ویژه آکواریوم‌ها، کوکلودینیوم‌ها نزدیک به دیواره‌ای که در فاصله دورتری از منبع نور قرار دارد تجمع می‌یافتند که احتمالاً این امر ناشی از قرارگیری در شدت نور مناسب بوده است. در همین ارتباط Kim و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی مهاجرت عمودی *C. polykrikoides* در طبیعت گزارش نموده‌اند که این جلبک در هوای آرام و آفتابی، جهت تنظیم شدت نور دریافتی به مناطق عمیق تر آب مهاجرت می‌کند، زیرا در چنین شرایطی ممکن است شدت نور در سطح، بیش از حد مطلوب برای این گونه باشد. به‌نظر می‌رسد استفاده از ۲ لامپ ۴۰ وات فلورسنت با قابلیت تولید شدت نور ۵۰۰۰ لوکس، شدت نور بیشتر از حد نیاز کوکلودینیوم را فراهم نموده و در نتیجه کوکلودینیوم‌ها در نزدیک دیواره واقع در فاصله دورتر از منبع نور تجمع می‌یافتند. این حالت به‌ویژه در ارلن‌های ۱۰۰۰-۵۰۰ سی‌سی و آکواریوم‌ها مشهودتر بود. البته در زمان تامین نور مورد نیاز، جهت جلوگیری از تجمع نور در یک نقطه و در نتیجه افزایش مفرط شدت نور، مهتابی‌ها به فاصله ۱۰ سانتی‌متر از هم و در فاصله ۱۰ سانتی‌متری آکواریوم‌ها، ارلن‌ها و لوله‌های آزمایش قرار داده شدند. حتی در زمان کشت کوکلودینیوم به‌نظر می‌رسید که زاویه تابش نور طبیعی در آزمایشگاه نیز بر محل تجمع آنها تاثیر

می‌گذارد. کوکلودینیوم‌ها، عمدتاً در قسمتی از آکواریوم که دورتر از منبع نور طبیعی قرار داشت، تجمع می‌یافتند. این احتمال وجود دارد که استفاده از شدت نورهای کمتر نیز بتواند موجب شکوفایی مناسب کوکلودینیوم گردد.

در طول دوره پرورش، درجه حرارت آب در حد ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم و از آب با شوری ۱±۳۲ قسمت درهزار استفاده گردید که از نظر محدوده حرارتی و شوری با گزارش Kim و همکاران (۲۰۰۴) که دامنه حرارتی مطلوب را برای *C. polykrikoides* ۲۱ تا ۲۶ درجه سانتی گراد و شوری را ۳۰ تا ۳۶ قسمت در هزار گزارش نموده‌اند، همخوانی دارد. همچنین Yamatogi و همکاران (۲۰۰۵)، محدوده حرارتی ۳۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد و محدوده شوری ۳۶-۱۶ قسمت در هزار را برای کشت *C. polykrikoides* مناسب گزارش نموده و تا حدودی موید محدوده‌های ارائه شده می‌باشد.

در مجموع می‌توان اظهار داشت که تکثیر کوکلودینیوم با استفاده از محیط کشت‌های Conway و گیلارد (f/2-Si) کاملاً ناموفق بود. محیط کشت ESM، از اثرات مثبت کمتری برخوردار و فقط در لوله‌های آزمایش و ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری تا حدودی موفق بود. در واقع می‌توان نتیجه گرفت که شکوفایی و کشت انبوه کوکلودینیوم نیازمند شرایط خاص و محیط کشت ویژه‌ای است که فقط با استفاده از محیط کشت گیلارد f/2 (تغییر یافته) محقق گردید.

سپاسگزاری

از ریاست محترم موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مدیران محترم بخش آبزی پروری موسسه و بخش اکولوژی، ریاست محترم پژوهشکده میگو، معاونان محترم برنامه‌ریزی و پشتیبانی و پژوهشی پژوهشکده، مسئولین محترم بخش‌های آبزی‌پروری، ارزیابی ذخایر، بهداشت و بیماری‌ها و اکولوژی پژوهشکده میگو و آقای مهندس سامانی، سرکار خانم دکتر میربخش، آقای مهندس یگانه، آقای مهندس نظاری و آقای مرزبان تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم. همچنین از همکاری و مساعدت‌های ریاست و معاونت محترم پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریا عمان، مسئول محترم بخش آبزی‌پروری پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس تشکر و قدردانی می‌نماییم. لازم است تشکر ویژه‌ای را از آقای مهندس عیسی عبدالعلیان و خانم مهندس مریم معزی به دلیل ارائه راهنمایی‌های ارزنده در زمان اجرای تحقیق داشته باشیم.

منابع

ریاحی، ح.، ۱۳۸۱. جلبک شناسی. ناشر: دانشگاه الزهرا. ۲۴۶ ص.

عبدالعلیان، ع.، روحانی قادیکلایی، ک.، معزی، م.، فروغی فرد، ح.، اکبرزاده، غ.، صدیق مرتضوی، م. ص.، دهقانی، ر.، غریب نیا، م. و بناویی، ف.، ۱۳۹۱. تعیین برخی از پارامترهای موثر بر رشد و شکوفایی داینوفلاژله *Cochlodinium polykrikoides*. مجله علمی شیلات ایران، سال بیست و یکم، شماره ۲، صفحات ۴۰-۳۱.

AlgaeBase, 2011. Cochlodinium polykrikoides. http://www.algabase.org

Anton, A., Teoh, P. L., Mohd-Shaleh, S. R. and Mohammad-Noor, N., 2008. First occurrence of *Cochlodinium polykricoides* blooms in Sabah Malaysia. Harmful algae,Vol.7. PP. 331-336.

Bilgrami, K. S. and Saha, L. C., 2004. A textbook of algae. CBS Publishers and distributors. New Delhi. India. 260 p.

Bok, T. H., Paeng, D. G., Kim, E., Na, J. and Kang, D., 2010. Ultrasound backscattered power from *Cochlodinium polykrikoides*, the main red tide species in the southern sea of Korea. Journal of plankton research, Vol. 32. Issue 4. pp. 503-514.

Cho, E. S. and Costa, E., 2003. Rapid monitoring for the potentially ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Korean coastal waters using fluorescent probe tools. Journal of Plankton Research, Vol. 26. pp. 175-180.

Diwan, A. D., Joseph, S. and Ayyappan, S., 2009. Physiology of reproduction, breeding and culture of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Naredera Publishing House, Delhi (India). 292 p.

Fukuyo, Y., Takano, H., Chihara, M. and Matsuoka K., 1990. Red Tide Organisms in Japan. An Illustrated Taxonomic Guide. Uchida Rokakuho, Co., Ltd., Tokyo, 407 p.

Garate-Lizarraga, I., Lopez-Cortes, D. J., Bustillos-Guzman, J. J. and Hernandez-Sandoval, F., 2004. Blooms of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniaceae) in the Gulf of California, Mexico. Revista de Biologia Tropica, 52: 51-58.

Honjo, T., Imada, N., Anraku, Y., Kim, D. I., Muramatsu, M. and Oshima, Y., 2002. Removal of harmful red tide plankton by ozone treatment. Japan.

Kim, D. I., Matsuyama, Y., Nagasoe, S., Yamaguchi, M., yoon, Y. H., Oshima, Y., Imada, N. and Honjo, T., 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykricoides* Margalef (Dinophyceae). Journal of Plancton Research, Vol. 26. No. 1. pp. 61-66.

Kim, M. J., Jeong, S. Y. and Lee, S. J., 2008. Isolation, identification, and algicidal activity of marine bacteria against *Cochlodinium polykrikoides*. Journal of applied phycology, Vol. 20. No. 6.

Kim, Y. S., Jeong, C. S., Seong, G. T., Han, I. S. and Lee, S., 2010. Diurnal vertical migration of *C. polykrikoides* during the red tide in Korean coastal sea waters. Journal of Environmental Biology, 31 (5). Pp. 687-693.

Kitto, M. R. and Regunathan, C., 2005. Bioengineering tools control harmful blooms in shrimp ponds. World aquaculture, 36: 14-12.

Kudela, J. P., Blakery, M. D., Lane, J. Q., 2008. Linking the physiology and ecology and ecology of *Cochlodinium* to better understand harmful algal bloom events: a comparative approach. Harmful Algae, 7(3): 278-292.

Lee, Y. S., 2006. Factors affecting outbreaks of *Cochlodinium polykrikoides* blooms in coastal areas of Korea. Marine Pollution Bulletin, 52: 626-634.

Lee, Y. S., 2008. Utilization of various nitrogen, phosphorus, and selenium compounds by *Cochlodinium polykricoides*. Journal of Environmental Biology, 29: 799-804.

Mulholland, M. R., Morse, R. E., Boneillo, G. E., Bernhardt, P. W., Filippino, K. C., Procise, L. A., Blanco-Garcia, J. L., Marshall, H. G., Egerton, T. A., Hunley, W. S., Moore, K. A. and Berry, D. L., 2009. Understanding causes and impacts of the dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*, blooms in the Chesapeake Bay. Estuaries and Coasts, 32(7): 734-747.

Richlen, M., Morton, L., Jamali, S. l., Rajan, A. and Anderson, D. M., 2010. The catastrophic 2008-2009 red tide in the Persian Gulf region, with observation on the identification and phylogeny of the fish-killing dinoflagellate *Cochlodinium polykricoides.* Journal of harmful algae, Vol. 9. Issue 2. pp. 163-172.

Secher, S., 2009. Measures to control harmful algal blooms. The Plymouth Student Scientist. University of Paslymouth, 2 (1): 212-227.

Sun, X. X., Lee, Y. J., Choi, J. K. and Kim, E. K., 2004. Synergistic effect of sophorolipid and loess combination in harmful algal blooms mitigation. Marine Pollution Bulltein, Vol. 48. Issues 9-10. pp. 863-872.

Tang, Y. Z. and Gobler, C. J., 2009. Characterization of the toxicity of *Cochlodinium polykricoides* isolates from northeast US estuaries to finfish and shellfish. Journal of harmful algae. Vol. 8. pp. 454-462.

Tang, Y. Z. and Gobler, C. J., 2011. *Cochlodinium polykrikoides* blooms and clonal isolates from the northwest Atlantic coast cause rapid mortality in larvae of multiple bivalve species. Journal of Marine Biology, Vol. 156. No. 12. pp. 2601-2611.

Toshifum, Y., 2003. Occurrence of *Cochlodinium polykrikoides* red tide and its growth characteristics in Imari Bay in 1999. Bulletin of Nakasaki prefectural Institute of Fisheries, No. 28. pp. 21-26.

Vicente, H., Gaid, R., Dejarme, H., Roa, E. and Azanza, R., 2002. Harmful algal bloom in Iligan bay, southern Philippines. Science Diliman, Vol. 14. No. 2.