

بهینه‌سازی رشد اسپیرولینا پلاتنسیس در آب غنی‌سازی شده خلیج فارس

الهه تقیان^۱، داریوش نباتی احمدی^۲، محمد رعایایی اردکانی^۳، حمید معماری رجبی^۴

^۱ دانشجوی دکتری ژنتیک و بهنژادی گیاهی، دانشگاه تهران، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، کرج، ایران

^۲ دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران، دانشکده کشاورزی، اهواز، ایران

^۳ استاد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، اهواز، ایران

^۴ استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران، دانشکده کشاورزی، اهواز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در زمینه‌های مختلف گسترش یافته است. هدف اصلی این پژوهش بهینه‌سازی شرایط رشد این ریزجلبک به منظور کاهش هزینه‌ها و افزایش مزایای تولید انبوه آن در آب دریا می‌باشد. همچنین با کشف شرایط رشدی بهینه اسپیرولینا از طریق غنی‌سازی آب خلیج فارس، می‌توان با تولید بیشتر آن آلودگی‌های محیط زیستی کاهش داد. مواد و روش‌ها: ابتدا شرایط رشدی ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بر مبنای سه عامل دما، نور و PH بهینه‌سازی شد. عامل دما شامل چهار تیمار، فاکتور نور شامل چهار تیمار و عامل PH شامل پنج تیمار بود. همچنین ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در شرایط بهینه رشدی، در آب خلیج فارس، آب دریای غنی شده با ۵٪ زاروک، با ۱۰٪ زاروک، با اوره و محیط کشت خالص زاروک کشت شد. یافته‌ها: بهترین بازه دمایی برای رشد اسپیرولینا پلاتنسیس، ۲۷ الی ۳۲ درجه سانتی‌گراد بود. همچنین بهترین رشد در ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی بدست آمد؛ و برای فاکتور PH، مناسب‌ترین مقدار بازه ۱۰،۷۲ الی ۱۱،۴۷ تعیین گردید. همچنین، در کشت اسپیرولینا پلاتنسیس به ترتیب، در محیط کشت زاروک، اوره، ۱۰٪ زاروک، ۵٪ زاروک و در انتها آب دریا، شرایط مساعدی برای رشد ریزجلبک اسپیرولینا به دست آمد. نتیجه‌گیری: بنابراین، رشد ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در آب خلیج فارس به کندی و با عملکرد کمی صورت می‌گیرد و با غنی‌سازی این آب با سایر موارد مذکور، ریزجلبک سریع‌تر وارد فاز لگاریتمی شده و عملکرد بهتری از خود نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اسپیرولینا پلاتنسیس، آب دریا، محیط کشت، محیط زیست، زیست پالایی

مقدمه

ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس^۱، از ابتدایی‌ترین اشکال حیات بر روی کره زمین و نوعی جلبک سبز-آبی از خانواده سیانوباکترها است^{۱،۲}. امروزه با افزایش جمعیت و نیاز روزافزون جوامع به تولید غذا، منابع غذایی مختلف از جمله ریزجلبک‌ها، برای تامین غذای انسان، دام، طیور و آبزیان در جهان مورد توجه متخصصین قرار گرفته‌اند^{۳،۴}. ریزجلبک‌ها منابع غنی از ترکیباتی هستند که می‌توانند موجب ارتقاء کیفیت زندگی بشر شوند. تجدیدپذیر بودن آن‌ها، عدم نیاز به زمین‌های زراعی حاصلخیز، امکان رشد در آب‌های شور و لب‌شور و امکان رشد و پرورش آن‌ها در فضاهای بسته و آزمایشگاهی، کاهش آلودگی‌های محیطی بواسطه فرایندهای زیست‌پالایی و ارزشمند بودن آن‌ها را چندین برابر کرده است^{۵،۶}.

اسپیرولینا پلاتنسیس دارای درصد بالایی از پروتئین است؛ و بواسطه وجود پروتئینی نظیر فیکوسیانین و وجود رنگدانه آبی در آن، معمولا در صنایع غذایی و آرایشی به عنوان رنگ طبیعی استفاده می‌شود^{۷،۸}. همچنین این ریزجلبک دارای خواص ضدالتهابی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی است^{۹،۱۰}. در حقیقت اسپیرولینا پلاتنسیس یکی از پرمصرف‌ترین مواد طبیعی است که به عنوان مکمل غذایی در انسان، حیوانات، طیور و آبزیان محبوب شده است. همچنین این ریزجلبک حاوی ویتامین‌ها، مواد معدنی، اسیدهای چرب، رنگدانه‌ها و اسیدهای آمینه ضروری است. علاوه بر این، مقادیر قابل توجهی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی منحصر به فرد از جمله پلی فنول‌ها، کاروتنوئیدها و فیکوسیانین نیز در آن وجود دارد که این ترکیبات پلی فنولی دارای اثرات ضد باکتریایی هستند^{۱۱،۱۲}.^{۱۳} همچنین، اسپیرولینا فعالیت‌های ضد ویروسی در برابر برخی از ویروس‌های مشترک انسانی یا حیوانی نشان داده است^{۱۴}.

همانطور که واضح است، آب دریا ۹۷٫۵٪ از کل آب‌های روی کره زمین را تشکیل می‌دهد^{۱۵،۱۶}. در مقایسه با آب شیرین، آب دریا دارای غلظت نمک (NaCl) بالاتر (۳۵ گرم در کیلوگرم نمک های محلول) و همچنین سایر ترکیبات کمیاب مانند کربن، لیتیوم، باریم، منگنز، آهن، روی، آلومینیوم، مس، سلنیوم است. آب دریا همچنین حاوی گازهای محلول از جمله نیتروژن (N) اکسیژن (O₂) و دی‌اکسیدکربن (CO₂) است^{۱۷}.

شوری زیاد آب دریا استفاده از آن را در سیستم‌های کشاورزی محدود می‌کند. با این حال، این خاصیت استفاده از آن را برای کشت ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس تقویت می‌کند^{۱۸،۱۹}. با توجه به موارد مذکور با بررسی میزان رشد زیرجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در آب دریا، می‌توان به میزان کمبود ترکیبات موجود در آب دریا پی برد و با غنی‌سازی آن، به تولید بیشتر این ریزجلبک پرداخت. مطالعه حاضر با هدف بررسی رشد ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در آب خلیج فارس، به همراه غنی‌سازی، برای تعیین امکان سنجی استفاده از آب دریا به عنوان منبع تغذیه و ارزیابی استفاده از آن به عنوان جایگزین محیط کشت برای پرورش اسپیرولینا پلاتنسیس، است.

مواد و روش‌ها

روش تهیه محیط کشت‌های مورد استفاده

محیط کشت زاروک

محیط کشت مورد استفاده برای ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در این پژوهش، محیط کشت زاروک در نظر گرفته شده است که از ۴ بخش تشکیل شده است^{۲۰، ۲۱، ۲۲}. برای تهیه محیط کشت، بعد از تعیین حجم مورد نیاز براساس غلظت‌های مشخص، محلول در ۴ بخش جداگانه تهیه می‌گردید. برای تهیه بخش C و بخش D به دلیل حجم مورد نیاز بسیار کم در محیط کشت، از آن‌ها استوک تهیه می‌شد. بخش‌های C و D بعد از تهیه، اتوکلاو و در یخچال نگهداری می‌شدند. برای آماده سازی

۱ . *Spirulina platensis*

می‌گشت و در کنار شعله بخش A و بخش B با هم مخلوط می‌شد و حجم مشخصی (بر اساس حجم مورد نیاز در محیط کشت) از FeSO_4 به محیط کشت اضافه می‌شد؛ بعد از این مراحل، بخش C و بخش D را به محیط ساخته شده، اضافه کرده و توسط ریزجلبک اسپیرولینا تلقیح می‌شد^{۲۳، ۲۴، ۲۵}. مواد مورد نیاز برای تهیه ۱۰۰ cc محیط کشت در جدول ۱ آمده است.

بخش A، بیکربنات سدیم و دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات در حجم مشخصی از آب مقطر حل می‌شد، سپس بخش B از ترکیب سایر مواد شیمیایی موجود در این بخش، درون آب مقطر بدست می‌آمد. بعد از تهیه همه بخش‌های مورد نیاز، بخش A و بخش B هر یک به طور جداگانه در اتوکلاو قرار داده می‌شد. بعد از اتمام کار دستگاه، محلول‌ها به زیر هود منتقل

جدول ۱- مقدار مواد تشکیل دهنده محیط کشت زاروک بر اساس گرم، برای تهیه ۱۰۰ cc محیط کشت

ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت Zarrouk	گرم در ۱۰۰ cc
Part A:	—
NaHCO_3	۱/۶۸
K_2HPO_4	۰/۰۵
Part B:	—
NaNO_3	۰/۲۵
NaCl	۰/۱
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۲
$\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۰۸
CaCl_2	۰/۰۰۴
FeSO_4	۰/۱ cc
Part C:	در ۲۰۰ cc استوک
H_3BO_3	۰/۵۷۲
$\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	۰/۳۶۲
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۴۴۴

MoO3	۰/۰۰۳
CuSO4.5H ₂ O	۰/۰۱۴۸
Part D:	در ۲۰۰ cc استوک
NH4CO3	۰/۰۴۵۸
NiSO4.7H ₂ O	۰/۰۹۵۶
NawO2	۰/۰۳۵۸

نحوه نگهداری و تکثیر ریز جلبک اسپیرولینا

پلاتنسیس

در ابتدای کار، برای تلقیح اولیه کشت، ریز جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس از مرکز تحقیقات میگو (بوشهر) خریداری و در تمام مراحل پژوهش به سه روش کوتاه مدت، میان مدت و بلند مدت نگهداری و تکثیر شد.

نگهداری کوتاه مدت

برای نگهداری کوتاه مدت ریز جلبک اسپیرولینا، از محیط کشت مایع زاروک استفاده می‌شد. در این روش جلبک در صورت آلوده نشدن، فقط تا پایان فاز لگاریتمی خود، قادر به رشد و تکثیر بود و از آن به بعد، رشد آن رو به زوال می‌رفت. طول دوره زندگی ریز جلبک اسپیرولینا در محیط کشت مایع حدوداً ۱ ماه است.

نگهداری میان مدت

در نگهداری میان مدت، ریز جلبک اسپیرولینا روی پلیت کشت داده می‌شد. در این روش به محیط کشت زاروک، ۲٪ تا ۱/۵٪ آگار اضافه می‌گردید و قبل از این که محیط کشت تهیه شده، کاملاً خنک شود و ببندد؛ درون پلیت‌ها ریخته می‌شد و بعد از خنک شدن محیط کشت، پلیت‌ها توسط ریز جلبک اسپیرولینا تلقیح و درون یخچال نگهداری می‌شدند. در این روش جلبک‌ها تا ۶ ماه نیز زنده می‌مانند. البته

محیط کشت زاروک (محیط جامد)

بعد از تهیه محیط کشت زاروک به میزان ۱/۵٪ تا ۲٪ از حجم کل، آگار به محیط اضافه می‌گردید و محیط قبل از خنک شدن و سفت شدن درون پلیت‌ها ریخته می‌شد.

محیط کشت زاروک گلیسیروله

در ابتدا محیط کشت زاروک به طور کامل تهیه می‌شد؛ سپس در پایان، به میزان ۵٪ و ۱۰٪ از حجم نهایی به محیط کشت، گلیسرول اضافه می‌گردید.

آب دریا غنی شده توسط اوره

آب دریا از اعماق مختلف دریای شهر بوشهر جمع‌آوری گردید و توسط اوره به مقدار 4 g/l غنی‌سازی شد و به عنوان محیط کشت برای سنجش شرایط رشدی ریز جلبک در آب دریا، مورد بررسی قرار گرفت.

آب دریا غنی شده توسط محیط کشت

زاروک

آب دریا به مقدار ۵٪ و ۱۰٪ از حجم محیط کشت مورد استفاده در آزمایش، توسط محیط کشت زاروک، غنی‌سازی گردید.

رسم منحنی های رشد جلبک و بهینه سازی

آن بر اساس سه فاکتور دما، نور، pH

شرایط طراحی شده آزمایش

برای رسم منحنی بر اساس ۳ فاکتور دما، نور و pH، شرایط مختلفی طراحی شد. برای فاکتور دما، ۴ تیمار دمایی شامل ۲۲ °C، ۲۷ °C، ۳۲ °C، ۳۷ °C و برای فاکتور نور، ۳ تیمار نوری شامل (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی)، (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، (۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی) و برای فاکتور pH، ۵ تیمار شامل ۶/۶، ۷/۸۱، ۹/۵۶، ۱۰/۷۲، ۱۱/۴۷ طراحی گردید و لازم به ذکر تمامی آزمایشات در ۳ تکرار صورت گرفت.

شرایط طراحی شده آزمایش برای

رسم منحنی رشد جلبک در آب دریا

در این مرحله آب دریا از خلیج فارس از شهر بوشهر جمع آوری شد و توسط زاروک و اوره غنی گردیده و توسط ریزجلبک اسپیرولینا تلقیح شده در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm و دوره های ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دو تکرار قرار داده شد. آب دریا در مقادیر ۵٪ و ۱۰٪ بوسیله محیط کشت زاروک و توسط ۴ سی سی اوره غنی گردید. همچنین آب دریا بدون غنی سازی در دو تکرار همراه سایر محیط های غنی شده به عنوان تیمار شاهد در انکوباتور قرار گرفت.

نحوه آماده سازی نمونه ها و خوانش

آن ها

در ابتدا از نمونه ها به حجم ۱ cc نمونه گیری صورت می گرفت؛ سپس نمونه ها بوسیله دستگاه بیوفتومتر، در سه طیف نوری (۵۵۰ nm، ۶۰۰ nm، ۶۵۰ nm) مورد سنجش نوری قرار می گرفتند. بعد از خوانش، pH نمونه ها توسط دستگاه pH meter اندازه گیری می شد. بعد نمونه ها برای

لازم به ذکر است که هرچه مدت زمان بیشتری سپری شود از قدرت باززایی جلبک ها کاسته خواهد شد.

نگه داری بلند مدت

در نگهداری بلند مدت، از روش گلیسیروله کردن استفاده می شد؛ که در این روش به محیط کشت زاروک تلقیح شده با جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، غلظت های ۵٪ و ۱۰٪ گلیسیرول اضافه می شد؛ سپس آن ها را درون میکروتیوب ریخته و در فریزر ۸۰- قرار داده می شد. در نگهداری بلند مدت به کمک روش گلیسیروله کردن می توان ریزجلبک را تا یک سال نگهداری کرد.

کشت ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و

تلقیح محیط کشت

کشت ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به منظور تکثیر از آن در این پژوهش، در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دور شیکر ۱۵۰ rpm صورت می گرفت. تمامی مراحل تلقیح در زیر هود و در کنار شعله، انجام می شد و مقدار حجم مایع تلقیح کننده شامل ۱٪ از حجم محیط کشت زاروک در نظر گرفته شده بود.

نحوه نمونه برداری

بعد از تهیه محیط کشت در تاریخ های مشخص، اولین نمونه گیری ۲۴ ساعت بعد از تلقیح صورت می گرفت و سایر نمونه گیری ها، هر ۴۸ ساعت یک بار تکرار می شد و داده های بدست آمده جمع آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار می گرفت. در هر نوبت از نمونه برداری، همه نمونه ها به زیر هود منتقل می شد و برای جلوگیری از انتشار آلودگی در کنار شعله، از محیط کشت حاوی ریزجلبک، حجم ۱cc برداشت و در میکروتیوب ها ریخته می شد.

جدا سازی و ته نشین شدن جلبک به منظور جدا سازی مایع رویی، به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می‌شدند. بعد از جدا کردن مایع رویی، وزن نمونه‌ها به دقت اندازه‌گیری می‌شد تا وزن تر حاصل گردد. بعد از اتمام این مراحل، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۷۰ درون آون قرار می‌گرفتند، تا نمونه‌ها کاملاً خشک شوند و وزن خشک آن‌ها نیز بدست آید. با دو وزن خشک و وزن میکروتیوب، وزن خالص جلبک‌ها بدست می‌آمد و نمودارها بر اساس ۲ پارامتر OD و وزن خشک جلبک، مورد سنجش قرار می‌گرفتند.

تجزیه تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل نتایج در تمام مراحل بوسیله نرم افزار اکسل^۱ برای بدست آوردن میانگین داده‌ها و رسم نمودار و از نرم افزار اس پی اس اس^۲ به منظور بررسی سطح معنی داری داده‌ها استفاده شد.

در این پژوهش از روش های تحلیل آماری توصیفی و استنباطی استفاده شده است. روش های توصیفی شامل میانگین، انحراف استاندارد و رسم نمودار در موارد مورد نیاز است. روش های آماری استنباطی شامل روش های بین گروهی مانند آزمون های t مستقل، تحلیل واریانس ساده، تحلیل واریانس چند متغیره و آزمون های t همبسته و اندازه گیری های مکرر می باشد.

نتایج

رسم منحنی‌های رشد جلبک و بهینه سازی آن

بر اساس سه فاکتور دما، نور، pH

ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس امروزه در بسیاری از فعالیت‌های زیست محیطی و تغذیه‌ای نقش موثری را به خود اختصاص داده است^{۲۶}. با توجه به بررسی‌ها و پژوهش‌های زیادی که در این زمینه توسط رادمن و همکاران، کیم و همکاران، اوگوندا و همکاران و هیریرو و همکاران در دنیا در

حال انجام است، می‌توان به این مهم پی‌برد که برای کاهش و حذف آلودگی‌ها از محیط اطراف، در ابتدا باید به مطالعه شرایط رشدی میکروارگانیسم و بهینه‌سازی آن پرداخت^{۲۷، ۲۸، ۲۹}.

بررسی نوع فاکتورهای موثر در بهینه سازی رشد ریزجلبک بسیار حایز اهمیت هستند. با توجه به تحقیقات صورت گرفته توسط دی اولیورا و همکاران و دانشور و همکاران در مورد فاکتورهای مهم و تاثیرگذار در شرایط رشدی ریزجلبک، می‌توان پی‌برد که فاکتورهای دما و pH و نور از مهمترین عوامل موثر بر رشد ریزجلبک اسپیرولینا می‌باشند^{۳۱، ۳۲، ۳۳}. یکی از مهمترین فاکتورها، عامل pH است که علاوه بر رشد ریزجلبک بر سایر عوامل نیز تاثیرگذار خواهد بود و موجب تغییر در فرآیندهای زیستی اسپیرولینا پلاتنسیس می‌شود^{۳۴، ۳۵}. یکی از این فرآیندها، جذب زیستی فلزات سنگین از محیط است که می‌تواند موجب کاهش آلودگی‌های زیست محیطی گردد. برای مثال افزایش pH محیط ریزجلبک از ۳ به ۵ باعث افزایش میزان جذب فلزات سنگین از محیط می‌شود^{۳۶}. بنابراین تعیین مناسب‌ترین فاکتورهای رشدی برای ریزجلبک، باعث افزایش عملکرد و بهبود روند رشدی و افزایش طول دوره زندگی آن نیز خواهد شد^{۳۷}. در اولین مرحله از پژوهش شرایط بهینه رشدی برای ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس برای ۳ فاکتور دما، pH و نور مورد بررسی قرار گرفت.

1 . Excel

2 . spss

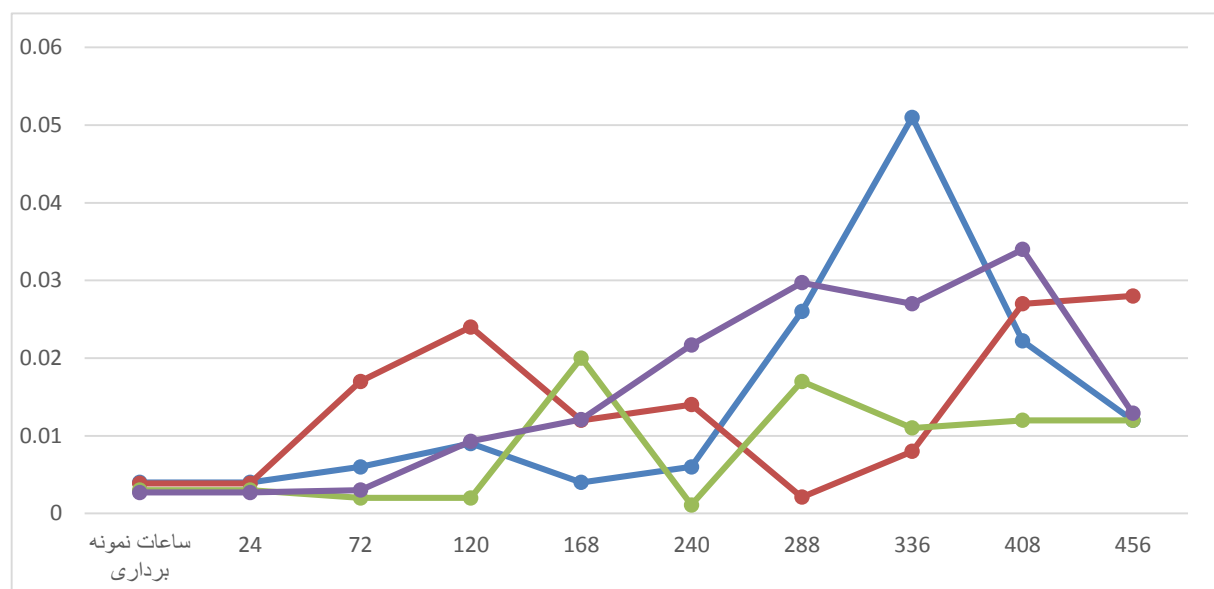
فاکتور دما

در این آزمایش برای بررسی فاکتور دما، ۴ تیمار دمایی و در نظر گرفته شد. و در دوره ی ۱ ماهه تا پایان طول عمر جلبک نمونه گیری و ثبت داده ها ادامه داشت. نمونه گیری از جلبک ها هر ۴۸ ساعت یکبار صورت می گرفت.

(۲۲ °C ، ۲۷ °C ، ۳۲ °C ، ۳۷ °C)

جدول شماره ۲- میانگین وزن خشک _ فاکتور دما

۲۷°C	۳۷°C	۲۲ °C	۳۲°C	ساعات نمونه گیری
۰/۰۰۴	۰/۰۳۶۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲۷	۲۴
۰/۰۰۶	۰/۰۱۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۷۲
۰/۰۰۹	۰/۰۲۴	۰/۰۰۲	۰/۰۰۹۳	۱۲۰
۰/۰۰۴	۰/۰۱۲	-۰/۰۰۲	۰/۰۱۲۱	۱۶۸
۰/۰۰۶	۰/۰۱۴	۰/۰۰۱۱	۰/۰۲۱۷	۲۴۰
۰/۰۲۶	-۰/۰۰۲۱	۰/۰۱۷	۰/۰۲۹۷	۲۸۸
۰/۰۵۱	۰/۰۰۸	۰/۰۱۱	۰/۰۲۷	۳۳۶
۰/۲۲۲	-۰/۰۲۷	۰/۰۱۲	۰/۰۳۴	۴۰۸
۰/۰۱۲	۰/۰۲۸	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲۹	۴۵۶



نمودار ۱- نمودار میانگین وزن خشک _ فاکتور دما

نتایج حاصل از نمودار رشدی جلبک

در شرایط تیمار دمایی

با توجه به جدول ۲ و نمودار ۱ در بررسی وزن خشک نمونه‌ها و تحلیل خواش نمونه‌ها، می‌توان مشاهده نمود که دمای 32°C مناسب‌ترین روند رشدی را برای اسپیرولینا پلاتنسیس به همراه دارد. بر اساس تحلیل داده‌ها و بررسی - های صورت گرفته از این بخش از آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که ریزجلبک اسپیرولینا در دمای 32°C ، زودتر به فاز نمایی می‌رسد و از سایر تیمارهای دمایی تاثیر بهتری بر رشد ریزجلبک خواهد داشت.

در بررسی تیمارهای دمایی برای یافتن شرایط بهینه در ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، با توجه به جدول ۲ و نمودار ۱ می‌توان به روشنی دریافت که بازه دمایی 27°C تا 32°C مناسب ترین دما برای رشد ریزجلبک خواهد بود. به طور کلی ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس دارای

قدرت رشد زیادی در بازه دمایی متفاوت است و اگر تغییر ناگهانی دما در محیط پیش نیاید و شوک دمایی به ریزجلبک القا نگردد، ریزجلبک اسپیرولینا قادر به ادامه حیات می‌باشد. حتی با افزایش دما تا 40°C ریزجلبک اسپیرولینا قدرت رشد خود را حفظ خواهد کرد؛ اما با رسیدن به دمای 45°C ریزجلبک از بین خواهد رفت. اما در بازه دمایی 27°C تا 32°C بهترین نمودار رشدی و عملکرد مناسب را خواهد داشت. به طور اختصاصی در بررسی انجام شده بین دو دمای 27°C و دمای 32°C برای دستیابی مناسب‌ترین دما برای رشد ریزجلبک، نتایج نشان داد که دمای 32°C مناسب‌تر از دمای 27°C برای رشد ریزجلبک می‌باشد اما در بررسی‌های آماری تفاوت بین این دو دما معنی دار نبود ^{۳۲}.

جدول ۳- آنالیز واریانس وزن خشک برای فاکتور دما

منبع	مجموع مجزورات نوع ۳	درجه آزادی	مجموع مربعات	F	سطح معنی داری
مدل اصلاح شده	۰/۰۷۷	۳۷	۰/۰۰۲	۱/۶۱۸	۰/۰۳۹
عرض از مبدا	۰/۰۵۴	۱	۰/۰۵۴	۴۱/۸۷۶	۰/۰۰
زمان * دما	۰/۰۵۱	۲۵	۰/۰۰۲	۱/۵۷۸	۰/۰۶۸
دما	۰/۰۱۱	۳	۰/۰۰۴	۲/۹۸۰	۰/۰۳۷
زمان	۰/۰۲۰	۹	۰/۰۰۲	۱/۷۵۳	۰/۰۹۲
خطا	۰/۰۹۶	۷۵	۰/۰۰۱	-	-
مجموع	۰/۲۱۹	۱۱۳	-	-	-

-	-	-	۱۱۲	۰/۱۷۳	مجموع اصلاح شده
---	---	---	-----	-------	-----------------

شده

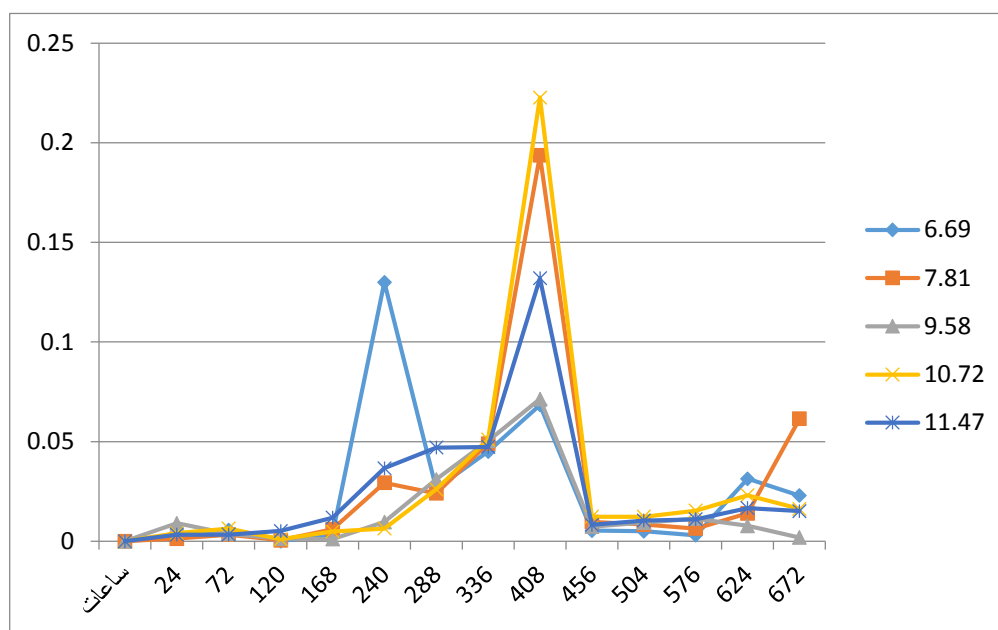
فاکتور pH

داده‌های بدست آمده، بهترین pH برای رشد ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، بازه ۱۰/۷۲ تا ۱۱/۴۷ بود و روند رشدی بسیار مناسبی را به همراه داشت؛ اما در بازه pH اسیدی، منحنی‌های رشد و زمان وارد شدن به فاز نمایی نسبت به حالت قلیایی کاهش معنی داری را نشان داد.

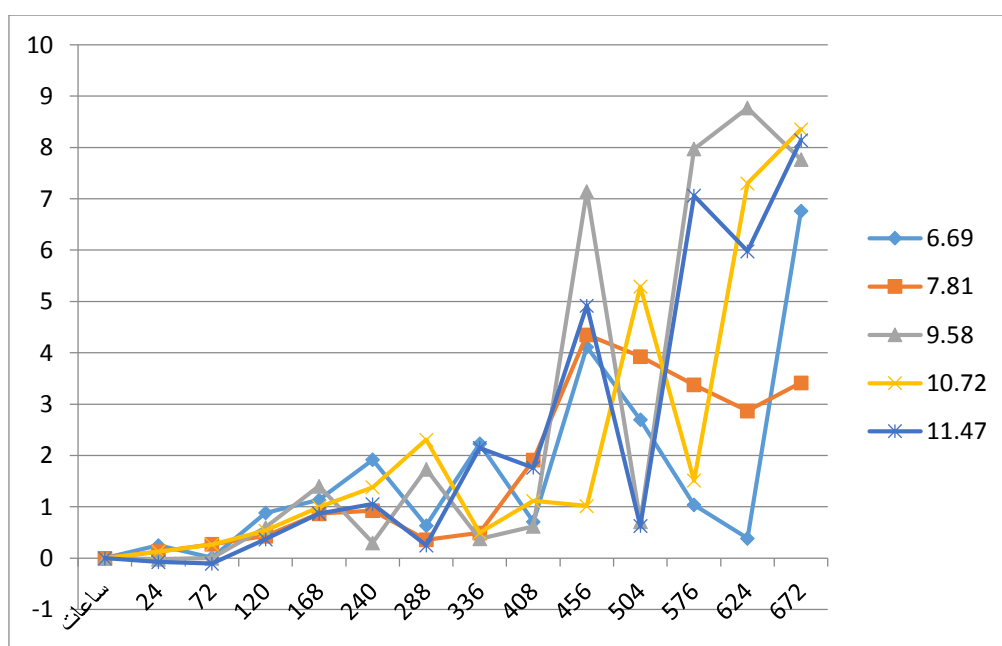
فاکتور pH نیز شامل ۵ تیمار شامل (۶/۶، ۷/۸۱، ۹/۵۶، ۱۰/۷۲، ۱۱/۴۷) بررسی شد. اولین پارامتری که مورد سنجش قرار گرفت، فاکتور pH بود. در این مرحله با توجه به نمودارها و

جدول شماره ۴- میانگین وزن خشک _ فاکتور pH

ساعات نمونه‌گیری	pH ۶/۶۹	pH ۷/۸۱	pH ۹/۵۸	pH ۱۰/۷۲	pH ۱۱/۴۷
۲۴	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۹	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳
۷۲	۰/۰۰۵۶	۰/۰۰۳۳	۰/۰۰۳۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳۳
۱۲۰	۰/۰۰	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰۵
۱۶۸	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱۱
۲۴۰	۰/۰۰۳	۰/۰۲۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳۶
۲۸۸	۰/۰۲۶	۰/۰۲۴	۰/۰۳۱	۰/۰۲۶	۰/۰۴۷
۳۳۶	۰/۰۴۵	۰/۰۴۹	۰/۰۵۰	۰/۰۵۱	۰/۰۴۷۳
۴۰۸	۰/۰۶۸	۰/۱۹۳	۰/۰۷۱	۰/۲۲۲	۰/۱۳۲
۴۵۶	۰/۰۰۵۳	۰/۰۰۹	۰/۰۰۷	۰/۰۱۲	۰/۰۰۸
۵۰۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۸	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۱۰
۵۷۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۱۱	۰/۰۱۵	۰/۰۱۱
۶۲۴	۰/۰۰۲۹	۰/۰۱۳	۰/۰۰۷	۰/۰۲۳	۰/۰۱۶
۶۷۲	۰/۰۰۲	۰/۰۶۱	۰/۰۰۱	۰/۰۱۶	۰/۰۱۵



نمودار ۲- نمودار میانگین وزن خشک _ فاکتور pH در غلظت های مختلف



نمودار ۳- نمودار میانگین خوانش (OD) _ فاکتور pH در غلظت های مختلف

نتایج حاصل از نمودار رشدی جلبک در

شرایط تیمار pH

با توجه به جدول شماره ۴ می‌توان مشاهده کرد که در بررسی‌های انجام شده و تحلیل‌های صورت گرفته از میانگین وزن خشک های فاکتور pH، دو غلظت ۱۰/۷۲ و ۱۱/۴۷ دارای روند رشدی منطقی‌تری نسبت به سایر غلظت‌ها می‌باشد. همچنین زمان آغاز مرحله شدی و وارد شدن به فاز

نمایی در دو غلظت نامبرده، بهترین عملکرد را برای ریزجلبک به همراه داشته است. همچنین با توجه به نمودار های شماره ۲ و نمودار ۳ در بررسی میانگین خوانش‌های صورت گرفته برای فاکتور pH، می‌توان به این نتیجه رسید که در غلظت‌های ۱۰/۷۲ و ۱۱/۴۷، ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس بهترین نمودار رشدی را خواهد داشت که در سایر pHهای اعمال شده، شاهد آن نمی‌باشیم.

جدول ۵- آنالیز واریانس وزن خشک برای فاکتور pH

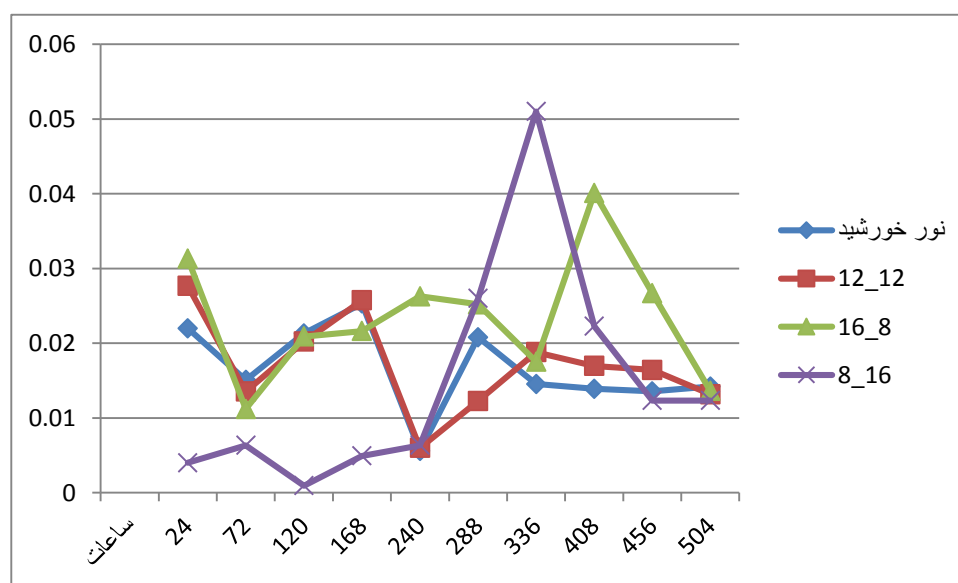
منبع	مجموع	درجه	مجموع	F	سطح معنی
	مجدورات نوع ۳	آزادی	مربعات		داری
مدل اصلاح شده	۰/۳۲۴	۴۸	۰/۰۰۷	۲/۱۷۹	۰/۰۰۱
عرض از مبدا	۰/۱۲۷	۱	۰/۱۲۷	۴۰/۸۱۶	۰/۰۰
pH * زمان	۰/۰۸۷	۳۵	۰/۰۰۲	۰/۸۰۲	۰/۷۶۷
pH	۰/۰۰۴	۴	۰/۰۰۱	۰/۳۳۶	۰/۸۵۳
زمان	۰/۲۳۳	۹	۰/۰۲۶	۸/۳۴۵	۰/۰۰
خطا	۰/۳۰۱	۹۸	۰/۰۰۳	—	—
مجموع	۰/۷۵۹	۱۴۷	—	—	—
مجموع اصلاح شده	۰/۶۲۸	۱۴۶	—	—	—

فاکتور نور

همچنین فاکتور نور در ۴ تیمار نوری (نور خورشید، ۱۲-۱۲، ۸-۱۶، ۱۶-۸) مورد بررسی قرار گرفت.

جدول شماره ۶- میانگین وزن خشک _ فاکتور نور

ساعات نمونه‌گیری	۱۶-۸	۱۲-۱۲	۸-۱۶	نور خورشید
۲۴	۰/۰۳۱۳	۰/۰۲۷	۰/۰۰۴	۰/۰۲۲
۷۲	۰/۰۱۱۲	۰/۰۱۳	۰/۰۰۶۳	۰/۰۱۵
۱۲۰	۰/۰۲۰۹	۰/۰۲۰۲	۰/۰۰۰۹	۰/۰۲۱۳
۱۶۸	۰/۰۱۲۶	۰/۰۲۵۷	۰/۰۰۴	۰/۰۲۱
۲۴۰	۰/۰۲۶۲	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶۳	۰/۰۰۵۶
۲۸۸	۰/۰۲۵۲	۰/۰۱۲	۰/۰۲۶	۰/۰۲۰۸
۳۳۶	۰/۰۱۷۵	۰/۰۱۸۸	۰/۰۵۱	۰/۰۱۴۵
۴۰۸	۰/۰۴۰۱	۰/۰۱۶۹	۰/۰۲۲۲	۰/۰۱۳۹
۴۵۶	۰/۰۲۶۷	۰/۰۱۶۴	۰/۰۱۲	۰/۰۱۳۵



نمودار ۴- نمودار میانگین وزن خشک _ فاکتور نور

نتایج حاصل از نمودار رشدی جلبک در

شرایط تیمار نوری

در این مرحله ۴ تیمار نوری، شامل (نور خورشید، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) اعمال شد؛ و با توجه به جدول ۶ و نمودار ۴ و بررسی های انجام شده می توان نتیجه گرفت که در بین ساعات روشنایی و تاریکی اعمال شده، بهترین روند رشدی برای ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس مربوط به تیمار نوری (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) می باشد.

همچنین در بررسی تیمارهای نوری می توان گفت که ریزجلبک اسپیرولینا قادر به رشد در ۴ تیمار نوری اعمال شده می باشد و

تنها تغییرات ناگهانی نور باعث ایجاد شوک نوری در ریزجلبک می شود، در غیر این صورت به رشد خود ادامه خواهد داد. با توجه به همه شرایط و اعداد بدست آمده می توان نتیجه گرفت که دوره نوردهی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شرایط مناسبی را برای رشد ریزجلبک فراهم می نماید. البته لازم به ذکر است، دوره نوری ۱۲-۱۲ نیز روندی تقریباً مشابه تیمار نوری فوق داشت و تفاوت چندانی را در نمودار رشدی ایجاد نکرد^{۳۷، ۳۸، ۳۹}. در واقع به بیانی بهتر باید گفت که تغییرات حاصل از ساعات روشنایی و تاریکی تاثیر چندانی بر رشد ریزجلبک اسپیرولینا نخواهد داشت؛ اما با توجه به مطالعه صورت گرفته توسط وونشکا، چیونگ و چن می توان بیان کرد که تغییرات شدت نور بر رشد اسپیرولینا موثرتر از ساعات روشنایی و تاریکی اعمال شده، خواهد بود^{۴۰، ۴۱}.

جدول ۷- آنالیز واریانس وزن خشک برای فاکتور نور

منبع	مجموع مجذورات	درجه آزادی	مجموع مربعات	F	سطح معنی داری
نوع ۳					
مدل اصلاح شده	۰/۰۲۸	۳۷	۰/۰۰۱	۰/۰۸۳۳	۰/۷۲۶
عرض از مبدا	۰/۰۴۷	۱	۰/۰۴۷	۵۲/۳۹۶	۰/۰۰
زمان * نور	۰/۰۱۹	۲۵	۰/۰۰۱	۰/۸۴۳	۰/۶۷۷
نور	۰/۰۰۴	۳	۰/۰۰۱	۱/۶۳۲	۰/۱۸۹
زمان	۰/۰۰۸	۹	۰/۰۰۱	۰/۹۶۰	۰/۴۸۰
خطا	۰/۰۶۷	۷۵	۰/۰۰۱	-	-
مجموع	۰/۱۳۷	۱۱۳	-	-	-
مجموع اصلاح شده	۰/۰۹۵	۱۱۲	-	-	-

رسم منحنی رشد جلبک در آب دریا

همه جلبک‌ها در شرایط دمایی 27°C و دوره نوردی (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و دور شیکر ۱۵۰ rpm قرار داشتند و همه آزمایش‌ها در ۲ تکرار صورت گرفت. تیمارهای اعمال شده شامل آب دریا، آب غنی شده با ۵٪ محیط کشت زاروک، آب دریا غنی شده با ۱۰٪ محیط کشت

زاروک و آب دریا غنی شده با اوره بود. لازم به ذکر است که در طول آزمایش همه تیمارها دارای ۲ تکرار بوده‌اند.

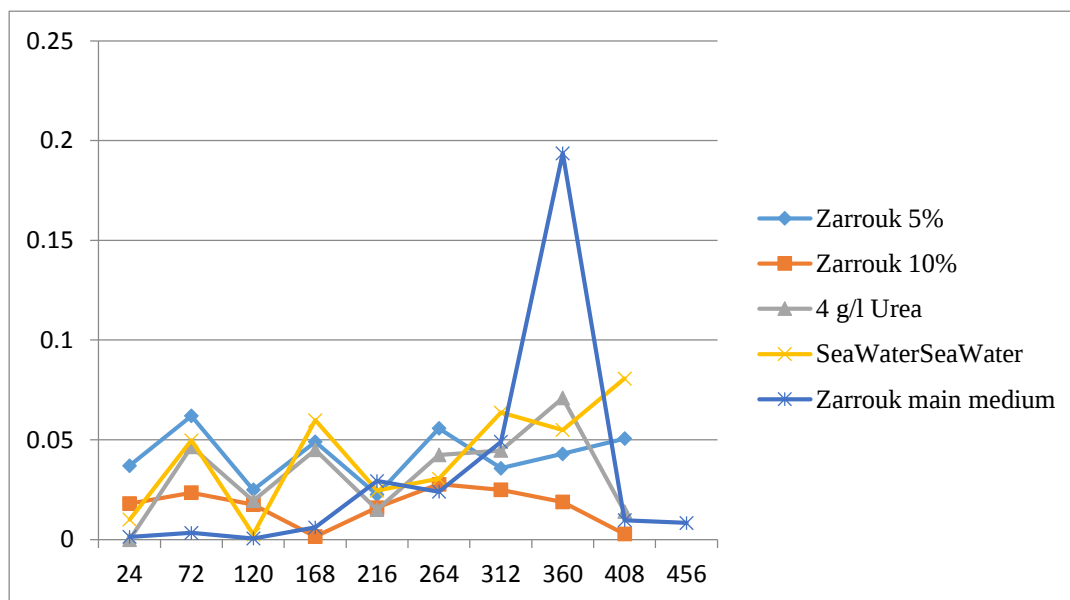
مقایسه وزن خشک جلبک

مقایسه وزن خشک ریزجلبک اسپیرولینا بین تیمارهای مختلف در ساعات نمونه برداری شده در جدول ۸ و نمودار ۵ آمده است.

جدول ۸- مقایسه وزن خشک ریزجلبک اسپیرولینا بین تیمارهای اعمال شده در ساعات نمونه برداری

تیمارهای اعمال شده	۲۴*	۷۲	۱۲۰	۱۶۸	۲۱۶	۲۶۴	۳۱۲	۳۶۰	۴۰۸
Zarrouk 5%	۰/۰۳۷۰۵	۰/۰۶۲	۰/۰۲۴۹۵	۰/۰۴۹	۰/۰۲۲۵	۰/۰۵۵۷۵	۰/۰۳۵۷۵	۰/۰۴۳	۰/۰۵۰۶
Zarrouk 10%	۰/۰۱۸	۰/۰۲۳۵	۰/۰۱۷۵۵	۰/۰۰۱۵	۰/۰۱۶	۰/۰۲۷۷	۰/۰۲۴۹	۰/۰۱۸۸۵	۰/۰۰۲۸
4 g/l Urea	۰	۰/۰۴۶۵	۰/۰۱۹۵	۰/۰۴۴۹۵	۰/۰۱۵	۰/۰۴۲۴	۰/۰۴۴۷	۰/۰۷۰۹۵	۰/۰۱۴
SeaWater	۰/۰۱	۰/۰۴۹۷	۰/۰۰۲۵	۰/۰۵۹۸	۰/۰۲۴۵	۰/۰۳۰۴۵	۰/۰۶۳۶۵	۰/۰۵۴۹۵	۰/۰۸۰۶۵
Zarrouk main medium	۰/۰۰۱۳۳	۰/۰۰۳۳۳	۰/۰۰۰۵۱	۰/۰۰۶۰۳	۰/۰۲۹۳۳	۰/۰۲۴	۰/۰۴۹	۰/۱۹۳۶۷	۰/۰۰۹۶۷

* اعداد این ردیف اول از جدول، زمان نمونه‌برداری‌ها (ساعت) از ریزجلبک کشت شده در محیط‌های کشت مختلف را نشان می‌دهد.



نمودار ۵- مقایسه وزن خشک ریزجلبک اسپیرولینا بین تیمارهای اعمال شده در ساعات نمونه برداری

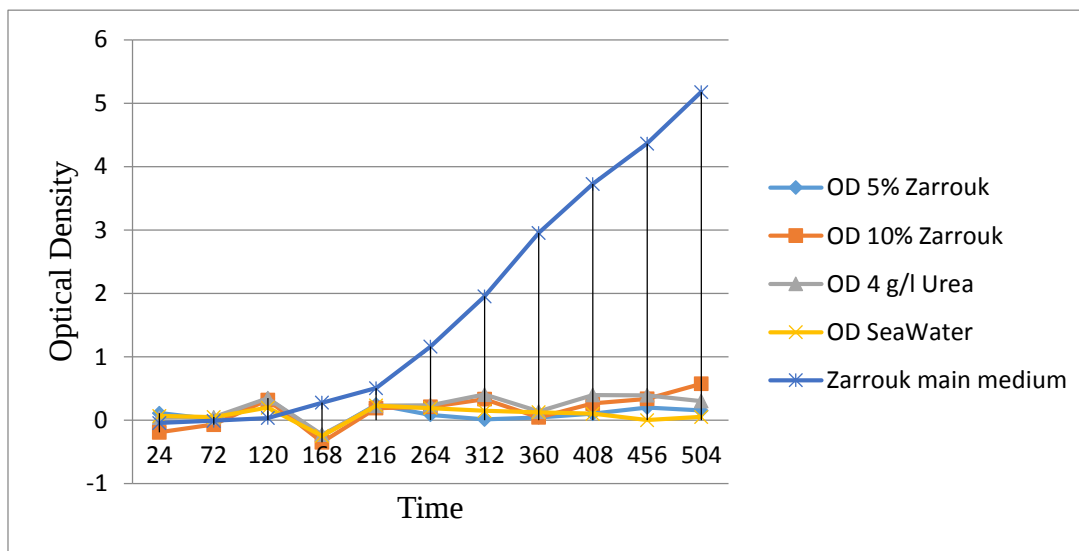
مقایسه خوانش های (OD) جلبک

مقایسه بین خوانش های انجام شده در ساعات مشخص بین تیمارهای اعمالی در جدول ۹ و نمودار ۶ آمده است.

جدول ۹- مقایسه خوانش (OD) ریزجلبک اسپیرولینا بین تیمارهای اعمال شده در ساعات نمونه برداری

تیمارها	۲۴*	۷۲	۱۲۰	۱۶۸	۲۱۶	۲۶۴	۳۱۲	۳۶۰	۴۰۸	۴۵۶	۵۰۴
Zarrouk 5%	۰/۱۱۳۵	۰/۰۱۴۵	۰/۳۳۹	-۰/۲۴۵	۰/۲۴۷	۰/۰۸۵	۰/۰۱۱	۰/۰۴۵۵	۰/۱۰۴	۰/۲۰۲۵	۰/۱۵۴۵
Zarrouk 10%	-۰/۱۹۱	-۰/۰۶۷۵	۰/۳۱۹۵	-۰/۳۴۶	۰/۱۹۲۵	۰/۲۱۲	۰/۳۳۳	۰/۰۴۵۵	۰/۲۶۴۵	۰/۳۳۷۵	۰/۵۷۵۵
4 g/l Urea	۰/۰۴۲۵	۰/۰۴۸۵	۰/۳۴۷۵	-۰/۲۲۸	۰/۲۲۸	۰/۲۳۶	۰/۴۰۵۵	۰/۱۳۸	۰/۳۹۸۵	۰/۳۹۳	۰/۳۰۲۵
SeaWater	۰/۰۶۸	۰/۰۴۹	۰/۲	-۰/۲۴۹	۰/۲۳۲۵	۰/۱۹۲۵	۰/۱۴۸	۰/۱۲۵۵	۰/۱۰۳۵	۰/۰۰۲۵	۰/۰۵۳
Zarrouk main medium	-۰/۰۴۳	-۰/۰۰۸	۰/۰۳۵۳۳	۰/۲۷۶	۰/۵۰۷۷	۱/۱۶۰۳	۱/۹۵۴۳	۲/۹۵۵۳	۳/۷۲۷۷	۴/۳۶۳۷	۵/۱۷۵۷

* اعداد این ردیف از جدول زمان نمونه برداری ها (به ساعت) از ریزجلبک کشت شده در محیط های مختلف را نشان می دهد.



نمودار ۶- مقایسه خوانش (OD) ریزجلبک اسپیرولینا بین تیمارهای اعمال شده در ساعات نمونه برداری

نتایج حاصل از مقایسه وزن خشک و

خوانش (OD) جلبک

با توجه به میانگین وزن خشک های بدست آمده و خوانش های صورت گرفته برای تیمار آب دریا در جداول ۸ و ۹ و همچنین منحنی های حاصله در نمودارهای ۵ و ۶ می توان مشاهده کرد که براساس تیمار اعمال شده در طول آزمایش محیط کشت زاروک بیشترین رشد را در ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به ثبت رسانده است. همچنین در بررسی سایر تیمارهای اعمال شده می توان مشاهده کرد که وضعیت رشدی در تیمار محیط کشت غنی شده با اوره بعد از محیط کشت زاروک بیشترین رشد را به خود اختصاص داده است و بعد از آن به ترتیب محیط های حاوی ۱۰٪ و ۵٪ زاروک دارای رشد بهتری می باشند. به طور کلی همه تیمارهای

اعمال شده در این بخش، از لحاظ نوسانات رشدی دارای شرایط منطقی تری نسبت به آب دریا هستند. بنابراین با توجه به سیر کلی آزمایش می توان اذعان داشت که به ترتیب محیط کشت زاروک، اوره، ۱۰٪ محیط کشت زاروک، ۵٪ محیط کشت زاروک و در انتها آب دریا شرایط مساعدی برای رشد ریزجلبک اسپیرولینا را دارا می باشند.

تحلیل آماری رشد ریزجلبک اسپیرولینا در آب دریا

در این بخش از آزمایش از نرم افزار Excel برای رسم منحنی ها و از نرم افزار SPSS22 برای بررسی معنی داری داده ها در سطح ۵٪ استفاده شد.

جدول ۱۰- تحلیل واریانس در بررسی سطح معنی داری رشد جلبک در آب دریا

منبع	مجموع مجذورات نوع ۳	درجه آزادی	مجموع مربعات	F	سطح معنی داری
مدل اصلاح شده	۲/۸۳۸	۳۹	۰/۰۷۳	۱۴/۱۲۴	۰/۰۰
عرض از مبدا	۱/۰۴۶	۱	۱/۰۴۶	۲۰۲/۹۵۴	۰/۰۰
تیمارها	۰/۱۳۱	۳	۰/۰۴۴	۸/۴۸۷	۰/۰۰
زمان	۲/۱۲۳	۹	۰/۲۳۶	۴۵/۷۸۸	۰/۰۰
زمان*تیمارها	۰/۵۸۴	۲۷	۰/۰۲۲	۴/۱۹۵	۰/۰۰
خطا	۰/۲۰۶	۴۰	۰/۰۵۵	-	-
مجموع	۴/۰۹۰	۸۰	-	-	-
مجموع اصلاح شده	۳/۰۴۴	۷۹	-	-	-

بحث

استفاده از ریز جلبک اسپیرولینا در کاهش و یا حذف فلزات سمی و سنگین به منظوره کاهش آلودگی‌های محیط، در این کره خاکی اهمیت بسیار زیادی دارد^{۴۱}. در حقیقت محیط کشت زاروک، بستر استاندارد است که برای رشد اسپیرولینا استفاده می‌شود. اگرچه این بستر کشت، زیست توده بهینه را ارائه می‌دهد، اما به دلیل گران بودن اجزای مورد نیاز برای ساخت محیط کشت، از نظر اقتصادی در سطح وسیع، به‌صرفه نخواهد بود و در فرآیند متداول تولید زیست توده اسپیرولینا، هزینه تولید محیط کشت حدوداً ۳۵ الی ۴۰ درصد از کل هزینه تولید را تشکیل می‌دهد. در این راستا، توسعه محیط کشت جایگزین مقرون‌به‌صرفه، با استفاده از تکنیک‌هایی به منظور تولید در مقیاس گسترده، برای تولید این ریزجلبک ضروری است^{۴۲}. تولید این ریزجلبک با استفاده از یک منبع ارزان قیمت، مانند آب دریا همواره مورد توجه بوده است^{۴۳}. تولید تجاری ریزجلبک در دنیا ابتدا در ژاپن با کشت کلرلا و به دنبال آن با کشت اسپیرولینا اوایل سال ۱۲۶۱ در دریای تکزکوکو در مکزیک آغاز شد^{۴۴}، تولید انبوه اسپیرولینا پلاتنسیس در آب دریا می‌تواند صنعت تولید آن را بهبود بخشد^{۴۵، ۴۶}. به طور کلی نور، دما، pH، کیفیت آب، میزان هوادهی و حضور ترکیب‌های مغذی، از فاکتورهای موثر در تولید اسپیرولینا می‌باشند^{۴۸، ۴۹، ۵۰}. کربن، نیتروژن، فسفر، سولفور، کلسیم، منیزیم و پتاسیم از جمله عناصر ضروری برای اسپیرولینا هستند. عناصری که اسپیرولینا در مقادیر کم به آن‌ها نیاز دارد، شامل مولیبدن، آهن، نیکل، مس، روی، کبالت، بور، منگنز و کلرید است^{۵۱، ۵۲}. از جمله مزایای تولید اسپیرولینا پلاتنسیس در آب دریا شامل کاهش هزینه‌های مصرفی مواد شیمیایی، صرفه‌جویی در اراضی و محیط‌های آزمایشگاهی، استفاده بهینه از سواحل و پاکسازی آب دریا از فلزات سنگین و آلاینده‌ها می‌باشد^{۵۳، ۵۴}؛ همچنین استفاده از آب دریا برای کشت اسپیرولینا پلاتنسیس

هزینه‌های تولید را به طور قابل توجهی کاهش خواهد داد^{۵۵}.
^{۵۶} با توجه به مطالعه صورت گرفته در زمینه کشت ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در آب دریا توسط حسین زاده، خناری، جعفری (۱۳۹۳)، در بررسی تاثیر غنی سازی آب حوضه جنوبی دریای خزر بر پارامترهای رشد ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس و قرار دادن چهار تیمار برای کشت در آب دریا که شامل آب دریا غنی شده به ترتیب با ۰/۵٪، ۱/۰٪ و ۲/۰٪ از محیط کشت زاروک، نتایج حاصله نشان دهنده این امر بود که هر چه میزان غنی سازی توسط محیط کشت زاروک در آب دریا افزایش یابد، میزان رشد ریزجلبک در شرایط کاملاً مساوی نیز افزایش می یابد^{۵۷}. این نتیجه نشان دهنده این امر است که آب دریا فاقد یکسری مواد مغذی و حیاتی برای رشد و تولید مثل ریزجلبک اسپیرولینا می باشد. البته لازم به ذکر است که آب دریاها و تالاب های مناطق مختلف به دلیل این که دارای درصد متفاوتی از مواد محلول و ترکیبات می باشند، ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس پاسخ های متفاوتی را در نرخ رشدی خود، منعکس می کند^{۵۸}. همچنین در تحقیق دیگری که توسط دانشکومار و همکاران (۲۰۱۶)، به منظور بررسی میزان رشد اسپیرولینا در محیط‌های کشت مختلف صورت گرفت، نتایج حاکی از این بود که آب دریای غنی شده با مقادیر مختلف NaHCO_3 و NaNO_3 تاثیر معنی داری بر رشد اسپیرولینا ندارد^{۵۹}. با این حال، به دلیل اهمیت موضوع، نتایج تحقیق حاضر می‌تواند برای کشت تجاری اسپیرولینا با استفاده از محیط طبیعی و در شرایط متفاوتی مورد توجه قرار گیرد. به عنوان مثال استفاده از اوره به عنوان منبع نیتروژن می‌تواند بر میزان رشد و کیفیت کلروفیل در اسپیرولینا موثر باشد. در تحقیقی که توسط اودین و همکاران (۲۰۲۰)، در کشور بنگلادش صورت گرفت، از تیمارهای زاروک حاوی مقادیر مختلف اوره استفاده شد که نتایج حاصل نشان دهنده، افزایش میزان نرخ رشد و کیفیت بالاتر کلروفیل، به صورت معنی دار بود^{۶۰}. این یافته‌ها ممکن است موجب تولید نسخه موثری برای رشد اسپیرولینا، با کیفیت

بالتر و اقتصادی‌تر شود. استفاده از نیتروژن آلی بجای نیتروژن معدنی به منظور پرورش اسپیرولینا، مسئله مهم دیگری است که می‌تواند موجب کاهش هزینه‌ها و کاهش مشکلات زیست محیطی شود و استفاده ماده مغذی ارگانیک در غنی‌سازی آب دریا، می‌تواند یک راه حل پایدار و سازگار با محیط زیست در کشت اسپیرولینا باشد. پژوهشی توسط شانتی و همکاران (۲۰۲۱)، مبنی بر استفاده از بقایا و ضایعات ماهی و هیدرولیز پروتئین ماهی به عنوان منبع نیتروژن آلی برای کشت اسپیرولینا به جای نیتروژن معدنی صورت گرفت و نتایج حاکی از این بود که استفاده از ضایعات ماهی به عنوان نیتروژن آلی بالقوه برای کشت اسپیرولینا با تولید رنگدانه با کیفیت‌تر، موثر است.^{۶۱}

کشت ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در آب خلیج فارس با توجه به شرایطی که مشابه آزمایشاتی که توسط سایر محققین صورت گرفته است، طراحی گردید و نتایج حاصله در این آزمایش تقریباً مشابه با سایر آزمایش‌های صورت گرفته، بود. کشت ریزجلبک اسپیرولینا در آب دریا، در این آزمایش با توجه به مساوی بودن و رعایت همه شرایط و دستورالعمل‌های لازم از رشد کافی برخوردار نبود. در حالی که شرایط رشدی برای محیط‌های دارای ۱۴/mg اوره و سپس محیط‌های غنی شده با ۱۰٪ و ۵٪ از محیط کشت زاروک به ترتیب دارای رشد بهتری، نسبت به آب دریا بدون غنی‌سازی بوده است؛ اما بدلیل کم بودن این اختلاف، در مورد آب خلیج فارس در این آزمایش

قابل چشم‌پوشی است. همچنین لازم به ذکر است که بر اساس نمودارها و منحنی‌های رسم شده و همچنین بررسی نتایج سایر محققین می‌توان مشاهده نمود که محیط کشت زاروک نسبت به آب دریا بدون غنی‌سازی و غنی شده با سایر مواد از رشد چشم‌گیرتری برخوردار است.

با این حال، بررسی رشد ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس در این پژوهش، فقط در آب خلیج فارس انجام شد. میزان رشد ریزجلبک بسته به نوع ترکیبات موجود در آب جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، قطعاً متفاوت خواهد بود که می‌تواند بر رشد اسپیرولینا پلاتنسیس تأثیرگذار باشد. در پژوهش‌های آینده می‌توان از آب‌های دریاچه‌ها و حتی آب‌های شیرین رودخانه‌ها جهت کشت اسپیرولینا پلاتنسیس استفاده کرد. همچنین اعمال تغییرات متعدد در ترکیب آب دریا به عنوان محیط کشت با مواد شیمیایی، ضایعات صنعتی و محصولات جانبی ارزان‌تر به عنوان جایگزینی بالقوه برای کشت ریزجلبک، می‌تواند مورد بررسی قرار بگیرد و به عنوان محیط کشت جایگزین در نظر گرفته شود. همچنین غنی‌سازی آب دریا با استفاده از سبوس برنج یا سایر محصولات جانبی ارزان کشاورزی و یا پساب حاصل از استخرهای پرورش ماهی به عنوان یک محیط رشد مقرون‌به‌صرفه برای تولید اسپیرولینا در مقیاس تجاری، هنوز به‌طور گسترده در کشورهای مبتنی بر کشاورزی، به‌ویژه در کشورهای آسیایی تولیدکننده برنج، مورد بررسی قرار نگرفته است که می‌تواند در تحقیقات آینده مورد مطالعه قرار گیرد.

References

- Kumar M, Tomar M, Punia S, Dhakane-Lad J, Dhumal S, Changan S, et al. Plant-based proteins and their multifaceted industrial applications. *LWT*. 2022;154:112620.
- Tomaselli, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell Biology and Biotechnology; Vonshak, A., Ed.; Taylor and Francis: London, UK, 1997; pp. 1–15.
- Seyidoglu N, Inan S, Aydin C. A prominent superfood: *Spirulina platensis*. Superfood and functional food the development of superfoods and their roles as medicine. 2017 Feb 22;22:1-27.
- Panjaitan T, Quigley SP, McLennan SR, Swain AJ, Poppi DP. *Spirulina* (*Spirulina platensis*) algae supplementation increases microbial protein production and feed intake and decreases retention time of digesta in the rumen of cattle. *Animal Production Science*. 2014 Feb 14;55(4):535-43.
- Jung F, Krüger-Genge A, Waldeck P, Küpper JH. *Spirulina platensis*, a super food?. *Journal of Cellular Biotechnology*. 2019 Jan 1;5(1):43-54.
- Saranraj P, Sivasakthi S. *Spirulina platensis*—food for future: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2014;4(1):26-33.
- Boussiba S, Richmond AE. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*. 1980 Mar;125:143-7.
- Ragusa I, Nardone GN, Zanatta S, Bertin W, Amadio E. *Spirulina* for skin care: A bright blue future. *Cosmetics*. 2021 Jan 14;8(1):7.
- Lee JC, Hou MF, Huang HW, Chang FR, Yeh CC, Tang JY, Chang HW. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer cell international*. 2013 Dec;13:1-7.
- Somchit MN, Mohamed NA, Ahmad Z, Zakaria ZA, Shamsuddin L, Fauzee MS, Kadir AA. Anti-inflammatory and anti-pyretic properties of *Spirulina platensis* and *Spirulina lonar*: a comparative study. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2014 Sep 1;27(5):1277-81.
- Koníčková R, Vanková K, Vaníková J, Vánová K, Muchová L, Subhanová I, Zadinová M, Zelenka J, Dvůrák A, Kolár M, Strnad H. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Annals of Hepatology*. 2014 Apr 21;13(2):273-83.
- Kaushik P, Chauhan A. In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Microbiology*. 2008 Sep;48:348-52.
- Kumar V, Bhatnagar AK, Srivastava JN. Antibacterial activity of crude extracts of *Spirulina platensis* and its structural elucidation of bioactive compound. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011 Dec 30;5(32):7043-8.
- El-Baz FK, El-Senousy WM, El-Sayed AB, Kamel MM. In vitro antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extract. *J. Appl. Pharm. Sci*. 2013 Dec;3(12):52-6.
- Haglund WD, Sorg MH. Human remains in water environments. *Advances in forensic taphonomy: method, theory, and archaeological perspectives*. 2002:201-18.
- Shannon MA, Bohn PW, Elimelech M, Georgiadis JG, Marinas BJ, Mayes AM. Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*. 2008 Mar 20;452(7185):301-10.
- Lécuyer T, Teston E, Ramirez-Garcia G, Maldiney T, Viana B, Seguin J, Mignet N, Scherman D, Richard C. Chemically engineered persistent luminescence nanoprobe for bioimaging. *Theranostics*. 2016;6(13):2488.
- Wu B, Tseng CK, Xiang W. Large-scale cultivation of *Spirulina* in seawater based culture medium.
- Dineshkumar R, Narendran R, Sampathkumar P. Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media.
- Parada JL, de Caire GZ, de Mulé MC, de Cano MM. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *International journal of food microbiology*. 1998 Dec 22;45(3):225-8.
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2019). Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy Reports*, 5, 327-336.
- De Moraes MG, Costa JA. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology letters*. 2007 Sep;29:1349-52.
- Andrade MR, Costa JA. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*. 2007 Apr 6;264(1-4):130-4.
- Vonshak A, Cheung SM, Chen F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *Journal of Phycology*. 2000 Aug 26;36(4):675-9.
- El-Monem A, Ahmed M, Gharieb MM, Doman KM. Chemical constituents of zarrouk's medium affect growth, pigments and metabolites productions of *Spirulina platensis*. *Egyptian Journal of Botany*. 2021 Dec 1;61(3):681-91.
- Amadeu SO, Sarmiento-Machado LM, Bartolomeu AR, Chaves MA, Romualdo GR, de Moura NA, Barbisan LF. *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* feeding reduces the early stage of chemically induced rat colon carcinogenesis. *British Journal of Nutrition*. 2023 Feb;129(3):395-405.

27. Herrero, M., Martín-Álvarez, P. J., Senorans, F. J., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2005). Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry*, 93(3), 417-423.
28. Kim W, Park JM, Gim GH, Jeong SH, Kang CM, Kim DJ, Kim SW. Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2012 Jan;35:19-27.
29. Ogbonda KH, Aminigo RE, Abu GO. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource technology*. 2007 Aug 1;98(11):2207-11.
30. Radmann EM, Reinehr CO, Costa JA. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*. 2007 May 1;265(1-4):118-26.
31. Daneshvar N, Khataee AR, Rasoulifard MH, Pourhassan M. Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: Optimization of effective parameters using Taguchi method. *Journal of Hazardous Materials*. 2007 May 8;143(1-2):214-9.
32. Oliveira MD, Monteiro MP, Robbs PG, Leite SG. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture international*. 1999 Jul;7:261-75.
33. Arahou F, Hassikou R, Arahou M, Rhazi L, Wahby I. Influence of culture conditions on *Arthrospira platensis* growth and valorization of biomass as input for sustainable agriculture. *Aquaculture International*. 2021 Oct;29(5):2009-20.
34. Soni RA, Sudhakar K, Rana RS. Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy Reports*. 2019 Nov 1;5:327-36.
35. Çelekli A, Alslibi ZA, Üseyin Bozkurt H. Influence of incorporated *Spirulina platensis* on the growth of microflora and physicochemical properties of ayran as a functional food. *Algal Research*. 2019 Dec 1;44:101710.
36. Almomani F, Bhosale RR. Bio-sorption of toxic metals from industrial wastewater by algae strains *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*: Application of isotherm, kinetic models and process optimization. *Science of the Total Environment*. 2021 Feb 10;755:142654.
37. Chojnacka K, Chojnacki A, Gorecka H. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere*. 2005 Mar 1;59(1):75-84.
38. Lee HY, Erickson LE, Yang SS. Kinetics and bioenergetics of lightlimited photoautotrophic growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnology and bioengineering*. 1987 May;29(7):832-43.
39. Xiong J, Yu L, Zhang Z, Wang Y, Wang W, Yang H, Yan R, Zhu D. Intrinsic kinetic model of photoautotrophic microalgae based on chlorophyll fluorescence analysis. *Mathematical Biosciences*. 2019 Sep 1;315:108234.
40. Nosratimovafagh A, Fereidouni AE, Krujatz F. Modeling and Optimizing the Effect of Light Color, Sodium Chloride and Glucose Concentration on Biomass Production and the Quality of *Arthrospira platensis* Using Response Surface Methodology (RSM). *Life*. 2022 Mar 3;12(3):371.
41. Blanco-Vieites M, Suárez-Montes D, Delgado F, Álvarez-Gil M, Battez AH, Rodríguez E. Removal of heavy metals and hydrocarbons by microalgae from wastewater in the steel industry. *Algal Research*. 2022 May 1;64:102700.
42. Ragaza, J.A., Hossain, M.S., Meiler, K.A., Velasquez, S.F. and Kumar, V., 2020. A review on *Spirulina*: alternative media for cultivation and nutritive value as an aquafeed. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), pp.2371-2395.
43. Sallam ER, Khairy HM, Elnouby MS, Fetouh HA. Sustainable electricity production from seawater using *Spirulina platensis* microbial fuel cell catalyzed by silver nanoparticles-activated carbon composite prepared by a new modified photolysis method. *Biomass and Bioenergy*. 2021 May 1;148:106038.
44. Cheng Z, Kong W, Cheng Z, Qi H, Yang S, Zhang A, Niu S. A bibliometric-based analysis of the high-value application of *Chlorella*. *3 Biotech*. 2020 Mar;10:1-4.
45. Henrikson R. How this micro algae can transform your health and our planet.
46. Materassi R, Tredici M, Balloni W. *Spirulina* culture in sea-water. *Applied microbiology and biotechnology*. 1984 Jun;19:384-6.
47. Budi RM, Rahardja BS, Masithah ED. Potential concentration of heavy metal copper (cu) and microalgae growth *Spirulina plantesis* in culture media. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 2020 Feb 1 (Vol. 441, No. 1, p. 012147). IOP Publishing.
48. Ayala F. Guide *Spirulina* cultivation. *Microorganisms in Biotechnology at photoautotrophs*. 1998:3-20.
49. Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological reviews*. 1983 Dec;47(4):551-78.
50. Ikeda IK, Sydney EB, Sydney AC. Potential application of *Spirulina* in dermatology. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2022 Oct;21(10):4205-14.
51. Kaamouch M, El-Agawany N, Salhin HE, El-Zeiny A. Monitoring effect of nickel, copper, and zinc on growth and photosynthetic pigments of *Spirulina platensis* with suitability investigation in Idku Lake. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022 Nov;29(52):78942-59.
52. Markou G, Georgakakis D, Plagou K, Salakou G, Christopoulou N. Balanced waste management of 2-and 3-phase olive oil mills in relation to the seed oil extraction plant. *Terr. Aquat. Environ. Toxicol*. 2010;4(1):109-12.

53. Wu B, Tseng C, Xiang W. Large-scale Cultivation of Spirulina in Seawater Based Culture Medium. 1993;36(2): 99-102.
54. Thevarajah B, Nishshanka GK, Premaratne M, Nimarshana PH, Nagarajan D, Chang JS, Ariyadasa TU. Large-scale production of Spirulina-based proteins and c-phycocyanin: A biorefinery approach. Biochemical Engineering Journal. 2022 Jul 13;108541.
55. Leema JM, Kirubakaran R, Vinithkumar NV, Dheenan PS, Karthikayulu S. High value pigment production from Arthrospira (Spirulina) platensis cultured in seawater. Bioresource technology. 2010 Dec 1;101(23):9221-7.
56. Jiang L, Yu S, Pei H. Seawater-cultured Spirulina subsalsa as a more promising host for phycocyanin production than Arthrospira platensis. Algal Research. 2021 Dec 1;60:102545.
57. Hosseinzade K, Ganjian Khenari A, Jafari SM. Effects of water enrichment on microalgae Spirulina platensis growth parameters in the southern Caspian Sea. Aquatic Animals Nutrition. 2015 Sep 23;1(2):1-1. Persian In
58. Kardovani P. Aquatic ecosystems of Iran, Caspian Sea (Caspian Sea). Tehran: Qos Publishing. 1995 : 312-315. In Persian
59. Dineshkumar R, Narendran R, Sampathkumar P. Cultivation of Spirulina platensis in different selective media.
60. Uddin, A.F.M.J., Ifaz, M.I., Husna, M.A., Sakib, I. and Rakibuzzaman, M., 2020. Comparative growth analysis of Spirulina platensis using urea as a nitrogen substitute for NaNO₃. Int. J. Bus. Soc. Sci. Res, 8(2), pp.76-80.
61. Shanthi G, Premalatha M, Anantharaman N. Potential utilization of fish waste for the sustainable production of microalgae rich in renewable protein and phycocyanin-Arthrospira platensis/Spirulina. Journal of Cleaner Production. 2021 Apr 20;294:126106.

Optimizing the growth of *Spirulina platensis* in the enriched water of the Persian Gulf

Elaheh Taghian¹, Dariush Nabati Ahmadi², Mohammad Roayai Ardakani³, Hamid Memari Rajabi⁴

¹ Ph.D. student of genetics and plant breeding, University of Tehran, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj, Iran

² Associate Professor, Department of Plant Breeding, Shahid Chamran University, Faculty of Agriculture, Ahvaz, Iran

³ Professor of Biology Department, Shahid Chamran University, Faculty of Science, Ahvaz, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Shahid Chamran University, Faculty of Agriculture, Ahvaz, Iran

Email: elahetaghian8@yahoo.com

Received: 1 May 2023 ; Accepted: 26 June 2023

ABSTRACT

Background: The use of *Spirulina platensis* has been expanded in various fields. The main goal of this research is to optimize the growth conditions of this microalgae to reduce costs and increase the benefits of its mass production in seawater. It is also feasible to lessen environmental pollution by producing more spirulina by discovering the best growing conditions for it through the enrichment of Persian Gulf water.

Methods: First, the growth conditions of *Spirulina platensis* were optimized based on three factors: temperature, light, and pH. The temperature factor included four treatments, the light factor included four treatments, and the PH factor included five treatments. Also, *Spirulina platensis* microalgae were cultured in optimal growth conditions in Persian Gulf water, seawater enriched with 5% Zarrouk, 10% Zarrouk, with urea, and pure Zarrouk culture medium.

Findings: The best temperature range for the growth of *Spirulina platensis* was 27–32 degrees Celsius. Also, the best growth was achieved in 16 hours of light and 8 hours of darkness; for the PH factor, the most appropriate value was determined between 10.72 and 11.47. Also, in the cultivation of *Spirulina platensis*, optimal conditions for the growth of *Spirulina* microalgae were obtained in the medium of Zarrouk, urea, 10% Zarrouk, 5% Zarrouk, and seawater, respectively.

Conclusion: Therefore, the growth of *Spirulina platensis* in Persian Gulf water is slow and shows little performance, and by enriching this water with the mentioned factors, the microalgae enter the logarithmic phase faster and show better performance.

Keywords: *Spirulina platensis*, Seawater, Culture media, environment, biodegradation