CC BY

مقاله علمی – پژوهشی:

مطالعه عملکرد رشد، پروتئین و رنگدانه‌های ریزجلبک اسپیرولینا (*Arthrospira* sp.) با استفاده از محیط کشت‌های ارزان قیمت

آلتون مرادی[۱]، نصراله احمدی‌فرد[۱*]، یعقوب حبیب‌زاده[۲]

*n.ahmadifard@urmia.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی ، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱٤۰۱ تاریخ پذیرش: شهریور ۱٤۰۲

چکیده

مهم‌ترین محدودیت تولید انبوه ریزجلبک اسپیرولینا در جهان قیمت بالای محیط کشت آن است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی محیط‌های کشت مبتنی بر مواد شیمیایی و کودهای تجاری و مقایسه ویژگی‌های رشد، ترکیبات رنگدانه‌ها و میزان پروتئین جلبک اسپیرولینا تولید شده در مقایسه با محیط کشت زاروک انجام گرفت. برای تامین نیازهای غذایی گونه جلبک اسپیرولینا از کودهای شیمیایی ارزان‌قیمت در قالب ۱۸ تیمار و سه تکرار استفاده گردید. در تمام تیمارها از جوش شیرین تجاری به مقدار ۱۶/۸ گرم در لیتر، نمک دریا به مقدار ۰/۵ گرم بر لیتر و کود مایع تجاری (پتاسیم: فسفر، ۲۰:۲۰) برای تامین نیاز فسفر و پتاسیم جلبک استفاده گردید. برای تامین نیتروژن در تیمارها از سه منبع نیترات سدیم، اوره و ترکیب ۵۰:۵۰ از هر دو استفاده شد. در هر سه گروه از ۶ ماده در قالب ۶ تیمار (شاهد، پتاسیم، آهن، ترکیبی از پتاسیم و آهن، منیزیم و ریز مغذی‌ها) استفاده گردید. براساس نتایج، میزان رشد جلبک اسپیرولینا تا روز بیستم در گروه شاهد (محیط کشت زاروک) بیشتر از بقیه تیمارها بود اما بعد از روز بیستم تیمار حاوی نیترات سدیم- منیزیم (N-Mg) نرخ رشد بالاتری را نسبت به گروه شاهد نشان داد. همچنین بالاترین نرخ رشد ویژه و تراکم جلبکی و کمترین زمان دو برابر شدن در تیمار حاوی منبع نیترات سدیم اندازه‌گیری گردید. بالاترین تراکم جلبکی و نرخ رشد ویژه به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در تیمارهای نیترات سدیم- منیزیم (N-Mg) و نیترات سدیم-ریزمغذی‌ها (N-Mic) مشاهده گردید که تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد (محیط کشت زاروک) نداشتند. در تیمار نیترات سدیم-ریزمغذی‌ها (N-Mic) به‌طور معنی‌داری حداکثر کلروفیل a، کلروفیل b و رنگدانه کل به‌دست آمد ($p<۰/۰۵$). بیشترین میزان پروتئین در گروه ترکیبی نیترات سدیم - اوره با منبع آهن و پتاسیم به‌دست آمد. در جمع‌بندی، بالاترین میزان رشد و بیشترین تراکم سلولی در محیط کشت حاوی نیترات سدیم به‌دست آمد که قابل مقایسه با تیمار حاوی محیط کشت زاروک بود که می‌توان در مقیاس تجاری از آن استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *Arthrospira*، اوره، جلبک، کلروفیل، نیترات سدیم

*نویسنده مسئول

مقدمه

اسپیرولینا یک سیانوباکتر فتوسنتزکننده است که در بسیاری از کشورهای گرمسیری، نیمه گرمسیری و مناطق معتدله به منظور تغذیه انسان و حیوانات به‌صورت تجاری کشت شده است (Kim *et al*., 2007). این محصول تجاری به دلیل مواد مغذی باارزش، به عنوان منبعی غنی از پروتئین و ویتامین‌هاست که در صنعت داروسازی، مواد غذایی و شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Volkmann *et al*., 2008). تولید انبوه و اقتصادی این جلبک با هدف تولید مکمل‌های غذایی انسانی و حیوانی و مصارف دارویی و آرایشی نیز مورد توجه قرار گرفته است. در زمینه آبزی‌پروری از جلبک اسپیرولینا به عنوان مکمل‌های غذایی جهت بهبود رشد، افزایش کارایی غذایی و بهبود ایمنی ماهی استفاده می‌شود (FAO, 2006; Choonawala, 2007). مهم‌ترین محدودیت تولید انبوه جلبک اسپیرولینا در جهان قیمت بالای محیط کشت است که بیشتر مربوط به استفاده از محیط کشت زاروک است (Gershwin and Belay, 2007; Habib *et al*., 2008; Madkour *et al*., 2012; Tarko *et al*., 2012). محیط کشت زاروک برای سال‌ها به عنوان محیط کشت استاندارد برای پرورش اسپیرولینا مورداستفاده قرار گرفته است (Nor *et al*., 2015). اگرچه محققین مختلف تلاش‌های زیادی برای تولید محیط کشت‌های مناسب و ارزان جهت تولید انبوه جلبک اسپیرولینا انجام داده‌اند که زیست‌توده جلبک اسپیرولینا را باکیفیت قابل‌مقایسه با محیط زاروک تولید می‌کنند (Raoof *et al*., 2006; Chen, 2011; Gami *et al*., 2011; Madkour *et al*., 2012; Kumari *et al*., 2015).

در کشت گسترده ریزجلبک‌ها، مواد غذایی یکی از عوامل کلیدی است که رشد و بهره‌وری آنها را کنترل می‌کند. اگرچه نمک‌های نیترات سدیم و نیترات پتاسیم به عنوان منابع اصلی نیتروژن محیط کشت‌های اسپیرولینا استفاده شده، اما مطالعات نشان داده که امکان استفاده از منابع نیتروژن جایگزین در شرایط کم‌هزینه وجود دارد و بیومس همچنان تولید بالایی داشته است (Danesi *et al*., 2002; Costa *et al*., 2003; Matsudo *et al*., 2009). برای بهبود تولید اسپیرولینا، چندین مطالعه نیز با استفاده از منابع نیتروژن مخلوط شامل نمک‌های اوره و آمونیوم انجام‌شده است (Danesi *et al*., 2002; Soletto *et al*., 2005). در یک مطالعه Madkour و همکاران (۲۰۱۲) برای کاهش هزینه محیط کشت جلبک اسپیرولینا از نیترات آمونیوم و اوره استفاده نمودند. این محققین گزارش کردند که نیترات آمونیوم می‌تواند یک جایگزین مناسب و ارزان برای تولید انبوه جلبک اسپیرولینا باشد درحالی‌که مقادیر بالای اوره باعث کاهش رشد این جلبک شد. در مطالعه Mulokozi و همکاران (۲۰۱۹) کود NPK15-15-15 و اوره با محیط کشت زاروک جایگزین گردید و میانگین بیومس تولیدی و عملکرد رشد روزانه در تیمار حاوی کود اوره مشابه با محیط کشت استاندارد بود درحالی‌که این محیط کشت از نظر اقتصادی بسیار باصرفه‌تر از محیط کشت زاروک است. در مطالعه Danesi و همکاران (۲۰۱۱) نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه منابع نیتروژنه شامل نیترات آمونیوم و اوره با نیترات سدیم در محیط کشت زاروک نیز نشان از برتری کودهای نیترات آمونیوم و اوره نسبت به محیط کشت زاروک ازنظر اقتصادی داشت. کود اوره در مقایسه با کودهای نیترژنه گران هر مولکول از آن دو اتم نیتروژن تولید می‌کند درحالی‌که هر مولکول نیترات حاوی یک اتم نیتروژن است (Sigurdarson *et al*., 2018). اگرچه به علت سمیت آمونیاک استفاده بیش از حد آن منجر به رشد ضعیف جلبک خواهد شد (Dai *et al*., 2014). بنابراین، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی رشد اسپیرولینا در محیط مبتنی بر مواد شیمیایی و کودهای تجاری و مقایسه ویژگی‌های رشد و ترکیب پروتئین جلبک تولیدشده در مقایسه با محیط کشت زاروک است که بدین طریق یک محیط ارزان‌قیمت برای کاهش هزینه تولید اسپیرولینا پیشنهاد گردد.

مواد و روش کار

تهیه محیط کشت اسپیرولینا

استوک اولیه و خالص ریزجلبک اسپیرولینا (*Arthrospira* sp.) از شرکت دانش‌بنیان زیست‌فناوری آبزیان (آذربایجان غربی، ایران) تهیه و با استفاده از محیط کشت زاروک در آزمایشگاه در شرایط استاندارد (دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و

شرایط نوری ۲۵۰۰ لوکس و دوره نوری ۲۴ ساعت روشنایی) کشت گردید (Choonawala, 2007).

تیمارهای آزمایش

برای تأمین نیازهای غذایی گونه جلبک اسپیرولینا از کودهای شیمیایی ارزان‌قیمت در قالب ۱۸ تیمار استفاده گردید (جدول ۱). طبق پروتکل‌های استاندارد، جلبک اسپیرولینا در شرایط قلیایی رشد می‌کند. لذا، در تمام تیمارها از جوش‌شیرین تجاری (۱۶/۸ گرم در لیتر)، نمک دریا (۰/۵ گرم بر لیتر) و کود مایع تجاری (پتاسیم: فسفر، ۲۰:۲۰) برای تأمین نیاز فسفر و پتاسیم جلبک استفاده گردید. برای تأمین منبع نیتروژنی جلبک تیمارهای مورد استفاده شامل سه گروه ۶ تایی بودند که در گروه اول از نیترات سدیم تجاری، در گروه دوم از اوره و در گروه سوم ترکیبی از اوره و نیترات سدیم با نسبت وزنی یکسان از نیتروژن استفاده شد. با توجه به جدول ۱، در هر گروه از موادی مختلف (شاهد، پتاسیم، آهن، ترکیبی از پتاسیم و آهن، منیزیم و ریز مغذی ها) برای بررسی نقش آنها در تسریع رشد سلول‌های جلبک اسپیرولینا استفاده گردید (Kumari *et al*., 2015).

جدول ۱: مشخصات تیمارهای آزمایش

Table 1: Characteristics of experimental treatments

Treatments								Groups
$MgSO_4$ (gram)	Micronotrient (mL)	$FeSO_4$ (gram)	K_2HPO_4 (gram)	CLF (20:20, K:P) (mL)	Urea (gram)	$NaNO_3$ (gram)	Treatments	
-	-	-	-	-	-	-	Control	Zarrouk
-	-	-	-	200	-	2.5	N-0	$NaNO_3$
-	-	-	1	200	-	2.5	N-K_2	
-	-	0.1	-	200	-	2.5	N-Fe	
-	-	0.05	0.5	200	-	2.5	N-K_2Fe	
-	1	-	-	200	-	2.5	N-Mic	
1	-	-	-	200	-	2.5	N-Mg	
-	-	-	-	200	0.88	-	U-0	Urea
-	-	-	1	200	0.88	-	U-K_2	
-	-	0.1	-	200	0.88	-	U-Fe	
-	-	0.05	0.5	200	0.88	-	U-K_2Fe	
-	1	-	-	200	0.88	-	U-Mic	
1	-	-	-	200	0.88	-	U-Mg	
-	-	-	-	200	0.44	1.25	NU-0	$NaNO_3$ +Urea (50:50)
-	-		1	200	0.44	1.25	NU-K_2	
-	-	0.1	-	200	0.44	1.25	NU-Fe	
-	-	0.05	0.5	200	0.44	1.25	NU-K_2Fe	
-	1	-	-	200	0.44	1.25	NU-Mic	
1	-	-	-	200	0.44	1.25	NU-Mg	

Abbreviations: N: sodium nitrate, U: urea, NU: combination of sodium nitrate and urea with a ratio of 50:50, K2: K_2HPO_4, Fe: $FeSO_4$, K_2Fe: combination of 50 50: of K_2HPO_4 and $FeSO_4$, Mic: micronutrients, Mg: $MgSO_4$, CLF: Commercial liquid fertilizer

بررسی میزان رشد جلبک اسپیرولینا

جلبک اسپیرولینا با تیمارهای آزمایش مذکور در ظروف ۲ لیتری با ۳ تکرار کشت گردیدند. شرایط استاندارد شامل دما و pH به طور روزانه با pH متر دیجیتالی کنترل و تنظیم گردید. به علت رشته‌ای بودن جلبک اسپیرولینا و عدم امکان شمارش جلبک، طی مدت کشت (۳۰ روز) تراکم سلولی هر

دو روز یک‌بار به‌وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر با طول‌موج ۶۸۰ نانومتر سنجش و سپس با استفاده از فرمول ذیل تعداد سلول برآورد گردید (Nogueira *et al*., 2018):

$$CD\ (trichomes/mL) = [(OD + 0.127)/0.179].10$$

بررسی میزان کلروفیل و کارتنویید ریزجلبک اسپیرولینا

برای استخراج رنگدانه جلبک از روش Lichtenthaler و Wellburn (۱۹۸۳) استفاده گردید. به طور خلاصه ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی جلبک برداشت و سانتریفوژ گردید. سپس ۵ سی‌سی حلال متانول ۹۹/۸ درصد به آنها اضافه گردید. پس از هموژن کردن با استفاده از هموژنایزر و سپری شدن مدت زمان یک‌ساعت از کاغذ صافی با شماره ۰/۴۲ عبور داده شدند. میزان جذب محلول صاف‌شده در کنار تیمار شاهد (حلال خالص) در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۲ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر قرائت گردید. محاسبه غلظت کلروفیل a و b و رنگدانه کل با استفاده از فرمول‌های ذیل صورت گرفت (Lichtenthaler and Wellburn, 1983):

$$C_a\ (\mu g/ml) = 16.72\ A_{665.2} - 9.16\ A_{652.4}$$
$$C_b\ (\mu g/ml) = 34.09\ A_{652.4} - 15.28\ A_{665.2}$$
$$C_{(x+c)}\ (\mu g/ml) = (1000\ A_{470} - 1.63\ c_a - 104.96\ c_b)/221$$

تعیین پروتئین ریزجلبک اسپیرولینا

بعد از سپری شدن ۳۰ روز از مدت زمان کشت با کمک سانتریفیوژ بزرگ سیگما با دور ۴۵۰۰ g بیومس جلبکی برداشت شد. بیومس جلبکی جمع‌آوری شده با استفاده از آون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین خام؛ ابتدا ۰/۳ گرم پودر اسپیرولینا با اسیدسولفوریک غلیظ و قرص کلدال داخل دستگاه هضم قرار گرفت و سپس داخل دستگاه تقطیر نیتروژن با اسیدکلریدریک ۰/۵ نرمال تیتر و درصد پروتئین تعیین گردید. برای اندازه‌گیری رطوبت یک گرم از پودر اسپیرولینا در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و اختلاف وزن در مدت سه ساعت محاسبه گردید (Danesi *et al*., 2010).

روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم‌افزار SPSS با نسخه ۲۱ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ استفاده گردید. بعد از انجام آزمایش، نرمال بودن داده‌های خام با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف بررسی شد. از آزمون تجزیه واریانس دوطرفه برای آنالیز داده‌های نرمال و از آزمون Tukey برای مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف استفاده گردید. حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. داده‌های به‌دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه گردیدند.

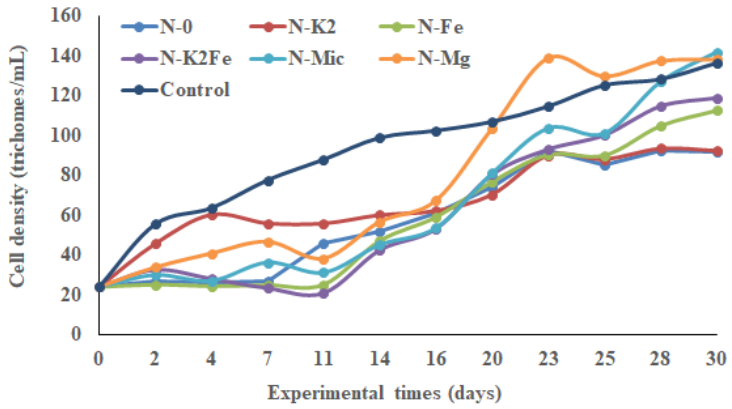
نتایج

روند رشد جلبک اسپیرولینا

نتایج رشد جلبک اسپیرولینا با استفاده از انواع محیط کشت ارزان قیمت در شکل‌های ۱ الی ۳ نشان داده شده است. در شکل ۱ میزان رشد جلبک اسپیرولینا بر پایه منبع نیترات سدیم با انواع مختلف مواد افزودنی به مدت ۳۰ روز نشان داده شده است. در تیمار شاهد (محیط کشت زاروک) رشد جلبک اسپیرولینا تا روز بیستم بیشتر از سایر تیمارها بود، اما بعد از روز بیستم تیمار جایگزین حاوی سولفات منیزیم (N-Mg) به طور معنی‌داری میزان رشد بالاتری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد ($p < ۰/۰۵$).

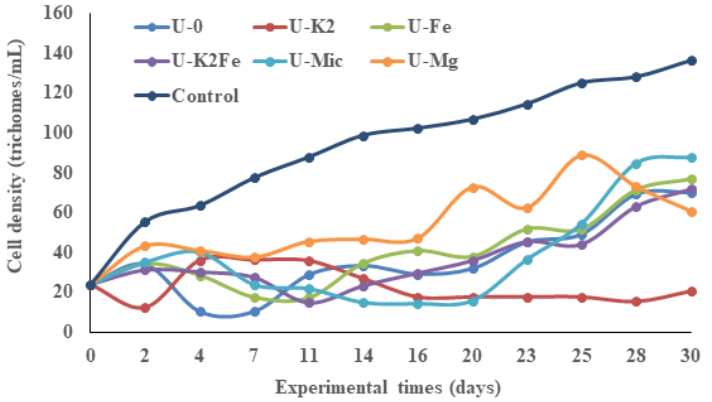
در شکل ۲ میزان رشد جلبک اسپیرولینا بر پایه نیتروژنی اوره به همراه انواع مختلف مواد افزودنی به مدت ۳۰ روز نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، جلبک اسپیرولینا به طور معنی‌داری در تیمار شاهد (محیط کشت زاروک) رشد بالاتری را نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$).

نتایج میزان رشد جلبک اسپیرولینا بر پایه ترکیب نیترات سدیم- اوره به همراه انواع مختلف مواد افزودنی به مدت ۳۰ روز در شکل ۳ نشان داده شده است. همانند تیمارهای دریافت‌کننده اوره در این تیمارها نیز تیمار شاهد بالاترین میزان رشد را نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$).



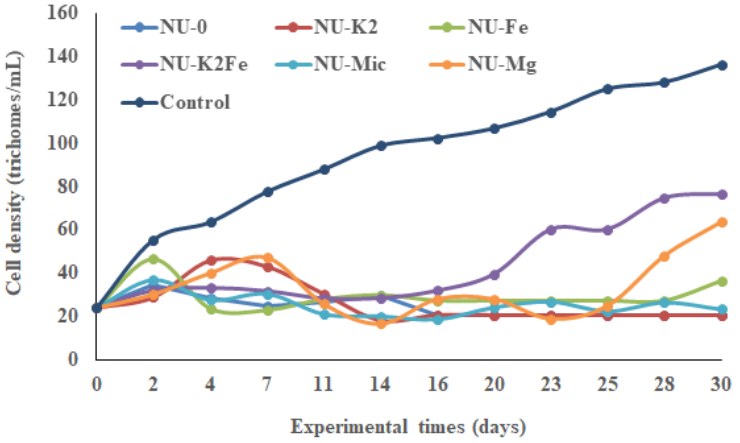
شکل ۱: میزان رشد جلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف بر پایه نیترات سدیم در روزهای مختلف آزمایش

Figure 1: Growth rate of spirulina algae in different treatments based on sodium nitrate on different days of the experiment



شکل ۲: میزان رشد جلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف بر پایه اوره در روزهای مختلف آزمایش

Figure 2: Growth rate of *spirulina* algae in different treatments based on urea on different days of the experiment



شکل ۳: میزان رشد جلبک اسپیرولینا در تیمارهای مختلف بر پایه ترکیب نیترات سدیم و اوره (۵۰:۵۰) در روزهای مختلف آزمایش

Chart 3: Growth rate of *spirulina* algae in different treatments based on the combination of sodium nitrate and urea (50:50) on different days of the experiment

پارامترهای رشد

در جدول ۲ میانگین فاکتورهای رشد شامل حداکثر تراکم جلبکی، حداکثر نرخ رشد ویژه و زمان دو برابر شدن آمده است. براساس نتایج داده‌ها به طور معنی‌داری حداکثر نرخ رشد ویژه و تراکم جلبکی و کمترین زمان دو برابر شدن در تیمار حاوی منبع ازت نیترات سدیم به‌دست آمد ($p<۰/۰۵$). بالاترین تراکم جلبکی و نرخ رشد ویژه به طور معنی‌داری در تیمارهای نیترات سدیم - منیزیم (N-Mg)، نیترات سدیم – ریزمغذی ها (N-Mic) و تیمار شاهد به ثبت رسید ($p<۰/۰۵$). همچنین کمترین مدت زمان دو برابر شدن در تیمار حاوی منیزیم به‌دست آمد.

جدول ۲: نتایج میانگین فاکتورهای رشد جلبک اسپیرولینا در مدت‌زمان ۳۰ روز در محیط‌های کشت ارزان‌قیمت (میانگین ± اشتباه معیار)

Table 2: Results of the growth parameters of *spirulina* algae in a period of 30 days in low-cost culture media (mean±standard error)

Duppling times (days)	SGR (days)	Maximum cell density (cell.mL)	Treatments	Groups
10.17±0.263 f	0.068±0.001 a	136.4±1.32a	Control	Zarrouk
11.81±0.123 ef	0.059±0.001 b	91.8±1.33 e	N-0	$NaNO_3$
12.03±0.180 ef	0.058± 0.001 bc	92.3±0.86 d	N-K2	
13.42±0.093 def	0.052±0.001 d	112.5 ±1.21 c	N-Fe	
12.96±0.053 def	0.053± 0.001 cd	118.8±0.78 b	N-K2Fe	
11.67±0.058 ef	0.059±0.001 b	141.8±1.27 a	N-Mic	
9.11±0.353 f	0.076±0.003 a	138.1±2.21 a	N-Mg	
19.36±0.222 cd	0.036±0.001 fg	70.2±0.89 g	U-0	Urea
18.87±0.881 cd	0.037±0.002 fg	20.5±0.88 j	U-K2	
17.84±0.398 cde	0.039±0.001 ef	76.8±2.01 f	U-Fe	
18.93±0.194 cd	0.037±0.001 fg	71.7±0.79 g	U-K2Fe	
16.06±0.380 cde	0.043±0.001e	87.8±2.82 e	U-Mic	
13.21±0.076 def	0.053±0.003 d	60.8±0.56 h	U-Mg	
47.22±3.776 a	0.015±0.001 i	20.7±0.35 j	NU-0	$NaNO_3$+Urea (50:50)
32.22±0.286 b	0.022±0.002 h	20.6±2.50 j	NU-K2	
46.66±7.158 a	0.016±0.003 i	36.4± 0.24 i	NU-Fe	
17.88±0.369 cde	0.039±0.001 ef	76.5±1.79 f	NU-K2Fe	
21.14±2.822 c	0.034±0.004 g	23.2±0.10 j	NU-Mic	
21.27±0.407 c	0.033±0.001 g	63.6±1.18 h	NU-Mg	

Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different treatments (*p<0.05*).

مقدار رنگدانه‌ها و پروتئین جلبک اسپیرولینا

در جدول ۳ میانگین داده‌های کلروفیل a، کلروفیل b، کل رنگدانه‌ها و پروتئین جلبک اسپیرولینا ارائه شده است. نتایج بررسی داده‌ها نشان داد که در تیمار نیترات سدیم- ریز مغذی‌ها (N-MIC) به طور معنی‌داری حداکثر کلروفیل a، کلروفیل b و رنگدانه کل به‌دست آمد ($p<۰/۰۵$). از سوی دیگر، در همین تیمار مقدار پروتئین به‌دست‌آمده نسبت به سایر تیمارها به طور معنی‌داری کمتر بود ($p<۰/۰۵$). بیشترین میزان پروتئین در تیمار نیترات سدیم–اروه به همراه مواد معدنی آهن و فسفات پتاسیم (NU-K2Fe) به‌دست آمد.

جدول ۳: نتایج میانگین داده‌های کلروفیل a، کلروفیل b، کل رنگدانه ها و پروتئین جلبک اسپیرولینا در مدت زمان ۳۰ روز در محیط‌های کشت ارزان‌قیمت (میانگین ± اشتباه معیار)

Table 3: Results of chlorophyll a, chlorophyll b, total pigments and protein of spirulina algae during 30 days in low cost culture media (mean±standard error)

Total caretonoids (mg/L)	Chlotophyll b (mg/L)	Chlotophyll a (mg/L)	Protein (%)	Treatments	Groups
5.61±0.3 ef	6.86±0.04 b	15.1 ± 0.14 f	34.5±0.29 f	N-0	$NaNO_3$
7.60±0.03 e	4.63±0.14 c	17.3 ± 0.11 e	40.0±0.29 d	N-K2	
9.53±0.01 c	5.28±0.09 bc	26.1 ± 0.05 b	45.8±0.44 c	N-Fe	
9.72±0.01 c	4.06±0.10 cd	25.5 ± 0.06 b	45.0±0.57 c	N-K2Fe	
11.00±0.02 a	13.50±0.11 a	31.8 ± 0.05 a	33.00.58 f	N-Mic	
10.82±0.24 b	3.32±0.24 d	19.6 ± 0.4 d	40.0±0.57 d	N-Mg	
13.70±0.01 a	4.03±0.13 cd	25.7 ± 0.08 b	37±0.58 e	U-0	Urea
8.24±0.09 e	2.70±0.16 de	15.0 ± 0.18 f	40.0±0.58 d	U-K2	
8.50±0.06 d	4.65±0.09 c	14.5 ± 0.07 f	47.7±0.88 b	U-Fe	
10.38±0.01 c	2.32±0.10 de	16.3 ± 0.07 e	37.8±0.17 e	U-K2Fe	
6.43±0.11 f	1.42±0.39 e	15.5 ± 0.10 f	34.0±0.58 f	U-Mic	
-	-	-	-	U-Mg*	
-	-	-	-	NU-0*	$NaNO_3$+Urea (50:50)
9.97±0.01 d	2.64±0.9 de	18.9 ± 0.04 d	45.1±0.47 c	NU-K2	
11.12±0.01 b	3.59±0.9 d	23.7 ± 0.07 c	49±0.58 b	NU-Fe	
9.30±0.01 c	4.71±0.06 c	25.1 ± 0.09 bc	51.2±0.73 a	NU-K2Fe	
-	-	-	-	NU-Mic*	
9.82±0.01 c	4.46±0.08 cd	26.5 ± 0.06 b	46±0.58 c	NU-Mg	

Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different treatments ($p<0.05$).

* In these treatments, there was no mass of algae on the last day to measure pigments and protein.

بحث

ریزجلبک‌ها قادرند با شرایط مختلف محیطی (فیزیکی و شیمیایی) سازگار شوند. بنابراین، امکان یافتن شرایط محیطی مناسب از لحاظ رشد و ترکیبات مغذی در گونه‌های مختلف ریزجلبکی بیشتراست (Halim *et al*., 2012). در کشت‌های انبوه ریز جلبک‌ها، مواد مغذی مورد استفاده یکی از عوامل کلیدی است که بر رشد و بهره‌وری آنها تاثیرگذار است (Vonshak and Richmond, 1988; Faintuch *et al*., 1991). در تحقیق حاضر، میزان رشد جلبک اسپیرولینا با تیمارهای مختلف بر پایه نیترات سدیم نزدیک به محیط کشت شاهد زاروک بود. همچنین تیمار نیترات سدیم-سولفات منیزیم میزان رشد بالاتری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. در مطالعه Gorgij-Jaski و همکاران (۲۰۱۷) اسپیرولینا به طور موفقیت‌آمیزی در محیط کشت حاوی منابع مختلف نیتروژنی شامل اوره، نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم رشد نمود و باوجود این‌که بیشینه زی‌توده جلبکی در محیط کشت حاوی نیترات آمونیوم به‌دست آمد، ولی اختلاف معنی‌داری با اوره و نیترات پتاسیم نداشت. مشابه با تحقیق حاضر در مطالعه Arumugam و همکاران (۲۰۱۳) نیز جلبک سبز *Scenedesmus* با منابع مختلف نیتروژنی (نیترات پتاسیم، نیترات سدیم، اوره، نیترات کلسیم، نیترات آمونیوم و کلرید آمونیوم) کشت شد و نیترات سدیم منبع مطلوبی برای رشد توده زیستی *Scenedesmus* تشخیص داده شد. اگرچه آنها بیان کردند که استفاده از اوره به عنوان منبع نیتروژن منجر به تولید زیست‌توده تقریباً برابر نیترات سدیم شد که می‌تواند یک جایگزین اقتصادی مناسب در کشت‌های وسیع جلبک‌ها باشد. در مطالعه حاضر، حداکثر نرخ رشد ویژه و تراکم جلبکی و کمترین زمان دو برابر شدن در تیمار حاوی نیترات سدیم مشاهده شد. Solomon و Gilbert (۲۰۰۸) گزارش کردند که افزایش رشد جلبک در غلظت‌های پایین اوره می‌تواند به دلیل در دسترس قرار گرفتن یون‌های آمونیوم و بی‌کربنات بعد از تجزیه اوره به‌وسیله آنزیم اوره آز باشد، اما در غلظت‌های بالا خاصیت سمیت را نشان می‌دهد. در پژوهشی دیگر Soletto و

همکاران (۲۰۰۵) با در نظر گرفتن توانایی بسیاری از ریزجلبک‌ها در تجزیه اوره به آمونیوم به‌خصوص در شرایط قلیایی، جایگزینی نیترات پتاسیم با سولفات آمونیوم و اوره به عنوان منابع نیتروژنی ارزان‌قیمت را بررسی کردند. این محققین گزارش کردند، در بررسی آنها ابتدا کشت ناپیوسته به منظور تعیین نیاز سلول به مقدار واقعی به نیتروژن و آستانه غلظت مهاری آمونیاک نیز انجام شد. فعالیت اوره‌آزی و شرایط قلیایی هیدرولیز اوره با آمونیاک در سرعتی برابر با جذب آن به سلول از مهار رشد به‌وسیله آمونیاک جلوگیری می‌کند. نتایج نشان داد که استفاده از اوره با الگوی افزایشی آهسته باعث تجمع کمتر آمونیاک در محیط می‌شود و برای کشت‌های طولانی‌مدت مناسب‌تر است. بنابراین، استفاده از اوره به جای آمونیوم سولفات پیشنهاد می‌گردد. مشابه با نتایج یافته‌های تحقیق حاضر Madkour و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که استفاده از اوره در غلظت‌های ۲/۹۴، ۵/۸۸، ۸/۸۳ و ۱۱/۷۷ میلی‌مولار باعث کاهش کلروفیل، بهره‌وری سلولی و بیشینه نرخ رشد ویژه در مقایسه با محیط کشت زاروک می‌شود و پیشنهاد دادند برای رفع این مشکل می‌توان از سیستم کشت به همراه خوراک‌دهی ناپیوسته[1] استفاده کرد (Rangel-Yagui *et al*., 2004). اسپیرولینا با فعالیت آنزیم اوره‌آز (Carvajal *et al*., 1980) یا با هیدرولیز مداوم اوره به آمونیاک در شرایط قلیایی (Danesi *et al*., 2002) به‌راحتی می‌تواند اوره را جذب کند. علت کاهش رشد جلبک اسپیرولینا در محیط کشت‌های حاوی اوره تبدیل اوره در محیط قلیایی به آمونیاک می‌باشد. همچنین تبدیل اوره به آمونیاک می‌تواند به خاطر عملکرد آنزیم اوره آز توسط ارگانیسم‌ها باشد. اگرچه محققین پیشنهاد کردند که مخلوط کردن اوره با کلرید کلسیم و تیوسولفات آمونیوم می‌تواند فعالیت آنزیم اوره آز را متوقف کند (Yuan *et al*., 2018). اثر بازدارندگی در رشد سلول در کشت‌های حاوی اوره و آمونیوم به این واقعیت نسبت داده می‌شود که انتقال بیش از حد آمونیوم به سلول‌ها می‌تواند مانع تشکیل ATP در کلروپلاست شده و منجر به مهار فتوسنتز گردد (Ramanna *et al*., 2014). در حالی که انتقال نیترات در سلول‌های جلبکی توسط سلول‌ها کاملاً تنظیم می‌شود، هجوم آمونیوم به‌راحتی کنترل نمی‌شود، به‌ویژه هنگامی‌که سطح آمونیوم خارج سلولی زیاد باشد (Kim *et al*., 2016). همچنین، در بعضی موارد، اشباع بیش از حد آمونیوم در محیط می‌تواند با آزاد سازی یون‌های H^+باعث کاهش قابل‌توجه pH شود، درنتیجه از رشد سلول جلوگیری کرده و حتی باعث لیز سلول می‌شود (Wu *et al*., 2013; Li *et al*., 2019).

در مطالعه حاضر حداکثر کلروفیل a، کلروفیل b و رنگدانه کل در تیمار نیترات سدیم- ریز مغذی‌ها به دست آمد. براساس مطالعه Piorreck و همکاران (۱۹۸۴) محدودیت نیتروژن در محیط کشت باعث کاهش غلظت کلروفیل می‌شود. مطالعه Choi و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند کلروفیل پس از ده روز با کاهش نیتروژن در محیط کشت کاهش می یابد. در حضور نیتروژن در محیط کشت مقدار بیشتری آمونیوم طی هیدرولیز آزاد می‌شود که باعث جذب بیشتر این ترکیب می‌شود (Avila-Leon *et al*., 2012). براساس مطالعه Mashor و همکاران (۲۰۱۶) محیط کشت حاوی نیترات آمونیوم بهترین عملکرد از نظر میزان توده سلولی و کلروفیل a در جلبک اسپیرولینا در بین منابع مختلف نیتروژنی اوره، نیترات آمونیوم، سولفات آمونیوم نشان داد.

در مطالعه حاضر بالاترین میزان پروتئین جلبک اسپیرولینا در تیمار سدیم-اوره به همراه آهن و فسفات به دست آمد. برعکس نتایج تحقیق حاضر، در مطالعه Gorgij Jaski و همکاران (۲۰۱۷) بیشترین میزان پروتئین جلبکی در محیط کشت حاوی نیترات آمونیوم و نیترات پتاسیم حاصل شد. در مطالعه آنها در تمام کشت‌های جلبک اسپیرولینا، افزایش میزان نیتروژن منجر به افزایش زی‌توده و افزایش میزان پروتئین گردید. Rodrigues و همکاران (۲۰۱۰) اسپیرولینا را با ترکیبی از KNO_3 و NH_4Cl کشت دادند و بیان کردند که افزودن NH_4Cl به روش مداوم و افزایش لگاریتمی در مقدار آن از سمیت ناشی از آمونیاک و کمبود نیتروژن جلوگیری کرد و باعث تولید غلظت سلولی بسیار بالا و بالاترین مقدار کلروفیل (۲۱/۸۵ میلی‌گرم)، پروتئین (۴۹/۸ درصد) و چربی (۲۰/۵ درصد) گردید. در مطالعه Hajji (۲۰۱۴) اثر غلظت‌های مختلف اوره بر رشد و محتوای

[1] Fed-Batch

کلروفیل و پروتئین جلبک اسپیرولینا بررسی شد و مشخص شد با افزایش مقدار اوره میزان بیومس، محتوای کلروفیل و میزان پروتئین افزایش می‌یابد و بالاترین میزان در سطح ۵/۸۱۵ میلی‌گرم بر لیتر اوره مشاهده گردید. اگرچه بالاترین بهره‌وری در تیمار استفاده‌شده از محیط کشت زاروک به‌دست آمد.

عوامل فیزیکی و نیازهای شیمیایی از عوامل مؤثر بر رشد اسپیرولینا هستند (Moroney *et al*., 2011)، پتاسیم جزو اصلی و ضروری‌ترین عناصر غذایی جلبک است. در شدت بخشیدن به سنتز کربوهیدارت‌ها و دیواره سلولی و مقاومت جلبک نقش دارد. پتاسیم در سلول به عنوان کاتالیزور در واکنش‌های بیولوژیک بسیاری به‌خصوص واکنش‌های انرژی‌زا، سنتز پروتئین و گلیکوژن شرکت می‌کند. همچنین پتاسیم یکی از عوامل نگهداری فشار اسمزی به‌شمار می‌رود (Ghezelbash *et al*., 2008). منیزیم یک عنصر اساسی در پدیده فتوسنتز بوده و نیاز جلبک‌های مختلف به آن متفاوت است. وجود این عنصر برای بعضی از گونه‌های جلبکی به عنوان ماده تشکیل‌دهنده کلروفیل حیاتی است و به عنوان عناصر پرمصرف نقش مهم و اساسی در رشد دارد (Fallahi and Salvatian, 2006). در مطالعه حاضر، بالاترین میزان بیومس و نرخ رشد ویژه جلبک اسپیرولینا در تیمارهای حاوی عناصر منیزیم و ریز مغذی‌ها (کلرید منگنز، سولفات روی، سولفات مس و مولیبدن) بر پایه منبع نیتروژنی نیترات سدیم به‌دست آمد. Behrouzi (۲۰۱۴) گزارش کرد که تأثیر عناصر پتاسیم و منیزیم بر افزایش رشد در دو گونه جلبکی *Tetraselmis suecica* و *Chaetoceros calcitrans* نسبت به فلزات روی، کادمیوم و کبالت بیشتر بود. همچنین این محقق گزارش کرد که افزایش غلظت عناصر کلرید پتاسیم و کلرید منیزیم تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش میزان کلروفیل شد و با افزایش این غلظت میزان کلروفیل کاهش یافت. Farhi-Ashtiani و Mahdieh (۲۰۰۲) گزارش نمودند که کاهش میزان کلروفیل در غلظت‌های بالای عناصر پتاسیم، منیزیم، کبالت، روی و کادمیوم به علت ممانعت از سنتز کلروفیل به دلیل کاهش اکسیژن محلول در محیط کشت است، اما در غلظت‌های پایین باعث افزایش کلروفیل می‌شود. ولی تاثیر غلظت یون منیزیم نسبت به سایر فلزات برای کلروفیل بیشتر بوده، زیرا منیزیوم ماده تشکیل‌دهنده کلروفیل است (Borowitzka and Borowitzka, 1988). در مطالعه‌ای مشابه، Schwenk (۲۰۱۲) اثرات سولفات منیزیم را بر رشد جلبک *Scenedesmus dimorphus* بررسی و گزارش نمود که وجود منیزیم باعث افزایش تراکم و رشد سلول می‌گردد. Concas و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که آهن سبب افزایش نرخ رشد و افزایش تراکم سلولی می‌شود و محدودیت آهن می‌تواند در کاهش نرخ تثبیت دی‌اکسید کربن و جذب نیتروژن از ریزجلبک‌ها با محدود کردن واکنش فتوسنتز مؤثر باشد. Rueter و Petersen (۱۹۸۷) گزارش کردند که آهن باعث رشد سیانوباکتری ها، افزایش فتوسنتز و تثبیت نیتروژن می‌شود.

کاهش رشد جلبک‌ها در غلظت‌های بالای عناصر ناشی از مسمومیت فلزی از طریق مسدود کردن گروه‌های عملکردی در مولکول‌های مهم از قبیل آنزیم‌ها، پلی‌نوکلئوتیدها، سیستم‌های انتقال مواد مغذی ضروری و یون‌ها، جابه‌جایی یا جایگزینی با یون‌های ضروری از مکان‌های سلولی، دناتوراسیون و غیرفعال شدن آنزیم‌ها، اختلال فیزیولوژیک در سلول و غشاهای سلولی است (Rauser, 1995; Cobbett and Goldsbrough, 2002). به طور کلی، می‌توان بیان کرد که تأثیرات فلزات بر میزان تراکم جمعیت، کلروفیل و زیست‌توده متفاوت است که بستگی به گونه جلبک، نوع فلز و غلظت مورداستفاده دارد (Farhadian-Omidhar *et al*., 2016). Michael و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند، با توجه به این‌که جلبک‌ها قادر به ساخت عناصر موردنیاز خود نیستند، مقدار این عناصر موجود در جلبک بستگی به میزان آن در محیط کشت و آب دارد که به‌وسیله جلبک جذب می‌شود.

در این تحقیق از محیط کشت‌های ارزان حاوی ترکیبات ازته نیترات سدیم و اوره برای کشت جلبک اسپیرولینا استفاده شد. براساس نتایج بالاترین میزان رشد، کلروفیل a و b و کارتنوئیدهای کل در تیمارهای حاوی محیط کشت نیترات سدیم قابل‌مقایسه با تیمار حاوی محیط کشت زاروک بود که می‌توان در مقیاس تجاری از آن استفاده کرد.

منابع

Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M.C. and Ahmed, Z., 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae Scenedesmus bijugatus. *Bioresource Technology*, 131: 246–249. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.159

Avila-Leon, M., Chuei Matsudo, S. and Sato, J.C.M., 2012. *Arthrospira platensis* biomass with high protein content cultivated in continuous process using urea as nitrogen source. *Journal of Applied Microbiology*, 112:1084-1094. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05303.x

Behrouzi, A., 2014. The effect of some metals (potassium, cobalt, cadmium, zinc, magnesium) on the growth of two species of algae, Tetraselmis suecica and Chaetoceros calcitrans. Master's thesis, Hormozgan University, 101 P [In Persian]

Borowitzka, M.A and Borowitzka, L.J., 1988. Micro-algal biothecnology. Cambridge University Press, New York, pp. 14-15.

Carvajal, N., Fernandez, M., Rodriguez, J.P. and Donoso, M., 1980. Urease of *Spirulina maxima*. *Phytochemistry*, 21: 2821-2823. DOI: 10.1016/0031-9422(80)85048-5

Chen, Y.C., 2011. The effect of shifts in medium types on the growth andmorphology of Spirulina platensis (*Arthrospira platensis*). *Journal of Marine Science and Technology*, 19: 565–570. DOI: 10.51400/2709-6998.2171.

Choi, A., Song-Gun, K. and Byung-Dae, Y., 2003. Growth and amino acid contents of *Spirulina* platensis with different nitrogen sources. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8: 368-372. DOI: 10.1007/BF02949281

Choonawala, B., 2007. *Spirulina* sp. Production in brine effluent from cooling tower water. Durban Institute of Technology, Durban. 421 P. DOI: 10.51415/10321/134

Cobbett, C. and Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1): 159-182. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154

Concas, A., Steriti, A., Pisu, M. and Cao, G., 2014. Comprehensive modeling and investigation of the effect of iron on the growth rate and lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* cultured in batch photobioreactors. *Bioresource Technology*, 153: 340-350. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.11.085

Costa, J.A.V., Colla, L.M. and Duarte Filho, P.F., 2003. *Spirulina platensis* growth in open raceways ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Zeitschrift für Naturforsch*, 58: 76-80. DOI: 10.1515/znc-2003-1-214.

Dai, G.Z., Qiu, B.S. and Forchhammer, K., 2014. Ammonium tolerance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and the role of the psbA multigene family. *Plant, Cell and Environment*, 37(4): 840-851. DOI: 10.1111/pce.12202.

Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.D.O., De Carvalho, J.C.M. and Sato, S., 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 23(4): 261-269. DOI:10.1016/S0961-9534(02)00054-5

Danesi, E.D.G., Navacchi, M.F.P., Takeuchi, K.P., Frata, M.T. and Carvalha, J.C.M., 2010. Application of *Spirulina platensis* in protein enrichment of manico based bakery products. *Journal of Biotechnology*, 150: 311-311. DOI:10.1016/j.jbiotec.2010.09.286

Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Sato, S. and Carvalho, J.C.M.D., 2011. Growth and content of *Spirulina platensis* biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1): 362-373. DOI: 10.1590/S1517-83822011000100046

Faintuch, B.L., Sato, S. and Aquarone, E., 1991. Influence of the nutritional sources on the growth-rate of cyanobacteria. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 34(1): 13-30.

Fallahi, M., Salvatian, S. M., 2006. Study on effect of different concentrations of magnesium on growth and biomass of *Chlorella vulgaris*. *Pajouhesh Va Sazandgi: Livestock and Aquatic Affairs*, 72: 13-9 [In Persian]

FAO, 2006. Fishstat software. Universal software for fishery statistical. Time series 1950–2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Viale delle Terme di Caracalla, Rome, Italy,Version 2. 30.

Farhadian Omidhar, Moulai Hossein, Pir Ali Zafrayi Ahmad Reza. 2016. Effects of Zn and Mn on Population Dynamic, Chlorophyll a and Caroteniods in green microalgae *Scenedesmus quadricauda*. *Plant Process and Function*, 5(15):33-42. [In Persian]

Farhi-Ashtiani, S. and Mahdieh, M., 2002. The effect of nitrogen form on the growth of astaxanthin content of single-celled green algae *Haematococcus pluvialis*. *Tehran University Science Journal*, 28: 224-215. [In Persian]

Gami, B., Naik, A. and Patel, B., 2011. Cultivation of *Spirulina* species in different liquid media. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2: 15–26.

Gershwin, M.E., and Belay, A., 2007. *Spirulina* in human nutrition and health (1st ed.). *CRC Press*, 328 P. DOI:10.1201/9781420052572

Ghezelbash, F., Farboodnia, T., Heidari, R. and Agh, N., 2008. Biochemical effects of different salinities and luminance on green microalgae *Tetraselmis chuii*. Research *Journal of Biological Sciences*, 3: 217–221. [In Persian]

Gorgij-Jaski, M., Yahivi, M., Rouhani Qadiklai, K. and Salarzadeh, A., 2017. The effect of different Nitrogen sources on growth rate and protein content of *Spirulina platensis*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 27(6): 57-65. DOI:10.22092/ISFJ.2019.118398. [In Persian]

Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C. and Hasan, R.M., 2008. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, Rome-Italy. 41 P.

Hajji, S., 2014. Investigating the effect of urea concentration (as a nitrogen source) on the growth and content of protein and amino acid lysine in algae (*Spirulina paltensis*). Master's thesis. Mashhad Ferdowsi University. 81 P. [In Persian]

Halim, R., Danquah, M.K. and Webley, P.A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3): 709-732. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001

Kim, C.K., Jung, Y.H. and Oh, H.M., 2007. Factors indicating culture status during cultivation of *Spirulina platensis*. *The Journal of Microbiology*, 45 (2): 122-127.

Kim, G., Mujtaba, G. and Lee, K., 2016. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. *Algae*, 31(3): 257-266. DOI: 10.4490/algae.2016.31.8.18

Kumari, A., Pathak, A.K. and Guria, C., 2015. Cost-effective cultivation of *Spirulina platensis* using NPK fertilizer. *Agricultural Research*, 4: 261–271. DOI: 10.1007/s40003-015-0168-4

Li, X., Li, W., Zhai, J., Wei, H. and Wang, Q., 2019. Effect of ammonium nitrogen on microalgal growth, biochemical composition and photosynthetic performance in mixotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 273: 368-376. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.11.042

Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5): 591–592. DOI: 10.1042/bst0110591

Madkour, F.F., Kamil, A. and Nasr, H.S., 2012. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquaculture Research*, 38: 51–57. DOI: 10.1016/j.ejar.2012.09.003

Mashor, N., Yazam, M.S.M., Naqqiuddin, M.A., Omar, H. and Ismail, A., 2016. Different nitrogen sources effects on the growth and productivity of *Spirulina* grown In outdoor conditions. *Acta Biologica Malaysiana*, 5(1): 16-26. doi:10.7593/abm/5.1.16

Matsudo, M.C., Bezerra, R.P., Sato, S., Perego, P., Converti, A. and Carvalho, J.C.M., 2009. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using urea as nitrogen source. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 52–57. DOI: 10.1016/j.bej.2008.08.009

Michael, A., Kyewalyanga, M.S. and Lugomela, C.V., 2019. Biomass and nutritive value of *Spirulina* (*Arthrospira fusiformis*) cultivated in a cost-effective medium. *Annals of Microbiology*, 69(13): 1387-1395. DOI:10.1007/s13213-019-01520-4

Moroney, J.V., Ma, Y., Frey, W.D., Fusilier, K.A., Pham, T.T., Simms, T.A., Di Mario, R.J., Yang, J. and Mukherjee, B., 2011. The carbonic anhydrase isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: intracellular location, expression, and physiological roles. *Photosynthesis Research*, 109(1-3): 133-149. DOI: 10.1007/s11120-011-9635-3

Mulokozi, D.P., Mtolera, M.S. and Mmochi, A.J., 2019. Biomass production and growth performance of Momela Lake's *spirulina* (*Arthrospira fusiformis*) cultured under urea and N: P: K fertilizers as cheaper nitrogen sources. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(2): 861-869. DOI:10.4314/ijbcs.v13i2.23

Nogueira, S.M.S., Souza Junior, J., Maia, H.D., Saboya, J.P.S. and Farias, W.R.L., 2018. Use of *Spirulina platensis* in treatment of fish farming wastewater. *Revista Ciência Agronômica*, 49(4): 599-606. DOI:10.5935/1806-6690.20180068

Nor, N.M., Naqqiuddin, M, A., Mashor, N., Zulkifly, S., Omar, H. and Ismail, A., 2015. The effect of different nitrogen sources on continuous growth of *Arthrospira platensis* in simple floating photobioreactor design in outdoor conditions. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 6(4): 1-11.

Piorreck, M., Baasch, K.H. and Pohl, P., 1984. Biomass production total protein, chlorophyll, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23: 207-216. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80304-0

Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I. and Bux, F., 2014. The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 168: 127-135. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.064

Rangel-Yagui, C., Danesi, E.D.G., de Carvalho, J.C.M. and Sato, S., 2004. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92(2): 133-141. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.09.002

Raoof, B., Kaushik, B.D. and Prasanna, R., 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *spirulina*. *Biomass and Bioenergy Journal*, 30(6): 537-542. DOI: 10.1016/j.biombioe.2005.09.006

Rauser, W.E., 1995. Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology*, 109: 1141–1149. DOI: 10.1104/pp.109.4.1141

Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Converti, A., Sato, S. and Carvalho, J.C.M., 2010. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 101(12): 4491-4498. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.054

Rueter, J.G. and Petersen, R.R., 1987. Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21(3): 435-445. DOI: 10.1080/00288330.1987.9516239

Schwenk, J.R., 2012. Effects of magnesium sulfate, digestate, and other inorganic nutrients on the phototrophic growth of the green microalga *Scenedesmus dimorphus*. Doctoral dissertation, Cleveland State University, United States. 83 P.

Sigurdarson, J.J., Svane, S. and Karring, H., 2018. The molecular processes of urea hydrolysis in relation to ammonia emissions from agriculture. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 17: 241-258. DOI::10.1007/s11157-018-9466-1

Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M. and Converti, A., 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243(1-4): 217-224. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.10.005

Solomon, C.M. and Glibert, P.M., 2008. Urease activity in five phytoplankton species. *Aquatic Microbial Ecology*, 52: 149-157. DOI: 10.3354/ame01213

Tarko, T., Duda-Chodak, A. and Kobus, M., 2012. Influence of growth medium composition on synthesis of bioactive compounds and antioxidant properties of selected strains of *Arthrospira cyanobacteria*. *Czech Journal of Food Sciences*, 30(3): 258-267. DOI:10.17221/46/2011-CJFS

Volkmann, H., Imianovsky, U., Oliveira, J.L.B. and Sant Anna, E.S., 2008. Cultivation of *Arthrospira platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 1-4. DOI:: 10.1590/S1517-838220080001000022

Vonshak, A. and Richmond, A., 1988. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. *Biomass*, 15(4): 233-247. DOI: 10.1016/0144-4565(88)90059-5

Wu, L.F., Chen, P.C. and Lee, C.M., 2013. The effects of nitrogen sources and temperature on cell growth and lipid accumulation of microalgae. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85: 506-510. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.05.016

Yuan, C., Xu, K., Sun, J., Hu, G.R. and Li, F.L. 2018. Ammonium, nitrate, and urea play different roles for lipid accumulation in the nervonic acid—producing microalgae Mychonastes afer HSO-3-1. *Journal of Applied Phycology*, 30(2): 793-801. DOI: 10.1007/s10811-017-1308-y.

Study of growth performance, protein, and pigments in Spirulina (*Arthrospira* sp.) using low-cost culture media

Moradi A.[1]; Ahmadifard N.[1*]; Habibzadeh Y.[2]

[*]n.ahmadifard@urmia.ac.ir

1- Department of fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, P.O. Box: 46414-356, Urmia, Iran, Urmia, Iran.

2- West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Urmia, Iran.

Abstract

The most important limitation of the mass production of Spirulina microalgae in the world is the high cost of its culture medium. The present study was carried out with the aim of evaluating the cultivation mediums based on chemicals and commercial fertilizers and comparing the growth characteristics, pigments, and the amount of protein in the produced spirulina in comparison with the Zarrouk's medium. In order to meet the nutritional needs of Spirulina species, low-cost fertilizers were used in the form of 18 treatments and three replications. In all treatments, commercial sodium bicarbonate at 16.8 g/L, sea salt at 0.5 g/L, and the commercial liquid fertilizer (K:P, 20:20) were used to meet the phosphorus and potassium needs of the microalgae. To supply nitrogen in the treatments, three sources of sodium nitrate, urea, and a 50:50 combination of both were used. In all three groups, 6 substances were used in the form of 6 treatments (control, potassium, iron, a combination of potassium and iron, magnesium, and micronutrients). According to the results, the growth of Spirulina was higher in the control group (Zarrouk's medium) than other treatments until the 20th day, but after that, the sodium nitrate - magnesium (N-Mg) treatment showed a higher growth rate than the control group. Also, the highest specific growth rate, cell density of algae, and the lowest doubling time were measured in the treatment containing sodium nitrate source. The highest algal cell density and specific growth rate were significantly ($p<0.05$) observed in sodium nitrate-magnesium (N-Mg) and sodium nitrate-micronutrients (N-Mic) treatments, which were significantly different from the control group (Zarrouk's medium). The maximum chlorophyll a, chlorophyll b, and total pigment were obtained significantly in sodium nitrate-micronutrients (N-Mic) treatment ($p<0.05$). The highest amount of protein was obtained in the combined sodium nitrate-urea group with iron and potassium sources. To sum up, the highest growth rate and the highest cell density were obtained in the culture medium containing sodium nitrate, which is comparable to Zarrouk's culture medium that can be used on a commercial scale.

Keywords: Arthrospira, Urea, Algae, Chlorophyll, Sodium nitrate

[*]Corresponding author