تاثیر غنی سازی آب دریای خزر منطقه گمیشان با استفاده از نیترات سدیم بر رشد میکروجلبک *SPIRULINA PLATENSIS*

خورشید حسین زاده، علی گنجیان خناری

چکیده

بیوماس(زی توده) Spirulina platensis سال‌هاست توسط انسان مصرف می‌شود که علت آن خواص سلامتی بخش این میکروجلبک می‌باشد. این خواص مفید به این علت میزان زیادی پروتئین (حدود ۶۵% وزنی-وزنی)، ترکیب متعادلی از ویتامین‌ها، مواد معدنی و ترکیبات دیگر مانند اسیدهای چرب غیر اشباع ω3 و ω6، ترکیبات فنولی با تاثیر آنتی‌اکسیدانی بر پرواکسیداسیون لیپیدها، می باشد (Costa, et al., 2002). خصوصیت این میکروارگانسیم این است که چون در محیط بسیار انتخابی رشد می‌کند، می‌توان آن را در استخرهای روباز کشت کرد اما نسبتا عاری از میکروارگانیسم‌های آلوده کننده باقی بماند(Borowitzka,1999). از طرفی تولید با هزینه پایین با استفاده از محیط کشت ارزان می‌تواند یک فاکتور کلیدی در توسعه تولید Spirulina platensis باشد. استفاده از آب دریا بهینه شده (Faucher, et al., 1979) یا بعد از غنی سازی با مواد مغذی خاص در شرایط آزمایشگاهی (Materassi, et al., 1984) یا در استخرهای روباز گردشی (Tredici, et al., 1986;Wu, et al., 1993) به عنوان یک محیط پیشنهادی جهت تولید Spirulina platensis گزارش شده است. با توجه به اهمیت اقتصادی میکرو جلبکها از جمله Spirulina platensis در زمینه‌های غذایی و دارویی، تولید این ارگانیسم با استفاده از منابع ارزان مانند آب دریا مورد توجه تولیدکنندگان می‌باشد. از طرفی با تغییر بعضی از منابع غذایی می‌توان میزان رشد و تراکم سلولی میکروجلبکها را به حداکثر مقدار خود به خصوص در مقادیر انبوه رساند. بر اساس مطالعات انجام شده منابع آبی داخلی منبع بسیار مهم و سرشار از میکروجلبک‌ها هستند و در دریای خزر بیش از ۳۳۴ گونه از ۸ شاخه فیتوپلانکتون مورد شناسایی قرار گرفته است (گنجیان و همکاران ۱۳۹۱; Ganjian et al., 2011; Ganjian et al., 2010) . در این تحقیق افزودن غلظت‌های مختلف نیترات سدیم (grl^{-1} ۰، ۰/۲۵، ۰/۵) به آب دریای گمیشان (منطقه شرق حوضه جنوبی دریایی خزر) جهت بررسی اثر آن بر رشد میکروجلبک *Spirulina platensis* انجام شد. کشت در دمای ۳۰°C، شدت نور ۳۵۰lux ± ۴۶۷۰ و پریود نوری (L/D: 12/12)انجام شد و شمارش با استفاده از لام نئوبار انجام شد. نتایج نشان داد بالاترین نرخ رشد و ضریب رشد ویژه(به ترتیب ۰/۰۴۷ و ۰/۰۳۴) و بیشترین میزان رشد ($۱۰^{۴}$× ۱۰ عدد سلول در میلی لیتر) با استفاده از gl^{-1} ۰/۵ نیترات سدیم در آب دریا حاصل می شود. نتایج این بررسی نشان داد آب دریای گمیشان به تنهایی برای حمایت از رشد*Spirulina platensis* مناسب نمی باشد و برای این منظور به غنی سازی با ترکیبات مغذی نیاز دارد.

مواد و روش ها

میکروارگانیسم و محیط کشت

در این بررسی سیانوباکتر Spirulina platensis از پارک زیست فناوری خلیج فارس خریداری شد. محیط کشت زاروک[۱] برای کشت و نگهداری مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. این محیط توسط زاروک به عنوان محیط کشت استاندارد Spirulina platensis ساخته شد و در اغلب منابع علمی جهت کشت و توسعه مایه تلقیح Spirulina platensis مورد استفاده قرار می گیرد. (Vonshak, 1982; Zarrouk, 1996). آب خلیج گمیشان با غلظت‌های مختلف بیکربنات سدیم غنی سازی شد(جدول۱). برای ساخت محیط زاروک از ترکیبات شیمیایی با درجه خلوص آزمایشگاهی (مرک) استفاده شد.

جدول۱: غلظت میزان مصرف بیکربنات سدیم در تیمارها

تیمار	نیترات سدیم (gr/l)
۱	۰
۲	۰/۲۵
۳	۰/۵

۱ Zarrouk medium.

کشت

کشت در ارلن مایرهای ml ۲۵۰ با ml ۲۲۰ محیط کشت در قفسه کشت با دمای °C ۳۰±۲، شدت نور lux ۴۶۷۰ ±۳۵۰ انجام شد. زمان نور دهی توسط تایمر اتوماتیک به صورت ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد (Costa, et al., 2002و Reinehr and Costa, 2006) . غلظت بی کربنات سدیم مطابق جدول ۱ در هر تیمار تنظیم شد. برای تنظیم غلظت در هر تیمار، جرم مورد نیاز از بیکربنات سدیم برای رسیدن به غلظت مشخص در حجم ml ۲۲۰ توزین و به ارلن حاوی آب دریای گمیشان افزوده شد. هوادهی ارلن‌ها بطور مداوم با کمک پمپ اکواریومی انجام شد. به همه تیمارها ml ۵ از استوک Spirulina platensis تلقیح شد. شمارش تعداد سلول در استوک تلقیح شده به تیمارها و خود تیمارها در روزهای مختلف با استفاده از لام نئوبار آینه‌ای انجام شد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برداشت میکروجلبک ها با استفاده از پیپت پاستور استریل صورت گرفت. تعداد واقعی سلول‌های جلبک در هر تیمار و در هر روز با استفاده از فرمول زیر به دست آمد (Ganjian, 2011):

ملی متر مربع/سلول‌ها =ملی متر مربع/سلول‌ها × ×۱۰رقت

ملی متر مربع/سلول‌ها = میانگین سلول‌های شمارش شده/وسعت شمارش شده(میلی متر مربع)

تعداد سلول های شمارش شده × ۱۰× ×۵رقت × ۱۰۰۰ = تراکم سلولی در هر ۱cc از نمونه

برای محاسبه ضریب رشد(ضریب رشد ویژه) (Specific Growth Rate (SGR در روزهای مختلف از فرمول زیر استفاده شد (Ganjian, 2011):

$$\mu = K' = Ln (mt2/mt1)/t2-t1;\ t2>t1$$

m2 = تراکم سلولی (تعداد سلول در میلی لیتر) درآخرین روز

m1 = تراکم سلولی (تعداد سلول در میلی لیتر)دراولین روز

t1 = اولین روز

t2 = آخرین روز

تغییرات میکروجلبک Spirulina platensis طی ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت. هر ۷۲ ساعت یک بار شمارش از نمونه‌ها انجام شد. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی و کلیه اطلاعات ثبت شده در انتهای آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن جهت مقایسه میانگین‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه عملیات مربوط بوسیله نرم افزار SPSS 18 مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد در بین غلظت‌های مختلف بیکربنات سدیم که جهت غنی سازی آب دریای خزر (گمیشان) مورد استفاده قرار گرفت، تیمار سوم با داشتن gl^{-1} ۲/۸ بیکربنات سدیم بیشترین میزان رشد (۱۵×۱۰^{۴} عدد سلول در میلی لیتر) را در روز بیست و یکم داشت. در این تیمار نرخ رشد و ضریب رشد ویژه به ترتیب به ۰/۰۷۵ و ۰/۰۵۴ رسید که از سایر تیمارها بالاتر بود(جدول ۲). با تلقیح Spirulina platensis به آب دریای خزر (گمیشان)، به علت کمبود مواد مغذی رشدی مشاهده نشد و تعداد سلول‌ها افزایش پیدا نکرد و پس از ۸ روز، به دلیل کمبود مواد مغذی سلول‌های جلبک زرد شده و رسوب کردند. با افزودن ترکیبات مغذی (بیکربنات سدیم و نیترات سدیم) رشد Spirulina platensis ادامه پیدا کرد. . تیمار ۳ در مقایسه با تیمار ۲ افزایش چندانی در تعداد سلول‌ها نداشت اما ضریب رشد و نرخ رشد بیشتری نسبت به تیمار ۲ نشان داد(جدول ۳).

جدول ۲: مقایسه رشد میکروجلبک *Spirulina platensis* (تعداد سلول در میلی لیتر × ۱۰^{۴}) در تیمارهای مختلف

میانگین± انحراف معیار (×۱۰^{۴})			
روزهای شمارش	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
۱	۰±۵	۰±۵ ^{a}	۰±۵ ^{a}
۴	۰±۵	۰±۵ ^{a}	۷/۳±۵/۵۳^{a}
۸	۰±۵	۰±۵ ^{a}	۷/۳±۵/۵۳^{a}
۱۱	۰	۰±۱۰ ^{a}	۷/۳±۵/۵۳^{a}
۱۵	۰	۷/۳±۵/۵۳^{a}	۰±۱۰ ^{a}
۱۸	۰	۷/۳±۵/۵۳^{a}	۰±۱۰ ^{a}
۲۱	۰	۷/۳±۵/۵۳^{a}	۰±۱۰ ^{a}

جدول۳: میزان نرخ رشد و ضریب رشد ویژه میکروجلبک *Spirulina platensis* در تیمارهای مختلف

تیمارها	ضریب رشد	نرخ رشد
۱	۰	۰
۲	۰/۰۱۷	۰/۰۲۷
۳	۰/۰۳۴	۰/۰۴۷

بحث

نیتروژن نیز یکی از مواد مغذی مهم برای تولید بیوماس میکروجلبک می‌باشد. میزان نیتروژن در بیوماس بسته به مقدار، در دسترس بودن و نوع منبع نیتروژن، از ۱ تا ۱۰٪ متغییر است. نیتروژن میتواند به صورت NO^{3-}، NO^{2-}، NH^{4}+ و N^{2} مورد استفاده قرار گیرد. ترتیب مواد نیتروژنی که Spirulina platensis ترجیح میدهد از آن استفاده کند به صورت $N^{2} > NO^{3-+} > NH^{4}$ می‌باشد(Ohmori et al, 1997) زمانی که نیترات در دسترس است این ماده به صورت درون سلولی توسط نیترات ردوکتاز به نیتریت احیا میشود و نیتریت توسط نیتریت ردوکتاز به آمونیوم احیا میشود. بنابر این ضایعات و پسابهای غنی از نیتروژن میتوانند به عنوان یک محیط کشت مناسب برای تولید پروتئین مورد توجه قرار گیرند(Markou and Georgakakis, 2010) .

نتایج این بررسی نشان داد استفاده از آب دریای خزر (گمیشان) بدون غنی سازی جهت کشت میکروجلبک *Spirulina platensis* مناسب نمی‌باشد. با توجه به حضور سایر ترکیبات مغذی در آب دریای خزر (گمیشان) با غنی سازی آب توسط منبع کربن می‌توان از آن برای کشت میکروجلبک *Spirulina platensis* استفاده کرد.

اولین کشت موفقیت آمیز Spirulina maxima با استفاده از آب دریا بعلاوه اوره، میانگین سالانه تولید بیوماس Spirulina maxima ۷/۳۵ میلی گرم به ازای هر متر مربع در هر روز را نتیجه داد که کمی پایین‌تر از مقدار بدست آمده از محیط استاندارد بیکربنات سدیم بعلاوه آب دریا بود(۸/۱۴ گرم به ازای هر متر مربع در هر روز)(Tredici, et al., 1986).

در یک تحقیق محیط زاروک رقیق نشده، محیط زاروک رقیق شده با ۵۰٪ آب تالاب منگوئرا (برزیل) و آب تالاب بعلاوه ۱۰٪ محیط زاروک جهت کشت *Spirulina platensis* بکار رفت. ضریب رشد ویژه d^{-1} ۰/۱۱۱ و بازدهی بیومس $gl^{-1}d^{-1}$ ۰/۰۴۲۲۳ با استفاده محیط زاروک بدست آمد. در حالی که با استفاده از آب تالاب بعلاوه ۱۰٪ محیط زاروک ضریب رشد ویژه d^{-1} ۰/۱۱۳ و بازدهی $gl^{-1}d^{-1}$ ۰/۰۴۶۷ حاصل شد و اختلاف معنی داری بین این دو محیط مشاهده نشد (Reinehr and Costa, 2006). در تحقیقی دیگر بیکربنات سدیم،اوره، فسفات، سولفات، فریک آهن، منگنز و پتاسیم، برای تکمیل کردن آب

تالاب منگوئرا جهت کشت *Spirulina platensis* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد تولید بیوماس *Spirulina platensis* در آب تالاب منگوئرا gl^{-1} ۷۸/۰۱ ±۰/۰ (بر مبنای وزن خشک) می‌باشد، در حالی که در آب تالاب بعلاوه gl^{-1} ۲/۸۸ بیکربنات سدیم بدون افزودن اوره، فسفات، سولفات و آهن، میزان بیوماس تولید شده به gl^{-1} ۸۲/۰۱ ±۰/۰ رسید. با افزودن فسفات و ترکیبات آهن‌دار، میزان نهایی بیوماس *Spirulina platensis* به gl^{-1} ۰/۰۳ ±۱/۳۴ افزایش یافت (Costa, *et al.*, 2003).

Spirulina platensis در آب تالاب منگوئرا بعلاوه نیترات سدیم رشد کمی داشت در آب دریای گمیشان بعلاوه نیترات سدیم نیز رشد کمی از خود نشان داد. افزودن منبع کربن و نیتروژن سبب افزایش قابل توجهی در میزان بیومس spirulina platensis شد که با نتایج Costa و همکاران (۲۰۰۳)، مطابقت دارد.

Costa و همکاران (۲۰۰۴)، از اوره و سدیم بیکربنات برای غنی سازی آب تالاب منگوئرا استفاده کردند و میزان رشد*Spirulina platensis* را مورد بررسی قرار دادند. اوره در غلظت‌های ۰، ۱/۱۲۵ وmgl^{-1} ۲/۲۵۰ و سدیم بیکربنات در غلظت‌های ۰، ۲۱ و mgl^{-1} ۴۲ مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد افزودن mgl^{-1} ۱/۱۲۵ اوره بدون افزودن بیکربنات سدیم بیشترین میزان بیومس را حاصل می‌کند که بیش از ۲ برابر بیومس تولید شده در اب تالاب غنی نشده بود. با افزودن mgl^{-1} ۲/۲۵۰ اوره بدون بیکربنات سدیم، میزان بیومس کاهش پیدا کرد. mgl^{-1} ۲۱ افزودن بیکربنات سدیم در غلظت‌های مختلف اوره افزایش کمی در میزان بیومس حاصل کرد در حالی که افزودن mgl^{-1} ۴۲ بیکربنات سدیم در غلظت‌های مختلف اوره سبب کاهش تولید بیومس شد. همه تیمارها با استفاده از آب تالاب بدون افزودن ترکیبات مغذی شروع شد و پس از ۳۱۲ ساعت کشت (کمبود مواد مغذی) اضافه شدن اوره و بیکربنات سدیم در غلظت‌های مختلف انجام شد، تنش حاصل از املاح نمکی ممکن است علت کاهش بیومس در غلظت‌های بالاتر باشد. نتایج این بررسی نشان داد اگرچه میزان کربنات و بیکربنات موجود در اب تالاب منگوئرا می‌تواند از رشد*Spirulina platensis* حمایت کند اما افزودن اوره برای رشد *Spirulina platensis* مفید است (Costa, *et al.*, 2004).

کشت آزمایشی Spirulina platensis در هوای آزاد انجام شد در حالی که نیترات سدیم و بیکربنات سدیم به ضایعات مایع گاو(شیرابه) افزوده شد. در این بررسی بالاترین نرخ تولید بدست آمده $gm^{-2}d^{-1}$ ۱۴ بود (Mitchell and Richmond, 1988). در مطالعه‌ای دیگر ضایعات گاو رقیق شده با آب به صورت بی‌هوازی هضم شد، سپس از این محیط برای کشت Spirulina platensis استفاده شد. نتایج نشان داد رشد جلبک در این شرایط سریع می‌باشد و هیچ گونه محدودیتی در حضور ترکیبات نیتروژنی[2]در غلظت کمتر از mgl^{-1} ۷۵ رخ نمی‌دهد. اما غلظت بالاتر از mgl^{-1} ۱۰۰ این ترکیبات، از رشد جلبک جلوگیری می‌کند. با این حال بازدهی حذف ترکیبات نیتروژنی توسط جلبک $mgl^{-1}d^{-1}$ ۲۴ بود و بازدهی بیومس برای تولید در آزمایشگاه به $mgl^{-1}d^{-1}$ ۷۰ و برای کشت در هوای آزاد به $mgl^{-1}d^{-1}$ ۲۴ رسید(Lincoln, et al., 1996).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد کمبود منبع نیتروژن سبب کاهش تراکم سلولی، ضریب رشد ویژه و نرخ رشد میکروجلبک می‌گردد که با نتایج Mitchell و Richmond (۱۹۸۸)، Lincoln و همکاران (۱۹۹۶)، مطابقت دارد. نتایج این بررسی نشان داد آب دریای خزر (گمیشان) به تنهایی برای حمایت رشد *Spirulina platensis* مناسب نمی‌باشد که با نتایج کار Costa و همکاران (۲۰۰۴)، مغایرت دارد علت آن کمتر بودن منبع کربن و نیتروژن آب دریای گمیشان در مقایسه با تالاب منگوئرا می‌باشد.

منابع

گنجیان خناری، ع.، شکوری، م.، قاسم نژاد، م.، گنجیان خناری، ف.، فارابی، و.، ۱۳۹۱. بررسی تاثیر بی کربنات سدیم بر رشد میکرو جلبک کلرلا(*Chlorella* sp.) در محیط کشت TMRL. مجله توسعه آبزي پروري، سال ششم، شماره دوم، زمستان1391 .

[2] . $N–NH_3$

Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, 70, 313–321.

Carvalho JCM, Francisco FR, Almeida KA, Sato S, Converti A., 2004. Cultivation of Arthrospira (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. J Phycol, 40:589–97.

Colla LM, Oliveira Reinehr C, Reichert C, Costa JAV., 2007. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. Bioresour Technol; 98:1489–93.

Converti A, Scapazzoni S, Lodi A, Carvalho J., 2006. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. J Ind Microbiol Biotechnol; 33:8–16.

Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte Filho, P., Kabke, K., Weber, A., 2002. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology.World J. Microbiol: Biotechnology. 18, 603–607.

Costa, J.A.V., Colla, L.M., Duarte Filho, P., 2003. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. Journal for Nature Research: Journal of Biosciences 58, 76–80.

Costa, J.A.V., Colla, L.M.1, Duarte Filho, P., 2004. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. Bioresource Technology, 92, 237-241.

Costa JAV, Cozza KL, Oliveira L, Magagnin G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. World J Microbiol Biotechnol 2001;17:439–42.

Danesi EDG, Rangel-Yagui CO, de Carvalho JCM, Sato S., 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. Biomass Bioenergy; 23:261–9.

Faucher, O., Coupal, B., Leduy, A., 1979. Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. Can J Microbiol, 25,752-759.

Ganjian, A.,Wan Maznah, W.O.,Yahya , Kh., Najafpour, Sh., Najafpour, Gh.D., Roohi, A., Fazli, H., 2010. Seasonal succession of phytoplankton community structure in the southern part of Caspian Sea. American-Eunrasian J.Agric.& Environ. Sci., Vol. 8 (2), pp. 146-155.

Ganjian,A., 2011. Temporal distribution and composition of phytoplankton in the Southern part of Caspian Sea in Iranian waters from, 1994-2007. Thesis submitted in fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy. UNIVERSITI SAINS MALAYSIA.

Habib, M.A.B., Parvin, M., Huntington, T.C., Hasan, M.R., 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.

Henrikson, R., 1994. Superfood *Spirulina* microalgae-of futuro.Barcelona: Ediciones Urano SA ISBN 84-7953-047-2.

Lincoln, E.P., Wilkie, A.C., French, BT., 1996. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. Biomass Bioenergy, 10, 63–81.

Markou, G., and Georgakakis, D., 2010. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters A review: Applied Energy 88(10), 3389-3401.

Materassi, R., Tredici, M., Balloni, W., 1984. *Spirulina* culture in sea water. Appl Microbiol Biotechnol 19: 384-386.

Mitchell, S.A. and Richmond, A., 1988. Optimization of a growth medium for *Spirulina* based on cattle waste. Biological Wastes, 25(1), 41-50.

Ohmori M, Ohmori K, Strotmann H., 1977. Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, Anabaena cylindrica. Arch Microbiol; 114:225–9.

Radmann, E. M., Reinehr, C. O., Costa, J. A. V., 2007. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. Aquaculture, 265(1-4), 118-126.

Reinehr, C.O., Costa, J.A.V., 2006. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22, 937–943.

Richmond, A., 1990. Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Boston. ISBN:0-8493-3240-0.

Sanchez-Luna LD, Converti A, Tonini GC, Sato S, de Carvalho JCM., 2004. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. Aquacult Eng; 31:237–45.

Soletto D, Binaghi L, Lodi A, Carvalho JCM, Converti A., 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. Aquaculture; 243:217–24.

Tredici, M.R., Papuzzo, T. & Tomasello, L., 1986. Outdoor mass culture of *Spirulina maxima* in sea-water. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24: 47–50.

Vetayasupom, S., 2004. The Potential of Using Wastwater from Household Scale Fermented Thai Rice Noodle Factories for Cultivating *Spirulina Platensis*. Pakistan Journal of Biological Scientific Information, 7(9), 1554-1558.

Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, S., Arad, S. & Richmond, A., 1982. Productio n of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. Biomass, 2, 175–185.

Vonshak, A., 1997 *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology.London: Taylor & Francis. ISBN 0-7484-0674-3.

Wu B, Tseng CK., Xiang W., 1993. Large-scale cultivation of *Spirulina* in sea-water based cultured medium. Bot Mar, 36: 99-102

Zarrouk, C., 1966. Contribution to the study of cyanobacteria, Influence of various physical and chemical factors on growth and photosynthesis is *Spirulina maxima*. PhD thesis, University of Paris.