

آماده انتشار

فربا اکبرزاده کرگان¹، محمدعلی نعمت‌اللهی^{2*}، محمود سلطانی فیروز³، سید ولی حسینی⁴، پویا فرش‌باف آفاجانی⁵

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: Faribaakbarzadeh@ut.ac.ir

*۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: malahi@ut.ac.ir

۳. گروه مهندسی ماشین‌های کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mahsoltani@ut.ac.ir

۴. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hosseinsv@ut.ac.ir

۵. گروه مهندسی ماشین‌های کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: Pouya.Farshbaf@ut.ac.ir

Doi: 10.22069/japu.2025.23774.1961

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴-۰۳-۱۹

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴-۰۵-۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴-۰۵-۲۰

**Fariba Akbarzadeh Kargan¹, Mohammad Ali Nematollahi^{2*}, Mahmoud Soltani Firouz³,
Seyed Vali Hosseini⁴, Pouya Farshbaf Aghajani⁵**

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: Faribaakbarzadeh@ut.ac.ir

2. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: malahi@ut.ac.ir

3. Department of Agricultural Machinery Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mahsoltani@ut.ac.ir

4. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: hosseinsv@ut.ac.ir

5. Department of Agricultural Machinery Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: Pouya.Farshbaf@ut.ac.ir

بهینه‌سازی کشت نانوکروپسیس اوکولاتا: اثرات هم‌افزای تنش شوری و فراصوت برای تولید

زیست‌توده پایدار

خلاصه

زمینه و هدف: پیش‌بینی جمعیت جهانی ۹/۷ میلیارد نفر تا سال ۲۰۵۰، چالش‌های امنیت غذایی، کمبود آب شیرین و پایداری محیط‌زیست را تشدید می‌کند. گزارش‌های سازمان ملل نشان می‌دهند که تولید غذا باید ۷۰ درصد افزایش یابد، اما زمین‌های قابل کشت و آب شیرین محدود هستند. تغییرات اقلیمی مانند خشکسالی و شوری خاک، کشاورزی سنتی را تهدید می‌کنند. نانوکروپسیس اوکولاتا، میکرو جلبکی با ۶۰ درصد پروتئین، اسیدهای چرب ضروری (امگا-۳، EPA) و رنگدانه‌های آنتی‌اکسیدانی (کلروفیل، کاروتنوئید)، راه‌حل‌هایی پایدار برای تغذیه، سوخت زیستی و تصفیه CO₂ ارائه می‌دهد. این گونه در آب شور رشد می‌کند و وابستگی به آب شیرین را کاهش می‌دهد. با این حال، تولید صنعتی آن به دلیل بازده پایین زیست‌توده و هزینه‌های بالا محدود است. تنش شوری (۲۰-۴۰ ppt) متابولیسم را به سمت تولید لیپید هدایت می‌کند و فراصوت با تخریب دیواره سلولی، رشد و استخراج را بهبود می‌بخشد. این مطالعه با هدف بهینه‌سازی کشت نانوکروپسیس اوکولاتا با ترکیب تنش شوری و فراصوت برای افزایش زیست‌توده، کلروفیل و کاروتنوئیدها انجام شد تا به چالش‌های امنیت غذایی، انرژی تجدیدپذیر و پایداری محیط‌زیست پاسخ دهد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در آزمایشگاه فیکولوژی تحت شرایط کنترل‌شده انجام شد. نانوکروپسیس اوکولاتا در بطری‌های ۱ لیتری با محیط f/2 غنی‌شده (سدیم نیترات، فسفات، سیلیکات، ویتامین‌های B12 و بیوتین) کشت شد. شرایط شامل دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد، نور ۵۰۰۰ لوکس با چرخه نور/تاریکی ۱۲ ساعته، pH 8، شوری پایه ۲۰ ppt و هوادهی فیلترشده (فیلتر ۰/۲۲ میکرون) بود. تنش شوری ۲۰ ppt اعمال شد، زیرا مطالعات نشان می‌دهند این سطح تولید لیپید را افزایش می‌دهد. فراصوت با پارامترهای زمان (۱۰-۶۰ ثانیه)، قدرت (۱۰-۳۰ وات) و چرخه وظیفه (۱۰-۱۰۰ درصد) در روزهای اولیه (۰ تا ۹) در ۲۸ تیمار، شامل شاهد بدون فراصوت، اعمال گردید. رشد با چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر)، کلروفیل (۶۵۰ و ۶۶۵ نانومتر)، کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر) و تعداد سلول با پلیت ریدر، اسپکتروفتومتر و میکروسکوپ اندازه‌گیری شد. زیست‌توده با سانتریفیوژ (۳۵۰۰ دور در دقیقه) و خشک‌کردن (آون یا انجمادی) برداشت شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Design Expert و روش‌های آماری ANOVA، Tukey HSD و الگوریتم ژنتیک تحلیل شدند.

یافته‌ها: ترکیب تنش شوری ۲۰ ppt و فراصوت تولید زیست‌توده و رنگدانه‌ها را به طور هم‌افزا بهبود داد. تیمار ۷ (۶۰ ثانیه، ۳۰ وات، ۱۰۰ درصد) کاروتنوئید را به ۱/۹۹۲ µg/mL رساند (شاهد: ۰/۹۲۴ µg/mL)، که نشان‌دهنده تحریک سنتز آنتی‌اکسیدان‌ها است. تیمار ۹ (۱۰ ثانیه، ۳۰ وات، ۱۰۰ درصد) کلروفیل ۶۶۵ نانومتر را به ۱/۹۹۸ µg/mL (شاهد: ۰/۸۹۴ µg/mL)، تیمار ۲۴ (۶۰ ثانیه، ۲۰ وات، ۱۰۰ درصد) کلروفیل ۶۵۰ نانومتر را به ۱/۰۱۴ µg/mL (شاهد: ۰/۷۲۴ µg/mL) و تیمار ۱۷ (۳۰ ثانیه، ۳۰ وات، ۵۵ درصد) چگالی نوری را به ۱/۲۷۲ (شاهد: ۰/۷۷) افزایش داد. تعداد سلول در تیمارهای برتر تا ۱ میلیون سلول در میلی‌لیتر رسید (شاهد: ۰/۳۵ میلیون سلول در میلی‌لیتر). ANOVA تفاوت‌های معنی‌دار ($p < 0.01$) را با F بالا برای کاروتنوئید (۲۱۸.۷۲۴) و کلروفیل (۲۲۷.۰۸۹) تأیید کرد. Tukey HSD برتری تیمارهای ۷، ۹، ۱۶، ۱۷ و ۲۴ را نشان داد. الگوریتم ژنتیک شرایط بهینه مانند تیمار ۱۶ را شناسایی کرد. این نتایج با افزایش ۲۰-۳۰ درصدی بازده لیپید در مطالعات مشابه هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری: تنش شوری و فراصوت به طور هم‌افزا زیست‌توده و رنگ‌دانه‌های نانوکلوپسیس/اوکولاتا را افزایش دادند و موانع تولید صنعتی را رفع کردند. تیمارهای ۷، ۹، ۲۴ و ۱۷ عملکرد برتر داشتند. این روش‌های پایدار و کم‌هزینه برای فوتوبیوراکتورهای صنعتی، تولید غذا، سوخت زیستی و تصفیه CO₂ مناسب‌اند. آزمایش در آب‌های شور (خلیج فارس) برای کاهش وابستگی به آب شیرین پیشنهاد می‌شود، که می‌تواند تولید را در مناطق خشک گسترش دهد.

لغات کلیدی: میکروجلبک‌ها، پایداری محیط‌زیست، امنیت غذایی، فوتوبیوراکتور، بهینه‌سازی آماری.

مقدمه

پیش‌بینی می‌شود جمعیت جهانی تا سال ۲۰۵۰ به ۹/۷ میلیارد نفر برسد، که این امر چالش‌های برآورده کردن نیازهای تغذیه‌ای، انرژی و محیط‌زیستی را تشدید می‌کند (1). سیستم‌های سنتی کشاورزی و دامداری با محدودیت‌هایی مانند زمین‌های قابل کشت محدود، کاهش آب شیرین و اختلالات ناشی از تغییرات اقلیمی مانند خشکسالی و سیل مواجه هستند (2). فعالیت‌های انسانی، از جمله صنعتی‌سازی و بهره‌برداری بیش از حد از منابع، تخریب محیط‌زیست را تشدید می‌کند و باعث انتشار گازهای گلخانه‌ای، آلودگی آب، فرسایش خاک و از دست رفتن تنوع زیستی می‌شوند (3). این مسائل نیازمند راه‌حل‌های پایداری است که به‌طور هم‌زمان امنیت غذایی، نیازهای انرژی و حفظ محیط‌زیست را برآورده کنند (4).

میکروجلبک‌ها، به‌ویژه نانوکلوپسیس اوکولاتا، راه‌حلی امیدوارکننده ارائه می‌دهند. این میکروارگانیسم‌های فتوسنتزی سرشار از پروتئین‌ها (۵۰-۶۰٪ در گونه‌هایی مانند اسپیرولینا و کلرلا)، اسیدهای چرب ضروری (امگا-۳، امگا-۶)، ویتامین‌ها (گروه B، C) و مواد معدنی (آهن، کلسیم، منیزیم) هستند، که آنها را به‌عنوان جایگزین‌های مناسبی برای منابع غذایی سنتی مطرح می‌کند (5-7). محتوای لیپیدی بالای آنها، به‌ویژه اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFAs) مانند ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA)، کاربردهایی در سوخت‌های زیستی، مکمل‌های غذایی و داروسازی دارد (8, 9). میکروجلبک‌ها همچنین با جذب CO₂، تصفیه فاضلاب، بهبود حاصلخیزی خاک، و تولید مواد زیست‌تجزیه‌پذیر، پایداری محیط‌زیست را تقویت می‌کنند (10-13).

با وجود پتانسیل بالای میکروجلبک‌ها، تولید صنعتی آنها به دلیل بازده پایین لیپید، هزینه‌های بالا و وابستگی به حلال‌های شیمیایی مضر برای استخراج با موانعی مواجه است (14, 15). کشت با تغییرات شوری (30-40 ppt) بازده لیپید را با هدایت متابولیسم به سمت سنتز لیپید افزایش می‌دهد، در حالی که رشد زیست‌توده را نیز پشتیبانی می‌کند (16, 17). فناوری فراصوت، با استفاده از امواج با فرکانس بالا برای تخریب دیواره‌های سلولی و تحریک متابولیسم، رشد، تجمع لیپید و کارایی استخراج را بهبود می‌بخشد و در عین حال استفاده از حلال را به حداقل می‌رساند (18-20).

میکروجلبک‌ها ارگانسیم‌های فتوسنتزی هستند که برای اکوسیستم‌های آبی و کاربردهای متنوع در امنیت غذایی، اصلاح محیط‌زیست و محصولات زیستی حیاتی‌اند (21). رشد سریع آنها در محیط‌های کنترل‌شده مانند فوتوبیوراکتورها، بدون نیاز به استفاده گسترده از زمین، آنها را به جایگزین‌های پایداری برای محصولات کشاورزی تبدیل می‌کند (22).

از نظر زیست‌محیطی، میکروجلبک‌ها تغییرات اقلیمی و آلودگی را کاهش می‌دهند. فتوسنتز کارآمد آنها CO_2 را سریع‌تر از گیاهان خشکی جذب می‌کند و گازهای گلخانه‌ای را کاهش می‌دهد (10, 23). آنها فاضلاب را با حذف نیتروژن، فسفر و فلزات سنگین تصفیه می‌کنند و از اوتروفیکاسیون جلوگیری می‌کنند (11). میکروجلبک‌ها به‌عنوان تولیدکنندگان اولیه، با تولید اکسیژن و غذا، تنوع زیستی آبی را پشتیبانی می‌کنند (24). در کشاورزی، آنها به‌عنوان کودهای زیستی عمل می‌کنند و با آزادسازی هورمون‌های رشد، پلی‌ساکاریدها و ویتامین‌ها، جوانه‌زنی بذر، جذب مواد مغذی و مقاومت گیاه را تقویت می‌کنند و وابستگی به کودهای شیمیایی را کاهش می‌دهند (12, 25, 26).

کشت با تغییرات شوری (30-40 ppt) تولید لیپید را بهینه می‌کند (16, 17). شوری، سنتز PUFA را در نانوکلوپسیس اوکولاتا تقویت می‌کند، اما سطوح بیش از حد با اختلال در فتوسنتز، رشد را کاهش می‌دهد (17, 27, 28). برای سازگاری با شوری بالا، میکروجلبک‌ها اسمولیت‌های سازگار (مانند گلیسرول) تولید می‌کنند و سنتز اسیدهای چرب غیراشباع را افزایش می‌دهند، که تقسیم سلولی را برای حفظ انرژی کاهش می‌دهد (27). فراصوت از طریق کاویتاسیون صوتی، کشت و استخراج را بهبود می‌بخشد، نفوذپذیری غشا را افزایش می‌دهد، سنتز لیپید را تحریک می‌کند و فتوسنتز را بهبود می‌بخشد (18-20, 29). استخراج به کمک فراصوت (UAE) سریع‌تر، سازگار با محیط‌زیست و حفظ‌کننده PUFAs در مقایسه با روش‌های مبتنی بر حلال است (18, 30). روش‌های جایگزین مانند استخراج CO_2 فوق بحرانی و میدان‌های الکتریکی پالسی مؤثر اما پرهزینه یا انرژی‌بر هستند (31, 32). مقیاس‌پذیری و کارایی UAE آن را برای کاربردهای صنعتی ایده‌آل می‌کند (33).

هدف کلی این تحقیق، بهینه‌سازی کشت میکروجلبک نانوکلوپسیس اوکولاتا به‌منظور افزایش تولید زیست‌توده پایدار و بهبود بازده تولید رنگ‌دانه‌ها (مانند کلروفیل و کاروتنوئیدها) و لیپیدها با استفاده از ترکیب تنش شوری و فناوری فراصوت است. این مطالعه به دنبال ارائه راه‌حل‌های نوآورانه برای پاسخ به چالش‌های جهانی در زمینه امنیت غذایی، انرژی تجدیدپذیر، و پایداری محیط‌زیست از طریق توسعه روش‌های کشت کارآمد و پایدار میکروجلبک‌ها است. با بهره‌گیری از شوری کنترل‌شده (۲۰ ppt) و فراصوت برای تحریک رشد و متابولیسم، این پژوهش قصد دارد موانع تولید صنعتی

میکروجلبک‌ها، مانند بازده پایین لیپید و هزینه‌های بالا، را برطرف کند و کاربردهای نانوکلوپسیس اوکولاتا در تغذیه انسانی و حیوانی، سوخت‌های زیستی، داروسازی، و بهبود محیط‌زیست را تقویت نماید.

مواد و روش‌ها

طراحی سیستم کشت:

نانوکلوپسیس اوکولاتا در یک سیستم آزمایشگاهی فیکولوژی کنترل‌شده با استفاده از بطری های ۱ لیتری با استوک گونه نانو کلو پس یس کشت شد. شرایط محیطی برای کشت نانوکلوپسیس اوکولاتا بهینه‌سازی شد تا فتوسنتز، تولید زیست‌توده، و سنتز رنگدانه‌ها به حداکثر برسد (۳۴). دما در محدوده ۲۱ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد (°C) تنظیم شد (27, 35). شدت نور ۵۰۰۰ لوکس (lux) با چرخه نور/تاریکی ۱۲ ساعته، با استفاده از لوکس‌متر اندازه‌گیری شد تا سنتز کلروفیل و کاروتنوئیدها تقویت شود (28). شوری محیط روی ۲۰ ppt (٪) نگه داشته شد و با شوری سنج نظارت شد (17). pH محیط روی ۸ ثابت ماند و با pH متر دیجیتال (دقت ± 0.1) ردیابی شد تا از اختلال در رشد جلوگیری شود (16). همچنین، هوادهی از طریق سیستم فیلترشده با فیلتر ۲۲/۰ میکرون تأمین شد تا از آلودگی محیط کشت جلوگیری به عمل آید.

ابزارها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۶ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. ابزارهای غیرقابل اتوکلاو در محلول کلر-آب ذخیره و با آب حاوی تیوسولفات شستشو شدند (36). همچنین از یک محیط کشت بهبودیافته و اتوکلاو شده برای کشت جلبک استفاده شد که روش زیر مواد مورداستفاده شده برای آماده‌سازی این محیط کشت را توصیف می‌کند (۳۷).

محلول F1: برای تهیه محلول F1، مواد شیمیایی در مقادیر مشخص در آب مقطر حل و سپس به نسبت‌های تعیین‌شده ترکیب شدند. در این محلول، از ۱۵ گرم سدیم نترات^۱ در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد. به علاوه، ۱/۱۳ گرم سدیم دی هیدروژن فسفات^۲، ۶ گرم سدیم سیلیکات^۳ و ۸/۳۲ گرم سدیم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید^۴ به آب مقطر اضافه شد. سپس ۶/۳۰ گرم فریک کلرید^۵، ۰/۰۲ گرم سولفات مس^۶، ۰/۰۴۴ گرم زینک سولفات^۷، ۰/۰۲ گرم کبالت ۲ کلرید

¹- NaNO₃

²- NaH₂PO₄·2H₂O

³- Na₂SiO₃·9H₂O

⁴- Na₂EDTA

⁵- FeCl₃·6H₂O

⁶- CuSO₄·۷H₂O

⁷- ZnSO₄·7H₂O

۶ آبه^۸، ۰/۳۶ گرم منگنز کلرید^۹ و ۰/۰۱۲ گرم سدیم مولیبدات^{۱۰} نیز در محلول حل شد. در نهایت، برای تکمیل این محلول، به ازای هر لیتر آب مقطر، ۰/۰۰۰۵ گرم سیانوکوبالامی^{۱۱}، ۰/۰۰۰۵ گرم بیوتین^{۱۲} و ۰/۱ گرم تیامین^{۱۳} اضافه شد.

محلول الف: برای تهیه محلول الف، از ۷۵ گرم سدیم نیترات^{۱۴}، ۵ گرم سدیم دی هیدروژن فسفات^{۱۵} ۲ آبه^{۱۵} و ۳۰ گرم سدیم سیلیکات^{۱۶} آبه^{۱۶} استفاده شد. این ترکیبها در آب مقطر حل و بهدقت مخلوط شد تا محلول یکنواختی به دست آید.

محلول ب: در محلول ب، از ۱ گرم سولفات مس^{۱۷}، ۲/۲ گرم سولفات روی^{۱۸}، ۱ گرم کلریدکوبالت^{۱۹} ۶ آبه^{۱۹}، ۱۸ گرم منگنز کلرید^{۲۰} ۴ آبه^{۲۰} و ۰/۶ گرم سدیم مولیبدات^{۲۱} ۲ آبه^{۲۱} استفاده شد. تمام این مواد در آب مقطر حل و سپس با هم مخلوط شدند.

محلول ج: برای تهیه محلول ج، ۳/۱۵ گرم کلرید آهن^{۲۲} ۶ آبه^{۲۲} و ۴/۳۶ گرم سدیم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید^{۲۳} در آب مقطر حل شدند تا محلول نهایی به دست آید.

کشت و کاربرد فراصوت:

فرایند کشت به گونه ای طراحی شد که تولید زیست توده نانوکلوپسیس اوکولاتا را بهینه کرد. در مرحله اول (رشد زیست توده بدون فراصوت)، میکروجلبکها با نسبت ۱۰٪ استوک به ۹۰٪ محیط تازه در محیطی استریل تلقیح شدند. پس از یک فاز تأخیری ۲-۳ روزه، سلولها وارد فاز رشد نمایی شدند. در این مرحله از فراصوت استفاده نشد تا امکان سازگاری با محیط فراهم شود، و شرایط بهینه - محیط غنی از مواد مغذی، شوری ۳۲٪ و ۵۰۰۰ لوکس - تولید زیست توده را به حداکثر رساند و در مرحله دوم؛ یعنی از روز ۳ام به بعد کشت جلبک با فراصوت تا پایان روز ۹ام انجام شد (۳۸).

⁸- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

⁹- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

¹⁰- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

¹¹- Cyanocobalamin B₁₂

¹²- Biotin

¹³- Thiamine HCl B₁

¹⁴- NaNO_3

¹⁵- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

¹⁶- $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

¹⁷- $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

¹⁸- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

¹⁹- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

²⁰- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

²¹- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

²²- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

²³- Na_2EDTA

برداشت و پردازش نمونه‌ها:

زیست‌توده در فاز ایستا از طریق سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه برداشت شد، تا زیست‌توده را به طور مؤثری از محیط جدا بکند (۳۹). پس از سانتریفیوژ، نمونه‌ها با دو روش خشک شدند: خشک کردن در آون در دمای ۶۰-۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶-۴۸ ساعت، که مقرون‌به‌صرفه اما بالقوه برای ترکیبات حساس مضر است، و خشک کردن انجمادی، شامل انجماد سریع و خشک کردن در خلأ برای حفظ ترکیبات فعال زیستی، که برای تحقیقات ایده‌آل است (۴۰).

اندازه‌گیری پارامترها:

طیف وسیعی از پارامترهای بیولوژیکی و شیمیایی برای ارزیابی تأثیر فراصوت، شوری و شرایط کشت بر نانوکلوپسیس اوکولاتا با استفاده از پروتکل‌های استاندارد و تجهیزات پیشرفته اندازه‌گیری شد. چگالی نوری روزانه در ۷۵۰ نانومتر با استفاده از پلیت ریدر اندازه‌گیری شد تا رشد سلولی ردیابی و منحنی‌های رشد (فازهای تأخیری، نمایی، ایستا، مرگ) ترسیم شوند (۴۱). وزن خشک پس از سانتریفیوژ و خشک‌کردن (آون یا انجمادی) با استفاده از ترازوی دیجیتال (دقت ۰.۰۰۱ گرم) برای تعیین مقدار زیست‌توده مشخص شد (۴۲). شمارش سلولی با استفاده از اسلاید نوبیور و میکروسکوپ نوری، با سه تکرار برای دقت، انجام شد تا رشد جمعیت ارزیابی شود. نیترات و فسفات به‌صورت کالریمتریک به ترتیب در ۵۳۰ نانومتر و ۶۲۰ نانومتر از طریق اسپکتروفتومتر برای نظارت بر مصرف مواد مغذی ضروری کمی شدند. کلروفیل a و b با استفاده از محلول N,N-دی‌متیل‌فورمامید^{۲۴} استخراج و با پلیت ریدر در ۶۵۰-۶۶۵ نانومتر برای ارزیابی ظرفیت فتوسنتزی اندازه‌گیری شد؛ از استون به دلیل احتمال آسیب به نمونه‌ها استفاده نشد (۴۳). کاروتنوئیدها با پلیت ریدر در ۴۷۰ نانومتر برای ارزیابی تولید آنتی‌اکسیدان و پاسخ به تنش کمی شدند (۴۴). تغییرات رنگ به‌صورت بصری و با اسپکتروفتومتری کالریمتریک تحت نور سفید و UV برای مستندسازی ترکیب رنگ‌دانه‌ها و حالت فیزیولوژیکی ارزیابی شد. وزن خشک بدون خاکستر^{۲۵} با وزن‌کردن زیست‌توده خشک‌شده، سوزاندن در ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت و کسر خاکستر برای تعیین محتوای آلی محاسبه شد. این اندازه‌گیری‌ها بینش جامعی از پاسخ میکروجلبک‌ها ارائه داد و امکان بهینه‌سازی دقیق فرایندهای کشت و استخراج را فراهم کرد (۴۵).

²⁴ - DMF
²⁵ - AFDW

کنترل آلودگی:

آلودگی با اتوکلاو کردن ابزارها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۶ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه به حداقل رسید. ابزارهای غیر قابل اتوکلاو در محلول کلر - آب ذخیره و با آب حاوی تیوسولفات شستشو شدند. ظروف کشت با استفاده از اشعه UV به مدت ۲۴ ساعت استریل شدند. یک سیستم هوادهی فیلترشده با فیلتر ۰/۲۲ میکرون از آلودگی میکروبی جلوگیری کرد و محیطی استریل را تضمین کرد (۴۶).

تحلیل آماری:

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Design Expert تحلیل شدند که از طراحی مرکب مرکزی و طراحی داده‌های تاریخی برای بهینه‌سازی شرایط کشت و استخراج استفاده کرد. روش‌های آماری شامل محاسبه میانگین‌ها، انحراف معیار و ANOVA برای ارزیابی اهمیت داده‌ها بود که نتایج قوی را تضمین کرد (36).

جدول ۱ تیمارهای آزمایشی اعمال‌شده برای بهینه‌سازی کشت نانوکلوپسیس اوکولاتا برای افزایش تولید زیست‌توده را شرح می‌دهد. هر تیمار در پارامترهای کاربرد فراصوت - مدت‌زمان (زمان)، شدت (قدرت) و چرخه وظیفه (چرخه) - متفاوت است. تیمار شاهد (۲۸) هیچ فراصوتی دریافت نکرد. این پارامترها به‌صورت سیستماتیک آزمایش شدند تا تأثیر آنها بر معیارهای رشد و رنگدانه، مانند چگالی نوری، کلروفیل و کاروتنوئیدها، تحت شرایط شوری کنترل‌شده (۲۰ ppt) ارزیابی شود. کد تیمار هر ترکیب را به‌صورت منحصربه‌فرد برای ارجاع در تحلیل‌های آماری و مقایسه نتایج شناسایی می‌کند.

جدول ۱- پارامترهای تیمار فراصوت برای کشت نانوکلوپسیس اوکولاتا.

Table 1. Ultrasound treatment parameters for *Nannochloropsis oculata* cultivation.

کد تیمار	روز ^{۳۰}	چرخه ^{۲۹} ، واحد درصد	قدرت ^{۲۸} ، واحد وات	زمان ^{۲۷} ، واحد ثانیه	تیمار ^{۲۶}
1,10,10,10,5	5	10	10	10	1
2,10,10,55,5	5	55	10	10	2
3,10,10,100,5	5	100	10	10	3
4,10,20,10,5	5	10	20	10	4
5,10,20,55,5	5	55	20	10	5

²⁶ - Treatment

²⁷ - Time

²⁸ - Power

²⁹ - Duty Cycle

³⁰ - Day

کد تیمار	روز ^{۳۰}	چرخه ^{۲۹} ، واحد درصد	قدرت ^{۲۸} ، واحد وات	زمان ^{۲۷} ، واحد ثانیه	تیمار ^{۲۶}
6,10,20,100,5	5	100	20	10	6
7,10,30,10,5	5	10	30	10	7
8,10,30,55,5	5	55	30	10	8
9,10,30,100,5	5	100	30	10	9
10,30,10,10,5	5	10	10	30	10
11,30,10,55,5	5	55	10	30	11
12,30,10,100,5	5	100	10	30	12
13,30,20,10,5	5	10	20	30	13
14,30,20,55,5	5	55	20	30	14
15,30,20,100,5	5	100	20	30	15
16,30,30,10,5	5	10	30	30	16
17,30,30,55,5	5	55	30	30	17
18,30,30,100,5	5	100	30	30	18
19,60,10,10,5	5	10	10	60	19
20,60,10,55,5	5	55	10	60	20
21,60,10,100,5	5	100	10	60	21
22,60,20,10,5	5	10	20	60	22
23,60,20,55,5	5	55	20	60	23
24,60,20,100,5	5	100	20	60	24
25,60,30,10,5	5	10	30	60	25
26,60,30,55,5	5	55	30	60	26
27,60,30,100,5	5	100	30	60	27
28,0,0,0,5	5	0	0	0	28

در مقاله، روزهای کشت به عنوان روزهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ذکر شده‌اند، که به ترتیب با روزهای آزمایشی واقعی ۰،

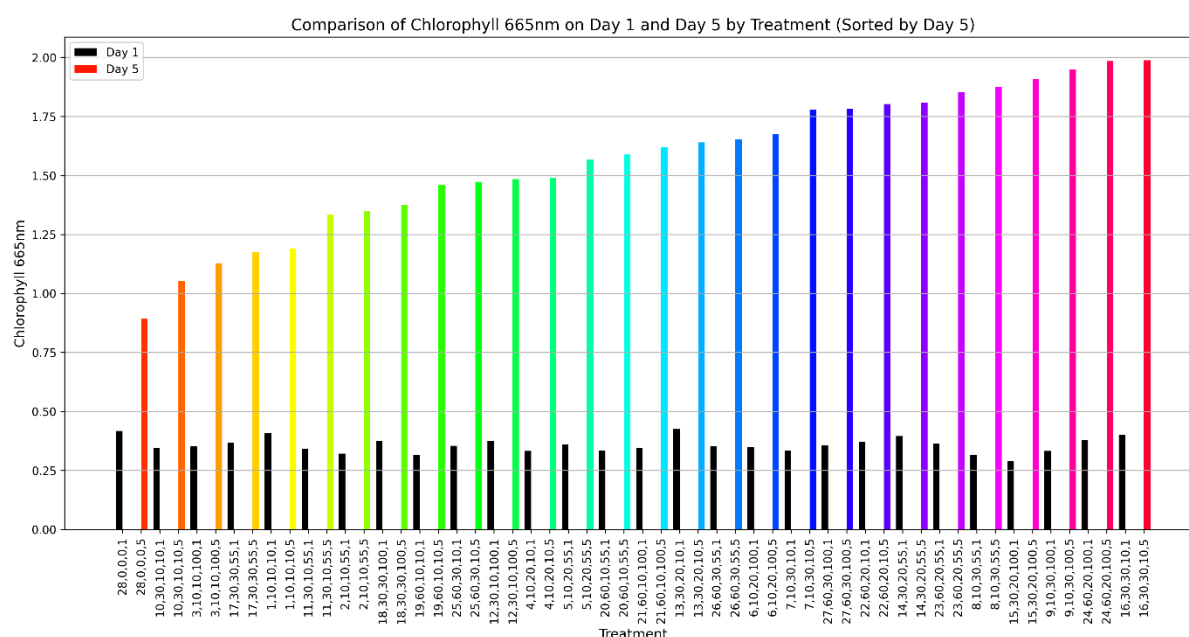
۳، ۵، ۷ و ۹ مطابقت دارند. این نگاشت، تفسیر دقیق معیارهای رشد و رنگدانه (مانند چگالی نوری، کلروفیل، کاروتنوئیدها)

اندازه‌گیری شده در طول مطالعه را تضمین می‌کند.

نتایج و بحث

معیارهای رشد و رنگدانه در روزهای ۱ و ۵ در میان تیمارها:

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود مقدار (درصد) کلروفیل (۶۵۰ نانومتر) از ۰/۳-۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱ روز) به ۰/۷-۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۵ روز) افزایش یافت. تیمار ۲۶ در روز ۵ به ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۵ روز) رسید (از ۰/۳)، در حالی که شاهد (تیمار ۲۸) از ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۰/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت. شوری و فراصوت تجمع کلروفیل را ترویج داد.



شکل ۱- کلروفیل ۶۶۵ نانومتر در روزهای ۱ و ۵ در میان تیمارها.

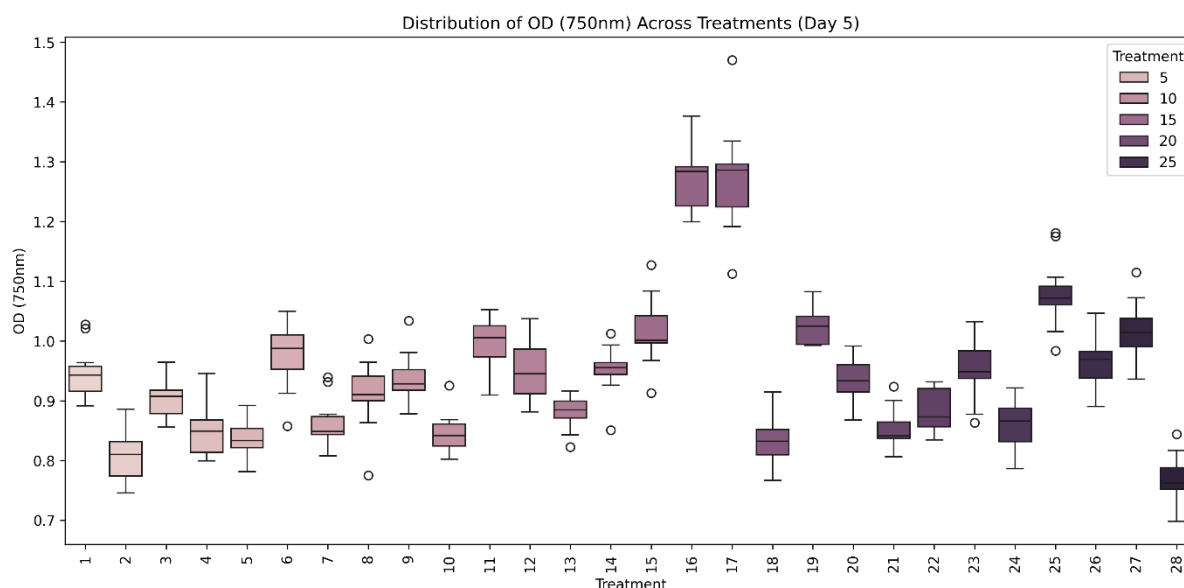
Figure 1. Chlorophyll at 665 nm on days 1 and 5 across treatments.

کلروفیل (۶۶۵ نانومتر) از ۰/۴-۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (روز ۱، میله‌های سیاه) به ۰/۹-۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (روز ۵، میله‌های رنگی) افزایش یافت. تیمار ۲۴ و ۱۶ در روز ۵ به ۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید (از ۰/۳)، در حالی که شاهد (تیمار ۲۸) از ۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۰/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت. شوری و فراصوت تجمع کلروفیل را ترویج داد (شکل ۱). تعداد سلول از ۰/۲ میلیون سلول در میلی‌لیتر (روز ۱) به ۱/۰-۰/۴ میلیون سلول بر میلی‌لیتر (روز ۵) افزایش یافت. تیمار ۱۳ به ۱/۰ میلیون سلول در میلی‌لیتر رسید (از ۰/۴۵)، در حالی که تیمار ۲۸ به ۰/۳۵ میلیون سلول بر میلی‌لیتر رسید (از ۰/۲). فراصوت و شوری تقسیم سلولی را تقویت می‌کنند. چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر) از ۰/۴ تا ۰/۵ (روز ۱) به ۰/۸ تا ۱/۳ (روز ۵) افزایش یافت. تیمار ۱۶ به ۱/۳ رسید (از ۰/۴۵)، در حالی که تیمار ۲۸ به ۰/۸ افزایش

یافت (از ۰/۴). فراصوت و شوری زیست توده را تقویت کرد. کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر) از ۰/۳-۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر (روز ۱) به ۰/۹-۱/۸۵ میکروگرم بر میلی لیتر (روز ۵) افزایش یافت. تیمار ۷ به ۱/۸۵ میکروگرم بر میلی لیتر رسید (از ۰/۴۵)، در حالی که تیمار ۲۸ به ۰/۹ میکروگرم بر میلی لیتر رسید (از ۰/۴۵). شوری و فراصوت سنتز کاروتنوئید را تقویت کرد.

توزیع معیارهای رشد و رنگدانه در میان تیمارها در روز ۵:

کلروفیل (۶۵۰ نانومتر) در میان تیمارها از ۰/۷ تا ۱/۱ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود. تیمار ۹ به ۰/۹۵ میکروگرم بر میلی لیتر رسید، در حالی که تیمار ۲۸ در ۰/۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود.



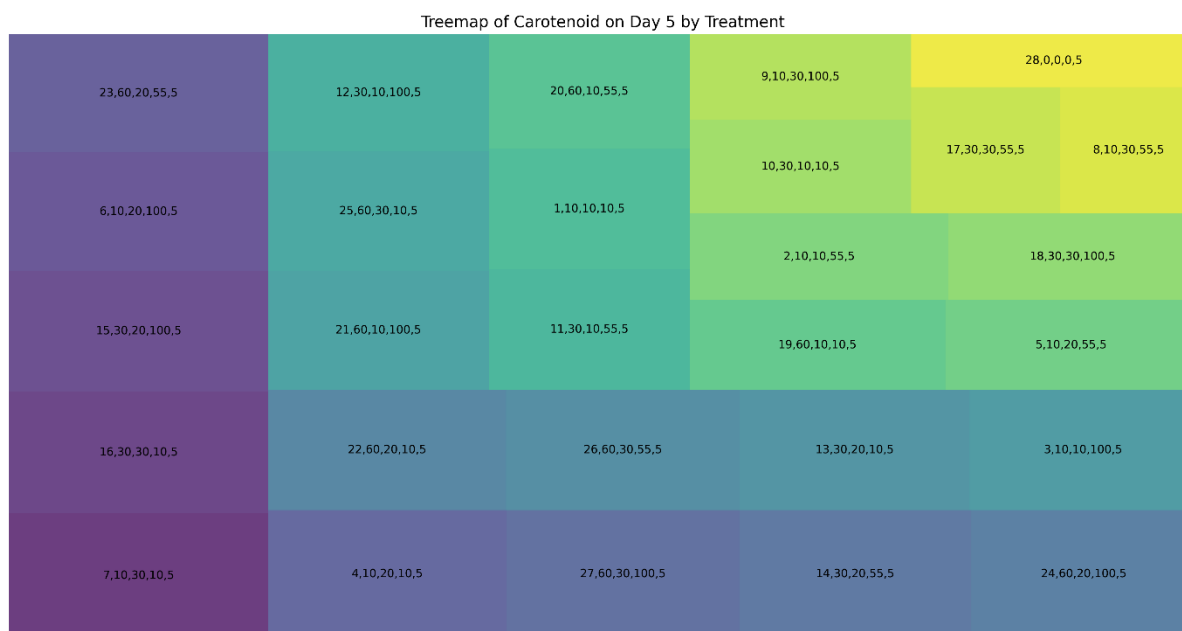
شکل ۲- توزیع چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر) در میان تیمارها (روز ۵).

Figure 2. Distribution of optical density (750 nm) across treatments (day 5).

چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر) در میان تیمارها از ۰/۷ تا ۱/۳ متغیر بود. تیمار ۱۶ و ۱۷ به ۱/۳ رسید، در حالی که تیمار ۲۸ در ۰/۷۵ بود (شکل ۲). کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر) در میان تیمارها از ۰/۵ تا ۲/۰ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود. تیمار ۷ به ۲/۰ میکروگرم بر میلی لیتر رسید، در حالی که تیمار ۲۸ در ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

نقشه درختی معیارهای کلیدی در روز ۵ در میان تیمارها:

شکل ۳ نقشه های درختی برای کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر) در میان ۲۸ تیمار در روز ۵ نشان می دهند. مستطیلها بزرگی معیار را منعکس می کنند، با گرادیان رنگی از بنفش (بالا) به زرد (پایین).



شکل ۳- نقشه درختی کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر).

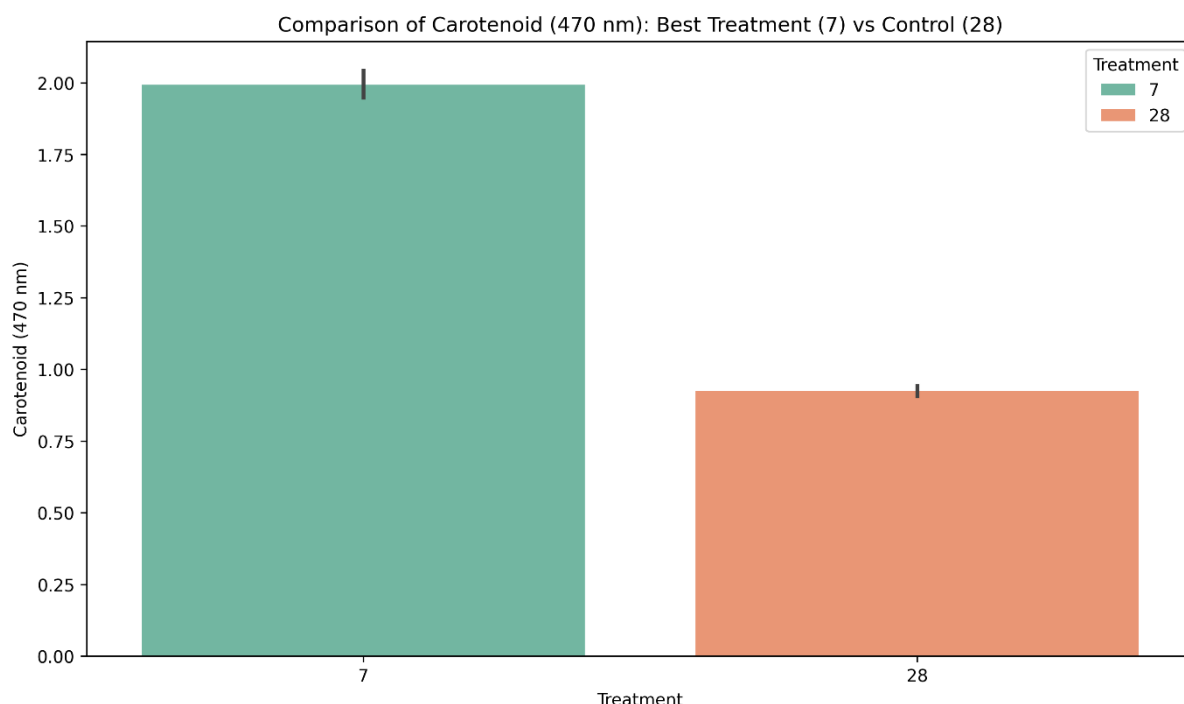
Figure 3. Treemap of carotenoids (470 nm).

تیمار شماره ۷ بالاترین مقدار کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر) را با ۲/۰۷۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و تیمار شماره ۱۶ بالاترین چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر) را با ۱/۳۳۸ در روز ۵ نشان دادند، که با شرایط تنش بالای شوری (۲۰ ppt) و شدت فراصوت (۳۰ وات) هم‌خوانی دارد و تیمار شماره ۲۸ که همان تیمار کنترل می‌شود، پایین‌ترین بود (شکل ۳). تیمارهای شماره ۲۱ و ۲۴ بالاترین میزان وزن خشک بدون خاکستر را به‌ترتیب با مقادیر ۰/۳۷۳ گرم و ۰/۳۶ گرم در روز ۵ به‌دست آوردند، در حالی که تیمار کنترل (شماره ۲۸) با ۰/۱۵ گرم پایین‌ترین مقدار را ثبت کرد. از نظر چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر)، تیمار کنترل (شماره ۲۸) با مقدار ۰/۷۵ در روز ۵ پایین‌ترین میزان را داشت، در حالی که تیمارهای شماره ۱۶ و ۱۷ با مقادیر ۱/۳۸۸ و ۱/۲۷۲ به‌ترتیب بالاترین مقادیر را ثبت کردند. تیمار ۲۸ پایین‌ترین میزان تولید پودر میکروجلبک را با ۰/۱ گرم در روز ۵ ثبت کرد، در حالی که تیمارهای شماره ۳ و ۸ به‌ترتیب با ۰/۳۹۱ گرم و ۰/۳۸۵ گرم بالاترین میزان تولید پودر را در همان روز به‌دست آوردند. از نظر میزان تولید کلروفیل، تیمار کنترل (شماره ۲۸) کمترین مقادیر را در ۶۵۰ نانومتر (۰/۷) میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۶۶۵ نانومتر (۰/۷۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در روز ۵ ثبت کرد. در مقابل، تیمار شماره ۲۳ در کلروفیل ۶۵۰ نانومتر (۱/۱۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و تیمار شماره ۲۴ در کلروفیل ۶۶۵ نانومتر (۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بالاترین مقادیر را به‌دست آوردند. تیمار ۲۸ پایین‌ترین تعداد سلول را با ۰/۳۵ میلیون سلول بر میلی‌لیتر در روز ۵ ثبت کرد، در حالی که تیمار ۱۳ بالاترین تعداد سلول را با ۱ میلیون سلول بر میلی‌لیتر در همان روز به‌دست آورد. نقشه‌های درختی

نشان داد که شرایط با تنش بالا کاروتنوئید و وزن خشک بدون خاکستر را بهینه کرد و چگالی نوری، پودر، کلروفیل و تعداد سلول بالایی را به دست آورد.

مقایسه معیارهای رشد و رنگدانه بین بهترین تیمارها و شاهد در روز ۵:

شکل ۴ نمودارهای میله‌ای را نشان می‌دهند که کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر) را بین بهترین تیمارها و شاهد مقایسه می‌کنند.



شکل ۴- توزیع کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر) بین بهترین تیمار و تیمار کنترل با میله های خطا.

Figure 4. Distribution of carotenoids (470 nm) between the best treatment and control, with error bars.

تیمار ۷ سطح کاروتنوئید حدود ۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را به دست آورد، در مقایسه با شاهد (تیمار ۲۸) که در ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. تیمار ۷ به‌طور قابل‌توجهی در تولید کاروتنوئید از شاهد پیشی گرفت (شکل ۴). تیمار ۲۴ سطح کلروفیل حدود ۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را به دست آورد، در مقایسه با شاهد (تیمار ۲۸) که ۰/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. تیمار ۲۴ بهبود قابل‌توجهی در تولید کلروفیل نسبت به شاهد نشان داد. نمودار کلروفیل (۶۶۵ نانومتر) در تیمار شماره ۹ به ۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید، درحالی که تیمار شاهد کمتر از نصف بهترین تیمار بود (۰/۷۵). تیمار ۱۷ مقدار چگالی نوری حدود ۱/۳ را ثبت کرد، در حالی که شاهد (تیمار ۲۸) در ۰/۸ بود. تیمار ۱۷ برتری آشکاری در معیارهای رشد نسبت به شاهد نشان داد.

نتایج ANOVA برای معیارهای رشد و رنگدانه در میان تیمارها:

برای ارزیابی اهمیت آماری تفاوت‌ها در معیارهای رشد و رنگدانه در میان ۲۸ تیمار، یک تحلیل واریانس (ANOVA) انجام شد. جدول ۲ نتایج ANOVA را برای چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر)، کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر)، کلروفیل (۶۵۰ نانومتر) و کلروفیل (۶۶۵ نانومتر) ارائه می‌دهد. تمام معیارها تفاوت‌های بسیار معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.001$)، با کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر) و کلروفیل (۶۶۵ نانومتر) که بالاترین آمارهای F را داشتند (به ترتیب ۲۱۸/۷۲۴ و ۲۲۷/۰۸۹)، که نشان‌دهنده اثرات قوی تیمار بر تجمع رنگدانه بود. چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر) نیز تغییرات معنی‌داری را نشان داد (۸۱/۲۸۲). $F=0.001$ ، $p<$ ، که منعکس‌کننده تفاوت‌ها در رشد زیست‌توده در میان تیمارها بود. کلروفیل (۶۵۰ نانومتر) آمار F پایین‌تری داشت (۱۵/۵۰۴) اما همچنان معنی‌دار بود ($p < 0.001$)، که نشان‌دهنده اثرات ظریف‌تر تیمار بود.

جدول ۲- نتایج ANOVA برای معیارهای رشد و رنگدانه در میان تیمارها.

Table 2. ANOVA results for growth and pigment metrics across treatments.

مقدار p	آمار F	متغیر
3/303e-123	81/282	چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر)
1/351e-183	218/724	کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر)
9/373e-43	15/504	کلروفیل (۶۵۰)
5/658e-186	227/089	کلروفیل (۶۶۵)

نتایج بهینه‌سازی معیارهای رشد و رنگدانه با استفاده از الگوریتم ژنتیک:

برای شناسایی شرایط بهینه برای حداکثر کردن معیارهای رشد و رنگدانه، یک الگوریتم ژنتیک اعمال شد. تیمار ۱۶ در روز ۴، تکرار ۵، چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر) را در ۱/۳۸۸ به حداکثر رساند (تفاوت: ۰/۵۹۴)، درحالی‌که تیمار ۷ در روز ۵، تکرار ۵، بالاترین کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر) را به ۲/۰۷۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر رساند (تفاوت: ۱/۱۶۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر). برای کلروفیل (۶۵۰ نانومتر) تیمار ۱۴ در روز ۵، تکرار ۳، به ۱/۱۶۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر رسید (تفاوت: ۰/۴۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، و تیمار ۹ در روز ۵، تکرار ۴، کلروفیل (۶۶۵ نانومتر) را در ۲/۰۷۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بهینه کرد (تفاوت: ۱/۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). علاوه بر این، پودر (گرم) و وزن خشک بدون خاکستر (گرم) به ترتیب توسط تیمار ۳ (۰/۳۹۱ گرم) و تیمار ۲۱ (۰/۳۷۳ گرم) در روز ۵، تکرار ۱، به حداکثر رسیدند.

تحلیل پسین Tukey HSD برای معیارهای رشد و رنگدانه در میان تیمارها:

برای کلروفیل (۶۵۰ نانومتر)، تیمار ۲۸ به طور قابل توجهی نسبت به اکثر تیمارها عملکرد ضعیفتری داشت. تیمار ۲۴، که به عنوان بهترین شناسایی شد، تفاوت‌های معنی‌داری با شاهد و چندین تیمار دیگر نشان داد، اما با دیگر تیمارهای با عملکرد بالا مانند تیمار ۱۴ تفاوت معنی‌داری نداشت، که نشان‌دهنده کارایی مشابه در میان تیمارهای برتر بود.

برای چگالی نوری (۷۵۰ نانومتر)، تیمار ۲۸ به طور قابل توجهی توسط اکثر تیمارها پیشی گرفته شد. تیمارهای ۱۶ و ۱۷، که بهینه هستند، تفاوت‌های معنی‌داری با شاهد نشان می‌دادند اما با یکدیگر تفاوت نداشتند، که نشان می‌دهد آنها سطوح زیست‌توده بالایی را تحت شرایط بهینه مانند شوری بالاتر و شدت فراصوت به دست آوردند.

برای کلروفیل (۶۶۵ نانومتر)، تیمار ۲۸ تفاوت‌های معنی‌داری با اکثر تیمارها نشان داد، که عملکرد برتر آن در تولید رنگدانه را تقویت کرد.

برای کاروتنوئید (۴۷۰ نانومتر)، تیمار ۲۸ به طور قابل توجهی از اکثر تیمارها متفاوت بود. تیمار ۷ تفاوت‌های معنی‌داری با شاهد و بسیاری دیگر نشان داد. به طور قابل توجه، تیمار ۸ نیز به طور معنی‌داری از تیمار ۲۸ متفاوت بود.

این نتایج روندهای مشاهده شده در بخش‌های قبلی را تأیید کردند که نشان دادند بهترین تیمارها به طور قابل توجهی از شاهد و بسیاری از تیمارهای دیگر پیشی گرفتند که توسط شرایط بهینه مانند شوری و قرارگرفتن در معرض فراصوت هدایت شدند.

به طور کلی، تحلیل Tukey HSD یافته‌های بخش‌های قبلی را تثبیت کردند و به طور آماری عملکرد برتر تیمارها را نسبت به شاهد (تیمار ۲۸) در تمام معیارها تأیید کردند. عدم وجود تفاوت‌های معنی‌دار در میان تیمارهای با عملکرد برتر برای هر معیار نشان دادند که شرایط متعدد تیمار می‌توانند به نتایج بهینه دست یابند و انعطاف‌پذیری را برای استراتژی‌های کشت میکروجلبک‌ها فراهم کردند.

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از تنش شوری و فناوری فراصوت به طور هم‌زمان می‌تواند به طور چشمگیری تولید زیست‌توده و رنگدانه‌ها را در نانوکروپسیس اوکولاتا افزایش دهد. ترکیب این دو عامل باعث بهبود معیارهای مختلف رشد مانند چگالی نوری، تولید کلروفیل و کاروتنوئیدها شد. نتایج به دست آمده از تحلیل‌های آماری (ANOVA و Tukey HSD) نیز برتری تیمارهای تحت تأثیر فراصوت و شوری بالا را نسبت به تیمار شاهد تأیید کردند. به

طور خاص، تیمارهای شماره ۷، ۹، ۲۴، و ۱۷ عملکرد بهتری در تولید رنگدانه‌ها و زیست‌توده نسبت به دیگر تیمارها نشان دادند. این تحقیق همچنین اهمیت استفاده از روش‌های بهینه‌سازی مانند فراصوت و تنش شوری برای بهبود تولید زیست‌توده در کشت نانوکلوپسیس اوکولاتا را برجسته می‌کند. به‌کارگیری این روش‌ها در مقیاس صنعتی می‌تواند تولید پایدار و کارآمد میکروجلبک‌ها را بهبود بخشد. این رویکرد در پاسخ به چالش‌های جهانی امنیت غذایی، انرژی تجدیدپذیر و پایداری محیط‌زیست مؤثر است. به‌طور کلی، این مطالعه می‌تواند راه‌حل‌های نوآورانه‌ای برای بهینه‌سازی فرآیندهای تولید زیست‌توده میکروجلبک‌ها در شرایط صنعتی فراهم آورد.

پیشنهادهای

پیشنهاد می‌شود برای گسترش کاربرد این تحقیق، آزمایش‌های مشابهی در آب‌های با شوری بالاتر، مانند آب دریای خلیج فارس، انجام شود. استفاده از آب‌های شور برای کشت میکروجلبک‌ها می‌تواند یک راه‌حل پایدار برای کاهش وابستگی به منابع آب شیرین باشد که در بسیاری از مناطق جهان محدود هستند. در این راستا، بررسی عملکرد نانوکلوپسیس اوکولاتا در آب‌های با شوری بالا و مقایسه نتایج با این مطالعه، می‌تواند اطلاعات مفیدی در اختیار پژوهشگران و صنعتگران قرار دهد تا بتوانند فرایندهای کشت و تولید زیست‌توده را بهینه‌سازی کرده و از منابع آب‌شور به طور مؤثرتر استفاده نمایند. این تحقیقات می‌توانند به توسعه راهکارهای نوآورانه برای مقابله با چالش‌های زیست‌محیطی و کمبود منابع آب شیرین کمک کنند.

منابع

1. Schmidhuber, J. and F.N. Tubiello. (2007). Global food security under climate change. *Proceedings of the national academy of sciences*, 104(50), 19703-19708. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0701976104>
2. Tahir, F., et al. (2024). Emerging trends in algae farming on non-arable lands for resource reclamation, recycling, and mitigation of climate change-driven food security challenges. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 23(3), 869-896. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11157-024-09697-0>
3. Staudinger, M.D., et al. (2012). Impacts of climate change on biodiversity, ecosystems, and ecosystem services. *United States Global Change Research Program, Washington, DC*, 4.
4. Biswas, R.K. and A.K. Choudhury. (2024). Climate Change: Deducing the Importance of Algae as a Significant Tool for Mitigation of the Eminent Threat of Climate Induced Changes of Environment. In *Algae as a Natural Solution for Challenges in Water-Food-Energy Nexus: Toward Carbon Neutrality* (pp. 891-901). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-97-2371-3_33
5. Chen, C., et al. (2022). The potential and challenge of microalgae as promising future food sources. *Trends in Food Science & Technology*, 126, 99-112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.016>

6. Wu, J.Y., et al. (2023). The utility of algae as sources of high value nutritional ingredients, particularly for alternative/complementary proteins to improve human health. *Frontiers in nutrition*, 10, 1277343. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1277343>
7. Tang, G. and P.M. Suter. (2011). Vitamin A, nutrition, and health values of algae: Spirulina, Chlorella, and Dunaliella. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 1(2), 111-118. <https://doi.org/https://doi.org/10.6000/1927-5951.2011.01.02.04>
8. Oliver, L., et al. (2020). Producing omega-3 polyunsaturated fatty acids: A review of sustainable sources and future trends for the EPA and DHA market. *Resources*, 9(12), 148. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/resources9120148>
9. Kumari, A., S. Pabbi, and A. Tyagi. (2024). Recent advances in enhancing the production of long chain omega-3 fatty acids in microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(29), 10564-10582. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2226720>
10. Benemann, J.R. (1997). CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy conversion and management*, 38, S475-S479. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0196-8904\(96\)00313-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0196-8904(96)00313-5)
11. Razzak, S.A., et al. (2013). Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 27, 622-653. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.063>
12. Osorio-Reyes, J.G., et al. (2023). Microalgae-based biotechnology as alternative biofertilizers for soil enhancement and carbon footprint reduction: Advantages and implications. *Marine Drugs*, 21(2), 93. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md21020093>
13. Malik, A., et al. (2015). Hybrid life-cycle assessment of algal biofuel production. *Bioresource technology*, 184, 436-443. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.132>
14. Barkia, I., N. Saari, and S.R. Manning. (2019). Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine drugs*, 17(5), 304. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md17050304>
15. Lee, S.Y., et al. (2021). Techniques of lipid extraction from microalgae for biofuel production: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 231-251. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10311-020-01088-5>
16. Aziz, M.M.A., et al. (2020). Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109621. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621>
17. Pal, D., et al. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1429-1441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-011-3170-1>
18. Araujo, G.S., et al. (2013). Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 95-98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.027>
19. Krishnamoorthy, A., C. Rodriguez, and A. Durrant. (2023). Optimisation of ultrasonication pretreatment on microalgae *Chlorella Vulgaris* & *Nannochloropsis Oculata* for lipid extraction in biodiesel production. *Energy*, 278, 128026.
20. Deng, Y., et al. (2022). Ultrasound-assisted extraction of lipids as food components: Mechanism, solvent, feedstock, quality evaluation and coupled technologies—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 122, 83-96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.034>
21. Fernandes, T. and N. Cordeiro. (2021). Microalgae as sustainable biofactories to produce high-value lipids: biodiversity, exploitation, and biotechnological applications. *Marine drugs*, 19, 593. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md19100573>
22. Mahmood, T., et al. (2023). Sustainable production of biofuels from the algae-derived biomass. *Bioprocess and biosystems engineering*, 46(8), 1077-1097. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00447-023-01049-4>
23. Molazadeh, M., et al. (2019). The use of microalgae for coupling wastewater treatment with CO₂ biofixation. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 42. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00042>

24. Geremia ,E., et al. (2021). A review about microalgae wastewater treatment for bioremediation and biomass production—a new challenge for Europe. *Environments*, 8(12), 136. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/environments8120136>
25. Ramakrishnan, B., et al. (2020). Potential of microalgae and cyanobacteria to improve soil health and agricultural productivity: a critical view. *Environmental Science: Advances*, 2(4), 586-611. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/D2VA00158F>
26. Sen, S.K., et al. (2025). Role of Soil Algae in the Maintenance of Soil Fertility and Soil Health. In *Soil Algae: Morphology, Ecology and Biotechnological Applications* (pp. 293-304). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-97-9873-5_9
27. Bartley, M.L., et al. (2020). Optimization of environmental parameters for *Nannochloropsis salina* growth and lipid content using the response surface method and invading organisms. *Journal of applied phycology*, 28, 15-24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-015-0567-8>
28. Chen, B., et al. (2017). Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. *Bioresource technology*, 244, 1198-1206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.110>
29. Hui, G.T., T.K. Meng, and M.A. Kassim. (2023). Green ultrasonication-assisted extraction of microalgae *Chlorella* sp. for polysaturated fatty acid (PUFA) rich lipid extract using alternative solvent mixture. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46(10), 1499-1512. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00449-023-02917-x>
30. Phan, T.M., et al. (2023). Ultrasound-Assisted Lipid Extraction from *Chlorella* sp.: Taguchi Design and Life Cycle Assessment. *Molecular Biotechnology*, 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12033-023-00836-6>
31. Patel, A., et al. (2020). Extraction of lipids from algae using supercritical carbon dioxide. In *Green sustainable process for chemical and environmental engineering and science* (pp. 17-39). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817388-6.00002-7>
32. Martínez, J.M., et al. (2020). Pulsed electric field- assisted extraction of valuable compounds from microorganisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 5-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12512>
33. Alpural, A., B. Dincoglu, and E. Imamoglu. (2024). Ultrasound-assisted extraction vs. microwave-assisted extraction for sustainable development goals: Selecting the ideal lipid extraction and fatty acid profile. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 205, 110035. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cep.2024.110035>
34. Andriopoulos, V., et al. (2022). Production of Antioxidants and High Value Biomass from *Nannochloropsis oculata*: Effects of pH, Temperature and Light Period in Batch Photobioreactors. *Marine Drugs*, 20(9)
35. Mienis, E., D. Vandamme, and I. Foubert. (2024). Resuspended freeze-dried *Nannochloropsis* as a model laboratory system for concentrated fresh *Nannochloropsis* in ultrasound cell disruption experiments. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1359090. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1359090>
36. Njoku, C.N. and S.K. Otisi. (2023). Application of central composite design with design expert v13 in process optimization. In *Response Surface Methodology-Research Advances and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109704>
37. ElBarmelgy, A., M.M. Ismail, and H. Sewilam. (2021). Biomass productivity of *Nannochloropsis* sp. grown in desalination brine culture medium. *Desalination and Water Treatment*, 216, 306-314. <https://doi.org/https://doi.org/10.5004/dwt.2021.26848>
38. Gkioni, M.D., et al. (2022). Ultrasound-assisted extraction of *Nannochloropsis oculata* with ethanol and betaine: 1, 2-propanediol eutectic solvent for antioxidant pigment-rich extracts retaining nutritious the residual biomass. *Antioxidants*, 11(6), 1103. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox11061103>
39. Sales, R., R.B. Derner, and M.Y. Tsuzuki. (2019). Effects of different harvesting and processing methods on *Nannochloropsis oculata* concentrates and their application on rotifer

- Brachionus sp. cultures. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3607-3615. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-019-01877-8>
40. Coleman, B., et al. (2023). The effect of drying, cell disruption and storage on the sensory properties of Nannochloropsis sp. *Algal Research*, 71, 103092. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103092>
 41. Ambriz-Pérez, D.L., et al. Accurate method for rapid biomass quantification based on specific absorbance of microalgae species with biofuel importance. (1472-765X (Electronic)). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/lam.13519>
 42. Borges, L., et al. (2016). Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga Nannochloropsis oculata. *Aquaculture Reports*, 4, 164-168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.10.004>
 43. Gitelson, A.A., et al. Optical properties of Nannochloropsis sp and their application to remote estimation of cell mass. (0006-3592 (Print)). [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20000905\)69:5%3C516::aid-bit6%3E3.0.co;2-i](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0290(20000905)69:5%3C516::aid-bit6%3E3.0.co;2-i)
 44. Wan Razali, W.A., C.A. Evans, and J. Pandhal. (2022). Comparative proteomics reveals evidence of enhanced EPA trafficking in a mutant strain of Nannochloropsis oculata. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 838445. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.838445>
 45. Han, K.H., et al. (۲۰۲۵) .Exploration of a cultivation strategy to improve eicosapentaenoic acid (EPA) production and growth of a Korean strain of Nannochloropsis oceanica cultivated under different light sources. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 18(1), 55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13068-025-02660-3>
 46. Obeid, S. (2018). Ecodesign process for microalgae fractionation: use of supercritical CO₂, membrane technology and low frequency ultrasounds .

Optimization of Nannochloropsis oculata Cultivation: Synergistic Effects of Salinity Stress and Ultrasound for Sustainable Biomass Production

Abstract

Background and Objective: The projected global population of 9.7 billion by 2050 intensifies challenges related to food security, freshwater scarcity, and environmental sustainability. United Nations reports indicate that food production must increase by 70%, yet arable land and freshwater resources are limited. Climate change, including drought and soil salinity, threatens traditional agriculture. Nannochloropsis oculata, a microalga with 60% protein, essential fatty acids (omega-3, EPA), and antioxidant pigments (chlorophyll, carotenoids), offers sustainable solutions for nutrition, biofuel, and CO₂ sequestration. This species thrives in saline water, reducing dependence on freshwater. However, its industrial production is limited by low biomass yields and high costs. Salinity stress (20–40 ppt) directs metabolism toward lipid production, while ultrasound, by disrupting cell walls, enhances growth and extraction efficiency. This study aimed to optimize Nannochloropsis oculata cultivation using a combination of salinity stress and ultrasound to increase biomass, chlorophyll, and carotenoid production, addressing challenges in food security, renewable energy, and environmental sustainability.

Materials and Methods: This research was conducted in a controlled phycology laboratory. Nannochloropsis oculata was cultivated in 1-liter flasks with enriched f/2 medium (containing sodium nitrate, phosphate, silicate, and vitamins B12 and biotin). Conditions included a temperature of 24°C, light intensity of 5000 lux with a 12-hour light/dark cycle, pH 8, baseline salinity of 20 ppt, and filtered aeration (0.22-micron filter). A salinity stress of 20 ppt was applied, as studies indicate this level enhances lipid production. Ultrasound was applied with varying parameters: duration (10–60 seconds), power (10–30 watts), and duty cycle (10–100%) over the initial days (0 to 9) across 28 treatments, including a control without ultrasound. Growth was measured by optical density (750 nm), chlorophyll (650 and 665 nm), carotenoids (470 nm), and cell counts using a plate reader, spectrophotometer, and microscope. Biomass was harvested via centrifugation (3500 rpm) and dried (oven or freeze-drying). Data were analyzed using Design Expert software and statistical methods including ANOVA, Tukey HSD, and a genetic algorithm.

Results: The combination of 20 ppt salinity stress and ultrasound synergistically improved biomass and pigment production. Treatment 7 (60 seconds, 30 watts, 100%) increased carotenoid content to 1.992 µg/mL (control: 0.924 µg/mL), indicating enhanced antioxidant synthesis. Treatment 9 (10 seconds, 30 watts, 100%) raised chlorophyll at 665 nm to 1.998 µg/mL (control: 0.894 µg/mL), Treatment 24 (60 seconds, 20 watts, 100%) increased chlorophyll at 650 nm to 1.014 µg/mL (control: 0.724 µg/mL), and Treatment 17 (30 seconds, 30 watts, 55%) elevated optical density at 750 nm to 1.272 (control: 0.77). Cell counts in the best treatments reached 1 million cells per milliliter (control: 0.35 million cells per milliliter). ANOVA confirmed significant differences ($p < 0.01$) with high F-values for carotenoids (218.724) and chlorophyll (227.089). Tukey HSD tests demonstrated the superiority of Treatments 7, 9, 16, 17, and 24. The genetic algorithm identified optimal conditions, such as those in Treatment 16. These results align with a 20–30% increase in lipid yield reported in similar studies.

Conclusion: Salinity stress and ultrasound synergistically enhanced biomass and pigment production in *Nannochloropsis oculata*, overcoming barriers to industrial production. Treatments 7, 9, 24, and 17 exhibited superior performance. These sustainable, cost-effective methods are suitable for industrial photobioreactors, supporting food production, biofuel, and CO₂ sequestration. Experiments in saline waters (e.g., Persian Gulf) are recommended to reduce reliance on freshwater, potentially expanding production in arid regions.

Keywords: Microalgae, Environmental Sustainability, Food Security, Photobioreactor, Statistical Optimization.