بررسی اثرات EDTA بر میزان رشد،کلروفیل و کاروتنوئیدهای میکروجلبک *Nannochloropsis oculata*

عذرا سلیمانی[۱]
سیده زهرا معصومی زاده[۲*]

۱ گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی ، اهواز، ایران.
۲. گروه علوم و فناوری‌های زیستی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی ، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات
Zahramasoomi@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۸

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

نانوکلروپسیس اکولاتا یکی از ارزشمندترین گونه‌های ریز جلبکی به‌منظور استفاده در آبزی‌پروری، بیودیزل و صنایع غذایی است. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف EDTA بر روی رشد و رنگیزه‌های میکروجلبک *Nannochloropsis oculata* انجام شده است. این مطالعه در سال ۱۳۹۹ و طی ۲۱ روز و در محیطی با دمای ۱±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، شدت نور ۲۵۰۰ لوکس (و دوره نوری ۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و هوادهی ۲۴ ساعته با سه تکرار انجام شد. محیط کشت پایه TMRL با مقادیر ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۴، ۰/۰۸ و ۰/۱۲ گرم بر لیتر از محلول EDTA و شوری آب ppt ۲۵ بود. تراکم جلبکی و میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها اندازه‌گیری شدند. بیشترین میزان کلروفیل a در روز پانزدهم تیمار (۰/۱۲ گرم بر لیتر)بود و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. ولی افزایش EDTA اثر افزایشی بر میزان b نداشت و بیشترین مقدار مربوط به روز هفتم و تیمار ۰/۰۸ گرم بر لیتر بود. بیشترین میزان کاروتنوییدها تیمار۰/۱۲ و روز سیزدهم بود. بیشترین تراکم سلولی مربوط به روز پانزدهم و تیمار ۰/۱۲ گرم بر لیتر بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد افزایش EDTA سبب افزایش میزان رنگیزه‌ها، رشد سلولی و افزایش مدت زمان فاز لگاریتمی می‌شود که احتمالاً به دلیل افزایش pH محیط ، افزایش کلات یون‌ها و درنتیجه جذب بهتر نیترات توسط میکروجلبک است.

واژگان کلیدی: ***Nannochloropsis oculata***، رشد، رنگیزه، کاروتنوئید، کلروفیل، EDTA

مقدمه

Nannochloropsis یک میکروجلبک دریایی است که دارای کلروفیل a و مقدار نسبتاً زیادی اسیدهای چرب ایکوزا پنتانوئیک اسید است (Babuskin *et al.*, 2014). غیر متحرک با رنگ متمایل به سبز بدون تاژک، باسلول‌های کوچک گرد با قطر ۶-۴ میکرون بوده، کلروپلاست بیشتر حجم سلول را اشغال کرده است. سلول‌ها تمایل دارند در محیط کشت شناور شوند و بدون هوادهی در کشت معلق می‌مانند. یکی دیگر از ویژگی‌های بارز ریز جلبک نانوکلروپسیس غنی بودن از رنگدانه‌های کاروتنوئیدی است که اهمیت به سزایی در مهار کردن و از بین بردن رادیکال‌های آزاد و پایان دادن به زنجیره تولید این رادیکال‌ها در سلول دارد (Lobo *et al.*, 2010).

اتیلن دی‌امین تترا استات (EDTA) یک اسید کربوکسیلیک پلی‌امین نوعی ترکیب چنگالی است که در تغذیه انسانی از آن برای افزودن به بعضی از غذاها به‌منظور باند شدن با مواد غذایی کم‌نیاز که عامل توسعه رنگ و طعم نامناسب هستند استفاده می‌شود. همچنین ممکن است به‌طور خوراکی یا تزریقی مصرف گردد تا با بعضی مواد معدنی کم‌نیاز ترکیب شود و آنها را از بدن توسط ادرار یا مدفوع خارج کند (Jacob *et al.*, 2015). این ترکیب می‌تواند با کلسیم، مس، آهن، روی و دیگر فلزات ترکیبات چنگالی تشکیل داده و از خروج آن‌ها از محیط جلوگیری کرده و آن‌ها را در دسترس موجودات برای رشد قرار دهد. همچنین افزودن این ماده به‌عنوان شلاتورها به محیط کشت به دو منظور صورت می‌گیرد، اولا با اتصال شلاتورها به یون‌های موجود در محیط کشت از اتصال آنها به عوامل دیگری مانند فسفات‌ها و

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-04-28]

درنتیجه رسوب آنها جلوگیری می‌شود. ثانیا فرم شلات شده بعضی از یون‌ها مثل آهن در شرایط قلیایی در مقایسه با املاح دیگری پایداری بیشتری از خود نشان می‌دهد (Dou *et al*., 2013).

Satpati و همکاران (۲۰۱۶)، کارآمدی EDTA را بر روی بیومس و ذخیره لیپید بر روی دو ریز جلبک *Chlorococcum infusionum* و *Chlorella ellipsoidea* را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۱ گرم بر لیتر مورد بررسی قرار گرفت. میزان لیپید با افزایش سطح EDTA تا ۰/۰۸ گرم بر لیتر افزایش یافت اما با افزایش آن روندی کاهشی به خود گرفت. Mohan و همکاران (۲۰۱۲)، بیومس و تولید دیاتومه‌های دریایی *Amphiprora paludosa* را در غلظت‌های مختلف Fe-EDTA مورد بررسی قرار دادند. جلبک‌های حداکثر تولید بیومس (۳۳۰ میلی‌گرم بر لیتر) را در ۰/۰۷۵ میلی‌مول سدیم فسفات جایی که حداکثر محتوی لیپید کل ۶۵/۶۴ درصد وزن خشک بود در غلظت ۰/۰۲۶ میلی‌مول Fe-EDTA داشتند. غوابشی (۱۳۹۸) اثرات مقادیر ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۴، ۰/۰۸ و ۰/۱۲ گرم بر لیتر EDTA را بر میزان فلزات سنگین (سرب، کادمیوم، آهن و آرسنیک)، BOD ، COD پساب بیمارستانی بررسی کرد و اثرات کاهشی در میزان تمام فلزات سنگین را مشاهده نمود . بیشترین کاهش مربوط به سرب و تیمار ۰/۱۲ گرم بر لیتر و کمترین اثر کاهشی مربوط به آرسنیک و در همین غلظت بود. با افزایش EDTA اثرات افزایشی معنی‌داری بر میزان BOD و COD مشاهده نشد. تعداد گزارشات در دسترس بر روی تاثیر EDTA بر روی رشد و تولید چربی در ریز جلبک‌ها بسیار محدود است. ازاین‌رو در مطالعه‌ی حاضر تاثیر غلظت‌های مختلف EDTA بر روی رشد و تغییرات کلروفیل جلبک *Nannochloropsis oculata* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

استوک جلبک *Nannochloropsis oculata* از مرکز تکثیر آبزیان بندر لنگه و در جعبه‌های یونولیتی به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی اهواز منتقل شدند. محیط کشت TMRL با مقادیر ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۴، ۰/۰۸ و ۰/۱۲ گرم بر لیتر از محلول EDTA در تیمارها استفاده شد(جدول ۱). از ظروف ۱/۵ لیتری آب معدنی که با استفاده از الکل استریل شده بودند، استفاده شد. مقادیر تعیین شده برای هر محیط کشت در ۸۰۰ سی‌سی آب مقطر با شوری ppt ۲۵ حل گردید و پس از هوادهی به هر محیط کشت ۲۰۰ سی‌سی از استوک جلبکی *Nannochloropsis oculata* اضافه شد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

جدول ۱ : محیط کشت TMRL تغییر یافته و تیمارهای EDTA

محلول	ماده		مقدار
A	نیترات پتاسیم		۱۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر
B	ارتوفسفات سدیم		۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر
C	کلرید آهن		۰/۳ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر
D	EDTA	تیمار ۱	۰ گرم بر لیتر
		تیمار ۲	۰/۰۱ گرم بر لیتر
		تیمار ۳	۰/۰۴ گرم بر لیتر
		تیمار ۴	۰/۰۸ گرم بر لیتر
		تیمار ۵	۰/۱۲ گرم بر لیتر

در طول این آزمایش محیط کشت TMRL تحت تیمار نوری ۱۲۰ ± ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفت. دوره نوردهی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. هوادهی ۲۴ ساعته و با استفاده از پمپ آکواریوم و به کمک رابط‌های تنظیمی هوا انجام شد . دما در طول این آزمایش ثابت و ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. نمونه‌برداری در روزهای دوم، چهارم، ششم، هشتم، دهم، دوازدهم و چهاردهم انجام شد. جهت

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-04-28]

شمارش سلول‌های جلبکی یک قطره از تیمار جلبکی به‌طور یکسان روی لام هموسیتومتر پخش و لایه‌ی نازکی تشکیل شد. جهت شمارش سلولی در تراکم زیاد از روش زیر استفاده می‌شود:

سلول‌های موجود در مربع وسطی که دارای تقسیمات مضاعف است در نظر گرفته می‌شود. بدین ترتیب که سلول‌های موجود در ۵ مربع کوچک‌تر (۴ تا در گوشه و یکی در مرکز) شمرده می‌شود. سپس تراکم سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود (Haran , 1992):

تعداد کل سلول‌ها در ۲۵ مربع = تعداد سلول‌ها در ۵ مربع × ۵

تعداد کل سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت= $۱۰^{۴}$×تعداد کل سلول‌ها در ۲۵ مربع

از سانتریفیوژ با دور ۸۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه جهت جداسازی جلبک‌ها از محیط کشت استفاده شد. استخراج کلروفیل از جلبک‌ها بر اساس روش Yang و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد. ۱۰ میلی‌گرم جلبک با ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط استون- آب به نسبت (۴: ۱) هموژن و به مدت ۲ دقیقه تا زمان یکنواخت شدن هم زده شد. مخلوط به دست آمده با کمک دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (Sigma3-30K) با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. میزان کلروفیل‌ها در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۵۳، ۶۶۶ و ۴۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل DR2800 (آلمان) قرائت گردید و با استفاده از فرمول‌های زیر مقدار رنگیزه‌ها محاسبه شد (Yang *et al*., 1998).

Chlorophyll a (µg/ml) = 12.25 A_{663} -2.25 A_{653}
Chlorophyll b (µg/ml) = 20.31 A_{653}- 2.25 A_{666}
Total Carrotenoids (µg/ml) = (1000 A_{470} – 2.860 Chl a – 12.29 Chl b)/245

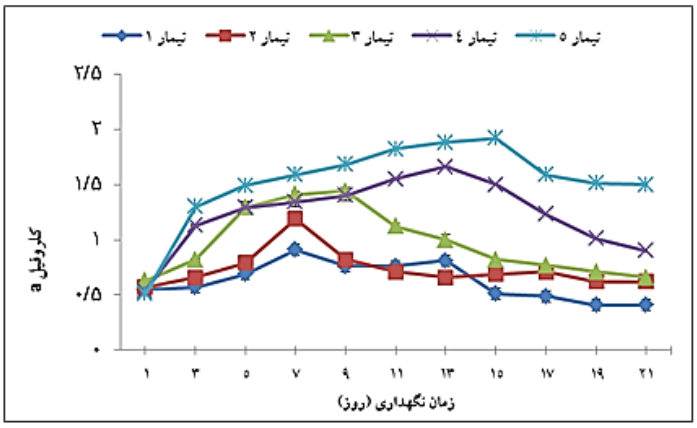
برای مقایسه نتایج به دست آمده از نرم‌افزار SPSS 23 استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک بررسی شد. نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی مورد بررسی قرار گرفتند. تمام آنالیزهای آماری در سطح ۰/۰۵ انجام شد. نمودارهای نیز با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم گردید.

نتایج

اثرات EDTA در میزان رنگیزه کلروفیل a میکروجلبک *Nannochloropsis oculata*

روند تغییرات میزان کلروفیل a جلبک نانوکلروپسیس تحت تاثیر مقادیر مختلف EDTA در نمودار ۱ نشان داده شده است. در تیمار ۱، میزان کلروفیل تا روز هفتم افزایش (۰/۹۱- ۰/۵۵ میکروگرم بر لیتر) و پس از روندی کاهشی در روز سیزدهم (۰/۸۱ میکروگرم بر لیتر) افزایش یافت و به دنبال آن تا روز بیست و یکم کاهش یافت ($P <$ ۰/۰۵). در تیمار ۲، روند افزایشی میزان از ۰/۵۷ میکروگرم بر لیتر تا ۱/۱۹ میکروگرم بر لیتر تا روز نهم ادامه داشت و پس از روندی کاهشی در روز هفدهم به ۰/۷۱ میکروگرم بر لیتر افزایش و تا انتهای دوره کاهش یافت ($P <$ ۰/۰۵). اوج میزان کلروفیل a در تیمار ۳ در روز نهم و با میزان ۱/۴۴ میکروگرم بر لیتر بالاترین میزان را داشت. تیمار ۴ روند افزایشی میزان کلروفیل a تا روز سیزدهم و تیمار ۵ نیز تا روز پانزدهم ادامه داشت و پس از آن روند کاهشی داشت ($P <$ ۰/۰۵).

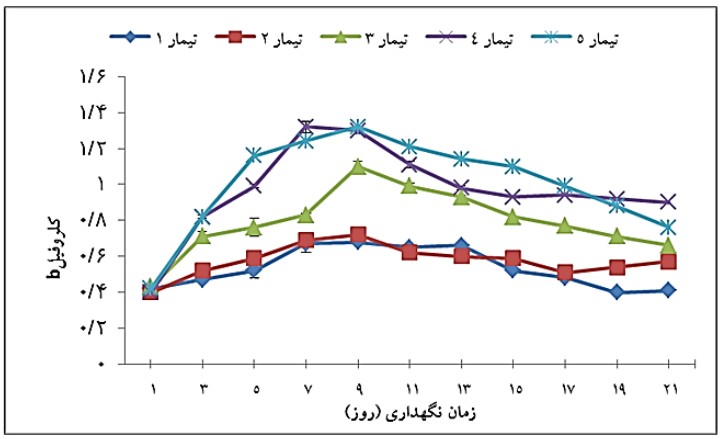
[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-04-28]



نمودار ۱ : اثرات EDTA در میزان رنگیزه کلروفیل a (میکروگرم بر لیتر) میکروجلبک *Nannochloropsis oculata*، تیمار ۱(۰)، تیمار ۲(۰/۰۱)، تیمار ۳(۰/۰۴) و تیمار ۴(۰/۱۲) گرم بر لیتر EDTA

اثرات EDTA در میزان رنگیزه کلروفیل b میکروجلبک *Nannochloropsis oculata*

تغییرات رنگیزه کلروفیل b در میکروجلبک *N. oculata* در نمودار ۲ نشـان داده شـده اسـت. در تیمار ۱ کلروفیل b از ۰/۴۲ تا ۰/۶۸ میکروگرم بر لیتر تا روز نهم روندی افزایشی و سپس تا روز ۲۱ روندی کاهشی داشت و به میزان ۰/۴۱ میکروگرم بر لیتر رسید ($P <$ ۰/۰۵). در تیمار ۲ میزان کلروفیل b محدوده‌ای بین ۰/۷۲ -۰/۴ میکروگرم بر لیتر داشـــت و اوج میزان کلروفیل در این تیمار در روزهای هفتم تا یازدهم و بین ۰/۷۲- ۰/۶۲ میکروگرم بر لیتر بود. در تیمارهای ۳، ۴ و ۵ نیز روند تغییرات میزان کلروفیل b تا روز نهم افزایشـــی بوده و به ترتیب مقادیر ۱/۱، ۱/۳ و ۱/۳۲ میکروگرم بر لیتر را نشـان داد و سـپس در هر سـه تیمار روندی کاهشـی داشـت و در روز بیسـت و یکم به مقادیر ۰/۶۶، ۰/۹ و ۰/۷۶ میکروگرم بر لیتر رسید که اختلاف معنی‌داری با نقطه‌ی اوج داشت ($P <$ ۰/۰۵).



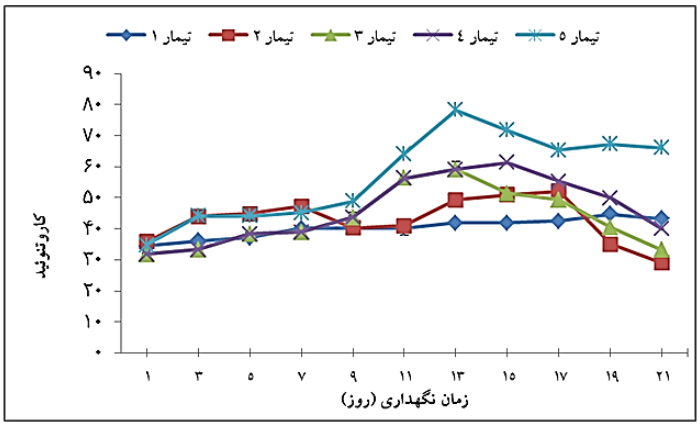
نمودار ۲ : اثرات EDTA در میزان رنگیزه کلروفیل b (میکروگرم بر لیتر) میکروجلبک *Nannochloropsis oculata*، تیمار ۱(۰)، تیمار ۲(۰/۰۱)، تیمار ۳(۰/۰۴) و تیمار ۴(۰/۱۲) گرم بر لیتر EDTA

اثرات EDTA در میزان رنگیزه کارتنوئید میکروجلبک *Nannochloropsis oculata*

با توجه به روند تغییرات ذکر شـده در نمودار ۳، اوج میزان کاروتنوئید در روزهای انتهایی دوره اتفاق افتاد. کاروتنوئید در تیمار ۱ اوج خود را در روز نوزدهم و بیســت و یکم با میزان ۴۴/۷۵ – ۴۳/۲۷ میکروگرم بر لیتر، در تیمار ۲ اوج خود را در روز پانزدهم و هفدهم (۵۲/۱- ۵۱ میکروگرم بر لیتر) و در تیمار ۳ اوج میزان خود را در روز ۱۳ با میزان ۵۹/۱۳ میکروگرم بر لیتر، نشان داد ($P <$ ۰/۰۵).

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-04-28]

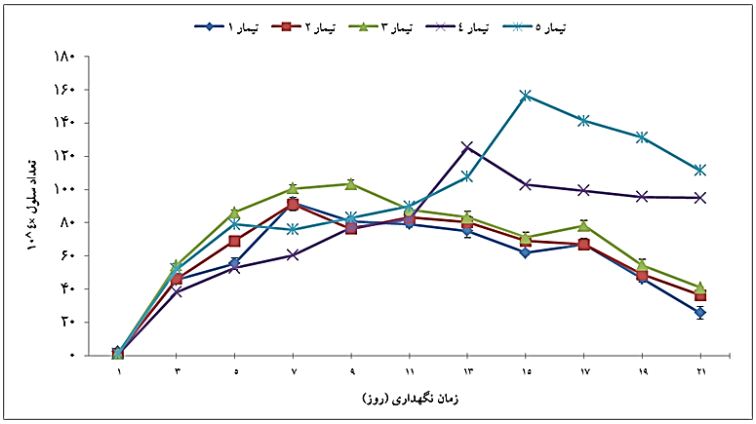
تیمار ۴ از روز اول تا روز پانزدهم از میزان ۳۱/۸۵ به ۶۱/۳۶ میکروگرم بر لیتر رسید و تا انتهای دوره‌ی نگهداری روندی کاهشی داشت ($P <$ ۰/۰۵). در تیمار ۵ میزان کاروتنوئید از روز اول تا روز سیزدهم روندی افزایشی داشت و به ۷۸/۳۲ میکروگرم بر لیتر رسید و سپس روندی کاهشی داشت و در روز بیست و یکم میزان ۶۶/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد ($P <$ ۰/۰۵).



نمودار ۳ : اثرات EDTA در میزان رنگیزه کاروتنوئید (میکروگرم بر لیتر) میکروجلبک *Nannochloropsis oculata*، تیمار ۱(۰)، تیمار ۲(۰/۰۱)، تیمار ۳(۰/۰۴) و تیمار ۴(۰/۱۲) گرم بر لیتر EDTA

اثرات EDTA بر روی تراکم سلول‌های میکروجلبک *Nannochloropsis oculata*

تراکم میکروجلبک‌های نانوکلروپسیس، تحت تاثیر EDTA تغییر کرد (نمودار ۴) و با افزایش سطح ETDA تراکم سلولی به شکل معنی‌داری افزایش یافت ($P <$ ۰/۰۵) و بالاترین میزان خود را در تیمار ۵ و در روز پانزدهم نشان داد. تیمار ۴ و ۳ با مقادیر ۱۰۴ × ۱۲۵/۲۵ و ۱۰۴ × ۱۰۳/۳۶ عدد سلول در هر میلی‌لیتر در روزهای سیزدهم و نهم بالاترین میزان را در طول پرورش داشت ($P <$ ۰/۰۵). دو تیمار ۱ و ۲ در روز هفتم بالاترین تراکم سلولی را داشتند ($P <$ ۰/۰۵). پس از نقطه‌ی اوج، تراکم سلولی کاهش یافت ($P <$ ۰/۰۵).



نمودار ۴ : اثرات EDTA بر روی تراکم سلول‌های میکروجلبک *Nannochloropsis oculata*، تیمار ۱(۰)، تیمار ۲(۰/۰۱)، تیمار ۳(۰/۰۴) و تیمار ۴(۰/۱۲) گرم بر لیتر EDTA

بحث و نتیجه‌گیری

برای تولید اقتصادی جلبک‌ها، بیومس جلبکی و نیز میزان کلروفیل جلبک نقش بسیار پراهمیتی دارد. مسیرهای متفاوتی برای افزایش بیومس و میزان کلروفیل و نیز میزان چربی جلبک‌ها در طی چند دهه‌ی اخیر آزمایش شده است. استراتژی همه‌ی این روش‌ها، بهبود محیط کشت و تامین مواد مورد نیاز برای رشد جلبک‌ها است (Abou-Shanab *et al*., 2014). در مطالعه‌ی حاضر از EDTA برای بررسی اثر آن بر رشد و میزان رنگیزه‌ها در میکروجلبک *N. oculata* در یک دوره‌ی ۲۱ روزه استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده در این

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-04-28]

تحقیق افزایش سطح EDTA تا ۰/۱۲ در مقایسه با تیمار فاقد EDTA و نیز تیمارهای حاوی درصدهای پایین‌تر(۰/۰۸، ۰/۰۴ و ۰/۰۱) EDTA میزان کلروفیل a (نمودار۱)، کلروفیل b (نمودار۲) و نیز تراکم سلولی (نمودار۴) بالاتری داشت ($P < ۰/۰۵$). افزایش EDTA سبب افزایش میزان کلروفیل a به میزان قابل‌توجهی می‌شود به طوری که می‌تواند سبب افزایش مدت زمان فاز لگاریتمی شود. به‌طوری که افزایش کلرفیل a در تمام تیمارها تا روز نهم مشاهده شده ولی پس از آن روند کاهشی دارد درحالی‌که افزایش EDTA به میزان ۰/۰۸ گرم بر لیتر تا روز سیزدهم و تا مقدار ۰/۱۲ گرم بر لیتر تا روز پانزدهم سبب افزایش میزان کلروفیل a و به دنبال آن افزایش رشد می‌شود. طبق نمودار ۲، میزان کلروفیلb تا روز نهم در تمام تیمارها روند افزایشی داشته ولی پس از آن سبب کاهش می‌شود. به عبارت دیگر افزایش EDTA اثر افزایشی بر میزان کلروفیل b ندارد.

میزان کاروتنوئید در تیمار روندی همانند با کلروفیل‌های a داشت به این ترتیب تیمار ۱ کمترین میزان کاروتنوئید را داشت و با افزایش سطح EDTA میزان کاروتنوئید افزایش یافت. چنانچه در نمودار ۳ مشاهده می‌شود با افزایش میزان EDTA میزان کاروتنوئیدها از روز نهم به بعد افزایش می‌یابند. از طرفی افزایش کاروتنوئیدها عمدتا با افزایش میزان چربی همراه است، پس افزایش EDTA می‌تواند سبب افزایش میزان اسیدهای چرب شود و لذا با افزودن EDTA می‌توان به‌منظور تولید بیودیزل از جلبک نانوکلروپسیس و یا به‌منظور غنی‌سازی و افزایش اسیدهای چرب در تغذیه لاروهای آبزیان به کار رود. البته اندازه‌گیری اسیدهای چرب و انجام آزمایشات تکمیلی نیاز است.

در مطالعه‌ی Satpati و همکاران (۲۰۱۶) افزودن EDTA به میزان ۰/۰۸ گرم بر لیتر به محیط کشت جلبک کلرلا و ۰/۰۱ گرم بر لیتر به محیط کشت کلروکوکوم سبب افزایش رشد این جلبک‌ها شد. به شکلی که در غلظت ۰/۰۸ گرم بر لیتر حداکثر بیومس (۱/۳۲ گرم بر لیتر) بعد از ۲۰ روز به دست آمد. که با توجه به نمودار ۴، در مطالعه‌ی حاضر نیز افزایش غلظت EDTA در محیط کشت سبب افزایش تراکم نانوکلروپسیس شد و حداکثر تراکم سلولی ($۱۵۶/۳ \times ۱۰^۴$) در تیمار ۰/۱۲ گرم بر لیتر EDTA در روز پانزدهم به دست آمد که روند یکسان هر دو مطالعه را نشان می‌دهد. Mohan و همکاران (۲۰۱۲) نیز افزایش بیومس *Amphiprora paludosa* را در اثر افزایش غلظت EDTA از ۰/۰۰۹ تا ۰/۰۲۶ میلی‌مول گزارش کردند. افزایش بیومس احتمالا به دلیل افزایش افزایش منبع انرژی و یا اسیدهای چرب ضروری است.

Satpati و همکاران (۲۰۱۶) افزایش ذخیره چربی در دیواره‌ی سلولی جلبک درنتیجه حضور EDTA و استفاده از آن به منبع انرژی برای رشد را عامل واکنش جلبک به حضور این ماده دانستند. آنها عنوان کردند که اسیدهای چرب گروه PUFA همانند لینولئیک و الفا- لینولئیک و نیز گروه MUFA همانند پالمتیک و اولئیک اسید عمده‌ترین گروهی هستند که در حضور EDTA افزایش می‌یابد. Mohan و همکاران (۲۰۱۲) نیز اظهار داشتند میزان ذخیره چربی در دیاتومه دریایی *Amphiprora paludosa* در غلظت ۰/۰۲۶ میلی‌مول Fe-EDTA ، ۶۵/۶۴ درصد است.

علاوه بر افزایش میزان چربی دیواره سلولی جلبک، EDTA دسترسی به سایر فلزات مغذی برای رشد و ذخیره چربی را نیز افزایش می‌دهد (Khozin *et al*., 2006; Chia *et al*., 2013). چلیته‌کنندگی EDTA و جلوگیری از رسوب فلزاتی نظیر منیزیم، آهن و کلیسم که عناصر ضروری برای فتوسنتز و ساخت کلروفیل هستند، از دیگر دلایل افزایش کلروفیل a و b و نیز تراکم سلولی است (Gorain *et al*., 2013). در این تحقیق نیز طبق نتایج نمودار ۴ با افزایش مقدار EDTA خصوصا در تیمارهای ۰/۰۸ و ۰/۰۴ گرم بر لیتر سبب افزایش تراکم سلولی شده است. در تیمارهای ۱،۲ و ۳ افزایش EDTA سبب افزایش تراکم سلولی تا روز یازدهم شده و بعد از آن سبب کاهش تراکم می‌شود در حالی‌که افزایش EDTA در تیمارهای ۰/۰۸ و ۰/۱۲ گرم بر لیتر به‌طور معنی‌داری سبب افزایش و رشد سلولی می‌شود و این افزایش تا روز پانزدهم ادامه داشته و با شیب کمتری پس از آن سبب کاهش رشد می‌شود. به عبارت دیگر افزایش EDTA سبب افزایش زمان لگاریتمی و یا حداقل زمان سکون در دینامیک رشد این میکروجلبک می‌شود. احتمالا افزایش استفاده از مقادیر بیشتر EDTA سبب افزایش pH محیط ، افزایش کلات یون‌ها (Doyle *et al*, 2003) و درنتیجه جذب بهتر نیترات توسط میکروجلبک می‌گردد.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-04-28]

Dou و همکاران (۲۰۱۳) حضور مکمل‌هایی نظیر روی، آهن، مولیبدن و EDTA را در بهبود پروفایل اسیدهای چرب و میزان ذخیره چربی در جلبک *Nannochloropis oculata* موثر دانستند اما در غلظت‌های بالا (۱۷/۴۴ گرم بر لیتر) به شکل بازدارنده رشد و ذخیره چربی عمل کردند. این ترکیبات بخصوص یون منیزیم آنزیم کربوکسیلاز کوآ- استیل را که کاتالیست مرحله‌ی اول بیوسنتز اسیدهای چرب است را فعال می‌کند (Nelson and Cox, 2008). علاوه بر این ترکیب کلروپلاست پیروات که استیل-کوآنزیم و NADH را برای سنتز اسیدهای چرب آماده می‌کند در مقادیر بالایی به ریزمغذی‌ها به‌خصوص منیزیم نیاز دارد. افزایش سطح استرس و کاهش ذخیره چربی تحت شرایط استرس و نبود EDTA در جلبک *Chlorococcum infusionum* گزارش شده است (Satpati *et al*., 2016). Gorain و همکاران (۲۰۱۳) افزایش حضور کلسیم، منیزیم و سدیم کلراید در محیط کشت کلرلا و سندسموس را عامل افزایش چربی و بیومس جلبکی ذکر کردند که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد افزایش چربی در کاهش استرس و مقابله جلبک با شرایط محیطی نامطلوب کمک می‌کند که این موضوع کاهش سطح کاروتنوئیدها با افزایش سطح EDTA را در تیمارهای مورد مطالعه مشخص می‌سازد (نمودار ۳). Duan و همکاران (۲۰۱۲) بیان داشتند که تولید چربی می‌تواند از سلول جلبکی در مقابل استرس‌های اسمزی محافظ کند.

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد افزایش غلظت EDTA تا میزان ۰/۱۲ گرم بر لیتر ضمن افزایش میزان تراکم سلولی، افزایش میزان کلروفیل a، و کاروتنوئید را نیز به دنبال داشته ولی تاثیر معنی‌داری بر افزایش میزان کلروفیل b نداشت. همچنین افزایش EDTA سبب افزایش زمان لگاریتمی و یا حداقل زمان سکون در دینامیک رشد این میکروجلبک می‌شود. با توجه به میزان افزایش کاروتنوئیدها احتمالا سبب افزایش اسیدهای چرب PUFA می‌شود که پیشنهاد می‌گردد در این خصوص تحقیقات بیشتری صورت گیرد.

منابع

غوابشی، ح. ۱۳۹۸. اثرات EDTA بر رشد و حذف آلودگی پساب توسط میکروجلبک *Arthrospira platensis*. پایان نامه کارشناسی ارشد، ۱۲۰ص.

Abou-Shanab, R. A. I. M. M. El-Dalatony, M. M. El-Sheekh. 2014. Cultivation of a new microalga, Micractinium reisseri, in municipal wastewater for nutrient removal, biomass, lipid, and fatty acid production, Biotechnology and Bioprocess Engineering, vol. 19, no. 3, pp. 510–518.

Babuskin, S., Krishnan, K.R., Babu, S., Azhagu, P., Sivarajan, M. and Sukumar, M. 2014. Functional foods enriched with marine microalga Nannochloropsis oculata as a source of ω-3 fatty acids. Food Technology and Biotechnology, 52(3): 292-299. DOI: 10.1294/01-10.32014.

Chia M. A., A. T. Lombardi, M. D. G. G. Mel˜ao, and C. C. Parrish. 2013. Lipid composition of Chlorella vulgaris (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate oncentrations, Aquatic Toxicology, vol. 128-129, pp. 171–182.

Dou, X., Lu, X., Lu, M., Yu, L., Ji, J. 2013. The Effects of Trace Elements on the Lipid Productivity and Fatty Acid Composition of Nannochloropis oculata. Hindawi Publishing Corporation Journal of Renewable Energy. http://dx.doi.org/10.1155/2013/671545.

Doyle JD, Oldring K, Churchley J, Price C, Parsons SA. 2003. Chemical control of struvite precipitation. Journal of Environmental Engineering.;129(5):419-26.

Duan X, Ren GY, Liu LL, Zhu WX. 2012. Salt-induced osmotic stress for lipid over production in batch culture of Chlorella vulgaris. African J. Biotechnol.11:7072–7078.

Gorain, P., Bagchi, S., Mallick, N. 2013. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae, Environmental Technology, DOI: 10.1080/09593330.2013.812668

Jacob, A., Xia, A., and Murphy, J.D. 2015. A perspective on gaseous biofuel production from micro-algae generated from CO2 from a coal-fired power plant, Applied Energy, 148, 396-420.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandera, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Review, 4(8):118–126. DOI: 10.4103/0973- 7847.70902.

Mohan N., M. G. Rajaram, A. B. Boopathy, and Rengasamy R. 2012. Biomass and lipid production of marine diatom Amphiprora paludosa W. Smith at different nutrient concentrations, Journal of Algal Biomass Utilization, vol. 3, no. 4, pp. 52–59.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-04-28]

Nelson DL and Cox MM. 2008. Lipid biosynthesis. In: Principles of biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Compan. p. 805–845.

Satpati, G., Gorain, P., Pal, R. 2016. Efficacy of EDTA and Phosphorous on Biomass Yield and Total Lipid Accumulation in Two Green Microalgae with Special Emphasis on Neutral Lipid Detection by Flow Cytometry. Hindawi Publishing Corporation. http://dx.doi.org/10.1155/2016/8712470.

Haran, M.P. 1992. Monual on shrimp hatechery operation and management (penaeus monodon). Publ: TASPARC.114pp.

The investigation of EDTA on the growth, Chlorophyll and carotenoids of Nannochloropsis *oculata*

Ozra Soleimani[1]
Seyedeh Zahra Masoomizadeh[2*]

1. Department of Fisheries, Ahv. C., Islamic Azad University, Ahvaz, Iran
2. Department of biological sciences and technologies, Ahv. C., Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

[*]**Corresponding author:**
Zahramasoomi@iau.ac.ir

Received date: **September/14/2025**
Accepted date: **November/09/2025**

Abstract

Nannochloropsis oculata is one of the most important microalgae used in aquaculture. The present study aims to investigate the effects of different concentrations of EDTA on the growth and pigments of *N. oculata*. This study was conducted over 21 days in an environment with a temperature of 22 ± 1 °C, light intensity of 2500 lux (6 hours of light and 8 hours of darkness) and 24-hour ventilation with three repetitions. The basic culture medium was TMRL with values of 0, 0.01, 0.04, 0.08 and 0.12 g/l of EDTA solution and 25 ppt salinity. The algae density, amount of chlorophyll a, b, and carotenoids were measured. The maximum Chlorophyll a was found in EDTA level of 0.12 g/l in the fifteenth day, which was significantly different from other treatments. The increase of EDTA, however, did not have a significant effect on the amount of Chlorophyll b and the maximum amount was found in 0.08 g/l treatment in the seventh day. The highest rate of carotenoids was seen in 0.12 g/l treatment in the thirteenth day. Also, the maximum cell density was recorded in 0.12 g/l treatment in the fifteenth day. The results of this study showed that the increase of EDTA causes a rise in the amount of pigments, cellular growth, and the period of logarithmic phase, which is probably due to an increase in the pH of the culture medium, the properties of chelators and better absorption of nitrates by the microalgae.

Keywords: *Nannochloropsis oculata, EDTA,* Chlorophyll, pigments, carotenoids, growth

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-04-28]