Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 40 No.4 (2024): 28-39

مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 40- عدد 4 (2024): 28-39

أمثلة بعض الشروط البيئية لتنمية طحالب Haematococcus pluvialis وإنتاج أكبر كمية من أصبغة اليخضور a وb والكاروتينويدات

عبير علي ديوب[*1] ، عدنان علي نظام[2] ، حسام عكو[3]

1- طالبة دكتوراه، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق.
2- أستاذ، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق.
3- باحث، قسم التنوع الحيوي، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق.

الملخص:

يتأثر استزراع الطحالب الدقيقة بالعوامل البيئية، التي لا تؤثر فقط في عملية التركيب الضوئي ومعدل النمو، بل تؤثر أيضاً في النشاط الاستقلابي للخلية وتركيبها؛ لذلك اهتمّ هذا البحث في تهيئة شروط نمو مثالية بهدف زيادة الإنتاجية والكتلة الحيوية التي تحتوي مستقلبات عالية القيمة. عُزل طحلب Haematococcus pluvialis وهو أحد الطحالب الدقيقة الخضراء من مياه نهر بردى، وتمت تنميته في المختبر باستعمال المفاعل الحيوي، تحت تأثير شروط بيئية مختلفة: درجة الحرارة (15 ،25 ،35 مْ)، وتركيز النتروجين (0.1، 0.3، 0.5 غ/ل)، والرقم الهيدروجيني pH (6، 7، 8). أظهرت النتائج أن الشروط البيئية (درجة الحرارة 23 مْ، وتركيز النتروجين 0.3 غ/ل، pH7) كانت الأمثل لتنمية الطحلب وإنتاجيته، إذ بلغ أعلى تركيز لليخضور a (10.17 ملغ/ل) وأعلى تركيز لليخضور b (6.07 ملغ/ل)، بينما كانت الشروط البيئية (درجة الحرارة27 مْ، وتركيز النتروجين 0.1 غ/ل، pH8) هي الأمثل للوصول إلى أعلى تركيز للكاروتينويدات (1.23 ملغ/ل).

الكلمات المفتاحية: Haematococcus pluvialis، المفاعل الحيوي، اليخضور a,b، الكاروتينويدات.

تاريخ الإيداع: 2022/12/4
تاريخ الموافقة: 2023/1/23

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

Optimization of some environmental conditions for the development of the algae Haematococcus pluvialis, and production the largest amount of chlorophyll a,b and carotenoids pigments

Abeer Ali Dayoub[*1], Adnan Ali Nizam[2]
Hussaam Okkou[3]
1-Ph. Student, Department of Plant Biology, Faculty of Science, Damascus University.
2-Dr. Professor, Plant Biology Department, Faculty of Science, Damascus University.
3- Researcher, department of biodiversity, NCBT, Damascus, Syria

Received :2022/12/4
Accepted:2023/1/23

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract

Microalgae culture is affected by environmental factors, which not only affect photosynthesis and growth rate, but also affect the metabolic activity and structure of the cell. Therefore, this research was concerned with creating optimum growth conditions in order to increase productivity and biomass containing high value metabolites. Haematococcus pluvialis, one of the green microalgae, was isolated from the waters of Barada River, and it was grown in the laboratory using a photobioreactor, under the influence of different environmental conditions: temperature (15, 25, 35 °C), nitrogen concentration (0.1, 0.3, 0.5 g/l), and pH (6,7,8). The results showed that the environmental conditions (temperature 23°C, nitrogen concentration 0.3 g/l, pH7) were optimal for the development of the alga and its productivity, as the highest concentration of chlorophyll a (10.17 mg/L) and the highest concentration of chlorophyll b (6.07 mg/L), while the environmental conditions (temperature 27°C, nitrogen concentration 0.1 g/l, pH8) were optimal to reach the highest concentration of carotenoids (1.23 mg/L).

Keywords: Haematococcus Pluvialis, Photobioreactor, Chlorophyll A,B, Carotenoids.

المقدمة:

تتميّز الطحالب الدقيقة Microalgae أنها أحياء مجهرية، ذات كفاءة أعلى من النباتات الأرضية في تحويل الطاقة الشمسية إلى طاقة كيميائية (Perin et al., 2019)، وتنتشر هذه الأحياء الدقيقة في جميع البيئات وتبدو من الأحياء المسيطرة في الأوساط المائية، وهي سريعة النمو ولها مقدرة على إنتاج مواد استقلابية مختلفة، وخلاياها غنية بالمركبات العضوية المختلفة، مثل: البروتينات والكربوهيدرات والحموض الدسمة غير المشبعة والفيتامينات ومضادات التأكسد والأصبغة (Barghbani et al., 2012)، إضافة إلى أن الطحالب الدقيقة مخزن غني وغير مستغل لمركبات جديدة نشطة بيولوجياً (مستقلبات ثانوية) تنتجها بعض الأنواع عندما تخضع في بيئاتها لظروف الإجهاد (ملوحة عالية، حرارة مرتفعة، نقص مغذيات، ضوء شديد، أشعة فوق بنفسجية)؛ لذلك تُنتج هذه المستقلبات بهدف التكيف بسرعة مع الظروف البيئية الجديدة للبقاء على قيد الحياة. وتشهد الأصبغة الطبيعية والمستقلبات الثانوية للطحالب الدقيقة طلباً شديداً في السوق بسبب خصائصها المضادة للتأكسد والمضادة للسرطان خصوصاً، ويصعب الحصول عليها بطريقة التصنيع الكيميائي (Demming-Adams and Adams, 2002)، وزيادة كمية صباغ اليخضور b قد تساعد في المحافظة على نشاط صباغ اليخضور a وإنتاجية الطحالب (Bujaldon et al., 2017).

تعيش طحالب Haematococcus الخضراء في المياه العذبة، وهي من الطحالب الدقيقة ذات الأهمية بسبب ما تحتوي كتلتها الحيوية على مستقلبات ثانوية عالية القيمة مثل صباغ الأستازنتين Astaxanthin، وتعد أغنى مصدر طبيعي لهذا الصباغ (مضادة التأكسد السوبر) إذ تصل كميته إلى 5 % من الوزن الجاف للخلية(Wayama et al.,2013)، ويمكن أن يندفع إليها العديد من شركات التصنيع الحيوي، وأن تكون مفيدة أيضاً للعديد من التطبيقات، مثل استعمالها لتعزيز قيمة الأغذية والأعلاف الحيوانية ومستحضرات التجميل وفي مزارع الأحياء المائية والدواجن والصناعات الدوائية وإنتاج الطاقة (Bhalamurugan et al., 2018)، وتتضمن دورة حياة هذا الطحلب مرحلتين: المرحلة الإعاشيةvegetative stage في بيئة النمو الطبيعي، حيث تكون الخلايا متحركة بسوطين، وتتكوّن خلالها الكتلة الحيوية الأساسية للطحلب، والمرحلة الحمراء red stage عندما يتعرض الطحلب لظروف إجهاد مختلفة، مثل نقص المغذيات وارتفاع الملوحة والشدة الضوئية القوية، وتكون فيها الخلايا غير متحركة، محاطة بغمد مخاطي سميك، وتُراكم كميات كبيرة من الكاروتينويدات الثانوية لاسيما صباغ الأستازنتين (Butler et al., 2018)، يُحدد إنتاج الكتلة الحيوية للطحالب اعتماداً على ستة عوامل: التغذية والملوحة (للطحالب البحرية الدقيقة) ودرجة الحرارة والضوء والرقم الهيدروجيني وإمدادات غاز ثنائي أكسيد الكربون (Gatamaneni et al., 2018)، وتعد درجة الحرارة وتركيز النتروجين والرقم الهيدروجيني أهم العوامل المؤثرة في نمو طحالب Haematococcus pluvialis وإنتاجيتها.

لدرجة الحرارة تأثير كبير في معدل النمو وحجم الخلية والتركيب الكيميائي الحيوي للطحالب الدقيقة، وتقع درجة الحرارة المثالية لنموها ضمن المجال 20 – 30 مْ (Singh et al., 2012)، لكن تغير درجة الحرارة عن قيمتها المثلى للنمو أو التعرض لأي نوع من الإجهاد خلال فترة النمو يؤدي إلى زيادة نسبة الليبيدات والكربوهيدرات في الكتلة الحيوية الطحلبية، يقابلها انخفاض في معدل النمو ونقصان في نسبة البروتينات (Sun et al., 2018)، ويتأثر استهلاك الطحالب للعناصر المغذية في الوسط بعوامل مختلفة مثل: شدة الإضاءة ودرجة الحرارة وحركة المياه وكثافة الطحالب والمجتمع النباتي المائي، ويتحدد مسار الاستقلاب بنسبة عنصري النتروجين والفُسفور في الخلايا الحية، إن الحد من هذين العنصرين يبدل استقلاب الليبيد من تركيب ليبيدات بنيوية تدخل في تركيب الغشاء الخلوي إلى تركيب ليبيدات ادخارية وتخزين الليبيدات في الخلايا، وهذا بدوره يزيد محتوى الليبيدات الكلي في الطحالب الخضراء (Hu, 2004)، ويزداد محتوى الطحالب من الكربوهيدرات أيضاً، فزيادة الليبيدات والكربوهيدرات كآلية للبقاء، تحت ظروف عوز النتروجين في وسط النمو، إذ تتوقف الخلايا عن الانقسام وتتجه إلى تخزين الطاقة على هيئة ليبيدات وكربوهيدرات (Ran et al., 2019)، ويعتمد استزراع الطحالب على درجة الرقم الهيدروجيني pH للوسط، إذ إن هذا الرقم يؤثر في عملية الاستقلاب والتركيب الكيميائي للخلايا، ويحدد أيضاً قابلية انحلال وتوافر غاز CO_2 والمغذيات الأساسية في الماء (Wu et al., 2012)، يكون النمو المثالي لمعظم الطحالب حول pH 7، وتبين أن تغير pH الوسط يمكن أن يحد من نمو الطحالب من

خلال تثبيط عمليات الاستقلاب ويؤدي الرقم القاعدي على نحو غير مباشر إلى زيادة تراكم الغليسريدات الثلاثية وانخفاض الليبيدات القطبية المرتبطة بالغشاء (Qiu et al., 2017)، ويحسن الرقم الهيدروجيني الحمضي من درجة امتصاص بعض أنواع الطحالب الدقيقة للمغذيات (Zhang et al., 2014).

هدف البحث:

يهدف هذا البحث إلى تنمية طحلب Haematococcus pluvialis ضمن المفاعل الحيوي في المختبر تحت تأثير شروط بيئية مختلفة من درجات الحرارة (15، 25، 35 مْ) وتركيز نترات الصوديوم (0.1، 0.3، 0.5 غ/ل)، pH (6، 7، 8)، والبحث عن أفضل الشروط البيئية لإنتاج أكبر كمية من الأصبغة الأساسية (اليخضور a، اليخضور b، الكاروتينويدات)، التي تدخل في العديد من الاستعمالات الطبية والغذائية المختلفة.

مكان تنفيذ البحث:

أُجري هذا البحث في مختبرات الدراسات العليا في قسم علم الحياة النباتية من كلية العلوم بجامعة دمشق، ومختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق.

طرائق البحث:

حُضّن طحلب Haematococcus pluvialis المعزول من مياه راكدة من نهر بردى في منطقة الربوة في محافظة دمشق في المختبر لتنميته باستعمال المفاعل الحيوي، الذي يتحكم ويضبط جميع شروط النمو بطريقة الدفعات Batch، في السائل المغذي Bold's Basal Medium BBM (Bischoff and Bold, 1963)، مع تعديل الوسط بإضافة محلول التربة الخصبة إليه (1مل/ل). وإجراء التجارب تحت شروط ثابتة من حيث الإضاءة المستمرة 10 آلاف لوكس، سرعة الدوران 200 دورة /د، تدفق الغازات 2 ل/د)، ودراسة تأثير ثلاثة متغيرات (درجة الحرارة، pH، تركيز النتروجين) في إنتاج طحالب Haematococcus pluvialis للأصبغة، ودرس كل متغير عند ثلاثة مستويات كالآتي:

درجة الحرارة: 15، 25، 35 مْ، pH: 6، 7، 8، تركيز النتروجين: 0.1، 0.3، 0.5 غ/ل.

أُجري حصاد الكتلة الحيوية الطحلبية بعد 18–22 يوماً من التنمية لكل تجربة، وجُمّدت بالمجمدة في درجة حرارة –80 مْ، ثم جُفّدت للحصول على كتلة حيوية طحلبية جافة لا تزيد رطوبتها على 6–7%.

استُعمل تصميم التجارب المتقدم Response Surface Methodology RSM على برنامج Minitap Optimization Method لدراسة تأثير كل عامل على حدة، وتأثير تربيع هذه العوامل، وتأثير العوامل المتداخلة بعضها مع بعض.

تقدير تركيز اليخضور a واليخضور b والكاروتينويدات

أضيف إلى كل 3.5 ملغ كتلة حيوية طحلبية مجففة ومحطمة بجهاز Tissue Lyser (QIAGEN company- Germany) 5 مل مذيب dimethylsulfoxide (DMSO)، ثم سُخنت العينة في حمام جاف بدرجة حرارة 70 مْ مدة 10 دقائق، وثفلت وقيست امتصاصية المحلول الطافي عند الأطوال الموجية (480، 650، 660 نم)، وحُسب تركيز كل من اليخضور a واليخضور b والكاروتينويدات وفق المعادلات الآتية (Solovchenko et al., 2010):

$$C.chl.\ a\ (mg\ /\ L^{-1}) = 13.34A_{666} - 4.85A_{650}$$

$$C.chl.\ b\ (mg\ /\ L^{-1}) = 24.58A_{650} - 6.65A_{666}$$

$$Total\ car.\ (mg\ /\ L^{-1}) = 1000 \times D_{480} - 1.29 \times Cchl\ a - 53.76 \times Cchl\ b/220$$

يعبر عن العلاقة بين تركيز كل صباغ ينتجه الطحلب والمتغيرات المدروسة بمعادلة من الدرجة الثانية كالآتي:

$$\mathbf{Y = a + bX_1 + cX_2 + dX_3 + eX_1^2 + fX_2^2 + gX_3^2 + hX_1X_2 + iX_1X_3 + jX_2X_3}$$

حيث يمثل كل من:

Y: العامل المدروس Response، a: العامل الثابت constant، b,c,d: العامل المتغير Linear coefficient، e,f,g: مربع العامل المتغير Square coefficient

النتائج والمناقشة:

تم بالاعتماد على التصميم الإحصائي إجراء 20 تجربة، وتم حساب تركيز اليخضور a واليخضور b والكاروتينويدات تحت تأثير شروط بيئية مختلفة.

تأثير كل عامل لوحده وتأثير تربيع العوامل المدروسة وتأثير العوامل المتداخلة في تركيز اليخضور a واليخضور b:

يُلاحظ من الجدول 1 أن هناك تأثير خطي معنوي ($p<0.05$)؛ للمتغيرات (تركيز النتروجين ودرجة الحرارة وpH) كل عامل لوحده، ومربع هذه العوامل، والعوامل متداخلة مع بعضها في تركيز اليخضور a الذي ينتجه الطحلب. وكذلك الأمر بالنسبة لليخضور b إذ يُلاحظ من الجدول 2 أن هناك تأثير خطي معنوي ($p<0.05$)؛ لهذا المتغيرات كل عامل لوحده ومربع هذه العوامل والعوامل متداخلة مع بعضها في تركيز اليخضور b الذي ينتجه الطحلب، وتأخذ العلاقة بين مربع هذه المتغيرات وتركيز اليخضور a وb شكل قطع مكافئ.

ويدل معامل التحديد R^2 = 98.70% بالنسبة لتركيز اليخضور aعلى أن معادلة الانحدار للعوامل المتغيرة تؤثر بنسبة 98.70% في تركيز اليخضور a.

ويدل معامل التحديد R^2 =% 97.30 بالنسبة لتركيز اليخضور b على أن معادلة الانحدار للعوامل المتغيرة تؤثر بنسبة 97.30% في تركيز اليخضور b.

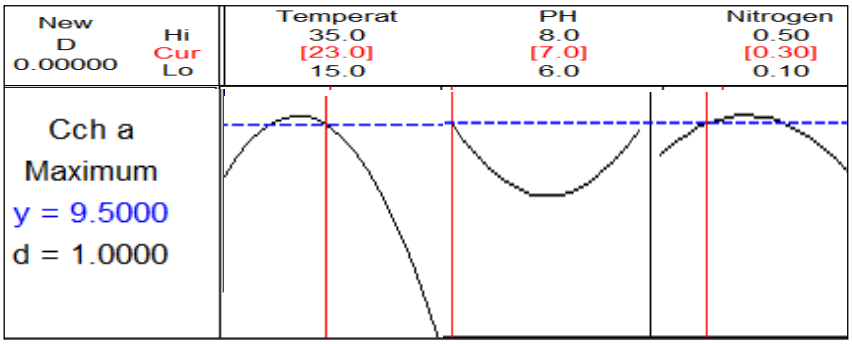
الجدول 1 التحليل الإحصائي لتأثير العوامل المدروسة في تركيز اليخضور a.

المتغير Term	معامل التغير Coef	SE Coef	الخطأ المعياري للمعامل T	الاحتمالية P
الثابت Constant	104.663	15.168	6.900	0.000
درجة الحرارة Temperature	0.011	0.207	0.055	0.047
الرقم الهيدروجيني pH	-27.884	4.471	-6.237	0.000
تركيز النتروجين Nitrogen	23.593	8.354	2.824	0.022
Temperature*Temperature	-0.014	0.003	-4.286	0.003
pH*pH	1.975	0.317	6.232	0.000
Nitrogen*Nitrogen	-34.118	7.921	-4.307	0.003
Temperature*pH	0.026	0.018	1.404	0.008
Temperature*Nitrogen	0.436	0.092	4.746	0.001
pH*Nitrogen	-2.533	0.918	-2.761	0.025

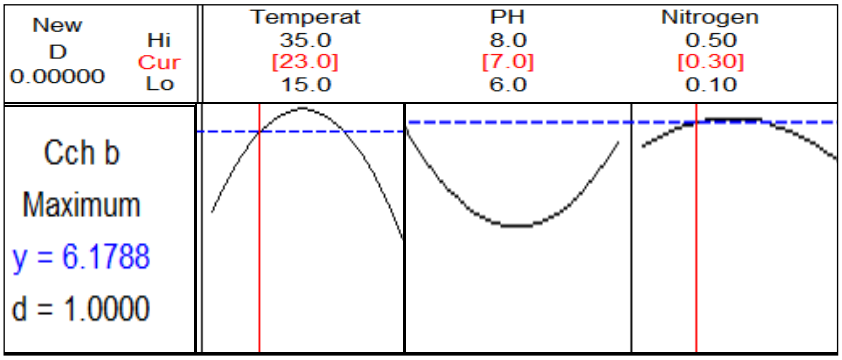
الجدول 2 التحليل الإحصائي لتأثير العوامل المدروسة في تركيز اليخضور b.

المتغير Term	معامل التغير Coef	SE Coef	الخطأ المعياري للمعامل T	الاحتمالية P
الثابت Constant	82.216	14.215	5.784	0.000
درجة الحرارة Temperature	0.007	0.194	0.036	0.032
الرقم الهيدروجيني pH	-21.942	4.190	-5.236	0.001
تركيز النتروجين Nitrogen	7.723	7.829	0.986	0.003
Temperature*Temperature	-0.008	0.003	-2.786	0.024
pH*pH	1.545	0.297	5.203	0.001
Nitrogen*Nitrogen	-17.549	7.424	-2.364	0.046
Temperature*pH	0.013	0.017	0.761	0.048
Temperature*Nitrogen	0.282	0.086	3.279	0.011
pH*Nitrogen	-0.931	0.860	-1.082	0.023

يبين الشكلان 1و2 الشروط البيئية المثلى لإنتاج اليخضور a واليخضور b وهي كالتالي وفق النتائج الإحصائية: درجة الحرارة 23 مْ، والرقم الهيدروجيني pH 7، وتركيز النتروجين 0.3 غ/ل. جرى تطبيق هذه الشروط وقيس تركيز اليخضور a فبلغ 10.17 ملغ/ل، وهي قريبة من تركيز اليخضور a النظرية y= 9.50 =، وقيس تركيز اليخضور b فبلغ 6.07 ملغ/ل. وهي قريبة من تركيز اليخضور b النظرية y= 6.18 =.



الشكل (1) الشروط المثلى لإنتاج اليخضور a بوساطة البرنامج الإحصائي RSM.



الشكل 2. الشروط المثلى لإنتاج اليخضور b بوساطة البرنامج الإحصائي RSM.

اعتماداً على الجدول 1 يمكن كتابة المعادلة التي تعبر عن تأثير العوامل المدروسة في كمية اليخضور a التي ينتجها الطحلب كما يلي حيث:

درجة الحرارة temperature X1

الرقم الهيدروجيني pH.....X2

تركيز النتروجين nitrogen.....X3

$$Y_1=104.663+ 0.011X_1-27.884X_2+23.593X_3-0.014x_1^2+1.975x_2^2 4.118x_3^2+0.026x_1x_2+0.436x_1x_3-2.533x_2x_3$$

اعتماداً على الجدول 2 يمكن كتابة المعادلة التي تعبّر عن تأثير العوامل المدروسة في كمية اليخضور b التي ينتجها الطحلب كالآتي، حيث:

$$Y_2 = 82.216+0.007x_1-21.942x_2+7.723x_3-0.008x_1^2+1.545x_2^2- 17.549x_3^2+0.013x_1x_2+0.282x_1x_3-0.931x_2x_3$$

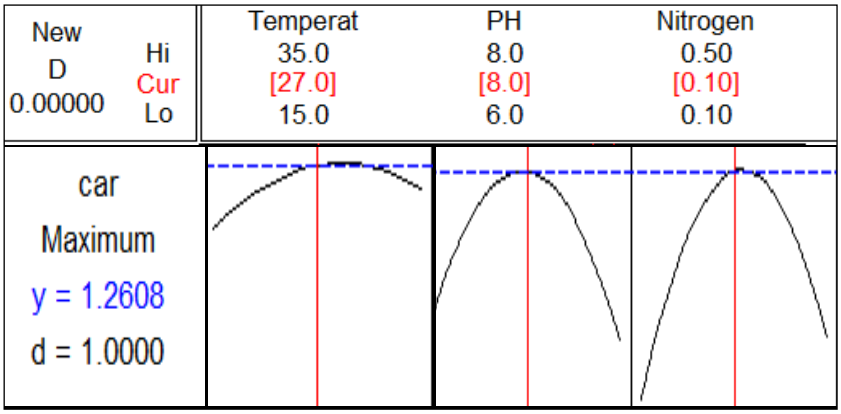
ويبين الجدول 3 أن تأثير العوامل المدروسة (كل عامل على حدة، مربع العوامل، العلاقة بين العوامل) في تركيز الكاروتينويدات التي ينتجها الطحلب هو تأثير خطي معنوي ($p<0.05$).

يدل معامل التحديد R^2 =% 97.20 لتركيز الكاروتينويدات على أن معادلة الانحدار للعوامل المتغيرة تؤثر بنسبة% 97.20 في تركيز الكاروتينويدات.

الجدول 3. التحليل الإحصائي لتأثير العوامل المدروسة في تركيز الكاروتينويدات.

المتغير Term	معامل التغير Coef	SE Coef	الخطأ المعياري للمعامل T	الاحتمالية P
الثابت Constant	0.817	3.031	0.270	0.004
درجة الحرارة Temperature	0.108	0.041	2.627	0.030
الرقم الهيدروجيني pH	-0.124	0.894	-0.139	0.003
تركيز النتروجين Nitrogen	-2.407	1.670	-1.442	0.017
Temperature*Temperature	-0.003	0.001	-5.151	0.001
pH*pH	0.014	0.063	0.218	0.023
Nitrogen*Nitrogen	-0.167	1.583	-0.106	0.009
Temperature*pH	-0.002	0.004	-0.426	0.041
Temperature*Nitrogen	0.069	0.018	3.766	0.005
pH*Nitrogen	-0.018	0.183	-0.099	0.024

يبين الشكل 3 الشروط البيئية المثلى لإنتاج الكاروتينويدات وهي وفق النتائج الإحصائية كالآتي: درجة الحرارة 27 مْ، والرقم الهيدروجيني 8 pH، وتركيز النتروجين 0.1 غ/ل. تم تطبيق هذه الشروط وقيس تركيز الكاروتينويدات فبلغ 1.23 ملغ/ل، وهي قريبة من تركيز االكاروتينويدات النظرية y= 1.26.



الشكل 3. الشروط المثلى لإنتاج الكاروتينويدات بوساطة البرنامج الإحصائي RSM.

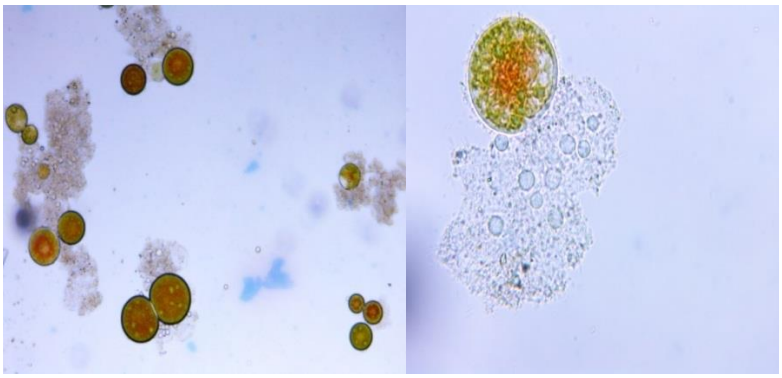
اعتماداً على الجدول 3 يمكن كتابة المعادلة التي تعبر عن تأثير العوامل المدروسة في كمية الكاروتينويدات التي ينتجها الطحلب كالآتي، حيث:

$$Y3=0.817+0.108X1-0.124X2-2.407X3-0.003X12+0.014X22-0.167X32-0.002X1X2+0.069X1X3-0.018X2X3$$

تحليل التجربة

تأثير درجة الحرارة في كمية الأصبغة:

تشير النتائج في الشكلين 1 و2 إلى أن درجة الحرارة 23 مْ هي الدرجة المثالية لإنتاج الطحلب أكبر كمية من اليخضور a وb التي بلغت 10.17 ملغ/ل، 6.07 ملغ/ل على التوالي، وأن درجة الحرارة 27 مْ هي الدرجة المثالية لإنتاج الطحلب الكاروتينويدات التي بلغت 1.23 ملغ/ل، ولم تكن درجة الحرارة 35 مْ مناسبة لنمو طحالب Haematococcus pluvialis في المختبر، إذ كان عدد الخلايا في وسط التنمية قليلاً جداً، وكانت بعض الخلايا ميتة ومتفككة والبعض الآخر في طريقها إلى التحلل والتفكك (الشكل 4):



الشكل 4 تحلل وموت بعض خلايا طحالب Haematococcus pluvialis
عند تنميتها في درجة حرارة 35مْ بتكبير40X

توافقت هذه النتائج مع نتائج العديد من الباحثين (Hata et al., 2001; Lababpour et al., 2005; Kang et al., 2010;Yoo et al., 2012; Wan et al., 2014)، إذ بينت أن درجة الحرارة المناسبة لنمو طحالب H. pluvialis وتراكم الأستازنتين كان بين 20 و 28 مْ، وإن درجة الحرارة المثالية لتراكم الكاروتينويدات هي 30 مْ، إذ تؤدي إلى الانتقال من المرحلة الإعاشية الخضراء إلى المرحلة الحمراء، ويقترن هذا التحول مع تباطؤ كبير في النمو، وتراكم الكاروتينويدات لاسيما الأستازنتين الذي يشكل 90% منها (Azizi et al., 2020)، وإن زيادة درجة الحرارة من 35 مْ إلى 40 مْ تؤدي إلى تحلل الخلايا (Shah et al., 2016; Pereira et al., 2020). وهذا ما أكدته Oslan وآخرون (2021) إذ بينت أن النمو في المرحلة الإعاشية أي في بيئة النمو الطبيعي يحتاج إلى درجة حرارة من 20 – 25 مْ، كما أكد Giannelli وآخرون (2015) حساسية طحلب Haematococcus لتغيرات درجة الحرارة، فعند تنمية هذا الطحلب في درجات حرارة 20 و27 مْ تبين أن درجة الحرارة 27 مْ ساعدت على تكوين الأستازنتين بنسبة 37% أكثر من درجة الحرارة 20 مْ، وبين أن درجة الحرارة العالية المترافقة مع عوز النتروجين في الوسط لها تأثير إيجابي في إنتاج صباغ الأستازنتين، إذ يتم إنتاجه نظراً إلى استجابة الخلايا للإجهاد الخفيف الذي يحفز تكوين جذور الأكسجين الحرة وزيادة تفاعلها. وتوافقت هذه النتائج أيضاً مع Hong وآخرون (2015) إذ بين أن درجة الحرارة المعتدلة من 25 إلى 28 مْ حسنت من إنتاج الأستازنتين مقارنة بدرجة الحرارة المناسبة للنمو الطبيعي 23 مْ، وانخفض تركيز الكتلة الحيوية بنسبة 20%و48% عندما كانت التنمية في درجة حرارة 30 مْ و36 مْ مقارنة بالعينات التي نُميت في درجة حرارة 23 مْ بعد 18 يوماً. وتبين أن الإجهاد الحراري من 30 إلى 36 مْ يثبط عملية التركيب الضوئي في H. pluvialis، وهكذا حدث انخفاض إنتاجية الطحلب وازداد إنتاج الكاروتينويدات (الأستازنتين).

تأثير الرقم الهيدروجيني في كمية الأصبغة :

تشير النتائج الموضحة بالأشكال 1و2و3 إلى أن الرقم الهيدروجيني7 هو المثالي للنمو وإنتاج اليخضور a وb، وأن الرقم الهيدروجيني8 هو المثالي لإنتاج الكاروتينويدات. كانت هذه النتائج قريبة من نتائج دراسات عدة (مثل: دراسة أجراها Li وآخرون (2011)، وكذلك Aflalo وآخرون (2007) عن تأثير pH وسط النمو في النوع H. pluvialis فتبين اختلاف قيم pH بين المرحلتين الإعاشية والحمراء، إذ تتراوح بين 6– 9، وفي دراسة أخرى أجراها Li وآخرون (2011) على النوع نفسه الذي أُجريت تنميته وفق نظام هجين (كانت المرحلة الإعاشية في نظام مغلق PBR والمرحلة الحمراء في بركة مفتوحة) بينوا أن قيم pH يجب أن تكون 7.5 في المرحلة الإعاشية، وتتطلب المرحلة الحمراء قيم pH تصل إلى نحو 8 من خلال إضافة مضبوطة لغاز CO_2. وبينت دراسة Oslan وآخرون (2021) أن مجال الرقم الهيدروجيني المناسب للمرحلة الإعاشية هو 6 – 8 مع شروط طبيعية للنمو. وأكد Kim وآخرون (2015) أن النوع Haematococcus sp. KORDI03 تمكن من النمو تحت مجموعة واسعة من قيم pH (3–12)، ولكن تحسن النمو على نحو ملحوظ عند الرقم الهيدروجيني 5–9.

تأثير تركيز النتروجين في كمية الأصبغة :

تشير النتائج في الأشكال 1و2و3 إلى أن 0.3 غ/ل هو تركيز النتروجين المثالي للنمو وإنتاج اليخضور a وb، وأن 0.1غ /ل هو تركيز النتروجين المثالي لإنتاج الكاروتينويدات، وقد توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة أجراها Goksan وآخرون (2011) إذ بين أن الوزن الجاف وعدد خلايا طحالب Haematococcus pluvialis يزداد مع ازدياد تركيز مصدر النتروجين ($NaNO_3$)، وأن تراكيز النتروجين المنخفضة (أياً كان مصدر النتروجين) تؤدي إلى إنتاج أعلى من الكاروتينويدات. وتوافقت أيضاً مع نتائج دراسة أخرى بينت أن نقص النتروجين في وسط التنمية إلى 0.15 غ/ل يؤدي إلى توقف انقسام الخلية ويثبط معدل النمو ويؤدي إلى نقص حاد في كمية اليخضور، ويقابله زيادة إنتاج الأستازنتين (Boussiba and Vonshak, 1991).

الاستنتاجات Conclusions

كانت الشروط البيئية المثالية لإنتاج أعلى تركيز من اليخضور a واليخضور b (أصبغة التركيب الضوئي) بتهيئة الشروط المناسبة لتنامي طحالب Haematococcus pluvialis، وزيادة إنتاج الكتلة الحيوية الطحلبية هي:(23مْ، تركيز نتروجين 0.3غ/ل، 7 pH).

كانت الشروط المثالية لإنتاج أعلى تركيز من الكاروتينويدات هي: (درجة حرارة 27 مْ، تركيز نتروجين 0.1غ/ل، pH8)، إذ حفزت درجة الحرارة العالية المترافقة مع عوز النتروجين على إنتاج صباغ الأستازنتين كاستجابة للحفاظ على السلامة الهيكلية والوظيفية للنظام الضوئي الثاني (PSII) في عملية التركيب الضوئي.

لم تكن درجة الحرارة 35 مْ مناسبة لنمو الطحلب، لذلك يفضل إحداث تغيير تدريجي لدرجة الحرارة؛ الأمر الذي يسمح بتكيّف أفضل مع الظروف الجديدة.

التوصيات Recommendation

1. زيادة الاهتمام بالأبحاث التطبيقية على الطحالب الخضراء الدقيقة المنتشرة في المياه السورية على نحو عام، لاسيما بطحالبHaematococcus sp لما لها من أهمية كبيرة.
2. إجراء المزيد من الأبحاث على طحالب Haematococcus sp الموجود في المياه المحلية وتنميته على مستوى تجاري لاستخدامه في الصناعات الغذائية والطبية.
3. دراسة العوامل المؤثرة في إنتاجية صباغ الأستازنتين ذي الأهمية الطبية الكبيرة كمضاد تأكسد فعال المنتَج بفعل طحالب Haematococcus pluvialis.

معلومات التمويل :

هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

المراجع References

1 Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., Boussiba, S. (2007). On the relative efficiency of two vs. one-stage.

2 Azizi, M.; Moteshafi, H.; Hashemi, M. Distinctive nutrient designs using statistical approach coupled with light feeding strategy to improve the Haematococcus pluvialis growth performance and astaxanthin accumulation. Bioresour. Technol. 2020, 300, 122594.

3 Barghbani, R.; Rezaei, K; Jaranshir, A. (2012). Investigating the effects of several parameters on the growth of Chlorella vulgaris using Taguchi's experimental approach. International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. Vol. 1, 128-133.

4 Bhalamurugan, G. L., Valerie, O., Mark, L. (2018). Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. Environmental Engineering Research, 23(3), 229–241.

5 Bischoff, H. W., Bold, H. C. (1963). Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. University of Texas Publications, Vol. 6318, 1- 95.

6 Boussiba, S., Vonshak. A. (1991). Astaxanthin accumulation in the green alga Haematococcus pluvialis. Plant Cell Physiol. 32(7): 1077-1082.

7 Bujaldon, S.; Kodama, N.; Rappaport, F.; Subramanyam, R.; De Vitry, C; Takahashi, Y. Wollman, F. A. (2017). Functional Accumulation of Antenna Proteins in chlorophyll b less mutant of Chlamydomonas. Molecular Plant, 10, 115 – 130.

8 Butler, T. O., McDougall, G. J., Campbell, R., Stanley, M. S., Day, J. G. (2018). Media screening for obtaining Haematococcus pluvialis red motile macrozooids rich in astaxanthin and fatty acids. Biology.

9 Demming-Adams B., Adams W. W. 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. Science. ;298: 2149–2153.

10 Gatamaneni, B. L., Orsat, V., Lefsrud, M. (2018). Factors affecting growth of various microalgal species. Environmental Engineering Science, 35(10), 1037-1048.

11 Giannelli, L.; Yamada, H.; Katsuda, T.; Yamaji, H. (2015). Effects of temperature on the astaxanthin productivity and light harvesting characteristics of the green alga Haematococcus pluvialis. J. Biosci. Bioeng. 119, 345–350.

12 Goksan, T., AK, İ., Kilic, C. (2011). Growth characteristics of the alga Haematococcus pluvialis Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 11, no. 1, pp. 377-383.

13 Hata N., Ogbonna J. C., Hasegawa Y., Taroda H., Tanaka H. (2001). Production of astaxanthin by Haematococcus pluvialis in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. J. Appl. Phycol. 13, 395–402.

14 Hong, M. E.; Hwang, S. K.; Chang, W. S.; Kim, B.W.; Lee, J.; Sim, S. J. (2015). Enhanced autotrophic astaxanthin production from Haematococcus pluvialis under high temperature via heat stress-driven Haber–Weiss reaction. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 5203–5215.

15 Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition, In: Richmond, A (ed.). Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publ. pp.83-93.

16 Kang C. D., Han S. J., Choi S. P., Sim S. J. (2010). Fed-batch culture of astaxanthin-rich Haematococcus pluvialis by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation. Bioproc. Biosys. Eng. 33, 133–139. 10.1007/s00449-009-0362-5

17 Kim, J. H., Affan, A., Jang, J., Kang, M. H., Ko, A. R., Jeon, S. M., ... Kang, D. H. (2015). Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga Haematococcus sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) isolated from Korea. Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(2), 238-246.

18 Lababpour A., Shimahara K., Hada K., Kyoui Y., Katsuda T., Katoh S. (2005). Fedbatch culture under illumination with blue light emitting diodes (LEDs) for astaxanthin production by Haematococcus pluvialis. J. Biosci. Bioeng. 100, 339–342. 10.1263/jbb.100.339

19 Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., Wang, G. (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of Haematococcus pluvialis. Biotechnology Advances, 29(6), 568–574.

20 Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., ... Mohamed, M. S. (2021). A review on Haematococcus pluvialis bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. Biomolecules, 11(2), 256.

21 Pereira, S.; Otero, A. (2020). Haematococcus pluvialis bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. Algal Res. , 51, 102027

22 Perin, G., Bellan, A., Bernardi, A., Bezzo, F., Morosinotto, T. (2019). The potential of quantitative models to improve microalgae photosynthetic efficiency. Physiologia plantarum, 166(1), 380-391.

23 Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO_2 addition of microalgae Chlorella sorokiniana. Algal Research, 28, 192-199.

24 Ran, W., Wang, H., Liu, Y., Qi, M., Xiang, Q., Yao, C., ... Lan, X. (2019). Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. Bioresource technology, 291, 121894.

25 Shah, M. M. R.; Liang, Y.; Cheng, J. J.; Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga Haematococcus pluvialis: From single cell to high value commercial products. Front. Plant Sci. 2016, 7, 531.

26 Singh, A., Pant, D., Olsen, S. I., Nigam, P. S. (2012). Key issues to consider in microalgae based biodiesel production. Energy Edu. Sci. Technol. Part A Energy Sci. Res. 29, 68-700.

27 Solovchenko, A., Merzlyak, M. N., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Boussiba, S. (2010). Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in parietochloris incisa (Chlorophyta, trebouxiophyceae) mutant deficient in δ5 desaturase by nitrogen starvation and high light 1. Journal of phycology, 46(4), 763-772.

28 Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. Biotechnology for biofuels, 11(1), 1-16.

29 Wan M., Zhang J., Hou D., Fan J., Li Y., Huang J., et al. (2014). The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of Haematococcus pluvialis during a light–dark cyclic cultivation. Bioresour. Technol. 167, 276–283. 10.1016/j.biortech.2014.06.030.

30 Wayama M., Ota S., Matsuura H., Nango N., Hirata A., Kawano S. (2013). Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga Haematococcus pluvialis. PLoS ONE 8:e53618.

31 Wu,Z.,Zhu,Y.,Huang,W.,Zhang,C.,Li,T.,Zhang,Y.,etal.(2012).Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of floc- culatedmedium. Bioresour.Technol. 110, 496–502

32 Yoo J. J., Choi S. P., Kim B. W., Sim S. J. (2012). Optimal design of scalable photobioreactor for phototropic culturing of Haematococcus pluvialis. Bioprocess Biosyst. Eng. 35, 309–315. 10.1007/s00449-011-0616-x 300–305. DOI: 10.1002/bit.21391

33 Zhang, Q., Wang, T., Hong, Y. (2014). Investigation of initial pH effects on growth of an oleaginous microalgae Chlorella sp. HQ for lipid production and nutrient uptake. Water science and technology, 70(4), 712-719.