اولین کنفرانس بین المللی ۲۲ و ۲۳ دی ۱۴۰۰، دامغان
بوم شناسی و حفاظت از تنوع زیستی

1st International conference of
Ecology and conservation biodiversity

تولید سوخت پاک هیدروژن توسط *Chlorella vulgaris*

فرحناز جوانمردی*[1]، محمد مهدی محمودی[2]
۱- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
۲-استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

در تحقیق حاضر، از توانایی جلبک های سبز میکروسکوپی در جهت تولید گاز هیدروژن به عنوان یک جایگزین مناسب برای سوخت های فسیلی استفاده گردید. برای این منظور جلبک سبز میکروسکوپی از آب دریاچه مصنوعی جداسازی شد و درمحیط مایع تریس استات فسفات فاقد گوگرد کشت داده شد. عمل تولید گاز هیدروژن تحت تابش نور سفید انجام گرفت. گازهای تولید شده جمع آوری و غلظت گاز هیدروژن توسط دستگاهی الکترونیکی مجهز به حسگر هیدروژن که اختصاصا برای این منظور طراحی و ساخته شده بود، اندازه گیری شد. جدایه مورد بررسی، براساس تعیین توالی ناحیه ژنی 18S rDNA شناسایی شد و مشخص گردید که متعلق به گونه *کلرلا وولگاریس* می باشد. مکانیزم تولید هیدروژن به **این** صورت می باشد که در شرایط فقدان گوگرد، مورفولوژی سلول به شدت تغییر می کند و به دلیل متابولیسم بالا و تخریب منابع کربوهیدرات، حجم سلول افزایش یافته وکروی شکل می شود. در این شرایط، مسیر معمول فتوسنتز متوقف شده و مسیر جایگزین دیگری در کلروپلاست جلبک فعال می شود که با بهره گیری از نور خورشید و مسیر هیدروژناز منجر به تولید گاز هیدروژن می شود. نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از این گونه جلبک می تواند مسیر را به سمت تولید سوخت زیستی هموار کند.

کلمات کلیدی: *کلرلا وولگاریس* ، هیدروژن زیستی، جلبک سبز

۱. مقدمه

هیدروژن به دلیل انرژی بالا وسازگاری با محیط زیست امیدوار کننده ترین سوخت برای آینده در نظر گرفته شده است (Hemschemeier et al., 2009) . این سوخت به راحتی در پیل های سوختی برای تولید برق استفاده می شود و در اثر احتراق آن آب تولید می شود. در حال حاضر تولید هیدروژن زیستی به دلیل تولید نکردن آلاینده ها و امکان تولید در دما و فشار پایین مقرون به صرفه است (Imran et al., 2001). گروهی از میکروب های فتوسنتز کننده چه پروکاریوت مثل سیانوباکترها و یا یوکاریوت مثل جلبلک های سبز میکروسکوپی حاوی کلروفیل a و دیگر رنگیزه ها بوده که انرژی نوری را جذب کرده و به کمک فتوسیستم های **I**و **II**مشابه گیاهان سبز، فتوسنتز اکسیژنی انجام می دهند (Coleman et al., 1994; Chase et al., 2009). وقتی ریزجلبک در شرایط بی هوازی و تاریکی قرار می گیرد، توانایی تولید هیدروژن را دارد. پژوهش ها در زمینهٔ تولید هیدروژن فتوسنتزی به صورت یک منبع انرژی تجدید پذیر در سال ۱۹۷۰ آغاز شد. Ghader و همکاران، در سال ۲۰۱۱ تولید هیدروژن زیستی را توسط جلبک سبز میکروسکوپی *Chlorella sorokiniana* مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که گونه مورد بررسی توانایی خوبی برای تولید هیدروژن دارد. Volgusheva و همکاران در سال ۲۰۱۳، تولید هیدروژن توسط جلبک سبز تک سلولی *Chlamydomonas reinhardtii*را در شرایط فقر گوگرد بررسی کردند و نتیجه گرفتند که شرایط بی هوازی به تولید بیشتر هیدروژن کمک می کند. یکی از روش های متداول برای کاهش میزان فتوسنتز استفاده از محیط کشت با کمبود گوگرد می باشد (Melis et al., 2000; Hemschemeier, 2008). در حین فقر گوگرد و تولید هیدروژن، میزان تثبیت دی اکسید کربن کاهش می یابد. بنابراین عمل انتقال الکترون از مسیر اصلی فتوسنتز صورت نگرفته، در مقابل مسیر هیدروژناز فعال می شود که منجر به احیای پروتون و تولید هیدروژن می شود (Baldursson,2006; Karthic and Shiny, 2012;Obazu,2012). در سال ۲۰۰۸، Greenbaum و Lee بر روی تولید هیدروژن زیستی توسط جلبک ها تحقیقاتی انجام دادند و نتیجه گرفتند که حضور اکسیژن در محیط از تولید هیدروژن توسط جلبک ممانعت می کند در تحقیق حاضر، از جلبک سبز میکروسکوپی بعنوان منبع تولید هیدروژن زیستی استفاده شده است که یکی از اهداف مهم در جهت جایگزین نمودن یک منبع سوخت پاک بجای سوخت های فسیلی است.

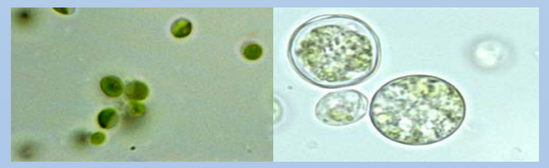
شکل۱: لوله های کشت جهت بررسی اولیه توانایی تولید گاز هیدروژن

مواد و روش ها

ابتدا نمونه های جلبک سبز میکروسکوپی از منابع آبی جداسازی شدند .بعد از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه، عمل رقیق سازی بر روی نمونه ها انجام گرفته و برروی محیط Tris-Acetate-Phosphate agar (TAP) با pH ۷کشت داده شدند .این محیط حاوی تمامی مواد معدنی مورد نیاز جلبک بود .نمونه ها تحت تابش مستقیم لامپ فلورسنت سفید در دمای ۲۵درجه سلسیوس قرار داده شدند .بعد از گذشت چهار هفته کلنی های جلبک رشد کردند .تک تک کلنی های رشد کرده به منظور تولید هیدروژن به محیط مایع TAPبدون گوگرد انتقال داده شدند(شکل ۱و۲) و پس از تنظیم غلظت سلولی در بیوراکتور، تحت تابش نور و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بیو راکتور متشکل از یک ظرف شیشه ای که دهانه آن با درپوش استیکی مسدود شده و لوله ای نیز برای انتقال گازهای تولیدی در آن تعبیه شده بود می باشد .نمونه جلبک در محیط کشت مایع فاقد گوگرد ریخته شد و هوای درون راکتور به کمک لوله های رابط تخلیه و با کپسول محتوی گاز نیتروژن، توسط گاز نیتروژن جایگزین شد .در این تحقیق جهت شناسایی مولکولی جلبک، از جفت پرایمرهای همگانی 18S-Ca و 18S-Daکه بخشی از توالی 18S rDNA ژنوم جلبک را شناسایی می نمودند استفاده گردید (Medlin et al.1988 and Coleman et al. 1994).

یکی از نمونه های جلبک مورد بررسی قادر به تولید هیدروژن در شرایط کمبود گوگرد بود .به منظور تعیین حجم گاز تولید شده، از روش جانشین سازی گاز به جای آب استفاده شد .گاز تولید شده در راکتور از طریق لوله رابط به استوانه مدرج انتقال یافته و جانشین آب موجود در استوانه مدرج می شود .گازهای تولید شده توسط نمونه مورد بررسی، جمع آوری و توسط دستگاه الکترونیکی مجهز به سنسور هیدروژن بررسی شد. ابتدا این دستگاه با مقادیر مشخص هیدروژن کالیبره گردید و سپس نمونه مورد بررسی توسط آن آزمایش گردید که میزان هیدروژن تولیدی ٪ ۲۱ از کل حجم گاز تولیدی را شامل می شد .شناسایی مولکولی نشان داد که جلبک مورد بررسی *Chlorella vulgaris* می باشد. مورفولوژی سلول جلبک نیز قبل و بعد از قرار گرفتن در شرایط فقر گوگرد بررسی شد.

شکل۲ : کلنی های جلبک سبز میکروسکوپی در سطح محیط کشت TAP



نتایج و بحث شکل ۳: تصویر میکروسکوپی سلول های جلبک سبز کلرلا قبل از قرارگیری و بعد از قرارگیری در شرایط فقر گوگرد

تولید گاز هیدروژن

یکی از نمونه های جلبک مورد بررسی قادر به تولید هیدروژن در شرایط کمبود گوگرد بود .به منظور تعیین حجم گاز تولید شده، از روش جانشین سازی گاز به جای آب استفاده شد .گاز تولید شده در راکتور از طریق لوله رابط به استوانه مدرج انتقال یافته و جانشین آب موجود در استوانه مدرج می شود .گازهای تولید شده توسط نمونه مورد بررسی، جمع آوری و توسط دستگاه الکترونیکی مجهز به سنسور هیدروژن بررسی شد. ابتدا این دستگاه با مقادیر مشخص هیدروژن کالیبره گردید و سپس نمونه مورد بررسی توسط آن آزمایش گردید که میزان هیدروژن تولیدی ٪ ۲۱ از کل حجم گاز تولیدی را شامل می شد .شناسایی مولکولی نشان داد که جلبک مورد بررسی *Chlorella vulgaris* می باشد. مورفولوژی سلول جلبک نیز قبل و بعد از قرار گرفتن در شرایط فقر گوگرد بررسی شد.

هدف این تحقیق بررسی پتانسیل استفاده از جلبک های سبز میکروسکوپی به منظور تولید گاز هیدروژن بود .با قرار دادن سلولهای جلبک در محیط کشت فاقد گوگرد و گذاشتن آنها در معرض نور، جلبک می تواند مقادیر قابل توجهی هیدروژن را برای یک دوره چند روزه تولید کند .وقتی گوگرد از محیط حذف شده و جلبک در معرض نور قرار گیرد، بخشی از مرکز واکنش فوتوسیستم ۲ (PSII) غیرفعال می‌شود. در نتیجه محیط کشت پس از چند روز غیرهوازی می‌گردد و شرایط برای عملکرد آنزیم هیدروژناز که نسبت به اکسیژن حساس می باشد مهیا می گردد (Wykoff et al ,.1998)در جلبک های سبز میکروسکوپی در حضور نور ، انرژی نوری توسط رنگیزه های فتوسیستم های **I**و **II**جذب شده و با افزایش سطح انرژی الکترون های بدست آمده از اکسیده شدن مولکول آب، در جهت تولید گاز هیدروژن به کار می رود، بنابراین بخشی از انرژی نوری در مولکول هیدروژن تولید شده ذخیره می شود.

تغییر مورفولوژی سلول جلبک در شرایط تولید گاز هیدروژن

مورفولوژی سلول جلبک نیز قبل و بعد از قرار گرفتن در شرایط فقر گوگرد بررسی شد. شکل ۳ تصویر میکروسکوپی سلول های جلبک سبز کلرلا را قبل از قرارگیری و بعد از قرارگیری در شرایط فقر گوگرد نشان می دهد. قبل از اینکه سلول جلبک در شرایط فقر گوگرد قرار گیرد .اندازه سلول جلبک تقریبا کوچک، بیضوی شکل با کلروپلاست کناری و دیواره سلولی مشخص می باشد .در شرایط فقر گوگرد مورفولوژی سلول به شدت تغییر می کند .همانطور که در شکل ۳ دیده می شود در شرایط فقر گوگرد، به دلیل متابولیسم بالا و کاهش منابع کربوهیدرات حجم سلول افزایش یافته و شکل کروی پیدا می کند وقتی جلبک سبز در محیط کشت فاقد گوگرد قرار گیرد، میزان تثبیت دی اکسید کربن کاهش می یابد .بنابراین عمل انتقال الکترون از مسیر اصلی فتوسنتز صورت نگرفته، در مقابل مسیر هیدروژناز فعال می شود که منجر به احیای پروتون و تولید هیدروژن می شود . (Antal et al., 2007; Chochois et al., 2009; Long et al., 2008)در واقع، قبل از اینکه جلبک در شرایط فقر گوگرد قرار بگیرد، نشاسته در سلول انباشته می شود (دوره رشد) ولی در شرایط فقر گوگرد، این ذخیره از بین می رود .نتایج مشابهی در رابطه با تغییر مورفولوژیکی سلول جلبک *Chlamydomonas reinhardtii*در شرایط فقر گوگرد در مطالعات Zhang و همکاران ۲۰۰۹ بدست آمده است. تولید هیدروژن به طریقه زیستی یکی از اهداف مهم در جهت جایگزین نمودن یک منبع سوخت پاک بجای سوخت های فسیلی است، که در کشورهای توسعه یافته بعنوان یکی از موارد مهم تحقیقی در جریان بوده است .اما در کشور ما شاید به دلیل دارا بودن منابع غنی نفت و گاز به این امر مهم توجهی نشده و فقدان تحقیقات علمی جامع در این خصوص کاملا مشهود می باشد .لذا با توجه به پایان پذیر بودن منابع سوخت های فسیلی و از آن مهمتر مسئله آلودگی های ایجاد شده بواسطه مصرف این قبیل سوخت ها، بسیار ضروری است که تحقیقات در جهت بکارگیری سویه هایی از میکروارگانیسم ها با قابلیت مطلوب تولید هیدروژن و همچنین بررسی فاکتورهای لازم به منظور بهینه سازی تولید انجام گیرد، که در این راستا می توان جنبه نوآوری این دانش در کشور و بومی سازی آن را از اهمیت های این تحقیق برشمرد

In the present study, the ability of microscopic green algae to produce hydrogen gas as a suitable alternative to fossil fuels was used. For this purpose, microscopic green algae were isolated from artificial lake water and cultured in sulfur-free Tris-Acetate-Phosphate medium. Hydrogen gas production was performed under white light. The produced gases were collected and the hydrogen gas concentration was measured by an electronic device equipped with a hydrogen sensor that was specially designed and manufactured for this purpose. The studied isolate was identified based on the sequencing of the 18S rDNA gene region and was identified that belonging to the species *Chlorella vulgaris*. The mechanism of hydrogen production is such that in the absence of sulfur, the morphology of the cell changes drastically, and due to high metabolism and degradation of carbohydrate sources, the cell volume increases and becomes spherical. Under these conditions, the normal path of photosynthesis is stopped and another alternative pathway is activated in the algal chloroplast, which leads to the production of hydrogen gas by utilizing sunlight and the hydrogenase pathway. The results of this study showed that the use of this species of algae can pave the way to the production of biofuels.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, biohydrogen, green algae

Baldursson.S.R.B.(2006) .Thermophilic hydrogen producing anaerobes in Icelandic hot-spring s.J.Biotechnol.1-110.

Coleman A.W., Suarez A. and Goff L. (1994), Molecular delineation of species and syngens in Volvocacean green algae (Chlorophyta), Journal of Phycology, vol. 31: 89-91.

Hemschemeier A., Fouchard S., Cournac L., Peltier G. and Happe T. (2118), Hydrogen production by Chlamydomonas reinhardtii: an elaborate interplay of electron sources and sinks, Planta, vol. 227: 397–417.

Karthic P. & Shiny J. (2012). Comparisons and limitation of biohydrogen production processes: a Review. International Journal of Advances in Engineering and Technology,ISSN:2231-1968.

Zhang,C., Ma,K., Xing,X.-H. (2009). Regulation of Hydrogen production by Enterobacter aerogenes by external NADH and NAD+. Int.J.Hydrogen Energy. 34:1226-1232.

Email: F.javanmardi@kau.ac.ir
09177045195