

## بررسی مولکولی و تعیین ویژگی‌های عملکردی جلبک *Chlorella* با رویکرد بیان ژن هیدروژناز

سیده طیبه موسوی<sup>۱</sup>، وهب جعفریان<sup>۱\*</sup> و عباس بهاری<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

<sup>۲</sup> پژوهشکده فناوری نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

### چکیده

هیدروژن زیستی حاصل فرایندهای زیستی در جایگاه یک منبع تجدید شونده انرژی مطرح است. هدف از این پژوهش، مقایسه و بهینه‌سازی بستر کشت مناسب برای پرورش ریزجلبک *Chlorella* برای تولید حداکثر هیدروژن است. در این پژوهش، بررسی‌های مولکولی به وسیله PCR و تایپینگ توالی 18S rDNA نشان داد که جلبک پژوهش شده با جلبک *Chlorella vulgaris* ۱۰۰ درصد شباهت دارد. بعد از مرحله انتخاب محیط کشت مناسب از بین محیط‌های کشت (Sorokin and Krauss, TAP, Chu10, BBM) و بهینه‌سازی شرایط کشت، نتایج نشان داد که بالاترین بهره‌وری برای تولید زیست‌توده در محیط BBM با pH=۸ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس با دوره نور/ تاریکی ۸/۱۶ ساعت است. در مرحله بعد برای القای بیشتر بیان ژن هیدروژناز، دستگاه فتوبیوراکتوری با قابلیت تولید هیدروژن طراحی و ساخته شد. سپس عملکرد دستگاه و بررسی بیان ژن هیدروژناز در شرایط مختلف (نور، pH و گوگرد....) آزموده شد. به این منظور پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، ابتدا تکثیر ژن هیدروژناز و ژن رفرنس با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد و محصول PCR ژن‌های مربوط روی ژل آگارز بررسی شد. در ادامه بیان نسبی ژن هیدروژناز با تکنیک Real Time PCR در تیمارهای یاد شده در مقایسه با تیمار شاهد نیز نشان‌دهنده تأثیر شاخص‌های نور، PH و گوگرد در بیان این ژن بود.

**واژه‌های کلیدی:** بهینه‌سازی، بیان ژن، هیدروژناز، *Chlorella vulgaris*، Real Time PCR

## مقدمه

در حال حاضر، انرژی یک جزء مهم از زندگی روزمره است. حدود ۸۰ درصد از انرژی مورد نیاز جهان از سوخت‌های فسیلی تأمین می‌شود. مصرف انرژی فعلی در سراسر جهان نزدیک به ۱۵ تریلیون وات است، در حالی که نرخ مصرف انرژی در سال ۲۰۵۰ در حدود ۲۷ تریلیون وات و در سال ۲۱۰۰، ۴۰ تریلیون وات برآورد شده است (Lewis et al., 2006). مسلماً منابع انرژی‌های فسیلی نیز مانند تمام پدیده‌های طبیعی دیگر، روزی پایان خواهد یافت. علاوه بر این آلاینده‌های ناشی از احتراق این سوخت‌ها و افزایش غلظت دی‌اکسید کربن در اتمسفر و پیامدهای آن، جهان را با تغییرات برگشت‌ناپذیر و تهدیدآمیزی روبه‌رو کرده است. تشدید اثرات گلخانه‌ای و افزایش دمای کره زمین، تغییرات آب و هوایی و بالا آمدن سطح دریاها از جمله این پیامدها محسوب می‌شوند (Das et al., 2014; et al., 2001). در نتیجه در جامعه پیشرفته امروزی برای حفظ شیوه زندگی، دسترسی به منابع انرژی جایگزین و تجدیدپذیر برای عرضه مداوم انرژی، ضروری به نظر می‌رسد. سوخت‌های زیستی به طیف متنوعی از فناوری‌هایی اشاره دارند که در آن تولید سوخت بر پایه سیستم زیستی انجام می‌شود (Wigmosta et al., 2011). فناوری جلبک، نشان‌دهنده یک حوزه پژوهشی وسیع است که در دهه‌های گذشته به سرعت در حال گسترش است. ریزجلبک‌ها به سبب توانایی رشد سریع، قابلیت بالای انجام فتوسنتز، نیاز به محیط کشت ارزان، بازدهی تولید بیشتر و قابلیت صنعتی شدن راحتتر، تنها منبعی هستند که می‌توان تا چند دهه دیگر از آن برای تولید سوخت زیستی استفاده کرد (Deschamps et al.,

2009). فرایند فتوسنتز با تبدیل انرژی نورانی به انرژی شیمیایی و در نهایت تولید مواد اولیه مورد نیاز برای تولید سوخت‌های زیستی، جایگاه اصلی را در تولید همه سوخت‌های زیستی دارند. با توجه به توانایی ریزجلبک‌ها در تثبیت گاز دی‌اکسید کربن، میکروارگانیسم‌های یادشده به تولید چندین نوع مختلف از سوخت‌های زیستی قادر هستند (Hankamera et al., 2007). از بین این سوخت‌ها، هیدروژن به دلایلی همچون چگالی انرژی بالا و زیست‌سازگاری، امیدوارکننده‌ترین سوخت برای آینده در نظر گرفته شده است (Hemschemeier et al., 2009). این سوخت به راحتی در پیل‌های سوختی برای تولید برق استفاده می‌شود و در اثر احتراق آن آب تولید می‌شود. در مجموع در حال حاضر تولید هیدروژن زیستی به سبب تولید نکردن آلاینده‌ها و امکان تولید در دما و فشار پایین مقرون به صرفه است (Imran et al., 2011). انرژی یک کیلوگرم هیدروژن معادل ۳/۵ لیتر بنزین است و مقدار انرژی بیشتری را نسبت به سوخت‌های فسیلی تولید می‌کند. علاوه بر این، منابع دسترسی به هیدروژن، فراوان و قابل تجدید است. بنابراین تهیه هیدروژن با روش زیستی از موضوعات بسیار مهم به حساب می‌آید. بخش شایان توجهی از تولید هیدروژن در ریزجلبک‌ها به فعالیت فتوسنتزی آن‌ها از جمله الکترون‌های حاصل از اکسیداسیون آب فتوسنتزی و آنزیم هیدروژناز بستگی دارد (Schenk et al., 2008). به آنزیم هیدروژناز و متابولیسم آن به بهترین وجه در جلبک سبز الگو، *Chlamydomonas reinhardtii*، توجه شده است. در ریزجلبک‌ها سه مسیر تولید هیدروژن وجود دارد. اول مسیر وابسته به

*reinhardtii* با حذف گوگرد از محیط کشت گزارش کردند.

کشور ایران منابع وسیع و ناشناخته‌ای از ریزجلبک‌ها دارد که می‌تواند یکی از کشورهای پیشرو در زمینه تولید سوخت زیستی باشد. در حال حاضر، ریزجلبک *Chlorella*، یکی از منابع اصلی محصولات زیستی با ارزش مطرح شده است. هدف از این پژوهش، کاوش و ایجاد بسترهای لازم برای بهینه‌سازی تولید محصولاتی مانند سوخت‌های زیستی از جمله هیدروژن از گونه بومی این جلبک است. بیشتر بررسی‌های انجام‌شده دنیا در این زمینه بر اساس جمع‌آوری و اندازه‌گیری گاز هیدروژن تولیدشده بر جلبک‌های بومی آن کشور است. بنابراین در این پژوهش علاوه بر معرفی و تعیین ویژگی یک جلبک بومی جدید با قابلیت تولید هیدروژن، میزان بیان ژن هیدروژناز با تکنیک Real Time PCR در شرایط مختلف (نور، pH و گوگرد...) در یک فتوبیوراکتور طراحی شده برای این هدف نیز بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

**تهیه نمونه:** ریزجلبک بررسی شده در این پژوهش (*Chlorella*) از پژوهشکده آبی‌پرووری آب‌های داخلی در بندر انزلی تهیه شد.

**کشت ریزجلبک *Chlorella*:** برای بررسی سیستماتیک و آلودگی، ریزجلبک مورد نظر در محیط کشت مایع و جامد TAP (تریس استات فسفات) با pH=7 کشت داده شد و ویژگی‌های ظاهری با میکروسکوپ نوری شناسایی شد. کشت در اتاق مخصوص کشت با دمای 30 درجه سانتیگراد و دوره

فتوسیستم ۲ که در این مسیر، انتقال الکترون به صورت خطی است و تولید فتوستنتزی اکسیژن و هیدروژن به‌طور هم‌زمان اتفاق می‌افتد. در این مورد، الکترون‌های ایجادشده در اکسیداسیون آب به فرایند تولید هیدروژن با فعالیت هیدروژناز وارد می‌شوند. Ghirardim *et al.* (2000). دوم، مسیر مستقل از فتوسیستم ۲ که در این مسیر، جریان الکترون به صورت چرخه‌ای است و منبع الکترون، پیرووات و NAD(P)H است که در اثر اکسیدشدن آن‌ها الکترون‌های لازم برای تولید هیدروژن تأمین می‌شود (Burgess *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2013) و سومین مسیر، مسیر پیوندخورده با تخمیر است (Dubini *et al.*, 2015). اکسیژن تولیدشده در فتوستنتز، مانعی برای بیان ژن هیدروژناز است. برای حل این مشکل، یک راه حل دو مرحله‌ای به کار گرفته می‌شود. در مرحله اول، جلبک‌ها در شرایط هوازی کشت داده می‌شوند و در حضور نور خورشید، دی‌اکسید کربن تثبیت و اکسیژن تولید می‌شود. در مرحله دوم، جلبک‌ها در شرایط بی‌هوازی قرار داده می‌شوند و هیدروژن از طریق تخریب ترکیبات عالی ذخیره‌شده تولید می‌شود (Rashid *et al.*, 2011; Rashid *et al.*, 2013).

Gaffron (۱۹۳۹) متابولیسم هیدروژن را در جلبک کشف کرد. Gaffron و Jack (۱۹۴۲) مشاهده کردند که وقتی ریزجلبک *Scenedesmus dimorphus* در شرایط بی‌هوازی و تاریکی قرار می‌گیرد، توانایی تولید هیدروژن را دارد. پژوهش‌ها در زمینه تولید هیدروژن فتوستنتزی به صورت یک منبع انرژی تجدیدپذیر در سال ۱۹۷۰ آغاز شد. Melis و همکاران (۲۰۰۰) فعالیت تولید هیدروژن بالا و پایدار را در *Chlamydomonas*

کشت ریز جلبک *Chlorella* استفاده شده است، برای انتخاب محیط کشت مناسب رشد بهتر و تولید بیشتر توده سلولی، جلبک در چهار محیط کشت مختلف با ترکیبات شیمیایی متفاوت BBM، Chu<sub>10</sub>، TAP و Krauss & Sorokin کشت داده شد (جدول ۱).

نوری ۱۶ ساعت، روشنایی و ۸ ساعت، تاریکی انجام شد. روشنایی از طریق لامپ‌های فلورسانت با شدت نور ۱۲۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه تأمین شد.

### بهینه‌سازی شرایط کشت

انتخاب محیط کشت مناسب: با توجه به این که در مقالات مختلف از محیط کشت‌های متفاوتی برای

جدول ۱- مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کشت: (A) TAP, BBM, (B) Chu<sub>10</sub>(C) Sorokin & Krauss, (D) به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

A		B	
NH <sub>4</sub> CL	40 g	NaNO <sub>3</sub>	25 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5 g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.34 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.26 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
Tris base	242 g	NaCL	2.5 g
Acetic Acid	100 ml	EDTA	50 g
EDTA-Na <sub>2</sub>	5 g	KOH	31 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.14 g	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.5 g
MgCL <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	5.1 g	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	9 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g	MnCL <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.5 g
CaCL <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1.6 g	MoO <sub>3</sub>	0.7 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.6 g	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	1.1 g	CO(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.5 g
C		D	
H <sub>2</sub> O	1000 ml	H <sub>2</sub> O	1000 ml
KNO <sub>3</sub>	1.25 g	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	20 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25 g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	25 mg
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .4H <sub>2</sub> O	2.5 mg
CaCL <sub>2</sub>	85 mg	MnCL <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.5 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	115 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 mg
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50 mg	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 mg
MnCL <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	15 mg	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	25 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	90 mg	HCL	0.25 ml
MOO <sub>3</sub>	7 mg	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	16 mg	EDTA	2 mg
EDTA-Na <sub>2</sub>	500 mg	FeCL <sub>3</sub>	1 mg

سانتیگراد انجام شد. دوره روشنایی (۱۶ ساعت) و تاریکی (۸ ساعت) در نظر گرفته شد. روشنایی از طریق لامپ‌های فلورسانت با شدت نور ۱۲۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه تأمین شد.

محیط کشت‌ها پس از تهیه در pH=۷ تنظیم و در ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند تا از هرگونه آلودگی دور باشند. کشت در اتاق مخصوص کشت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۰ درجه

### بررسی مولکولی ریزجلبک از طریق تحلیل

**۱۸S rDNA:** با توجه به این که گونه ریزجلبک تهیه شده مشخص نبود و همچنین به سبب تنوع بسیار زیاد گونه‌های ریزجلبکی، ممکن است روش‌های معمول مانند مشاهده میکروسکوپی و بررسی‌های مورفولوژی در شناسایی آن‌ها کافی نباشد. از سوی دیگر با توجه به پیشرفت روزافزون روش‌های بیولوژی مولکولی و همچنین اطمینان و راحتی شناسایی از طریق مقایسه ژن‌های حفاظت شده در سطح جنس و گونه ریزجلبک‌ها، استفاده از تحلیل مولکولی **۱۸S rDNA** روشی مناسب است.

**استخراج DNA:** استخراج DNA با روش دلاپورتا انجام شد (Dellaporta *et al.*, 1983). حدود یک میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی (زمانی که جلبک در مرحله رشد تصاعدی است) به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر استریل، منتقل و سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج شده (دربردارنده غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار تریس با pH=۸، غلظت ۵۰ میلی‌مولار اتیلن دی آمین تترا استیک اسید با pH=۸، غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و غلظت ۱۰ میلی‌مولار بتا مرکاپتو اتانول) به توده سلولی اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. ۱۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار، فنل و کلروفرم اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس سوسپانسیون سلولی، سانتریفیوژ و فاز بالایی جدا شد. یک میلی‌لیتر ایزوپروپانل به آن اضافه شد و مجدداً سانتریفیوژ انجام شد. فاز رویی جدا شده با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. در نهایت، رسوب به دست آمده

**ارزیابی میزان رشد:** چگالی نوری به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (DR2700, Hach, USA) در طول موج ۶۸۰ نانومتر در زمان‌های مشخصی اندازه‌گیری شد. طول موج در نظر گرفته شده از اسکن کردن نمونه مورد نظر با توجه به محیط کشت (شاهد) به دست آمد (Sharma *et al.*, 2011).

### اندازه‌گیری میزان کلروفیل: برای اندازه‌گیری

میزان کلروفیل، ابتدا به هر لوله سانتریفیوژ سه میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبک انتقال داده شد و سپس به وسیله دستگاه سانتریفیوژ (UNIVERSAL 320 R, Hettich, Germany) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی به آرامی جدا شد و به رسوب جلبکی حاصل، سه میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد اضافه شد. پس از هم‌زدن کامل، دوباره به مدت ۱۰ دقیقه عمل سانتریفیوژ تکرار شد. محلول رویی جدا شد و جذب نوری آن در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Melis *et al.*, 2001).

از طریق رابطه‌های ذیل، میزان کلروفیل a و b بر حسب میلی‌گرم در لیتر سوسپانسیون جلبکی محاسبه شد (Richmond, 2004).

Ch.a:  $14/7 (A_{663}) - 2/69 (A_{645})$

Ch.b:  $22/9 (A_{645}) - 4/64 (A_{663})$

### تعیین pH بهینه برای رشد جلبک: برای تعیین

pH بهینه، محیط کشت BBM تهیه و در pH های مختلف (۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰) تنظیم شد. پس از تلقیح، جلبک در محیط کشت در دمای ثابت ۳۰ درجه سانتیگراد در اتاق رشد قرار گرفت. نمونه‌برداری از محیط کشت در فواصل زمانی یک روز در شرایط استریل انجام و جذب نمونه‌ها در ۶۸۰ نانومتر محاسبه شد.

الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد دارنده اتیدیوم برماید، جداسازی و رنگ آمیزی شد.

**توالی‌یابی و تطبیق:** برای تعیین توالی، محصول PCR پس از تخلیص به وسیله کیت تخلیص محصول PCR به شرکت تکاپو زیست فرستاده شد و به منظور مقایسه میزان شباهت توالی، rDNA ۱۸s حاصل از تعیین توالی با توالی‌های موجود در NCBI تطبیق داده شد.

### طراحی و ساخت دستگاه فتوبیوراكتور

آنزیم هیدروژناز در حضور غلظت‌های کم اکسیژن مهار می‌شود و این طبیعت اکسیژن و هیدروژن در واکنش‌های فتوسنتز، باعث شده است تا در تولید هیدروژن جلبک‌های سبز در شرایط محیطی، پیشرفتی حاصل نشود. در نتیجه برای بررسی روند تولید هیدروژن از ریزجلبک‌ها، دستگاه فتوبیوراكتوری با قابلیت کشت و تولید هیدروژن در مقیاس آزمایشگاهی طراحی و ساخته شد. هدف از طراحی و ساخت دستگاه، ارائه یک سیستم جامع تولید هیدروژن زیستی و در کنار آن زیست‌توده جلبک با امکان کنترل تعدادی از عوامل فیزیکی و شیمیایی مؤثر در عملکرد سیستم از قبیل شدت نور، pH، جریان محیط، کنترل تولید اکسیژن و هیدروژن بود. فتوبیوراكتور ساخته شده مزیت‌هایی داشت، از جمله، سیستم بسته تولید هیدروژن، تولید نرخ بیشتری از توده زیستی در محیط کاملاً استریل و بدون آلودگی، کشت سایر میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده مانند سیانوباکتری‌ها.

### بررسی بیان ژن هیدروژناز

**تهیه پیش کشت:** از آن جا که مدتی طول می‌کشد تا ریزجلبک‌ها به محیط تازه‌ای که وارد آن می‌شوند سازگار شوند، برای به دست آوردن توده سلولی مطلوبی

در ۳۰ میکرولیتر آب، حل شد. برای اطمینان از استخراج DNA، ۵ میکرولیتر از نمونه روی ژل ۱ درصد آگارز برده شد و باندهای DNA تخلیص شده به کمک دستگاه نمایانگر ژل (-20-UVITECBTS MS, UVitec, UK) مشاهده شد.

**طراحی پرایمر:** برای شناسایی توالی s rDNA ۱۸ ابتدا لازم بود که پرایمرهای کاملاً منحصر به فرد و اختصاصی طراحی شود؛ به طوری که پرایمرهای بالادست و پایین دست فقط توالی هدف را شناسایی و تکثیر کنند. به این منظور پرایمرهای F و R با استفاده از سایت‌های BLAST و CLUSTAL و نرم‌افزار GeneRunner طراحی و برای سنتز به شرکت تکاپو زیست ارسال شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):** برای تکثیر توالی مورد نظر از جفت پرایمر پیشرو (5-ACC-TGC TTG ATC CTG CCA G-3) و پیرو (5-AGG-GCA GGG ACG TAA TCA AC-3) استفاده شد که در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، یک ناحیه به طول تقریبی ۱۷۰۰ جفت باز از توالی rDNA ۱۸s را تکثیر می‌کنند. مخلوط واکنش با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. برنامه چرخه‌های ترموسایکلر به این صورت طراحی شد: مدت زمان ۵ دقیقه، دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و ۳۵ سیکل شامل یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، یک دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و مرحله پایانی، ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. بدون فاصله پس از پایان مرحله تکثیر توالی و انجام PCR، محصول واکنش به وسیله

ترتیب که برای شمارش تعداد سلول‌ها ابتدا ارلن به آرامی حرکت دورانی داده می‌شود تا جلبک‌ها به صورت یکنواخت پخش شوند. آن گاه یک میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی به یک لوله آزمایش منتقل و ۱۰ میکرولیتر محلول لوگل دارندهٔ ید به هر لولهٔ آزمایش اضافه می‌شود تا جلبک‌ها از حرکت باز ایستند و ثابت بمانند. سپس یک قطره از سوسپانسیون جلبکی، روی محفظهٔ مخصوص لام هموسایتومتر ریخته می‌شود و پس از قراردادن لام، تعداد سلول‌ها در فواصل زمانی معین به وسیلهٔ میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ شمارش و سپس تعداد جلبک‌ها در یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون، محاسبه شد.

#### القای بیان ژن هیدروژناز: زمانی که تراکم

سلولی به  $1 \times 10^7$  رسید، تودهٔ سلولی از طریق ساترئیفیوژ جداسازی شد. محیط کشت BBM به حجم ۳۰۰۰ ml با  $\text{pH}=8$  تهیه شد. در تهیهٔ محیط کشت جدید برای تحریک بیان ژن هیدروژناز، گوگرد از محیط کشت حذف شد؛ به این طریق که به جای نمک‌های گوگردی از نمک‌های کلریدی استفاده شد. تودهٔ سلولی به دست آمده در محیط کشت بدون گوگرد در شرایط دمایی ۳۷ درجهٔ سانتیگراد (Song *et al.*, 2011)، دورهٔ نوری متناوب ۲۴ ساعت تاریکی و ۴۸ ساعت روشنایی، شدت نور ۱۲۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و هوادهی با گاز آرگون، کشت داده شد. در این مرحله از گلوکز ۳۰ میلی‌مولار به عنوان منبع کربن استفاده شد.

#### نمونه‌گیری برای استخراج RNA و ساخت

cDNA: در سومین روز القا که محیط، کاملاً بی‌هوایی شده بود و بیان ژن هیدروژناز، بیشترین نرخ خود را

که در مرحلهٔ رشد فعال است به تهیهٔ پیش کشت اقدام شد. به این منظور، محیط کشت Bold's Basal BBM (Medium) به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر تهیه و جلبک مورد پژوهش در آن کشت داده شد. سپس به مدت دو هفته در اتاق رشد با شرایط دمایی ۳۰ درجهٔ سانتیگراد و نور ممتد (با توجه به فتوسنتزکننده بودن ریزجلبک‌ها برای به دست آوردن حداکثر تودهٔ سلولی) قرار داده شد. پس از دو هفته، تودهٔ سلولی از طریق ساترئیفیوژ جمع‌آوری شد.

#### کشت ریزجلبک در فتوبیوراکتور: ابتدا

محیط کشت BBM با  $\text{pH}=8$  به حجم ۴۰۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد (Rashid *et al.*, 2013). سپس کشت جلبک‌ها در راکتور به مدت سه روز در نور مطلق با شدت نور ۱۲۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، دمای ۳۰ درجهٔ سانتیگراد و هوادهی با گاز دی‌اکسید کربن ۵ درصد انجام شد. برای اطمینان از جلوگیری رشد باکتری در محیط، از آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کانامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در غلظت نهایی استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱- کشت ریزجلبک در فتوبیوراکتور

#### شمارش سلول‌های جلبک *Chlorella*:

شمارش سلول‌ها با لام هموسایتومتر انجام شد. به این

موجود در کیت در شرایط واکنش قرار داده شد. برای تکثیر cDNA از دستگاه ترموسایکلر (مدل C1000™، شرکت (C1000™ Thermal Cycle, Biorad, USA) استفاده شد و برنامه چرخه‌های ترموسایکلر به این صورت طراحی شد: ۱۲ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد، ۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد، ۵۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و مرحله پایانی، ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد.

**طراحی پرایمر:** در این پژوهش برای بررسی بیان ژن هیدروژناز، پرایمرهای کاملاً منحصر به فرد و اختصاصی طراحی شد. همچنین از ژن رفرنس *gapdh* به عنوان شاهد داخلی در اندازه‌گیری بیان ژن با روش exon junction targeting در نرم‌افزار Beacon Designer ver8 استفاده شد. (جدول ۲).

داشت، نمونه‌گیری برای جداسازی RNA و ساخت DNA انجام شد.

**استخراج RNA:** نمونه‌گیری در روز سوم کشت برای استخراج RNA انجام شد. استخراج RNA طبق دستورعمل آورده شده در کیت RiboEx™ تهیه شده از شرکت پیشگام انجام شد. پیش از شروع کار، همه مواد و وسایل مورد استفاده از جمله تیوپ‌ها و سر سمپلر در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱۲۱ بار اتوکلاو شدند. سپس تعیین غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودرآپ (مدل، کشور) انجام شد.

**ساخت cDNA:** برای سنتز cDNA از کیت RT Premix CycleScript تهیه شده از شرکت تکاپو زیست که در بردارنده مواد مورد نیاز برای سنتز cDNA است، استفاده شد. به این منظور، ابتدا ترکیب موجود در کیت در ۱۹ میکرولیتر آب دیس، حل شد و یک میکرولیتر از RNA استخراج شده به آن اضافه و براساس دستورعمل

جدول ۲- توالی آغازگرهای استفاده شده در واکنش PCR

ژن	توالی آغازگرها
هیدروژناز	رفت 5'-GCTGACCTGACCATTATGGAGGAGG-3'
	برگشت 5'-CATGGGCAGTGGCTCCTCCTTGTTG-3'
خانه دار	رفت 5'- CTTGGAAGCTAGGAGTATGTC-3'
	برگشت 5'-GATCTTAATCTTGCCACTCATTC-3'

محصول PCR روی ژل ۲ درصد الکتروفورز و با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. برای دیدن ژل از دستگاه ترانس لومینومتر (دستگاه موگد UV با طول موج ۲۴۵-۳۶۵ نانومتر) (UVITECBTS-20-MS, UVitec, UK) استفاده شد.

**بررسی بیان ژن هیدروژناز با استفاده از Real Time PCR:** در تکمیل نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، بیان ژن هیدروژناز به وسیله Real

**واکنش زنجیره‌ای پلیمرز:** مراحل PCR شامل این موارد بود: واسرشت‌سازی اولی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۳ دقیقه، سپس ۴۵ چرخه به صورت دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال به ترتیب برای رفرنس و هیدروژناز ۵۲ و ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و در مرحله آخر، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه.



برای بررسی آلودگی، ریزجلبک در محیط کشت جامد TAP کشت داده شد. پس از مدت زمان دو هفته به همراه نمونه جلبکی کلونی‌های باکتری مشاهده شد. از آن جا که جلبک‌های سبز با توجه به ساختار دیواره‌شان به سطح بالای اشعه ماورای بنفش نسبت به باکتری‌ها مقاوم هستند (Holzinger and et al., 2006) برای پاک‌سازی محیط از باکتری، ابتدا از اشعه ماورای بنفش با تابش ۲۰۰۰۰ میکرووات بر ثانیه بر سانتی‌متر مربع به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد و در نهایت از آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) هنگام تهیه محیط کشت به‌طور هم‌زمان استفاده شد و از این طریق آلودگی باکتریایی از بین برده شد.

در مرحله انتخاب محیط کشت مناسب، نتایج حاصل از تحلیل واریانس نشان داد که اثر زمان و محیط کشت بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b و رشد ریزجلبک (جذب ۶۸۰ نانومتر) در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۳).

Time PCR نیز بررسی شد. به این منظور از پرایمرهای ژن هیدروژناز و *gapdh* استفاده شد (جدول ۲). چرخه‌های دمایی مراحل مختلف Real Time PCR در دو مرحله انجام شد: واسرشت سازی اولی در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و ۴۵ چرخه در دماهای ۹۴ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه. پس از آن، تحلیل ذوب نیز برای تأیید اختصاصی بودن واکنش استفاده شد.

### نتایج

با توجه به پژوهش‌های سیستماتیک، جلبک بررسی شده بر اساس خصوصیات ظاهری (کروی، تک یاخته، کلروپلاست فنجان‌ی و بدون تاژک) شناسایی و به عنوان جلبک *Chlorella* تأیید شد (شکل ۲).



شکل ۲- شکل میکروسکوپی ریزجلبک با بزرگ‌نمایی ۴۰

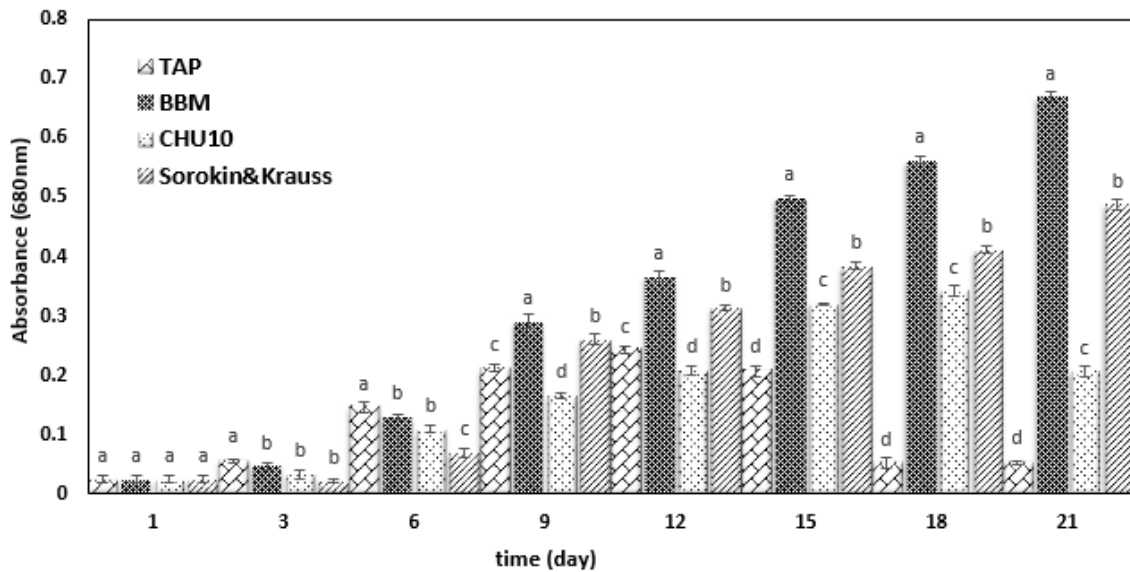
جدول ۳- تحلیل واریانس (میانگین مربعات) زمان و محیط کشت از نظر سه صفت بررسی شده در ریزجلبک *Chlorella*

میانگین مربعات				منابع تغییر
جذب (۶۸۰)	کلروفیل b	کلروفیل a	درجه آزادی	
۰/۱۳۴**	۱/۵۷۶**	۵/۳۰۱**	۷	زمان
۰/۰۵۸**	۰/۳۴۹**	۸/۵۲۶**	۳	محیط کشت
۰/۰۲۰**	۰/۲۲۶**	۱/۰۳۴**	۲۱	محیط کشت × زمان
۰/۰۰۰۶	۰/۰۲۴	۰/۰۰۳	۳۱	اشتباه آزمایشی
۱۲/۴۹۸	۲۰/۹۶۱	۴/۱۱۵		ضریب تغییرات (درصد)

\*\* و NS به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و غیر معنی‌دار

بالاترین میزان تولید توده زیستی را در بین محیط کشت‌های دیگر دارد (شکل ۳).

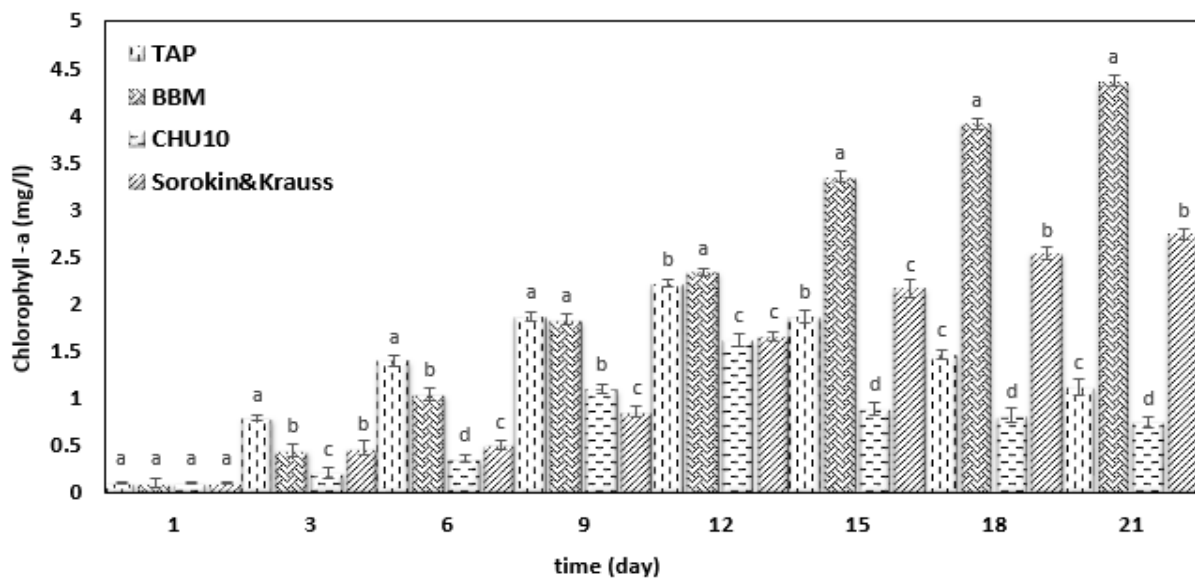
مقایسه میانگین رشد ریزجلبک در چهار محیط کشت مختلف نشان داد که محیط کشت BBM



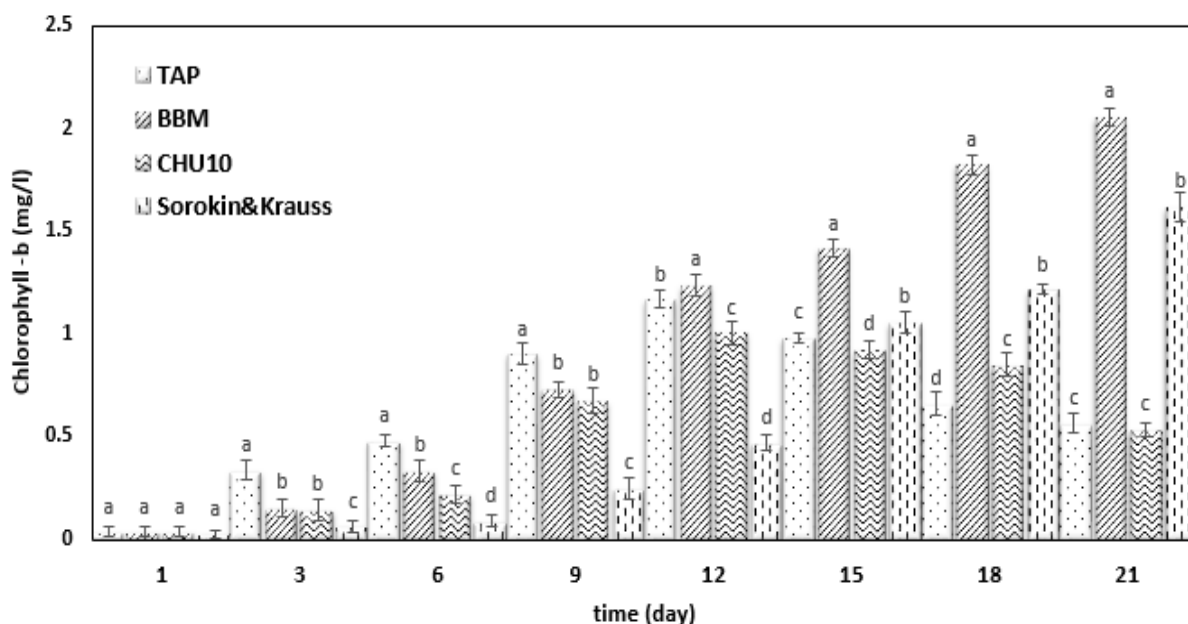
شکل ۳- مقایسه میانگین رشد ریزجلبک *Chlorella* در چهار محیط کشت بررسی شده (حروف یکسان نشان‌دهنده نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است که با آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شده است).

برابر با ۲/۲۰۵ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد که این نیز نشانه بودن محیط کشت BBM برای ریزجلبک بررسی شده است.

همچنین با مقایسه میانگین کلروفیل a (شکل ۴) و b (شکل ۵) در چهار محیط کشت مختلف، بالاترین میزان تولید کلروفیل در محیط کشت BBM برای کلروفیل a برابر با ۴/۳۶۱ میلی‌گرم در لیتر و کلروفیل b



شکل ۴- مقایسه میانگین کلروفیل a در ریزجلبک *Chlorella* در چهار محیط کشت بررسی شده (حروف یکسان، بیان‌کننده نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است که با آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شده است).



شکل ۵- مقایسه میانگین کلروفیل b در ریزجلبک *Chlorella* در چهار محیط کشت بررسی شده (حروف یکسان، نشان‌دهنده نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است که با آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شده است).

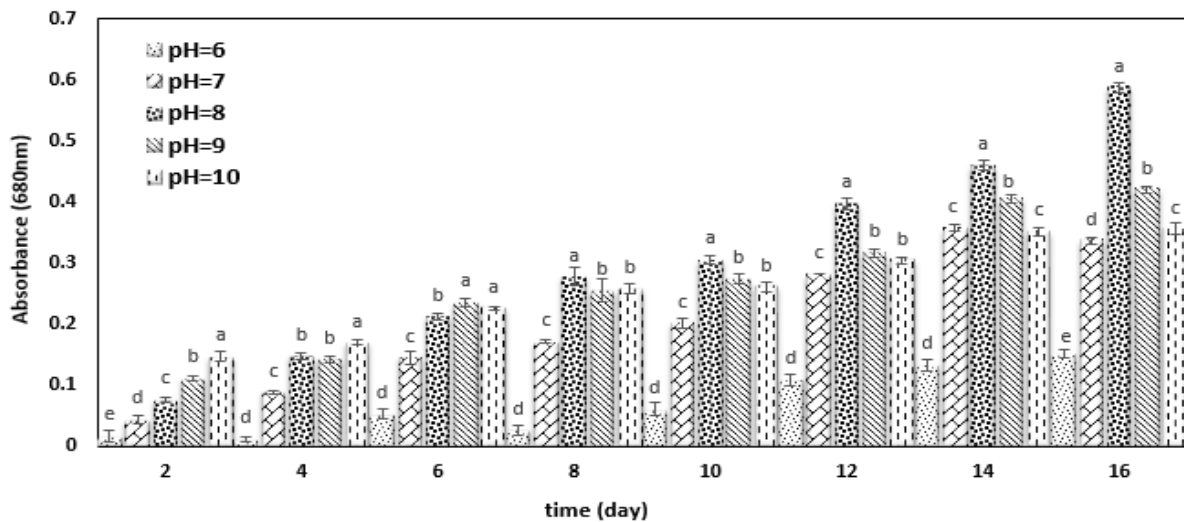
رشد ریزجلبک نه تنها به درجه حرارت و نور مناسب نیاز دارد، بلکه مواد مغذی در دسترس و مقدار آن در محیط کشت نیز تأثیر مستقیم روی رشد دارد. در مرحله تعیین pH بهینه، نتایج تحلیل واریانس نشان داد که اثر زمان و pH بر میزان رشد ریزجلبک در سطح ۱ درصد، معنی‌دار است (جدول ۴).

جدول ۴- تحلیل واریانس (میانگین مربعات) زمان و pH از نظر صفت بررسی شده در جلبک

منابع تغییر	درجه آزادی	جذب (۶۸۰)
زمان	۷	۰,۱۰۷۲**
pH	۴	۰,۱۲۴۹**
pH × زمان	۲۸	۰,۰۰۴۱**
اشتباه آزمایشی	۳۹	۰,۰۰۱۸
ضریب تغییرات (درصد)		۱۹,۵۰۹

\*\* و <sup>ns</sup> به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و غیر معنی‌دار

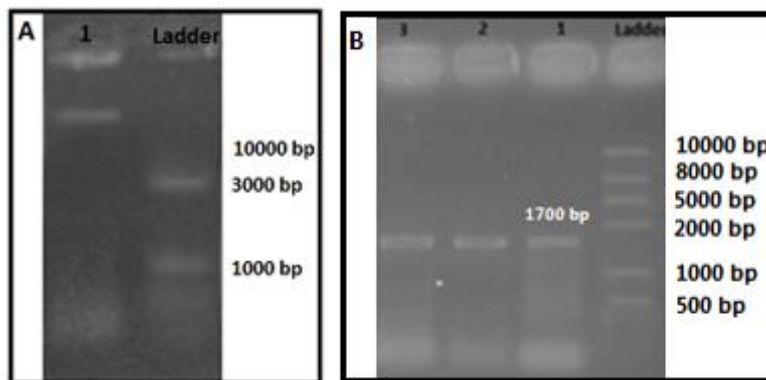
همچنین مقایسه میانگین محیط کشت BBM با pH های مختلف نشان داد که pH بهینه رشد pH=۸ است (شکل ۶).



شکل ۶- مقایسه میانگین محیط کشت BBM با pH های مختلف (حروف یکسان، بیان‌کننده نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است که با آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شده است).

محصول PCR ژن مربوط روی ژل آگارز برده شد (شکل ۷- B). اندازه قطعه تکثیر شده حدود ۱۷۰۰ bp مشاهده شد.

در بررسی مولکولی ریزجلبک از طریق تحلیل s rDNA ۱۸ پس از استخراج DNA (شکل ۷- A)، تکثیر و تعیین توالی ژن کدکننده rDNA ۱۸s انجام شد و



شکل ۷- الکتروفورز ژل آگارز DNA ژنومی و rDNA ۱۸s استخراج شده از نمونه جلبک:

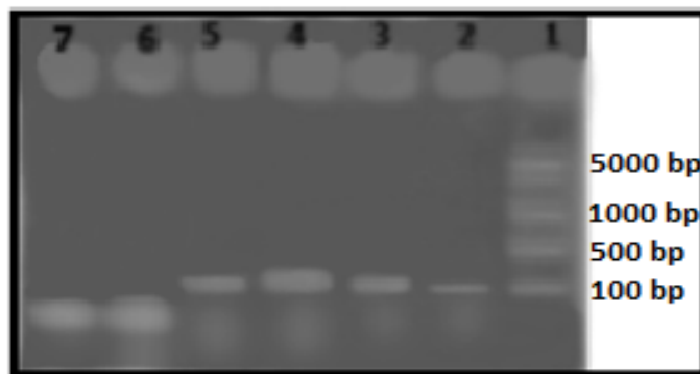
(A) باند مربوط به استخراج DNA و (B) باندهای ۱، ۲، ۳ مربوط به rDNA (۱۷۰۰ bp) ۱۸ s

در مرحله بررسی بیان ژن هیدروژناز پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، تکثیر ژن هیدروژناز و ژن رفرنس با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، انجام شد و محصول PCR ژن‌های مربوط روی ژل آگارز برده شد. باند مربوط به ژن هیدروژناز هم در نمونه تیمار شده و هم در نمونه شاهد در محدوده ۱۰۰ bp مشاهده شد، اما

شرکت Bionee کره جنوبی، تعیین توالی محصول PCR را با پرایمرهای F و R را انجام داد. پس از تعیین توالی و انطباق آن در NCBI در نهایت، ریزجلبک مورد نظر، همسانی ۱۰۰ درصد را با ریزجلبک *Chlorella vulgaris* نشان داد و در بانک جهانی ژن به نام KU720636 ثبت شد.

شاهد نشان می‌دهد که ژن هیدروژناز موجود در جلبک بررسی شده به اکسیژن مقاوم است و در شرایط طبیعی و در حضور اکسیژن نیز بیان می‌شود (شکل ۸).

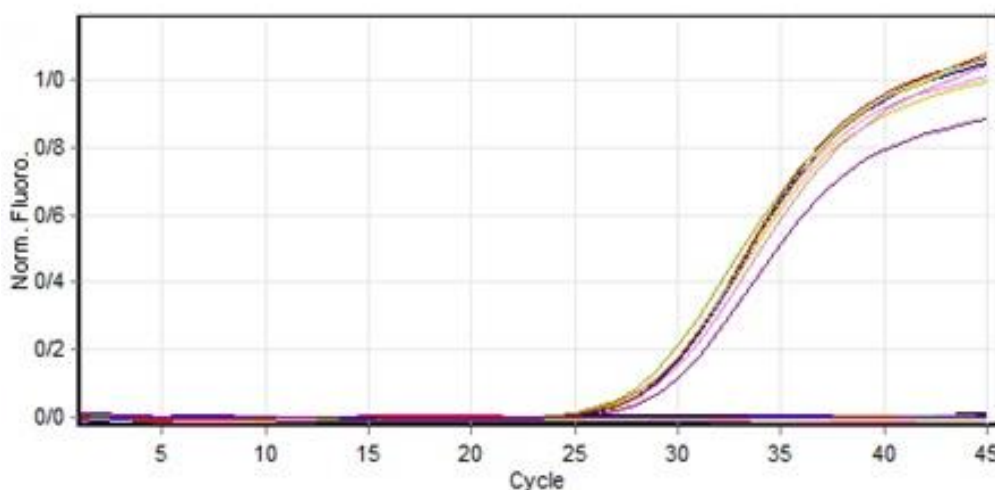
قوی بودن باند هیدروژناز در نمونه تیمار شده نشان‌دهنده افزایش بیان ژن هیدروژناز در این نمونه است. مشاهده شدن باند مربوط به ژن هیدروژناز در نمونه



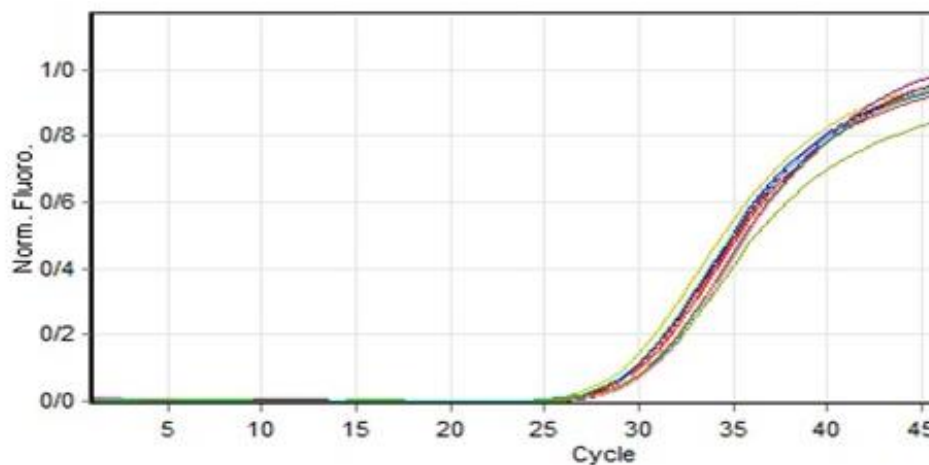
شکل ۸- محصول PCR توالی ژن هیدروژناز: نشان‌دهنده ۱۰۰ bp (۱)، باند مربوط به ژن هیدروژناز: نمونه شاهد (۲)، نمونه تیمار شده (۴) و نمونه شاهد منفی (۶). باند مربوط به ژن رفرنس (*gapdh*): نمونه شاهد (۳) نمونه تیمار شده (۵)، نمونه شاهد منفی (۷).

گروه‌های شاهد بود. نمودارهای تکثیر واکنش Real Time PCR ژن هیدروژناز و ژن رفرنس در شکل‌های (۹) و (۱۰) نشان داده شده است.

در تکمیل نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، بیان ژن هیدروژناز به وسیله Time PCR نیز بررسی شد. نتایج به دست آمده از این روش نیز نشانه بیان بیشتر ژن هیدروژناز در شرایط بهینه شده نسبت به



شکل ۹- نمودار منحنی تکثیر (amplification curves) ژن هیدروژناز در دستگاه qPCR. خط آستانه برای به دست آوردن سیکل آستانه (Ct) بر مبنای پایین‌ترین جایی که همه منحنی‌های مربوط به گروه‌های تیمار و کنترل، وارد مرحله لگاریتمی شده بودند، ترسیم شد. Ct های حاصل بر مبنای غلظت cDNA و Ct مربوط به spike DNA نرمال شد و در نهایت، بیان نسبی ژن هیدروژناز در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل به وسیله Ct های به دست آمده برای ژن رفرنس *gapdh* و با روش Pfaffl در نرم‌افزار REST 2009 محاسبه شد (Pfaffl, 2001).



شکل ۱۰- نمودار منحنی تکثیر ژن رفرنس *gapdh* در دستگاه Real Time PCR. ژن رفرنس هدف به دست آمده در پژوهش حاضر ابتدا برای اطمینان توالی‌یابی شد. آزمون RT<sup>-</sup> (واکنش PCR با الگو قرار دادن RNA به جای cDNA) برای کنترل آلودگی DNA ژنومی انجام شد. در هر Run، دستگاه cDNA متناظر برای ژن هدف (هیدروژناز) و ژن رفرنس به کار گرفته شد. در نهایت از Ct های *gapdh* در جایگاه کنترل داخلی (internal control) در بیان ژن هیدروژناز استفاده شد.

نتایج حاصل از بررسی تغییرات بیانی ژن هیدروژناز در نرم‌افزار REST نشان‌دهنده افزایش کمی بیان ژن هیدروژناز به میزان ۱/۳۷ نسبت به گروه شاهد است (جدول ۵).

همچنین نتایج تحلیل منحنی ذوب نشان داد که واکنش Real Time PCR از هر گونه تکثیر غیراختصاصی و پرایمر دایمر به دور است (نتایج نیامده است).

جدول ۵- نتایج بررسی تغییرات کمی بیان ژن هیدروژناز

نتیجه	نسبت بیان	کارایی واکنش	نوع	ژن
افزایش بیان	۱/۳۷	۰/۷۹	هدف	هیدروژناز
	۱/۱۰۰	۰/۷۲۷۵	خانه دار	<i>gapdh</i>

از غلظت گلوکز ۳۰ میلی‌مولار به صورت منبع کربن در محیط کشت بدون گوگرد استفاده شد. آن‌ها مشاهده کردند که به نسبت کاهش گلوکز در محیط، میزان بیشتری از هیدروژن تولید می‌شود و استفاده از غلظت‌های بالای گلوکز (۴۰ و ۵۰ میلی‌مولار) مناسب نیست؛ زیرا با توجه به شرایط اعمال شده (منبع غنی از کربن و شرایط بی‌هوازی) احتمال این که مسیر به سمت بیوسنتز چربی پیش رود وجود دارد. همچنین برای

در پژوهش حاضر برای بیان ژن هیدروژناز، طبق یافته‌های ملیس و همکاران (۲۰۰۱) گوگرد از محیط حذف شد. محرومیت از گوگرد در جلبک‌های سبز، مهار برگشت‌پذیر فتوسنتز به سبب مانع شدن از بیوسنتز پروتئین‌ها را موجب می‌شود. فتوسیستم ۲ غیر فعال و محیط، بی‌هوازی می‌شود و شرایط برای بیان ژن هیدروژناز فراهم می‌شود (Melis *et al.*, 2001). همچنین با توجه به مطالعات رشید و همکاران (۲۰۱۱)

شرایط بهینه رشد این ریزجلبک با توجه به تحلیل واریانس، محیط کشت BBM با  $\text{pH}=8$  است. با بررسی عملکرد دستگاه فتویوراکتور و بیان ژن هیدروژناز با روش Real time PCR به وضوح مشخص شد که ژن بررسی شده در شرایط بهینه اعمال شده بیان بیشتری دارد. از این طریق صحت عملکرد دستگاه فتویوراکتور (از جنبه کنترل بسته بودن سیستم و کنترل اثر مهارگی گاز اکسیژن بر بیان ژن هیدروژناز) نیز تأیید شد. در نهایت پیشنهاد می‌شود با توجه به عملکرد مناسب این جلبک در تولید هیدروژن زیستی، این جلبک در تولید هیدروژن استفاده شود.

### سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه زنجان انجام شد.

دست‌یابی به بالاترین سطح تولید هیدروژن از چرخه نوری متناوب ۲۴ ساعت تاریکی - ۴۸ ساعت روشنایی، استفاده شد؛ زیرا در شدت نور بالا با ایجاد مهار نوری، تولید اکسیژن کاهش و شرایط بالقوه بی‌هوازی ایجاد می‌شود. شدت نور بالا، تخریب نشاسته و پروتئین‌های ذخیره شده در مرحله یک (رشد در شرایط هوازی) را موجب می‌شود؛ در نتیجه افزایش تولید هیدروژن را دربردارد. علاوه بر این، مصرف گوگرد باقی مانده در محیط در شدت نور بالا نسبت به تاریکی، سریعتر اتفاق می‌افتد (Melis et al., 2001).

### جمع بندی

با توجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، مشخص شد که ریزجلبک بررسی شده بر مبنای پژوهش‌های سیستماتیک و مولکولی *Chlorella vulgaris* از جنبه تولید هیدروژن، قابل بررسی است.

### منابع

- Burgess, S. J., Tamburic, B., Zemichael, F., Hellgardt, K. and Nixon, P. J. (2011) Solar-driven hydrogen production in green Algae. *Advances in Applied Microbiology* 75: 71-110.
- Das, D. and Vezirolu, T. N. (2001) Hydrogen production by biological process: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy* 26: 13-28.
- Das, D., Khanna, N. and Dasgupta, C. N. (2014) Biohydrogen production: fundamentals and technology advances. CRC Press, Boca Raton.
- Deschamps, P. and Moreira, D. (2009) Signal conflicts in the phylogeny of the primary photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 26(12): 2745-2753.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J. B. (1983) A rapid method for DNA extraction from plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Dubini, A. and Ghirardi, M. (2015) Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen. *Photosynthesis Research* 123(3): 241-253.
- Ghirardim, M. L., Zhang, L., Lee, J. W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E. and Melis, A. (2000) Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>. *Trends in Biotechnology* 18(12): 506-511.
- Gaffron, H. (1939) Reduction of CO<sub>2</sub> with H<sub>2</sub> in green plants. *Nature* 143: 204-205.

- Gaffron, H. and Rubin, J. (1942) Fermentative and photochemical of hydrogen in algae. *Journal of General Physiology* 26: 219-240.
- Hankamera, B., Lehrb, F., Rupprechta, J., Jan, H. M., Postenb, C. and Kruse, O. (2007) Photosynthetic biomass and H<sub>2</sub> production by green algae, from bioengineering to bioreactor scale-up. *Physiologia Plantarum* 131: 10–21.
- Hemschemeier, A., Melis, A. and Happe, T. (2009) Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynthesis Research* 102(2-3): 523–540.
- Holzinger, A. and Lu'tz, C. (2006) Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* 37: 190–207.
- Imran, A., Sudip, R. and Lakkhana, K. (2011) Biohydrogen production from microalgae of *Chlorella sp.* In: The International Conference on Sustainable Community Development, UN Headquarters, New York, USA.
- Lewis, N. S. and Nocera, D. G. (2006) Powering the planet: Chemical challenges in solar energy utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(43): 15729-15735.
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L. and Seibert, M. (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 122: 127–135.
- Melis, A. and Happe, T. (2001) Hydrogen production, green algae as a source of energy. *Plant Physiology* 127: 740-748.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): 2002-2007.
- Rashid, N., Lee, K. and Mahmood, Q. (2011) Bio-hydrogen production by *Chlorella vulgaris* under diverse photoperiods. *Bioresource Technology* 102: 2101–2104.
- Rashid, N., Lee, K., Han, J. and Gross, M. (2013) Hydrogen production by immobilized *Chlorella vulgaris*: optimizing pH, carbon source and light. *Bioprocess Biosystem Engineering* 36: 867–872.
- Richmond, A. (2004) *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science. Oxford, UK.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O. and Hankamer, B. (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioengineering Research* 1: 20–43.
- Sharma, S., Singh, R. N. and Satyendra, T. (2013) Biohydrogen from Algae: fuel of the future. *International Research Journal of Environment Sciences* 2(4): 44-47.
- Sharma, R., Rekha, R., Singh, G. P. and Sharma, V. K. (2011) Comparison of different media formulations on growth, morphology and chlorophyll content of green alga, *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2(2): 509-516
- Song, W., Rashid, N., Choi, W. and Lee, K. (2011) Biohydrogen production by immobilized *Chlorella sp.* using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. *Bioresource Technology* 102: 8676–8681.
- Wigmosta, M. S., Coleman, A. M., Skaggs, R. J., Huesemann, M. H. and Lane, L. J. (2011) National microalgae biofuel production potential and resource demand. *Water Resources Research* 47(3): 1-13.



## Molecular study of the *Chlorella* algae and determining its functional features with the approach of hydrogenase gene expression

Seyedeh Tayebeh Mousavi <sup>1</sup>, Vahab Jafarian <sup>1\*</sup> and Abbas Bahari <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zanjan, Zanjan, Iran

<sup>2</sup> Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran

### Abstract

Biohydrogen production by biological processes are known as a renewable energy source. The aim of the investigation was to find and optimize the most appropriate medium for the algae growth to produce the maximum amount of hydrogen. First of all, the bioinformatics and biosystematics studies were taken for identifying the collected microalgae which was detected as *Chlorella* with the following features: spherical appearance, spent protozoan, Cup-shaped chloroplast with no flagella. On the other hand, the molecular analysis by PCR and 18S sequence typing of interested microalgae demonstrated 100% similarity to that well known sequences for *Chlorella vulgaris*. Second, we assessed some culture media including BBM, Chu<sub>10</sub>, TAP, and Sorokin and Krauss for optimum growth conditions for *Chlorella vulgaris*. In general, our results showed that BBM medium had the highest efficiency for producing microalgae biomass under following conditions: pH=8, temperature of 30 ° with 16 to 8 h light to darkness periods ratio. Third, we designed a more efficient photo-bioreactor apparatus toward inducing more powerful bio-hydrogen production by hydrogenase enzyme activity of our given microalgae. Then, the performance of the apparatus as well as the gene expression was scrutinized under different conditions (light, pH, sulphorous, etc.). For this, after extracting RNA and constructing cDNA, hydrogenase gene was amplified with PCR and the product was evaluated by agarose gel. However, the relative expression of the gene measured by Real Time PCR showed the influence of light, pH and sulphorous on the expression as compared with control.

**Key words:** Optimization, Gene expression, *Chlorella vulgaris*, Real Time PCR, Hydrogenase.

\* v.jafarian@znu.ac.ir