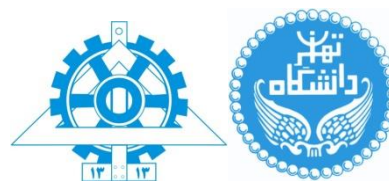




University of Cordoba
College of Bioscience
Department of Biochemistry
and Molecular Biology



University of Tehran
College of Engineering
Faculty of Chemical
Engineering

PhD program: Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Título:

**Estudios Experimentales sobre el metabolismo de la producción
de hidrógeno en consorcios de Algas-bacterias**

Title:

**Experimental Study and Modeling the Metabolism of Hydrogen
Production in Algae-Bacteria Consortia**

Supervisors:

Dr. David Gonzalez Ballester

Dr. Omid Tavakoli

Dr. Alexandra Dubini

Dr. Seyed Amir Marashi

Advisors:

Prof. Mohammad Reza Mehrnia

Dr. Hamid Moghimi

By:

Neda Fakhimi

**Joint PhD thesis between
University of Cordoba and University of Tehran**

October 2019

TITULO: *Estudios Experimentales sobre el metabolismo de la producción de hidrógeno en consorcios de Algas-bacterias*

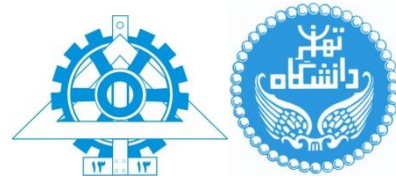
AUTOR: *Neda Fakhimi*

© Edita: UCOPress. 2020
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



University of Cordoba
College of Bioscience
Department of Biochemistry
and Molecular Biology



University of Tehran
College of Engineering
Faculty of Chemical
Engineering

Experimental Study and Modeling the Metabolism of Hydrogen Production in Algae-Bacteria Consortia

PhD thesis

Neda Fakhimi

Cordoba, 2019

Experimental Study and Modeling the Metabolism of Hydrogen Production in Algae-Bacteria Consortia

Directors from University of Cordoba,

Signature. **David Gonzalez Ballester**

Signature. **Alexandra Dubini**

A thesis submitted to the graduate studies office
in partial fulfillment of the requirements for
the degree of Doctor of Philosophy in
Biochemistry and Molecular Biology (UCO)
& Chemical Engineering-Biotechnology (UT)

Signature. **Neda Fakhimi**



TÍTULO DE LA TESIS: 'Estudios Experimentales sobre el metabolismo de la producción de hidrógeno en consorcios de Algas-bacterias'.

En inglés, 'Experimental Study and Modeling the Metabolism of Hydrogen Production in Algae-Bacteria Consortia'.

DOCTORANDO/A: Neda Fakhimi

David Gonzalez Ballester, Profesor titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba; y Alexandra Dubini, Investigadora distinguida de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

Informan que:

La presente Tesis Doctoral titulada "Estudios Experimentales sobre el metabolismo de la producción de hidrógeno en consorcios de Algas-bacterias". En inglés, "Experimental Study and Modeling the Metabolism of Hydrogen Production in Algae-Bacteria Consortia" realizada por D^a. Neda Fakhimi se ha desarrollado en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba bajo nuestra dirección.

Esta Tesis Doctoral reúne todas las condiciones exigidas según la legislación vigente. Su evolución y desarrollo ha seguido el plan de trabajo inicialmente previsto, alcanzándose los objetivos previamente marcados. Durante la elaboración de la Tesis, el doctorando ha realizado una labor altamente satisfactoria dentro del grupo de investigación.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis, han sido publicados en dos revistas internacionales de reconocido prestigio. Otros resultados están actualmente en proceso de publicación. Además, el doctorando ha realizado la tesis en régimen de cotutela con la Universidad de Teherán.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 16 de septiembre de 2019

Firma del/de los director/es


Fdo. **David Gonzalez Ballester**


Fdo. **Alexandra Dubini**



TÍTULO DE LA TESIS: Experimental study and modeling the metabolism of hydrogen production in algae-bacteria consortia.

DOCTORANDO/A: Neda Fakhimi

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

As s supervisor of PhD thesis of Miss Neda Fakhimi, I would like to summarize my evaluation as following:

- 1- The work demonstrates originality of conception and execution.
- 2- The thesis provides a sufficiently comprehensive study of the topic.
- 3- The research findings are suitably articulated and accompanied by adequate exposition.
- 4- The thesis as a whole makes an original contribution to the subject with which it deals, and the candidate understand the relationship of the thesis to the wider context of knowledge in which it belongs.
- 5- The creative work demonstrates a sufficiently high standard of literacy and performance quality and is presented in a professional manner.
- 6- The research questions have been identified and explored through the creative work, as appropriate.

We had cooperation in publishing three ISI journal papers:

- 1- Acetic acid uptake rate controls H₂ production in Chlamydomonas-bacteria, *Algal Research*, 42 (2019)
- 2- Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in Chlamydomonas-bacteria, *Bioresource Technology*, 289 (2019)
- 3- Improving hydrogen production using co-cultivation of bacteria with *Chlamydomonas reinhardtii* microalga, *Materials Science for Energy Technologies*, 2 (2019)

Last but not least, Miss Neda Fakhimi is an enthusiastic, hardworking, and dedicated young lady. She is consistently successful in improving her skills, and she works hard to do so. She has an outstanding potential, diligence and motivation to succeed in her future academic studies. She also has a friendly personality and is very cooperative which makes her an excellent team member.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 9 de October de 2019

Firma del/de los director/es

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'D. Javiera', with a long horizontal flourish extending to the right.

Fdo.: _____ Fdo.: _____



TÍTULO DE LA TESIS: Experimental study and modeling the metabolism of hydrogen production in algae-bacteria consortia.

DOCTORANDO/A: Neda Fakhimi

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma)

It is my pleasure to write this report about the doctoral thesis of Ms. Neda Fakhimi. As one of her supervisors, I had the opportunity to be partly involved the design of Neda's work, which involved extensive analysis of algal-bacterial co-cultures, together with the application of metabolic models to understand the mechanism of inter-species interactions. During the course of her doctoral research, I was impressed by her knowledge about the topic and the precision of her research results, as well as the comprehensive and insightful discussions on the results. I have read her PhD thesis carefully, and can certainly say that it is a very well-written scientific work. Moreover, Neda's research studies has been resulted in three published papers:

Fakhimi and Tavakoli (2019) Improving hydrogen production using co-cultivation of bacteria with *Chlamydomonas reinhardtii* microalga, *Materials Science for Energy Technologies*, **2**: 1-7.

Fakhimi et al. (2019) Acetic acid uptake rate controls H₂ production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures, *Algal Research*, **42**: 101605.

Fakhimi et al. (2019) Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures, *Bioresource Technology*, **289**: 121648.

Altogether, I believe that Neda certainly has all the required qualifications to obtain a PhD degree. I personally recommend her PhD work to be graded as the maximum possible qualification score.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Tehran, 2 Oct. 2019

Sayed-Amir Marashi

Dr. Sayed-Amir Marashi

To my parents

تقدیر و قدردانی (Acknowledgements)

سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست!

از اساتید راهنمای فرهیخته و ارجمندم، جناب آقای دکتر امید توکلی و جناب آقای دکتر سید امیر مرعشی سپاس بی کران دارم. تشویق، حمایت و راهنمایی های ایشان برایم توشه ای بسیار گران بها بوده و بی شک اخلاق و منش حرفه ای ایشان الهام بخش من خواهد بود.

همچنین از اساتید فاضل، جناب آقای دکتر محمدرضا مهرنیا و جناب آقای دکتر حمید مقیمی که اندیشمندانه بنده را راهنمایی کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از همه دوستانم در آزمایشگاه های "فناوری های سبز"، "زیست شناسی سامانه ای" و "زیست فناوری محیطی" بابت تمامی همراهی های دوستانه و ساختن خاطراتی به یاد ماندنی ممنونم.

به ویژه از دوست بسیار عزیز و گران قدرم، خانم حمیده فولادپها بابت تمام آموزه ها و همراهی که در بخش مدل سازی برای اینجانب داشتن تشکر و قدردانی می کنم.

از آقای دکتر حسین زاده برای تمام راهنمایی ها و کمک های ارزنده ای ایشان تشکر و قدردانی می کنم.

از تمام دوستان خوبم که همیشه مشوق و همراه من هستند تشکر می کنم.

Thanks to my Spanish family, who 'always' gave me support, respect and love!!!

Thanks to my supervisor, Dr. **David Gonzalez Ballester** for all your support, respect, patience, motivation and trust. Thanks for teaching me how to 'think better and bigger', how to 'give a message'. I feel so happy and lucky for being your student.

Thanks to my second supervisor, Dr. **Alexandra Dubini**, for all your kind support, advices and motivation. Thanks for teaching me how to 'improve', how to 'make my mind clear about my future'. You are an example of a successful and determined scientist to follow.

You and David are much more than supervisors to me, and I am always proud of working with you! Thanks for everything!

Thanks to Prof. **Emilio Fernandez Reyes**, for all your support, respect and advices. Thanks for hosting me in your scientific family in your lab. Your smile and calmness always give me a lot of motivation and positive energy.

Thanks to Prof. **Aurora Galvan Cejudo**, for all your support, respect and kindness. Thanks for hosting me in your unique science group. I always appreciate and respect your dedication!

Thanks to **Maria Isabel Macias Gomez** for all your help and patience. Thanks for everything you taught me, for always being there to help us with your smile.

Thanks to Dr. **Angel Ilamas Azua** for all your help and respect. Thanks for teaching me how to be organized!

Thanks to my **Vickie** for always always being there, from first to last, in and out of the lab. You are a great scientist and I always learn from you! Thanks for all your support, motivation and kindness. You are the true meaning of friendship! I always remember Cordoba with 'my Vickie'! As we always say: "nothing can separate us".

Thanks to Dr. **Manolo**, for all your support, respect and motivation. Thanks for answering all my questions with patient, for sharing your knowledge and experience with me and for your kind discussions!

Thanks to **Carmen**, the most wonderful vecina, for all your support and kindness in and out of the lab. You make my life more enjoyable in Cordoba and I never forget your help and friendliness!

Thanks to **Ainoa**, the kindest and most energetic scientist, for all your concern and support, for always being there to listen to me. 'Eres el mejor profesora de español del mundo!' You are an unforgettable and pure friend of mine!

Thanks to **Aitor**, our only brother in the lab, for all your kindness, for always being there to help me.

Thanks to **Chudi**, the kind jefa, for all your concern and help. I always appreciate the motivation you give me to do sport and enjoy my life.

Thanks to Dr. **Gregorio Galvez Valdivieso** for passing me such an interesting microbial community. This gift opened a new line of research to me which I hope to be continued!

Thanks to Dr. **Alejandro**, for all your help and patient, for teaching me how to use the HPLC.

Thanks to **Jose Luis** for teaching me the basic knowledge of hydrogen production.

و در انتها، از **خانواده‌م**، افرادی که عشق، محبت و پشتیبانی آن‌ها در تمام دوران زندگی‌ام همراه من بوده است، بینهایت سپاسگزارم. از اینکه سختی‌ها را با من شریک شدند و بی دریغ در کنارم بودند سپاسگزارم و قدردان زحماتشان هستم.

سپاس از پدر عزیزتر از جانم، که هرچه دارم و هستم از اوست. پدری که تا ابد آموزه‌هایش در قلب و جانم طنین‌انداز است. پدری بی نظیر! اولین معلمم! او که حرکت بر مدار انسانیت را ارج می‌نهد و شگفتا که پایمردی

در کردار و گفتار صادقانه را به گونه‌ای پیشه خود ساخته است که گویی معمولی‌ترین کاریست که در این عالم مردمان می‌کنند. دستانشان را می‌بوسم و عمری با عزت و طولانی از خداوند بزرگ برایشان خواستارم. پدرم راه تمام زندگیست و فرزند او بودن بزرگترین افتخار من است!

سپاس از مادر عزیزتر از جانم، مهربان‌ترین خوبی دنیا! مادری که فداکاری را هر روز و هر لحظه زندگی می‌کند. او که روشنی خانه و ستون زندگی است. او که غم و شادی‌اش بزرگترین نیروی محرکه برای تلاش من است. دستانشان را می‌بوسم و عمری با عزت و طولانی از خداوند بزرگ برایشان خواستارم. مادرم دلخوشی همیشگی‌ست و فرزند او بودن بزرگترین افتخار من است!

با تمام وجودم از برادرهام، از همسفران مهربان و پشتیبان زندگیم، نادر و نیمای نازنیم تشکر و قدردانی می‌کنم. زندگی را با هم آغاز کردیم، در کنار هم آموختیم و به امید هم به آینده چشم می‌دوزیم. همیشه دوستان دارم و خوشبختی‌تان منتهای آرزوی من است! سپاسگزارم برای همیشه بودنتان، بیشتر از یک برادر! از صمیم قلبم از خواهران مهربانم، نیلوفر و پریسای عزیزم که زیبایی حضورشان در کنارم، خستگی‌های این راه را به امید و روشنی تبدیل کرده تشکر و قدردانی می‌کنم. خواهرانه دوستان دارم و خوشبختی‌تان منتهای آرزوی من است!

عشق و نور چشمی خانواده، هدیه‌ی الهی ما، فرنام عمه، ممنونم که با حضورت در این دنیا دل و فکر عمه را روشن کردی. عمه همیشه به وجودت افتخار خواهد کرد و بهترین‌های دنیا را از خداوند بزرگ برایت می‌خواهد. درخشش و موفقیت منتهای آرزوی من است!

另外，我要感谢我的一位特别的朋友刘鹤，他总是以爱和尊重来支持我。她永远不仅仅是我的朋友，她是我的妹妹！

最后但并非最不重要的，我最好的朋友和同伴，我的终生支持者！我经历过的人爱过！感谢您不时与我同住，并且耐心地帮助您解决了这条路线的困难。感谢你等待832天的爱。你在我生命中的存在是神圣恩典的象征，你存在的阴影是我生命中的希望，和平，安全，动力和荣誉！你一直和我在一起，我请求上帝和你一起度过余生！我的心里充满了对你的爱。你的幸福和成功是我唯一的愿望！你是我生命的希望，你的伴侣是我最大的荣幸！

Funding:

This work was supported by the European ERANETMED program [ERANETMED2-72-300]; the Plan Propio of University of Córdoba [MOD.4.1 P.P.2016 A. DUBINI]; the Spanish Government [MINECO Grant BFU2015-70649-P], the European FEDER program, Junta de Andalucía [BIO-502], the European U.E.INTERREG [0055_ALGARED_PLUS_5_E] and the Biotechnology Development Council of the Islamic Republic of Iran [grant number 950409].

Resumen

El hidrógeno molecular (H_2) se considera una fuente de energía limpia y de alto contenido energético. La producción fotobiológica de H_2 por algas verdes puede ser un método limpio y renovable para la generación de este gas. *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas*) es una microalga verde unicelular capaz de llevar a cabo la foto-producción de H_2 . En este trabajo se estudia el efecto que la intensidad lumínica y diferentes fuentes de carbono y nitrógeno tienen en la producción de H_2 en co-cultivos de *Chlamydomonas* con diferentes bacterias. El objetivo general es obtener un mejor conocimiento sobre cómo las interacciones alga-bacteria pueden mejorar la producción de H_2 . Primero, se estudiaron co-cultivos de *Chlamydomonas* con diferentes bacterias (*Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* y *Rhizobium etli*) en medios ricos, con acetato como fuente de carbono y a tres intensidades de luz diferentes (12, 50 y 100 PPFD). El aumento de 0.87 a 18.2 ml de H_2 /L de cultivo fue la mayor mejora en la producción de H_2 que se obtuvo cuando *Chlamydomonas* se cocultivó con *Pseudomonas putida* 12264 bajo 100 PPFD. Se obtuvieron mejoras en la producción de H_2 en co-cultivos respecto a los monocultivos del alga. Estas mejoras estaban claramente relacionadas con la menor capacidad de los co-cultivos para consumir el ácido acético de los medios. Cuanto más tiempo permaneció el ácido acético en el medio, mayor fue la producción de H_2 . En el segundo estudio se observó que en co-cultivos incubados con azúcares como única fuente de carbono, la foto-producción de H_2 por parte del alga es posible cuando las bacterias producían ácido acético. También observamos que el cocultivo de *Chlamydomonas* con *Escherichia coli* condujo a una producción sinérgica de H_2 que produjo un 60% más de H_2 en cocultivos en comparación con la suma de la producción en monocultivos de alga y bacteria. La acumulación de ácido acético es uno de los principales inconvenientes de la producción fermentativa de H_2 llevada a cabo por bacterias. Sin embargo, este inconveniente puede convertirse en una ventaja cuando las bacterias productoras de H_2 se cultivan conjuntamente con *Chlamydomonas*. En un tercer estudio, tres cepas de bacterias (*Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp. y *Bacillus* sp.) fueron aisladas e identificadas de una comunidad de bacterias silvestres. Se observó que *Microbacterium* es un socio bacteriano mutualista para *Chlamydomonas* en término de crecimiento. En medios de cultivo suplementados con azúcares y fuentes de nitrógeno inorgánico, *Microbacterium* no pudo crecer de forma aislada, sin embargo, sí lo pudo hacer cuando se co-cultivó con *Chlamydomonas*. Posiblemente el alga permite el crecimiento de *Microbacterium* al proporcionar nutrientes esenciales, probablemente fuentes de nitrógeno orgánico. Por otro lado, la producción de ácido acético por parte de *Microbacterium*, a partir de la fermentación de azúcares, favorece el crecimiento de *Chlamydomonas* y la foto-producción de H_2 . Bajo esta cooperación, se produjo una cantidad considerable de H_2 , 313 ml/L de cultivo en cocultivos de *Chlamydomonas-Microbacterium* en medios ricos en azúcar. Finalmente, se logró un nivel aceptable de coordinación entre los resultados del modelado y los datos empíricos en términos de crecimiento, producción de H_2 y absorción de ácido acético, tanto en co-cultivos de *Chlamydomonas-Pseudomonas putida* como en los monocultivos control. Este modelo de red metabólica basado en restricciones puede ser prometedor para predecir el comportamiento de organismos en sistemas de mono y co-cultivo.

Palabras clave: Consorcios de algas y bacterias, *Chlamydomonas reinhardtii*, Modelación de redes metabólicas basadas en restricciones, Producción fotobiológica de hidrógeno.

Abstract

Hydrogen gas (H₂) is considered a clean energy carrier with a very high energy content per mass. Photobiological production of H₂ by green algae can potentially be a clean and renewable method for H₂ generation. *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas*) is a model unicellular green microalga capable of H₂ photoproduction. In this work we studied the effect of light intensity and different carbon and nitrogen sources on H₂ production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures to gain a better knowledge on how alga-bacteria interactions can improve H₂ production. First, we studied co-cultivation of *Chlamydomonas* with different bacteria, including *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* and *Rhizobium etli* cultured in acetate-containing nutrient-replete media at three different light intensities (12, 50 and 100 PPFD). Increasing from 0.87 to 18.2 ml H₂/L culture, was the highest enhancement in H₂ production which was obtained when *Chlamydomonas* was co-cultivated with *Pseudomonas putida* 12264 under 100 PPFD. Enhancement of H₂ production in co-cultures was clearly related to the lower capacity of these co-cultures to consume the acetic acid from the media. The longer the acetic acid remained in the media, the longer the cultures were able to sustain hypoxia and support H₂ production. Then, we found out that algal H₂ photoproduction is possible in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures grow on sugars as the only carbon source when acetic acid is produced by the bacteria. These results suggested that acetic acid assimilation is linked to H₂ production beside its ability to promote oxygen consumption. We also observed that co-culturing *Chlamydomonas* with *Escherichia coli* led to synergetic H₂ production that 60% more H₂ was produced in co-cultures compared with the sum of production in alga and bacterium monocultures. The accumulation of acetic acid is one of the main drawbacks of the dark fermentative H₂ production. However, this drawback could be switched into an advantage when H₂ producing bacteria are co-cultivated with *Chlamydomonas*. In the following, three bacteria strains including *Stenotrophomonas* sp., *Microbacterium* sp. and *Bacillus* sp. were isolated and identified from an unknown bacteria community. *Microbacterium* was found to be a mutualistic bacterial partner for *Chlamydomonas* in term of growth. In culture media supplemented with sugars and inorganic nitrogen source, *Microbacterium* alone was not able to grow, however it grew when co-cultivated with *Chlamydomonas*. It seemed that this alga allowed *Microbacterium* growth by providing essential key nutrients, probably organic nitrogen sources. On the other hand, *Microbacterium* was able to produce acetic acid through fermentation of sugars which favors *Chlamydomonas* growth and H₂ production. Following this cooperative relationship, a considerable amount of H₂, 313 ml/L culture was produced in *Chlamydomonas*-*Microbacterium* co-cultures in sugar-rich media. Finally, an acceptable level of coordination between the results of modeling and the empirical data in terms of growth, H₂ production and acetic acid uptake in *Chlamydomonas*-*Pseudomonas putida* co-cultures and pure control cultures was achieved. Therefore, constraint-based metabolic network model can be a promising potential to predict and especially compare the behavior of organisms in mono- and co-culture systems.

Keywords: Alga-bacteria consortia, *Chlamydomonas reinhardtii*, Constraint-based metabolic network modeling, Photobiological hydrogen production.

چکیده

گاز هیدروژن به عنوان یک حامل انرژی پاک با ارزش حرارتی بالا به ازای واحد جرم در نظر گرفته می‌شود. تولید زیستی نوری هیدروژن در جلبک‌های سبز، روشی تجدیدپذیر برای تولید هیدروژن است. کلامیدوموناس رینهاردتی یک ریزجلبک سبز تک سلولی است که به عنوان مدل برای تولید زیستی نوری هیدروژن در نظر گرفته می‌شود. در این تحقیق اثر شدت نور و منابع کربنی و نیتروژنی متفاوت بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس، ای‌کلای و ریزوبیوم اتلی در محیط کشت غنی از اسیداستیک و سایر مواد مغذی و در شدت نورهای مختلف (۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ PPFD) مطالعه شده است. در ابتدا هم‌زیستی کلامیدوموناس با باکتری‌های مختلف شامل سویه‌های مختلف پوتیدا/۱۲۲۶۴ در شدت نور ۱۰۰ PPFD که تولید هیدروژن را از ۰/۸۷ به ۱۸/۲ ml/L culture افزایش داد، مشاهده شد. تقویت تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست با کاهش ظرفیت این کشت‌ها در مصرف اسیداستیک از محیط کشت ارتباط داشت. هر چه اسیداستیک برای مدت زمان طولانی‌تری در محیط کشت باقی ماند، کشت‌ها برای مدت زمان بیشتری در شرایط کم‌اکسیژنی بوده و هیدروژن تولید کردند. در ادامه مشخص شد که باکتری‌ها می‌توانند از تخمیر قندها اسیداستیک تولید کنند که سبب تولید زیستی هیدروژن توسط کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری می‌شود. این نتایج نشان دادند که بین مصرف اسیداستیک و تولید هیدروژن ارتباطی فراتر از قابلیت مصرف اکسیژن وجود دارد. همچنین مشاهده شد که هم‌زیستی کلامیدوموناس با/شرشیا کلای سبب هم‌افزایی تولید هیدروژن می‌شود. در این کشت‌های هم‌زیست تولید هیدروژن ۶۰٪ بیشتر از مجموع تولید در کشت‌های خالص این ارگانسیم‌ها بود. تجمع اسیداستیک از بزرگترین مشکلات تولید تخمیری هیدروژن در باکتری‌های بی‌هوازی است. در حالی که در کشت‌های هم‌زیست این باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن با کلامیدوموناس، این مانع به یک مزیت تبدیل می‌شود. در ادامه‌ی تحقیقات اثر هم‌زیستی سه سویه‌ی باکتری شامل استنوتروفوموناس، میکروباکتریوم و باسیلوس جدا شده از یک جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته بر رشد و تولید هیدروژن کلامیدوموناس بررسی شد. از نظر رشد، میکروباکتریوم موفق به برقراری رابطه‌ی مفید متقابل با کلامیدوموناس شد. در محیط کشت‌های غنی از قندها و منبع نیتروژنی غیرآلی، میکروباکتریوم به تنهایی قادر به رشد نبود. درحالی‌که، هم‌زیستی با کلامیدوموناس رشد این باکتری در همان محیط کشت را میسر کرد. به نظر می‌رسد که این جلبک با تامین مواد مغذی ضروری و مهم، به رشد این باکتری کمک می‌کند. از طرف دیگر، میکروباکتریوم از تخمیر قندها، اسیداستیک مورد نیاز رشد و تولید هیدروژن در کلامیدوموناس را فراهم می‌کند. بر اساس این همکاری، مقدار قابل توجه ۳۱۳ ml/L culture هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت‌های غنی از قندها حاصل شد. در پایان، هماهنگی قابل قبولی بین نتایج مدل‌سازی و نتایج آزمایش‌های تجربی در زمینه‌ی رشد، تولید هیدروژن و مصرف اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا/ و کشت‌های کنترلی این ارگانسیم‌ها مشاهده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مدل‌سازی مبتنی بر قید شبکه‌های متابولیک پتانسیل امیدبخشی برای پیش‌بینی و به ویژه مقایسه‌ی رفتار ارگانسیم‌ها در کشت‌های خالص انفرادی و کشت‌های هم‌زیست است.

کلمات کلیدی: تولید زیستی نوری هیدروژن، کنسرسیوم جلبک-باکتری، کلامیدوموناس رینهاردتی، مدل‌سازی مبتنی بر قید شبکه‌ی متابولیک.

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

- ۱-۱. هیدروژن ۲
- ۲-۱. کاربردهای هیدروژن ۳
- ۳-۱. روش های تولید هیدروژن ۵
- ۴-۱. فرایندهای تولید زیستی هیدروژن ۷
- ۱-۴-۱. بیوفتولیز آب با استفاده از جلبک های سبز و جلبک های سبز-آبی (سیانوباکتری ها) ۷
- ۱-۴-۱-۱. فتولیز مستقیم ۷
- ۱-۴-۱-۲. فتولیز غیرمستقیم ۸
- ۲-۴-۱. تجزیه نوری ترکیبات آلی به وسیله ی باکتری های فتوسنتزکننده ی بی هوازی ۱۰
- ۳-۴-۱. تولید هیدروژن به وسیله ی تخمیر ترکیبات آلی در غیاب نور ۱۰
- ۵-۱. ریزجلبک کلامیدوموناس رینهاردتی (*Chlamydomonas reinhardtii*) ۱۲
- ۱-۵-۱. محدودیت های تولید هیدروژن در کلامیدوموناس ۱۴
- ۲-۵-۱. روش های تقویت تولید هیدروژن در کلامیدوموناس ۱۵
- ۶-۱. اهداف و ضرورت اجرای طرح ۱۶
- ۱-۶-۱. اهداف طرح ۱۶
- ۲-۶-۱. ضرورت اجرای طرح ۱۷
- ۳-۶-۱. نوآوری طرح ۱۸

فصل دوم: تولید هیدروژن در کنسرسیوم جلبک-باکتری

- ۱-۲. کنسرسیوم کلامیدوموناس-باکتری ۲۲
- ۱-۱-۲. کاهش سطح اکسیژن در کنسرسیوم کلامیدوموناس-باکتری ۲۳
- ۱-۱-۲-۱. اثر تنفس باکتریایی بر سطح اکسیژن در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-باکتری ۲۷
- ۱-۱-۲-۲. پارامترهای موثر بر غلظت اکسیژن در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-باکتری ۲۷
- ۲-۱-۲. بازده تبدیل نشاسته به هیدروژن افزایش می یابد ۲۷

۱-۲-۱-۲. باکتری های بی هوازی نشاسته‌ی موجود در زیست توده‌ی کلامیدوموناس را مصرف کرده و به همراه اسیدهای آلی کوچک هیدروژن تولید می کنند.	۲۸
۲-۲-۱-۲. باکتری های بی هوازی نشاسته‌ی موجود در زیست توده‌ی کلامیدوموناس را مصرف کرده و اسیدهای آلی که توسط باکتری های فتوسنتز کننده‌ی بی هوازی به هیدروژن تبدیل می شوند را تولید می کنند.	۲۸
۳-۲-۱-۲. کلامیدوموناس ذخایر نشاسته را به اسیدهای آلی که تامین کننده‌ی الکترون های مورد نیاز برای تولید هیدروژن در باکتری های فتوسنتز کننده‌ی بی هوازی هستند، می شکند.	۲۹
۴-۲-۱-۲. ذخایر نشاسته الکترون های مورد نیاز تولید هیدروژن در کلامیدوموناس از مسیر متابولیکی مستقل از PSII را تامین می کند.	۳۰
۳-۱-۲. توسعه‌ی محدوده‌ی جذب نور خورشید برای تولید هیدروژن در کنسرسیوم کلامیدوموناس-باکتری	۳۰

فصل سوم: مواد و روش ها

۱-۳. مواد بیولوژیکی	۳۶
۱-۱-۳. سویه های ریزجلبک و باکتری ها	۳۶
۲-۱-۳. معرفی میکروارگانسیم ها	۳۶
۱-۲-۱-۳. کلامیدوموناس رینهاردتی	۳۸
۲-۲-۱-۳. سودوموناس پوتیدا	۳۸
۳-۲-۱-۳. سودوموناس اشتوتسری	۳۸
۴-۲-۱-۳. ریزوبیوم اتلی	۳۸
۵-۲-۱-۳. اشرشیا کلای	۳۸
۶-۲-۱-۳. متیلوباکتریوم اوریزا	۳۸
۷-۲-۱-۳. استنوتروفوموناس	۳۸
۸-۲-۱-۳. باسیلوس	۳۸
۹-۲-۱-۳. میکروباکتریوم	۳۸
۲-۳. تکنیک های میکروبیولوژی	۳۸
۱-۲-۳. محیط کشت ها و شرایط کشت	۳۸
۱-۱-۲-۳. محلول های استوک برای تهیه‌ی محیط کشت ها:	۳۸

۳۹ محیط کشت های کلامیدوموناس	۲-۱-۲-۳
۳۹ Tris – Acetate – Phosphate (TAP) محیط کشت	۱-۲-۱-۲-۳
۴۰ Minimal medium (MM) محیط کشت کمینه	۲-۲-۱-۲-۳
۴۰ محیط کشت های باکتری ها	۳-۱-۲-۳
۴۰ LB محیط کشت	۱-۳-۱-۲-۳
۴۰ محیط کشت متیلوباکتریوم (MeM)	۲-۳-۱-۲-۳
۴۱ YEM محیط کشت	۳-۳-۱-۲-۳
۴۱ TYM محیط کشت	۴-۳-۱-۲-۳
۴۲ محیط کشت های کشت های همزیست	۴-۱-۲-۳
۴۳ آزمایش های رشد	۳-۲-۳
۴۳ رشد در محیط کشت مایع	۱-۳-۲-۳
۴۳ رشد هوازی	۱-۱-۳-۲-۳
۴۴ رشد در شرایط تولید هیدروژن	۲-۱-۳-۲-۳
۴۵ رشد در محیط کشت جامد	۲-۳-۲-۳
۴۵ رشد بر منابع کربن و نیتروژن مختلف	۱-۲-۳-۲-۳
۴۶ رشد بر آمینواسیدها	۲-۲-۳-۲-۳
۴۷ جداسازی و شناسایی باکتری ها	۴-۲-۳
۴۸ بررسی کمی میکروارگانیزم ها	۵-۲-۳
۴۸ شمارش سلولی	۱-۵-۲-۳
۴۸ جذب نوری	۲-۵-۲-۳
۴۹ غلظت کلروفیل	۳-۵-۲-۳
۴۹ واحد کلونی های تشکیل شده (CFU)	۴-۵-۲-۳
۴۹ تولید هیدروژن	۳-۳
۴۹ آماده سازی کشت ها برای تولید هیدروژن	۱-۳-۳

۵۳	۴-۳. سنجش متابولیت‌ها
۵۳	۱-۴-۳. متابولیت‌ها در فاز گاز
۵۳	۲-۴-۳. متابولیت‌ها در فاز مایع
۵۴	۵-۳. بررسی‌های میکروسکوپی
۵۴	۶-۳. اندازه‌گیری شدت نور
۵۴	۷-۳. مدل سازی
۵۴	۱-۷-۳. مدل سازی استوکیومتریک و مبتنی بر قید
۵۶	۲-۷-۳. مدل های شبکه‌ی متابولیکی میکروارگانیزم‌ها
۵۶	۳-۷-۳. مدل ترکیبی شبکه‌های متابولیک
۵۶	۴-۷-۳. تابع هدف

فصل چهارم: نتایج و تحلیل

۵۸	۱-۴. مقدمه
۵۸	۱-۱-۴. بخش اول تحقیق
۵۸	۱-۱-۱-۴. دستاورد قابل توجه بخش اول
۵۸	۲-۱-۴. بخش دوم تحقیق
۵۸	۱-۲-۱-۴. دستاوردهای قابل توجه بخش دوم
۵۹	۳-۱-۴. بخش سوم تحقیق
۵۹	۱-۳-۱-۴. دستاوردهای قابل توجه بخش سوم
۵۹	۴-۱-۴. بخش چهارم تحقیق
۵۹	۱-۴-۱-۴. دستاوردهای قابل توجه بخش چهارم
۶۰	۲-۴. بخش اول: هم‌زیستی کلامیدوموناس با باکتری‌های مختلف در محیط کشت غنی از مواد مغذی در روشنایی
۶۰	۱-۲-۴. رشد کلامیدوموناس در حضور باکتری‌ها در کشت هم‌زیست در شدت نورهای مختلف
۶۱	۲-۲-۴. رشد باکتری‌ها در محیط کشت TAP

۳-۲-۴. ارتباط بین تولید هیدروژن، شرایط کم اکسیژنی و حضور اسیداستیک در کشت های همزیست کلامیدوموناس-باکتری در شدت نورهای مختلف	۶۳
۴-۲-۴. جامعه میکروبی جلبک و باکتری گزینه ای مناسب برای تولید هیدروژن	۶۹
۳-۴. بخش دوم: بررسی اثر منابع کربنی مختلف بر تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-باکتری	۶۹
۱-۳-۴. اسیداستیک تولید شده توسط باکتری ها و تولید هیدروژن در کلامیدوموناس	۷۰
۲-۳-۴. هم افزایی تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-ای کلای	۷۹
۳-۳-۴. جوامع ریزجلبک-باکتری منابع مناسبی برای تولید هیدروژن هستند.	۸۴
۴-۴. بخش سوم: خالص سازی و شناسایی اعضای جامعه باکتریایی و بررسی اثر این باکتری ها بر رشد و تولید هیدروژن کلامیدوموناس در کشت های همزیست.	۸۵
۱-۴-۴. بررسی عملکرد جامعه باکتریایی ناشناخته در همزیستی با کلامیدوموناس در محیط کشت های مختلف.	۸۹
۱-۱-۴-۴. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها	۸۹
۲-۱-۴-۴. رشد	۹۲
۱-۲-۱-۴-۴. دانسیته ی نوری کشت های کنترلی جلبک و کشت های همزیست	۹۲
۲-۲-۱-۴-۴. غلظت کلروفیل کشت های کنترلی جلبک و کشت های همزیست	۹۲
۳-۲-۱-۴-۴. دانسیته ی نوری کشت های کنترلی جامعه باکتریایی	۹۲
۴-۲-۱-۴-۴. مقایسه ی رشد جلبک و جامعه باکتریایی در کشت های همزیست و کشت های کنترلی	۹۵
۳-۱-۴-۴. آنالیز متابولیت ها	۹۵
۴-۱-۴-۴. رفتار کشت های کنترلی کلامیدوموناس پس از آلوده شدن با جامعه باکتریایی در محیط کشت های گوناگون	۹۷
۵-۱-۴-۴. پتانسیل تولید بلندمدت هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-جامعه باکتریایی	۱۰۱
۲-۴-۴. جداسازی و شناسایی اعضای جامعه باکتریایی	۱۰۲
۱-۲-۴-۴. باکتری W	۱۰۲
۲-۲-۴-۴. باکتری F	۱۰۳
۳-۲-۴-۴. باکتری B	۱۰۴

۳-۴-۴. بررسی عملکرد اعضای جامعه‌ی باکتریایی به صورت انفرادی و کنسرسیوم بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست با کلامیدوموناس	۱۰۵
۱-۳-۴-۴. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها	۱۰۶
۲-۳-۴-۴. رشد باکتری‌ها	۱۰۶
۳-۳-۴-۴. آنالیز متابولیت‌ها	۱۰۸
۴-۳-۴-۴. کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم پتانسیل بالایی برای تولید هیدروژن دارد.	۱۱۱
۴-۴-۴. منابع کربنی و نیتروژنی قابل استفاده توسط میکروباکتریوم	۱۱۱
۱-۴-۴-۴. منابع کربن و نیتروژن	۱۱۱
۲-۴-۴-۴. حضور مشتقات پروتئینی رشد می‌کند.	۱۱۴
۵-۴-۴. رشد کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست این دو میکروارگانیسم	۱۱۵
۱-۵-۴-۴. رشد کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست	۱۱۵
۲-۵-۴-۴. رشد میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست	۱۱۷
۳-۵-۴-۴. ارتباط فیزیکی بین سلول‌های کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست	۱۱۷
۴-۵-۴-۴. نوع رابطه‌ی هم‌زیستی در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس و میکروباکتریوم	۱۱۹
۶-۴-۴. بررسی عملکرد میکروباکتریوم و هم‌زیستی با کلامیدوموناس در محیط کشت‌های مختلف	۱۲۰
۱-۶-۴-۴. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها	۱۲۱
۲-۶-۴-۴. غلظت کلروفیل کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت‌های مختلف	۱۲۱
۳-۶-۴-۴. دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم در کشت‌های کنترلی این باکتری و کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت‌های مختلف	۱۲۳
۴-۶-۴-۴. آنالیز متابولیت‌ها	۱۲۵
۵-۶-۴-۴. محیط کشت مناسب برای تولید بلندمدت هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم	۱۲۸
۷-۴-۴. کنترل غلظت مشتقات پروتئینی در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم	۱۲۹
۱-۷-۴-۴. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها	۱۳۰

۲-۷-۴-۴. غلظت کلروفیل کشت های کنترلی کلامیدوموناس و کشت های همزیست در محیط کشت های دارای غلظت های مختلف تریپتون و در همزیستی با متیلوباکتریوم	۱۳۰
۳-۷-۴-۴. دانسیته ی نوری در کشت های کنترلی	۱۳۲
۴-۷-۴-۴. کنترل رشد میکروباکتریوم در همزیستی با کلامیدوموناس	۱۳۳
۸-۴-۴. همزیستی میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم در محیط کشت های مختلف و بررسی اثر آن بر تولید هیدروژن	۱۳۴
۱-۸-۴-۴. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها	۱۳۵
۲-۸-۴-۴. غلظت کلروفیل کشت های همزیست در محیط کشت های TAP و TM	۱۳۵
۳-۸-۴-۴. دانسیته ی نوری باکتری ها در کشت های کنترلی	۱۳۶
۴-۸-۴-۴. آنالیز متابولیت ها	۱۳۸
۵-۸-۴-۴. کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم در محیط کشت های TAP و TM	۱۴۱
۹-۴-۴. بررسی عملکرد میکروباکتریوم در همزیستی با کلامیدوموناس در محیط کشت های غنی از قندها	۱۴۲
۱-۹-۴-۴. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها	۱۳۵
۲-۹-۴-۴. غلظت کلروفیل کشت های همزیست و دانسیته ی نوری میکروباکتریوم در محیط کشت های غنی از گلوکز و مانیتول	۱۴۳
۳-۹-۴-۴. آنالیز متابولیت ها	۱۴۶
۴-۹-۴-۴. پتانسیل بالای تولید هیدروژن و رابطه ی همزیستی در کشت های همزیست کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در محیط کشت های غنی از قندها	۱۴۷
۱۰-۴-۴. تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم با غلظت بالای کلروفیل	۱۴۹
۵-۴. مدل سازی شبکه ی متابولیک کنسرسیون کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا	۱۵۱
۱-۵-۴. مدل ترکیبی شبکه ی متابولیک	۱۵۱
۱-۱-۵-۴. مصرف اسیداستیک	۱۵۳
۲-۱-۵-۴. تولید هیدروژن	۱۵۵
۳-۱-۵-۴. رشد کلامیدوموناس	۱۵۸
۲-۵-۴. مدل سازی، گزینه ای مناسب برای پیش بینی رفتار کنسرسیون کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا	۱۵۸

۱-۵. نتیجه گیری ۱۶۱

۲-۵. پیشنهادها ۱۷۲

فصل ششم: مراجع ۱۷۴

فصل هفتم: پیوست ها

۱-۷. آنزیم هیدروژناز ۱۶۱

۲-۷. تولید نیمه صنعتی هیدروژن توسط باکتری های بی هوازی ۱۶۱

فهرست مقالات منتشر شده ۱۸۹

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱. مصرف جهانی هیدروژن در صنایع شیمیایی و فرایندهای دیگر ۴
- شکل ۱-۲. تجزیه و تحلیل سنجش علم در رابطه با تحقیقات انجام شده در مورد تولید هیدروژن. ۶
- شکل ۱-۳. مسیرهای متابولیکی تولید هیدروژن در کلامیدوموناس. ۱۳
- شکل ۱-۲. مسیرهای ارتباطی کلامیدوموناس و باکتری‌ها. ۲۳
- شکل ۲-۲. شماتیک روند تغییرات سطح اکسیژن و تولید جمعی هیدروژن در کشت‌های تولید کننده هیدروژن. ۲۴
- شکل ۲-۳. متابولیسم نشاسته-هیدروژن در کنسرسیون‌های کلامیدوموناس-باکتری. ۲۸
- شکل ۱-۳. نمایی از کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس (ارلن سمت چپ) و کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (ارلن‌های وسط و سمت راست) در محیط کشت TYM^L ۴۴
- شکل ۲-۳. ۲۰ نوع اسیدآمین‌های مورد استفاده در آزمایش رشد. ۴۷
- شکل ۳-۳. کلونی‌های جدا شده از جامعه‌ی باکتریایی آلوده کننده‌ی کشت ریزوبیوم لگومینوساروم. ۴۸
- شکل ۳-۴. نمایی از بیوراکتورهای طراحی شده برای تولید هیدروژن. ۵۱
- شکل ۳-۵. نمایی از سامانه‌ی آزمایشگاهی طراحی شده برای تولید هیدروژن. ۵۲
- شکل ۴-۱. غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست و کشت کنترلی جلبک در سه شدت نور ۱۲ (a)، ۵۰ (b) و ۱۰۰ PPFD (c). ۶۲
- شکل ۴-۲. رشد باکتری‌ها بر اساس تغییرات دانسیته‌ی نوری در محیط کشت TAP. ۶۳
- شکل ۴-۳. تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست در شدت نورهای ۱۲ (a)، ۵۰ (b) و ۱۰۰ PPFD (c) و کشت‌های کنترلی باکتری‌ها (d). ۶۴
- شکل ۴-۴. اکسیژن موجود در فاز گاز بالاسری در کشت‌های هم‌زیست در شدت نورهای ۱۲ (a)، ۵۰ (b) و ۱۰۰ PPFD (c) و کشت‌های کنترلی باکتری‌ها (d). ۶۵
- شکل ۴-۵. مصرف اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست در شدت نورهای ۱۲ (a)، ۵۰ (b) و ۱۰۰ PPFD (c) و کشت‌های کنترلی باکتری‌ها (d). ۶۶
- شکل ۴-۶. هیدروژن تولید شده و اکسیژن موجود در فضای بالاسری کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های کنترلی در محیط کشت TAP و در شدت نور ۵۰ PPFD. ۷۱
- شکل ۴-۷. تولید هیدروژن و مقدار اکسیژن موجود در فضای بالاسری کشت‌های کلامیدوموناس پس از افزودن منابع کربنی آلی در شدت نور ۵۰ PPFD. ۷۲
- شکل ۴-۸. تولید هیدروژن، مقدار اکسیژن و تجمع اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست پس از افزودن منابع کربنی آلی. ۷۳
- شکل ۴-۹. تجمع/مصرف اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست پس از افزودن قندها به همراه اسیداستیک به محیط کشت‌ها. ۷۵

- شکل ۴-۱۰. روند تولید محصولات آلی و مصرف فندها در کشت‌های هم‌زیست پس از افزودن منابع کربن آلی. ۷۶.....
- شکل ۴-۱۱. غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست پس از افزودن منابع کربنی آلی. ۷۸.....
- شکل ۴-۱۲. تغییر رنگ کشت‌های هم‌زیست، ۲۴ h پس از افزودن فندها (گلوکز و مانیتول). ۷۹.....
- شکل ۴-۱۳. تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-ای کلای پس از تزریق گلوکز به صورت فدیج. ۸۲.....
- شکل ۴-۱۴. تصویر کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-ای کلای در روز ۱۱۲م در محیط کشت‌های مختلف. ۸۲.....
- شکل ۴-۱۵. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری و غلظت اسیداستیک (c) در کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های کنترلی. ۸۷.....
- شکل ۴-۱۶. غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های کنترلی جلبک در شدت نور ۵۰ PPFD. ۸۸.....
- شکل ۴-۱۷. دانسیته‌ی نوری باکتری‌ها در کشت‌های کنترلی. ۸۸.....
- شکل ۴-۱۸. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های مختلف. ۹۱.....
- شکل ۴-۱۹. دانسیته‌ی نوری در طول موج‌های ۶۰۰ nm (a) و ۷۵۰ nm (b) کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و کشت‌های کنترلی جلبک در محیط کشت‌های مختلف. ۹۳.....
- شکل ۴-۲۰. غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و کشت‌های کنترلی جلبک، در محیط کشت‌های مختلف. ۹۴.....
- شکل ۴-۲۱. دانسیته‌ی نوری جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته در محیط کشت‌های مختلف. ۹۴.....
- شکل ۴-۲۲. اختلاف دانسیته‌ی نوری کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و مجموع دانسیته‌ی نوری کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های مختلف. ۹۵.....
- شکل ۴-۲۳. غلظت اسیداستیک (g,d,a)، اسیدفرمیک (h,e,b) و اسیدلاکتیک (i,f,c) در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و کشت‌های کنترلی جلبک در محیط کشت‌های مختلف. ۹۶.....
- شکل ۴-۲۴. غلظت مانیتول در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و کشت‌های کنترلی جلبک در محیط کشت TYM^H. ۹۷.....
- شکل ۴-۲۵. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت‌های کنترلی جلبک خالص و آلوده شده در روز ۱۱۶م. ۹۹.....
- شکل ۴-۲۶. دانسیته‌ی نوری (a) و غلظت کلروفیل (b) کشت‌های کنترلی جلبک خالص و آلوده شده در روز ۱۱۶م. ۱۰۰.....
- شکل ۴-۲۷. غلظت مواد آلی (اسیداستیک (a)، مانیتول (b)، اسیدفرمیک (c)، اسیدلاکتیک (d) و اتانول (e)) موجود در کشت‌های کنترلی جلبک خالص و آلوده شده در روز ۱۱۶م، در محیط کشت TYM^H. ۱۰۱.....
- شکل ۴-۲۸. کلونی‌های جدا شده از جامعه‌ی باکتریایی آلوده کننده‌ی کشت ریزوبیوم لگومینوساروم. ۱۰۲.....

- شکل ۴-۲۹. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های کنترلی در محیط کشت TYM^H ۱۰۷
- شکل ۴-۳۰. دانسیته‌ی نوری اعضای جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته (باسیلوس، میکروباکتریوم و استنوتروفوموناس) در محیط کشت TYM^H ۱۰۸
- شکل ۴-۳۱. غلظت مانیتول در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باسیلوس، میکروباکتریوم و استنوتروفوموناس (a) و کشت‌های کنترلی این باکتری‌ها (b) در محیط کشت TYM^H ۱۰۹
- شکل ۴-۳۲. غلظت اسیدلاکتیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باسیلوس، میکروباکتریوم و استنوتروفوموناس در محیط کشت TYM^H ۱۱۰
- شکل ۴-۳۳. غلظت مواد آلی شامل اسیداستیک (a)، اسیدلاکتیک (b) و اتانول (c) در کشت‌های کنترلی باسیلوس، میکروباکتریوم و استنوتروفوموناس در محیط کشت TYM^H ۱۱۰
- شکل ۴-۳۴. رشد میکروباکتریوم در حضور منابع کربن و نیتروژن مختلف. ۱۱۲
- شکل ۴-۳۵. رشد میکروباکتریوم بر اسیدهای آمینه در حضور و عدم حضور آمونیوم در محیط کشت‌ها. ۱۱۲
- شکل ۴-۳۶. غلظت کلروفیل (a) و تعداد سلول‌ها (b) در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی جلبک در شرایط هوازی، در محیط کشت TYM^L ۱۱۶
- شکل ۴-۳۷. تصویر روزهای ۱، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ام کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی جلبک در شرایط هوازی و در محیط کشت TYM^L ۱۱۶
- شکل ۴-۳۸. غلظت سلولی میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی باکتری در شرایط هوازی، در محیط کشت TYM^L ۱۱۸
- شکل ۴-۳۹. دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم در کشت‌های کنترلی در شرایط هوازی، در محیط کشت TYM^L ۱۱۸
- شکل ۴-۴۰. تصویر میکروسکوپی کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم. ۱۱۸
- شکل ۴-۴۱. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های مختلف. ۱۲۲
- شکل ۴-۴۲. غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی این جلبک در محیط کشت‌های مختلف. ۱۲۳
- شکل ۴-۴۳. دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم در کشت‌های کنترلی (a) و کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (b) در محیط کشت‌های مختلف. ۱۲۴
- شکل ۴-۴۴. غلظت اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی این در محیط کشت‌های TAP (a)، TM^L (b)، TY^L (c) و TYM^L (d). ۱۲۶
- شکل ۴-۴۵. غلظت مانیتول در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های TM^L (a) و TYM^L (b). ۱۲۶

- شکل ۴-۴۶. غلظت اسیدلاکتیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های TAP، (a) TM^L، (b) TY^L، (c) TYM^L و (d) TYM^L..... ۱۲۷
- شکل ۴-۴۷. غلظت اسیدفرمیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های TAP، (a) TM^L، (b) TY^L، (c) TYM^L و (d) TYM^L..... ۱۲۷
- شکل ۴-۴۸. غلظت اتانول در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های TAP، (a) TM^L، (b) TY^L، (c) TYM^L و (d) TYM^L..... ۱۲۸
- شکل ۴-۴۹. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی، در محیط کشت‌های مختلف..... ۱۳۱
- شکل ۴-۵۰. غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم و کشت‌های کنترلی جلبک در محیط کشت‌های مختلف..... ۱۳۲
- شکل ۴-۵۱. دانسیته‌ی نوری کشت‌های خالص میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم و کشت‌های هم‌زیست این دو باکتری در محیط کشت‌های مختلف..... ۱۳۳
- شکل ۴-۵۲. تصویر از چپ به راست کشت‌های خالص میکروباکتریوم، کشت‌های هم‌زیست میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم و کشت خالص متیلوباکتریوم در محیط کشت TM^L..... ۱۳۳
- شکل ۴-۵۳. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم و کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی باکتری‌ها در محیط کشت‌های TAP و TM^L..... ۱۳۶
- شکل ۴-۵۴. غلظت کلروفیل کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم در محیط کشت‌های TAP و TM^L..... ۱۳۷
- شکل ۴-۵۵. دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم در محیط کشت‌های TAP و TM^L..... ۱۳۷
- شکل ۴-۵۶. غلظت اسیدلاکتیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a)، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم (b) و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (c) و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم (d) و متیلوباکتریوم (e) در محیط کشت‌های TAP و TM^L..... ۱۳۹
- شکل ۴-۵۷. غلظت مانیتول در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (a) و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم (b) در محیط کشت TM^L..... ۱۳۹
- شکل ۴-۵۸. غلظت اسیدلاکتیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a)، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم (b) و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (c) و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم (d) و متیلوباکتریوم (e) در محیط کشت‌های TAP و TM^L..... ۱۴۰

- شکل ۴-۵۹. غلظت اسیدفرمیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a)، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم (b) و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (c) و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم (d) و متیلوباکتریوم (e) در محیط کشت‌های TAP و TM^L ۱۴۰
- شکل ۴-۶۰. غلظت اتانول در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a)، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم (b) و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (c) و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم (d) و متیلوباکتریوم (e) در محیط کشت‌های TAP و TM^L ۱۴۱
- شکل ۴-۶۱. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول)..... ۱۴۴
- شکل ۴-۶۲. غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی جلبک در محیط کشت‌های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول)..... ۱۴۵
- شکل ۴-۶۳. دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم در محیط کشت‌های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول)..... ۱۴۵
- شکل ۴-۶۴. غلظت اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a) و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم (b) در محیط کشت‌های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول)..... ۱۴۶
- شکل ۴-۶۵. غلظت مانیتول (a) و گلوکز (b) در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت‌های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول)..... ۱۴۷
- شکل ۴-۶۶. غلظت اسیدلاکتیک (a و b)، اسیدفرمیک (c و d) و اتانول (e و f) در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت‌های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول)..... ۱۴۸
- شکل ۴-۶۷. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی جلبک دارای غلظت بالای کلرفیل در محیط کشت‌های TAP، TM^L و TYM^L ۱۵۰
- شکل ۴-۶۸. نمایی از بخش‌های در نظر گرفته شده در تشکیل شبکه‌ی متابولیک کنسرسیوم کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا..... ۱۵۳
- شکل ۴-۶۹. تغییرات غلظت اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا و کشت‌های کنترلی در شدت نورهای ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ PPFD..... ۱۵۴
- شکل ۴-۷۰. تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا و کشت‌های کنترلی در شدت نورهای ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ PPFD..... ۱۵۶
- شکل ۴-۷۱. تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا و کشت‌های کنترلی تا زمانی که اسیداستیک در محیط کشت‌ها موجود باشد (شکل ۴-۶۸)، در شدت نورهای ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ PPFD..... ۱۵۷
- شکل ۴-۷۲. مقایسه‌ی رشد کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا و کشت‌های کنترلی این جلبک در شدت نور ۱۰۰ PPFD..... ۱۵۸
- شکل پ ۷-۱. آنزیم هیدروژناز و سایت فعال H-cluster..... ۱۵۸

شکل پ ۲-۷. ساختار سایت فعال H-cluster..... ۱۵۸

شکل پ ۳-۷. تصویر تولید نیمه صنعتی تخمیر هیدروژن در غیاب نور. ۱۵۸

فهرست جدول ها

- جدول ۱-۱. مقدار انرژی حاصل شده از سوخت های مختلف ۳
- جدول ۱-۲. نرخ تولید هیدروژن در فرایندهای زیستی ۱۲
- جدول ۱-۲. باکتری های هوازی و اختیاری استفاده شده برای همزیستی با کلامیدوموناس در آزمایش های تولید هیدروژن ۲۵
- جدول ۲-۲. تولید هیدروژن در کنسرسیوم های کلامیدوموناس-باکتری بی هوازی-باکتری فتوسنتزی ۲۹
- جدول ۲-۳. تولید هیدروژن در کنسرسیوم های کلامیدوموناس-باکتری فتوسنتزی ۳۰
- جدول ۲-۴. تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-باکتری. مقایسه ی بازده، نرخ و مدت زمان تولید هیدروژن در کشت های همزیست و کشت های کنترلی کلامیدوموناس. ۳۲
- جدول ۳-۱. ارگانیسیم های استفاده شده در این تحقیق ۳۶
- جدول ۳-۱. میزان افزایش تولید هیدروژن در کشت های همزیست نسبت به کشت کنترلی کلامیدوموناس ۶۵
- جدول ۳-۲. نرخ مصرف اسیداستیک در ۲۴ h اول (mmol/h) ۶۷
- جدول ۳-۳. نرخ تولید هیدروژن (ml/L.day) در کشت های همزیست پس از افزودن منابع مختلف کربن آلی. نرخ های تولید ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از افزودن منابع کربنی اندازه گرفته شده است. ۷۴
- جدول ۳-۴. تولید هیدروژن، تغییرات pH و درصد تغییرات غلظت کلروفیل در کشت های همزیست کلامیدوموناس-ای کلای و کشت کنترلی ای کلای پس از افزودن غلظت های مختلف گلوکز به محیط کشت ها. ۸۰
- جدول ۳-۵. تجمع مواد آلی در کشت های همزیست کلامیدوموناس-ای کلای و کشت های کنترل ای کلای پس از تزریق فدیج گلوکز. ۸۳
- جدول ۴-۶. آنالیز بلاست باکتری W ۱۰۳
- جدول ۴-۷. آنالیز بلاست باکتری F ۱۰۴
- جدول ۴-۸. آنالیز بلاست باکتری B ۱۰۴
- جدول ۴-۹. سایز مدل های تک جزئی ارگانیسیم ها و مدل ترکیبی کنسرسیوم جلبک-باکتری ۱۵۱
- جدول ۵-۱. بیشینه تولید هیدروژن در کلامیدوموناس با استفاده از تکنیک های مختلف به ترتیب نزولی. ۱۶۷

فصل اول:

مقدمه

۱-۱. هیدروژن

افزایش تقاضا برای انرژی در جهان از یک طرف و محدود بودن تنوع منابع تامین انرژی از طرف دیگر، سرعت مصرف سوخت‌های فسیلی را بالا برده است. این رویداد، هشدارهای جدی مانند سطح بالای آلودگی در جهان و پایان یافتن منابع سوخت‌های فسیلی را به همراه داشته است. به علاوه، افزایش پیوسته‌ی سطح گازهای گلخانه‌ای^۱ که از سوختن سوخت‌های فسیلی آزاد می‌شوند، پدیده‌ی گرم شدن کره‌ی زمین^۲ را تشدید می‌کند. امروزه، غلظت دی‌اکسیدکربن به بیشتر از 350 ppm^3 رسیده که سبب افزایش اثر گلخانه‌ای و در نتیجه گرمایش زمین شده است [۱]. محدود بودن منابع سوخت‌های فسیلی و نگرانی‌های مربوط به اثرات گازهای گلخانه‌ای بر تغییرات آب و هوا، بشر را به سمت تحقیق و بررسی در مورد جایگزین کردن این سوخت‌ها با منابع تجدیدپذیر و طرفدار محیط‌زیست که نیاز جهان به انرژی را برطرف کند، سوق داده است [۲]. در سال‌های اخیر، توجه جهان به سمت گاز هیدروژن (H_2) به عنوان یک منبع سوخت امیدوارکننده، سازگار با محیط‌زیست^۴ و تجدیدپذیر متمرکز شده است.

هیدروژن، سبک‌ترین عنصر در جهان بوده و نزدیک به ۷۵٪ از جرم جهان را تشکیل می‌دهد. هیدروژن فراوان‌ترین عنصر موجود در طبیعت است اما کمتر به صورت مولکول یافت می‌شود. هیدروژن یک ماده خام مهم برای صنایع شیمیایی و پتروشیمیایی و یک حامل بارز انرژی است. هیدروژن بی‌رنگ، بی‌بو و از همه مهم‌تر غیرسمی است. همچنین، هیدروژن سوختی با کیفیت بالاست و برخلاف دیگر سوخت‌های امروزه عاری از کربن بوده و تنها محصول احتراق آن آب است و بنابراین استفاده از هیدروژن به عنوان منبع انرژی، سبب کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای به اتمسفر می‌شود. همانطور که در جدول ۱-۱ نشان داده شده است هیدروژن به دلیل داشتن ارزش حرارتی بالا به ازای واحد جرم نسبت به سوخت‌های دیگر، جایگزین مناسبی برای سوخت‌های فسیلی است [۳]. همچنین به دلیل اینکه در چارچوب سیستم‌های انرژی، فرایند تبدیل هیدروژن به الکتروسیسته آسان‌تر از

¹ Greenhouse gases (GHGs)

² Global warming

³ Part per million

⁴ Eco-friendly

فرایند تبدیل سوخت‌های فسیلی به الکتریسیته است، استفاده از این گاز به عنوان منبع انرژی، انتخابی مناسب است [۴].

جدول ۱-۱. مقدار انرژی حاصل شده از سوخت‌های مختلف [۳]

انواع سوخت	میزان انرژی (MJ/kg)
هیدروژن	۱۲۰/۰
گاز طبیعی	۵۴/۴
پروپان	۵۰/۳
LNG	۵۰/۰
LPG	۴۸/۸
بنزین	۴۵/۶
دیزل	۴۵/۳
بیودیزل	۳۷/۰
زغال چوب	۳۰/۰
اتانول	۲۹/۷
متانول	۲۲/۷
چوب (با هوای خشک)	۱۵/۵

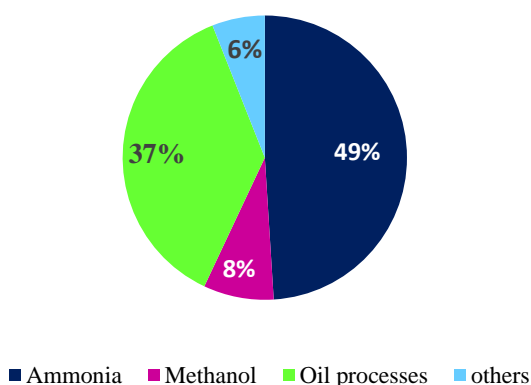
۲-۱. کاربردهای هیدروژن

به طور کلی کاربردهای هیدروژن را می‌توان به صورت زیر دسته بندی کرد:

- سوخت
- تولید آنیلین از نیتروبنزن
- تولید هگزامتیلن دی‌آمین
- هیدروکراکینگ (تبدیل هیدروکربن‌های سنگین در نفت خام به هیدروکربن‌های با نقطه جوش پایین تر مثل گازوئیل، نفت سفید، سوخت موشک و سوخت دیزل
- تولید گاز سنتزی (ICI process, Lurgi, gasification of coal)

- تولید آمونیاک
- تولید متانول
- فرایندهای OXO (تولید آلدهیدها از آلکنها)
- تولید ۱ و ۴-بوتان دیول یا Fischer-Tropsch (مجموعه‌ای از واکنش‌های شیمیایی که مخلوط مونوکسید کربن و هیدروژن را به هیدروکربن‌های مایع تبدیل می‌کند).
- هیدروژناسیون زغال سنگ سخت
- هیدروژناسیون چربی‌ها
- جاروب کننده اکسیژن: هیدروژن برای حذف کامل اکسیژن به منظور جلوگیری از اکسیداسیون و خوردگی استفاده می‌شود.
- به عنوان سرد کننده در ژنراتورهای الکتریکی برای استفاده از خواص فیزیکی منحصر به فرد آن استفاده می‌شود [۵].

شکل ۱-۱ سهم مصرف هیدروژن در صنایع مختلف را نشان می‌دهد. موارد مصرف ذکر شده در بالا معادل ۳٪ سوخت مصرفی امروز جهان است. انتظار می‌رود این درصد در سال‌های آینده به طور قابل توجهی افزایش یابد [۵].



شکل ۱-۱. مصرف جهانی هیدروژن در صنایع شیمیایی و فرایندهای دیگر [۶].

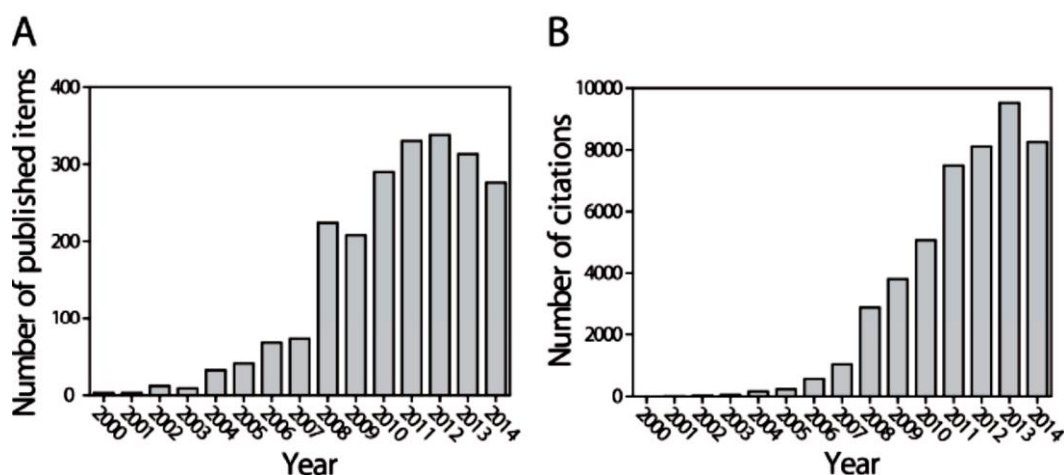
۱-۳. روش‌های تولید هیدروژن

هیدروژن به روش‌های مختلفی قابل تولید است. روش‌های تولید هیدروژن به گروه‌های عمده‌ی تولید از سوخت‌های فسیلی، زیست‌توده و آب تقسیم می‌شود [۷، ۸].

- روش‌های تولید هیدروژن از سوخت‌های فسیلی
 - تغییر شکل گاز طبیعی یا نفت به هیدروژن به وسیله بخار
 - شکست گاز طبیعی به هیدروژن به وسیله گرما
 - اکسیداسیون جزئی هیدروکربن‌های سنگین‌تر از نفت
 - گازی‌سازی زغال سنگ
- روش‌های تولید هیدروژن از زیست‌توده
 - پیرولیز یا گازی‌سازی (مخلوطی از گازها شامل H_2 ، CH_4 ، CO_2 ، CO و N_2 را تولید می‌کند).
- روش‌های تولید هیدروژن از آب
 - الکترولیز
 - فتولیز
 - فرایند گرمایشیمیایی
 - تجزیه مستقیم گرمایی یا ترمولیز
 - تولید زیستی

امروزه تولید جهانی هیدروژن بیشتر از $1 \text{ billion m}^3/\text{day}$ است که 48% آن از گاز طبیعی، 30% از نفت، 18% از زغال سنگ و 4% باقیمانده از الکترولیز آب تولید می‌شود [۹، ۱۰]. این روش‌های صنعتی اصولاً از سوخت‌های فسیلی استفاده می‌کنند که با انتشار گازهای گلخانه‌ای همراه است. هر دو روش گرمایشیمیایی و الکتروشیمیایی تولید هیدروژن انرژی زیادی مصرف کرده و مشکلات زیست محیطی ایجاد می‌کنند. در مقایسه با این روش‌ها، تولید زیستی هیدروژن اغلب در دما و فشار محیط انجام شده و بنابراین به انرژی زیادی نیاز ندارد. این فرایندها نه تنها مشکلات زیست محیطی ایجاد نمی‌کنند بلکه مسیری به سوی مصرف منابع تجدیدپذیر و پایان‌ناپذیر انرژی را ایجاد می‌کنند. به علاوه در این فرایندها ضایعات مختلفی مصرف شده و به بازیافت آن‌ها کمک می‌شود [۱۵].

تجزیه و تحلیل علم‌سنجی^۱ با استفاده از داده‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی SCI-expanded (از سال ۱۹۹۴)، Science technology (CPCI-S) (از سال ۱۹۹۴) و Social science (CPCI-SS) (از سال ۱۹۹۴) در شبکه‌ی اطلاعات ISI (Thomson Reuters) نشان می‌دهد که تعداد ۲۲۰۴ مقاله به همراه تعداد قابل توجهی ارجاع^۲ (۴۶۷۲۳) و H-index معادل ۹۲ در مورد هیدروژن چاپ شده است. همانطور که در شکل ۱-۲ مشاهده می‌شود، پس از سال ۲۰۰۳ میلادی تعداد تحقیقات در مورد هیدروژن رشد سریعی داشته و در سال ۲۰۰۸ به رکورد بیشینه‌ی ۲۳۰ مقاله با مجموع ارجاع ۲۸۸۳ رسیده است. پس از آن روند رو به رشد این تحقیقات تا سال ۲۰۱۲ (۳۳۵ مقاله و مجموع استناد ۸۱۰۷) ادامه داشته است. تمام این آمار و ارقام حاکی از آن است که تحقیقات در مورد هیدروژن رشد سریعی داشته و امید است که در آینده‌ای نزدیک فرایندی مناسب برای تولید این سوخت ارزشمند طراحی و اجرا شود.



شکل ۱-۲. تجزیه و تحلیل علم‌سنجی در رابطه با تحقیقات انجام شده در مورد تولید هیدروژن. منابع چاپ شده (A) و تعداد استنادها (B) در هر سال [۱۰].

مطالعات متعددی روش‌های استفاده شده برای تولید هیدروژن از سوخت‌های فسیلی [۱۱، ۱۲] و از منابع تجدیدپذیر [۶، ۱۱، ۱۳، ۱۴] را بررسی کرده‌اند. مرسوم‌ترین تکنیک‌های به کار برده شده برای تولید هیدروژن شامل تغییر شکل گاز طبیعی یا نفت به هیدروژن با استفاده از بخار، گازی‌سازی یا پیرولیز زیست توده، گازی‌سازی زغال سنگ و الکترولیز یا انجام عملیات گرمایشیمیایی روی آب هستند [۵، ۶]. تمام فرایندهای ذکر شده به انرژی زیادی احتیاج داشته یا تولید آلاینده‌هایی مانند مونوکسید کربن و دی‌اکسید کربن می‌کنند [۱۳].

¹ Scientometric analysis

² Citations

۴-۱. فرایندهای تولید زیستی هیدروژن

روش زیستی تولید هیدروژن، روشی تجدیدپذیر است که در دهه‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. فرایندهای تولید زیستی هیدروژن به صورت زیر دسته بندی می‌شوند:

- بیوفتولیز^۱ آب با استفاده از جلبک‌های سبز و جلبک‌های سبز-آبی (سیانوباکتری‌ها)
 - (۱) بیوفتولیز مستقیم
 - (۲) بیوفتولیز غیرمستقیم
- تجزیه‌ی نوری^۲ ترکیبات آلی به وسیله‌ی باکتری‌های فتوسنتزکننده‌ی بی‌هوازی
- تخمیر در غیاب نور ترکیبات آلی به وسیله‌ی باکتری‌های بی‌هوازی و بی‌هوازی اختیاری^۳
- سیستم‌های هیبریدی [۵].

۴-۱-۱. بیوفتولیز آب با استفاده از جلبک‌های سبز و جلبک‌های سبز-آبی (سیانوباکتری‌ها)

جلبک‌های سبز و جلبک‌های سبز-آبی مولکول آب را به یون‌های هیدروژن، الکترون‌ها و مولکول اکسیژن به ترتیب از طریق فتولیز مستقیم و غیر مستقیم، می‌شکنند.

۴-۱-۱-۱. فتولیز مستقیم

واکنش کلی برای تبدیل آب به هیدروژن به وسیله‌ی جلبک‌های سبز را می‌توان به وسیله‌ی واکنش (۱) نشان داد:



کلامیدوموناس رینهاردتی (*Chlamydomonas reinhardtii*)، مهم‌ترین ریزجلبک مطالعه شده در روش بیوفتولیز مستقیم آب به هیدروژن است. آنزیم هیدروژناز در این ریزجلبک تحت شرایط بی‌هوازی، هم می‌تواند هیدروژن تولید کند و هم هیدروژن را به عنوان دهنده‌ی الکترون مصرف کند. هیدروژناز پروتون‌های موجود در کلروپلاست را با دریافت الکترون‌های اهدا شده از طرف پروتئین فردوکسین^۴ موجود در سلول‌ها به گاز هیدروژن تبدیل می‌کند. با دریافت انرژی نوری در فتوسیستم II^۵ (PSII) الکترون‌های به دست آمده از شکست مولکول‌های

¹ Biophotolysis

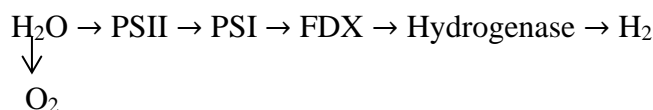
² Photodecomposition

³ Facultative anaerobic bacteria

⁴ Ferredoxin

⁵ Photosystem II

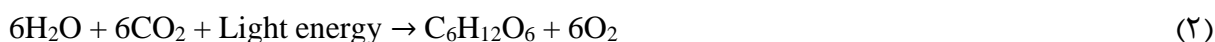
آب به سمت فتوسیستم I (PSI) و سپس به فردوکسین منتقل می شوند. هیدروژناز برگشت پذیر الکترون ها را به طور مستقیم از فردوکسین کاهش یافته برای تولید H₂ به صورت زیر دریافت می کند:



آنزیم هیدروژناز به حضور اکسیژن (O₂) بسیار حساس است. فعالیت هیدروژناز در جلبک های سبز دیگری مانند *Chlorococcum littorale*، *Scenedesmus obliquus*، *Platymonas subcordiformis* و *Chlorella vulgaris* نیز مشاهده شده است. همچنین جلبک های سبزی از گونه های *Dunaliella salina* و *Chlorella vulgaris* وجود دارند که فاقد فعالیت هیدروژنازی هستند.

۱-۴-۲. فتولیز غیرمستقیم

واکنش کلی برای تولید هیدروژن از آب به وسیله سیانوباکتری ها را می توان به صورت واکنش های (۲) و (۳) نشان داد:



سیانوباکتری ها با نام های دیگر جلبک های سبز-آبی، Cyanophyceae و یا Cyanophytes نیز شناخته می شوند. این ارگانیسیم ها، گروه بزرگ و متنوعی از میکروارگانیسیم های فتواتوتروف هستند. سیانوباکتری ها دارای رنگدانه های فتوسنتزی مانند کلروفیل ها، کاروتنوئیدها^۲ و فیکوبیلی پروتئین ها^۳ بوده و توانایی فتوسنتز اکسیژنی^۴ را دارند. این گروه از میکروارگانیسیم ها شکل های گوناگونی شامل گونه های منفرد، رشته ای و توده ای دارند. هیدروژن به وسیله هر دو آنزیم هیدروژناز و نیتروژناز تولید می شود. در سیانوباکتری های رشته ای، سلول های رویشی^۵ ممکن است به سلول های اصلاح شده از نظر ساختاری و دارای عملکرد ویژه توسعه یابند. منابع مورد نیاز رشد آن ها شامل هوا (CO₂ و N₂)، آب، نمک های معدنی و نور است.

سیانوباکتری های تولیدکننده ی هیدروژن ممکن است تثبیت کننده نیتروژن^۶ نیز باشند. مثال هایی از ارگانیسیم های تثبیت کننده نیتروژن *Calothrix* sp. و *Oscillatoria* sp. آبی هستند. سیانوباکتری هایی مانند *Synechococcus* sp.، *Gloeobacter* sp. و *Anabaena* sp. نیتروژن را تثبیت نمی کنند.

¹ Photosystem I

² Carotenoids

³ Phycobiliproteins

⁴ Oxygenic photosynthesis

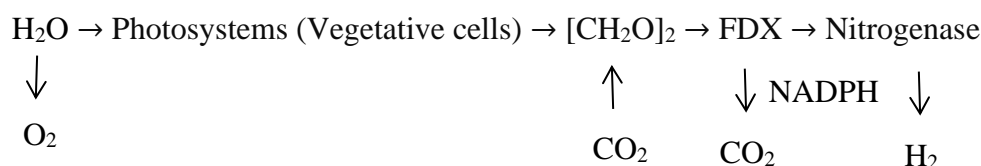
⁵ Vegetative cells

⁶ Nitrogen fixing

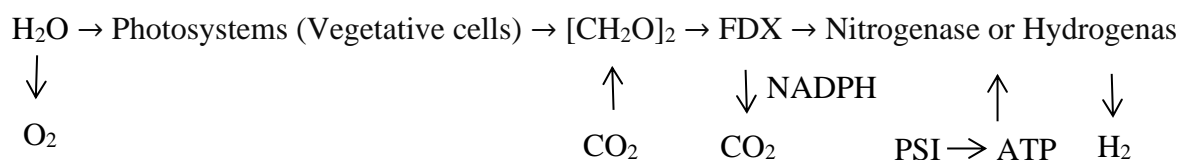
گونه‌های ذکر شده توانایی تولید هیدروژن بیشتری نسبت به دیگر گونه‌های سیانوباکتری‌ها دارند [۱۵, ۱۶]. هتروسیست‌های^۱ رشته‌ای *Anabaena variabilis* به دلیل بازده بالاتر تولید هیدروژن، توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند [۱۷].

هیدروژن در سلول‌های رویشی سیانوباکتری‌ها از دو راه تولید می‌شود:

- باکتری‌های هتروسیست تثبیت کننده نیتروژن



- باکتری‌های غیرهتروسیست تثبیت کننده نیتروژن



در سیانوباکتری‌ها اکسیژن ممانعت کننده‌ی فعالیت هر دو آنزیم نیتروژناز و هیدروژناز است و هیدروژن در شرایط بی‌هوازی تولید می‌شود. با وجود تلاش‌های زیاد برای افزایش تولید هیدروژن در سیانوباکتری‌ها، نرخ و بازده تولید در این ارگانیسم‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از نرخ و بازده تولید در باکتری‌های فتوسنتز کننده‌ی بی‌هوازی در معرض نور و باکتری‌های بی‌هوازی در غیاب نور است.

معادله‌ی استوکیومتری تولید هیدروژن در سیانوباکتری‌ها زمانی که با تثبیت نیتروژن همراه باشد به صورت واکنش (۴) است:



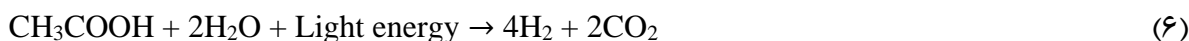
و چنانچه با تثبیت نیتروژن همراه نباشد به صورت واکنش (۵) است:



^۱ Heterocystous filamentous *Anabaena cylindrica*

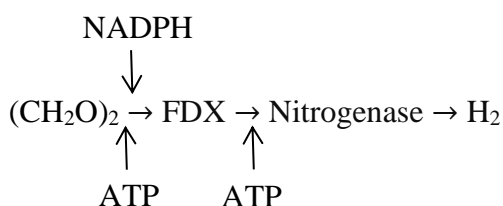
۱-۴-۲. تجزیه نوری ترکیبات آلی به وسیله باکتری های فتوسنتز کننده بی هوازی

در باکتری های غیر گوگردی ارغوانی^۱ آنزیم های نیتروژناز در شرایط فقر گاز نیتروژن، با استفاده از انرژی نوری و ترکیبات کاهنده (اسیدهای آلی) هیدروژن تولید می کنند. واکنش تولید هیدروژن به صورت واکنش (۶) است:



تولید هیدروژن در باکتری های فتوسنتز کننده بی هوازی برای مدت زمان طولانی مورد مطالعه قرار گرفته است. مزیت استفاده از آن ها متابولیسم انعطاف پذیر و چند بعدی این ارگانیسیم ها و نداشتن PSII است. نداشتن PSII، به معنی تولید نکردن اکسیژن و در نتیجه حذف ذاتی اثر ممانعت کننده ی آن بر آنزیم تولید کننده ی هیدروژن است. باکتری های فتوتروف به منبع الکترون آلی یا غیر آلی برای پیش برد فتوسنتز نیاز دارند. آن ها می توانند طیف وسیعی از ترکیبات ارزان قیمت را مصرف کنند. این باکتری های فتوهتروتروف برای تبدیل انرژی نور به هیدروژن، ضایعات آلی را به عنوان سوپسترا مصرف می کنند [۱۸].

می توان مسیر بیوشیمیایی کلی برای فرایند تخمیر نوری را به صورت زیر بیان کرد:



۱-۴-۳. تولید هیدروژن به وسیله تخمیر ترکیبات آلی در غیاب نور

تخمیر هیدروژن^۲ در غیاب نور یک پدیده فراگیر در شرایط بدون اکسیژن (اکسیژنی برای پذیرش الکترون وجود نداشته باشد) در باکتری ها است. زمانی که باکتری ها روی سوپستراهای آلی رشد می کنند (رشد هتروتروف)، این سوپستراها به وسیله اکسیداسیون تجزیه شده و واحدهای سازنده^۳ و انرژی مورد نیاز رشد را تهیه می کنند. در فرایندهای اکسیداسیون الکترونی تولید می شوند که برای حفظ شرایط خنثی الکتریکی باید خارج و مصرف شوند. در شرایط هوازی، اکسیژن کاهش پیدا کرده و آب تولید می شود. در محیط بی هوازی، ترکیبات دیگر مانند پروتون ها الکترون ها را دریافت کرده و به مولکول های هیدروژن کاهیده می شوند [۵، ۱۶]. در فرایند تخمیر هیدروژن، ابتدا گلوکز از طریق مسیر متابولیکی گلوکولیز^۴ به پیرووات تبدیل می شود. سپس پیرووات به acetyl-CoA که می تواند به استیل فسفات تبدیل شده و در نتیجه ATP و استات تولید کند، اکسید می شود. اکسید شدن پیرووات به acetyl-CoA سبب کاهش فردوکسین می شود. فردوکسین کاهش یافته سپس اکسید شده و

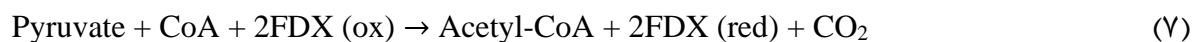
¹ Purple non-sulfur bacteria

² Hydrogen fermentation

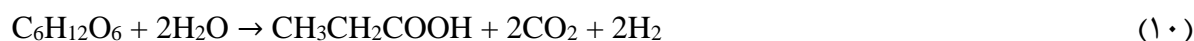
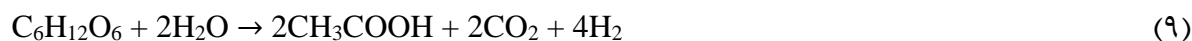
³ Building blocks

⁴ Glycolysis

الکترون‌های مورد نیاز تولید هیدروژن را در شرایط بی‌اکسیژنی^۱ آزاد می‌کند. واکنش کلی به صورت واکنش‌های (۷) و (۸) قابل بیان است:



تخمیر بی‌هوازی تولید انبوه هیدروژن را از طریق فرایند نسبتاً ساده‌ای با مصرف طیف وسیعی از مواد از جمله ضایعات و پسماندها، ممکن می‌کند. به علاوه، تولید تخمیری هیدروژن نرخ بالایی دارد و به منبع نور وابسته نیست. منابع اصلی کربن در این فرایندها، کربوهیدرات‌ها و عموماً گلوکز هستند. در حضور این منابع، تولید اسیداستیک، اسیدبوتیریک و گاز هیدروژن بالا می‌رود (واکنش‌های (۹) و (۱۰)).



به ازای هر مول گلوکز باکتری‌های بی‌هوازی اجباری و بی‌هوازی اختیاری، به ترتیب ۴ مول و ۲ مول هیدروژن تولید می‌کنند. بی‌هوازی‌های اختیاری حساسیت کمتری نسبت به اکسیژن داشته و بعضی اوقات قابلیت تولید هیدروژن را حتی پس از آسیبی که اکسیژن به آن‌ها وارد می‌کند با تخلیه سریع اکسیژن موجود در محیط کشت دوباره به دست می‌آورند. بنابراین این باکتری‌ها میکروارگانیسم‌های مناسب‌تری برای تولید تخمیری هیدروژن نسبت به بی‌هوازی‌های اجباری هستند [۱۹].

یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های تولید زیستی هیدروژن، بازده و نرخ پایین تولید نسبت به روش‌های مرسوم غیرزیستی است. جدول ۱-۲، تخمینی از نرخ تولید هیدروژن در فرایندهای زیستی را نشان می‌دهد. با وجود نرخ بسیار پایین تولید هیدروژن در روش‌های بیوفتولیز مستقیم و غیر مستقیم، تولید هیدروژن با استفاده از جلبک‌های سبز و جلبک‌های سبز-آبی روشی پایدار و امیدبخش است. زیرا این میکروارگانیسم‌ها با مصرف دو منبع بی‌پایان نور خورشید و آب می‌توانند هیدروژن تولید کنند [۱۰]. همچنین، جلبک‌ها توانایی مصرف دی‌اکسیدکربن برای رشد اتوتروفی را دارند و به همین دلیل برای تولید هیدروژن، توجه زیادی متمرکز آن‌ها شده است. بنابراین هدف و چالش نهایی برای تحقیقات در مورد تولید زیستی هیدروژن، رسیدن به بازده و نرخ بالای تولید است.

¹ Anoxia

جدول ۱-۲. نرخ تولید هیدروژن در فرایندهای زیستی [۱۱].

نرخ تولید هیدروژن (mmol H ₂ /h)	نوع فرایند زیستی
۰/۰۷	بیوفتولیز مستقیم
۰/۳۵۵	بیوفتولیز غیرمستقیم
۰/۱۶	تخمیر نوری
۸/۲-۱۲۱	تخمیر در غیاب نور

۵-۱. ریزجلبک کلامیدوموناس رینهاردتی (*Chlamydomonas reinhardtii*)

از آنجا که ریزجلبک‌ها بزرگترین جمعیت ارگانیس‌های فتوسنتزی جهان هستند، به عنوان کاندیدهای مناسبی برای تولید هیدروژن در نظر گرفته می‌شوند [۲۰]. کلامیدوموناس رینهاردتی (از این به بعد، کلامیدوموناس)، جلبکی تک‌سلولی است که به عنوان ارگانیس‌مدل برای تولید زیستی نوری^۱ هیدروژن در نظر گرفته می‌شود. رشد سریع (اتوتروفی و هتروتروفی)، ژنتیک شناخته شده و آسان بودن دستکاری ژنتیکی این ریزجلبک از ویژگی‌های شاخص آن است [۲۱]. کلامیدوموناس سه مسیر متابولیکی مختلف برای تولید هیدروژن دارد (شکل ۳-۱). دو تا از مسیرهای متابولیکی به الکترون‌های منتقل شده در دستگاه فتوسنتز این ریزجلبک وابسته بوده و مسیرهای متابولیکی وابسته به PSII و مستقل از PSII نامیده می‌شوند. در مسیر متابولیکی وابسته به PSII، الکترون‌های آزاد شده از فتولیز آب در سطح PSII، به ترتیب پلاستوکینون پول^۲ (PQ)، سیتوکروم b₆f^۳، پلاستوسیانین^۴ (PC)، PSI و در نهایت فردوکسین^۵ (FDX) را کاهش می‌دهند. در این مسیر متابولیکی اکسیژن به عنوان محصول جانبی تولید می‌شود. از بین شش فردوکسین شناخته شده در کلامیدوموناس، فردوکسین ۱ (FDX1) مهم‌ترین دهنده الکترون به هیدروژنازها است [۲۲، ۲۳]. در مسیر متابولیکی مستقل از PSII، الکترون‌های به دست آمده از NAD(P)H، PQ را به وسیله آنزیم NAD(P)H dehydrogenase type II،

¹ Photo-biological hydrogen production

² Plastoquinone pool

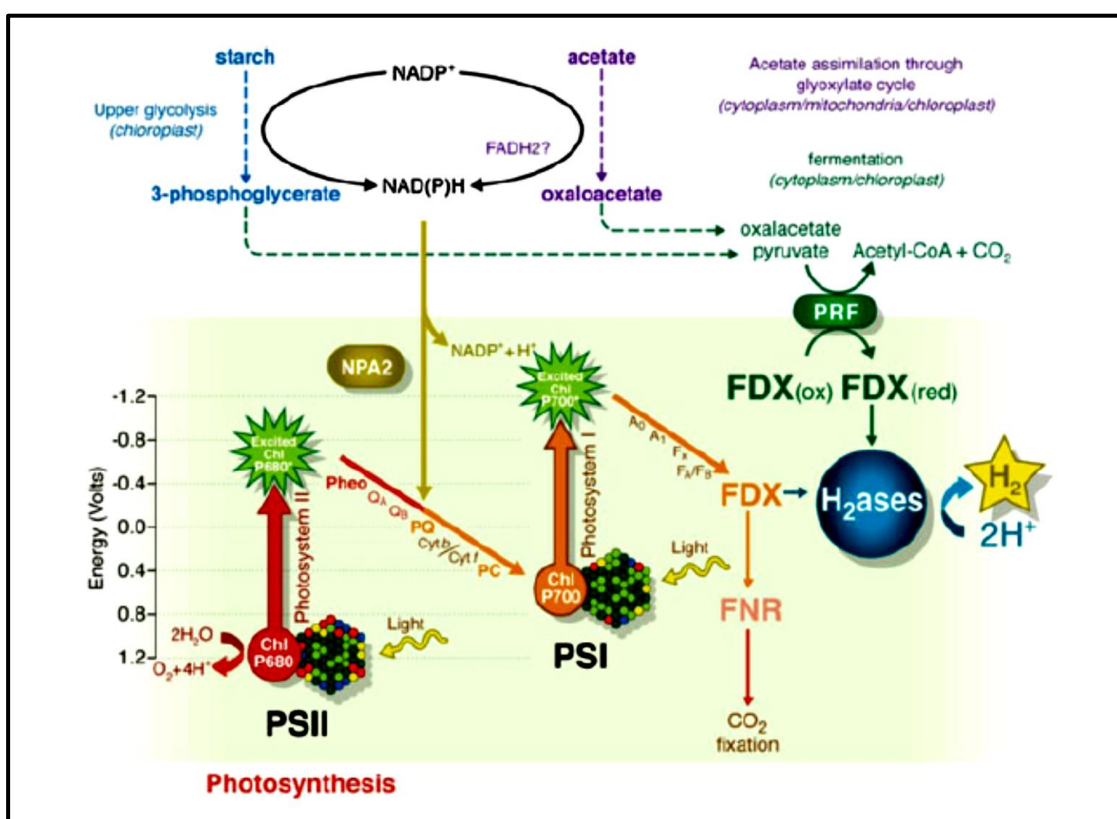
³ Cytochrome b₆f

⁴ Plastocyanin

⁵ Ferredoxin

NDA2، کاهش می‌دهد [۲۴-۲۸]. در ادامه مانند مسیر وابسته به PSII، الکترون‌ها به PSI رسیده و سپس به FDX1 منتقل می‌شوند.

مسیر متابولیکی سوم، الکترون‌های به دست آمده از تجزیه‌ی تخمیری ترکیبات درون سلولی مانند پیروات را در اختیار آنزیم تولید کننده‌ی هیدروژن قرار می‌دهد. در این مسیر متابولیکی، زمانی که پیروات به وسیله‌ی آنزیم پیروات فردوکسیدین اکسیدوروکتاز^۱ (PFR) به استیل کوآ اکسید می‌شود، FDX1 کاهش یافته و در نهایت الکترون‌ها را به هیدروژناز منتقل می‌کند [۳۱-۳۴].



شکل ۱-۳. مسیرهای متابولیکی تولید هیدروژن در کلامیدوموناس.

منبع تامین الکترون‌ها در مسیر متابولیکی وابسته به PSII با رنگ قرمز و در مسیر متابولیکی مستقل از PSII با رنگ زرد نشان داده شده‌اند. در مسیر متابولیکی مستقل از PSII، NAD(P)H از کاتابولیسم ترکیبات آلی مانند نشاسته و استات که به ترتیب با رنگ آبی و بنفش نشان داده شده‌اند، تشکیل می‌شود. به علاوه، تخمیر در غیاب نور پیروات و اگزالواستات با استفاده از آنزیم PFR که با رنگ سبز نشان داده شده است، الکترون‌های مورد نیاز تولید هیدروژن را در اختیار FDX قرار می‌دهند [۳۵].

۱-۵-۱. محدودیت‌های تولید هیدروژن در کلامیدوموناس

تولید هیدروژن در کلامیدوموناس یک فرایند موقتی است زیرا اکسیژن تولید شده در دستگاه فتوسنتز این ریزجلبک مانع فعالیت آنزیم تولید کننده هیدروژن می‌شود. این واقعیت بزرگ‌ترین عیب فرایند تولید زیستی نوری هیدروژن است. علاوه بر این، در دهه‌های گذشته، گزارش‌های مختلف عوامل محدود کننده دیگری را برای تولید هیدروژن در این ریزجلبک بیان کرده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از:

- بازده پایین تبدیل انرژی نوری به انرژی شیمیایی هیدروژن [۳۶، ۳۷].
- رقابت برای دریافت الکترون‌های فتوسنتزی [۲۳، ۳۲، ۳۴].
- اثر ممانعت کنندهی pH [۳۸].
- اثر فشار جزئی هیدروژن [۳۹].
- سطح بیان پایین آنزیم‌های هیدروژناز [۴۰].

۱-۵-۱-۱. بازده پایین تبدیل انرژی نوری به انرژی شیمیایی

ارگانیسیم‌های فتواتوتروفی می‌توانند به وسیله‌ی دستگاه فتوسنتزی که دارند انرژی نوری را دریافت کرده و به باندهای شیمیایی پر انرژی تبدیل کنند. موانع متعددی محدودکنندهی تبدیل انرژی نوری به انرژی شیمیایی هستند که در ادامه به اختصار توضیح داده می‌شوند:

میکروارگانیسیم‌های فتوسنتزی مختلف توانایی جذب دامنه‌ی محدودی از طول موج‌ها را دارند. همچنین اجزای دستگاه فتوسنتز توانایی محدودی برای جذب و انتقال انرژی دارند و بقیه‌ی انرژی اتلاف می‌شود. بازده تبدیل نهایی انرژی نوری به انرژی شیمیایی در کلامیدوموناس حدود ۲٪ یا حتی کمتر است [۳۷، ۴۱]. بنابراین فتوسنتز، فرایندی ناکارآمد برای تبدیل انرژی نوری به انرژی شیمیایی است که تولید هیدروژن به طور اجتناب‌ناپذیری تحت تاثیر این بازده پایین تبدیل انرژی است.

۱-۵-۱-۲. رقابت برای دریافت الکترون‌های فتوسنتزی:

فردوکسین‌ها به ویژه FDX1، اصلی‌ترین اهدا کنندگان الکترون‌ها به هیدروژنازها در کلامیدوموناس هستند [۲۳، ۳۲، ۳۴]. FDX1، الکترون‌های فتوسنتزی و تخمیری را به ترتیب از PSI و PFR دریافت می‌کنند. علاوه بر هیدروژنازها، FDX1 الکترون‌ها را به Ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase (FNR)، Ferredoxin: glutamate synthase و thioredoxin reductase (FTR)، Nitrite reductase، Sulfite reductase و α -Ketoglutarate synthase اهدا می‌کند. شرایط فیزیولوژیکی داخل سلول‌ها کنترل کننده‌ی فعالیت رقابتی این

آنزیم‌ها در مقابل هیدروژنازها است. در شرایط معمولی، مهم‌ترین دریافت‌کننده الکترون‌ها FNR است که با دریافت الکترون‌ها NADPH مورد نیاز برای تثبیت دی‌اکسیدکربن را تولید می‌کند [۴۲].

۱-۵-۱. اثر ممانعت‌کننده pH

pH درون سلول‌ها (غلظت پروتون‌ها) بر فعالیت هیدروژنازها موثر است [۳۸]. فعالیت هیدروژنازها در محیط‌های شدیداً اسیدی و شدیداً بازی متوقف می‌شود [۴۳]. pH بهینه برای عملکرد هیدروژنازها در کلامیدوموناس برابر ۷/۷ تعیین شده است [۴۳].

۱-۵-۱.۴. اثر فشار جزئی هیدروژن

هیدروژنازها، آنزیم‌هایی با عملکرد دو طرفه هستند که توانایی کاتالیز هر دو واکنش تولید هیدروژن و مصرف هیدروژن را دارند. مانند دیگر تعادل‌های شیمیایی، غلظت اجزا، تعیین‌کننده‌ی جهت واکنش است. گزارش شده است که تجمع هیدروژن در کشت‌های بسته‌ی کلامیدوموناس، واکنش مصرف هیدروژن را فعال می‌کند [۳۹]. [۴۴].

۱-۵-۱.۵. سطح بیان پایین آنزیم‌های هیدروژناز

هیدروژنازها کمتر از ۱٪ پروتئین‌های محلول در سلول‌های جلبک را، حتی در شرایط بی‌هوازی، تشکیل می‌دهند [۴۵]. استوکیومتری این آنزیم نسبت‌های ۱ به ازای بیش از ۱۰۰۰۰ کلروفیل و یا ۱ به ازای بیش از ۱۰ واحد PSI را تخمین می‌زند.

۱-۵-۲. روش‌های تقویت تولید هیدروژن در کلامیدوموناس

رویکردهای متفاوتی مانند اصلاحات ژنتیکی، بهره‌گیری از مهندسی متابولیک، فقر مواد مغذی، بهینه‌کردن پارامترهای عملیاتی موثر و طراحی بیوراکتورها برای تقویت تولید هیدروژن در کلامیدوموناس مطالعه شده‌اند [۱۳، ۴۲]، [۴۶-۴۸]. از میان استراتژی‌های مبنی بر فقر مواد مغذی [۱۳، ۴۷، ۴۸]، فقر سولفور به طور وسیعی مورد توجه و بررسی قرار گرفته است. در شرایط فقر سولفور، PSII به طور موقت غیر فعال شده و شرایط بی‌اکسیژنی مورد نیاز برای تولید هیدروژن در کلامیدوموناس را فراهم می‌کند [۴۹-۵۱]. همچنین در سال‌های اخیر نشان داده شده است که کمبود دی‌اکسیدکربن به دلیل کاهش رقابت چرخه‌ی کالوین (Calvin-Benson Cycle) برای دریافت الکترون‌های فتوسنتزی، تولید هیدروژن را افزایش می‌دهد [۵۲، ۵۳]. با این وجود، روش‌های مبتنی بر فقر مواد مغذی و محدودیت دی‌اکسیدکربن برای کاربردهای صنعتی به دلیل نیاز به بیوراکتورهای دو فاز (رشد و تولید هیدروژن) و یا استفاده از گازهای خنثی برای زدودن گاز فضای بالاسری بیوراکتورها مناسب نیستند. به علاوه، زیست‌پذیری کلامیدوموناس در شرایط فقر مواد مغذی به شدت کاهش می‌یابد که ممکن است

اعتبار بالقوه‌ی زیست‌توده برای کاربردهای دیگر را خدشه‌دار کند. از سوی دیگر استراتژی‌های مبنی بر کنترل نور در بیوراکتورها نشان داده است که در شرایط غنی از مواد مغذی، شدت نورهای کم منجر به توسعه‌ی شرایط بی‌اکسیژنی در کشت‌های اتوتروفی [۵۴] و میکسوتروفی [۵۵-۵۷]. کلامیدوموناس و در نتیجه تولید هیدروژن می‌شود. اخیراً، استراتژی‌های دیگر مبنی بر انتقال سریع از تاریکی به روشنایی امکان تولید بلندمدت هیدروژن را در هر دو شرایط کشت‌های اتوتروفی و میکسوتروفی نشان داده است [۵۲]. با این حال، کنترل نور از نظر صنعتی روش مناسبی برای رسیدن به شرایط بی‌هوازی در بیوراکتورهای مقیاس بزرگ به ویژه زمانی که نور خورشید منبع تامین انرژی باشد، نیست.

یک راهکار جایگزین و مناسب برای تولید هیدروژن در کلامیدوموناس، هم‌زیستی جلبک با باکتری‌ها در شرایط میکسوتروفی است. تحقیقات نشان داده‌اند که تنفس باکتریایی روش موثری برای رسیدن به شرایط کم‌اکسیژنی^۱ در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری است. هم‌زیستی کلامیدوموناس با باکتری‌های مختلفی در محیط کشت‌های غنی از اسیداستیک، در شرایط فقر سولفور [۵۸-۶۳] و در شرایط غنی از سولفور [۶۰، ۶۴، ۶۵] بررسی شده است. فصل بعدی این تحقیق جنبه‌های مثبت هم‌زیستی کلامیدوموناس با باکتری‌های مختلف به منظور تولید هیدروژن را به تفصیل مرور و بررسی می‌کند.

۱-۶. اهداف و ضرورت اجرای طرح

۱-۶-۱. اهداف طرح

هدف این رساله بررسی هم‌زیستی باکتری‌های مختلف با ریزجلبک کلامیدوموناس و پیدا کردن یک همراه مناسب باکتریایی برای این جلبک به منظور افزایش تولید زیستی هیدروژن است. به همین سبب به کمک اطلاعات به دست آمده از مرور مقالات و مراجع گذشته، باکتری‌های متعددی برای هم‌زیستی با کلامیدوموناس انتخاب می‌شود.

اثر هم‌زیستی باکتری‌های انتخاب شده بر رشد کلامیدوموناس و تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست در معرض شدت نورهای مختلف و در محیط کشت‌های متفاوت بررسی می‌شود. همچنین به منظور بررسی عملکرد مدل‌سازی شبکه‌ی متابولیک در پیش‌بینی رفتار کشت‌های هم‌زیست، مدل شبکه‌ی متابولیک کنسرسیون جلبک-باکتری از تجمیع شبکه‌های متابولیک هر یک از ارگانیسم‌ها ساخته شده و نتایج حاصل شده از مدل‌سازی با نتایج تجربی مقایسه می‌شود. تمام آزمایش‌ها در شرایط غنی از مواد مغذی انجام می‌شوند.

عناوین کلی مراحل اصلی طرح به شرح ذیل می‌باشند:

^۱ Hypoxia

- ۱) مرور جامع مقالات، گزارش‌ها و پژوهش‌های انجام شده در رابطه با موضوع رساله.
- ۲) بررسی و انتخاب باکتری‌هایی که پتانسیل هم‌زیستی با ریزجلبک کلامیدوموناس را دارند.
- ۳) بررسی اثر هم‌زیستی باکتری‌های انتخاب شده بر رشد کلامیدوموناس و تولید هیدروژن در این ریزجلبک در محیط کشت‌های غنی از مواد مغذی.
- ۴) بررسی اثر شدت نور بر رشد کلامیدوموناس و تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری و کشت‌های کنترلی ریزجلبک.
- ۵) بررسی اثر منابع کربنی مختلف بر رشد کلامیدوموناس و تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری و کشت‌های کنترلی ارگانسیم‌ها.
- ۶) کشف و شناسایی جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته با اثر مثبت بر رشد و تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی.
- ۷) مطالعه‌ی هم‌زیستی هر یک از اعضای جامعه‌ی باکتریایی بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست شامل کلامیدوموناس و انتخاب باکتری موثر بر تقویت تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست.
- ۸) مطالعه‌ی منابع کربن و نیتروژن مورد نیاز رشد باکتری منتخب.
- ۹) بررسی نوع رابطه‌ی هم‌زیستی کلامیدوموناس و باکتری منتخب.
- ۱۰) بررسی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری منتخب در حضور منابع کربن و نیتروژن مختلف.
- ۱۱) بررسی اثر غلظت اولیه‌ی باکتری‌ها بر رشد و تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زمان.
- ۱۲) بررسی اثر غلظت اولیه‌ی کلامیدوموناس بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زمان.
- ۱۳) مدل‌سازی شبکه‌ی متابولیک کنسرسیوم کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا و مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از مدل‌سازی با نتایج حاصل شده از آزمایش‌های تجربی.

۱-۶-۲. ضرورت اجرای طرح

در ابتدای فصل به جایگاه حائز اهمیت هیدروژن در تامین انرژی آینده اشاره شد. همچنین تولید زیستی نوری هیدروژن در جلبک‌ها به دلیل استفاده از دو منبع بی‌پایان نور و آب و نیز تثبیت دی‌اکسیدکربن که از گازهای گلخانه‌ای است، روشی امید بخش، پایدار و تجدیدپذیر است. مزیت عمده‌ی فتولیز مستقیم هیدروژن در جلبک‌های سبز نسبت به فتولیز غیر مستقیم در سیانوباکتری‌ها این است که جلبک‌های سبز بدون مصرف انرژی (ATP)، هیدروژن تولید می‌کنند. ریزجلبک کلامیدوموناس به دلیل ویژگی‌های قابل توجهی که دارد به عنوان ارگانسیم مدل در این فرایندها انتخاب می‌شود. بزرگترین مانع تولید هیدروژن در جلبک‌ها حضور اکسیژن فتوسنتزی در کشت‌ها معرفی شد. از سوی دیگر هم‌زیستی جلبک‌ها و باکتری‌ها همیشه در طبیعت وجود داشته

است و این نشان دهنده‌ی بهره‌وری این ارگانسیم‌ها از هم‌زیستی با یکدیگر است. بنابراین با مدنظر قرار دادن این پدیده‌ی طبیعی و به ویژه امکان حذف اکسیژن فتوسنتزی به وسیله‌ی تنفس باکتریایی در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری، مطالعه‌ی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری اهمیت قابل توجهی دارد. بنابراین تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن می‌تواند فرایندی اقتصادی، سازگار با محیط زیست و پایدار باشد.

برخی از جنبه‌های مثبت تولید زیستی‌نوری هیدروژن در کنسرسیوم جلبک-باکتری در حوزه انرژی و محیط-زیست به شرح ذیل می‌باشند:

- استفاده از منابع رایج، فراوان و بی‌پایان برای تولید سوختی پاک، با ارزش و پربازده
- اهمیت استفاده از هیدروژن در پیل‌های سوختی و وسایل نقلیه در آینده‌ای بسیار نزدیک
- کاهش گازهای گلخانه‌ای در فرایندهای تولید و مصرف انرژی
- تامین هیدروژن مورد نیاز صنایع پالایشگاهی، پتروشیمیایی و شیمیایی
- افزایش امنیت انرژی و تنوع بخشی به حاملهای ثانویه انرژی در کشور

در مورد موضوع تحقیق این رساله سابقه تحقیقاتی در ایران مشاهده نشده است. البته با توجه به تمامی تحقیقات انجام شده در این زمینه در دنیا، هنوز هم این فناوری به گفته بسیاری از محققان مطرح در فاز اولیه تحقیقاتی خود بوده و ابعاد مختلفی از آن نیاز به تحقیق و توسعه دارد. با این وجود، رشد سریع تعداد تحقیقات انجام شده در این زمینه و ورود کشورهای بیشتر به این حوزه از فناوری در سالهای اخیر و همچنین تاکید اسناد بالادستی ایران در زمینه هیدروژن و پیل سوختی نشانگر اهمیت موضوع می‌باشند.

با توجه به مطالب ذکر شده، نتیجه گرفته می‌شود که ورود به این حوزه از فناوری و دستیابی به دانش فنی آن ضرورت و اهمیت قابل ملاحظه و پرواضحی دارد. همچنین، این طرح از نظر باکتری‌های انتخاب شده برای هم‌زیستی با جلبک کلامیدوموناس و شرایط استفاده شده برای تولید هیدروژن (محیط کشت غنی از مواد مغذی)، دارای نوآوری می‌باشد.

۱-۶-۳. نوآوری طرح

به هنگام تعریف موضوع این رساله، جنبه‌های نوآورانه آن به شرح زیر بوده است:

- جدید بودن و بی‌سابقه بودن موضوع "تولید هیدروژن به روش زیستی‌نوری در کنسرسیوم جلبک-باکتری" به عنوان پژوهش دانشگاهی در کشور.

- در نظر گرفتن تولید هیدروژن در کنسرسیوم جلبک-باکتری به صورت بخشی از پروژه‌های ترکیبی کلان‌کشوری در آینده که شامل تصفیه‌ی آب و پساب، تولید هیدروژن و در نهایت استفاده از اعتبار بالقوه‌ی زیست‌توده برای کاربردهای دیگر بیوتکنولوژی، هستند.
- جدید بودن بررسی متابولیسم تولید هیدروژن در کنسرسیوم جلبک-باکتری در محیط کشت غنی از مواد مغذی
- معرفی اسیداستیک به عنوان پارامتری کلیدی برای تقویت تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری
- معرفی کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-ای‌کلای (باکتری تولیدکننده‌ی هیدروژن) به عنوان کشت‌هایی که توانایی هم‌افزایی تولید هیدروژن را دارند.
- تولید بلندمدت هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت‌های غنی از مواد مغذی.
- معرفی رابطه‌ی مفید متقابل¹ بین رشد کلامیدوموناس و رشد میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست.
- بررسی مصرف اسیداستیک، تولید هیدروژن و رشد کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا با استفاده از مدل‌سازی شبکه‌ی متابولیک این میکروارگانیسم‌ها.

¹ Mutualism

۷-۱. خلاصه‌ی فصل‌ها

مطابق اهداف ذکر شده در این تحقیق، فصل‌های بعدی رساله شامل مباحث و نتایج ذیل می‌باشند:

در فصل دوم به جمع‌بندی جامعی از اثرات هم‌زیستی باکتری‌ها بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری می‌پردازیم.

در فصل سوم رساله، مواد و روش‌های به کار برده شده برای برپا کردن^۱ آزمایش‌های هم‌زیستی و تولید هیدروژن به همراه امکانات مورد نیاز برای اندازه‌گیری و آنالیز کشت‌های مختلف توضیح داده می‌شوند. به علاوه، روش به کار برده شده برای مدل‌سازی شبکه‌ی متابولیک کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا بیان می‌شود.

در فصل چهارم، نتایج حاصل از بررسی اثر هم‌زیستی باکتری‌های مختلف بر رشد و تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری ارائه می‌شوند. همچنین نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی اثر شدت نورهای مختلف، منابع کربنی و نیتروژنی مختلف و غلظت اولیه‌ی جلبک و باکتری بر رشد و تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست بیان و تحلیل می‌شوند. در پایان نتایج به دست آمده از مدل‌سازی شبکه‌ی متابولیک کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا ارائه و با نتایج تجربی مقایسه می‌شوند.

در فصل پنجم، نتایج کلی حاصل شده از این تحقیق و نیز پیشنهادات جدید جهت ادامه‌ی کار و پیشبرد تحقیقات ارائه می‌شوند.

^۱ Set up

فصل دوم:

تولید هیدروژن در کنسرسیوم جلبک-باکتری

۱-۲. کنسر سیوم کلامیدوموناس-باکتری

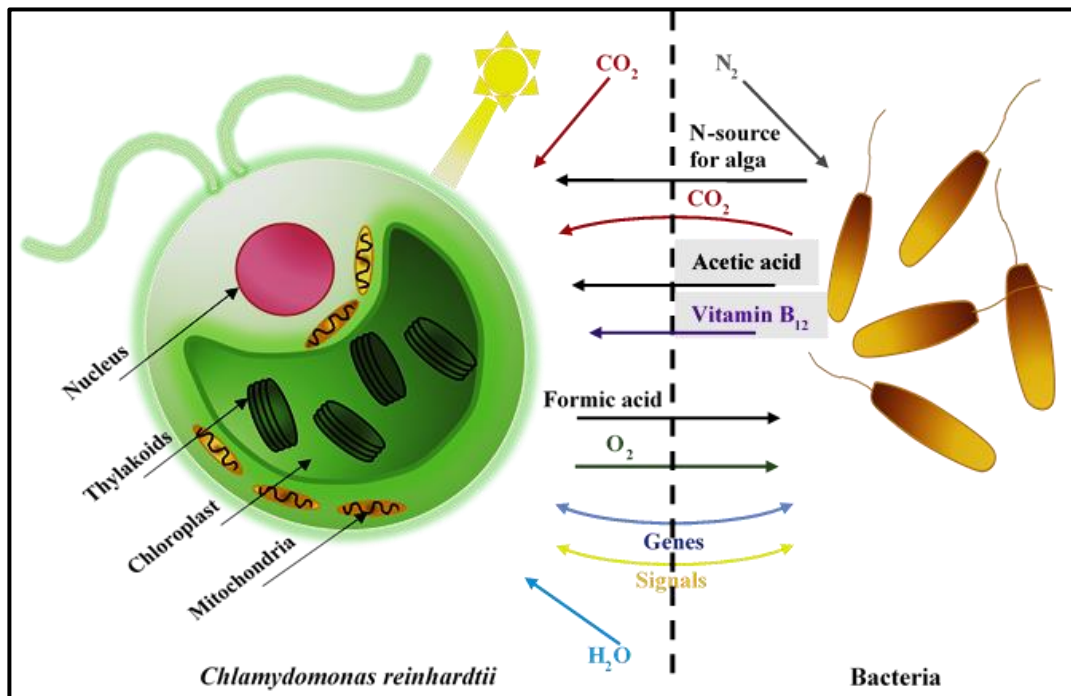
میکروارگانیسیم‌های مختلفی توانایی تولید هیدروژن را دارند. جلبک‌های سبز و جلبک‌های سبز-آبی از انرژی ناحیه‌ی مرئی نور خورشید استفاده کرده و هیدروژن تولید می‌کنند. به طور مشابه، بعضی از باکتری‌های فتوسنتزکننده‌ی بی‌هوازی انرژی نزدیک ناحیه‌ی فرورسرخ نور خورشید را جذب کرده و با مصرف اسیدهای آلی کوچک هیدروژن تولید می‌کند. گروهی دیگر از باکتری‌ها منابع کربنی آلی را در شرایط تخمیری مصرف کرده و هیدروژن را به عنوان محصول نهایی تولید می‌کنند. با این که تلاش زیادی شده است تا تولید هیدروژن در هر یک از این ارگانیسیم‌ها بهبود یابد، به ادغام این سیستم‌های زیستی برای افزایش تولید هیدروژن توجه ناچیزی شده است. از نظر تئوری، ارگانیسیم‌های فتوسنتزی مختلفی انرژی نور خورشید دریافت شده را به هیدروژن و ترکیبات فتوسنتزی آلی مانند نشاسته و لیپیدها تبدیل می‌کنند. این ترکیبات فتوسنتزی می‌توانند به ترکیبات آلی کوچکتر مانند گلوکز و پیرووات که برای تولید تخمیری هیدروژن در باکتری‌ها مناسب هستند، تبدیل شوند. در فرایند تخمیری تولید هیدروژن در باکتری‌ها، محصولات نهایی دیگری نیز تولید می‌شوند که از میان آن‌ها اسیداستیک برای رشد هترتروفی جلبک کلامیدوموناس و تقویت تولید هیدروژن در این جلبک و باکتری‌های فتوسنتزکننده‌ی بی‌هوازی مناسب است [۶۶].

به علاوه، ارتباط بین جلبک‌ها و باکتری‌ها رویکردی امیدبخش برای رفع بسیاری از محدودیت‌های مربوط به تولید زیستی نوری هیدروژن است. یکی از مهم‌ترین جنبه‌های محدود کننده‌ی تولید زیستی نوری هیدروژن حضور اکسیژن فتوسنتزی در کشت‌های جلبک‌ها است که در هم‌زیستی با باکتری‌ها، تنفس باکتریایی منجر به حذف اکسیژن از کشت‌ها می‌شود. بنابراین در کشت‌های هم‌زیست، جلبک‌ها اکسیژن مورد نیاز باکتری‌های هوازی را تولید کرده و در اختیار باکتری‌ها قرار می‌دهند و باکتری‌ها نیز اکسیژن را مصرف کرده و شرایط کم‌اکسیژنی را فراهم می‌کنند. در طبیعت جلبک‌ها و باکتری‌ها براساس نیازهای رشد، انواع مختلفی از ارتباطات، از ارتباط انگلی^۱ گرفته تا ارتباط مفید متقابل، را ایجاد می‌کنند. همانطور که در شکل ۱-۲ نشان داده شده است، این ارگانیسیم‌ها

¹ Parasitism

در سه سطح انتقال ژن، سیگنال و مواد مغذی تعامل می‌کنند [۶۷]. بنابراین انتخاب همراه مناسب باکتریایی برای تولید کارآمد و پایدار هیدروژن در کشت‌های همزیست کلامیدوموناس-باکتری چالش اصلی این گونه تحقیقات است.

در ادامه خلاصه‌ای از نتایج مطالعات انجام شده در زمینه‌ی تولید هیدروژن در کشت‌های همزیست کلامیدوموناس-باکتری براساس جنبه‌های متفاوتی مانند کاهش سطح اکسیژن برای فعالیت هیدروژناز، تامین الکترون از منابع نشاسته‌ی^۱ ذخیره شده در کلامیدوموناس و جذب دامنه‌ی وسیعتری از طول موج‌های نور خورشید ارائه می‌شود.



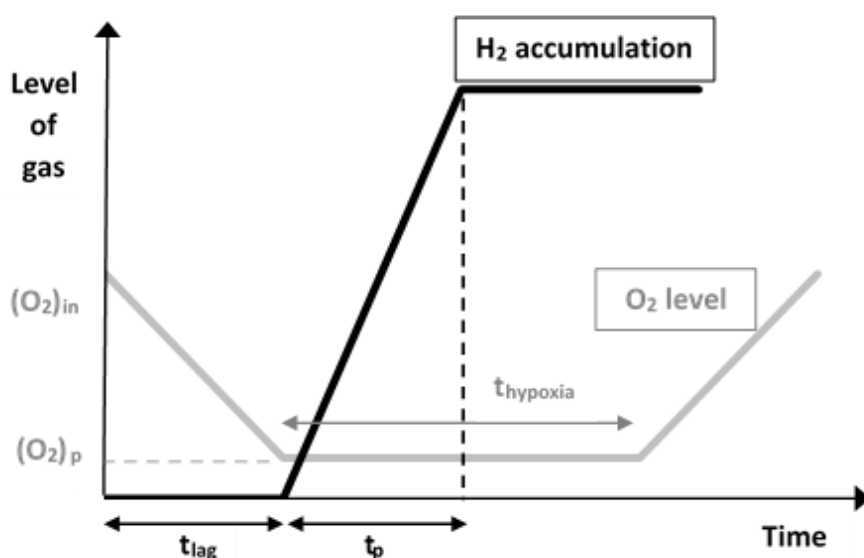
شکل ۲-۱. مسیرهای ارتباطی کلامیدوموناس و باکتری‌ها. ارتباط بین جلبک‌ها و باکتری‌ها در سه سطح انتقال ژن‌ها، سیگنال‌ها و متابولیت‌ها شناخته شده است [۶۷]. کلامیدوموناس می‌تواند اسیدفرمیک [۶۸] و اکسیژن [۵۸-۶۳]، [۶۹، ۷۰] مورد نیاز باکتری‌ها را تامین کرده و در مقابل از اسیداستیک، ترکیبات نیتروژنی تولید شده به وسیله‌ی تثبیت گاز نیتروژن [۶۱، ۷۱] و ویتامین B12 ترشح شده توسط باکتری‌ها [۶۴] استفاده کند. تمام این ارتباطات اثر مثبتی به طور مستقیم و غیر مستقیم بر تولید هیدروژن در کشت‌های همزیست کلامیدوموناس-باکتری دارند.

۲-۱-۱. کاهش سطح اکسیژن در کنسر سیوم کلامیدوموناس-باکتری

اکسیژن، محصول اجتناب ناپذیر فتوسنتز، بازدارنده‌ی قوی برای بیان ژن و فعالیت هیدروژنازها است [۳۳]. در خصوص تولید هیدروژن یکی از مزیت‌های آشکار همزیستی جلبک‌ها و باکتری‌ها، ظرفیت بالای باکتری‌ها

^۱ Starch

برای مصرف اکسیژن در محیط کشت است. شکل ۲-۲، تصویر سازه‌ای از ارتباط بین سطح اکسیژن و تولید هیدروژن را در کشت‌های تولید کننده‌ی هیدروژن نشان می‌دهد. افزایش نرخ مصرف اکسیژن توسط باکتری‌ها بر تولید هیدروژن با (۱) کاهش پایین‌ترین سطح اکسیژن قابل دستیابی در کشت‌ها ($(O_2)_{\text{hypoxia}}$) [۵۸, ۵۹]، (۲) کاهش زمان مورد نیاز برای رسیدن به شرایط کم‌اکسیژنی (t_{lag}) [۶۹]، (۳) افزایش مدت زمانی که کشت‌ها در شرایط کم‌اکسیژنی هستند (t_{hypoxia}) که به طور مستقیم کنترل کننده‌ی مدت زمان تولید هیدروژن است (t_p) [۶۰, ۶۱, ۶۲, ۶۳] و (۴) بالا بردن سطح تحمل کشت‌ها برای قرار گرفتن در شدت نورهای بالاتر بدون اینکه شرایط کم‌اکسیژنی خدشه‌دار شود، موثر است [۶۲].



شکل ۲-۲. شماتیک روند تغییرات سطح اکسیژن و تولید تجمعی هیدروژن در کشت‌های تولید کننده‌ی هیدروژن. سطح اولیه‌ی اکسیژن در کشت‌ها با $(O_2)_{\text{in}}$ نشان داده شده است. مدت زمان t_{lag} طول می‌کشد تا کشت‌ها به شرایط کم‌اکسیژنی ($(O_2)_{\text{hypoxia}}$) رسیده و تولید هیدروژن آغاز شود. با توجه به پارامترهایی مانند در دسترس بودن منابع الکترونی مورد نیاز و اثر فشار جزئی هیدروژن، تولید هیدروژن (t_p) ممکن است در تمام مدتی که کشت‌ها در شرایط کم‌اکسیژنی قرار دارند (t_{hypoxia})، ادامه یابد. با افزایش سطح اکسیژن، تولید هیدروژن در کشت‌ها متوقف می‌شود [۵۸, ۵۹, ۶۰, ۶۱, ۶۲, ۶۳].

۱-۱-۱-۲. اثر تنفس باکتریایی بر سطح اکسیژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-باکتری

مطالعات متعددی اثر همزیستی باکتری های هوازی و اختیاری با کلامیدوموناس را بر سطح اکسیژن و تولید هیدروژن در محیط کشت های غنی از سولفور (TAP) و عاری از سولفور (TAP-S) بررسی کرده اند (جدول ۱-۲). اکسیژن در هر دو فاز مایع تحت عنوان اکسیژن محلول و فاز گاز تحت عنوان سطح اکسیژن در فضای بالاسری^۱ می تواند اندازه گیری شود.

جدول ۱-۲. باکتری های هوازی و اختیاری استفاده شده برای همزیستی با کلامیدوموناس در آزمایش های تولید هیدروژن.

مرجع	نوع باکتری	نام باکتری
[69]	هوازی	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
[59]	هوازی	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
[59]	هوازی	<i>Microbacterium</i> sp.
[59, 63]	هوازی	<i>Pseudomonas</i> sp.
[60]	هوازی	<i>Rhodococcus</i> sp.
[60]	هوازی	<i>Leifsonia</i> sp.
[60]	هوازی	<i>Brevundimonas</i> sp.
[58, 61]	هوازی	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
[62]	هوازی	<i>Azotobacter chroococcum</i> 1.0233
[63]	هوازی	<i>Herbaspirillum</i> sp.
[63]	هوازی	<i>Comamonas</i> sp.
[63]	هوازی	<i>Phyllobacterium</i> sp.
[70]	هوازی	<i>Thuomonas intermedia</i> BCRC 17547
[60]	اختیاری	<i>Escherichia coli</i> K-12
[60]	اختیاری	<i>Escherichia coli</i> MC4100 ($\Delta hypF$)
[60]	اختیاری	<i>Ralstonia eutropha</i> H16
[60]	اختیاری	<i>Ralstonia eutropha</i> HF441 (SH, MBH, $\Delta hypF1F2$)
[64]	اختیاری	<i>Escherichia coli</i> ($\Delta hypF$)
[65]	اختیاری	<i>Escherichia coli</i> JW5433 (BW25113, $\Delta hypF:kan$)
[63]	اختیاری	<i>Escherichia coli</i> DH5 α
[63]	اختیاری	<i>Bacillus subtilis</i> WB800

¹ Headspace

با وجود اینکه غلظت اکسیژن محلول تعیین کننده فعالیت هیدروژناز است، سطح اکسیژن در فضای گاز بالاسری نیز به دلیل تعادل بین مقدار اکسیژن در فازهای گاز و مایع، شاخص مناسبی برای تخمین شرایط کشت‌ها به منظور تولید هیدروژن است. Lakatos و همکاران (۲۰۱۴)، هماهنگی خوبی بین اثر اکسیژن محلول و سطح اکسیژن در فضای گاز بالاسری بر تولید هیدروژن گزارش کرده‌اند [۶۰].

نتایج نشان می‌دهند که هیچ اکسیژن محلولی در کشت‌های همزیست کلامیدوموناس-باکتری در محیط کشت TAP تحت شدت نورهای متوسط تا بالا یافت نمی‌شود [۵۸-۶۰]. این پدیده نتیجه‌ی بیشتر بودن نرخ مصرف اکسیژن (مجموع نرخ مصرف اکسیژن توسط جلبک و باکتری) نسبت به تولید اکسیژن در دستگاه فتوسنتز جلبک در کشت‌های همزیست است.

نرخ مصرف اکسیژن در کشت‌های همزیست بین ۱۸ تا ۶۴٪ بسته به سوبه‌های جلبک و باکتری همراه نسبت به نرخ مصرف اکسیژن در کشت‌های کنترلی جلبک افزایش می‌یابد [۵۸، ۵۹]. به طور کلی در محیط کشت TAP، نرخ مصرف اکسیژن در کشت‌های همزیست همواره از نرخ مصرف اکسیژن در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس مستقل از روند نزولی [۷۰] و یا صعودی [۵۹] آن، بیشتر است.

همچنین نشان داده شده است که در محیط کشت TAP، همزیستی باکتری‌ها با کلامیدوموناس تولید هیدروژن را به دلیل کاهش سطح اکسیژن در فضای بالاسری ($(O_2)_{\text{hypoxia}}$) افزایش می‌دهد [۶۰].

در شرایط فقر سولفور (TAP-S)، همزیستی با باکتری‌ها نرخ تنفس اکسیژن را در روز اول از سه برابر (در معرض شدت نور بالا، ۲۰۰ PPFD) تا هشت برابر (در معرض شدت نور متوسط، ۶۰ PPFD) بیشتر می‌کند که با کاهش شدید (تقریباً نصف) در روز دوم همراه است [۵۸، ۵۹، ۶۲].

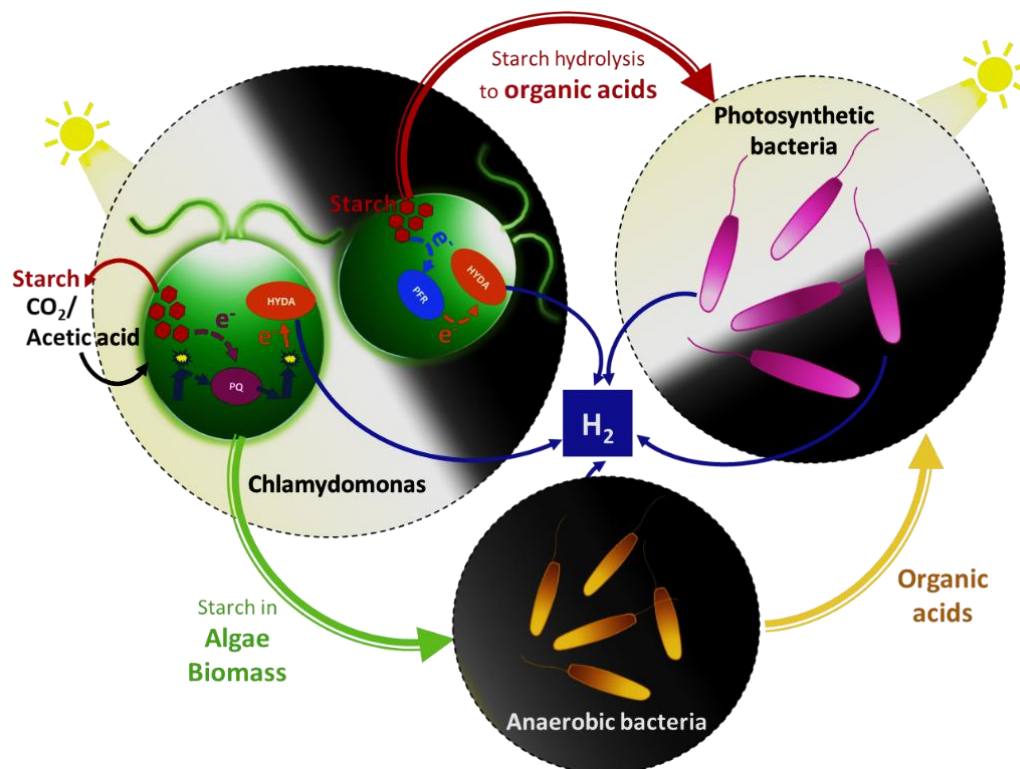
همچنین در شرایط فقر سولفور، سطح اکسیژن در فضای بالاسری کشت‌های همزیست کمتر از سطح اکسیژن در فضای بالاسری کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس است. پس از قرار دادن کشت‌ها در تاریکی به مدت ۲۴ ساعت، سطح اکسیژن در کشت‌های هم‌زمان و کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس به ترتیب به (۳/۵-۲/۵)٪ و (۳-۳-۷/۱۶)٪ می‌رسد [۶۱، ۶۲]. به طور مشابه پس از قرار دادن کشت‌ها در معرض تابش نور به مدت ۴ ساعت، سطح اکسیژن در کشت‌های هم‌زمان و کشت‌های کنترلی جلبک به ترتیب (۴-۵)٪ و (۱۵-۱۶)٪ می‌رسد [۶۰]. همچنین گزارشی نشان داده است که در TAP-S تنفس اکسیژن توسط باکتری‌ها می‌تواند تا جایی قوی باشد که بی‌اکسیژنی کامل (غلظت اکسیژن محلول=۰) در کشت‌های همزیست، در حالی که سطح اکسیژن در فضای بالاسری ۲۰٪ است، ایجاد شود [۶۳].

۲-۱-۱-۲. پارامترهای موثر بر غلظت اکسیژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری

غلظت نهایی اکسیژن در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری به وسیله‌ی مقادیر ورودی و خروجی اکسیژن به این کشت‌ها کنترل می‌شود. ورودی اکسیژن شامل مقادیر اولیه‌ی اکسیژن در فازهای مایع و گاز و اکسیژن تولید شده در دستگاه فتوسنتز جلبک است. در حالی که خروجی اکسیژن شامل تنفس اکسیژن به وسیله‌ی جلبک و باکتری هم‌زیست است. شدت نور به طور مستقیم بر فعالیت فتوسنتزی و در نتیجه مقدار نهایی اکسیژن در کشت‌های هم‌زمان جلبک-باکتری موثر است. از آنجا که سلول‌های جلبک توانایی تولید و مصرف اکسیژن را دارند، تعداد سلول‌های جلبک نیز بر غلظت اکسیژن در کشت‌های هم‌زیست اثر می‌گذارد. بنابراین در شرایط مشخص، مقداری بهینه برای تعداد سلول‌های جلبک که سبب بیشترین مقدار تولید هیدروژن در کشت‌ها می‌شوند، وجود دارد [۶۳]. همانطور که در شکل ۱-۲ مشاهده می‌شود غیر از اکسیژن فاکتورهای دیگری نیز وجود دارند که بر رابطه‌ی جلبک و باکتری موثر هستند. بنابراین بهترین نسبت بین سلول‌های جلبک به باکتری که منجر به ایجاد کنسرسیومی پایدار و سودمند از نظر زیست‌پذیری سلول‌ها در کنار یکدیگر و ایجاد شرایطی مناسب برای تولید بهینه‌ی هیدروژن شود، از بزرگترین دغدغه‌های تحقیقات در زمینه‌ی تولید هیدروژن در کنسرسیوم‌های کلامیدوموناس-باکتری است [۵۸، ۵۹، ۶۳، ۷۰]. با توجه به اثرات تداخلی پارامترهای شدت نور، تعداد سلول‌های جلبک و نسبت بین سلول‌های جلبک به باکتری، پیشنهاد می‌شود این پارامترها به صورت هم‌زمان مطالعه و بهینه شوند [۶۲].

۲-۱-۲. افزایش بازده تبدیل نشاسته به هیدروژن

کلامیدوموناس می‌تواند مقادیر زیادی از نشاسته را در تاریکی و روشنایی به ویژه زمانی که تحت استرس ناشی از فقر مواد مغذی مورد نیازش باشد، ذخیره کند [۷۲]. همانطور که در شکل ۲-۳ نشان داده شده است، ذخایر نشاسته در کلامیدوموناس می‌تواند به تولید هیدروژن در این جلبک و یا تولید هیدروژن در باکتری‌های همراه آن در کنسرسیوم‌های کلامیدوموناس-باکتری از چهار مسیر مختلف مرتبط باشد. در ادامه مسیرهای ارتباطی توضیح داده می‌شوند.



شکل ۲-۳. متابولیسم نشاسته-هیدروژن در کنسرسیوم های کلامیدوموناس-باکتری.

۱-۲-۱-۲. باکتری های بی هوازی نشاسته‌ی موجود در زیست توده‌ی کلامیدوموناس را مصرف کرده و به همراه اسیدهای آلی کوچک هیدروژن تولید می کنند.

بعضی از باکتری های بی هوازی مانند کلستریدیوم بوتیریکوم از تخمیر نشاسته‌ی موجود در زیست توده‌ی کلامیدوموناس ترکیبات آلی و هیدروژن تولید می کنند [۷۳]. تولید هم زمان هیدروژن، فرمات، استات، پروپیونات و بوتیرات در کلستریدیوم بوتیریکوم NCIB 9576 از تخمیر بی هوازی کلامیدوموناس UTEX 90 گزارش شده است [۷۳].

۲-۲-۱-۲. باکتری های بی هوازی نشاسته‌ی موجود در زیست توده‌ی کلامیدوموناس را مصرف کرده و اسیدهای آلی که توسط باکتری های فتوسنتز کننده‌ی بی هوازی به هیدروژن تبدیل می شوند را تولید می کنند.

نشاسته یکی از مهم ترین ترکیباتی است که در طول مدت فتوسنتز در سلول های کلامیدوموناس ذخیره می شود. همانطور که در بخش قبل نیز بیان شد، باکتری های بی هوازی یا بی هوازی اختیاری از این منبع ذخیره شده در زیست توده استفاده می کنند و اسیدهای آلی تولید می کنند. در ادامه اسیدهای آلی الکترون های مورد نیاز برای تولید هیدروژن را به آنزیم های مربوطه در باکتری های بنفش فتوسنتزی اهدا می کنند (شکل ۲-۳). برای مثال، لاکتوباسیلوس آمیلووروس نشاسته‌ی موجود در زیست توده‌ی جلبک را به اسیدلاکتیک هیدرولیز می کند

[۷۴، ۷۵]. سپس باکتری‌های رودوباکتر اسفائروئیدز RV، رودوباکترکپسولاتا ATCC 11166، رودواسپیریلوم روبروم ATCC 11170 و رودوبیوم مارینوم ATCC 35675 [۷۴] و رودوبیوم مارینوم A-501 [۷۵]، اسیدلاکتیک مصرف کرده و هیدروژن تولید می‌کنند. در تحقیقی دیگر ویبریو فلاویالیس نشاسته‌ی ذخیره شده در زیست‌توده‌ی کلامیدوموناس را به اسیداستیک و اتانول تبدیل کرده و در ادامه رودوبیوم مارینوم در شرایط غلظت بالای نمکی هیدروژن تولید می‌کند [۷۶]. به طور مشابه رودوباکتر اسفائروئیدز KD 131 با مصرف فرمات، استات و بوتیرات حاصل شده از تخمیر بی‌هوازی نشاسته در کلاستریدیوم بوتیریکوم NCIB 9576، هیدروژن تولید می‌کند [۷۳]. بازده تولید هیدروژن در بعضی از این تحقیقات در جدول ۲-۲ نشان داده شده است.

جدول ۲-۲. تولید هیدروژن در کنسرسيوم‌های کلامیدوموناس-باکتری بی‌هوازی-باکتری فتوسنتزی

مرجع	بازده (mol H ₂ /mol starch)	باکتری فتوسنتزی (تولید هیدروژن)	باکتری بی‌هوازی (تجزیه‌ی نشاسته)	سویه‌ی جلبک
[74]	۸	<i>R. marinum</i> ATCC 35675	<i>L. amylovorus</i>	<i>C. reinhardtii</i> (IAM C-238)
[76]	۶/۲	<i>R. marinum</i> A-501	<i>V. fluvialis</i> T-522	<i>C. reinhardtii</i> (IAM C-238)
[73]	۵/۷۲	<i>R. sphaeroides</i> KD131	<i>C. butyricum</i> NCIB 9576	<i>C. reinhardtii</i> UTEX 90

بیشینه بازده تئوری mol H₂/mol starch ۱۲ است [۷۵].

۲-۱-۲-۳. کلامیدوموناس ذخایر نشاسته را به اسیدهای آلی که تامین کننده الکترون‌های مورد نیاز برای تولید هیدروژن در باکتری‌های فتوسنتزکننده بی‌هوازی هستند، می‌شکند.

کلامیدوموناس تبدیل کننده‌ی سریع ذخایر نشاسته به محصولات تخمیری است [۷۷]. این جلبک در شرایط بی‌هوازی می‌تواند ذخایر داخلی نشاسته را به ترکیبات آلی و هیدروژن از طریق مسیر متابولیکی Embden-Meyerhof تجزیه کند [۷۸]. دو مدل روشنایی/تاریکی تولید هیدروژن که در آن‌ها کلامیدوموناس سوبستراهای آلی برای اهدای الکترون به آنزیم‌های تولید کننده‌ی هیدروژن در باکتری‌های فتوسنتزکننده بی‌هوازی را از تجزیه‌ی نشاسته تولید می‌کند (شکل ۲-۳) گزارش شده است. در مدل اول کلامیدوموناس C-238 در روشنایی رشد کرده و جلبک و رودواسپیریلوم روبروم NCIB 8255، هر دو در تاریکی هیدروژن تولید می‌کنند. در این تحقیق در شرایط تاریک و بی‌هوازی، کلامیدوموناس علاوه بر هیدروژن، دی‌اکسیدکربن، استات، اتانول، فرمات و گلیسرول تولید می‌کند. در همین زمان، رودواسپیریلوم از فرمات الکترون دریافت کرده و از طریق مسیر متابولیکی Formate Hydrogen-lyase، هیدروژن تولید می‌کند [۶۸]. در حالی که در تحقیق دیگر، کلامیدوموناس

MGA161 در تاریکی و رودوسودوموناس W-1S در روشنایی هیدروژن تولید می کنند. رودوسودوموناس الکترون های لازم برای تولید هیدروژن را از اسیداستیک و اتانول به دست آمده در فرایند تخمیر در کلامیدوموناس، دریافت می کنند [۷۹]. جدول ۲-۳، بازده تولید هیدروژن را در این تحقیقات نشان می دهد.

جدول ۲-۳. تولید هیدروژن در کنسرسیوم های کلامیدوموناس-باکتری فتوسنتزی

مرجع	بازده تولید هیدروژن (mol H ₂ /mol starch)		بakteri	جلبک
	کنسرسیوم جلبک-باکتری			
	تاریکی	روشنایی پیوسته		
[68]	۰/۵۱	-	<i>R. rubrum</i> NCIB 8255	<i>C. reinhardtii</i> C-238
[79]	۲	۱۰/۵	<i>Rhodospseudomonas</i> sp. strain W-1S	Marine <i>Chlamydomonas</i> sp. strain MGA161

۲-۱-۲-۴. ذخایر نشاسته الکترون های مورد نیاز تولید هیدروژن در کلامیدوموناس از مسیر متابولیسمی مستقل از PSII را تامین می کند.

در کلامیدوموناس الکترون های مورد نیاز تولید هیدروژن از مسیر متابولیسمی مستقل از PSII، به وسیله ی NAD(P)H تامین می شوند [۲۴-۲۶]، [۲۸]. تجزیه گلیکولیتیکی نشاسته، منبع اصلی تامین الکترون برای این مسیر متابولیسمی است [۸۰]. همزیستی با برادی ریزوبیوم جاپونیوم [۶۱]، ازوتوباکتر کرکوکوم [۶۲]، سویه ای از سودوموناس [۶۳] و توموناس اینترمدیا BCRC 17547 [۷۰] سبب افزایش تجمع نشاسته در کلامیدوموناس می شود. در نتیجه افزایش تولید نشاسته در کشت های همزیست سبب افزایش تولید هیدروژن در این کشت ها نسبت به کشت های کنترلی جلبک می شود (جدول ۲-۴).

۲-۱-۳. توسعه ی محدوده ی جذب نور خورشید برای تولید هیدروژن در کنسرسیوم کلامیدوموناس-باکتری

یکی از مزایای استفاده از کنسرسیوم جلبک-باکتری، امکان افزایش دامنه ی تبدیل طیف نوری به هیدروژن است. همانطور که در فصل اول بیان شد، جلبک های سبز و جلبک های سبز-آبی می توانند محدوده ی طول موج های مرئی نور خورشید (۴۰۰-۷۰۰ nm) را جذب کرده و هیدروژن تولید کنند. در حالی که، باکتری های فتوسنتز کننده ی بی هوازی محدوده ی نزدیک امواج فرورسرخ (۷۰۰-۹۵۰ nm) را جذب کرده و هیدروژن تولید می کنند. بنابراین یک سیستم تلفیقی (جلبک-باکتری) می تواند محدوده ی وسیعتری از تابش خورشید را بدون نیاز به فتوبیوراکتورهای جداگانه برای هر ارگانیزم، مصرف کند. بر اساس این ایده Melis و Melnicki (۲۰۰۶)

معتقدند که از تلفیق جلبک‌های سبز و باکتری‌های فتوسنتزکننده بی‌هوازی می‌توان فرایندی کارآمد و با صرفه‌ی اقتصادی که توانایی تولید پایدار هیدروژن را داشته باشد طراحی کرد [۶۶]. در جدول ۲-۴ خلاصه‌ای از نتایج به دست آمده از بررسی تولید هیدروژن در کنسرسیوم‌های کلامیدوموناس-باکتری گردآوری شده است.

با توجه به اطلاعات به دست آمده از مرور مقالات و مراجع علمی ریزوبیوم و سودوموناس از باکتری‌های غالب در فضای فیکوسفر^۱ کلامیدوموناس هستند [۶۴، ۹۱]. همچنین در تحقیقات Lakatos و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده شد که هم‌زیستی ای‌کلای با کلامیدوموناس در محیط کشت غنی از مواد مغذی (TAP) تولید هیدروژن را بهبود می‌بخشد [۶۰]. تولید هیدروژن به مقدار قابل توجهی در شرایط فقر مواد مغذی گزارش شده است. از سوی دیگر نشان داده شده است که فقر مواد مغذی، زیست‌پذیری کلامیدوموناس را پس از مدتی دچار مشکل می‌کند [۴۸]. بنابراین در این تحقیق اثر هم‌زیستی سویه‌های ریزوبیوم، سودوموناس و ای‌کلای که توانایی مصرف اکسیژن را دارند بر رشد و تولید هیدروژن کلامیدوموناس در محیط کشت‌های غنی از مواد مغذی مطالعه و بررسی شده است. شدت نور اثر مستقیم بر رشد و فعالیت کلامیدوموناس دارد. همچنین مواد مغذی موجود در محیط کشت تعیین‌کننده‌ی رشد و فعالیت جلبک و باکتری هستند. بنابراین شدت نور و منبع کربن موجود در محیط کشت به عنوان پارامترهای اصلی مورد مطالعه در آزمایش‌های تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست، در نظر گرفته شده‌اند.

^۱ Phycosphere

جدول ۲-۴. تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-باکتری. مقایسه ی بازده، نرخ و مدت زمان تولید هیدروژن در کشت های همزیست و کشت های کنترلی کلامیدوموناس.

مرجع	مدت زمان تولید H ₂ در کشت همزیست	مدت زمان تولید H ₂ در کشت خالص جلبک	تقویت نرخ تولید H ₂ (×times)	تقویت بازده تولید H ₂ (×times)	تولید H ₂ در کشت خالص جلبک	محیط کشت	شدت نور (μmol/m ² ·s)	باکتری	جلبک
[68]	اشاره نشده	اشاره نشده	۴	۵	۰/۶ (μmol/mg dry wt)	Modified Bristol Medium (MBM)	۱۲ ساعت روشنائی ۱۲/(۲۰۰ W/m ²) ساعت تاریکی	<i>Rhodospirillum rubrum</i> NCIB 8255	<i>C. reinhardtii</i> C-238
[69]	۷۰ ساعت	۵۱ ساعت	۲/۷	۱/۷۷	۱۱۱ (ml H ₂ /L culture)	TAP-S	۸۰ فلورسنس سفید سرد	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>C. reinhardtii</i> cc125
[58]	۱۴ روز	تقریباً ۶ روز	اشاره نشده	~ ۱۵	۲۰/۰۲ (μmol/۴۰ ml culture)	TAP-S	۶۰	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	lba transgenic <i>C. reinhardtii</i> (based on strain 849)
[58]	۶ روز	۲ روز	اشاره نشده	۵/۵	۱۵/۱ (μmol/۴۰ ml culture)	TAP-S	۶۰	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>C. reinhardtii</i> cc849
[59]	۶ روز	۴ روز	اشاره نشده	۴	۱۵/۱۱ (μmol/۴۰ ml culture)	TAP-S	۶۰	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>C. reinhardtii</i> cc849
[59]	۶ روز	۴ روز	اشاره نشده	۲/۹	۱۵/۱۱ (μmol/۴۰ ml culture)	TAP-S	۶۰	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>C. reinhardtii</i> cc849
[59]	۸ روز	۴ روز	اشاره نشده	۴/۱	۱۵/۱۱ (μmol/۴۰ ml culture)	TAP-S	۶۰	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>C. reinhardtii</i> cc849
[60]	۳ روز	۲ روز	اشاره نشده	~ ۱۳/۶۳	۱۹۳/۵ ± ۶۶/۸۱ (μl/L culture)	TAP-S	۵۰	<i>Escherichia coli</i> (<i>ΔhypF</i>)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549

مرجع	مدت زمان تولید H ₂ در کشت هم‌زیست	مدت زمان تولید H ₂ در کشت خالص جلبک	تقویت نرخ تولید H ₂ (×times)	تقویت بازده تولید H ₂ (×times)	تولید H ₂ در کشت خالص جلبک	محیط کشت	شدت نور (μmol/m ² .s)	باکتری	جلبک
[60]	۷ روز	۷ روز	اشاره نشده	~ ۱/۸۹	۲۵۰.۲۸/۱ ± ۳۹۴۳/۴۷ (μL culture)	TAP-S	۵۰	<i>Escherichia coli</i> (ΔhypF)	<i>C. reinhardtii</i> cc124
[60]	۱ روز	۰	*۴۹/۸۳ ± ۰/۱۸ μL/h	*۱۱۹۶/۰۶ ± ۴/۴۲ (μL culture)	۰	TAP	۵۰	<i>Escherichia coli</i> (ΔhypF)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549
[60]	۱ روز	۰	*۲۴۱/۶۸ ± ۲/۷۳ μL/h	*۵۸۰۰/۵۴ ± ۶۵/۷۳ (μL culture)	۰	TAP	۵۰	<i>Escherichia coli</i> (ΔhypF)	<i>C. reinhardtii</i> cc124
[61]	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	۲/۸	۹۹ (μmol/mg chl)	TAP-S	۳۰	<i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum</i>	Transgenic alga <i>hemHc-lbac</i>
[61]	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	۱۴	۲۰ (μmol/mg chl)	TAP-S	۲۰۰	<i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum</i>	<i>C. reinhardtii</i> cc124
[61]	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	۳/۶	۷۰ (μmol/mg chl)	TAP-S	۲۰۰	<i>Bradyrhizobium</i> <i>japonicum</i>	<i>C. reinhardtii</i> cc503
[62]	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	۳/۸	۱۹ (μmol/mg chl)	TAP-S	۳۰	<i>Azotobacter</i> <i>chroococcum</i>	<i>C. reinhardtii</i> cc849
[62]	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	۳/۶	۱۹ (μmol/mg chl)	TAP-S	۱۰۰	<i>Azotobacter</i> <i>chroococcum</i>	<i>C. reinhardtii</i> cc849
[62]	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	۵/۳	۲۸ (μmol/mg chl)	TAP-S	۲۰۰	<i>Azotobacter</i> <i>chroococcum</i>	<i>C. reinhardtii</i> cc849
[70]	۱۷ روز	۹ روز	اشاره نشده	۲/۸	۴۳/۸ μmol/mg chl	TAP-S	۲۴ ساعت تاریکی / ۱۴ ساعت روشنایی	<i>Thiomonas</i> <i>intermedia</i> BCRC17547	<i>C. reinhardtii</i> cc-503

مرجع	مدت زمان تولید H ₂ در کشت همزیست	مدت زمان تولید H ₂ در کشت خالص جلبک	تقویت نرخ تولید H ₂ (×times)	تقویت بازده تولید H ₂ (×times)	تولید H ₂ در کشت خالص جلبک	محیط کشت	شدت نور (μmol/m ² .s)	باکتری	جلبک
							(۲۰۰)/۱۰ ساعت تاریکی		
[70]	۱۷ روز	۹ روز	اشاره نشده	۵/۹	۴۳/۲۲ μmol/mg chl	TAP-S + 1 ml Na ₂ S ₂ O ₃ (3g/l)	۱۴ ساعت روشنایی (۲۰۰)/۱۰ ساعت تاریکی	<i>Thuomonas intermedia</i> BCRC17547	<i>C. reinhardtii</i> cc-503
[63]	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	~ ۱۲	اشاره نشده	TAP-S	۵۰	<i>Pseudomonas</i> strain D	<i>C. reinhardtii</i> FACH-265
[64]	۲۰ ساعت	۰	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	TAP	۵۰	Bacteria flora	<i>Chlamydomonas</i> sp. & <i>Scenedesmus</i> sp.
[64]	۱۲ ساعت	۰	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	TAP	۵۰	<i>Escherichia coli</i> (ΔhypF)	<i>Chlamydomonas</i> sp. & <i>Scenedesmus</i> sp.
[64]	۷۶ ساعت	-	اشاره نشده	اشاره نشده	اشاره نشده	TAP-S	۵۰	-	<i>Chlamydomonas</i> sp. & <i>Scenedesmus</i> sp.

* مقدار واقعی

فصل سوم:

مواد و روش ها

۳-۱. مواد بیولوژیکی

۳-۱-۱. سویه های ریز جلبک و باکتری ها

در این تحقیق از یک سویه ی جلبک و از چندین سویه ی متفاوت باکتری استفاده شده است. نام و مشخصات سویه های به کار برده شده در جدول ۳-۱ ارائه شده اند. تمام سویه های معرفی شده در این جدول خالص^۱ هستند.

جدول ۳-۱. ارگانیسم های استفاده شده در این تحقیق

منبع	نام به کار برده شده در متن	سویه	گونه	میکروارگانیسم
[۸۱]	کلامیدوموناس	704	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	ریز جلبک
اهدا شده توسط دکتر انخل جاماز	سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴	12264	<i>Pseudomonas putida</i>	باکتری
اهدا شده توسط دکتر انخل جاماز	سودوموناس پوتیدا/ ۲۹۱	291	<i>Pseudomonas putida</i>	باکتری
دانشکده علوم، گروه بیوتکنولوژی دانشگاه تهران	سودوموناس اشتوتسری	A1501	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	باکتری
بانک میکروارگانیسم ^۲ DSMZ	ریزوبیوم اتلی	CFN42	<i>Rhizobium etli</i>	باکتری
بانک میکروارگانیسم DSMZ	ای کلای K12	K12 – MG1655	<i>Escherichia coli</i>	باکتری
[۸۲]	ای کلای ($\Delta hypF$)	MC4100 ($\Delta hypF$)	<i>Escherichia coli</i>	باکتری
اهدا شده توسط دکتر ویکتوریا کالاتراوا	متیلوباکتریوم	CBMB20	<i>Methylobacterium oryzae</i>	باکتری
این تحقیق	استنوتروفوموناس	-	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	باکتری
این تحقیق	باسیلوس	-	<i>Bacillus</i> sp.	باکتری
این تحقیق	میکروباکتریوم	-	<i>Microbacterium</i> sp.	باکتری

¹ Axenic

² German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – Leibniz Institute

۲-۱-۳. معرفی میکروارگانیسم ها

۱-۲-۱-۳. کلامیدوموناس رینهاردتی

کلامیدوموناس رینهاردتی، ریزجلبک تک سلولی است که در بسیاری از تحقیقات به عنوان ارگانیسم مدل استفاده می شود. در این تحقیق از سویه ی ۷۰۴ (cw15 arg7⁺ Nia1:Ars mt⁺) که فاقد دیواره ی سلولی است استفاده شده است [۸۱]. این جلبک توانایی رشد اتوتروفی در روشنایی با تثبیت دی اکسید کربن و رشد هتروتروفی تنها با مصرف اسیداستیک را دارد.

۲-۲-۱-۳. سودوموناس پوتیدا

سودوموناس پوتیدا باکتری میله ای شکل و گرم منفی است که در آب و خاک زندگی می کند. در این تحقیق از دو سویه ی ۱۲۲۶۴ و ۲۹۱ استفاده شده است. این باکتری ها از گروه باکتری های هوازی هستند.

۳-۲-۱-۳. سودوموناس اشتوتسری

سودوموناس اشتوتسری باکتری میله ای شکل و گرم منفی است که در خاک زندگی می کند. در این تحقیق از سویه ی A1501 استفاده شده است. این باکتری از گروه باکتری های اختیاری است که توانایی رشد در هر دو شرایط هوازی و بی هوازی را دارند.

۴-۲-۱-۳. ریزوبیوم اتلی

ریزوبیوم اتلی باکتری میله ای شکل و گرم منفی است که در خاک زندگی می کند. این باکتری توانایی تثبیت نیتروژن را دارد. در این تحقیق از سویه ی CFN42 استفاده شده است. این باکتری از گروه باکتری های هوازی است.

۵-۲-۱-۳. اشرشیا کلای

اشرشیا کلای باکتری میله ای شکل و گرم منفی است که عموماً در روده ی ارگانیسم های خون گرم زندگی می کند. در این تحقیق از دو سویه ی وحشی K12-MG1655 و سویه ی جهش یافته ی MC4100 (*AhypF*) که فاقد آنزیم هیدروژناز است، استفاده شده است. این باکتری ها از گروه باکتری های اختیاری هستند که توانایی رشد در هر دو شرایط هوازی و بی هوازی را دارند.

۳-۱-۲-۶. متیلوباکتریوم اوریزا

متیلوباکتریوم اوریزا باکتری میله‌ای شکل و گرم منفی است که همراه با گیاه برنج زندگی می‌کند. همزیستی با این باکتری رشد گیاهان را تقویت می‌کند. در این تحقیق از سویه‌ی CBMB20 استفاده شده است. این باکتری از گروه باکتری‌های هوازی است. در کشت‌های مایع این باکتری‌ها به هم چسبیده و تولید لخته می‌کنند.

۳-۱-۲-۷. استنوتروفوموناس

استنوتروفوموناس باکتری میله‌ای شکل و گرم منفی است که در خاک یا همراه با گیاهان زندگی می‌کند. این باکتری از کشت ریزوبیوم لگومینوساروم در این تحقیق جدا شده است. این باکتری از گروه باکتری‌های هوازی است. در کشت‌های مایع این باکتری‌ها به هم چسبیده و تولید لخته می‌کنند.

۳-۱-۲-۸. باسیلوس

باسیلوس باکتری میله‌ای شکل، گرم مثبت و تولید کننده‌ی اسپور است که در خاک یا غذا زندگی می‌کند. این باکتری از کشت ریزوبیوم لگومینوساروم در این تحقیق جدا شده است. این باکتری از گروه باکتری‌های اختیاری است که توانایی رشد در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی را دارند.

۳-۱-۲-۹. میکروباکتریوم

میکروباکتریوم باکتری میله‌ای شکل و گرم مثبت است که همراه با چمن زندگی می‌کند. این باکتری از کشت ریزوبیوم لگومینوساروم در این تحقیق جدا شده است. این باکتری از گروه باکتری‌های هوازی است.

۳-۲. تکنیک‌های میکروبیولوژی

۳-۲-۱. محیط کشت‌ها و شرایط کشت

۳-۲-۱-۱. محلول‌های استوک^۱ برای تهیه‌ی محیط کشت‌ها:

محیط کشت‌های مختلف براساس دستورالعمل‌های بیان شده توسط Harris (۲۰۰۱) با استفاده از محلول‌های استوک زیر تهیه شده‌اند [۸۳].

مواد موجود در یک لیتر محلول‌های استوک به شرح زیر هستند:

^۱ Stock solutions

- **Tris solution:** ۲۴۲ g Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane, ((HOCH₂)₃CNH₂)
- **A solution:** ۵ g CaCl₂ · ۲H₂O, ۱۰ g MgSO₄ · ۷H₂O, ۴۰ g NH₄Cl
- **A – N solution:** The same as A solution, but without NH₄Cl
- **B solution:** ۱۱۵ g K₂HPO₄, ۴۶ g KH₂PO₄
- **Trace Elements solution:** ۵۰ g EDTA (acid-free), ۱۱/۴ g H₃BO₃, ۲۲ g ZnSO₄ · ۷H₂O, ۵/۱ g MnCl₂ · ۴H₂O, ۵ g FeSO₄ · ۷H₂O, ۱/۶ g CoCl₂ · ۶H₂O, ۱/۶ g CuSO₄ · ۵H₂O, ۰/۲۱۴ g MoO₄Na₂ · ۲H₂O

• پروتکل تهیهی محلول Trace element

ابتدا EDTA در ۲۵۰ ml آب مقطر (dH₂O) با ۲۱ g از KOH حل می شود. به طور مجزا، نمک ها به ترتیب ذکر شده در ۲۰۰ ml آب مقطر حل می شوند. سپس دو محلول را به هم آمیخته، دمای آن را تا ۸۰-۹۰°C بالا برده و pH را با استفاده از KOH به ۶/۸ می رسانیم. سپس با استفاده از آب مقطر حجم محلول را به ۵۰۰ ml رسانده، به شیشه‌ی کهربایی^۱ منتقل کرده و به مدت حداقل دو روز در محیط تاریک نگهداری می کنیم.

۲-۱-۲-۳. محیط کشت های کلامیدوموناس

۱-۲-۱-۲-۳. محیط کشت (TAP) – Acetate – Phosphate (TAP) – Tris

محیط کشت (TAP) استاندارد دارای آمونیوم شامل مواد زیر در یک لیتر است:

- Tris solution: ۱۰ ml
- A solution: ۱۰ ml
- B solution: ۱ ml
- Trace Elements solution: ۱ ml
- Acetic acid (glacial): ۰/۹۵ ml

این محیط کشت در اتوکلاو استریل شده و برای پیش کشت^۲ کلامیدوموناس در شرایط میکسوتروفی^۳ استفاده می شود. محلول تریس در این محیط کشت نقش بافر را ایفا می کند.

محیط کشت TAP عاری از نیتروژن (TAP-N) مشابه محیط کشت TAP تهیه می شود. با این تفاوت که در تهیهی آن به جای محلول A، از محلول A-N استفاده می شود.

¹ Amber glass

² Pre-Cultures

³ Mixotrophic Conditions

۲-۲-۱-۲-۳. محیط کشت کمینه (MM) Minimal medium

محیط کشت کمینه استاندارد دارای آمونیوم، شامل موارد زیر در یک لیتر است:

- A solution: ۱۰ ml
- B solution: ۱۰ ml
- Trace Elements solution: ۱ ml

این محیط کشت در اتوکلاو استریل شده و در آزمایش ها استفاده می شود. محلول B در این محیط کشت نقش بافر را ایفا می کند.

محیط کشت کمینه عاری از نیتروژن (MM-N) مشابه محیط کشت کمینه تهیه می شود. با این تفاوت که به جای محلول A، از محلول A-N استفاده می شود.

در آزمایش های مورد نظر، محلول های فیلتر شده (استریل شده) از آمینواسیدها، تریپتون^۱ یا عصاره ی مخمر^۲ به عنوان منبع نیتروژن به آن اضافه می شوند.

۳-۱-۲-۳. محیط کشت های باکتری ها

۱-۳-۱-۲-۳. محیط کشت LB

محیط کشت LB (Lysogeny Broth) برای رشد سویه های سودوموناس و ای کلای استفاده شده است. مواد موجود در یک لیتر از این محیط کشت به شرح زیر است:

- Bacto tryptone: ۱۰ g
- Yeast Extract: ۵ g
- NaCl: ۱۰ g

برای کشت جامد، ۲٪ (w/v) آگار استفاده می شود.

۲-۳-۱-۲-۳. محیط کشت متیلوباکتریوم (MeM)

محیط کشت MeM برای رشد متیلوباکتریوم استفاده شده است. مواد موجود در یک لیتر از این محیط کشت به شرح زیر است:

¹ Tryptone

² Yeast Extract

- A-N solution: ۱۰ ml
- B solution: ۱۰ ml
- Trace Elements solution: ۱ ml
- KNO₃: ۱ g

پس از استریل کردن این محلول در اتوکلاو صبر می کنیم تا دمای آن به دمای اتاق برسد. سپس به آن ۰/۵٪ متانول استریل (با خلوص ۹۹/۹٪) اضافه می شود. همچنین برای رشد سریع تر سلول های متیلوباکتریوم در پیش کشت، ۲/۵ g پپتون^۱ یا تریپتون به محیط کشت افزوده می شود. برای کشت جامد، ۱/۶٪ (w/v) آگار استفاده شده است.

۳-۳-۱-۲-۳. محیط کشت YEM

محیط کشت YEM (Yeast Extract Mannitol) برای رشد ریزوبیوم اتلی و جامعه ی باکتریایی شامل سویه های استنوتروفوموناس، باسیلوس و میکروباکتریوم استفاده شده است. مواد موجود در یک لیتر از این محیط کشت به شرح زیر است:

- K₂HPO₄: ۰/۴۰۰۶ g
- KH₂PO₄: ۰/۰۹۹ g
- MgSO₄ · ۷H₂O: ۰/۱۹۹۶ g
- NaCl: ۰/۰۹۹۲ g
- CaCl₂ · ۲H₂O: ۰/۰۵۲۸ g
- Yeast Extract: ۰/۸ g
- D-Mannitol: ۱۰/۰۱۹ g

برای کشت جامد (w/v) ۱/۶٪ آگار استفاده می شود.

۴-۳-۱-۲-۳. محیط کشت TYM

محیط کشت TYM (TAP Yeast Extract Mannitol) که بر پایه ی محیط کشت TAP است برای رشد سویه های استنوتروفوموناس، باسیلوس و میکروباکتریوم استفاده شده است. مواد موجود در یک لیتر از این محیط کشت به شرح زیر است:

¹ Peptone

- Tris solution: ۱۰ ml
- A solution: ۱۰ ml
- B solution: ۱ ml
- Trace Elements solution: ۱ ml
- Acetic acid (glacial): ۰/۹۵ ml
- Yeast Extract: ۰/۸ g
- D-Mannitol: ۱۰/۰۱۹ g

برای کشت جامد (w/v) ۱/۶٪ آگار استفاده می‌شود.

۳-۲-۱-۴. محیط کشت‌های هم‌زیست

پیش از شروع آزمایش‌های کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری، کلامیدوموناس به مدت سه روز در محیط کشت TAP تحت شدت نور ۹۰ - ۷۰ PPFD، اختلاط ۱۳۰ rpm و در دمای ۲۴°C کشت داده می‌شود (پیش‌کشت). هر یک از سویه‌های باکتری در محیط کشت مناسب خود با دور اختلاط ۱۳۰ rpm در دمای ۲۸°C کشت داده می‌شوند (پیش‌کشت). سویه‌های سودوموناس و ای‌کلای در محیط کشت LB و استنوتروفوموناس، باسیلوس و میکروباکتریوم در محیط کشت TYM با کنترل مقدار اولیه‌ی تلقیح، پس از یک روز رشد می‌کنند. ریزوبیوم اتلی در محیط کشت YEM پس از دو روز و متیلوباکتریوم در محیط کشت MeM پس از سه روز رشد می‌کنند. پس از آن که سلول‌ها در فاز لگاریتمی رشد قرار گرفتند سلول‌های جلبک و باکتری‌ها بسته به محیط کشت مورد استفاده در آزمایش‌های کشت هم‌زیست، بین یک تا سه بار با محیط کشت جدید شسته شده و در همان محیط کشت برای شروع آزمایش، مجدد پخش می‌شوند. محیط کشت‌های زیر برای آزمایش‌های کشت‌های هم‌زیست استفاده شده است:

- TAP
- TM: TAP + (۵ یا ۱۰) g/l D-Mannitol
- TY: TAP + (۰/۴ یا ۰/۸) g/l Yeast Extract
- TYM: TAP + (۵ یا ۱۰) g/l D-Mannitol + (۰/۴ یا ۰/۸) g/l Yeast Extract
- TTM: TAP + ۵ g/l D-Mannitol + (۲/۵ یا ۰/۲۵) g/l Tryptone

از این پس، محیط کشت‌های دارای غلظت‌های بالا و پایین مواد به ترتیب با اندیس H و L در بالای نام محیط کشت‌ها مشخص می‌شود.

۳-۲-۳. آزمایش های رشد

۳-۲-۳-۱. رشد در محیط کشت مایع

۳-۲-۳-۱-۱. رشد هوازی

رشد سلول های کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در کشت های انفرادی خالص و کشت های همزیست در محیط کشت TYM^L (عصاره ی مخمر ۰/۴ g/l + مانیتول ۵ g/l + TAP) در معرض شدت نور PPF ۹۰، که شدت نور مناسبی برای رشد کلامیدوموناس است و در دمای ۲۵°C بررسی شده است. مراحل انجام آزمایش به شرح زیر است:

• آماده سازی پیش کشت:

سلول های کلامیدوموناس ابتدا در کشت جامد به مدت دو روز سپس در پیش کشت مایع به مدت دو روز و در نهایت در کشت مایع به مدت سه روز کشت داده می شوند. در روز سوم مرحله ی پایانی، سلول ها به اواسط فاز لگاریتمی رشد می رسند.

سلول های میکروباکتریوم به طور مستقیم از آلیکوت^۱ نگهداری شده در دمای ۸۰°C- در محیط کشت مایع TYM^H تا رسیدن به اواسط فاز لگاریتمی (پس از یک روز) کشت داده می شوند.

• شست و شوی سلول ها:

سلول های کلامیدوموناس به وسیله ی سانتریفیوژ (g × ۳/۰۰۰ به مدت دو دقیقه) به صورت پلت^۲ ته نشین شده و مجدد در محیط کشت جدید TYM^L پخش می شوند. سلول های میکروباکتریوم با استفاده از سانتریفیوژ (g × ۶/۰۰۰ به مدت پنج دقیقه) در محیط کشت TYM^L یک بار شستشو داده شده و در نهایت در محیط کشت TYM^L پخش می شوند.

• تلقیح سلول ها:

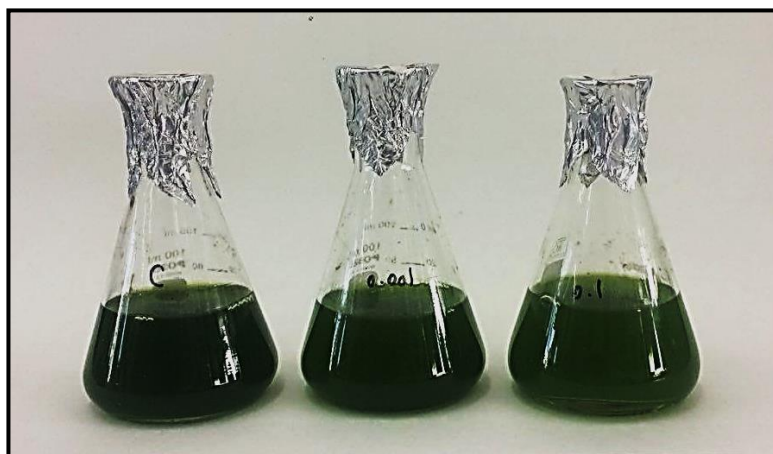
۵۰ ml سلول های شسته شده و پخش شده در محیط کشت جدید TYM^L به ارلن مایرهای به حجم ۱۰۰ ml منتقل می شوند (شکل ۳-۱). رشد کلامیدوموناس در کنار میکروباکتریوم با دو دانسیته ی نوری اولیه، مطالعه شده است. در کشت های همزیست جلبک و باکتری به گونه ای مخلوط می شوند که غلظت نهایی کلروفیل در هر کشت ۱۰ µg/ml و دانسیته ی نوری میکروباکتریوم ۰/۰۰۱ یا ۰/۱ باشد. برای جلوگیری از آلوده شدن

¹ Aliquot

² Pellet

کشت‌ها، درب ارلن مایرها با آلومینیوم فویل پوشانده شده است. تمام مراحل برپا کردن آزمایش در فضای استریل هود بیولوژیک انجام شده است.

کشت‌های تنها دارای سلول‌های کلامیدوموناس و یا سلول‌های میکروباکتریوم به عنوان کشت‌های کنترلی در نظر گرفته شده‌اند. برای هر یک از شرایط حداقل سه تکرار بیولوژیکی در نظر گرفته شده است. برای بررسی رشد کلامیدوموناس، اندازه‌گیری غلظت کلروفیل و شمارش سلول‌ها در تمام کشت‌های حاوی کلامیدوموناس به مدت ۷۰ روز انجام شده است. هم‌چنین هر ۲۰ روز یک بار از تغییر رنگ کشت‌ها عکس گرفته شده است. برای مشاهده روند رشد میکروباکتریوم در کشت‌های خالص کنترلی دانسیته‌ی نوری به مدت ۳۲ روز اندازه‌گیری شده است. هم‌چنین شمارش سلول‌های میکروباکتریوم با استفاده از تکنیک واحد کلونی‌های تشکیل شده (Colony Forming Unit) CFU در کشت‌های کنترلی و کشت‌های هم‌زیست در شروع آزمایش و روز ۱۴۵م آزمایش انجام شده است.



شکل ۳-۱. نمایی از کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس (ارلن سمت چپ) و کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (ارلن‌های وسط و سمت راست) در محیط کشت TYM^L .

۳-۲-۱-۲. رشد در شرایط تولید هیدروژن

در اغلب موارد رشد کلامیدوموناس و باکتری‌های مختلف مطالعه شده در این تحقیق در شرایط تولید هیدروژن بررسی شده است (مراجعه شود به بخش آزمایش‌های تولید هیدروژن). رشد کلامیدوموناس به صورت خالص و در هم‌زیستی با انواع باکتری‌ها از جمله سویه‌های سودوموناس، سویه‌های ای‌کلای، ریزوبیوم اتلی، استنوتروفوموناس، باسیلوس، میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم بسته به هدف آزمایش در محیط کشت‌های مختلفی مانند TAP، TM، TY، TYM و TTM بررسی شده است. برای تمام آزمایش‌ها حداقل سه تکرار بیولوژیک در نظر

گرفته شده است. غلظت کلروفیل و گاهی دانسیته‌ی نوری برای بررسی روند رشد سلول‌های کلامیدوموناس اندازه‌گیری شده‌اند. همچنین دانسیته‌ی نوری باکتری‌ها برای مشاهده‌ی روند رشد آن‌ها بررسی شده است.

۲-۳-۲-۲. رشد در محیط کشت جامد

برای بررسی رشد میکروباکتریوم در حضور منابع کربنی و نیتروژنی مختلف از آزمایش‌های قطره‌ای^۱ استفاده شده است. آزمایش‌ها به دو گروه رشد در محیط کشت‌های دارای منابع کربن و نیتروژن مختلف و رشد در محیط کشت‌های دارای آمینواسیدهای مختلف تقسیم می‌شوند. تمام مواد شیمیایی استفاده شده از شرکت‌های Merck و Sigma Aldrich تهیه شده‌اند.

۱-۲-۳-۲-۳. رشد بر منابع کربن و نیتروژن مختلف

پیش‌کشت سلول‌های میکروباکتریوم در TYM^H همانطور که در بخش ۱-۱-۳-۲-۳ توضیح داده شد تا رسیدن به اواسط فاز لگاریتمی آماده شده است. سپس سلول‌های باکتری در محیط کشت MN-N دو بار شسته شده و در نهایت در همین محیط کشت با دانسیته‌ی نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ nm پراکنده می‌شوند. سپس قطره‌های به حجم ۶ ml بر سطح محیط کشت‌های مختلف گذاشته شده‌اند. دوبار تکرار بیولوژیک برای این آزمایش در نظر گرفته شده است. عموم محیط کشت‌ها بر پایه‌ی MM در نظر گرفته شده‌اند. محیط کشت‌های زیر برای رشد میکروباکتریوم مطالعه شده‌اند:

- LB
- TAP
- MM + ۵ g/l Glucose
- MM + ۵ g/l D-Mannitol
- MM + ۵ g/l Potassium Acetate
- MM + ۰/۵% (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA)
- MM + ۰/۵% (w/v) BSA + ۵ g/l Glucose
- MM + ۰/۵% (w/v) BSA + ۵ g/l D-Mannitol
- MM + ۰/۵% (w/v) BSA + ۵ g/l Potassium Acetate
- MM + ۰/۸ g/l Tryptone
- MM + ۰/۸ g/l Tryptone + ۵ g/l Glucose
- MM + ۰/۸ g/l Tryptone + ۵ g/l D-Mannitol
- MM + ۰/۸ g/l Tryptone + ۵ g/l Potassium Acetate

^۱ Drop test for growth

- MM + 0/1 g/l Tryptone
- MM + 0/1 g/l Tryptone + 5 g/l D-Mannitol
- MM + 0/8 g/l Yeast Extract
- MM + 0/8 g/l Yeast Extract + 5 g/l D-Mannitol

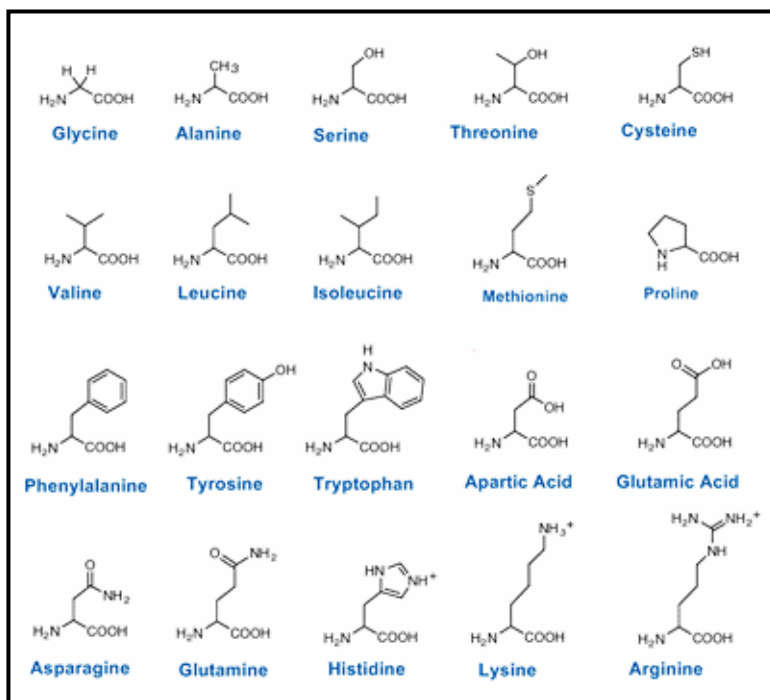
در تهیهی محیط کشت‌ها پروتئین BSA و تریپتون در محیط کشت MM حل شده و با استفاده از فیلترهای با سایز منافذ $0/2 \mu\text{m}$ (Whatman) استریل شده و سپس به محیط کشت‌های آگاردار مایع در دمای 50°C اضافه می‌شوند.

رشد در محیط کشت جامد در دمای 25°C بررسی شده است.

۲-۲-۳-۲-۳. رشد بر اسیدهای آمینه

رشد میکروباکتریوم بر ۲۰ نوع اسید آمینه نشان داده شده در شکل ۲-۳، بررسی شده است. برای تعیین آگزوتروف^۱ بودن میکروباکتریوم نسبت به هر یک از اسیدهای آمینه، آن‌ها به صورت جدا جدا به محیط کشت بر پایه MM که دارای ۵ g/l مانیتول است، اضافه شده‌اند. همچنین برای روشن شدن اینکه آیا میکروباکتریوم اسیدهای آمینه را به عنوان منبع کربن یا نیتروژن مصرف می‌کنند، رشد در محیط کشت‌های با پایه‌های MM و MM-N که حاوی هر یک از اسیدهای آمینه به طور جداگانه و ۵ g/l مانیتول هستند، مطالعه شده است. غلظت اولیه‌ی تمام اسیدهای آمینه در محیط کشت‌ها ۸ mM است. تنها غلظت Tyrosine به دلیل حلالیت کم آن ۸ mM در نظر گرفته شده است.

¹ Auxotroph



شکل ۳-۲. ۲۰ نوع اسید آمینه مورد استفاده در آزمایش رشد.

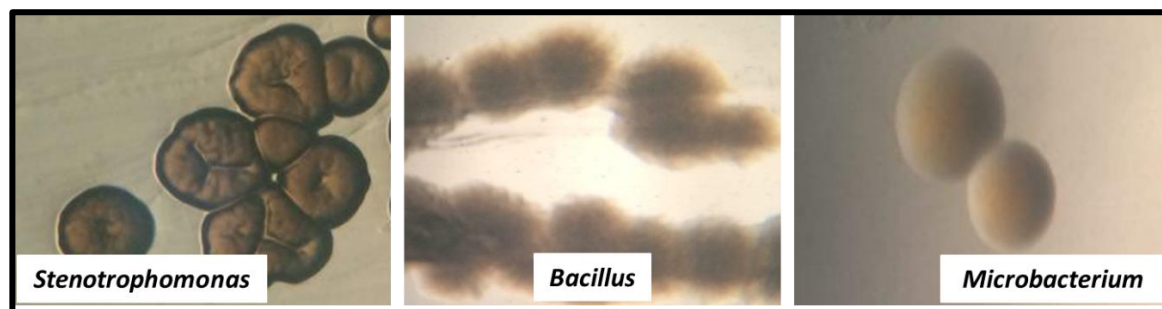
اسیدهای آمینه از شرکت Sigma Aldrich تهیه شدند. محلول اسیدهای آمینه در MM یا MM-N حل شده، توسط فیلتر با سایز منافذ $0.2 \mu\text{m}$ استریل شده، در جایی که لازم باشد pH آن‌ها با استفاده از KOH یا HCL به 7.2 ± 0.1 تنظیم شده و سپس به محیط کشت‌های آگار دار مایع در دمای 50°C اضافه می‌شوند.

همانند بخش قبل سلول‌های میکروباکتیریوم در محیط کشت TYM^H تا اواسط فاز لگاریتمی رشد کرده و سپس با محیط کشت‌های MM, MM-N دو بار شسته می‌شوند. قطره‌های به حجم ۶ ml با دانسیته‌ی نوری اولیه‌ی ۰/۱ بر سطح محیط کشت‌های جامد گذاشته شده‌اند. دو بار تکرار بیولوژیک برای این آزمایش در نظر گرفته شده است. رشد بر روی اسیدهای آمینه در دمای 25°C مطالعه شده است.

۴-۲-۳. جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

باکتری‌ها از کشت آلوده‌ی ریزوبیوم لگومینوساروم به وسیله‌ی کشت پی در پی جامعه‌ی باکتریایی بر روی محیط کشت جامد YEM جداسازی شده‌اند. با توجه به ظاهر متفاوت کلونی‌های آن‌ها در زیر میکروسکوپ (شکل ۳-۳)، سه نوع باکتری از کشت آلوده جداسازی شده‌اند. از هر نوع باکتری یک تک کلونی انتخاب شده و روی محیط کشت جامد کشت داده شده و برای تعیین توالی ژنوم و شناسایی باکتری‌ها به موسسه بیولوژی مولکولی SNP saurus واقع در امریکا ارسال شده‌اند. از روش PacBio برای توالی یابی کل ژنوم باکتری‌ها استفاده

شده است. با استفاده از نرم افزار Canu 1.7 ژنوم باکتری ها اسمبل^۱ شده اند. سپس با استفاده از (Basic Local Alignment Search Tool) BLAST و BBMap's MinHash Sketch توالی های اسمبل شده ارزیابی شده اند.



شکل ۳-۳. کلونی های جدا شده از جامعه ی باکتریایی آلوده کننده ی کشت ریزوبیوم لگومینوساروم.

۵-۲-۳. بررسی کمی میکروارگانیسیم ها

۱-۵-۲-۳. شمارش سلولی

شمارش تعداد سلول ها و اندازه گیری غلظت سلولی کلامیدوموناس در کشت ها با استفاده از دستگاه شمارش سلول های خون (Hemocytometer Microcell Counter) با برند Sysmex F-500 انجام شده است. $100-25 \mu l$ از نمونه های دارای کلامیدوموناس (کشت های کنترلی و کشت های همزیست) برای آنالیز استفاده شده است.

۲-۵-۲-۳. جذب نوری

دانسیتته ی نوری کلامیدوموناس و باکتری ها در کشت های کنترلی جلبک و باکتری ها و کشت های همزیست با استفاده از اندازه گیری جذب نوری در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Beckman Coulter DU 800) تعیین شده است. جذب نوری باکتری ها در طول موج 600 nm ، کلامیدوموناس در طول موج 750 nm و کشت های همزیست در هر دو طول موج اندازه گیری شده است.

به منظور اندازه گیری دانسیته ی نوری میکروباکتریوم در کشت های همزیست، ابتدا سلول های کلامیدوموناس از سلول های میکروباکتریوم با استفاده از سانتریفیوژ در دور $200 \times g$ به مدت $1/5$ دقیقه (بهینه شده در این تحقیق) جدا شده است. سلول های کلامیدوموناس به دلیل بزرگ تر بودن ته نشین می شوند و سلول های میکروباکتریوم در سوپرناتانت معلق باقی می ماندند. بنابراین بلافاصله جذب نوری سوپرناتانت شامل سلول های باکتری در طول موج 600 nm اندازه گیری شده است.

¹ Assemble

۳-۲-۵-۳. غلظت کلروفیل

برای اندازه گیری غلظت کلروفیل $200 \mu\text{l}$ نمونه به طور مستقیم از محیط کشت ها برداشته شده و با $800 \mu\text{l}$ اتانول مخلوط و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس می شدند. پس از ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور $16000 \times g$ به مدت یک دقیقه قرار داده می شوند. سپس غلظت کلروفیل $a + b$ موجود در سوپرناتانت با استفاده از فرمول زیر (معادله ۱) از جذب نوری تعیین شده در دستگاه اسپکتروفتومتر (Beckman Coulter DU 800) در طول موج های 665 mm (کلروفیل a) و 649 mm (کلروفیل b) تعیین شده است [۸۴].

$$\text{Chlorophyll (a + b) } (\mu\text{g/ml}) = (6/1 \times A_{665}) + (20/0.4 \times A_{649}) \quad (1)$$

۳-۲-۵-۴. واحد کلونی های تشکیل شده (CFU)

برای شمارش تعداد سلول های میکروباکتریوم و تعیین غلظت سلولی این باکتری در کشت های کنترلی و کشت های همزیست از روش واحد کلونی های تشکیل شده استفاده شده است. کشت ها به صورت سری و رقت های ۱۰ برابر، رقیق شده اند. سه رقت منطقی از بین کشت های رقیق شده انتخاب شده است. $100 \mu\text{l}$ از هر کدام از این رقت ها بر سطح محیط کشت جامد LB که در داخل ظرف های پتری با قطر ۸ cm تهیه شده اند پخش شده است. تعداد کلونی ها پس از سه و پنج روز که کلونی ها به خوبی رشد کرده و بدون چشم مسلح به راحتی قابل شمارش باشند، شمرده شده است. سپس ظروف پتری که تعداد کلونی های داخل آن ها ۵۰-۱۰۰ عدد باشد، انتخاب شده و تعداد کلونی های داخل آن ها مشخص شده است در انتها با احتساب ضرب رقت و حجم نمونه، تعداد کلونی ها که معیاری از تعداد سلول ها در کشت ها است، محاسبه شده است. از محیط کشت جامد LB استفاده شده است زیرا در کشت های همزیست، تنها میکروباکتریوم در این محیط کشت رشد می کند. در زمان رشد کلونی ها، ظروف پتری در دمای 25°C نگهداری شده اند. سه تکرار بیولوژیک برای شمارش کلونی ها در نظر گرفته شده است.

۳-۲-۳. تولید هیدروژن

۳-۲-۳-۱. آماده سازی کشت ها برای تولید هیدروژن

• پیش کشت سلول های کلامیدوموناس:

سلول های کلامیدوموناس پس از سه مرحله ی کشت جامد (دو روز)، پیش کشت مایع (دو روز) و کشت مایع (سه روز) آماده شده اند. از محیط کشت TAP برای کشت این جلبک در معرض شدت نور $90-70 \text{ PPFd}$ و در دمای 24°C استفاده شده است.

• پیش‌کشت سلول‌های باکتری:

از محیط کشت‌های استاندارد مخصوص برای رشد هر باکتری استفاده شده است. سویه‌های سودوموناس و ای‌کلای در محیط کشت LB (یک روز)، ریزوبیوم اتلی در محیط کشت YEM (دو روز)، متیلوباکتریوم در محیط کشت MeM (سه روز) و استنوتروفوموناس، باسیلوس و میکروباکتریوم در محیط کشت TYM^H (یک روز) کشت داده شده‌اند. برای کشت باکتری‌ها نمونه‌ی تلقیح از آلیکوت گلیسیریل شده که در فریزر 80°C - نگهداری می‌شود، مستقیماً به محیط کشت جدید برای تهیه‌ی پیش‌کشت سلول‌های باکتری تلقیح شده است. باکتری‌ها در دمای 28°C و با دور اختلاط 130 rpm کشت داده شده‌اند.

• شست و شوی سلول‌ها:

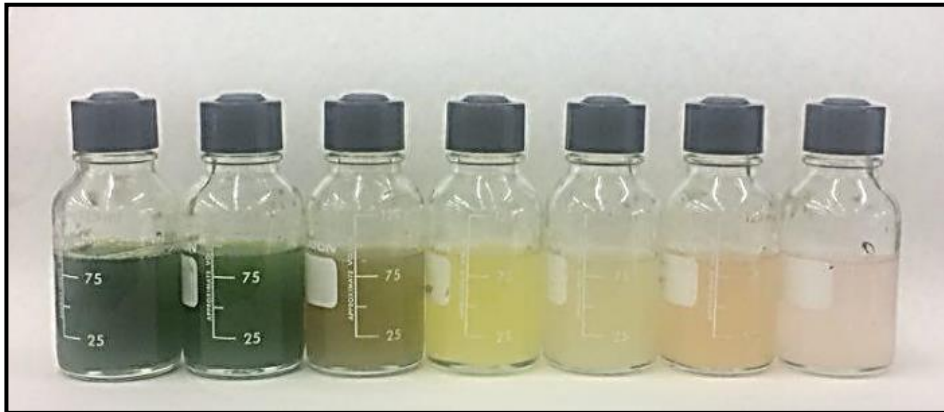
کشت جلبک پس از رسیدن به اواسط فاز لگاریتمی ($10^6 \times 10^8$ Cells/ml) با استفاده از سانتریفیوژ ($3/000 \times g$) به مدت دو دقیقه ته نشین شده و در محیط کشت جدیدی که برای آزمایش تولید هیدروژن در نظر گرفته شده است، پخش شده است. سلول‌های باکتری نیز پس از رسیدن به دانسیته‌ی نوری $0/6-0/8$ با استفاده از سانتریفیوژ ($6/000 \times g$) به مدت پنج دقیقه ته نشین شده، با محیط کشت جدید در نظر گرفته شده برای آزمایش تولید هیدروژن حداقل دو بار شسته شده و در نهایت در همان محیط کشت پخش شده‌اند.

• تلقیح سلول‌ها برای شروع آزمایش تولید هیدروژن:

سلول‌های جلبک و باکتری شسته شده و پخش شده در محیط کشت جدید، با نسبت‌های مناسب که در دستورالعمل آن آزمایش است در داخل بیوراکتورهای مخصوص شیشه‌ای تهیه شده برای آزمایش‌های تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست، ریخته شده‌اند. کشت‌های تنها دارای سلول‌های کلامیدوموناس یا سلول‌های باکتری به عنوان کنترل در نظر گرفته شده‌اند. برای هر یک از شرایط حداقل سه بار تکرار بیولوژیکی در نظر گرفته شده است. بیوراکتورهای استفاده شده برای آزمایش‌های تولید هیدروژن به گونه‌ای طراحی شده‌اند که با بسته شدن درب آن‌ها هیچ راهی برای ورود و خروج گازها وجود نداشته باشد و به اصطلاح کاملاً مهروموم شده^۱ و هیچ راه فراری برای خروج گاز وجود ندارد. همچنین در وسط درب این بیوراکتورها قطعه‌ی لاستیکی فشرده‌ای برای نمونه‌گیری از فاز گاز و مایع تعبیه شده است. حجم بیوراکتورها 155 ml است که 100 ml آن با کشت‌های مایع پر شده و 55 ml حجم گاز در فضای بالاسری است. نسبت حجم گاز به مایع بهینه (55 ml : 100 ml) برای تولید هیدروژن در یک آزمایش ساده با بررسی پنج نسبت گاز: مایع، 30 : 125، 55 : 100، 77/5 : 77/5، 100 : 100 : 50 و 125 : 30 انتخاب شده است. تعدادی از بیوراکتورها پر شده از کشت‌های مختلف جلبک و باکتری در شکل 3-4 نشان داده شده است. تمام مراحل آماده‌سازی بیوراکتورهای تولید هیدروژن در فضای هود استریل بیولوژیکی انجام شده است. پس از آن، بیوراکتورها به داخل محفظه‌ای مجهز به پنل‌های (AlgaeTron AG 230, Photon

¹ Seal

LED (System Instrument) که قابلیت تنظیم شدت نور و دما در آن وجود دارد، منتقل شده اند. تمام آزمایش های تولید هیدروژن در دمای 25°C انجام شده اند. از شیکرها برای تامین اختلاط در بیوراکتورها استفاده شده است. شکل ۳-۵، نمایی از امکانات استفاده شده در فرایند تولید هیدروژن را نشان می دهد. فرایند تولید هیدروژن عموماً به صورت ناپیوسته^۱ و گاهی به صورت نیمه پیوسته^۲ بررسی شده است.



شکل ۳-۴. نمایی از بیوراکتورهای استفاده شده برای تولید هیدروژن.

¹ Batch

² Fed-batch



شکل ۳-۵. نمایی از سامانه‌ی آزمایشگاهی طراحی شده برای تولید هیدروژن.

همانطور که در بخش مقدمه اشاره شد، آنزیم هیدروژناز آنزیمی دو جهته است که توانایی تولید و مصرف هیدروژن را با توجه به شرایط حاکم در آزمایش دارد. بنابراین با تجمع گاز هیدروژن در فضای بالاسری این بیوراکتورها، این آنزیم هیدروژن را مصرف می‌کند تا اثر فشار جزئی^۱ آن را از بین ببرد. Jurado-Oller و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که با هوادهی روزانه‌ی بیوراکتورها در فضای استریل که منجر به تعویض گاز فضای بالاسری بیوراکتورها (دارای هیدروژن) با هوای اتمسفری استریل می‌شود، بازده نهایی تولید هیدروژن افزایش می‌یابد [۵۷]. در همین راستا در تمام آزمایش‌های تولید هیدروژن درب بیوراکتورها روزانه به مدت ۵ دقیقه در فضای هود استریل بیولوژیکی باز شده است. سپس درب آن‌ها بسته شده و برای تولید هیدروژن در محفظه‌ی آلگاترون قرار داده شده‌اند. نمونه‌های گازی از فضای گاز بالاسری، روزانه قبل از هوادهی با استفاده از سرنگ مخصوص به حجم ۱ ml گرفته شده و در داخل دستگاه کروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography) GC آنالیز شده‌اند.

¹ Hydrogen Partial Pressure

نمونه های مایع نیز با استفاده از سرنگ های استریل یک بار مصرف ۱ ml از فضای مایع داخل بیوراکتورها برای آنالیزهای مایع مانند آنالیزهای مربوط به رشد و آنالیز مواد آلی موجود در محیط کشت ها در دستگاه کروماتوگرافی مایع HPLC (High Performance Liquid Chromatography) گرفته شده اند.

۴-۳. سنجش متابولیت ها

۱-۴-۳. متابولیت ها در فاز گاز

برای آنالیز فاز گاز موجود در فضای بالاسری بیوراکتورها نمونه های به حجم ۲۵۰ µl با استفاده از سرنگ مخصوص نمونه گیری کروماتوگرافی گاز (Hamilton's SampleLock™ Syringe # 81356) از فضای بالاسری بیوراکتورها گرفته شده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC, Agilent 7820A, Agilent Technologies) تزریق می شود. گازهای H₂, O₂ و N₂ با استفاده از ستون پر شده^۱ (60/80 Molecular Sieve 5A, Ref. 13133-) (u Supelco Thermal Conductivity) TCD در دمای ۷۵°C جدا شده و با استفاده از آشکار ساز هدایت گرمایی (Detector)، سیگنال های مربوط به هر کدام مشخص و در نرم افزار Ezchrom Elite نمایش داده می شوند. سپس با استفاده از منحنی کالیبراسیون تنظیم شده برای این گازها، مقدار هر کدام از اجزا در ۲۵۰ µl مشخص شده که به راحتی مقدار آن ها در ۵۵ ml را نیز می توان محاسبه کرد. از گاز آرگون به عنوان گاز حامل در GC استفاده شده است.

۲-۴-۳. متابولیت ها در فاز مایع

آنالیز متابولیت های قندی (گلوکز و مانیتول) و مواد آلی (اسیدلاکتیک، اسیدفرمیک، اسیداستیک و اتانول) در فاز مایع کشت ارگانیسم ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC, Agilent Series 1200, Agilent Technologies) انجام شده است. متابولیت ها در ستون تبادل یونی^۲ (Agilent Hi-plex H, 300 × 7.7 mm, 6 µm I.D.) به همراه فاز متحرک، محلول یکنواخت ۵ mM اسید سولفوریک، با نرخ جریان ۰/۶ ml/min حرکت کرده و در دمای ۵۰°C از یکدیگر جدا می شوند.

آماده سازی نمونه های مایع برای قرار دادن در دستگاه کروماتوگرافی مایع: نمونه های گرفته شده از فاز مایع کشت ها به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (g × ۱۶/۰۰۰) شده اند. سپس سوپرناتانت از سلول های ته نشین شده جدا شده است. پس از آن سوپرناتانت با استفاده از فیلترهای مخصوص با سایز منافذ ۰/۲ µm فیلتر شده و در داخل دستگاه قرار داده شده اند.

¹ Packed column

² Ion – exchange column

۲۰ µl از هر نمونه برای آنالیز متابولیت‌ها به داخل دستگاه کروماتوگرافی تزریق شده است. متابولیت‌های مختلف در زمان ماندگی^۱ مختلف با استفاده از دکتور (Refractive Index Detector) RID (Agilent G) (1362A, Agilent Technologies) شناسایی شده‌اند. برای تعیین غلظت متابولیت‌ها از نمودار کالیبراسیون تهیه شده با استفاده از غلظت‌های معین هر یک از آن‌ها استفاده شده است. برای تهیه نمودار کالیبراسیون اسیدلاکتیک، اسیدفرمیک و اتانول از رنج غلظت ۰/۱۲۵ تا ۲۰ mM، اسیداستیک از رنج غلظت ۰/۱۲۵ تا ۲۵ mM و گلوکز و مانیتول از رنج غلظت ۰/۱۲۵ تا ۶۰ mM استفاده شده است. تمام نمودارهای کالیبراسیون در محدوده‌ی غلظت‌های مورد بررسی خطی بوده و R^2 (R Squared) آن‌ها ۰/۹۹۹ است. در نمودارهای کالیبراسیون از حداقل ۶ غلظت در محدوده رنج ذکر شده استفاده شده و برای هر یک از غلظت‌ها سه تکرار فنی^۲ در نظر گرفته شده است.

۳-۵. بررسی‌های میکروسکوپی

در این تحقیق از دو نوع میکروسکوپ متفاوت استفاده شده است. برای بررسی و مشاهده‌ی شکل سلول‌های ارگانیسیم‌های مختلف در کشت‌ها و همچنین ارتباط فیزیکی این سلول‌ها در کشت‌های هم‌زیست از میکروسکوپ Leica DM750 و برای مشاهده‌ی ظاهر کلونی‌های تشکیل شده از میکروارگانیسیم‌ها از میکروسکوپ Kyowa optical SDZ-PL استفاده شده است.

۳-۶. اندازه‌گیری شدت نور

از دستگاه اندازه‌گیری شدت نور DataLogger L1-1000 برای اندازه‌گیری شدت نور مورد نیاز برای رشد کلامیدوموناس در آزمایش‌ها استفاده شده است.

۳-۷. مدل‌سازی

۳-۷-۱. مدل‌سازی استوکیومتریک و مبتنی بر قید^۳

گزارش‌ها نشان داده‌اند که مدل‌سازی متابولیک استوکیومتریک و مبتنی بر قید پتانسیل بالایی در آنالیز و پیش‌بینی ویژگی‌ها و توانایی‌های متابولیسم ارگانیسیم‌های مختلفی داشته است [۸۵-۸۷]. مدل‌سازی مبتنی بر قید، متابولیت‌ها را در شرایط پایا که غلظت ثابتی در طول زمان دارند، در نظر می‌گیرد. این پدیده زمانی اتفاق می‌افتد که سرعت فعالیت آنزیم‌ها بیشتر از تغییرات به وجود آمده در بیان ژن‌ها و تغییرات محیطی است [۸۵].

¹ Retention Time

² Technical replicates

³ Stoichiometric and Constraint-based modeling

شرایط پایای متابولیت ها مطابق معادله ی (۲) تعریف می شود:

$$S \cdot r = 0 \quad (۲)$$

ماتریس S که دارای تمام ضرایب استوکیومتری واکنش ها است، ماتریس استوکیومتری نامیده می شود و r برداری از شارهای واکنش ها است. برای شار هر واکنش دو مرز (شرایط مرزی حد بالا و حد پایین) به صورت زیر در نظر گرفته شده است:

$$lb_i \leq r_i \leq ub_i \quad (۳)$$

$r_i \geq 0$ ، برای واکنش های برگشت ناپذیر فرض شده است. با به کار بردن واکنش موازنه ی جرم برای هر یک از متابولیت ها در شبکه ی متابولیک، یک فضای محدب که شامل معادلات خطی و نابرابری های شناخته شده در مورد شبکه است، به وجود می آید. برنامه نویسی خطی، LP (Linear Programming) رویکردی رایج برای تعیین ویژگی ها و رفتار شبکه با در نظر گرفتن تمام محدودیت ها است [۸۸]. یکی از پرکاربردترین روش ها در مدل سازی مبتنی بر قید، آنالیز تعادل شارها یا FBA (Flux Balance Analysis) است که برای بیشینه یا کمینه کردن تابع هدف خطی استفاده می شود. عموماً، بیشینه کردن بازده تولید زیست توده، نرخ رشد و یا بازده تولید محصول به عنوان تابع هدف در نظر گرفته می شوند.

$$\text{Max } f^T v \quad (۴)$$

$$S \cdot v = 0 \quad (۵)$$

$$v_{\min} \leq v \leq v_{\max} \quad (۶)$$

f ، بردار تابع هدف و v_{\min} و v_{\max} ، به ترتیب بردارهای مقادیر کمینه و بیشینه ی ممکن برای شارها هستند که به عنوان شرایط مرزی حد پایین و بالا در نظر گرفته می شوند.

در این تحقیق از روش FBA برای بررسی سیستم تبادلی بین جلبک کلامیدوموناس و سودوموناس پوتیدا در مدل ترکیبی این دو میکروارگانیسم استفاده شده است. در مدل ترکیبی، شبکه ی متابولیک ریزجلبک و باکتری با به اشتراک گذاشتن واکنش های تبادلی مشترک به یکدیگر متصل شده اند. مدل سازی در محیط نرم افزار Matlab و با استفاده از پکیج Cobra toolbox انجام شده است. همچنین از سالور^۱ glpk که مخصوص حل معادلات خطی است برای حل معادلات استفاده شده است.

^۱ Solver

۲-۷-۳. مدل های شبکه‌ی متابولیکی میکروارگانسیم‌ها

از مدل های شبکه‌ی متابولیک ژنوم مقیاس ارگانسیم‌های *Chlamydomonas reinhardtii* CC-1690 [۸۹] و *Pseudomonas putida* KT2440 [۹۰] استفاده شده است.

۳-۷-۳. مدل ترکیبی شبکه‌های متابولیک

مدل ترکیبی از تجمیع مدل‌های انفرادی میکروارگانسیم‌ها ساخته شد. واکنش‌های تبادل مشترک در شبکه‌ی متابولیک هر دو میکروارگانسیم به عنوان پل ارتباطی بین شبکه‌ها در نظر گرفته شده است. فرض رشد متوازن^۱ که در آن نرخ رشد مخصوص برای همه‌ی اعضای جامعه‌ی میکروبی یکسان است، برای حفظ تعادل بین نسبت میکروارگانسیم‌ها در نظر گرفته شده است. در این تحقیق روند مصرف اسیداستیک و تولید هیدروژن در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و سودوموناس پوتیدا/ در سه شدت نور ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ PPFD با استفاده از مدل ترکیبی و مدل‌های انفرادی ارگانسیم‌ها بررسی شده است. همچنین روند رشد کلامیدوموناس در کشت انفرادی این جلبک و کشت هم‌زیست آن با سودوموناس پوتیدا/ در شدت نور ۱۰۰ PPFD با استفاده از مدل سازی برآورد شده است. و در نهایت نتایج حاصل شده از مدل سازی شبکه‌های متابولیک با نتایج تجربی مقایسه شده است.

۴-۷-۳. تابع هدف

برای آنالیز روند مصرف اسیداستیک در کشت‌های کنترلی جلبک و باکتری و کشت‌های هم‌زیست و مقایسه‌ی رشد کلامیدوموناس در کشت‌های خالص این جلبک و کشت‌های هم‌زیست تابع هدف، بیشینه شار تولید زیست‌توده در نظر گرفته شده است. در حالی که در آنالیز تولید هیدروژن در کشت‌های کنترلی و کشت‌های هم‌زیست، تابع هدف بیشینه شار تولید هیدروژن با فرض این که شار تولید زیست‌توده از نصف بیشینه شار تولید زیست‌توده کمتر نشود، در نظر گرفته شده است.

² Balanced Growth

فصل چهارم:

نتایج و تحلیل

۴-۱. مقدمه

به طور کلی نتایج این تحقیق را می توان در چهار بخش اصلی به صورت زیر دسته بندی کرد:

۴-۱-۱. بخش اول تحقیق

این بخش شامل نتایج به دست آمده از همزیستی کلامیدوموناس با باکتری های مختلف در محیط کشت غنی از مواد مغذی در معرض شدت نورهای مختلف به منظور بهبود تولید هیدروژن توسط کلامیدوموناس است.

۴-۱-۱-۱. دستاورد قابل توجه بخش اول

اهمیت و ارتباط الگوی مصرف اسیداستیک با تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-باکتری در معرض شدت نورهای مختلف.

۴-۱-۲. بخش دوم تحقیق

در بخش دوم نتایج، اثر منابع کربنی مختلف بر تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-باکتری در روشنایی بررسی شد. همچنین به منظور افزایش زمان تولید در کشت های همزیست با بازده تولید بالای هیدروژن از نحوه ی خوراک دهی نیمه پیوسته (فدبچ) استفاده شد.

۴-۱-۲-۱. دستاوردهای قابل توجه بخش دوم

۱. مشخص شدن نقش اسیداستیک در تولید هیدروژن توسط کلامیدوموناس در شرایط آزمایش.

۲. یافتن الگوی همزیستی با پتانسیل بالا برای کاربرد زیست فناوری تولید زیستی هیدروژن. در این رویکرد نشان داده می شود که کشت همزیست کلامیدوموناس و ای کلای سبب هم افزایی بازده تولید هیدروژن در روشنایی در کلامیدوموناس و تولید تخمیری هیدروژن در ای کلای در شرایط مناسب کشت می شود.

۳-۱-۴. بخش سوم تحقیق

در بخش سوم، خالص سازی و شناسایی اعضای یک جامعه ی باکتریایی به دلیل اثر بسیار خوبی که بر تولید هیدروژن داشتند انجام شد. از میان باکتری های شناسایی شده، باکتری موثر بر تولید هیدروژن در کشت های همزیست با کلامیدوموناس انتخاب شده و مورد آزمایش های بیشتر از نظر مواد مورد نیاز کشت قرار گرفت. در ادامه اثر متقابل بر رشد این باکتری و کلامیدوموناس در کشت همزیست بررسی شد.

۱-۳-۱-۴. دستاوردهای قابل توجه بخش سوم

۱. یافتن ارتباط مفید متقابل که منجر به بهبود رشد کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در کشت همزیست نسبت به کشت های انفرادی جلبک و باکتری می شود.
۲. شناسایی کشت همزیستی که قابلیت تولید بلندمدت هیدروژن را دارد.

۴-۱-۴. بخش چهارم تحقیق

در بخش پایانی، پتانسیل مدل سازی مبتنی بر قید برای پیش بینی روند تولید هیدروژن، مصرف اسیداستیک و رشد کلامیدوموناس در کشت های کنترلی کلامیدوموناس و سودوموناس پوتیدا و کشت های همزیست این دو میکروارگانیسم مطالعه شده است.

۱-۴-۱-۴. دستاوردهای قابل توجه بخش چهارم

پیش بینی صحیح کیفی از عملکرد سلولی در کشت های کنترلی و کشت های همزیست با استفاده از شبکه ی متابولیک این کشت ها.

۲-۴. بخش اول: هم‌زیستی کلامیدوموناس با باکتری‌های مختلف در محیط کشت

غنی از مواد مغذی در روشنایی

شدت نور پارامتری کلیدی است که اثر مستقیم بر رشد ریزجلبک‌های سبز دارد. در این آزمایش اثر هم‌زیستی پنج باکتری سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴، سودوموناس پوتیدا/ ۲۹۱، سودوموناس اشتوتسری، ای‌کلای K12 و ریزوبیوم/تلی در سه شدت نور ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ PPFD بر رشد و ظرفیت تولید هیدروژن در کلامیدوموناس بررسی شده است. سویه‌های ریزوبیوم، باکتری‌های شناخته شده‌ای هستند که قادر به برقراری ارتباط مفید دو طرفه با گیاهان هستند. این ارتباط مفید دو طرفه در کشت هم‌زیست این باکتری‌ها با ریزجلبک‌ها از جمله کلامیدوموناس مشاهده شده است [۹۱]. به علاوه، سویه‌های ریزوبیوم و سودوموناس در دسته‌ی باکتری‌های غالب در فضای فیکوسفر کلامیدوموناس قرار دارند [۶۴، ۹۱]. با توجه به این اطلاعات، این باکتری‌ها در تحقیق حاضر انتخاب شده‌اند. بیوراكتورهای پلمپ شده‌ی کشت ناپیوسته شامل ۱۰۰ ml کشت مایع کلامیدوموناس با غلظت (million cells/ml ~ ۳-۴) و ۱۰ µg chl./ml و باکتری با دانسیته‌ی نوری OD₆₀₀ = ۰/۱ در محیط کشت TAP در دمای ۲۵ °C مورد آزمایش قرار گرفتند. محیط کشت TAP مرسوم‌ترین محیط کشت برای رشد و نگهداری کلامیدوموناس است [۹۲]. با توجه به حضور هر دو منبع کربن آلی (استیک اسید) و دی‌اکسیدکربن در کشت‌ها، این آزمایش‌ها در شرایط کشت میکسوتروف^۱ بررسی شدند. بیوراكتورهای تنها حاوی کلامیدوموناس (۱۰ µg chl./ml) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. فضای بالاسری کشت مایع در تمام بیوراكتورها شامل ۵۵ ml هوا بود. درب بیوراكتورها روزانه در فضای استریل به مدت ۵ دقیقه باز شده تا هوای اتمسفری جایگزین گاز موجود در فضای بالاسری شود.

۲-۴-۱. رشد کلامیدوموناس در حضور باکتری‌ها در کشت هم‌زیست در شدت نورهای مختلف

از آنجا که کلروفیل تنها در سلول‌های کلامیدوموناس موجود است، تغییر در کلروفیل متناسب با رشد کلامیدوموناس در نظر گرفته می‌شود. روند تغییرات غلظت کلروفیل در شکل ۴-۱ نشان می‌دهد که حضور تمام باکتری‌ها سبب کاهش رشد کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست نسبت به کشت کنترلی جلبک در تمام شدت‌های نوری شده است. در حضور هر سه سویه‌ی سودوموناس، غلظت کلروفیل به وضوح کاهش یافته است. در حالی که سویه‌ی سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴ بیشترین اثر منفی بر رشد ریزجلبک در تمام شدت‌های نوری را داشته است و همانطور که شکل ۴-۱ نشان می‌دهد، رشد کلامیدوموناس در شدت نور ۱۲ PPFD تقریباً به صورت کامل متوقف شده است. همچنین اثر منفی ای‌کلای و ریزوبیوم/تلی بر رشد کلامیدوموناس کمتر از سویه‌های سودوموناس است. در تحقیقی Li و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که دانسیته‌ی نوری کلامیدوموناس در حضور سودوموناس نسبت به کشت کنترلی جلبک ۱۸/۵٪ کاهش یافت [۵۹]. در حالی که نتایج حاصل از مطالعات دیگر

¹ Mixotroph

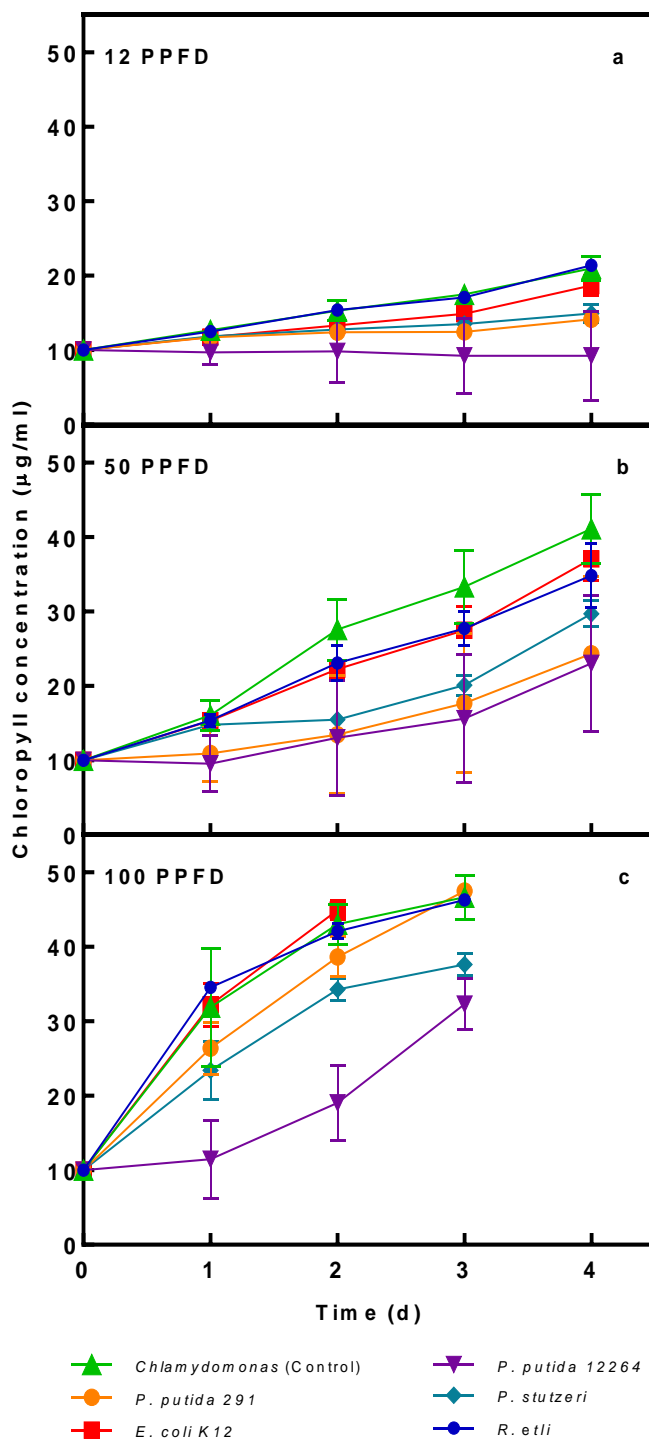
نشان داده است که تعداد سلول‌های کلامیدوموناس در حضور سویه‌ای از ریزوبیوم [۹۱]، برادور ریزوبیوم جاپونیکوم [۵۸] و سویه‌ای از رودوکوکوس^۱ [۶۰] در محیط کشت TAP افزایش یافته است. Xu و همکاران (۲۰۱۷) هم‌زیستی کلامیدوموناس با باکتری تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن/زوتوباکتر کروکوکوم در محیط کشت TAP عاری از سولفور (TAP-S) را بررسی کردند. نتایج نشان دهنده‌ی یک ارتباط مفید دو طرفه در کشت هم‌زیست بود و دانسیته‌ی نوری ریزجلبک تا دو برابر در حضور باکتری افزایش یافت [۶۲].

نتایج این تحقیق نشان داد که اثر مخرب باکتری‌ها بر رشد ریزجلبک با تغییر شدت نور تا حدی قابل کنترل است. افزایش شدت نور اثر منفی حضور باکتری‌ها بر رشد کلامیدوموناس را کاهش می‌دهد. در واقع زمانیکه شدت نور محدود نیست، سلول‌های ریزجلبک کمتر تحت تاثیر حضور باکتری‌ها قرار می‌گیرند.

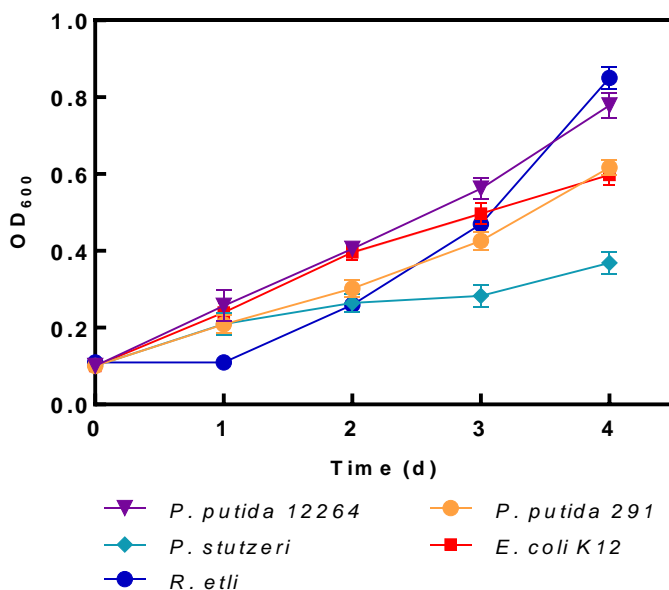
۲-۲-۴. رشد باکتری‌ها در محیط کشت TAP

رشد هر یک از باکتری‌ها در بیوراکتور حاوی محیط کشت TAP با دانسیته‌ی نوری اولیه‌ی $OD_{600} = 0.1$ مورد بررسی قرار گرفت. دانسیته‌ی نوری باکتری‌ها روزانه اندازه گرفته شد. شکل ۲-۴ نشان می‌دهد که هر سه سویه‌ی سودوموناس، ای‌کلای و ریزوبیوم در محیط کشت TAP رشد می‌کنند و از آنجا که تمام این باکتری‌ها سبب کاهش رشد کلامیدوموناس در کشت هم‌زیست می‌شوند (شکل ۴-۱)، می‌توان آن‌ها را به عنوان باکتری‌های رقابتی برای کلامیدوموناس در این شرایط کشت در نظر گرفت.

¹ *Rhodococcus*



شکل ۴-۱. غلظت کلروفیل در کشت های هم زیست و کشت کنترلی جلبک در سه شدت نور ۱۲ (a)، ۵۰ (b) و ۱۰۰ PPFD (c). اطلاعات نشان داده شده میانگین حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

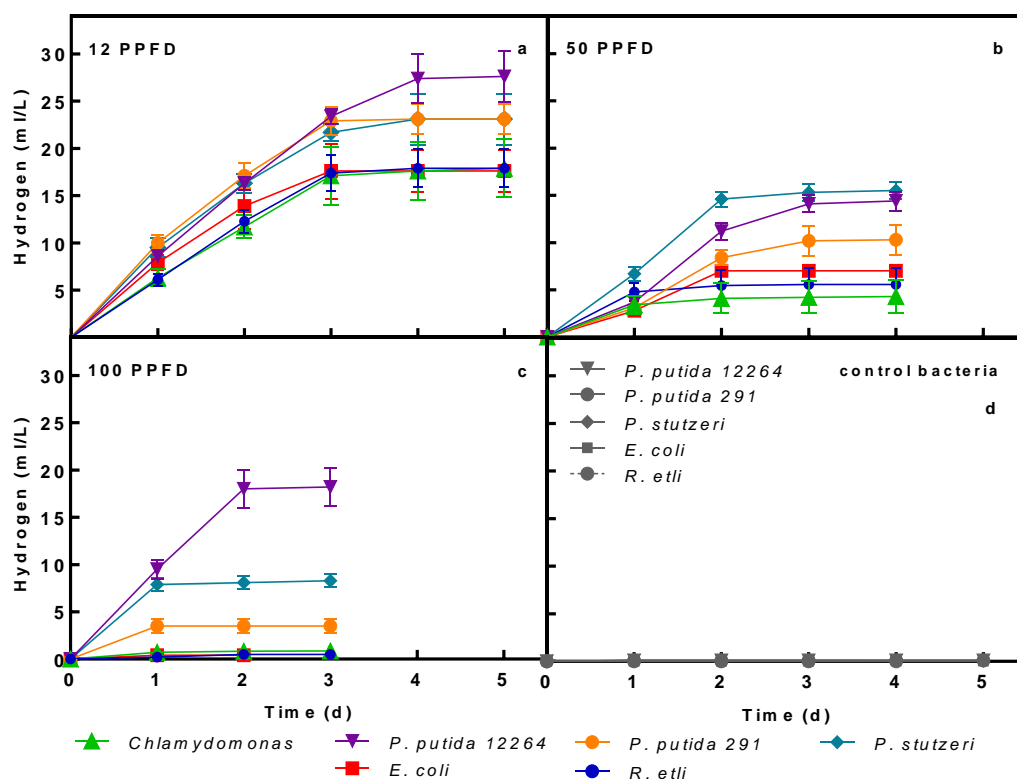


شکل ۴-۲. رشد باکتری‌ها بر اساس تغییرات دانسیته‌ی نوری در محیط کشت TAP. اطلاعات نشان داده شده میانگین حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۲-۳. ارتباط بین تولید هیدروژن، شرایط کم اکسیژنی و حضور اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری در شدت نورهای مختلف

کلامیدوموناس در شدت نور ۱۲ PPFD، بیشترین تولید هیدروژن (۱۷/۹ ml H₂/L culture) را دارد در حالی که در شدت نور ۱۰۰ PPFD تقریباً هیدروژن به وسیله‌ی این جلبک تولید نمی‌شود. به طور کلی در دو حالت کشت کنترل و کشت هم‌زیست کلامیدوموناس، رابطه‌ی منطقی‌ای بین تولید هیدروژن (شکل ۴-۳)، مقدار اکسیژن موجود در فاز گاز بالاسری (شکل ۴-۴) و حضور اسیداستیک در محیط کشت (شکل ۴-۵) وجود دارد. به این ترتیب که، تولید هیدروژن تا زمانی ادامه دارد که اسیداستیک در محیط کشت موجود باشد. به محض پایان یافتن اسیداستیک در محیط کشت، اکسیژن در فضای بالاسری تجمع پیدا کرده و تولید هیدروژن متوقف می‌شود. همانطور که قبلاً گزارش شده است، در شدت نورهای بالاتر، اسیداستیک سریع‌تر مصرف شده، اکسیژن با سرعت بیشتری تجمع پیدا کرده و در نتیجه تولید هیدروژن زودتر متوقف می‌شود [۵۷]. نتایج آزمایش‌های ما تصدیق‌کننده‌ی گزارش‌های اعلام شده مبنی بر محدوده‌ی شدت نوری که کلامیدوموناس در آن قادر به تولید هیدروژن است [۵۷]، هستند. از بین کشت‌های هم‌زیست مطالعه شده، تنها کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴ تولید هیدروژن در ۱۲ PPFD را به مقدار اندکی افزایش می‌دهند (شکل ۴-۳ و جدول ۴-۱). بیشترین اثر تقویت‌کننده بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴ در شدت نور

۱۰۰ PPFD مشاهده می‌شود، شرایطی که در آن کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس قادر به تولید هیدروژن نمی‌باشند. کشت‌های هم‌زیست ای‌کلای و ریزوبیوم/اتلی تولید هیدروژن را در شدت نور ۵۰ PPFD کمی افزایش می‌دهند. تقویت تولید هیدروژن مربوط به نرخ بالاتر تولید روزانه و یا ادامه داشتن تولید برای مدت طولانی‌تر می‌باشد. تولید هیدروژن در هیچ کدام از کشت‌های کنترلی باکتریایی در شرایط آزمایش دیده نمی‌شود. این نتیجه بیانگر این است که در کشت‌های هم‌زیست، هیدروژن تنها توسط کلامیدوموناس تولید می‌شود.

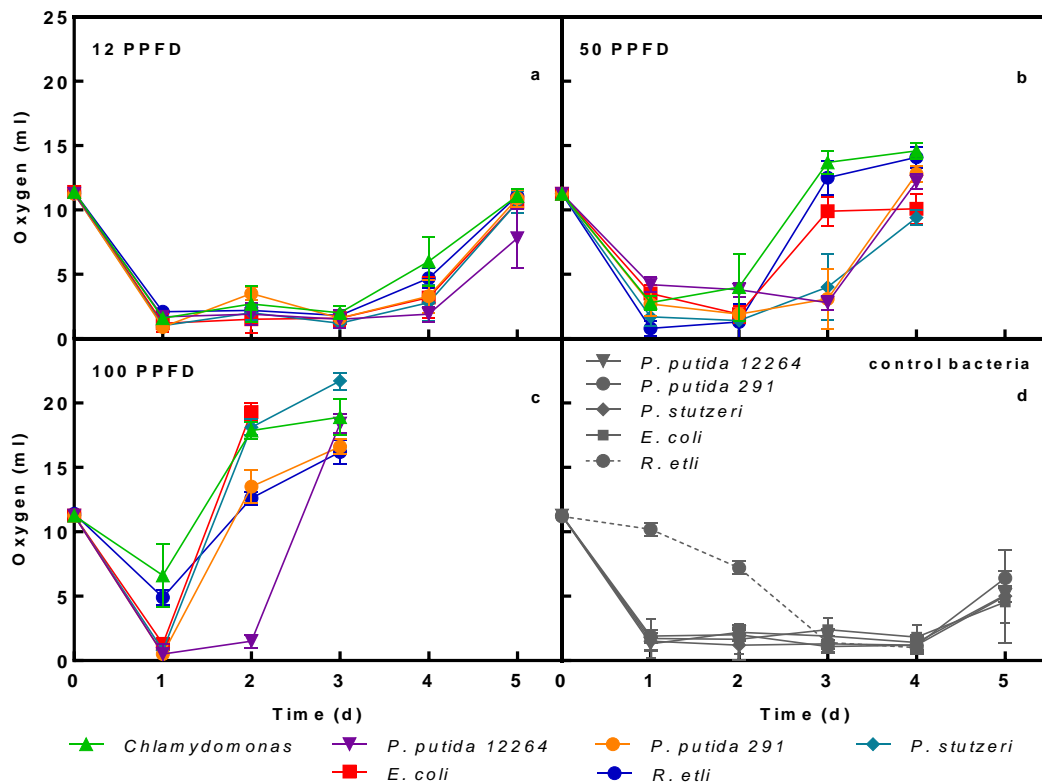


شکل ۳-۴. تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست در شدت نورهای ۱۲ (a)، ۵۰ (b) و ۱۰۰ PPFD (c) و کشت‌های کنترلی باکتری‌ها (d). تولید هیدروژن تا زمانی که تولید آن ادامه داشته ارزیابی شده است. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

در تمام کشت‌های هم‌زیست میزان مصرف اکسیژن نسبت به کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس افزایش می‌یابد (شکل ۴-۴). پس از ۲۴ h، فاز گاز بالاسری تمام کشت‌های کنترلی باکتریایی به غیر از کشت ریزوبیوم/اتلی به شرایط کم‌اکسیژنی می‌رسد و مدت زمان طولانی‌تری نسبت به کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست در این شرایط باقی می‌ماند (شکل ۴-۴). بنابراین تمام باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق غیر از ریزوبیوم/اتلی را می‌توان مصرف‌کننده‌های خوب اکسیژن در محیط کشت TAP در نظر گرفت.

جدول ۴-۱. میزان افزایش تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست نسبت به کشت کنترلی کلامیدوموناس

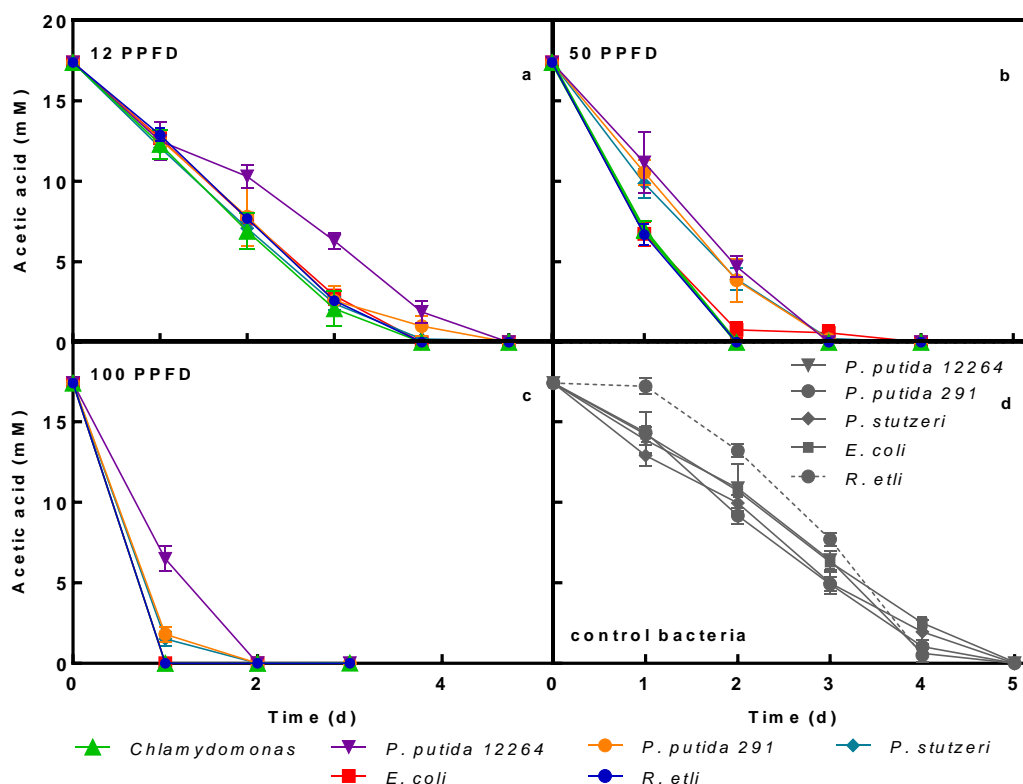
شدت نور (PPFD)			
۱۰۰	۵۰	۱۲	
0.18 ± 0.16	4.3 ± 1.7	17.9 ± 3.1	کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس (ml H ₂ /L culture)
٪ ۲۱۷۵	٪ ۲۳۰	٪ ۵۴/۵	کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴
٪ ۳۳۷	٪ ۱۴۰	٪ ۲۹	کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/ ۲۹۱
٪ ۹۳۷	٪ ۲۶۰	٪ ۲۹	کشت‌های هم‌زیست سودوموناس اشتوتسری
٪ ۰	٪ ۶۰	٪ -۲	کشت‌های هم‌زیست ای کلای
٪ ۰	٪ ۳۰	٪ -۰/۰۸	کشت‌های هم‌زیست ریزوبیوم اتلی



شکل ۴-۴. اکسیژن موجود در فاز گاز بالاسری در کشت‌های هم‌زیست در شدت نورهای ۱۲ (a)، ۵۰ (b) و ۱۰۰ PPFD (c) و کشت‌های کنترلی باکتری‌ها (d). اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

مصرف اسیداستیک در تمام کشت‌های هم‌زیست سودوموناس در شدت نور ۵۰ و ۱۰۰ PPFD به وضوح آهسته‌تر از کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس است (شکل ۴-۵ و جدول ۴-۲). مصرف اسیداستیک در کشت‌های

همزیست سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴ نسبت به کشت های کنترلی کلامیدوموناس در شدت نور ۱۲ PPFD نیز به طور قابل ملاحظه ای کاهش می یابد (شکل ۴-۵). الگوی مصرف اسیداستیک در کشت های همزیست ای کلای و ریزوبیوم اتلی شباهت زیادی به الگوی مصرف در کشت های کنترلی کلامیدوموناس دارد (شکل ۴-۵ و جدول ۴-۲). تمام کشت های کنترلی باکتریایی اسیداستیک را آهسته تر از کشت کنترلی کلامیدوموناس و کشت های همزیست مصرف می کنند. بنابراین در شرایط آزمایش، کلامیدوموناس بیشترین مصرف اسیداستیک را در میان تمام ارگانیسم های مورد بررسی دارد.



شکل ۴-۵. مصرف اسیداستیک در کشت های همزیست در شدت نورهای ۱۲ (a)، ۵۰ (b) و ۱۰۰ PPFD (c) و کشت های کنترلی باکتری ها (d). غلظت اولیه ی اسیداستیک در تمام محیط کشت ها ۱۷/۴ mM بوده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

جدول ۴-۲. نرخ مصرف اسیداستیک در ۲۴ h اول (mmol/h)

کشت‌های کنترلی باکتری	۱۰۰ PPFD	۵۰ PPFD	۱۲ PPFD	
-	۰/۷۳ ± ۰/۱۰۰	۰/۴۳ ± ۰/۱۰۲	۰/۲۱ ± ۰/۱۰۴	کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس
۰/۱۵ ± ۰/۱۰۴	۰/۴۵ ± ۰/۱۰۳	۰/۲۶ ± ۰/۱۰۸	۰/۲ ± ۰/۱۰۵	کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴
۰/۱۳ ± ۰/۱۰۵	۰/۶۵ ± ۰/۱۰۲	۰/۲۹ ± ۰/۱۰۳	۰/۲ ± ۰/۱۰۳	کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/ ۲۹۱
۰/۱۹ ± ۰/۱۰۳	۰/۶۶ ± ۰/۱۰۲	۰/۳۱ ± ۰/۱۰۴	۰/۲۲ ± ۰/۱۰۳	کشت‌های هم‌زیست سودوموناس اشتوتسری
۰/۱۳ ± ۰/۱۰۲	۰/۷۳ ± ۰/۱۰۰	۰/۴۴ ± ۰/۱۰۳	۰/۲ ± ۰/۱۰۲	کشت‌های هم‌زیست ای کلای
۰/۰۱ ± ۰/۱۰۲	۰/۷۳ ± ۰/۱۰۰	۰/۴۵ ± ۰/۱۰۳	۰/۲۱ ± ۰/۱۰۴	کشت‌های هم‌زیست ریزوبیوم اتلی

بین افزایش تولید هیدروژن و کاهش مصرف اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست رابطه‌ی منطقی‌ای مشاهده می‌شود. به طور کلی، با افزایش مدت زمان مصرف اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست، مدت زمانی که کشت در شرایط کم‌اکسیژنی قرار می‌گیرد بیشتر شده و در نتیجه هیدروژن بیشتری تولید می‌شود. قابل توجه است که در تمام کشت‌های هم‌زیست سویه‌های سودوموناس در دو شدت نور ۵۰ و ۱۰۰ PPFD، بیشترین کاهش نرخ مصرف اسیداستیک (شکل ۴-۵ و جدول ۴-۲) و بالاترین افزایش تولید هیدروژن (شکل ۴-۳) مشاهده می‌شود. برای مثال در کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴ در دو شدت نور ۵۰ و ۱۰۰ PPFD، مصرف اسیداستیک به ترتیب تا روز سوم و دوم ادامه داشته و در طول این مدت کشت‌ها در شرایط کم‌اکسیژنی بوده و تولید هیدروژن ادامه دارد. در حالی که در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس، مصرف اسید استیک، شرایط کم‌اکسیژنی و تولید هیدروژن در دو شدت نور ۵۰ و ۱۰۰ PPFD به ترتیب دو و یک روز ادامه دارد. از سوی دیگر مصرف اسیداستیک (شکل ۴-۵)، مصرف اکسیژن (شکل ۴-۴) و در نتیجه تولید هیدروژن (شکل ۴-۳) در کشت‌های هم‌زیست ای کلای و ریزوبیوم اتلی و کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس مشابه هستند. در تمام کشت‌های کنترلی ریزجلبک و باکتری‌ها، مصرف اکسیژن عموماً به مصرف اسیداستیک وابسته است. کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس اسیداستیک را سریع‌تر از تمام کشت‌های کنترلی باکتریایی به خصوص در شدت نورهای بالاتر (۵۰ و ۱۰۰ PPFD) مصرف می‌کنند. در شدت نورهای بالا، اکسیژن تولید شده به وسیله‌ی فعالیت فتوسنتزی مصرف اسیداستیک را بهبود می‌بخشد [۵۷]. قابل ملاحظه است که دلیل اصلی افزایش مدت زمان کم‌اکسیژنی و افزایش تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست سویه‌های سودوموناس مربوط به تنفس اکسیژن توسط باکتری‌ها نبوده، بلکه مرتبط با کاهش ظرفیت مصرف اسیداستیک در این کشت‌ها است. اکسیژن موجود در کشت‌های کنترلی جلبکی برآیند مقدار اکسیژن مصرف شده و مقدار اکسیژن تولید شده است. نتایج مطالعات گذشته نشان داده است که تا زمانی که اسیداستیک در محیط کشت موجود است، شرایط کم‌اکسیژنی در کشت‌های کلامیدوموناس در معرض شدت نور پایین قابل دستیابی است [۵۷]. بنابراین با افزایش مدت زمانی که اسیداستیک در محیط

کشت‌های هم‌زیست باقی بماند می‌توان مدت زمان مصرف این ماده، فاز کم‌اکسیژنی و تولید هیدروژن را افزایش داد. در مقابل مصرف سریع اسیداستیک، مدت زمان کوتاه فاز کم‌اکسیژنی و تولید ناچیز هیدروژن را به همراه دارد. حضور هر سه سویه‌ی سودوموناس به ویژه سودوموناس پوتیدا/۱۲۲۶۴ به وضوح سبب کاهش غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست در مقایسه با کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس در تمام شدت نورها می‌شود. از سوی دیگر غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست ای‌کلای و ریزوبیوم/تلی تغییر ناچیزی دارد (شکل ۴-۱). دو مورد زیر ممکن است در کاهش سرعت مصرف اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست سودوموناس نسبت به کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس نقش داشته باشند:

- ۱) از آنجا که مصرف اسیداستیک به حضور اکسیژن وابسته است [۵۷]، مصرف اکسیژن میزان اکسیژن موجود در محیط کشت را کاهش داده و به طور نسبی مصرف اسیداستیک را ضعیف می‌کند.
- ۲) سویه‌های سودوموناس به وضوح رشد کلامیدوموناس را در کشت‌های هم‌زیست کاهش می‌دهند (شکل ۴-۱)، و در نتیجه ظرفیت مصرف اسیداستیک و تولید اکسیژن کاهش می‌یابد.

در تحقیقی تولید هیدروژن در هم‌زیستی کلامیدوموناس و ای‌کلای در محیط کشت TAP بررسی شده است. افزایش تولید هیدروژن در این کشت هم‌زیست در شدت نور ۵۰ PPFD گزارش شده است [۶۰]. همچنین تولید هیدروژن در این کشت هم‌زیست در محیط کشت TAP-S افزایش یافته است [۶۰]. در حالی که محققان دیگر بهبود ناچیزی در تولید هیدروژن در این کشت هم‌زیست نسبت به کشت کنترلی کلامیدوموناس در TAP-S مشاهده کرده‌اند [۶۳]. در گزارش‌های دیگر نشان داده شده است که در حضور باکتری‌های دیگر مانند برادی ریزوبیوم جاپونیکوم [۵۸، ۶۱]، سویه‌ای از استنوتروفوموناس و میکروباکتریوم [۵۹]، زتوباکتر کروکوکوم [۶۲] و سویه‌های سودوموناس [۵۹، ۶۳] در کشت‌های هم‌زیست با کلامیدوموناس تولید هیدروژن تقویت شده است. همچنین مشاهده شده است که مقدار نشاسته و پروتئین تجمع یافته در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس و سودوموناس در محیط کشت TAP-S افزایش یافته و کاهش کلروفیل کم شده است [۶۳].

عموماً تمام مطالعات گذشته افزایش تولید هیدروژن را نتیجه‌ی اثر تنفس^۱ اکسیژن توسط باکتری‌ها که میزان اکسیژن در کشت‌ها را کاهش داده و سبب تولید هیدروژن می‌شود گزارش کرده‌اند. هرچند محققان نشان داده‌اند که نقصان اکسیژن تنها عامل تقویت تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست نمی‌باشد. عوامل دیگر مانند افزایش زیست‌توده، تجمع نشاسته و یا جلوگیری از تخریب نوری PSII نیز به عنوان پارامترهایی که تولید هیدروژن را در محیط کشت TAP-S افزایش می‌دهند معرفی شده‌اند [۶۱-۶۳]. لازم به ذکر است که تمام محیط کشت‌های مورد استفاده برای بررسی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست دارای یک مشخصه‌ی مهم یعنی حضور اسیداستیک هستند که نشان دهنده‌ی اهمیت این ماده برای تولید بهینه‌ی هیدروژن در این جلبک است. اهمیت

¹ Respiration

نرخ مصرف اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست *ای‌کلای* با *کللامیدوموناس* و *کلرلا*^۱ در تولید هیدروژن قبلاً گزارش شده است [۶۵, ۶۰]. مطالعات گذشته نشان داده است که کاهش نرخ مصرف اسیداستیک سبب طولانی‌تر شدن و افزایش تولید هیدروژن در کشت *کللامیدوموناس* می‌شود [۹۳, ۵۷]. همچنین گزارش شده است که تنها نقش اسیداستیک در فاز تولید هیدروژن کمک به فراهم ساختن شرایط بی‌اکسیژنی^۲ نمی‌باشد [۵۷, ۹۴, ۹۵]. احتمالاً مسیرهای متابولیسمی فعال در شرایط بی‌اکسیژنی و کم‌اکسیژنی متفاوت هستند و در واقع در شرایط کم‌اکسیژنی، مسیرهای متابولیسمی مصرف اسیداستیک در *کللامیدوموناس* به متابولیسم کلروپلاست مرتبط بوده و الکترون‌های لازم برای تولید هیدروژن از طریق مسیر متابولیسمی غیر وابسته به PSII را تامین کنند [۵۷, ۹۶, ۹۷]. قابل تامل است که در کشت‌های هم‌زیست *ای‌کلای* بر خلاف کشت‌های هم‌زیست سوبه‌های *سودوموناس* در شدت نور ۱۰۰ PPFD، هیدروژن تولید نمی‌شود (شکل ۴-۳) با اینکه میزان اکسیژن در تمام این کشت‌های هم‌زیست اندک و نزدیک به صفر است (شکل ۴-۴). اگر چه بعد از ۲۴ h در حالی که غلظت اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست *سودوموناس پوتیدا* ۱۲۲۶۴، *سودوموناس پوتیدا* ۲۹۱ و *سودوموناس اشتوتسری* به ترتیب ۶/۴۹، ۱/۸۱ و ۱/۶۳ mM است، هیچ مقداری از اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست *ای‌کلای* و *ریزوبیوم اتلی* یافت نمی‌شود (شکل ۴-۵). این نتیجه بیان‌کننده‌ی این است که علاوه بر شرایط کم‌اکسیژنی، حضور اسیداستیک نیز برای تولید هیدروژن مهم و ضروری است.

۴-۲-۴. جامعه‌ی میکروبی جلبک و باکتری گزینه‌ای مناسب برای تولید هیدروژن

نتایج این بخش از تحقیق نشان دادند که هم‌زیستی سوبه‌های *سودوموناس* با *کللامیدوموناس* در شرایط غنی از مواد مغذی سبب بهبود تولید هیدروژن در ریزجلبک می‌شود. بر خلاف باور رایج افزایش نرخ مصرف اکسیژن توسط باکتری‌ها تنها دلیل عمده‌ی بهبود تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست نبوده و بلکه غالباً توانایی کاهش نرخ مصرف اسیداستیک در این کشت‌ها سبب طولانی شدن شرایط مناسب برای تولید هیدروژن در سلول‌های *کللامیدوموناس* می‌شود. دانستن این اطلاعات اولیه زمینه‌ی مناسبی برای تحقیقات بعدی ما در راستای تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری ایجاد کرد.

۴-۳. بخش دوم: بررسی اثر منابع کربنی مختلف بر تولید هیدروژن در کشت‌های

هم‌زیست *کللامیدوموناس*-باکتری

در این قسمت از تحقیق ظرفیت تولید هیدروژن توسط جلبک در کشت‌های هم‌زیست *کللامیدوموناس*-*سودوموناس پوتیدا* ۱۲۲۶۴، *ای‌کلای* (سوبه‌ی جهش یافته فاقد آنزیم هیدروژناز (*Δh_{yp}F*)) و *ریزوبیوم اتلی* در

^۱ *Chlorella*

^۲ Anaerobiosis

محیط کشت TAP بررسی شده است (شکل ۴-۶ (a)). تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست در شدت نور PPF ۵۰ مطالعه شده است زیرا نتایج آزمایش‌های قبل نشان دادند که اثر حضور باکتری‌ها بر تولید هیدروژن توسط ریزجلبک در شدت نورهای ۵۰ و PPF ۱۰۰ (جایی که شرایط کم‌اکسیژنی در کشت‌های کنترلی ریزجلبک حاصل نمی‌شود) بهتر نشان داده شده می‌شود. مشابه نتایج بخش قبل تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/ و ای‌کلای به ترتیب ۶/۵ و ۱/۶ برابر تولید هیدروژن در کشت‌های کنترلی ریزجلبک است. در حالی که تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست ریزوبیوم اتلی بهبود نمی‌یابد. هیدروژن در هیچ کدام از کشت‌های کنترل باکتریایی تولید نمی‌شود و این نشان دهنده‌ی این است که در شرایط آزمایش کلامیدوموناس تنها تولید کننده‌ی هیدروژن است. شرایط کم‌اکسیژنی مناسب برای تولید هیدروژن در کشت‌های سودوموناس پوتیدا/ نسبت به کشت‌های هم‌زیست دیگر طولانی‌تر است (شکل ۴-۶ (b)). پس از سه روز در هیچ کدام از کشت‌های هم‌زیست، هیدروژن تولید نمی‌شود (شکل ۴-۶ (a)) و مقدار اسیداستیک موجود در تمام کشت‌ها در روز چهارم صفر بوده است (شکل ۴-۸ (i, f, c)).

۴-۳-۱. اسیداستیک تولید شده توسط باکتری‌ها و تولید هیدروژن در کلامیدوموناس

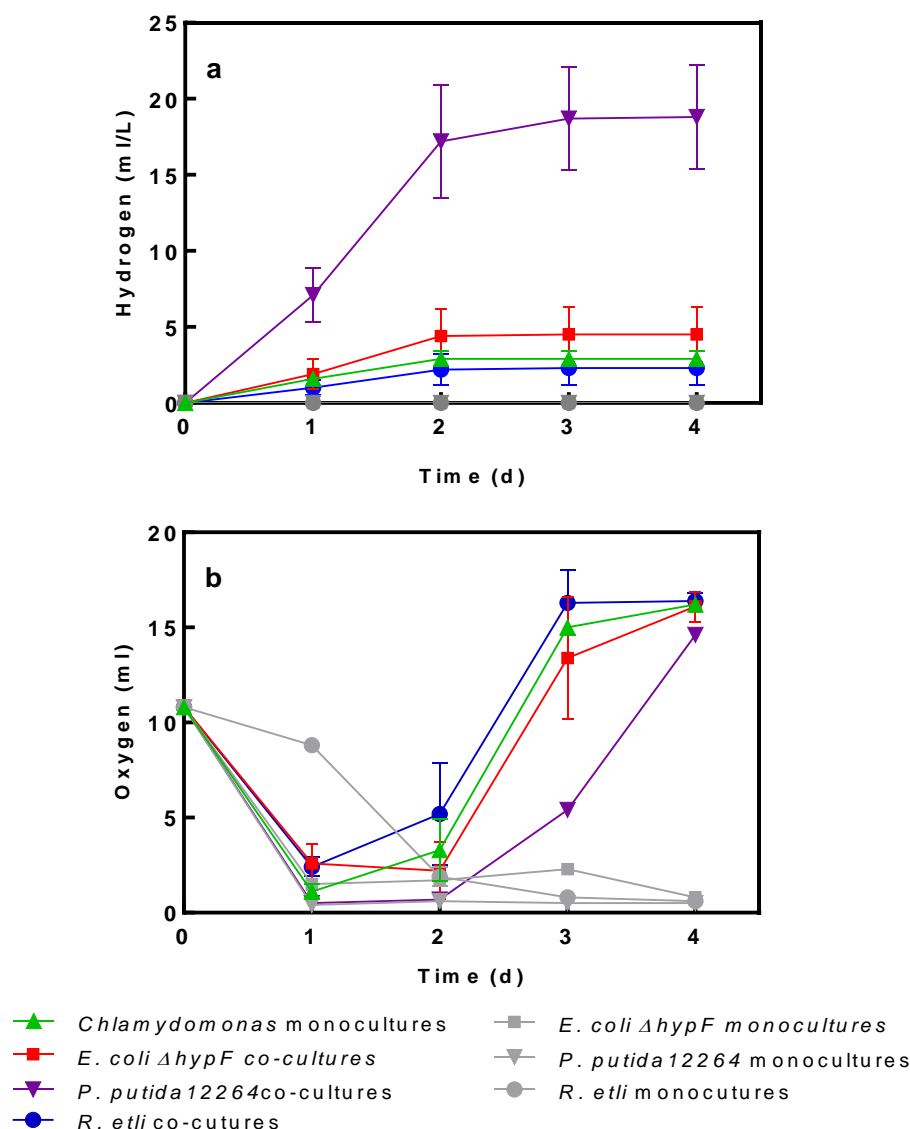
ظرفیت تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت‌های حاوی منابع کربن مختلف بررسی شده است. به این منظور منابع کربن مختلف به کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/، ای‌کلای و ریزوبیوم اتلی نشان داده شده در شکل ۴-۶ در روز چهارم (زمانی که تولید هیدروژن در تمام کشت‌ها متوقف شده و منبع کربن اولیه یعنی اسیداستیک تمام شده بود) اضافه شده است. تمام کشت‌های هم‌زیست در سه شرایط متفاوت بررسی شده‌اند:

۱. ۲۵ mM گلوکز یا مانیتول (منابع کربنی مناسب برای رشد باکتری‌ها) به کشت‌ها اضافه شده است.

۲. ۲۵ mM گلوکز یا مانیتول به همراه ۸ mM اسیداستیک (منبع کربنی مناسب برای رشد کلامیدوموناس) اضافه شده است.

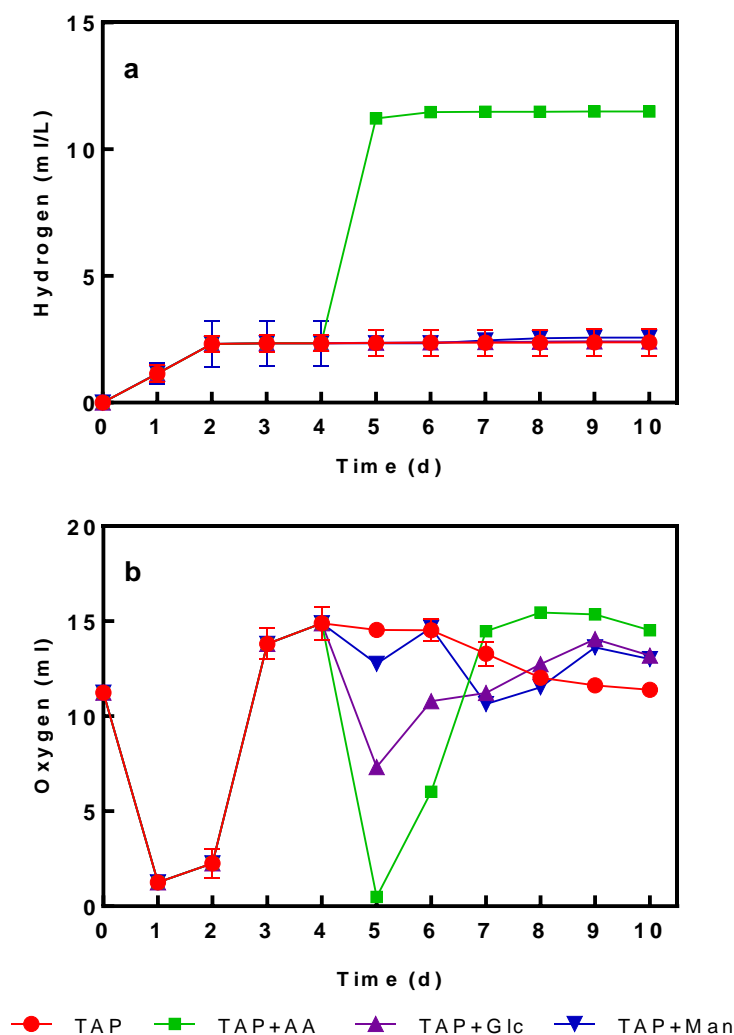
۳. هیچ منبع کربنی اضافه نشده و این کشت‌ها به عنوان کنترل در نظر گرفته شده‌اند.

گلوکز به کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا/ و ای‌کلای و مانیتول به کشت‌های هم‌زیست ریزوبیوم اتلی اضافه شده است. اطلاعات مربوط به مقدار اسیدهای آلی و اتانول در محیط کشت و غلظت کلروفیل از روز چهارم آزمایش پس از اضافه کردن منابع کربنی جدید گزارش شده‌اند.



شکل ۴-۶. هیدروژن تولید شده و اکسیژن موجود در فضای بالاسری کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های کنترلی در محیط کشت TAP و در شدت نور ۵۰ PPFD. در ابتدای تمام آزمایش‌ها، غلظت اولیه‌ی اکسیژن موجود در فضای بالاسری، غلظت اکسیژن اتمسفری است. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس فاز دوم تولید هیدروژن تنها پس از اضافه کردن اسیداستیک مشاهده می‌شود. زمانی که قندها (گلوکز و مانیتول) به این کشت‌ها اضافه می‌شوند، هیدروژن تولید نمی‌شود (شکل ۴-۷ (a)). مطابق انتظار تنها افزودن اسیداستیک سبب بروز شرایط کم‌اکسیژنی در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس می‌شود (شکل ۴-۷ (b)). این نتایج نشان می‌دهد که این جلبک نمی‌تواند گلوکز و مانیتول را برای رشد هتروتروفی مصرف کند. اثر افزودن اسیداستیک در این کشت‌ها مشابه نتایج حاصل شده از مطالعات گذشته است [۵۷].

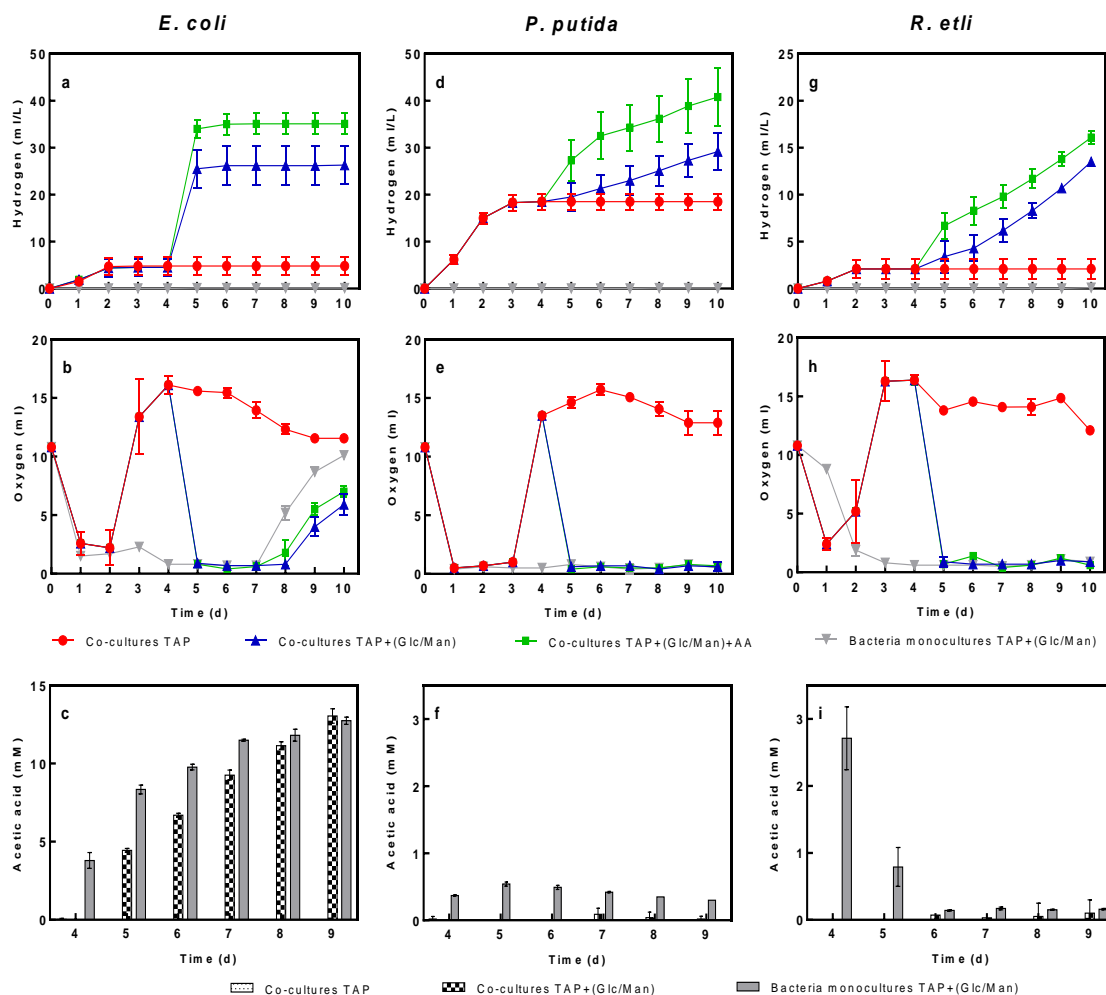


شکل ۴-۷. تولید هیدروژن و مقدار اکسیژن موجود در فضای بالاسری کشت‌های کلامیدوموناس پس از افزودن منابع کربنی آلی در شدت نور ۵۰ PPFD. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است. AA: اسیداستیک، Glc: گلوکز و Man: مانیتول.

در تمام کشت‌های هم‌زیست فاز دوم تولید هیدروژن در تمام شرایط (پس از افزودن قندها یا اسیداستیک) مشاهده می‌شود (شکل ۴-۸ (a, d, g)).

پس از افزودن گلوکز به کشت‌های هم‌زیست ای‌کلای مقدار زیادی هیدروژن تولید می‌شود، در حالی که این تولید تنها برای یک روز ادامه دارد (شکل ۴-۸ (a)). تولید متوسط و طولانی مدت هیدروژن (حداقل ۶ روز) در کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی پس از افزودن قندها مشاهده می‌شود (شکل ۴-۸ (d, g)). کشت‌هایی که هیچ منبع کربنی به آن‌ها اضافه نشده است، از روز چهارم در شرایط هوازی قرار گرفته (شکل ۴-۸ (b, e, h)) و هیدروژن تولید نمی‌کنند (شکل ۴-۸ (a, d, g)). هیچ کدام از باکتری‌ها در کشت‌های کنترلی

پس از افزودن منابع کربنی جدید هیدروژن تولید نمی‌کنند (شکل ۴-۸)، بنابراین در شرایط آزمایش ریزجلبک تنها تولید کننده هیدروژن است.



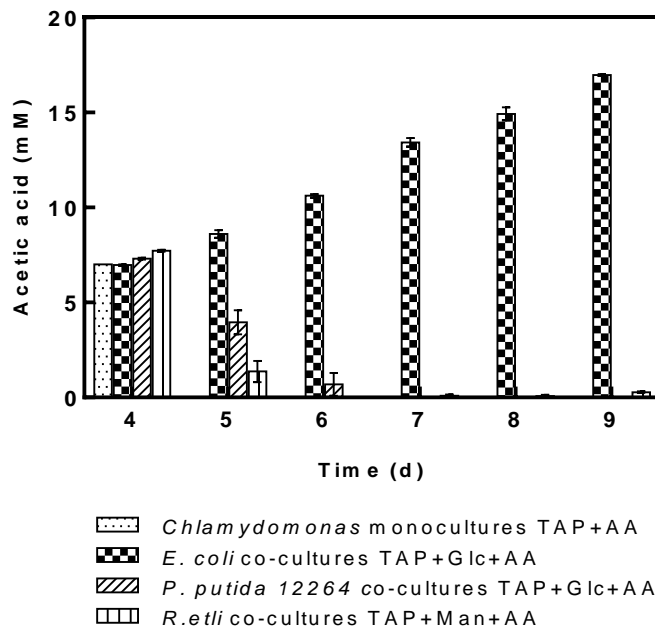
شکل ۴-۸. تولید هیدروژن، مقدار اکسیژن و تجمع اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست پس از افزودن منابع کربنی آلی. در پنل‌های c، f و h، کشت‌های هم‌زیستی که به آن‌ها قند+اسیداستیک اضافه شده است، نشان داده نشده است (به شکل ۴-۹ مراجعه شود). هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است. AA: اسیداستیک، Glc: گلوکز و Man: مانیتول.

نرخ بالاتر تولید هیدروژن در ۲۴ ساعت اول در تمام کشت‌های هم‌زیست، زمانی که قند و اسیداستیک هر دو به کشت‌های مربوطه افزوده شده‌اند نسبت به زمانی که تنها قند به کشت‌ها اضافه شده است حاصل می‌شود (شکل ۴-۸ و جدول ۴-۳).

جدول ۴-۳. نرخ تولید هیدروژن (ml/L.day) در کشت های همزیست پس از افزودن منابع مختلف کربن آلی. نرخ های تولید ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از افزودن منابع کربنی اندازه گرفته شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است. AA: اسیداستیک، Glc: گلوکز و Man: مانیتول.

زمان	کشت های کنترلی کلامیدوموناس		کشت های همزیست ای کلای		کشت های همزیست سودوموناس پوتیدا		کشت های همزیست ریزوبیوم اتلی	
	AA	Glc/Man	Glc+AA	Glc	Glc+AA	Glc	Man+AA	Man
۲۴ h	۷/۳ ± ۲/۲	۰ ± ۰/۰۰	۲۹/۶ ± ۲/۴	۲۱/۰ ± ۴/۵	۸/۵ ± ۲/۳	۰/۶۲ ± ۰/۲	Man+AA	Man
۴۸ h	۳/۲ ± ۰/۴۲	۰ ± ۰/۰۰	۱/۰۱ ± ۰/۰۷	۰/۷۲ ± ۰/۱۵	۵/۲۰ ± ۰/۰۶	۱/۸۱ ± ۰/۰۳	۱/۵۹ ± ۰/۰۹	۰/۸۵ ± ۰/۰۵
۷۲ h	۰ ± ۰/۰۰	۰ ± ۰/۰۰	۰/۰۴ ± ۰/۰۰۲	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۵	۱/۷۲ ± ۰/۱۹	۱/۷۷ ± ۰/۱۴	۱/۵۷ ± ۰/۲۸	۱/۹۲ ± ۰/۱۱

از آنجایی که تمام کشت های همزیست در تمام حالت ها ۲۴ ساعت پس از افزودن منابع کربنی جدید به شرایط کم اکسیژنی می رسند، اختلاف در نرخ تولید هیدروژن مربوط به سطح اکسیژن موجود در فاز گاز در تماس با محیط کشت ها ندارد (شکل ۴-۸ (a, b, c, d)). بنابراین حضور اسیداستیک در تمام کشت های همزیست تولید هیدروژن را افزایش می دهد و این تاثیر محدود به فراهم ساختن شرایط کم اکسیژنی نیست. نتایج مشابهی در کشت های خالص کلامیدوموناس حاصل شده است [۵۷]. قبل و بعد از افزودن منابع کربنی جدید، غلظت اسیداستیک، اتانول، اسیدفرمیک، اسیدلاکتیک، گلوکز و مانیتول در کشت ها به صورت روزانه اندازه گرفته شده است (شکل ۴-۸، ۴-۹ و ۴-۱۰).



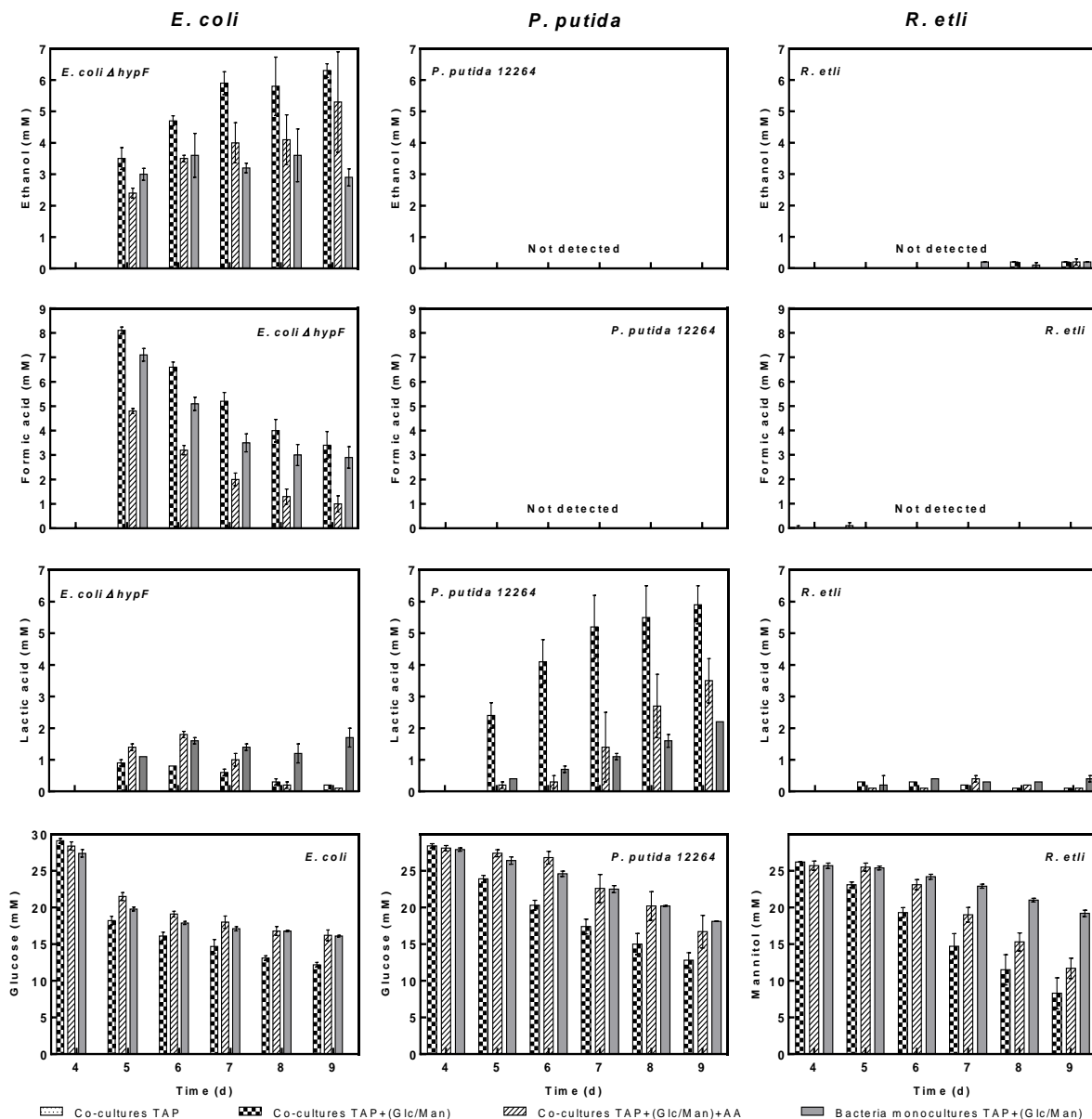
شکل ۴-۹. تجمع/مصرف اسیداستیک در کشت های همزیست پس از افزودن قندها به همراه اسیداستیک به محیط کشت ها. اطلاعات حاضر میانگین نتایج حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است. AA: اسیداستیک، Glc: گلوکز و Man: مانیتول.

۲۴ ساعت پس از اضافه کردن گلوکز به هر دو نوع کشت های همزیست و کنترلی ای کلای، اسیداستیک (شکل ۴-۸ (c))، اتانول، اسیدلاکتیک و اسیدفرمیک (شکل ۴-۱۰) به محیط کشت ترشح می شوند. این نتایج نشان دهنده قابلیت این باکتری در متابولیزه کردن سریع گلوکز به محصولات تخمیری^۱ است. از سوی دیگر در کشت های همزیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی، تجمع اسیداستیک، اتانول و اسیدفرمیک بسیار کاهش یافته و اغلب به صفر می رسد (شکل ۴-۸ و ۴-۱۰). اسیداستیک در کشت های همزیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی به ترتیب از روزهای ۷ام و ۶ام قابل تشخیص و اندازه گیری است (شکل ۴-۸). در مقایسه با اتانول، اسیدفرمیک و اسیداستیک، تجمع اسیدلاکتیک در کشت های همزیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی نسبت به کشت های همزیست ای کلای مشهودتر است. این اطلاعات نشان دهنده تفاوت مسیرهای کاتابولیکی قندها در این ارگانیسم ها در شرایط آزمایش است. احتمالاً کشت های همزیست ای کلای مسیر کاتابولیکی تخمیر مخلوط اسیدها^۲ را طی می کنند که در نتیجه اسیداستیک، اسیدفرمیک، اتانول و اسیدلاکتیک به عنوان محصولات نهایی تجمع می یابند. در صورتی که در کشت های همزیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی مسیرهای کاتابولیکی دیگری که غالباً منجر به تولید اسیدلاکتیک و سوکسینیک اسید (اطلاعات نشان داده نشده است) می شوند، فعال

¹ Fermentative products

² Mixed acid fermentation

هستند [۹۸]. در تمام کشت‌های همزیست، گلوکز و مانیتول تا پایان روز نهم در محیط کشت موجود هستند که نشان دهنده‌ی آن است که قندها عامل محدودکننده‌ی در کشت‌ها نیستند (شکل ۴-۱۰). همچنین در کشت‌های همزیست کنترلی که هیچ منبع کربن جدیدی به آن‌ها اضافه نمی‌شود، اسیداستیک، اتانول، اسیدلاکتیک و اسید فرمیک تولید نمی‌شود (شکل ۴-۸ و ۴-۱۰).

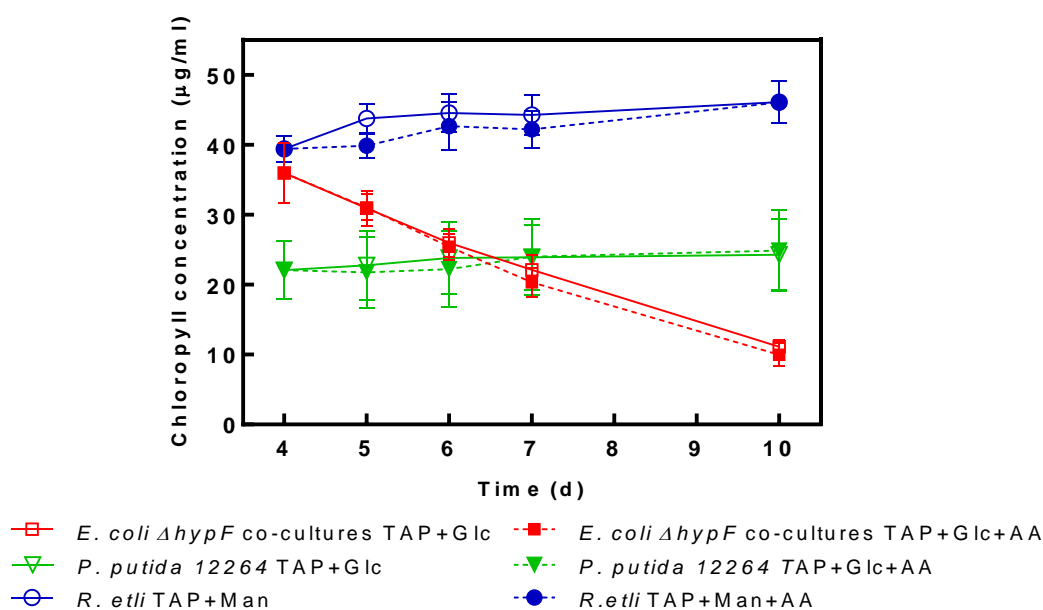


شکل ۴-۱۰. روند تولید محصولات آلی و مصرف قندها در کشت‌های همزیست پس از افزودن منابع کربن آلی. تجمع اتانول، اسیدفرمیک و اسیدلاکتیک از روز چهارم نشان داده شده‌اند. مصرف گلوکز و مانیتول نیز اندازه‌گیری و نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است. AA: اسیداستیک، Glc: گلوکز و Man: مانیتول.

به طور کلی هر سه باکتری مورد آزمایش در این تحقیق (ای‌کلای، سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی) با مصرف قندها (گلوکز و مانیتول) اسیداستیک، هرچند با نرخ‌های متفاوت، تولید می‌کنند (شکل ۴-۸ (i, f, c)). کشت‌های هم‌زیست ای‌کلای نرخ بالای تولید اسیداستیک با مصرف گلوکز را دارند (۴/۴۵ mM پس از ۲۴ ساعت)، در حالی که در کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی نرخ بسیار کم تولید استیک اسید به ترتیب پس از ۷۲ ساعت و ۴۸ ساعت مشاهده می‌شود. این اختلاف نرخ تولید اسیداستیک با مصرف قندها در باکتری‌ها می‌تواند دلیل نرخ تولید متفاوت هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست باشد. در کشت‌های هم‌زیستی که تنها قند مربوطه به آن‌ها اضافه شده است، رابطه‌ی منطقی و خوبی بین تجمع اسیداستیک در محیط کشت و تولید هیدروژن وجود دارد. برای مثال در کشت‌های هم‌زیست ای‌کلای در طول ۲۴ ساعت پس از افزودن گلوکز، مقدار بسیار زیادی اسیداستیک در محیط کشت و هیدروژن با نرخ بسیار بالا (۲۱ ml/day) در فاز گاز بالاسری تولید می‌شوند (جدول ۴-۳). در حالی که در همین مدت تجمع اسیداستیک در محیط کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی به حدی ناچیز است که قابل اندازه‌گیری نبوده و هیدروژن نیز با نرخ پایینی (به ترتیب ۰/۶۲ و ۱/۱۳ ml/day) تولید می‌شود (جدول ۴-۳). یادآوری می‌شود که این اختلاف در نرخ‌های اولیه‌ی تولید هیدروژن مستقل از سطح اکسیژن محیط است زیرا تمام کشت‌های هم‌زیست پس از ۲۴ ساعت به شرایط کم‌اکسیژنی می‌رسند (شکل ۴-۸).

همانطور که قبلاً بیان شد، نرخ اولیه‌ی تولید هیدروژن زمانی که اسیداستیک و قند مربوطه به طور هم‌زمان به کشت‌های هم‌زیست اضافه شوند بیشتر از زمانی است که تنها قند به محیط کشت این کشت‌ها افزوده می‌شود. این اختلاف در ۲۴ ساعت اول پس از افزودن منابع کربنی جدید به کشت‌ها در کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی مشهودتر است. پس از آن (۷۲-۴۸ h) این اختلاف در نرخ تولید هیدروژن تقریباً از بین می‌رود (شکل ۴-۸ و جدول ۴-۳). در کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی اسیداستیک اضافه شده در روز چهارم به طور کامل بعد از به ترتیب ۷۲ و ۴۸ h تمام می‌شود (شکل ۴-۹) که دقیقاً با نرخ‌های تولید هیدروژن مطابقت دارد (جدول ۴-۳). شباهت زیادی در غلظت اسیداستیک موجود در محیط کشت و نرخ تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی مشاهده می‌شود. به علاوه، با وجود اینکه در روزهای اول پس از افزودن قند به محیط کشت‌های هم‌زیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی اسیداستیک در حد دقت اندازه‌گیری دتکتور RID در کروماتوگرافی مایع مشاهده نمی‌شود فرض بر آن است که مقدار اسیداستیک مورد نیاز برای تولید هیدروژن تولید و مصرف می‌شود. از سوی دیگر در کشت‌های هم‌زیست ای‌کلای، نه تنها اسیداستیک افزوده شده در روز چهارم مصرف نمی‌شود و بلکه اسیداستیک بیشتری در محیط کشت تجمع می‌یابد (شکل ۴-۹). تجمع سریع و شدید اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست ای‌کلای اثر افزودن اسیداستیک بر تولید هیدروژن در این کشت‌ها را کاهش می‌دهد. به همین دلیل اختلاف اندکی در نرخ‌های تولید هیدروژن پس از افزودن منابع کربنی جدید به کشت‌های هم‌زیست ای‌کلای مشاهده می‌شود.

تداوم تولید هیدروژن در فاز دوم تولید (پس از افزودن منابع کربنی جدید) در کشت های همزیست متفاوت است. تولید هیدروژن در کشت های همزیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی حداقل شش روز ادامه دارد. در حالی که در کشت های همزیست ای کلای تنها یک روز تولید هیدروژن مشاهده می شود (شکل ۴-۸). پایداری در تولید هیدروژن به زنده بودن سلول های کلامیدوموناس مرتبط است. اضافه کردن گلوکز به کشت های همزیست ای کلای سبب کاهش سریع مقدار کلروفیل موجود در کشت می شود (شکل ۴-۱۱)، همچنین رنگ این کشت ها از سبز به زرد تغییر می کند (شکل ۴-۱۲). این نتایج نشان دهنده مرگ سلول های کلامیدوموناس هستند. از سوی دیگر مقدار کلروفیل موجود در کشت های همزیست سودوموناس پوتیدا و ریزوبیوم اتلی پس از اضافه کردن به ترتیب گلوکز و مانیتول به این کشت ها تغییر نکرده (شکل ۴-۱۱) و رنگ آن ها به صورت سبز ثابت باقی می ماند و به همین دلیل تولید هیدروژن برای مدت زمان طولانی تر حاصل می شود (شکل ۴-۸). تجمع مقدار زیادی محصولات تخمیری ترشح شده در کشت های همزیست ای کلای سبب اسیدی شدن محیط کشت (پایین آمدن pH تا حدود ۴/۵) و در نتیجه مرگ سلول های کلامیدوموناس می شود.



شکل ۴-۱۱. غلظت کلروفیل در کشت های همزیست پس از افزودن منابع کربنی آلی. غلظت کلروفیل کشت ها از روز چهارم نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است. AA: اسیداستیک، Glc: گلوکز و Man: مانیتول.



شکل ۴-۱۲. تغییر رنگ کشت‌های هم‌زیست، ۲۴ h پس از افزودن قندها (گلوکز و مانیتول). به ترتیب از چپ به راست کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-ای‌کلای، کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا ۱۲۲۶۴ و کلامیدوموناس-ریزوبیوم اتلی نشان داده شده‌اند.

به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که حضور اسیداستیک در محیط کشت (تولید شده از متابولیسم باکتری‌ها و یا اضافه شده به محیط کشت) اثر مثبتی بر تولید هیدروژن دارد و این اثر به فراهم ساختن شرایط کم‌اکسیژنی محدود نمی‌شود. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که زمانی که کلامیدوموناس در محیط کشت غنی از اسیداستیک و در شرایط کم‌اکسیژنی در روشنایی قرار داشته باشد، مسیر مستقل از فتوسیستم ۲، مسیر متابولیکی غالب تولید هیدروژن است [۵۷، ۹۳]. در این شرایط بین تولید هیدروژن و مقدار ذخیره‌ی نشاسته ارتباطی وجود ندارد [۵۷]. تحقیقات گذشته بیان داشته‌اند که ممکن است بین تولید هیدروژن و مصرف اسیداستیک به خصوص در شرایط کم‌اکسیژنی ارتباط وجود داشته باشد [۵۷، ۹۶، ۹۷]. ممکن است در شرایط کم‌اکسیژنی مسیرهای متابولیکی مربوط به مصرف اسیداستیک در کلامیدوموناس به متابولیسم کلروپلاست مرتبط باشد و به صورت بالقوه الکترون‌های لازم برای تولید هیدروژن از طریق مسیر متابولیکی مستقل از فتوسیستم ۲ را فراهم کنند [۵۷، ۹۶، ۹۷]. اطلاعات به دست آمده در این تحقیق به وضوح نشان می‌دهند که مصرف اسیداستیک نقش موثر و فعالی در تولید هیدروژن در کلامیدوموناس دارد.

۴-۳-۲. هم‌افزایی^۱ تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-ای‌کلای

نتایج قبل نشان دادند که کشت هم‌زیست کلامیدوموناس-ای‌کلای بالاترین ظرفیت تولید هیدروژن را دارند. هرچند سویه‌ی ای‌کلای مورد بررسی، سویه‌ای جهش یافته فاقد آنزیم هیدروژناز (*Ahpf*) بود. بنابراین پتانسیل این باکتری برای شرکت در فرایند تولید هیدروژن در این کشت‌ها بررسی نشد. به این منظور در این بخش از تحقیق تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست شامل کلامیدوموناس و سویه‌ی وحشی از ای‌کلای (*E. coli* K12) مطالعه شده است. همچنین افزودن ۲۵ mM گلوکز اثر مخرب شدیدی بر زیست‌پذیری سلول‌های کلامیدوموناس

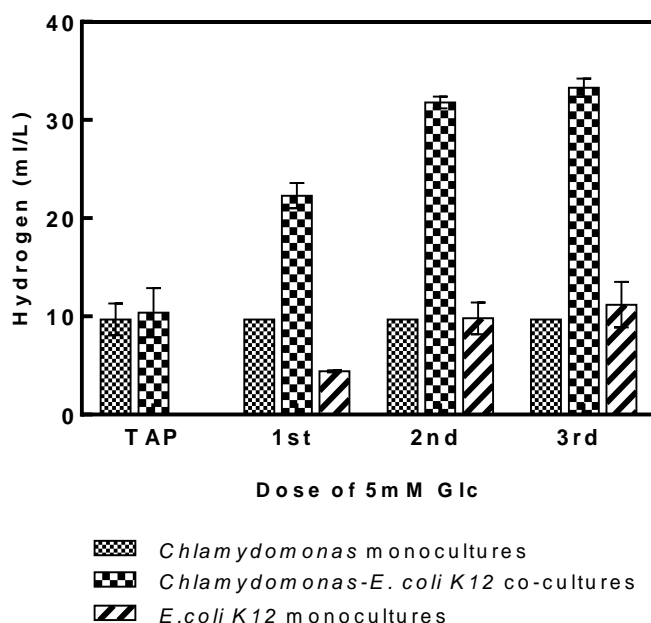
^۱ Synergy

در کشت‌های هم‌زیست (احتمالاً به دلیل کاهش pH محیط) داشت. به همین دلیل برای پایداری بیشتر کارایی این کشت‌های هم‌زیست افزودن غلظت‌های کمتر گلوکز (۱، ۵ و ۱۰ mM) بررسی شده است. به علاوه تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که بهینه تولید هیدروژن در کشت‌های خالص کلامیدوموناس در محیط کشت TAP در معرض شدت نور ۱۲ PPFD حاصل می‌شود. در معرض شدت نور ۱۲ PPFD، توازن بین تولید و مصرف اکسیژن منجر به ایجاد کم اکسیژنی و باقی ماندن در این شرایط برای مدت زمان طولانی‌تر نسبت به شدت نورهای دیگر شده و تولید هیدروژن افزایش می‌یابد [۵۷]. بنابراین در این بخش به منظور بررسی اثر حضور *ای‌کلای* بر تولید بهینه‌ی هیدروژن در کلامیدوموناس در شرایط آزمایش و یافتن بیشینه تولید هیدروژن از مجموع تولید هیدروژن در روشنایی در ریزجلبک و تولید تخمیری هیدروژن در باکتری، تمام آزمایش‌ها در معرض شدت نور ۱۲ PPFD انجام شده‌اند. در ابتدا اثر افزودن ۱، ۵ و ۱۰ mM گلوکز به کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-*ای‌کلای* و کشت‌های خالص کنترلی این ریزجلبک و باکتری در معرض شدت نور ۱۲ PPFD در روز پنجم آزمایش، زمانی که مقدار اولیه‌ی اسیداستیک در تمام کشت‌ها مصرف شد، ارزیابی شده است (جدول ۴-۴). نتایج نشان داده شده در جدول ۴-۴، اطلاعات به دست آمده از تولید هیدروژن، pH و غلظت کلروفیل در کشت‌ها در روز هشتم آزمایش، زمانی که تولید هیدروژن در تمام کشت‌ها پس از افزودن مقادیر مختلف گلوکز متوقف می‌شود، است. از آنجا که گلوکز توسط ریزجلبک مصرف نمی‌شود، بنابراین هیچ کدام از غلظت‌های گلوکز تأثیری بر رشد و تولید هیدروژن در کشت‌های خالص کلامیدوموناس ندارند. همچنین اضافه کردن ۱ mM گلوکز به کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های خالص *ای‌کلای* اثر قابل توجهی بر سطح اکسیژن موجود در این کشت‌ها ندارد و بهبودی در تولید هیدروژن ایجاد نمی‌کند. در حالی که پس از افزودن ۵ و ۱۰ mM گلوکز، فاز دوم تولید هیدروژن در هر دو گروه کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های خالص *ای‌کلای* به مدت یک یا دو روز مشاهده می‌شود.

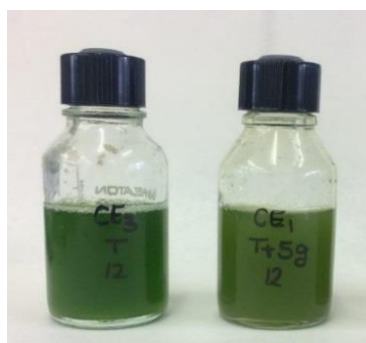
جدول ۴-۴. تولید هیدروژن، تغییرات pH و درصد تغییرات غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-*ای‌کلای* و کشت کنترلی *ای‌کلای* پس از افزودن غلظت‌های مختلف گلوکز به محیط کشت‌ها. از سویه‌ی وحشی *ای‌کلای* (K12 MG1655) استفاده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

تغییرات کلروفیل (%)		pH		H ₂ (ml/L)		غلظت گلوکز
کشت‌های کنترلی <i>ای‌کلای</i>	کشت‌های هم‌زیست	کشت‌های کنترلی <i>ای‌کلای</i>	کشت‌های هم‌زیست	کشت‌های کنترلی <i>ای‌کلای</i>	کشت‌های هم‌زیست	
-	۰	۷/۴۲ ± ۰/۰۱	۷/۶۴ ± ۰/۰۲	۰ ± ۰/۰۰	۰ ± ۰/۰۰	۰ mM
-	+ ۷/۸	۷/۳۲ ± ۰/۰۱	۷/۵۱ ± ۰/۰۴	۰ ± ۰/۰۰	۰/۱ ± ۰/۰۶	۱ mM
-	+ ۱/۲	۶/۶۲ ± ۰/۰۷	۷/۱۳ ± ۰/۰۸	۳/۸ ± ۰/۵۶	۱۱/۹ ± ۲/۵۶	۵ mM
-	- ۲۰/۱	۵/۳۹ ± ۰/۰۲	۵/۱۷ ± ۰/۱۵	۱۰/۴ ± ۲/۱۹	۱۰ ± ۰/۸۲	۱۰ mM

زمانی که ۵ mM گلوکز اضافه شده است، تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست بیشتر از سه برابر تولید هیدروژن در کشت‌های خالص *ای‌کلای* است. در حالی که پس از افزودن ۱۰ mM گلوکز، تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست تغییر قابل توجهی نسبت به کشت‌های خالص *ای‌کلای* نمی‌کند (جدول ۴-۴). با اضافه کردن گلوکز pH محیط کاهش می‌یابد. پس از اضافه کردن ۱۰ mM گلوکز، pH کمتر از ۶ می‌شود و در کشت‌های هم‌زیست کاهش مقدار کلروفیل به طور هم‌زمان مشاهده می‌شود. شرایط اسیدی حاصل شده پس از افزودن ۱۰ mM گلوکز و یا بیشتر سبب مرگ سلول‌های *کلامیدوموناس* می‌شود (شکل ۴-۱۱ و جدول ۴-۴). بنابراین مشارکت بین ریزجلبک و باکتری در تولید هیدروژن پس از افزودن ۱۰ mM گلوکز به کشت‌های هم‌زیست قابل تشخیص نیست. اثر هم‌افزایی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست *کلامیدوموناس-ای‌کلای* تنها زمانی قابل مشاهده است که ۵ mM گلوکز به محیط کشت اضافه شود زیرا بر طبق اطلاعات به دست آمده از غلظت کلروفیل و pH سلول‌های *کلامیدوموناس* در این شرایط زنده باقی می‌مانند. کشت‌های هم‌زیست *کلامیدوموناس-ای‌کلای* و کشت‌های خالص *کلامیدوموناس* و *ای‌کلای* در محیط کشت TAP کشت داده شده و پس از آن ۵ mM به صورت ناپیوسته و در دفعات گوناگون به این کشت‌ها اضافه شده است (شکل ۴-۱۳). قبل از اضافه کردن گلوکز، تنها کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های خالص *کلامیدوموناس* هیدروژن تولید می‌کنند. اولین دوز ۵ mM گلوکز پس از پایان اولین فاز تولید هیدروژن در محیط کشت TAP در روز پنجم به تمام کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های خالص اضافه می‌شود. پس از افزودن گلوکز دومین فاز تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست و اولین فاز تولید هیدروژن در کشت‌های خالص *ای‌کلای* ظاهر می‌شود. مجموع تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست (۲۲/۳ ml/L) بیشتر از مجموع تولید هیدروژن در کشت‌های خالص (۹/۷ و ۴/۴ ml/L) به ترتیب در کشت‌های خالص *کلامیدوموناس* و *ای‌کلای*) است که نشان دهنده هم‌افزایی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست این دو میکروارگانیسم است. سه روز پس از ورود اولین دوز گلوکز به محیط کشت‌ها، زمانی که تولید هیدروژن در فاز دوم به پایان رسیده است، دومین دوز ۵ mM گلوکز به کشت‌ها اضافه شده است. سومین فاز تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست (۹/۵ ml/L) و کشت‌های خالص *ای‌کلای* (۵/۴ ml/L) مشاهده می‌شود (شکل ۴-۱۳). سه روز بعد پس از اضافه کردن سومین دوز ۵ mM گلوکز مقدار قابل توجهی هیدروژن تولید نمی‌شود (شکل ۴-۱۳) با اینکه کشت‌های *کلامیدوموناس* در وضعیت ظاهری مناسبی قرار دارند (شکل ۴-۱۴).



شکل ۴-۱۳. تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-ای کلای پس از تزریق گلوکز به صورت فدیج. ارگانیسم ها در شدت نور ۱۲ PPFD کشت داده شده اند. از سویه ی وحشی ای کلای (K12 MG1655) استفاده شده است. ۵ mM گلوکز در سه بیج تزریق شده است. تولید هیدروژن قبل و پس از هر بار تزریق به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۱۴. تصویر کشت های همزیست کلامیدوموناس-ای کلای در روز ۱۲ام در محیط کشت های مختلف. به ترتیب از چپ به راست در محیط کشت TAP و در محیط کشت بر پایه ی TAP که به آن سه دوز ۵ mM گلوکز اضافه شده است.

نتایج آنالیز فاز مایع نشان می دهد که گلوکز اضافه شده در هر فاز در طول مدت ۲۴ ساعت به طور کامل در کشت های همزیست و کشت های خالص ای کلای مصرف می شود. محصولات تخمیری به دست آمده ۲۴ ساعت بعد از افزودن هر دوز گلوکز ارزیابی شده و نتایج در جدول ۴-۵ گردآوری شده اند. به طور کلی، اختلاف قابل توجهی بین تجمع اتانول، اسیدفرمیک و اسیدلاکتیک در کشت های همزیست و کشت های خالص ای کلای مشاهده نمی شود. در حالی که تجمع اسیدلاکتیک پس از ورود اولین دوز گلوکز به محیط کشت ها در کشت های همزیست

۷۰٪ کمتر از تجمع آن در کشت‌های خالص *ای کلای* است. پس از افزودن دومین دوز گلوکز این اختلاف به ۱۹٪ کاهش می‌یابد و پس از ۱۲ روز (اضافه کردن سومین دوز گلوکز) مقدار این متابولیت در هر دو کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های خالص باکتری تقریباً برابر است که نشان دهنده‌ی این است که مقدار مصرف آن در هر دو گروه کشت‌ها یکسان است (جدول ۴-۵).

جدول ۴-۵. تجمع مواد آلی در کشت‌های هم‌زیست *کلامیدوموناس-ای کلای* و کشت‌های کنترل *ای کلای* پس از تزریق فدیج گلوکز. از سویه‌ی وحشی *ای کلای* (K12 MG1655) استفاده شده است. ۵ mM گلوکز در روزهای ۵، ۸ و ۱۱ به محیط کشت‌ها تزریق شده است. غلظت اسیداستیک، اسیدفرمیک، اسیدلاکتیک و اتانول، ۲۴ ساعت بعد از تزریق گلوکز گزارش شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

کشت	زمان (day)	۶	۹	۱۲
	اسیداستیک	۱/۴ ± ۰/۳	۴/۲ ± ۰/۱	۵/۵ ± ۰/۶
کشت‌های هم‌زیست	اسیدفرمیک	۳ ± ۰/۲	۳/۷ ± ۰/۲	۴ ± ۰/۳
<i>ای کلای</i>	اسیدلاکتیک	nd	۰/۲ ± ۰/۰	۱ ± ۰/۳
	اتانول	۲/۷ ± ۰/۱	۲/۹ ± ۰/۳	۴/۴ ± ۰/۳
	اسیداستیک	۴/۷ ± ۰/۴	۵/۲ ± ۰/۴	۵/۷ ± ۰/۱
کشت‌های کنترلی	اسیدفرمیک	۳/۱ ± ۰/۱	۴/۶ ± ۰/۵	۲/۳ ± ۰/۳
<i>ای کلای</i>	اسیدلاکتیک	۰/۱ ± ۰/۰۰	۰/۱ ± ۰/۰	۰/۹ ± ۰/۱
	اتانول	۲/۳ ± ۰/۰	۳/۴ ± ۰/۲	۴/۷ ± ۰/۳

nd: not detected

بنابراین ظرفیت *کلامیدوموناس* برای مصرف اسیداستیک تولید شده توسط *ای کلای* در طول زمان آزمایش کاهش می‌یابد، همانطور که در مطالعات گذشته کاهش توانایی مصرف اسیداستیک در کشت‌های خالص *کلامیدوموناس* وقتی اسیداستیک به طور مستقیم و ناپیوسته در مدت ۱۰ روز به کشت‌ها اضافه می‌شود گزارش شده است [۵۷]. به احتمال زیاد تمام شدن منابع مغذی دیگر مانند منبع نیتروژن سبب قطع مصرف اسیداستیک می‌شود. ممکن است بتوان با کشت هم‌زیست در شرایط پیوسته^۱ این مشکل را حل کرد. کاهش ظرفیت مصرف اسیداستیک بعد از ۱۲ روز نشان دهنده‌ی علت احتمالی توقف تولید هیدروژن پس از اضافه کردن دوز سوم mM ۵ گلوکز به کشت‌های هم‌زیست است (شکل ۴-۱۳).

^۱ Continuous

با دانش ما، این تحقیق اولین گزارش از تولید تجمعی هیدروژن در کلامیدوموناس و باکتری همراه است. دو تحقیق دیگر نیز در رابطه با تولید هیدروژن در جلبک در محیط کشت بازمانده از کشت باکتری‌ها که غنی از اسیداستیک است، گزارش شده است. جلبک میکروکتینیوم ریسی^۱، $191/2 \text{ ml H}_2/\text{L}$ در محیط کشت غنی شده از محصولات تخمیری باکتریایی (استات و بوتیرات) تولید کرده است [۹۹]. به طور مشابه، افزودن گلوکز به فاضلاب در شرایط تخمیری سبب تجمع اسیداستیک در محیط کشت شده است. کشت جلبک در این محیط کشت سبب افزایش تولید هیدروژن در روشنایی ($5/22 \text{ mmol H}_2$) در کنسرسیوم طبیعی که سویه‌ای از کلرلا جمعیت غالب آن است شده است [۱۰۰]. این گزارش‌ها با نتایج به دست آمده از این تحقیق مطابقت داشته و نشان می‌دهند که ریزجلبک‌ها می‌توانند از محصولات تخمیری باکتری‌ها برای تولید هیدروژن استفاده کنند. مقدار هیدروژن تولید شده در مطالعات ذکر شده بیشتر از مقدار حاصل شده در این تحقیق است زیرا در طراحی آزمایش‌های ما شرایط برای تولید هیدروژن در *ای‌کلای* بهینه نیست. برای مثال مواد مورد نیاز برای رشد باکتری‌ها (ویتامین‌ها و کوفاکتورها) مانند تیامین، ریبوفلاوین یا بیوتین در محیط کشت TAP وجود ندارند. هرچند در تحقیقات ذکر شده باکتری‌ها ناشناخته بوده و تولید هیدروژن در فاز دوم سیستم پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت اولیه و ترشح محصولات تخمیری اتفاق می‌افتد. همچنین هم‌افزایی تولید هیدروژن تا کنون گزارش نشده است.

۳-۳-۴. جوامع ریزجلبک-باکتری منابع مناسبی برای تولید هیدروژن هستند.

گزارش‌ها نشان می‌دهند که تولید هیدروژن توسط کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست این ریزجلبک با باکتری‌های مختلف در هر دو شرایط کشت غنی از مواد مغذی (TAP) و عاری از سولفور (TAP-S) بهبود یافته است [۵۸-۶۵]. در بیشتر این تحقیقات از باکتری‌هایی که هیدروژن تولید نمی‌کنند استفاده شده است. تنها Lakatos و همکاران (۲۰۱۴) از هم‌زیستی باکتری‌هایی مانند *ای‌کلای*، رودوکوکوس و *راستونیا یوتروفان*^۲ که پتانسیل تولید هیدروژن دارند با کلامیدوموناس استفاده شده است. هرچند هر سه نوع کشت هم‌زیست در محیط کشتی مورد بررسی قرار گرفتند که تنها منبع کربن موجود در آن اسیداستیک بوده است. قابل توجه است که محققان در این تحقیق اغلب از سویه‌های جهش یافته‌ی این باکتری‌ها که فاقد فعالیت آنزیم هیدروژناز هستند استفاده کرده‌اند. در گروه دیگری از مطالعات، کلامیدوموناس به عنوان منبع زیست‌توده، نشاسته و یا محصولات تخمیری حاصل شده از نشاسته برای تولید هیدروژن توسط باکتری‌ها استفاده شده است [۶۸, ۷۹, ۱۰۱]. برخلاف کشت‌های هم‌زیست شامل باکتری‌های مختلف، تولید هیدروژن، به خصوص تولید ترکیبی آن، توسط کلامیدوموناس (یا جلبک دیگر) و شریک باکتریایی به ندرت بررسی شده است [۱۸].

^۱ *Micractinium reisseri*

^۲ *Ralstonia eutropha*

در این بخش از تحقیق، اثر منابع کربنی مختلف بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری در روشنایی بررسی شد. نتایج نشان دادند که تولید هیدروژن در محیط کشت عاری از اسیداستیک تنها زمانی امکان‌پذیر است که به کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری قند اضافه شود. باکتری موجود قند را مصرف کرده و اسیداستیک را در فرایندهای تخمیری تولید می‌کند. نتایج بخش قبل نشان دادند که حضور اسیداستیک در محیط کشت برای تولید هیدروژن در کلامیدوموناس در شرایط کم‌اکسیژنی و در روشنایی ضروری است. اسیداستیک مورد نیاز را می‌توان به طور مستقیم به محیط کشت اضافه کرد و یا از هم‌زیستی باکترهای تولید کننده‌ی این متابولیت با کلامیدوموناس بهره‌مند شد. نقش اسیداستیک تنها به فراهم ساختن شرایط کم‌اکسیژنی محدود نشده و به احتمال زیاد متابولیسم مصرف آن به تولید هیدروژن در این ریزجلبک مرتبط است. بنابراین نقش اسیداستیک در تولید هیدروژن در کلامیدوموناس نیاز به تحقیق و بررسی دقیق دارد. دانستن مکانیزم دقیق تولید هیدروژن در حضور اسیداستیک به ما کمک می‌کند که بتوانیم در آینده بازده تولید را از طریق بهبود شرایط فیزیولوژی و دستکاری ژنتیکی افزایش دهیم.

۴-۴. بخش سوم: خالص سازی و شناسایی اعضای جامعه‌ی باکتریایی و بررسی اثر

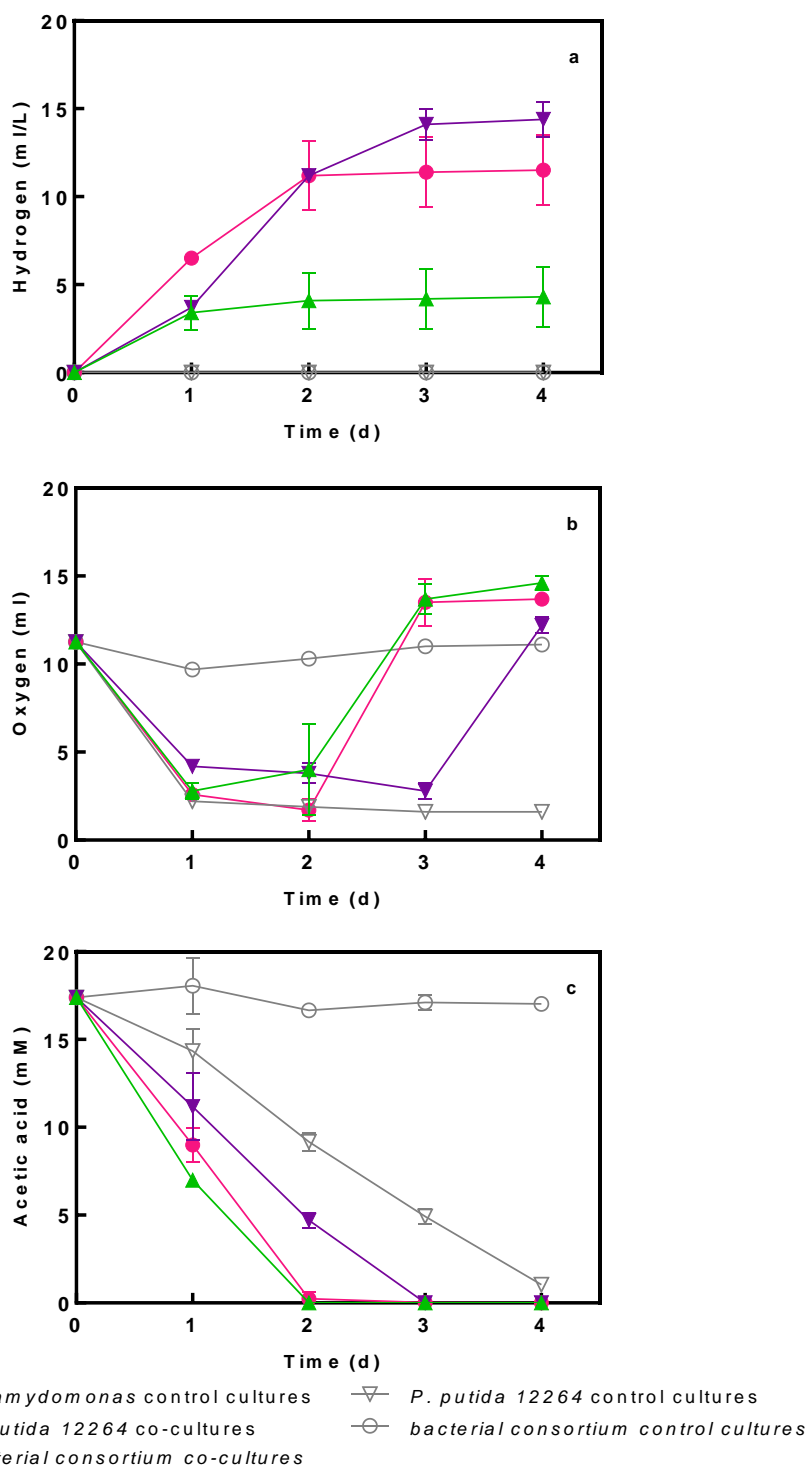
این باکتری‌ها بر رشد و تولید هیدروژن کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست.

در این قسمت از تحقیق اثر هم‌زیستی یک جامعه‌ی باکتریایی جدا شده از کشت ریزوبیوم لگومینوساروم با اثر هم‌زیستی سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴ بر رشد و تولید هیدروژن کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست این باکتری‌ها با جلبک نامبرده در محیط کشت TAP و تحت شدت نور ۵۰ PPFD مقایسه و بررسی شده است. (شکل ۴-۱۵، ۴-۱۶).

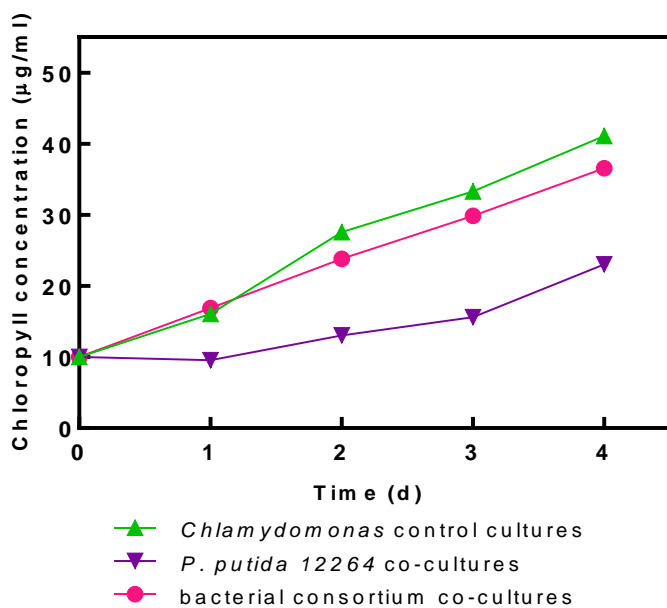
جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته عملکرد متفاوتی نسبت به دیگر باکتری‌های بررسی شده نشان می‌دهد. هم‌زیستی با این جامعه‌ی میکروبی سبب بهبود قابل توجهی (۲/۶۷ برابر، ۱۶٪ بیشتر) در تولید هیدروژن نسبت به مقدار تولید شده توسط کلامیدوموناس در کشت انفرادی می‌شود (شکل ۴-۱۵ (a)). در حالی که برخلاف دیگر باکتری‌های مطالعه شده در این تحقیق (به طور مثال سودوموناس پوتیدا) این جامعه‌ی باکتریایی به تنهایی قادر به مصرف اسیداستیک (شکل ۴-۱۵ (c)) و در نتیجه تنفس اکسیژن (شکل ۴-۱۵ (b)) در طول آزمایش نیست. از سوی دیگر همانطور که در شکل ۴-۱۶ نشان داده شده است هم‌زیستی این جامعه‌ی باکتریایی نسبت به هم‌زیستی سودوموناس پوتیدا/ اثر مخرب قابل توجهی بر رشد کلامیدوموناس ندارد. همچنین در طول آزمایش برخلاف سودوموناس پوتیدا/ رشد قابل ملاحظه‌ی این جامعه‌ی باکتریایی در محیط کشت TAP مشاهده نمی‌شود (شکل ۴-۱۷).

بنابراین نتایج متفاوت و قابل توجه به دست آمده از این قسمت از تحقیق ما را به سمت شناسایی و مطالعه‌ی دقیق‌تر این جامعه‌ی باکتریایی هدایت کرد. به طور کلی مراحل این قسمت از تحقیق را می‌توان در بخش‌های عمده‌ی زیر طبقه بندی کرد:

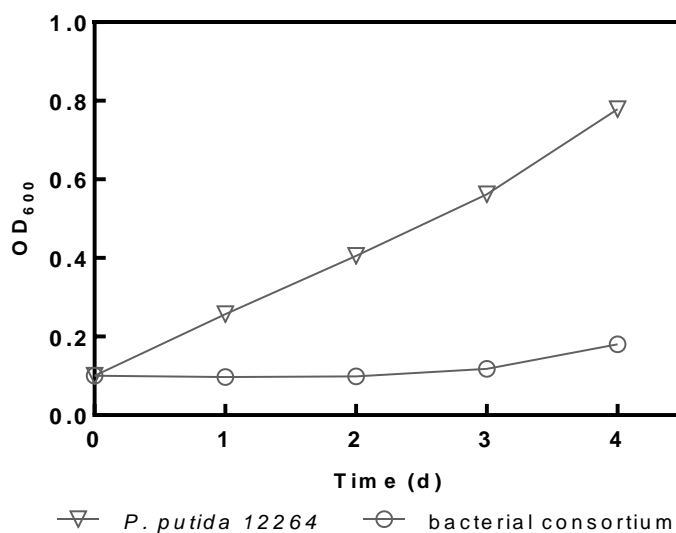
- ۱) بررسی عملکرد جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته در هم‌زیستی با کلامیدوموناس (رشد و تولید هیدروژن) در محیط کشت‌های مختلف.
- ۲) شناسایی و توالی‌یابی ژنوم باکتری‌های جدا شده از جامعه‌ی باکتریایی.
- ۳) مطالعه‌ی اثر باکتری‌های شناسایی شده به صورت انفرادی و ترکیبی بر تولید هیدروژن در کشت‌های انفرادی و کشت‌های هم‌زیست با کلامیدوموناس و انتخاب باکتری موثر بر تولید هیدروژن.
- ۴) مطالعه‌ی رشد میکروباکتریوم در منابع کربنی و نیتروژنی مختلف.
- ۵) بررسی رشد طولانی مدت کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست این ارگانیسیم‌ها.
- ۶) بررسی تولید هیدروژن و متابولیسم کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در محیط کشت‌های مختلف.
- ۷) مطالعه‌ی اثر کنترل منبع نیتروژن-کربن بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس و میکروباکتریوم.
- ۸) مقایسه‌ی تولید هیدروژن و متابولیسم کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در محیط کشت‌های حاوی مانیتول و گلوکز.
- ۹) بررسی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست با غلظت‌های بالای کلروفیل کلامیدوموناس در محیط کشت‌های مختلف.



شکل ۴-۱۵. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری و غلظت اسیداستیک (c) در کشت های همزیست و کشت های کنترلی. این آزمایش در شدت نور ۵۰ PPFD انجام شده است. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۱۶. غلظت کلروفیل در کشت های همزیست و کشت های کنترلی جلبک در شدت نور PPFD ۵۰. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۱۷. دانسیته ی نوری باکتری ها در کشت های کنترلی. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۱-۴. بررسی عملکرد جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته در هم‌زیستی با کلامیدوموناس در محیط کشت‌های مختلف.

با توجه به این که جامعه‌ی باکتریایی از کشت ریزوبیوم لگومینوساروم در محیط کشت YEM جدا شده و منابع کربن و نیتروژن این محیط کشت به ترتیب مانیتول و عصاره‌ی مخمر است، در این بخش تولید هیدروژن توسط کشت‌های کنترلی جلبک و باکتری‌ها و کشت‌های هم‌زیست این میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت‌های مختلف بر پایه‌ی TAP بررسی شده است.

محیط کشت‌های مورد آزمایش شامل محیط کشت مرسوم TAP، (عصاره‌ی مخمر 0.8 g/L + TAP) TY^{H} ، (مانیتول 10 g/L + TAP) TM^{H} و (مانیتول 10 g/L + عصاره‌ی مخمر 0.8 g/L + TAP) TYM^{H} هستند.

جامعه‌ی باکتریایی به خوبی در محیط کشت YEM رشد می‌کند و به دو دلیل زیر منبع کربن و نیتروژن این محیط کشت در گروه‌های مختلف به TAP به صورت جداگانه و با هم اضافه شده‌اند. در نظر داشته باشید در بخش قبل مشاهده شد که جامعه‌ی باکتریایی توانایی مصرف قابل توجهی از اسیداستیک در محیط کشت TAP را ندارد.

- (۱) بررسی احتمال تامین کردن منبع کربن یا نیتروژن مورد نیاز باکتری‌ها توسط کلامیدوموناس.
- (۲) مقایسه‌ی اثر حضور باکتری‌ها بر رشد و تولید هیدروژن توسط کلامیدوموناس زمانی که مواد مغذی مطلوب باکتری‌ها در محیط کشت موجود باشند و نباشند.

OD₆₀₀ اولیه‌ی جامعه‌ی باکتریایی 0.05 و غلظت اولیه‌ی کلروفیل کلامیدوموناس $10 \mu\text{g/ml}$ در نظر گرفته شده است و آزمایش در معرض شدت نور 50 PPFD انجام شده است.

۴-۱-۴-۱. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها

تولید هیدروژن در محیط کشت TM در هیچ یک از کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست مشاهده نمی‌شود. در تمام محیط کشت‌های دیگر حضور باکتری‌ها در کشت‌های هم‌زیست سبب افزایش تولید هیدروژن نسبت به مقدار تولید شده در کشت‌های کنترلی جلبک می‌شود (شکل ۴-۱۸ (a)).

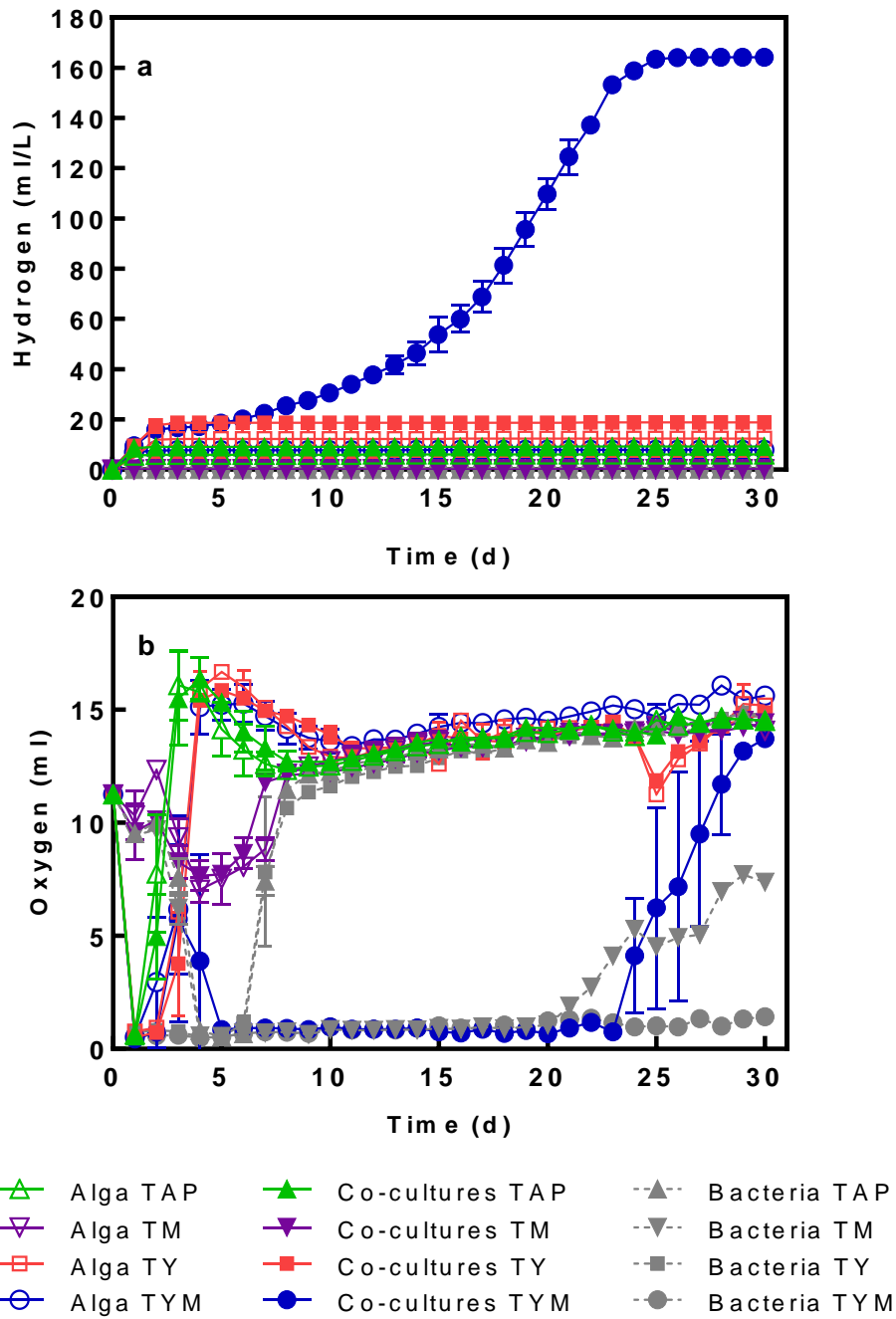
هیدروژن برای مدت طولانی‌تری در هر دو کشت‌های کنترلی جلبک و کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TY (سه روز) نسبت به محیط کشت TAP (دو روز) تولید می‌شود. در محیط کشت TYM تولید هیدروژن کشت‌های کنترلی جلبک سه روز ادامه دارد. در حالی که در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی، دو فاز تولید هیدروژن در محیط کشت TYM مشاهده می‌شود. در فاز اول تولید هیدروژن با نرخ نسبتاً بالا در دو روز اول آزمایش، مشابه عملکرد این کشت‌های هم‌زیست در سایر محیط کشت‌ها (TAP, TY) مشاهده

می‌شود. سپس به مدت دو روز هیدروژن با سرعت بسیار پایینی (کمتر از $1 \text{ ml/L}\cdot\text{d}$) تولید می‌شود. از روز چهارم آزمایش فاز دوم تولید هیدروژن با روند صعودی در نرخ تولید مشاهده شده و در روز ۲۳ام به بیشینه نرخ تولید ($16/12 \text{ ml/L}\cdot\text{d}$) می‌رسد. پس از آن نرخ تولید مجدد کاهش یافته و در روز ۲۵ام متوقف می‌شود (شکل ۴-۱۸ (a)).

به علاوه، در کشت‌های TY و TYM هیدروژن بیشتری در هر دو کشت‌های کنترلی جلبک و کشت‌های هم‌زیست نسبت به محیط کشت TM تولید می‌شود (شکل ۴-۱۸ (a)).

قابل توجه است که کشت‌های کنترلی جامعه‌ی باکتریایی در هیچ کدام از محیط کشت‌ها توانایی تولید هیدروژن را ندارند.

همانند بخش‌های قبل هماهنگی مناسبی بین تولید هیدروژن، و سطح اکسیژن موجود در فضای بالاسری کشت‌ها وجود دارد. هیدروژن در تمام کشت‌ها تحت هر شرایطی تا زمانی تولید می‌شود که سطح اکسیژن موجود در فضای بالاسری پایین باشد. در محیط کشت TYM سطح اکسیژن در کشت‌های هم‌زیست در روز سوم کمی افزایش می‌یابد ولی پس از آن مجدد کاهش یافته و فضای بالاسری کشت‌ها تا روز ۲۴ام در شرایط کم اکسیژنی باقی می‌ماند (شکل ۴-۱۸ (b)).



شکل ۴-۱۸. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن موجود (b) در فضای گاز بالاسری کشت های همزیست کلامیدوموناس-جامعهی باکتریایی و کشت های کنترلی در محیط کشت های مختلف. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۱-۴-۲. رشد

۴-۱-۴-۲-۱. دانسیته‌ی نوری کشت‌های کنترلی جلبک و کشت‌های هم‌زیست

همانطور که در بخش مواد و روش‌ها بیان شد، جذب نوری بهینه برای تخمین غلظت باکتری‌ها و کلامیدوموناس به ترتیب در طول موج ۶۰۰ و ۷۵۰ nm است. به منظور مقایسه و بررسی روند رشد کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست، دانسیته‌ی نوری این کشت‌ها در هر دو طول موج ۶۰۰ و ۷۵۰ nm و غلظت کلروفیل آن‌ها در طول مدت آزمایش اندازه‌گیری شده است (شکل ۴-۱۹، ۴-۲۰).

آشکار است که دانسیته‌ی نوری هر دو کشت‌های کنترلی جلبک و کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TM، تغییر قابل ملاحظه‌ای در طول مدت آزمایش نمی‌کند. به علاوه کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته، بیشترین دانسیته‌ی نوری را از روز چهارم آزمایش داشته و روند صعودی را تا پایان آزمایش که به معنای افزایش غلظت سلولی در محیط کشت TYM است، حفظ می‌کنند (شکل ۴-۱۹).

۴-۱-۴-۲-۲. غلظت کلروفیل کشت‌های کنترلی جلبک و کشت‌های هم‌زیست

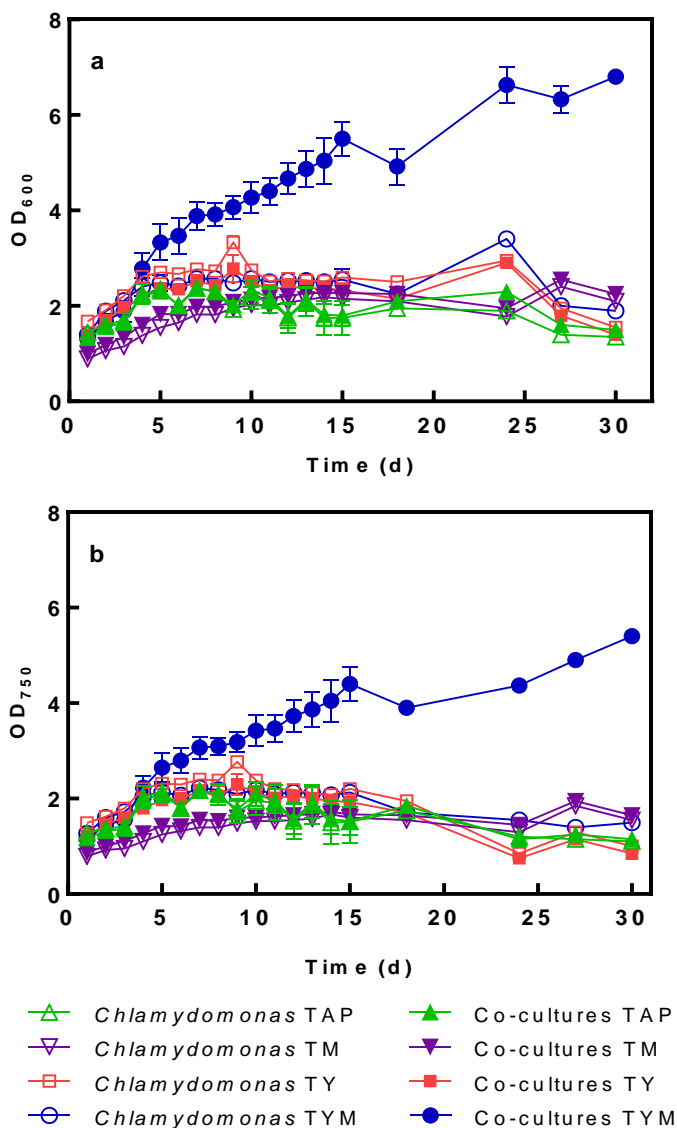
نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت کلروفیل نشان می‌دهد که در محیط کشت TAP، اختلاف ناچیزی بین غلظت کلروفیل کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست وجود دارد و این نشان دهنده‌ی آن است که در این محیط کشت، باکتری‌ها اثر منفی بر رشد کلامیدوموناس ندارد (شکل ۴-۲۰). همچنین روند نزولی در غلظت کلروفیل هر دو کشت‌های کنترلی جلبک و کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TM در تمام مدت آزمایش مشاهده می‌شود که نشان دهنده‌ی مرگ سلول‌های کلامیدوموناس در این محیط کشت است (شکل ۴-۲۰). در محیط کشت TY، در یک هفته‌ی اول آزمایش غلظت کلروفیل در کشت‌های کنترلی جلبک بیشتر از کشت‌های هم‌زیست است. پس از آن، اختلاف بین آن‌ها شدیداً کاهش یافته و در روز ۱۲م به صفر می‌رسد و سپس این اختلاف به صورت برعکس ظاهر می‌شود.

در محیط کشت TYM، کشت‌های کنترلی جلبک تا روز ۹م در فاز لگاریتمی رشد بوده و سپس تا روز ۱۵م در فاز سکون و پس از آن وارد فاز مرگ می‌شوند. در حالی که سلول‌های کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TYM در فاز سکون باقی می‌مانند (شکل ۴-۲۰).

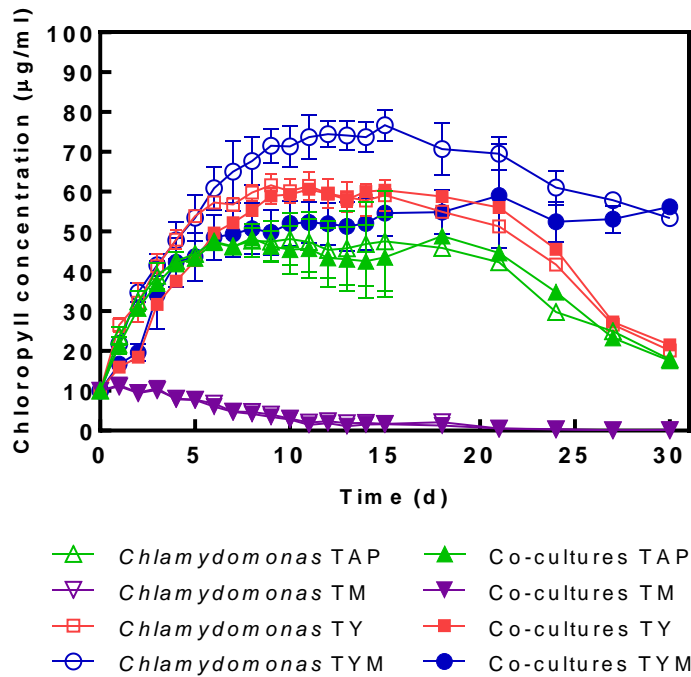
۴-۱-۴-۳. دانسیته‌ی نوری کشت‌های کنترلی جامعه‌ی باکتریایی

همانطور که در شکل ۴-۲۱ مشاهده می‌شود، رشد در جامعه‌ی باکتریایی در محیط کشت‌های TAP، TM، پس از گذراندن دو روز فاز تاخیر آغاز می‌شود. در محیط کشت TAP در روز پنجم با دانسیته‌ی نوری ۰/۵۳ به انتهای فاز لگاریتمی می‌رسد. در حالی که در محیط کشت TM رشد باکتری‌ها تا روز ۱۵م و رسیدن به دانسیته‌ی

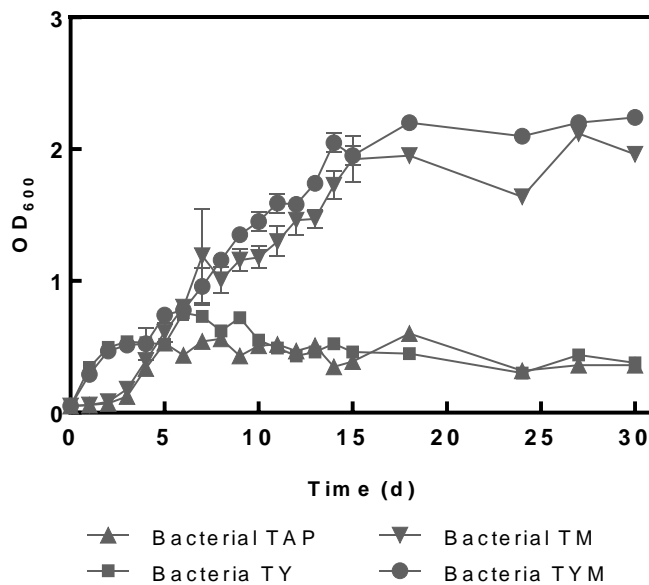
نوری ۱/۹۲ ادامه می‌یابد. از سوی دیگر رشد جامعه‌ی باکتریایی در محیط کشت‌های TY, TYM بدون فاز تاخیر شروع می‌شود. در محیط کشت TY و TYM، رشد لگاریتمی به ترتیب تا روز ۶ام و ۱۸ام و رسیدن به دانسیته‌ی نوری ۰/۷۶ و ۲/۲ ادامه می‌یابد (شکل ۴-۲۱). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که حضور عصاره‌ی مخمر و مانیتول در محیط کشت‌ها به ترتیب با حذف فاز تاخیر رشد و رشد بلند مدت و بیشتر جامعه‌ی باکتریایی ارتباط دارند.



شکل ۴-۱۹. دانسیته‌ی نوری در طول موج‌های ۶۰۰ nm (a) و ۷۵۰ nm (b) کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و کشت‌های کنترلی جلبک در محیط کشت‌های مختلف. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۲۰. غلظت کلروفیل در کشت های همزیست کلامیدوموناس-جامعه ی باکتریایی و کشت های کنترلی جلبک، در محیط کشت های مختلف. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.

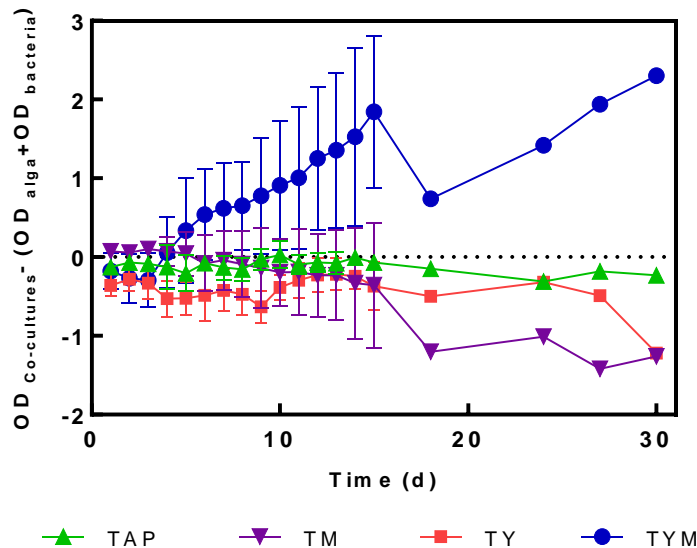


شکل ۴-۲۱. دانسیته ی نوری جامعه ی باکتریایی ناشناخته در محیط کشت های مختلف. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۲-۱-۴-۴. مقایسه‌ی رشد جلبک و جامعه‌ی باکتریایی در کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های

کنترلی

به منظور درک اثر هم‌زیستی جلبک و جامعه‌ی باکتریایی بر رشد یکدیگر اختلاف دانسیته‌ی نوری کشت‌های هم‌زیست این ارگانیسم با مجموع دانسیته‌ی نوری کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و جامعه‌ی باکتریایی در طول موج ۷۵۰ nm بررسی شده است. در شکل ۴-۲۲، به وضوح دیده می‌شود که تنها در محیط کشت TYM، از روز چهارم دانسیته‌ی نوری کشت‌های هم‌زیست بیشتر از مجموع دانسیته‌ی نوری کشت‌های کنترلی است. می‌توان نتیجه گرفت که رابطه‌ی هم‌زیستی تقویت‌کننده‌ی رشد حداقل یکی از ارگانیسم‌ها در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TYM است.



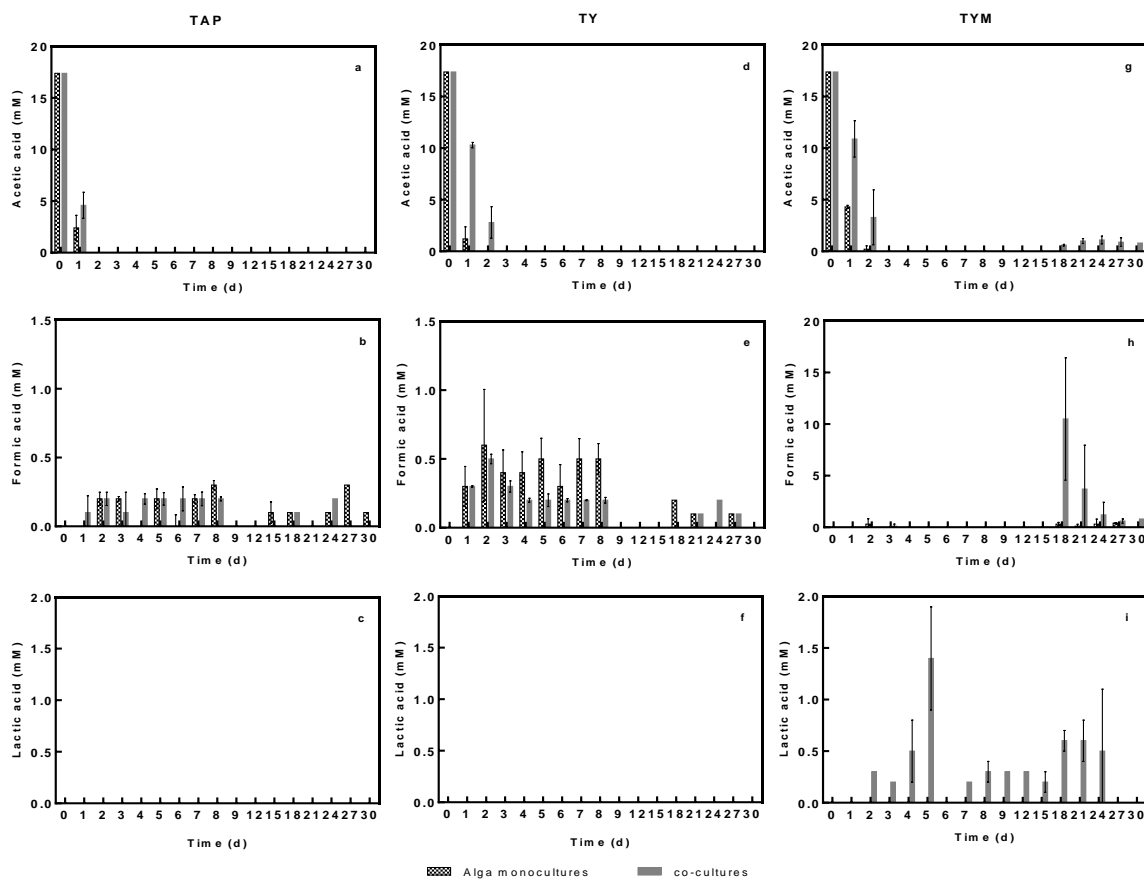
شکل ۴-۲۲. اختلاف دانسیته‌ی نوری کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و مجموع دانسیته‌ی نوری کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های مختلف. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۳-۱-۴-۴. آنالیز متابولیت‌ها

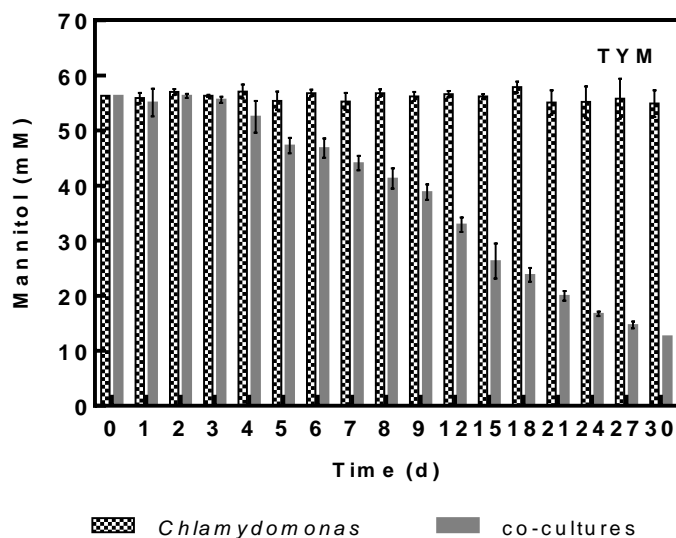
با توجه به شواهد حاصل شده از بخش قبل (شکل ۴-۲۰)، سلول‌های کلامیدوموناس در محیط کشت TM در هر دو حالت کشت کنترلی و کشت هم‌زیست دچار مرگ سلولی می‌شوند. بنابراین آنالیز متابولیت‌ها تنها در محیط کشت‌های TYM، TY و TAP انجام شده است (شکل ۴-۲۳).

در محیط کشت TAP و TY، اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست به ترتیب تا روز دوم و سوم مشاهده می‌شود (شکل ۴-۲۳ (a و d)). در حالی که در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TYM علاوه بر سه روز اول مقدار کمی اسیداستیک از روز ۱۱ تا پایان آزمایش نمایان می‌شود (شکل ۴-۲۳ (g)).

در محیط کشت‌های TAP و TM، مقدار کمی اسیدفرمیک در هر دو کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست تولید می‌شود (شکل ۴-۲۳ (b و e)). در حالی که از روز ۱۱م آزمایش مقدار بسیار زیادی از این اسید در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TYM با روند نزولی تولید می‌شود که در ابتدا بسیار بیشتر از مقدار تولید شده در کشت‌های کلامیدوموناس است (شکل ۴-۲۳ (h)). همچنین آشکار است که مقدار قابل ملاحظه‌ای اسیدلاکتیک تنها در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TYM تولید می‌شود (شکل ۴-۲۳ (i)). بنابراین در این کشت‌ها تولید هیدروژن و تولید اسیدلاکتیک به صورت هم‌زمان اتفاق می‌افتد. شکل ۴-۲۴ نشان می‌دهد که مانیتول تنها توسط جامعه‌ی باکتریایی مصرف می‌شود. و همانطور که در بخش‌های قبل نشان داده شده است کلامیدوموناس توانایی مصرف مانیتول را ندارد (بخش ۴-۳-۱).



شکل ۴-۲۳. غلظت اسیداستیک (g,d,a)، اسیدفرمیک (h,e,b) و اسیدلاکتیک (i,f,c) در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و کشت‌های کنترلی جلبک در محیط کشت‌های مختلف. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۲۴. غلظت مانیتول در کشت های همزیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی و کشت های کنترلی جلبک در محیط کشت TYM^H. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۱-۴-۴. رفتار کشت های کنترلی کلامیدوموناس پس از آلوده شدن با جامعه‌ی باکتریایی در محیط کشت های گوناگون

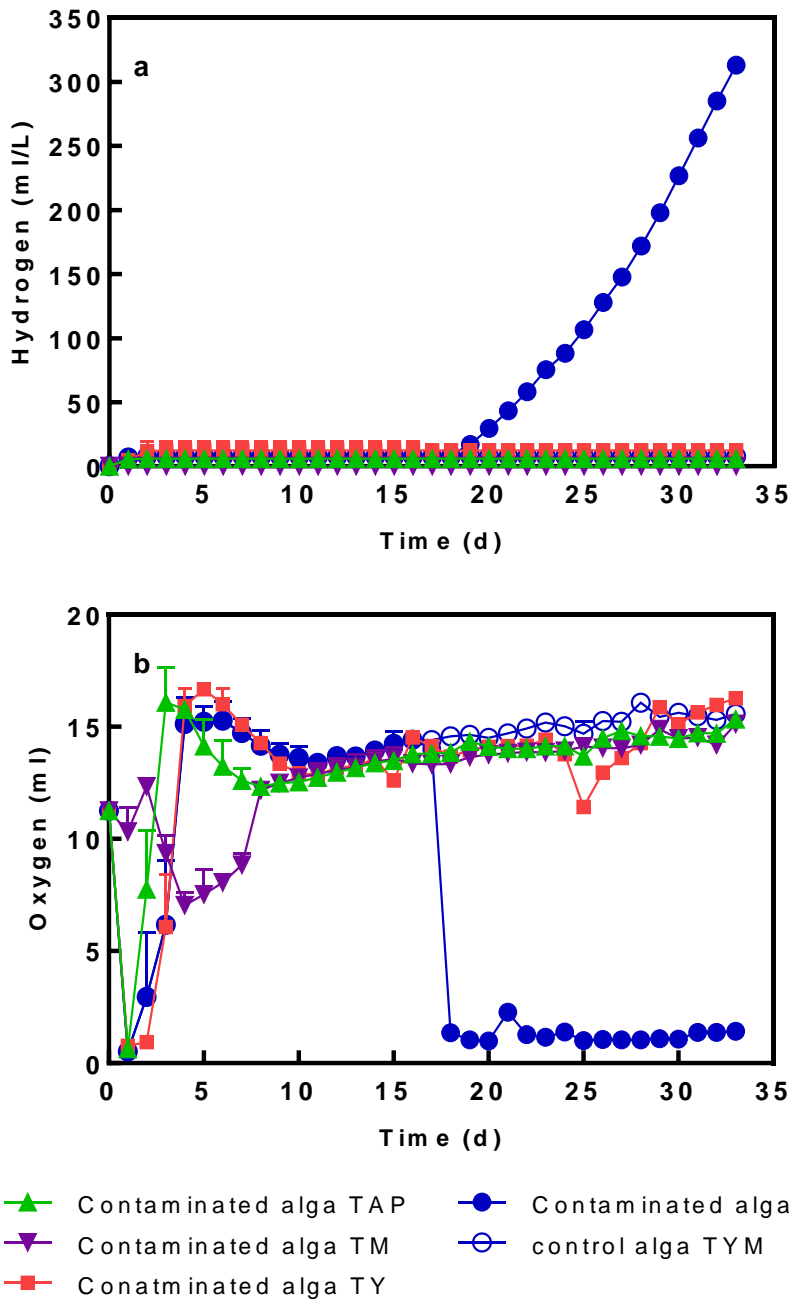
برای حصول اطمینان از نقش جامعه‌ی باکتریایی در تولید بلند مدت هیدروژن در کشت های همزیست با کلامیدوموناس در روز ۱۶م آزمایش بیوراکتورهای کنترل جلبک در تمام محیط کشت ها به صورت عمدی با ml ۱ کشت همزیست در محیط کشت TYM آلوده شدند.

نتایج نشان می دهند که پس از آلوده کردن بیوراکتورها تنها فضای بالاسری در محیط کشت TYM به شرایط کم اکسیژنی رسیده (شکل ۴-۲۵ (b)) و تولید هیدروژن با روند صعودی آغاز می شود (شکل ۴-۲۵ (a)). مقدار قابل توجهی هیدروژن (۳۱۳ ml/L) در مدت ۱۷ روز تولید می شود و احتمال ادامه یافتن تولید هیدروژن نیز وجود دارد.

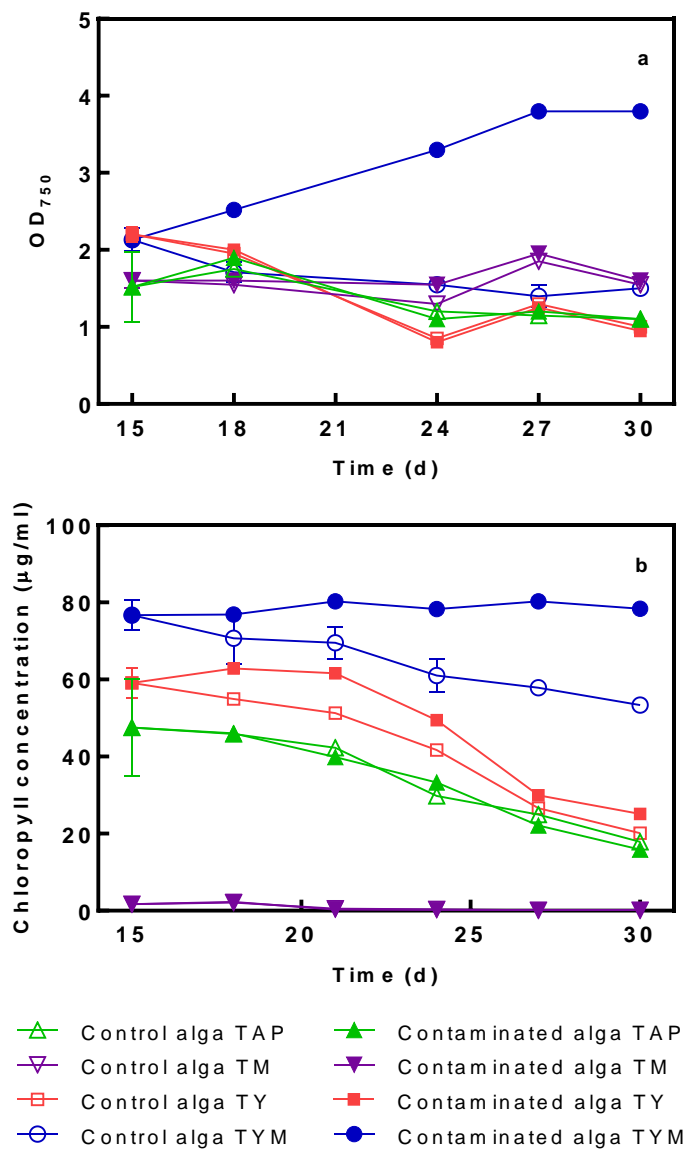
مقایسه‌ی دانسیته‌ی نوری در کشت های کنترلی کلامیدوموناس و کشت های کنترلی آلوده شده نشان می دهد که برخلاف تمام کشت ها که یا در شرایط سکون یا مرگ سلولی قرار دارند، تنها دانسیته‌ی نوری کشت کلامیدوموناس آلوده شده در محیط کشت TYM در طول مدت آزمایش افزایش یافته و سپس در انتهای آزمایش ثابت می شود (شکل ۴-۲۶ (a)). همچنین غلظت کلروفیل در هر دو نوع کشت (خالص و آلوده شده) در تمام محیط کشت ها روند نزولی دارد و تنها غلظت کلروفیل کشت آلوده شده در محیط کشت TYM مقدار ثابتی دارد (شکل ۴-۲۶ (b)).

بنابراین می‌توان حدس زد که هم‌زیستی جامعه‌ی باکتریایی اثر مثبتی بر زیست‌پذیری سلول‌های کلامیدوموناس دارد. همچنین از آنجا که رشد کلامیدوموناس در کشت‌های آلوده در محیط کشت TYM ثابت است (شکل ۴-۲۶ (b))، افزایش دانسیته‌ی نوری در این کشت‌ها احتمالاً به دلیل رشد سلول‌های جامعه‌ی باکتریایی است (شکل ۴-۲۶ (a)). پس احتمال برقراری ارتباط مفید متقابل بین کلامیدوموناس و جامعه‌ی باکتریایی در این شرایط آزمایش وجود دارد.

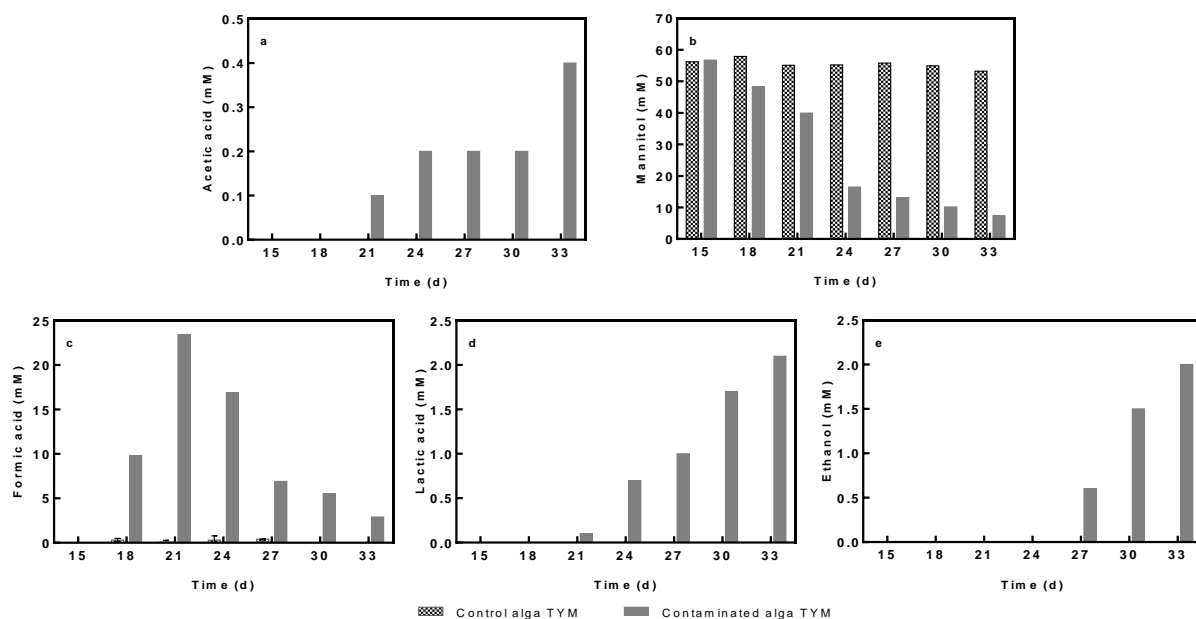
آنالیز متابولیت‌ها تنها در محیط کشت TYM انجام شده است. مشابه نتایج به دست آمده از بخش قبل (بخش ۴-۴-۱-۳)، مقدار کمی اسیداستیک در کشت‌های آلوده شده مشاهده می‌شود (شکل ۴-۲۷ (a)). از آنجا که کلامیدوموناس مانیتول را مصرف نمی‌کند، روند نزولی مانیتول در کشت‌های آلوده شده نشان دهنده‌ی رشد سلول‌های باکتریایی است (شکل ۴-۲۷ (b)). همچنین مقادیر بسیار زیاد اسیدفرمیک و مقادیر متوسط اسیدلاکتیک و اتانول در این کشت‌ها اندازه‌گیری شده است (شکل ۴-۲۷ (e,d,c)).



شکل ۴-۲۵. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت های کنترلی جلبک خالص و آلوده شده در روز ۱۶م. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۲۶. دانسیته‌ی نوری (a) و غلظت کلروفیل (b) کشت‌های کنترلی جلبک خالص و آلوده شده در روز ۱۶م. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۲۷. غلظت مواد آلی (اسیداستیک (a)، مانیتول (b)، اسیدفرمیک (c)، اسیدلاکتیک (d) و اتانول (e)) موجود در کشت های کنترلی جلبک خالص و آلوده شده در روز ۱۶ام، در محیط کشت TYM^H. نتایج از روز ۱۵ام نشان داده شده اند. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۱-۵. پتانسیل تولید بلندمدت هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی

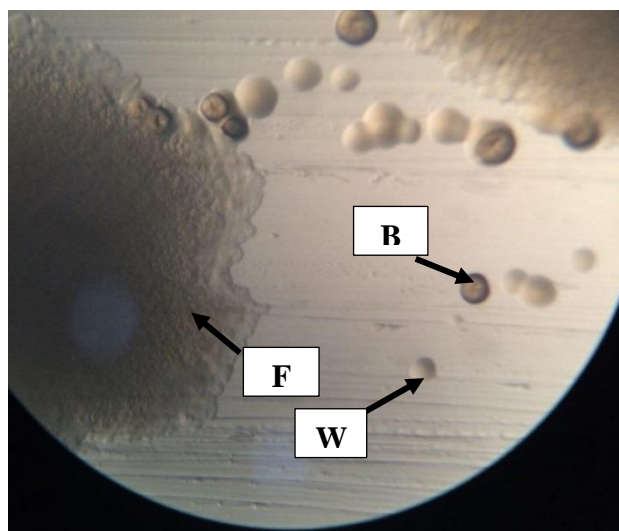
باکتریایی

باکتری‌هایی که همزیستی آن‌ها با کلامیدوموناس در بخش‌های قبل این تحقیق بررسی شد برای مصرف اسیداستیک با کلامیدوموناس رقابت می‌کردند. جامعه‌ی باکتریایی مورد استفاده در این بخش از تحقیق مصرف کننده‌ی بسیار ضعیف اسیداستیک است. از طرف دیگر زمانی که منبع کربن قابل استفاده توسط باکتری‌ها (مانیتول) در محیط کشت موجود باشد یک رابطه‌ی مفید متقابل بین کلامیدوموناس و جامعه‌ی باکتریایی برقرار می‌شود که اثر مثبت دو طرفه بر رشد سلول‌های جلبک و کنسرسیوم باکتری دارد. نتایج حاصل از آنالیز غلظت اسیداستیک در محیط کشت به وضوح نشان می‌دهد که کنسرسیوم باکتری از تخمیر مانیتول، اسیداستیک تولید می‌کند. اسیداستیک ترشح شده به محیط کشت سبب بهبود رشد کلامیدوموناس و افزایش مدت زمان تولید هیدروژن در کشت‌های همزیست می‌شود. قابل توجه است که در این مرحله از تحقیق درک روشنی از چگونگی اثر مثبت کلامیدوموناس بر جامعه‌ی باکتریایی وجود ندارد. علاوه بر آن به دلیل این که اعضای جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته هستند شناخت صحیح ارتباط بین کلامیدوموناس و باکتری‌ها غیر ممکن است.

۴-۲-۴. جداسازی و شناسایی اعضای جامعه‌ی باکتریایی

پس از کشت‌های پی‌درپی در محیط کشت جامد YEM و بررسی‌های میکروسکوپی، همانطور که در شکل ۴-۲۸ مشاهده می‌شود، سه نوع کلونی متمایز از نظر شکل و رنگ جداسازی شدند. کلونی‌ها براساس شکل ظاهری و رنگ آن‌ها در زیر میکروسکوپ F، B و W نام گذاری شدند.

روش PacBio's SMRT (Single Molecule Real Time) برای توالی‌یابی کل ژنوم هر باکتری مورد استفاده قرار گرفت. توالی‌یابی PacBio's SMRT، یکی از مرسوم‌ترین تکنولوژی‌های نسل سوم توالی‌یابی است. در مقایسه با دو نسل قبل PacBio's long-read sequencing که توسط تکنولوژی توالی‌یابی SMRT قابل اجراست به PCR amplification احتیاج نداشته و طول خوانش^۱ در این روش تا ۱۰۰ برابر بزرگتر از Next-generation sequencing (NGS) است.



شکل ۴-۲۸. کلونی‌های جدا شده از جامعه‌ی باکتریایی آلوده کننده‌ی کشت ریزوبیوم لگومینوساروم. از توالی‌یابی ژنوم با استفاده از روش PacBio's SMRT برای شناسایی باکتری‌ها استفاده شده است.

۴-۲-۴-۱. باکتری W

با استفاده از نرم افزار Canu 1.7 توالی ژنوم باکتری W از ۱۳۱۱۳۳ خوانش حاصل شده است. این توالی شامل ۱۰۹۴۱۶۱۹۵۳ باز است.

¹ Read

اسمبل^۱ کردن با نرم‌افزار Canu، سه کانتیگ^۲ با مجموع طول ۳۷۸۵۳۵۳ باز تولید کرد. مشخصات کانتیگ‌ها به همراه آنالیز بلاست^۳ آن‌ها در جدول زیر گردآوری شده است.

با استفاده از نرم‌افزار دیگری به نام BBMap's MinHash Sketch، توالی ژنوم باکتری W بیشترین شباهت را به ژنوم *Microbacterium sp.* MEJ108Y دارد.

جدول ۴-۶. آنالیز بلاست باکتری W

شماره‌ی کانتیگ	طول کانتیگ	بهترین هیت‌های ^۴ انتخاب شده برای باکتری W پس از انجام بلاست و آنالیز آماری
۱	۳۷۶۸۲۵۹	<i>Microbacterium foliorum</i> strain 122 genome
۲	۱۶۰۴۸	<i>Microbacterium foliorum</i> strain 122 genome
۳	۱۰۵۹	<i>Microbacterium foliorum</i> strain 122 genome

۴-۲-۲. باکتری F

با استفاده از نرم‌افزار Canu 1.7 توالی ژنوم باکتری F از ۱۱۴۴۴۵ خوانش حاصل شده است. این توالی شامل ۹۱۶۷۰۹۵۲۰ باز است.

اسمبل کردن با نرم‌افزار Canu، نه کانتیگ با مجموع طول ۵۹۲۵۲۶۱ باز تولید کرد. مشخصات کانتیگ‌ها به همراه آنالیز بلاست آن‌ها در جدول ۴-۷ جمع‌آوری شده‌اند.

با استفاده از نرم‌افزار BBMap's MinHash Sketch، توالی ژنوم باکتری F بیشترین شباهت را به ژنوم *Bacillus cereus* ATCC 10876 دارد.

¹ Assembly

² Contig

³ Blast

⁴ Hits

جدول ۴-۷. آنالیز بلاست باکتری F

بهترین هیتهای انتخاب شده برای باکتری F پس از انجام بلاست و آنالیز آماری	طول کانتیگ	شماره کانتیگ
<i>Bacillus cereus</i> strain A1, complete genome	۵۲۲۹۹۴۵	۱
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Bt185, complete genome	۴۴۹۲۰۶	۲
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain c25, complete genome	۱۳۱۷۸	۳
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Bc601, complete genome	۱۱۲۴۸	۴
<i>Bacillus cereus</i> strain FORC_047, complete genome	۱۶۸۷	۵
<i>Bacillus cereus</i> strain MLY1 chromosome MLY1.0, complete sequence	۱۶۸۴	۶
<i>Bacillus cereus</i> strain MLY1 chromosome MLY1.0, complete sequence	۱۶۸۲	۷
لیست پلاسمیدهایی که با استفاده از بلاست شناسایی شدند.		
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar coreanensis strain ST7 plasmid	۱۴۸۵۷۶	۸
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar indiana strain HD521 plasmid pBTHD521-3	۶۸۰۵۳	۹

۴-۲-۳. باکتری B

با استفاده از نرم افزار Canu 1.7 توالی ژنوم باکتری B از ۱۰۲۲۳۸ خوانش حاصل شده است. این توالی شامل ۸۳۲۲۰۹۷۷۴ باز است.

اسمبل کردن با نرم افزار Canu، تنها یک کانتیگ با طول ۴۴۸۷۳۹۶ باز تولید کرد که مشخصات آنالیز بلاست آن در جدول ۴-۸ آورده شده است.

با استفاده از ژنوم BBMap's MinHash Sketch، توالی ژنوم باکتری B بیشترین شباهت را به ژنوم *Stenotrophomonas maltophilia* PML 168 دارد.

جدول ۴-۸. آنالیز بلاست باکتری B

بهترین هیتهای انتخاب شده برای باکتری B پس از انجام بلاست و آنالیز آماری	طول کانتیگ	شماره کانتیگ
<i>Stenotrophomonas</i> sp. LM091, complete genome	۴۴۸۷۳۸۹	۱

بنابراین از این پس باکتری‌ها W، F و B به ترتیب میکروباکتریوم^۱، باسیلیوس^۲ و استنوتروفوموناس^۳ نامیده می‌شوند.

۴-۳-۴. بررسی عملکرد اعضای جامعه‌ی باکتریایی به صورت انفرادی و کنسرسیوم بر تولید

هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست باکلامیدوموناس

در این بخش از تحقیق آزمایش تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس با هر یک از باکتری‌ها به صورت انفرادی و به صورت ترکیب‌های دوتایی و در انتها سه‌تایی انجام شده است. هدف اصلی پیدا کردن باکتری یا باکتری‌هایی است که نقش موثری بر تولید هیدروژن دارند.

آزمایش در محیط کشت TYM^H (با ترکیباتی که در بخش قبل توضیح داده شده است) با غلظت اولیه کلروفیل $12/5 \mu\text{g/ml}$ کلامیدوموناس خالص آغاز شده است. در روز سوم آزمایش پس از توقف تولید هیدروژن باکتری‌ها به صورت انفرادی یا گروهی به همراه محیط کشت بر پایه‌ی MM که فاقد اسیداستیک و دارای مانیتول و عصاره‌ی مخمر است به کشت‌های خالص کلامیدوموناس اضافه می‌شوند.

دانسیتته‌ی نوری اولیه‌ی باکتری‌ها در تمام حالت‌های انفرادی و ترکیبی ۰/۱ در نظر گرفته شده است. در کشت‌های هم‌زیست شامل ترکیب‌های دوتایی و سه‌تایی باکتری‌ها، از دانسیتته‌ی نوری برابر از هر کدام از باکتری‌ها استفاده شده به صورتی که مجموع آن‌ها ۰/۱ است.

کشت‌های خالص کلامیدوموناس و هر یک از باکتری‌ها به عنوان کنترل در نظر گرفته شده است. تولید هیدروژن در معرض شدت نوری ۵۰ PPFD بررسی شده است. کشت‌های کنترلی دیگر شامل کشت هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی اولیه و کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا نیز در نظر گرفته شده‌اند.

کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی به منظور بررسی اهمیت نسبت مقدار اول باکتری‌ها در جامعه‌ی باکتریایی بر تولید هیدروژن در نظر گرفته شده است. از سوی دیگر می‌دانیم که مانیتول ترکیبی است که اثر اسمزی بر روی سلول‌ها دارد. بنابراین این احتمال وجود دارد که تولید بلندمدت هیدروژن به اثر اسمزی که مانیتول اعمال می‌کند وابسته باشد. پس به منظور روشن شدن عامل اصلی موثر بر تولید بلندمدت هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی در محیط کشت TYM، تولید هیدروژن در کشت هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا در محیط کشت TYM نیز بررسی شده است.

¹ *Microbacterium*

² *Bacillus*

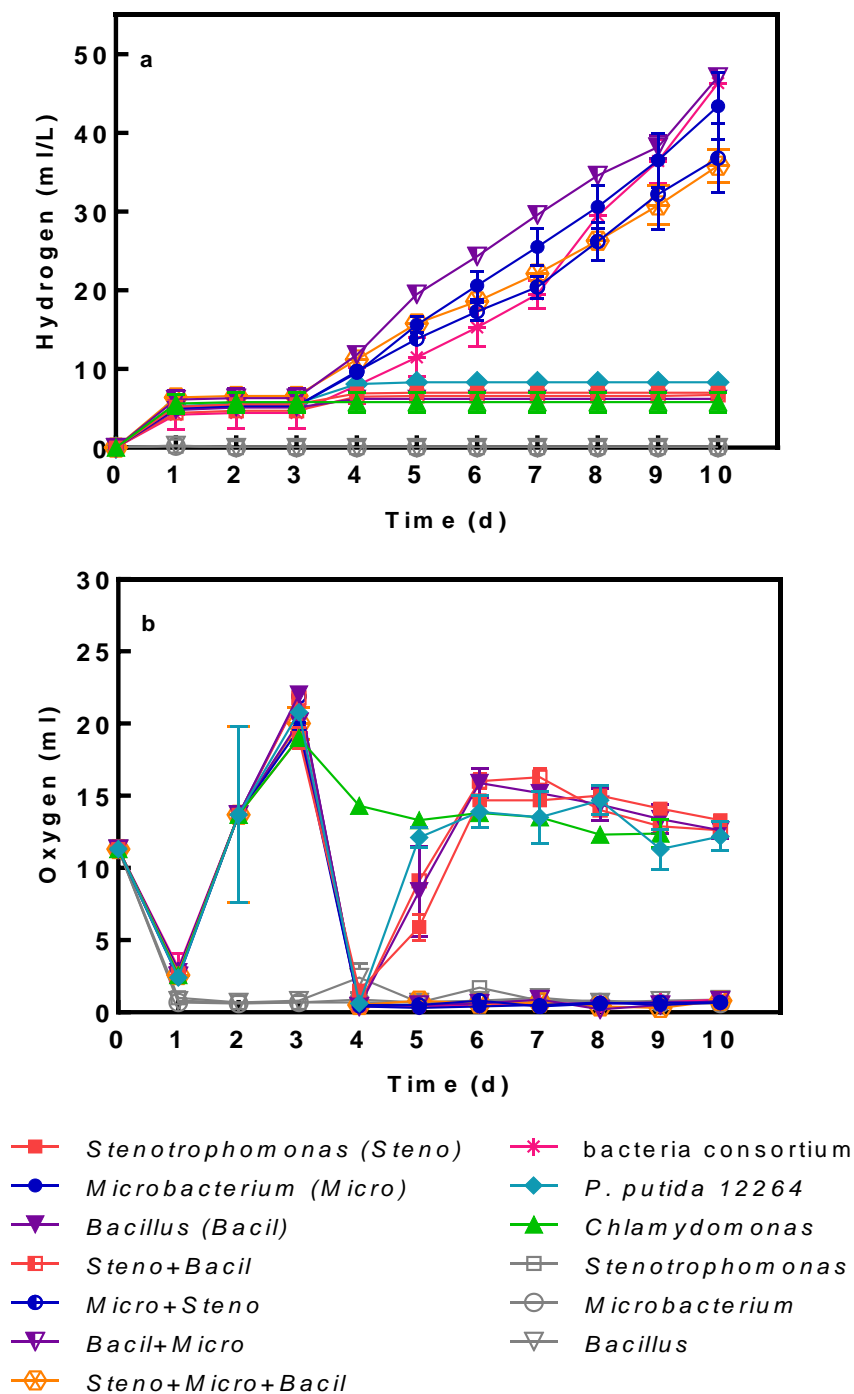
³ *Stenotrophomonas*

۴-۳-۱. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها

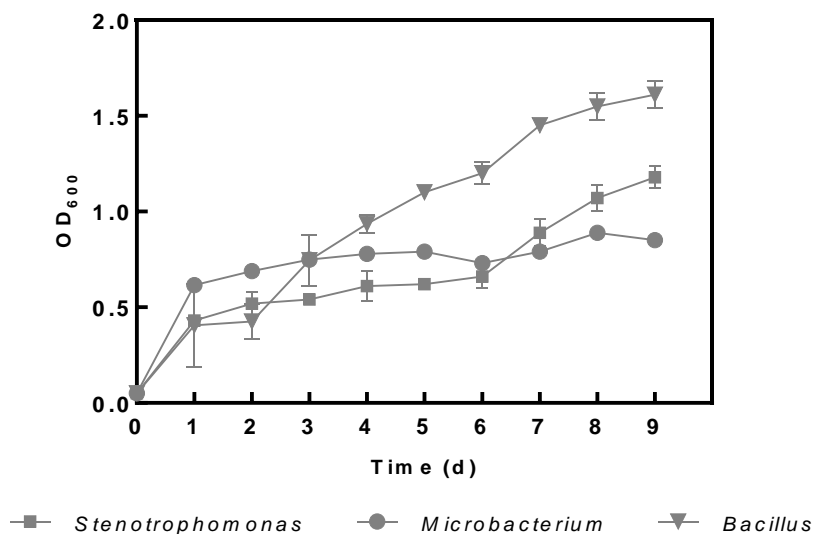
همانطور که شکل ۴-۲۹ (b) مشاهده می‌شود پس از افزودن باکتری‌ها تمام کشت‌های هم‌زیست به شرایط کم اکسیژنی می‌رسند. در حالی که این شرایط کم اکسیژنی تنها در کشت‌هایی که میکروباکتریوم حضور دارد تا پایان آزمایش ادامه دارد و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بقیه‌ی کشت‌های هم‌زیست پس از روز چهارم افزایش می‌یابد. ادامه یافتن شرایط کم اکسیژنی در کشت‌های هم‌زیست شامل میکروباکتریوم هماهنگی دقیقی با تولید بلندمدت هیدروژن در این کشت‌ها دارد. آشکار است که از میان باکتری‌های مورد مطالعه، میکروباکتریوم نقش اصلی را در تولید بلندمدت هیدروژن در محیط کشت TYM دارد.

۴-۳-۲. رشد باکتری‌ها

رشد باسیلوس، میکروباکتریوم و استنوتروفوموناس در محیط کشت TYM در شرایط تولید هیدروژن بررسی شده است. همانطور که در شکل ۴-۳۰ دیده می‌شود باسیلوس بیشترین رشد را نسبت به دو باکتری دیگر در محیط کشت TYM دارد و رشد این باکتری پس از نه روز همچنان در فاز لگاریتمی قرار دارد. استنوتروفوموناس با سرعت کمتری نسبت به باسیلوس رشد می‌کند ولی رشد این باکتری نیز تا پایان آزمایش ادامه دارد. در حالی که میکروباکتریوم رفتار کاملاً متفاوتی دارد. رشد سریع این باکتری در روز اول با کاهش شدید تا پایان آزمایش همراه است.



شکل ۴-۲۹. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت های همزیست و کشت های کنترلی در محیط کشت $T.Y.M^H$. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۳۰. دانشجوی نوری اعضای جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته (باسیلوس، میکروباکتریوم و استنوتروفوموناس) در محیط کشت TYM^H. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

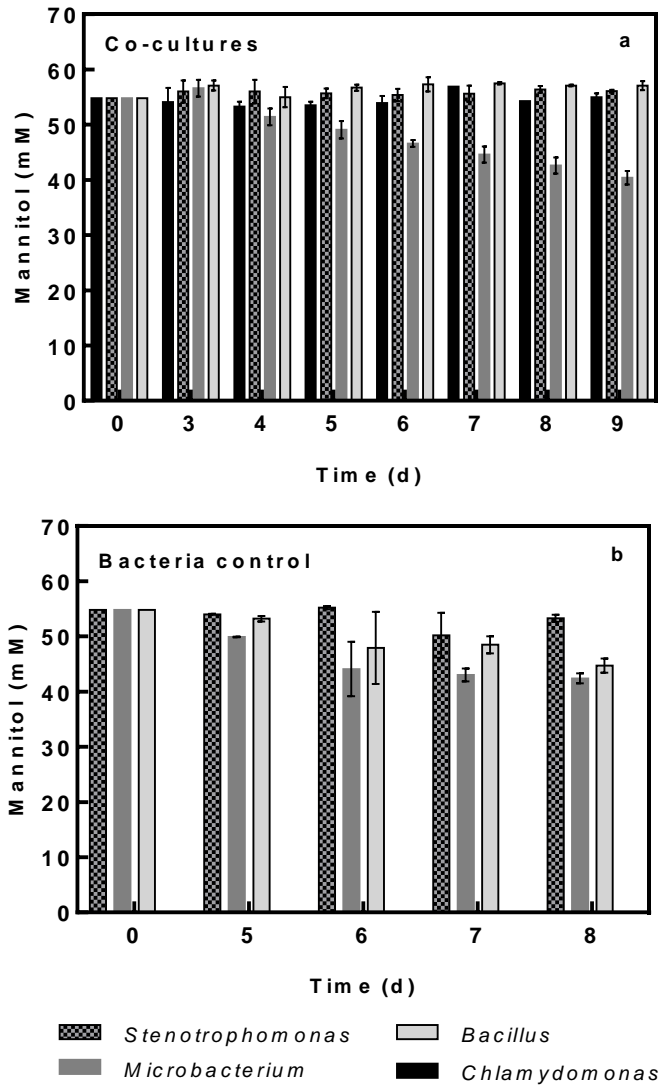
۴-۳-۳-۳. آنالیز متابولیت‌ها

اندازه‌گیری غلظت مانیتول در کشت‌های کنترلی و کشت‌های هم‌زیست نشان می‌دهد که تنها میکروباکتریوم می‌تواند مانیتول را در هر دو حالت خالص و هم‌زیستی با کلامیدوموناس در محیط کشت TYM مصرف کند (شکل ۴-۳۱). قابل توجه است که مصرف مانیتول در کشت‌های کنترلی این باکتری از روز ششم تقریباً متوقف می‌شود. در حالی که مصرف با نرخ پایین مانیتول در کشت‌های هم‌زیست این باکتری تا پایان آزمایش ادامه دارد. همچنین باسیلوس در کشت‌های هم‌زیست این باکتری با کلامیدوموناس مانیتول را مصرف نمی‌کند. در حالی که مصرف خیلی کم این ترکیب توسط کشت‌های کنترلی باسیلوس مشاهده می‌شود. احتمال دارد در کشت‌های هم‌زیست باسیلوس محصولات تولید شده توسط متابولیسم کلامیدوموناس را به مانیتول ترجیح داده و از آن‌ها به عنوان منبع کربن استفاده کند.

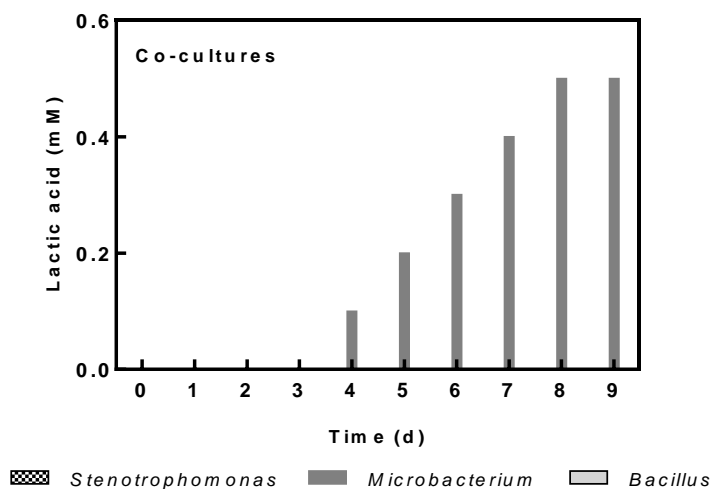
همچنین در شکل ۴-۳۲ دیده می‌شود که اسیدلاکتیک تنها در کشت‌های هم‌زیست میکروباکتریوم مشاهده می‌شود. در حالی که هر سه باکتری در کشت خالص کنترلی اسیدلاکتیک تولید می‌کنند (شکل ۴-۳۳ (b)). استنوتروفوموناس اسیدلاکتیک کمتری نسبت به دو باکتری دیگر تولید می‌کند.

اندازه‌گیری غلظت اسیداستیک در کشت‌های کنترلی باکتری‌ها نشان می‌دهد که کشت‌های کنترلی استنوتروفوموناس بیشترین نرخ مصرف اسیداستیک را دارند. باسیلوس اسیداستیک را با نرخ پایین مصرف می‌کند. در حالی که در کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم نه تنها مصرف اسیداستیک دیده نمی‌شود بلکه تولید با نرخ پایین

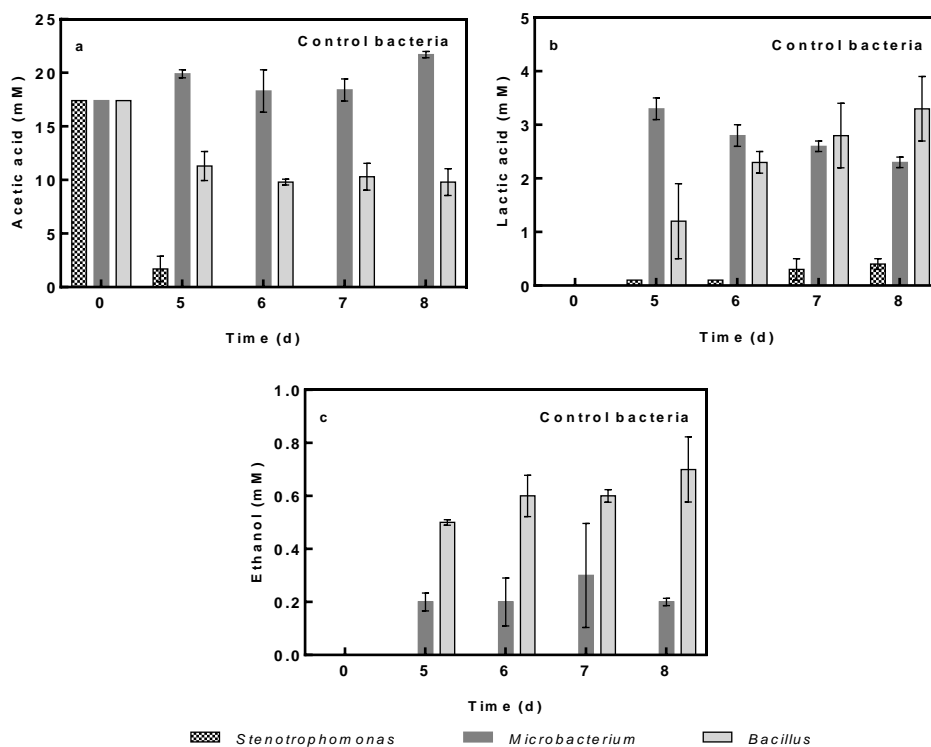
این ترکیب آلی مشاهده می شود (شکل ۴-۳۳ (a)). به علاوه تولید اتانول در کشت های کنترلی میکروباکتریوم و باسیلوس دیده می شود (شکل ۴-۳۳ (c)).



شکل ۴-۳۱. غلظت مانیتول در کشت های همزیست کلامیدوموناس-باسیلوس، میکروباکتریوم و -استنوتروفوموناس (a) و کشت های کنترلی این باکتری ها (b) در محیط کشت $T.Y.M^H$. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۳۲. غلظت اسیدلاکتیک در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-باسیلوس، میکروباکتریوم و استنوتروفوموناس در محیط کشت $T.Y.M^H$. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۳۳. غلظت مواد آلی شامل اسیداستیک (a)، اسیدلاکتیک (b) و اتانول (c) در کشت های کنترلی باسیلوس، میکروباکتریوم و استنوتروفوموناس در محیط کشت $T.Y.M^H$. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۳-۴. کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم پتانسیل بالایی برای تولید هیدروژن دارد.

در این بخش از تحقیق نشان داده شده است که در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در شرایط آزمایش هیدروژن به صورت بلندمدت تولید می‌شود. در محیط کشت TYM، میکروباکتریوم از مانیتول به عنوان منبع کربن استفاده کرده و به ظاهر اسیداستیک را مصرف نمی‌کند. صحت این موضوع به دلیل این که میکروباکتریوم در مصرف اسیداستیک با کلامیدوموناس رقابت نکرده و تمام اسیداستیک موجود در محیط کشت برای رشد و تولید هیدروژن در سلول‌های کلامیدوموناس مصرف می‌شود، اهمیت به سزایی دارد. زیرا همانطور که تاکنون مشاهده شده است باکتری‌های دیگر که اثر مثبت قابل توجهی بر تولید هیدروژن دارند مانند سودوموناس مصرف کننده‌ی اسیداستیک هستند. بنابراین مصرف اسیداستیک توسط میکروباکتریوم نیازمند مطالعات بیشتری است. همچنین نتایج نشان دادند که مصرف مانیتول توسط میکروباکتریوم پس از مدتی در کشت‌های کنترلی این باکتری برخلاف کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TYM متوقف می‌شود.

همچنین رشد میکروباکتریوم با نرخ بسیار بالا در روز اول شروع شده و پس از آن به شدت کاهش می‌یابد. از این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که محیط کشت TYM تنها برای مدت زمان کوتاهی شرایط مناسب برای رشد میکروباکتریوم را فراهم می‌کند. بنابراین برای ادامه دادن این تحقیق، یافتن عامل محدود کننده‌ی رشد برای این باکتری مهم و جالب توجه است. از سوی دیگر تولید اسیداستیک توسط این باکتری اهمیت به سزایی بر رشد و تولید بلندمدت هیدروژن در کلامیدوموناس دارد. با وجود رشد کندتر میکروباکتریوم نسبت به دو باکتری دیگر، متابولیسم این باکتری در محیط کشت TYM از نظر تولید مواد آلی فعال‌تر است.

۴-۴-۴. منابع کربنی و نیتروژنی قابل استفاده توسط میکروباکتریوم

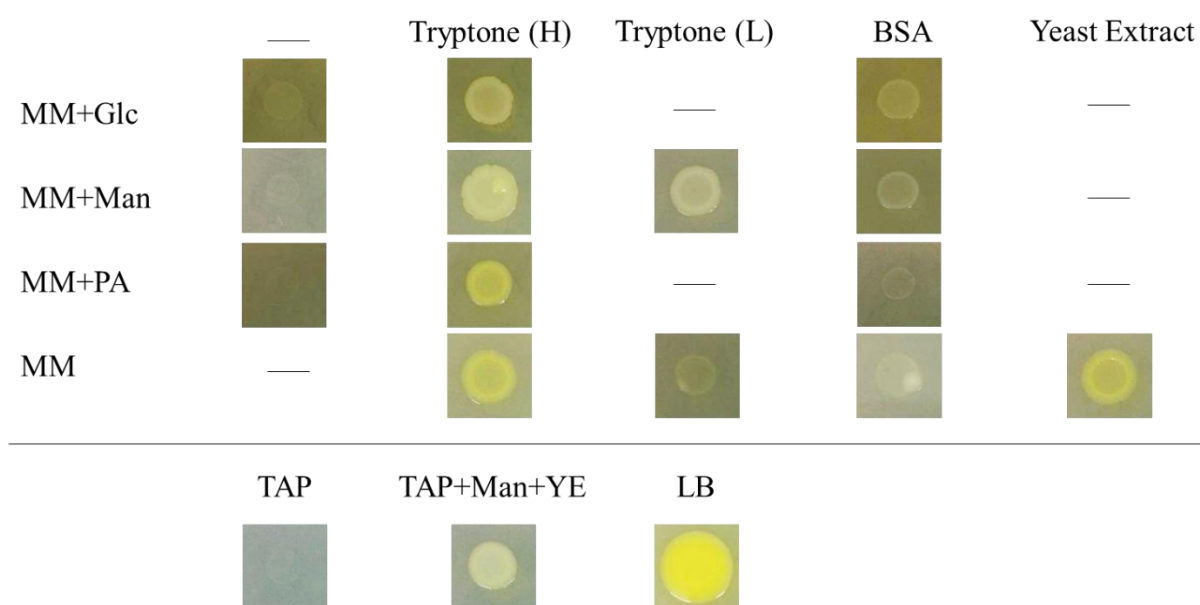
با توجه به نقش فعال میکروباکتریوم در تولید هیدروژن، در این تحقیق ادامه‌ی آزمایش‌ها بر شناخت بیشتر این باکتری متمرکز شده‌اند. شناخت منابع کربنی و نیتروژنی مورد استفاده توسط میکروباکتریوم برای درک توانایی‌ها و ارتباطی که ممکن است با کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست برقرار کند حائز اهمیت است. بنابراین در این قسمت از تحقیق رشد این باکتری بر روی منابع کربنی و نیتروژنی متفاوت بررسی شده است.

۱-۴-۴-۴. منابع کربن و نیتروژن

در این قسمت اثر منابع کربنی گلوکز، مانیتول و پتاسیم استات در حضور منابع نیتروژنی آمونیوم، تریپتون و پروتئین آلبومین (BSA) بر رشد میکروباکتریوم بررسی شده است. در بعضی از گروه‌های آزمایشی از دو غلظت ۰/۸ و ۰/۱ g/L تریپتون استفاده شده است. به علاوه رشد در محیط کشت‌های کمینه، کمینه به اضافه عصاره‌ی

مخمر، TAP، TYM و LB نیز بررسی شده است. لازم به ذکر است که تریپتون، آلبومین و عصاره مخمر علاوه بر منبع نیتروژن، منبع کربن نیز هستند.

آشکار است که میکروباکتریوم تنها در محیط کشت‌هایی که شامل ترکیبات پروتئینی و مشتقات آن (تریپتون، آلبومین و عصاره مخمر) هستند، رشد می‌کند (شکل ۴-۳۴).



شکل ۴-۳۴. رشد میکروباکتریوم در حضور منابع کربن و نیتروژن مختلف.

از آنجا که در بخش قبل مشاهده کردیم میکروباکتریوم قادر به مصرف مانیتول است بنابراین ممکن است علت رشد نکردن این باکتری در محیط کشت بر پایه‌ی محیط کشت کمینه و حاوی مانیتول عدم توانایی این باکتری در مصرف آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن باشد. همچنین اختلاف بین رشد در محیط کشت‌های دارای غلظت‌های مختلف تریپتون نشان دهنده‌ی این است که رشد این باکتری به مقدار تریپتون موجود در محیط کشت وابسته است. همانطور که در شکل ۴-۳۴ مشاهده می‌شود حضور مانیتول علاوه بر تریپتون سبب افزایش رشد میکروباکتریوم در هر دو غلظت کم و زیاد تریپتون می‌شود. برای شفاف شدن نقش ترکیبات پروتئینی و مشتقات آن مطالعات بیشتری لازم است.

به همین دلیل در ادامه آزمایشی انجام شده است تا پاسخ سوال‌های زیر مشخص شود:

آیا آگزوتروف بودن میکروباکتریوم بر یکی یا تعدادی از اسیدهای آمینه دلیل رشد این باکتری تنها در حضور مشتقات پروتئینی است؟ یا اینکه میکروباکتریوم از این ترکیبات به عنوان منبع کربن یا نیتروژن برای رشد استفاده می کند؟

بنابراین رشد بر روی ۲۰ اسید آمینه به صورت تک تک در محیط کشت جامد بر پایه ی محیط کشت کمینه حاوی ۵ g/l مانیتول بررسی شده است. دو حالت متفاوت محیط کشت کمینه شامل ۸ mM آمونیوم و محیط کشت کمینه عاری از آمونیوم برای بررسی اثر تمام اسیدهای آمینه مطالعه شده است.

همانطور که در شکل ۴-۳۵ مشاهده می شود میکروباکتریوم در حضور تمام اسیدهای آمینه مستقل از حضور آمونیوم رشد می کند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که این باکتری برای هیچ یک از اسیدهای آمینه آگزوتروف نیست. علاوه بر آن حضور آمونیوم تاثیری بر رشد این باکتری در حضور اسیدهای آمینه ندارد.

	+ NH ₄ ⁺	- NH ₄ ⁺		+ NH ₄ ⁺	- NH ₄ ⁺
Alanine			Glutamic acid		
Glycine			Arginine		
Isoleucine			Histidine		
Leucine			Lysine		
Proline			Serine		
Valine			Threonine		
Phenylalanine			Cysteine		
Tryptophan			Methionine		
Tyrosine			Asparagine		
Aspartic acid			Glutamine		

شکل ۴-۳۵. رشد میکروباکتریوم بر اسیدهای آمینه در حضور و عدم حضور آمونیوم در محیط کشت ها.

۴-۴-۲. میکروباکتریوم در حضور مشتقات پروتئینی رشد می‌کند.

ممکن است هر یک از موارد زیر دلیل این باشند که میکروباکتریوم تنها در حضور مشتقات پروتئینی رشد می‌کند:

- میکروباکتریوم توانایی مصرف^۱ آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن برای رشد را ندارد. با توجه به اینکه آمونیوم بهترین منبع نیتروژن شناخته شده برای باکتری‌ها است [۱۰۲]، امکان اینکه میکروباکتریوم توانایی مصرف آمونیوم را نداشته باشد بسیار کم است ولی ناممکن نیست.
- غلظت ۸ mM آمونیوم برای میکروباکتریوم سمی باشد. با توجه به این که در تمام محیط کشت‌های کمینه غلظت آمونیوم ۸ mM است و زمانی که به این محیط‌ها مشتقات پروتئینی اضافه می‌شود این باکتری رشد می‌کند. فرضیه‌ی سمی بودن این غلظت از آمونیوم نادرست است.
- گلوکز، مانیتول و پتاسیم استات به عنوان منبع انرژی سلول‌های میکروباکتریوم مصرف شوند. مصرف اسیدهای آمینه در سلول‌ها تامین کننده‌ی منبع نیتروژن (آمونیوم) و کربن (کتواسیدها) است. براساس تحقیقات انجام شده توسط Calatrava و همکاران (۲۰۱۸) چنانچه منبع کربن در اختیار باکتری نباشد که تامین کننده‌ی انرژی از طریق چرخه‌ی (TCA) tricarboxylic acid cycle باشد، مقداری از کتواسید تولید شده از مصرف اسیدآمینه به مصرف چرخه‌ی TCA برای تامین انرژی مورد نیاز حیات سلول می‌رسد و در نتیجه عدم توازن بین کربن و نیتروژن در چرخه‌ی central glutamine synthase-glutamine oxoglutarate amino transferase (GS-GOGAT) به وجود می‌آید که سبب توقف رشد باکتری می‌شود. در حالی که چنانچه منبع کربنی مناسب برای مصرف شدن در چرخه‌ی TCA و تولید انرژی موجود باشد، چرخه‌ی GS-GOGAT فعال شده و اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و در نتیجه نوکلئوتیدهای مورد نیاز برای رشد سلول تولید می‌شوند [۱۰۳]. چنانچه در این تحقیق گلوکز، مانیتول و پتاسیم استات به عنوان منبع انرژی استفاده شوند، در حضور مقدار زیادی آمونیوم موجود در کشت (۸ mM) باکتری منبع کربن مورد نیاز برای تولید اسیدهای آمینه در چرخه‌ی GS-GOGAT را دارد و این کربن از دامینه شدن اسیدهای آمینه‌ی موجود در محیط کشت تامین می‌شود. با اینکه نقش دقیق مشتقات پروتئینی از نظر تامین کربن یا نیتروژن مورد نیاز رشد میکروباکتریوم به صورت دقیق مشخص نیست، آشکار است که حضور این ترکیبات در محیط کشت برای رشد این باکتری الزامی است.

^۱ Assimilation

۴-۴-۵. رشد کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست این دو میکروارگانیسم

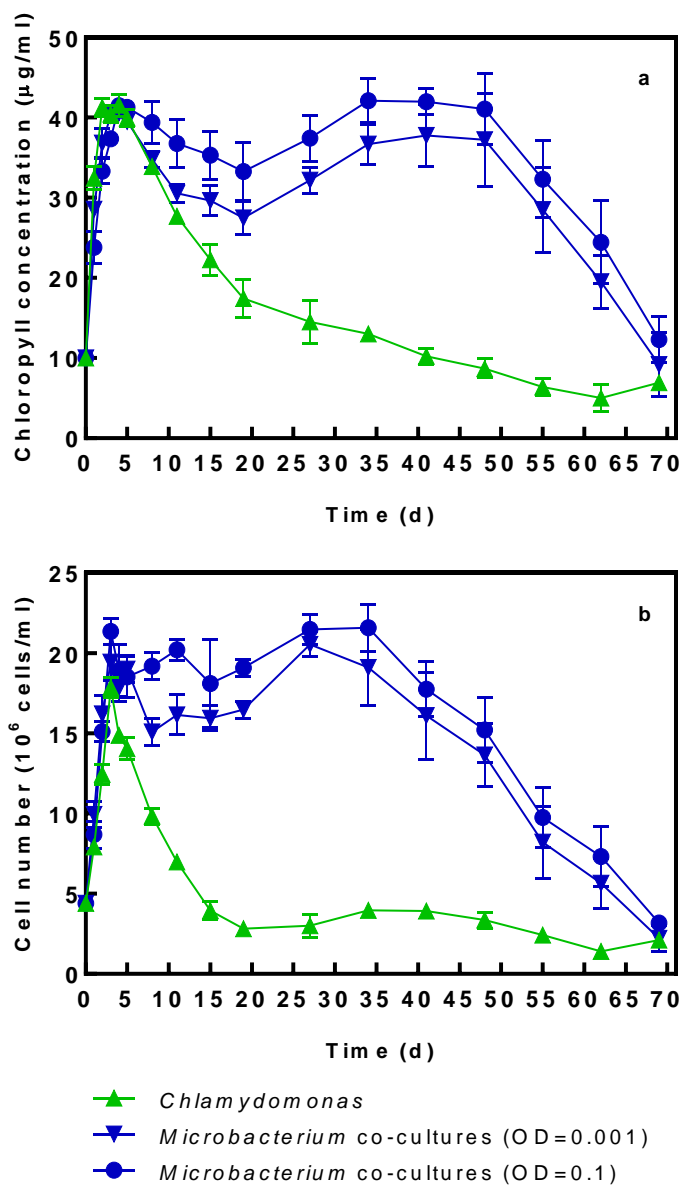
در این قسمت از تحقیق اثر هم‌زیستی کلامیدوموناس و میکروباکتریوم بر رشد این جلبک و باکتری بررسی شده است. به این منظور کلامیدوموناس با غلظت اولیه کلروفیل $10 \mu\text{g/ml}$ معادل 10^6 cells/ml با $4/4$ دو غلظت اولیه‌ی مختلف میکروباکتریوم (دانسیتته‌ی نوری $0/1$ و $0/001$) کشت داده شده است. کشت‌های خالص کلامیدوموناس و کشت‌های خالص میکروباکتریوم با هر دو غلظت به عنوان کشت‌های کنترلی در نظر گرفته شده‌اند. این آزمایش در محیط کشت TYM^{L} (مانیتول 5 g/l + عصاره‌ی مخمر $0/4 \text{ g/l}$ + TAP) در معرض شدت نور 90 PPFD انجام شده است. غلظت کلروفیل و تعداد سلول‌های کلامیدوموناس به مدت 69 روز اندازه‌گیری شده‌اند. در روز 45 آزمایش، تعداد سلول‌های میکروباکتریوم در هر دو حالت کشت‌های کنترلی و کشت‌های هم‌زیست شمارش شده‌اند و نیز تغییرات دانسیته‌ی نوری این باکتری در ماه اول اندازه‌گیری شده است. همچنین ارتباط فیزیکی بین سلول‌های کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست در زیر میکروسکوپ مشاهده شده است.

۴-۴-۵.۱. رشد کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست

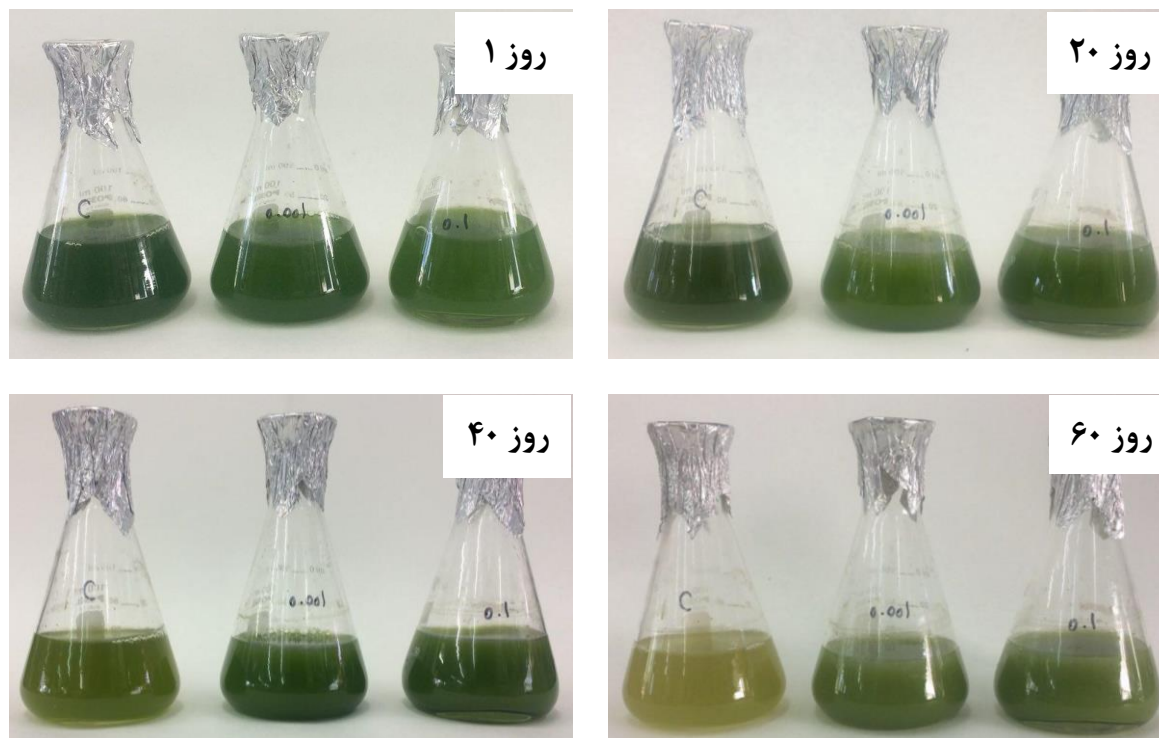
در شکل ۴-۳۶ نتایج غلظت کلروفیل و شمارش سلولی نشان می‌دهند که هم‌زیستی با میکروباکتریوم اثر مثبت قابل توجهی بر زیست‌پذیری^۱ کلامیدوموناس در بلند مدت دارد. در کشت‌های کنترلی غلظت کلروفیل و تعداد سلول‌ها به ترتیب پس از چهار و سه روز کاهش می‌یابد. در کشت‌های هم‌زیست به طور مشابه کاهش غلظت کلروفیل و تعداد سلول‌ها از همان روزهای چهارم و سوم ولی با نرخ آهسته‌تر شروع می‌شوند. از سوی دیگر پس از چند روز کلامیدوموناس مجدد رشد کرده و برای مدت طولانی زیست‌پذیری خود را حفظ می‌کند. آشکار است که کشت کنترلی کلامیدوموناس فاقد فاز سکون رشد است ولی در کشت‌های هم‌زیست زیست‌پذیری سلول‌های کلامیدوموناس تا مدت زمان طولانی مشاهده می‌شود (شکل ۴-۳۶). همچنین دانسیته‌ی نوری بالاتر میکروباکتریوم ($\text{OD}_{600=0/1}$) اثر مثبت بیشتری بر زیست‌پذیری کلامیدوموناس تا پایان آزمایش دارد.

در شکل ۴-۳۷ تصاویر کشت‌ها در روزهای $1, 20, 40, 60$ نشان داده شده‌اند. تغییر رنگ کشت کنترلی کلامیدوموناس در طول زمان به وضوح مشخص است. همچنین آشکار است که کشت‌های هم‌زیست رنگ سبز خود را تا مدت زمان بیشتری حفظ می‌کنند.

¹ Viability



شکل ۴-۳۶. غلظت کلروفیل (a) و تعداد سلولها (b) در کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت های کنترلی جلبک در شرایط هوازی، در محیط کشت TYM^{L} . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

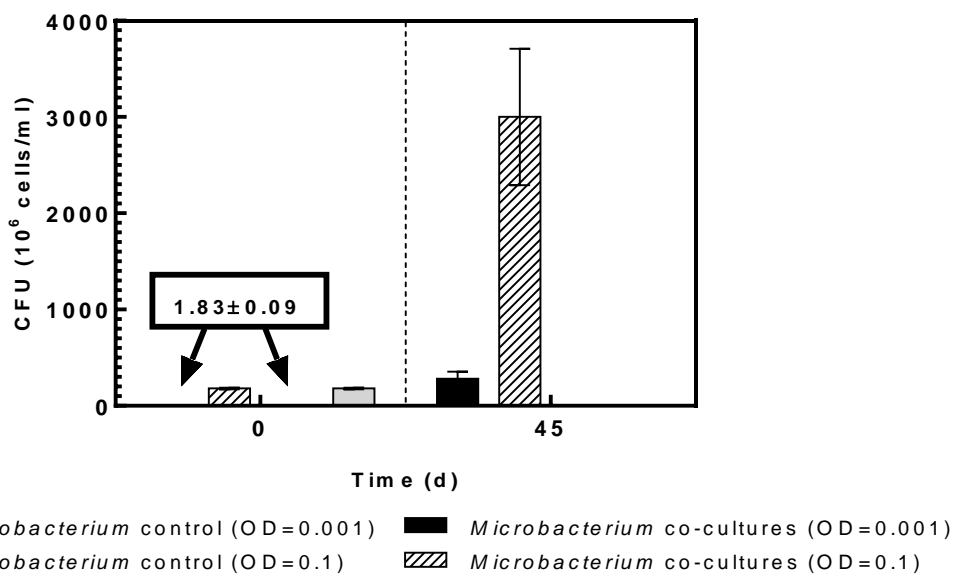


شکل ۴-۳۷. تصویر روزهای ۱، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ام کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی جلبک در شرایط هوازی و در محیط کشت TYM^L .

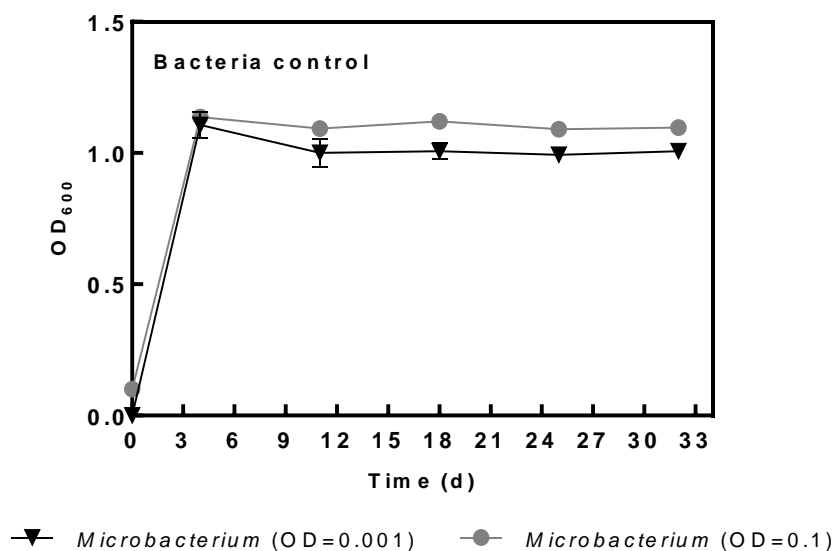
۴-۵-۲. رشد میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست

در این بخش تعداد سلول‌های میکروباکتریوم در کشت‌های کنترلی و کشت‌های هم‌زیست با استفاده از روش واحد کلونی‌های تشکیل شده (CFU) که در بخش روش کار توضیح داده شده است در شروع آزمایش و روز ۴۵ام آزمایش مشخص شده‌اند. تعداد اولیه سلول‌های میکروباکتریوم در کشت‌های دارای دانسیته‌ی نوری 0.001 در ابتدای آزمایش $10^6 \times 1/83$ بوده است که در مقیاس نمودار ۴-۳۸ قابل رویت نبوده و داخل نمودار اضافه شده است. پس از گذشت ۴۵ روز سلول‌های میکروباکتریوم در کشت‌های کنترلی می‌میرند و هیچ کلونی‌ای از آن‌ها رشد نمی‌کند. در حالی که در هر دو گروه کشت‌های هم‌زیست تعداد زیادی سلول‌های میکروباکتریوم اندازه‌گیری شده‌اند. تعداد سلول‌ها در کشت‌های هم‌زیستی که با دانسیته‌ی نوری بالاتر شروع شده‌اند بیشتر است.

همچنین در شکل ۴-۳۹، رشد سریع میکروباکتریوم در چهار روز اول آزمایش مستقل از مقدار اولیه دانسیته‌ی نوری این باکتری، در کشت‌های کنترلی دیده می‌شود. براساس نمودار دانسیته‌ی نوری پس از آن هر دو گروه کشت‌های کنترلی وارد فاز سکون رشد شده و حداقل تا ۳۳ روز در آن فاز باقی می‌مانند. در حالی که با استفاده از روش شمارش کلونی در روز ۳۰ام می‌دانیم که سلول‌های باکتری در کشت‌های کنترلی مرده‌اند.



شکل ۴-۳۸. غلظت سلولی میکروباکتریوم در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت های کنترلی باکتری در شرایط هوازی، در محیط کشت TYM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از سه تکرار مستقل بیولوژیکی هر آزمایش و سه تکرار فنی برای شمارش سلول ها است.



شکل ۴-۳۹. دانسیته ی نوری میکروباکتریوم در کشت های کنترلی در شرایط هوازی، در محیط کشت TYM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۵-۳. ارتباط فیزیکی بین سلول های کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در کشت های

همزیست

تصویر میکروسکوپی در روز ۲۷ام آزمایش از کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (شکل ۴-۴۰) نشان می دهد که سلول های باکتری اغلب به صورت آزادانه در محیط کشت غوطه ور هستند و تعداد اندکی از آنها بر سطح سلول های جلبک قرار دارند.



شکل ۴-۴۰. تصویر میکروسکوپی کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم

۴-۵-۴. نوع رابطه ی همزیستی در کشت های همزیست کلامیدوموناس و میکروباکتریوم

با توجه به نتایج حاصل شده از این بخش از تحقیق آشکار است که همزیستی کلامیدوموناس و میکروباکتریوم اثر مثبت دو طرفه بر رشد و زیست پذیری این میکروارگانیسم ها در شرایط آزمایش دارد.

در شکل ۴-۳۳ (a) نشان داده شده است که میکروباکتریوم توانایی تولید اسیداستیک را دارد و به احتمال زیاد از این طریق به رشد و زیست پذیری سلول های کلامیدوموناس کمک می کند تا برای مدت طولانی، بالاترین غلظت کلروفیل و مقدار سلول ها را حفظ کند.

در کشت های همزیست غلظت کلروفیل و تعداد سلول های کلامیدوموناس بر خلاف کشت های کنترلی خالص پس از یک کاهش موقت مجدد افزایش می یابد و برای مدت طولانی در بیشترین مقدار خود باقی می ماند. به احتمال زیاد سلول های این ریزجلبک پس از چند روز به شرایط جدید عادت کرده و یا ترکیب محیط کشت بر اساس نیاز سلول ها به گونه ای تغییر می کند که کلامیدوموناس دوباره می تواند رشد کند و زیست پذیری خود را برای مدت بیشتری حفظ کند.

از سوی دیگر Vogel و همکاران (۱۹۷۸) تولید آمینواسیدهای آسپاراتات، لوسین، متیونین، فنیل آلانین، تیروسین و والین توسط کلامیدوموناس را گزارش کرده اند [۱۰۴]. بنابراین در راستای نتایج حاصل شده از

آزمایش‌های بخش ۴-۴-۴، ممکن است، کلامیدوموناس از طریق تولید و ترشح آمینواسیدها به محیط کشت، نیاز میکروباکتریوم به این ترکیبات برای رشد و ادامه‌ی زندگی را تامین کند. هر چند بررسی صحت این فرضیه و تعیین آمینواسیدهای تولید شده توسط کلامیدوموناس در شرایط آزمایش به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

۴-۴-۶. بررسی عملکرد میکروباکتریوم و هم‌زیستی با کلامیدوموناس در محیط کشت‌های مختلف
در این بخش از تحقیق تولید هیدروژن، رشد کلامیدوموناس و میکروباکتریوم و غلظت متابولیت‌های مختلف در محیط کشت در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی این جلبک و باکتری بررسی شده است. آزمایش‌ها با غلظت اولیه‌ی کلروفیل $10 \mu\text{g/ml}$ و دانسیته نوری میکروباکتریوم برابر 0.1 در محیط کشت‌ها TAP, (مانیتول 5 g/l TAP + 5 g/l) TM^{L} , (عصاره‌ی مخمر 0.4 g/l TAP + 0.4 g/l) TY^{L} و (مانیتول 1 g/l + 5 g/l عصاره‌ی مخمر 0.4 g/l TAP + 0.4 g/l) TYM^{L} و در معرض شدت نور 50 PPFD انجام شده است.

۴-۶-۱. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها

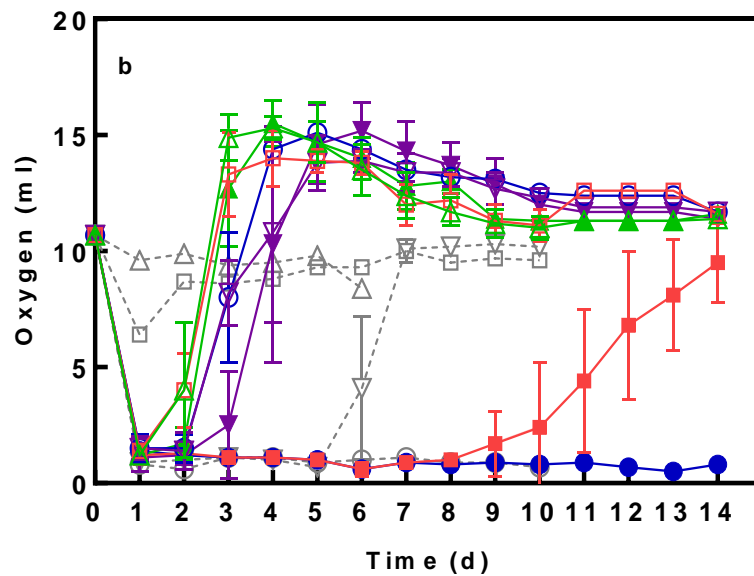
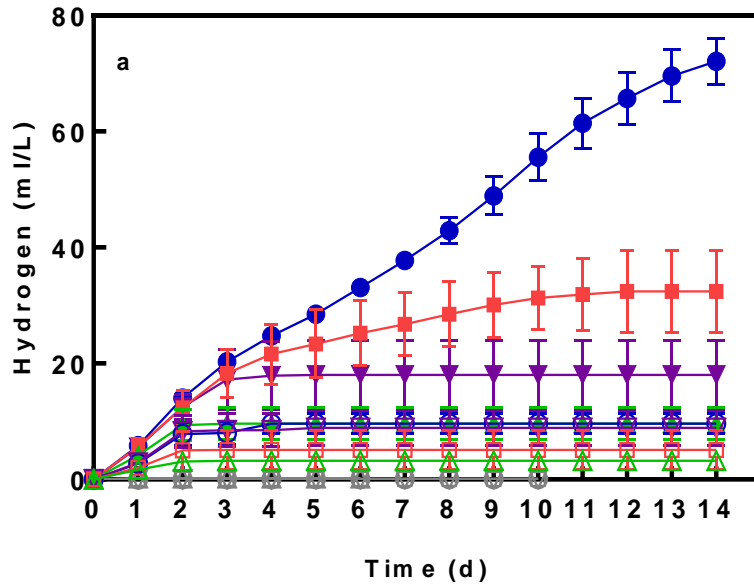
مانند نتایج حاصل شده در بخش‌های قبل، تولید هیدروژن در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس با افزودن عصاره‌ی مخمر بهبود می‌یابد. همچنین در هر محیط کشت مقدار هیدروژن تولید شده در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم بیشتر از مقدار تولید شده در کشت کنترلی کلامیدوموناس است. به علاوه کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم در هیچ کدام از محیط کشت‌ها هیدروژن تولید نمی‌کنند.

تولید هیدروژن در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس در تمام محیط کشت‌ها دو روز ادامه دارد. در حالی که در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت‌های TYM، TM، TAP و TY به ترتیب ۲، ۱۱ و ۳ روز هیدروژن تولید می‌شود. در محیط کشت TYM تولید هیدروژن تا پایان آزمایش ادامه دارد و متوقف نمی‌شود (شکل ۴-۴۱ (a)). تطابق شکل‌های ۴-۴۱ (a) و ۴-۴۱ (b) ارتباط دقیق را بین تولید هیدروژن و شرایط کم‌اکسیژنی در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست نشان می‌دهد. برای کسب اطمینان از اینکه کلامیدوموناس تولید کننده‌ی هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست است، در روز هفتم آزمایش، زمانی که تولید هیدروژن در کشت‌ها ادامه داشت، سلول‌های ریزجلبک و باکتری با استفاده از سانتریفیوژ و فیلتر $0.2 \mu\text{m}$ از سوپرناتانت کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت TYM جدا شده و سپس میکروباکتریوم به آن‌ها تلقیح شد. پس از تلقیح باکتری، تولید هیدروژن در آن کشت‌ها بررسی شد. کشت‌های میکروباکتریوم در سوپرناتانت هیدروژن تولید نکردند. این نتیجه تایید کننده‌ی این است که کلامیدوموناس تولید کننده‌ی هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم است.

۴-۶-۲. غلظت کلروفیل کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست در محیط

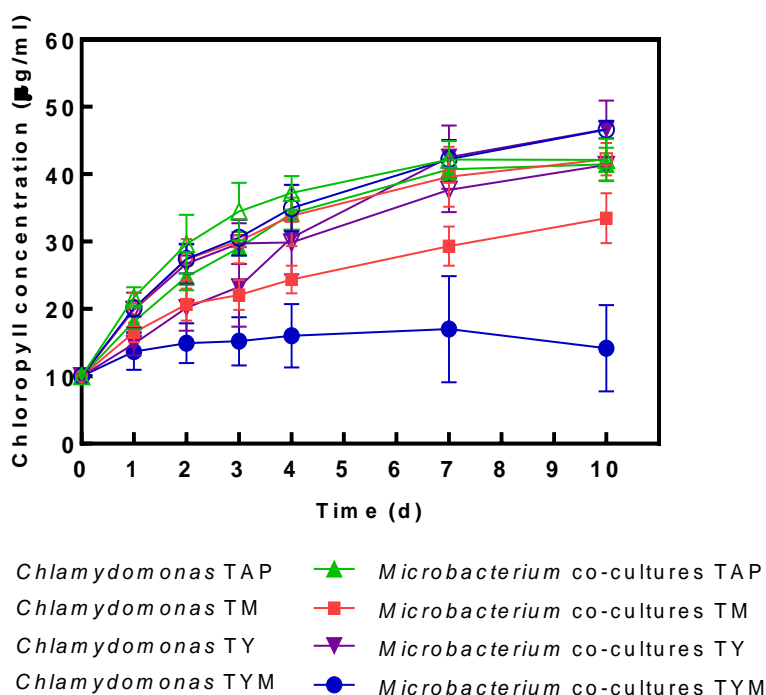
کشت‌های مختلف

نتایج کلروفیل نشان می‌دهند که در کشت‌های هم‌زیست بیشترین اثر منفی بر رشد کلامیدوموناس در محیط کشت‌های TYM، TM مشاهده می‌شود (شکل ۴-۴۲). آشکار است که اثر منفی هم‌زیستی میکروباکتریوم بر رشد کلامیدوموناس در محیط کشت TYM بیشتر است تا جایی که این جلبک تا روز هفتم رشد ناچیزی دارد و پس از آن غلظت کلروفیل کاهش می‌یابد. در حالی که محیط کشت TM، رشد کلامیدوموناس تا روز دهم ادامه دارد. نحوه‌ی رشد کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TY جالب توجه است. در هم‌زیستی با میکروباکتریوم، در روز اول آزمایش رشد کند کلامیدوموناس در این محیط کشت دیده می‌شود که با افزایش سریع نرخ رشد تا روز ۱۰ام همراه است. هم‌زیستی با میکروباکتریوم در محیط کشت TAP اثر قابل توجهی بر رشد کلامیدوموناس ندارد.



- | | | |
|---------------------|-------------------|----------------------|
| ▲ Chlamydomonas TAP | ▲ cocultures TAP | △ Microbacterium TAP |
| ■ Chlamydomonas TM | ■ co-cultures TM | □ Microbacterium TM |
| ▼ Chlamydomonas TY | ▼ co-cultures TY | ▽ Microbacterium TY |
| ● Chlamydomonas TYM | ● co-cultures TYM | ○ Microbacterium TYM |

شکل ۴-۴. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن موجود (b) در فضای گاز بالاسری کشت های همزیست کلامیدوموناس- میکروباکتریوم و کشت های کنترلی در محیط کشت های مختلف. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۴۲. غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی این جلبک در محیط کشت‌های مختلف. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.

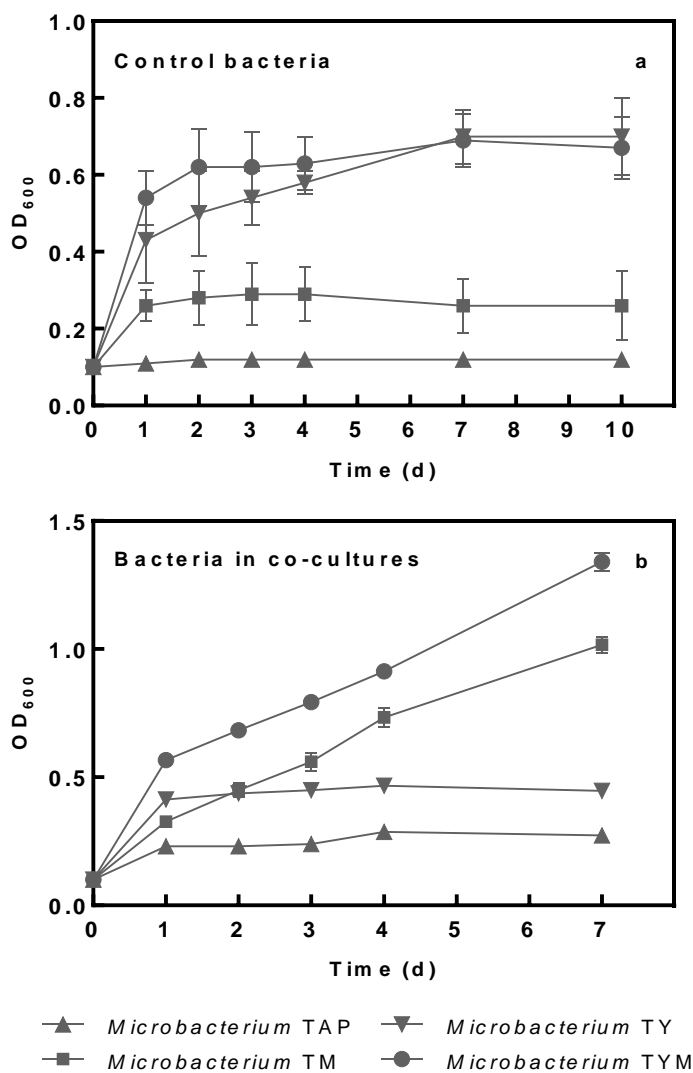
۴-۴-۳-۶. دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم در کشت‌های کنترلی این باکتری و کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت‌های مختلف

همانطور که در شکل ۴-۴۳ (a) مشاهده می‌شود میکروباکتریوم در محیط کشت TAP رشد نمی‌کند در حالی که در محیط کشت TM رشد بسیار ناچیزی که سریع به فاز سکون منتهی می‌شود، دارد. در محیط کشت‌های TY و TYM بیشترین رشد میکروباکتریوم در رسیدن به دانسیته‌ی نوری حدود ۰/۷ در کشت‌های کنترلی حاصل می‌شود.

با استفاده از سانتیفریوژ سلول‌های کلامیدوموناس و میکروباکتریوم موجود در کشت‌های هم‌زیست جدا شده‌اند (مراجعه به فصل روش کار). و به این ترتیب دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت‌های مختلف اندازه‌گیری شده است (شکل ۴-۴۳ (b)).

میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TAP رشد قابل ملاحظه‌ای ندارد. در محیط کشت TY، در روز اول رشد نسبتاً خوبی دیده می‌شود (دانسیته‌ی نوری برابر ۰/۴۲) که به سرعت با فاز سکون همراه می‌شود. در محیط کشت TM، در روز اول رشد کمتر از محیط کشت TY است (دانسیته‌ی نوری برابر ۰/۳۳) با این تفاوت که رشد در این محیط کشت تا روز هفتم و رسیدن به دانسیته‌ی نوری ۱/۰۲ ادامه دارد. همچنین رشد

در محیط کشت TYM با بیشترین نرخ در روز اول (دانسیتته‌ی نوری ۰/۵۷) نسبت به محیط کشت‌های دیگر آغاز شده و مانند محیط کشت TM تا پایان روز هفتم و رسیدن به دانسیته‌ی نوری ۱/۳۴ ادامه دارد. قابل توجه است که نمودار رشد در محیط کشت‌های TYM و TM از روز دوم تقریباً به صورت موازی است و احتمالاً اختلاف نرخ رشد در روز اول به حضور عصاره‌ی مخمر در این محیط کشت‌ها وابسته است.



شکل ۴-۴۳. دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم در کشت‌های کنترلی (a) و کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (b) در محیط کشت‌های مختلف. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۴-۶. آنالیز متابولیت‌ها

در اینجا روند مصرف اسیداستیک (شکل ۴-۴) و مانیتول (شکل ۴-۴۵) و نیز تولید محصولات تخمیری غالب مانند اسیدلاکتیک (شکل ۴-۴۶)، اسیدفرمیک (شکل ۴-۴۷) و اتانول (شکل ۴-۴۸) در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و میکروباکتریوم و کشت‌های هم‌زیست این دو میکروارگانیسم در شرایط آزمایش اندازه‌گیری شده است. آنالیز این متابولیت‌ها در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس در محیط کشت TYM تا روز سوم در کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت TAP تا روز چهارم انجام شده است.

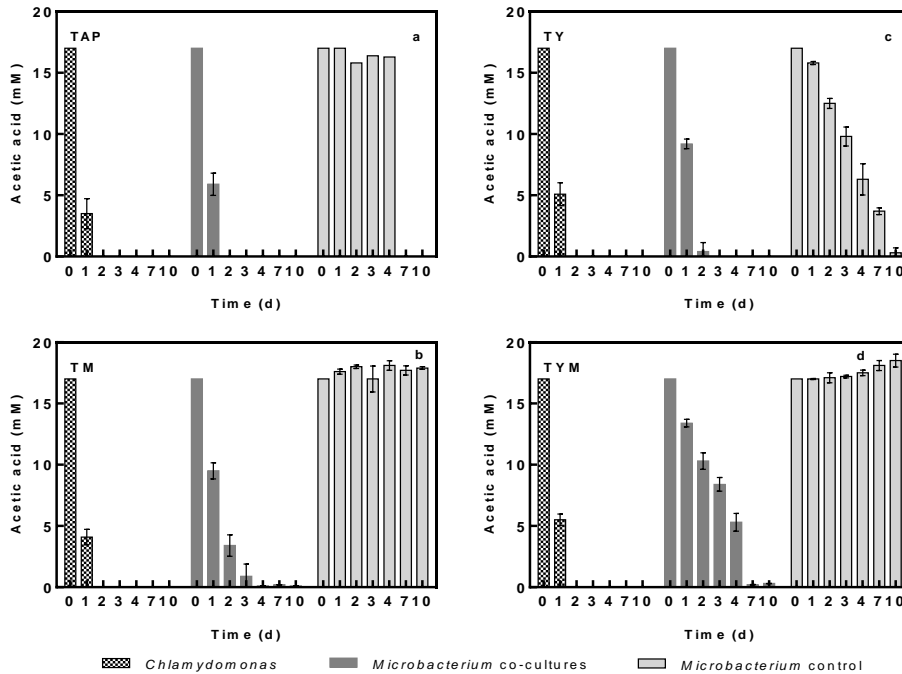
آنالیز اسیداستیک نشان می‌دهد که کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس در محیط کشت‌های TY و TYM، اسیداستیک را با نرخ کندتری مصرف می‌کنند. همچنین نرخ مصرف اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست در هر محیط کشت کمتر از نرخ مصرف آن در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس در همان محیط کشت است. در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TYM اسیداستیک در تمام روزها در محیط کشت دیده می‌شود (شکل ۴-۴۴(d)). در کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت TAP اسیداستیک مصرف نمی‌شود. در حالی که در محیط کشت TY مصرف اسیداستیک مشاهده می‌شود. در محیط کشت‌های TM و TYM، تجمع بیشتر اسیداستیک در کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم دیده می‌شود.

شکل ۴-۴۵ تغییرات غلظت مانیتول را در محیط کشت‌های TM و TYM نشان می‌دهد. همانطور که در بخش‌های قبل نیز بیان شد، کلامیدوموناس مانیتول را مصرف نمی‌کند. مصرف مانیتول در هر دو کشت‌های هم‌زیست در دو محیط کشت دیده می‌شود. در حالی که کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم تنها در محیط کشت TYM مانیتول را مصرف می‌کنند.

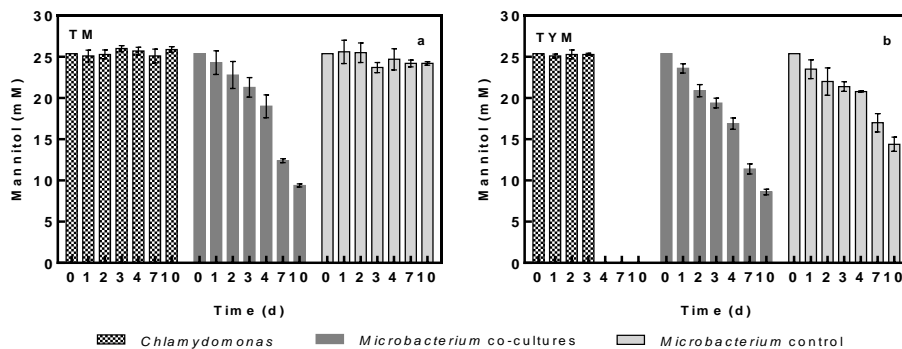
در شکل ۴-۴۶ نشان داده شده است که اسیدلاکتیک تنها در محیط کشت‌های TM و TYM در کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم و کشت‌های هم‌زیست تولید می‌شود. همچنین مقادیر بسیار ناچیزی از این ترکیب آلی در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس در روزهای اول مشاهده می‌شود. مقدار اسیدلاکتیک تولید شده در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TYM بیشتر از محیط کشت TM است.

همچنین شکل ۴-۴۷ نشان می‌دهد که کلامیدوموناس در تمام محیط کشت‌ها اسیدفرمیک تولید می‌کند و با اضافه کردن عصاره‌ی مخمر و مانیتول مقدار تولید این محصول تخمیری در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس افزایش می‌یابد. همانند کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس، در کشت‌های هم‌زیست مقدار قابل توجهی اسیدفرمیک تولید می‌شود. اتانول از دیگر محصولات تخمیری است که در کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم در تمام محیط کشت‌ها تولید می‌شود (شکل ۴-۴۸). مقدار تولید این محصول تخمیری در این

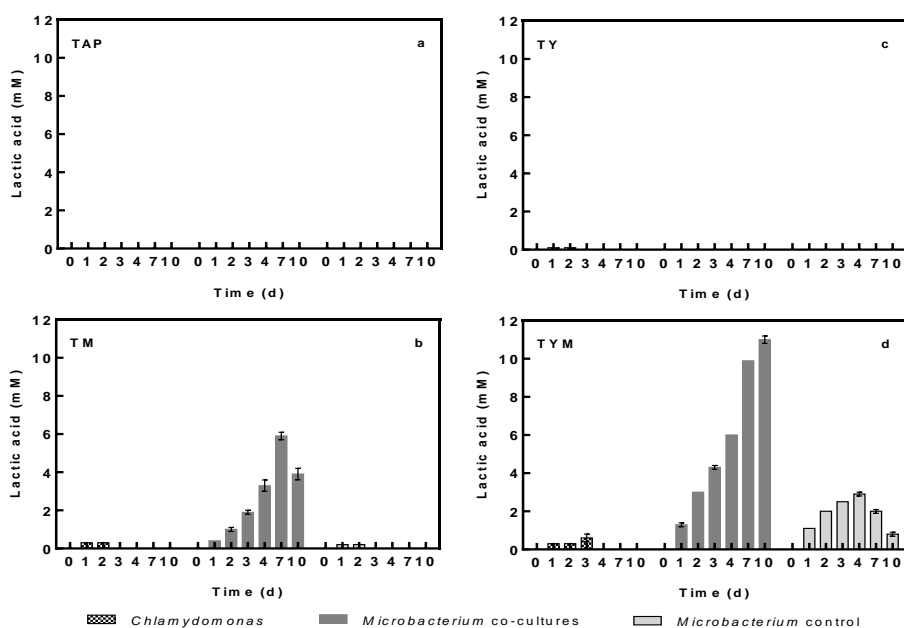
کشت‌ها در محیط کشت TYM بیشتر از سایر محیط کشت‌ها است. همچنین کلامیدوموناس در محیط کشت‌های TYM, TAP و TY انول تولید می‌کند.



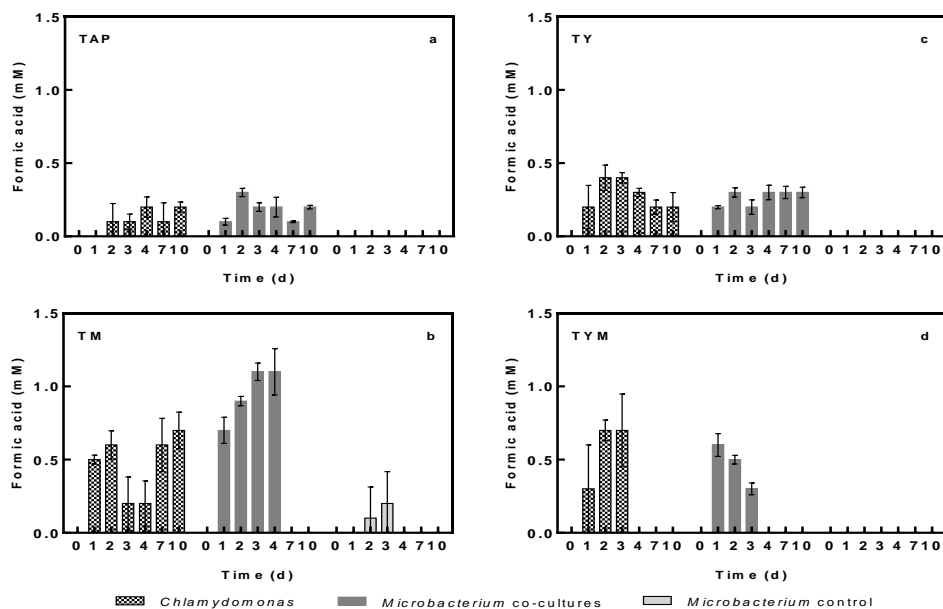
شکل ۴-۴۴. غلظت اسیداستیک در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی این در محیط کشت‌های (a) TAP، (b) TM^L ، (c) TY^L و (d) TYM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



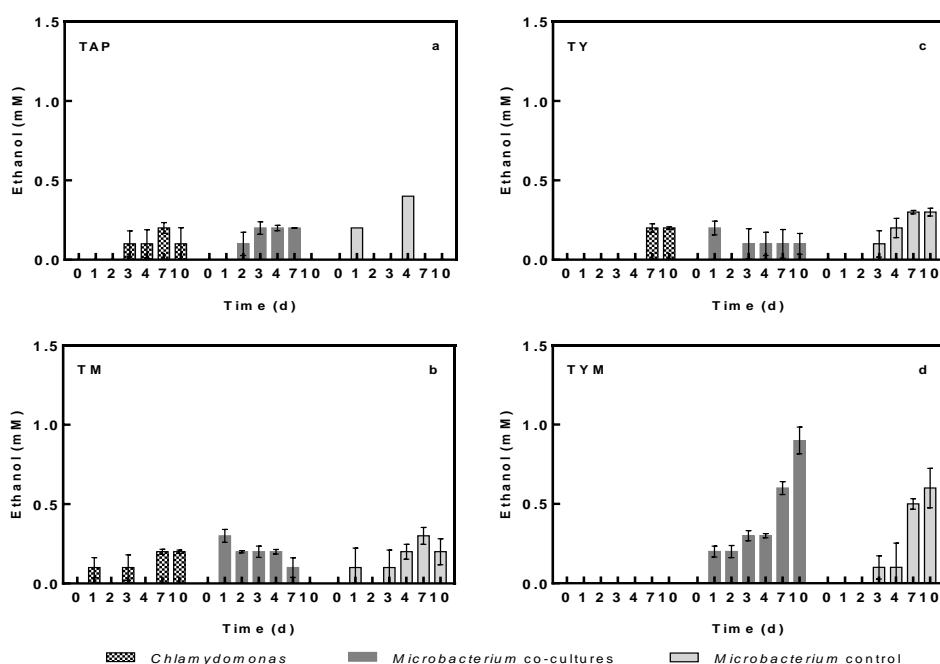
شکل ۴-۴۵. غلظت مانیتول در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی در محیط کشت‌های TM^L (a) و TYM^L (b). اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۴۶. غلظت اسیدلاکتیک در کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت های کنترلی در محیط کشت های TAP (a)، TM^L (b)، TY^L (c) و TYM^L (d). اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۴۷. غلظت اسیدفرمیک در کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت های کنترلی در محیط کشت های TAP (a)، TM^L (b)، TY^L (c) و TYM^L (d). اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۴. غلظت اتانول در کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت های کنترلی در محیط کشت های TAP (a)، (b) TM^L ، (c) TY^L و (d) TYM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۶-۵. محیط کشت مناسب برای تولید بلندمدت هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم

نتایج این بخش از تحقیق نشان دادند با وجود این که با افزودن مانیتول و عصاره ی مخمر به صورت جداگانه به کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم تولید هیدروژن در این کشت ها افزایش می یابد، بیشینه تولید زمانی حاصل می شود که هر دو به محیط کشت اضافه شوند. به نظر می رسد که در کشت های همزیست در محیط کشت TY با تمام شدن اثر مثبت عصاره ی مخمر بر میکروباکتریوم، رفتار کشت های همزیست از نظر رشد کلامیدوموناس و تولید هیدروژن مانند رفتار کشت های کنترلی کلامیدوموناس می شود. این شباهت رفتاری در محیط کشت های TAP نیز دیده می شود. در حالی که تاثیر همزیستی میکروباکتریوم بر رشد و تولید هیدروژن کلامیدوموناس در محیط کشت های TM و TYM برای مدت زمان طولانی تری ادامه دارد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که حضور مانیتول برای رشد و فعالیت میکروباکتریوم در کشت های همزیست ضروری است. با توجه به نتایج حاصل شده تولید هیدروژن در کشت های TM تنها تا روز ۱۱م ادامه دارد. در صورتی که فرضیه ی تولید و ترشح اسیدهای آمینه توسط کلامیدوموناس برای رشد میکروباکتریوم صحت داشته باشد می توان نتیجه گرفت که به دلایلی مانند تمام شدن منبع نیتروژن در محیط کشت، تولید این ترکیبات در کلامیدوموناس متوقف شده

و در نتیجه اثرات مثبت میکروباکتریوم مانند تنفس اکسیژن و تولید اسیداستیک برای تولید هیدروژن در کلامیدوموناس وجود نداشته و تولید هیدروژن قطع می‌شود.

همچنین آشکار است که اختلاف نرخ رشد میکروباکتریوم در محیط کشت‌های TM و TYM تنها در روز اول آزمایش مشاهده می‌شود که به احتمال زیاد این اختلاف به حضور عصاره‌ی مخمر در این محیط کشت‌ها مرتبط است. زمانی که اثر مثبت عصاره‌ی مخمر در محیط کشت TYM تمام می‌شود، رشد میکروباکتریوم مانند محیط کشت TM به رابطه‌ی هم‌زیستی با کلامیدوموناس وابسته می‌شود. به علاوه، با مقایسه‌ی رشد باکتری در کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم و کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TY می‌توان نتیجه گرفت که اثر عصاره‌ی مخمر بر رشد این باکتری در کشت‌های کنترلی طولانی‌تر از کشت‌های هم‌زیست است. ممکن است دلیل آن رقابت و مصرف برخی ترکیبات عصاره‌ی مخمر توسط کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست باشد. جالب توجه است که با در نظر گرفتن تغییرات غلظت اسیداستیک و مانیتول در کشت‌های کنترلی باکتری می‌توان نتیجه گرفت که در صورتی که عصاره‌ی مخمر در محیط کشت موجود باشد میکروباکتریوم مانیتول را به اسیداستیک ترجیح می‌دهد و تنها در صورتی که مانیتول در دسترس نباشد از اسیداستیک استفاده می‌کند.

در مجموع میکروباکتریوم برای رشد و ایفای نقش مثبت، به منظور تولید هیدروژن در هم‌زیستی با کلامیدوموناس به مشتقات پروتئینی به همراه یک منبع کربن مناسب مانند مانیتول احتیاج دارد. این باکتری به همراه مصرف مواد مورد نیاز رشد، اکسیژن موجود در محیط را نیز مصرف کرده و اسیداستیک مورد نیاز رشد و تولید هیدروژن در کلامیدوموناس را تولید می‌کند. از سوی دیگر هم‌زیستی با کلامیدوموناس نیاز این باکتری به مشتقات پروتئینی را برطرف می‌کند. به این ترتیب تولید بلندمدت هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم میسر می‌شود.

۴-۴-۷. کنترل غلظت مشتقات پروتئینی در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم

تا کنون در آزمایش‌های هم‌زیستی کلامیدوموناس و میکروباکتریوم از عصاره‌ی مخمر به عنوان منبع مشتقات پروتئینی استفاده شده است. عصاره‌ی مخمر یک ترکیب پیچیده شامل ترکیبات پروتئینی و پپتیدی و اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، فاکتورهای رشد و ... است. بنابراین ممکن است عواملی به غیر از تامین منابع کربن و نیتروژن که در بخش ۴-۴-۴ مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. رشد و فعالیت میکروباکتریوم و اثرات متقابل این باکتری با کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست را تحت تاثیر قرار دهند.

بنابراین در این قسمت از تحقیق از تریپتون که مجموعه‌ای از پپتیدها و آمینواسیدها است به عنوان جایگزین برای عصاره‌ی مخمر استفاده شده است که تنها نقش منبع تامین کربن یا نیتروژن را داشته باشد. همچنین دو غلظت ۲/۵ و ۰/۲۵ g/l تریپتون به منظور کنترل رشد میکروباکتریوم و بررسی اثر آن روی تولید هیدروژن

مطالعه شده است. از سوی دیگر با انجام یک سری آزمایش‌های تصادفی رشد بین باکتری‌های مختلف، مشاهده شده است که میکروباکتریوم در کنار باکتری دیگری به نام متیلوباکتریوم در محیط کشت فاقد مشتقات پروتئینی رشد قابل توجهی دارد. بنابراین علاوه بر غلظت‌های مختلف تریپتون، اثر هم‌زیستی با متیلوباکتریوم بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم بررسی شده است.

آزمایش با غلظت اولیه‌ی کلروفیل $10 \mu\text{g/ml}$ ، دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم 0.1 و دانسیته‌ی نوری متیلوباکتریوم 0.5 در معرض شدت نور 50 PPFd شروع شده است. بیوراکتورهای دارای باکتری و میکرو جلبک خالص به عنوان کنترل در نظر گرفته شده‌اند. از محیط کشت بر پایه‌ی، مانیتول 5 g/l TAP استفاده شده است.

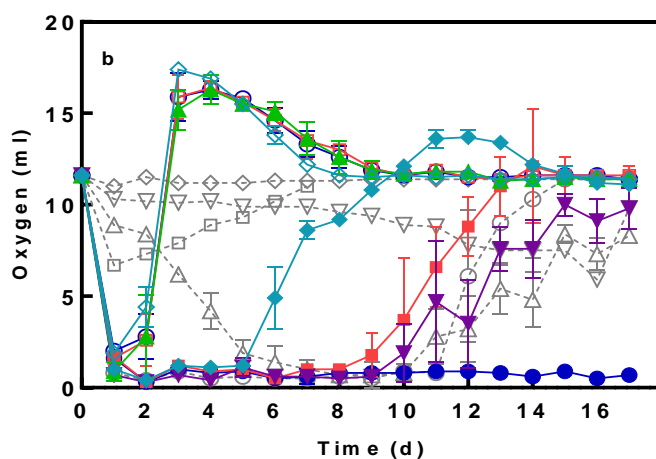
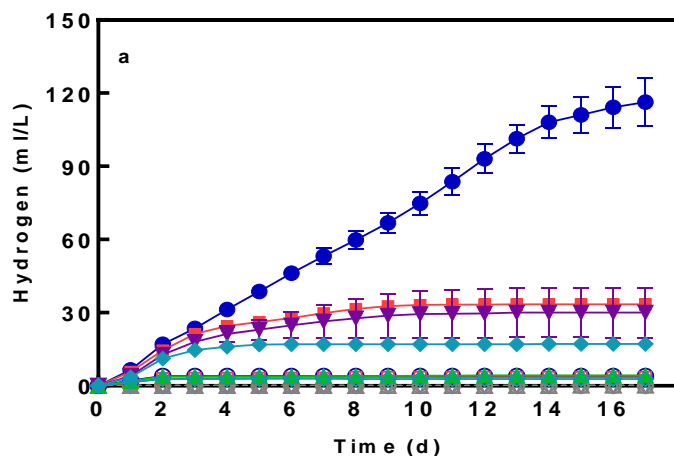
۴-۷-۱. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها

همانطور که در شکل ۴-۴۹ (a) مشاهده می‌شود افزودن تریپتون به محیط کشت سبب افزایش تولید هیدروژن می‌شود. با افزایش غلظت تریپتون در محیط کشت، هیدروژن بیشتری تولید می‌شود. تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست شامل میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم مشابه مقدار تولید شده در بیوراکتورهای دارای غلظت کم تریپتون است. متیلوباکتریوم نیز مانند میکروباکتریوم در شرایط آزمایش هیدروژن تولید نمی‌کند. هماهنگی دقیقی بین تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست مبنی بر تولید هیدروژن در شرایط کم‌اکسیژنی دیده می‌شود (شکل ۴-۴۹). شرایط کم‌اکسیژنی و تولید هیدروژن تنها از کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت دارای غلظت بالای تریپتون تا پایان آزمایش ادامه دارند. در کشت‌های کنترلی باکتری‌ها نشان داده شده است که در محیط کشت TM، میکروباکتریوم خالص و متیلوباکتریوم خالص تنفس سلولی قابل توجهی تا پایان آزمایش ندارند. درحالی‌که مصرف قابل توجه اکسیژن در کشت‌های هم‌زیست این دو باکتری مشاهده می‌شود (شکل ۴-۴۹ (b)).

۴-۷-۲. غلظت کلروفیل کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست در محیط

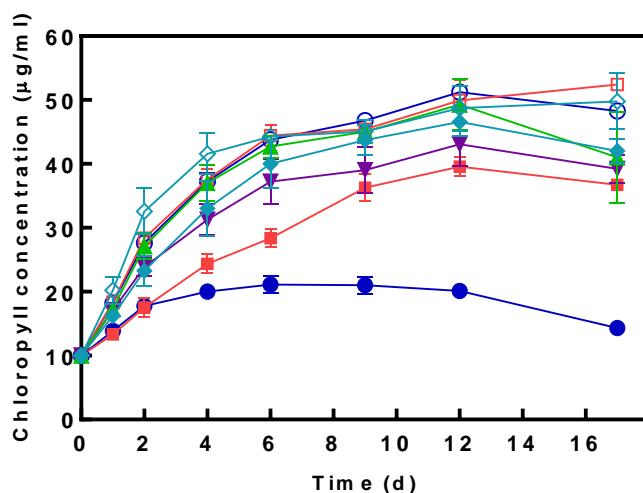
کشت‌های دارای غلظت‌های مختلف تریپتون و در هم‌زیستی با متیلوباکتریوم

تریپتون اثر قابل توجهی بر رشد کلامیدوموناس در کشت‌های کنترلی جلبک ندارد. در حالی‌که با افزایش غلظت تریپتون غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست کاهش می‌یابد. در محیط کشت با غلظت بالای تریپتون در کشت‌های هم‌زیست غلظت کلروفیل در شش روز اول آزمایش افزایش ملایمی داشته و سپس کاهش می‌یابد. روند تغییرات غلظت کلروفیل کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت با غلظت کم تریپتون مشابه روند تغییرات آن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم در محیط کشت TM است. با این اختلاف که حضور متیلوباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست تا حدودی اثر منفی میکروباکتریوم بر رشد کلامیدوموناس را تعدیل می‌کند (شکل ۴-۵۰).



- | | |
|---|---------------------------------------|
| ◇ Chlamydomonas TM | ◇ Microbacterium TM |
| □ Chlamydomonas TTM (Tryp=0.025 g/L) | ▽ Methylobacterium TM |
| ○ Chlamydomonas TTM (Tryp=2.5 g/L) | △ Micro-Methylo TM |
| ◆ Microbacterium (Micro) co-cultures TM | □ Microbacterium TTM (Tryp=0.025 g/L) |
| ▲ Methylobacterium (Methylo) co-cultures TM | ○ Microbacterium TTM (Tryp=2.5 g/L) |
| ▼ Micro-Methylo co-cultures TM | |
| ■ Microbacterium co-cultures TTM (Tryp=0.025 g/L) | |
| ● Microbacterium co-cultures TTM (Tryp=2.5 g/L) | |

شکل ۴-۴۹. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم و کشت های کنترلی، در محیط کشت های مختلف. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.

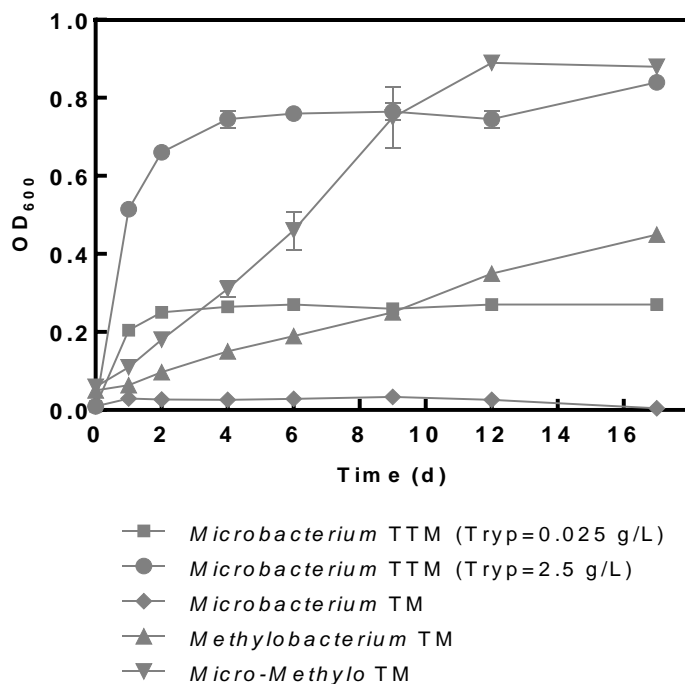


- ◇ *Chlamydomonas* TM
- ◆ *Microbacterium* (Micro)co-cultures TM
- ▲ *Methylobacterium* (Methylo) co-cultures TM
- ▼ Micro-Methylo co-cultures TM
- ▣ *Chlamydomonas* TTM (Tryp=0.025 g/L)
- *Microbacterium* co-cultures TTM (Tryp=0.025 g/L)
- *Chlamydomonas* TTM (Tryp=2.5 g/L)
- *Microbacterium* co-cultures TTM (Tryp=2.5 g/L)

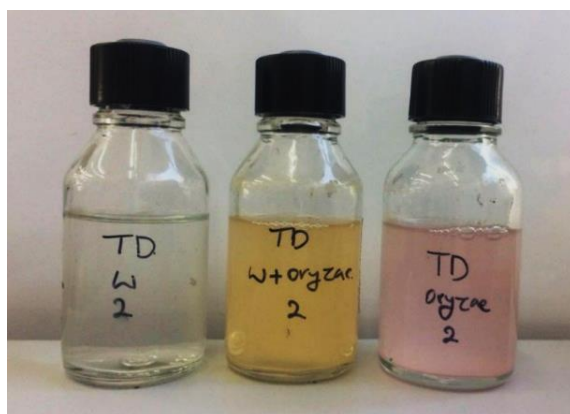
شکل ۴-۵۰. غلظت کلروفیل در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم و کشت های کنترلی جلبک در محیط کشت های مختلف. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۷-۳. دانسیته ی نوری در کشت های کنترلی

همانطور که در شکل (۴-۵۱) نشان داده شده است، در شرایط آزمایش میکروباکتریوم در محیط کشت TM رشد نمی کند. با افزودن تریپتون به این محیط کشت رشد سریع این باکتری در روزهای اول مشاهده می شود که پس از دو یا چهار روز بسته به غلظت تریپتون به فاز سکون رشد منتهی می شود. رشد کند و پیوسته ی متیلوباکتریوم تا پایان آزمایش در محیط کشت TM مشاهده می شود. همچنین کشت های هم زیست میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم به طور پیوسته و با سرعت بیشتری نسبت به کشت های خالص متیلوباکتریوم تا روز ۱۲ام رشد می کنند. تصویری از این کشت ها در روز ۱۲ام در شکل ۴-۵۲ نشان داده شده است.



شکل ۴-۵۱. دانسیته‌ی نوری کشت‌های خالص میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم و کشت‌های هم‌زیست این دو باکتری در محیط کشت‌های مختلف. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۵۲. تصویر از چپ به راست کشت‌های خالص میکروباکتریوم، کشت‌های هم‌زیست میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم و کشت خالص متیلوباکتریوم در محیط کشت TM^L .

۴-۷-۴-۴. کنترل رشد میکروباکتریوم در هم‌زیستی با کلامیدوموناس

نتایج این بخش از تحقیق نشان دادند که رشد میکروباکتریوم با غلظت تریپتون در محیط کشت، ارتباط مستقیم دارد. با افزایش غلظت تریپتون، رشد میکروباکتریوم سریعتر بوده و نقش آن در فراهم ساختن شرایط

کم‌اکسیژنی، مناسب برای تولید هیدروژن مؤثرتر و طولانی‌تر است. از سوی دیگر هر چه شرایط مناسب‌تری برای رشد میکروباکتریوم فراهم باشد، اثر منفی آن بر رشد کلامیدوموناس قوی‌تر است. بنابراین غلظت تریپتون در محیط کشت، پارامتری کلیدی است برای دستیابی به رشد مناسب کلامیدوموناس و میکروباکتریوم و تولید بهینه‌ی هیدروژن.

متیلوباکتریوم به عنوان باکتری تقویت‌کننده‌ی رشد گیاهان شناخته شده است [۱۰۳]. در اینجا با اینکه بهبودی برای رشد کلامیدوموناس در حضور متیلوباکتریوم مشاهده نمی‌شود، تقویت تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم نسب به مقدار تولید شده در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت TM دیده می‌شود. همچنین با مقایسه‌ی نمودار رشد کشت‌های خالص میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم و کشت‌های هم‌زیست این دو باکتری در محیط کشت TM می‌توان نتیجه گرفت که حداقل یکی از باکتری‌ها از هم‌زیستی با باکتری دیگر سود می‌برد و با توجه به رنگ بیوراکتورها به احتمال زیاد میکروباکتریوم جمعیت غالب این هم‌زیستی است (شکل ۴-۵۲). به این ترتیب هم‌زیستی با متیلوباکتریوم سبب رشد و فعالیت میکروباکتریوم شده و در نتیجه هیدروژن به صورت بلندمدت و با نرخ پایین در کشت‌های هم‌زیست دو باکتری و کلامیدوموناس تولید می‌شود. بررسی رابطه‌ی متقابل این دو باکتری نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

در اینجا تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت TM فقط پنج روز ادامه دارد. بنابراین در مقایسه با ۱۱ روز تولید هیدروژن در همین محیط کشت زمانی که دانسیته‌ی نوری اولیه‌ی میکروباکتریوم در کشت‌ها ۰/۱ بود (بخش ۴-۴-۶-۱)، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت اولیه‌ی میکروباکتریوم بر مدت زمان و مقدار تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم مؤثر است.

۴-۴-۸. هم‌زیستی میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم در محیط کشت‌های مختلف و بررسی اثر آن

بر تولید هیدروژن

تمرکز این بخش از تحقیق بر هم‌زیستی میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم در محیط کشت‌های TAP و TM (مانیتول ۵ g/L + TAP) است. در شروع آزمایش از غلظت‌های بالاتر این دو باکتری نسبت به بخش قبل، یعنی دانسیته‌ی سلولی ۰/۱ برای هر کدام استفاده شده است. اثر هم‌زیستی این دو باکتری به صورت انفرادی و ترکیبی بر تولید هیدروژن و رشد کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست این سه میکروارگانیسم در معرض شدت نور ۵۰ PPFD مطالعه شده است. غلظت کلروفیل کلامیدوموناس در ابتدای آزمایش ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ بوده است. همچنین

رشد این دو باکتری در محیط کشت‌های TAP و TM نشان داده شده است. آنالیز متابولیت‌ها در کشت‌های کنترلی باکتری‌ها و کشت‌های هم‌زیست انجام و گزارش شده است.

۴-۸-۱. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها

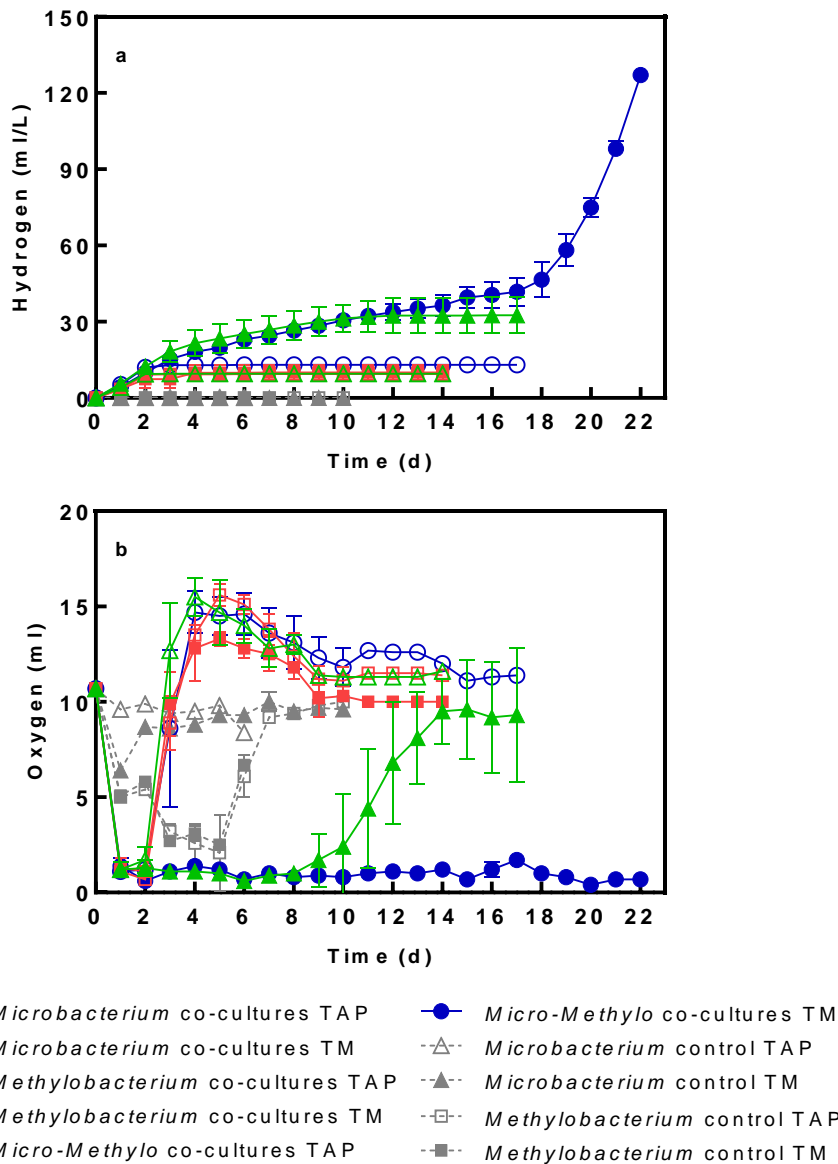
همانطور که در شکل ۴-۵۳ (a) مشاهده می‌شود در محیط کشت TAP هم‌زیستی با میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم تاثیر یکسانی بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست هر یک از این باکتری‌ها با کلامیدوموناس دارد. در همین محیط کشت، در کشت‌های هم‌زیست شامل هر دو باکتری و کلامیدوموناس بهبود نسبتا کمی بر تولید هیدروژن نسبت به کشت‌های هم‌زیست شامل هر یک از باکتری‌ها و کلامیدوموناس دیده می‌شود که به احتمال زیاد دلیل آن، غلظت اولیه بالاتر جامعه باکتریایی (دانسیته نوری برابر ۰/۲ نسبت به ۰/۱) است. همچنین کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم عملکرد یکسانی در تولید هیدروژن (شکل ۴-۵۳ (a)) و تغییرات سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها (شکل ۴-۵۳ (b)) در محیط کشت‌های TAP و TM دارند. در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم در محیط کشت TM هیدروژن به صورت پایا برای مدت زمان طولانی (به ترتیب ۱۱ و حداقل ۲۲ روز) تولید می‌شود (شکل ۴-۵۳ (a)). سطح اکسیژن در فضای بالاسری این دو نوع کشت تا روز هشتم یکسان است و پس از آن در کشت‌های کلامیدوموناس و میکروباکتریوم تجمع اکسیژن دیده می‌شود. پس از آن که غلظت اکسیژن در فضای بالاسری این کشت‌ها به بالاتر از مرز شرایط کم‌اکسیژنی مناسب برای بیان و فعالیت هیدروژناز رسید (روز ۱۲م)، تولید هیدروژن در آن‌ها متوقف می‌شود. در حالی که، سطح اکسیژن در کشت‌های کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم تا پایان آزمایش بسیار پایین بوده (شکل ۴-۵۳ (b)) و تولید هیدروژن با نرخ تولید صعودی ادامه دارد (شکل ۴-۵۳ (a)). همانطور که در بخش قبل نشان داده شد، هیچ یک از باکتری‌ها در شرایط آزمایش هیدروژن تولید نمی‌کنند.

۴-۸-۲. غلظت کلروفیل کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت‌های TAP و TM

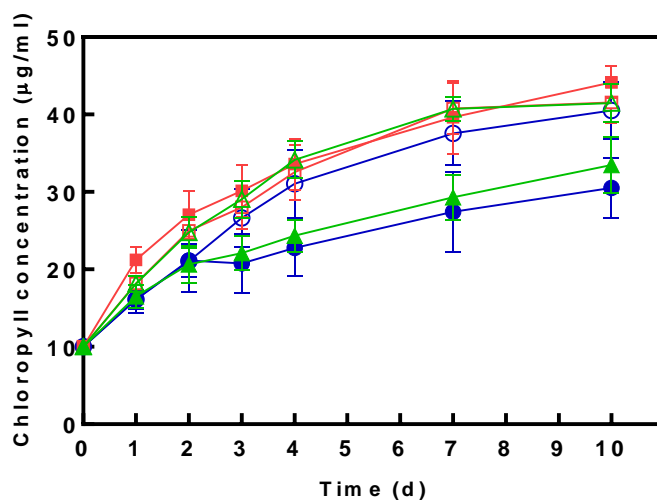
اثر هم‌زیستی باکتری‌ها بر رشد کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست به دو دسته تقسیم می‌شود. هم‌زیستی متیلوباکتریوم در هر دو محیط کشت TAP و TM، هم‌زیستی میکروباکتریوم در محیط کشت TAP و هم‌زیستی ترکیب این دو باکتری در محیط کشت TAP، اثر منفی ناچیزی را بر رشد کلامیدوموناس در بلند مدت نشان می‌دهند. در حالی که هم‌زیستی میکروباکتریوم و ترکیب میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم در محیط کشت TM سبب کاهش قابل توجه غلظت کلروفیل در کشت‌های هم‌زیست می‌شوند (شکل ۴-۵۴).

۴-۸-۳. دانسیته‌ی نوری باکتری‌ها در کشت‌های کنترلی

مشابه نتایج حاصل شده از بخش‌های قبل میکروباکتریوم در محیط کشت TAP رشد نمی‌کند و در محیط کشت TM در روز اول کمی رشد کرده که به سرعت به فاز سکون منتهی می‌شود. رشد متیلوباکتریوم در چهار روز اول آزمایش در هر دو محیط کشت TAP و TM یکسان است. پس از آن، تنها در محیط کشت TM تا روز هفتم نرخ کند رشد مشاهده می‌شود (شکل ۴-۵۵).

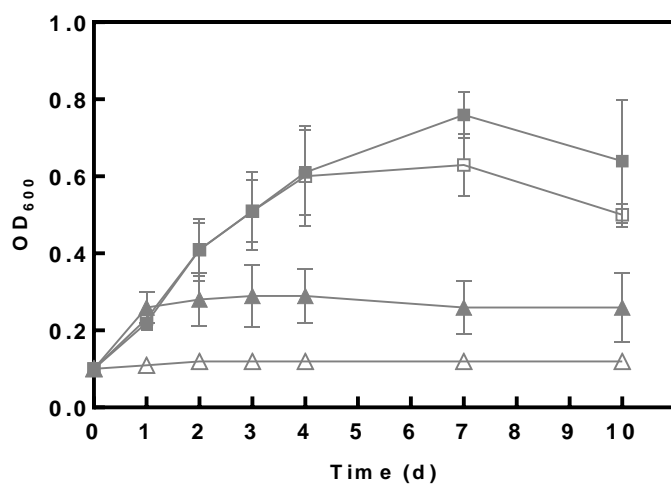


شکل ۴-۵۳. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم و میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم و کشت‌های کنترلی باکتری‌ها در محیط کشت‌های TAP و TM^L. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



- ▲ *Microbacterium* co-cultures TAP
- ▲ *Microbacterium* co-cultures TM
- *Methylobacterium* co-cultures TAP
- *Methylobacterium* co-cultures TM
- *Micro-Methylo* co-cultures TAP
- *Micro-Methylo* co-cultures TM

شکل ۴-۵۴. غلظت کلروفیل کشت های هم زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم در محیط کشت های TAP و TM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



- △ *Microbacterium* TAP
- ▲ *Microbacterium* TM
- *Methylobacterium* TAP
- *Methylobacterium* TM

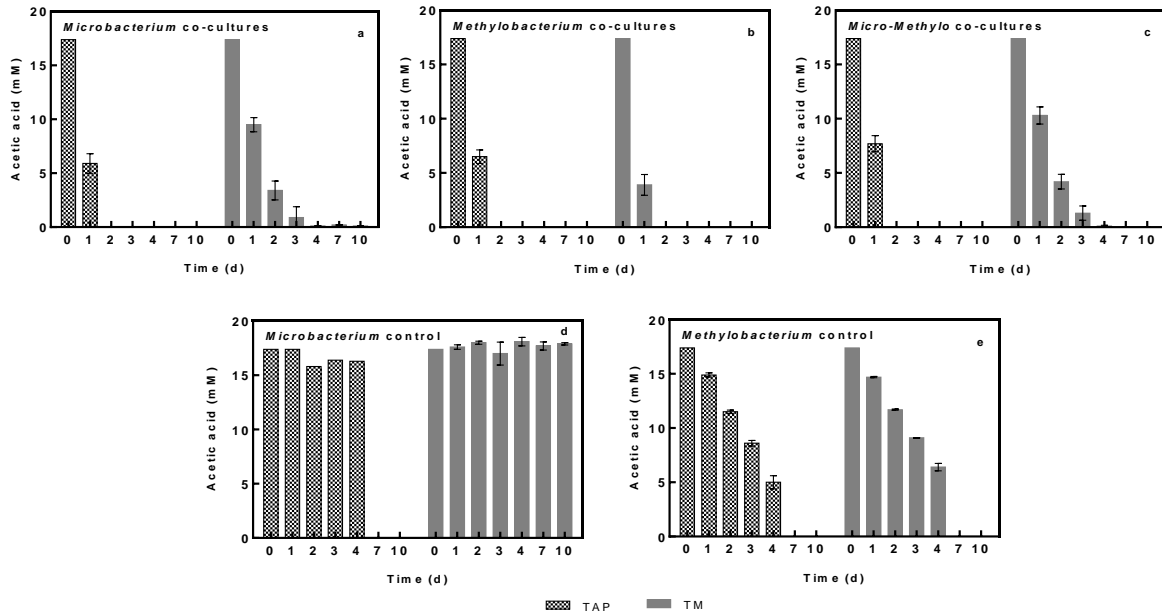
شکل ۴-۵۵. دانسیته ی نوری میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم در محیط کشت های TAP و TM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۴-۸-۴. آنالیز متابولیت‌ها

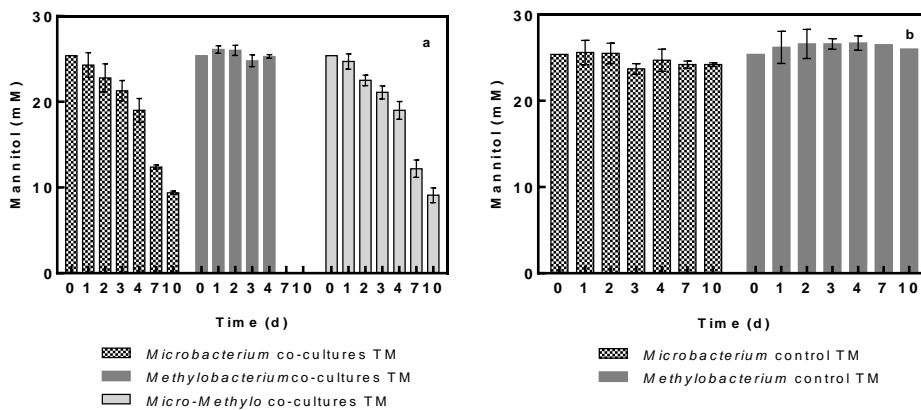
مصرف اسیداستیک و مانیتول و تولید محصولات تخمیری (اسیدلاکتیک، اسیدفرمیک و اتانول) در کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های کنترلی باکتری‌ها در محیط کشت TAP و TM اندازه شده است. توجه داشته باشید که آنالیز متابولیت‌ها در کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم و کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم تنها در چهار روز اول انجام شده است. برخلاف میکروباکتریوم که در محیط کشت‌های TAP و TM اسیداستیک را مصرف نمی‌کند، متیلوباکتریوم مصرف‌کننده‌ی اسیداستیک با نرخ برابر در هر دو محیط کشت است. در محیط کشت TAP، در تمام کشت‌های هم‌زیست اثری از اسیداستیک در روز دوم آزمایش مشاهده نمی‌شود یعنی تمام ۱۷/۴ mM اسیداستیک در مدت ۴۸ ساعت مصرف می‌شود. با این تفاوت که در کشت‌های هم‌زیست ترکیب دو باکتری-کلامیدوموناس مقدار اسیداستیک باقیمانده در محیط کشت از مقدار باقیمانده در دیگر کشت‌های هم‌زیست بیشتر است (شکل ۴-۵۶). از نظر غلظت مواد موجود در محیط کشت، کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم رفتار مشابهی در محیط کشت‌های TAP و TM دارند. در حالی که در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم در محیط کشت TM، اسیداستیک برای مدت زمان طولانی‌تری در کشت‌ها وجود دارد (شکل ۴-۵۶). در شکل ۴-۵۷ (b) نشان داده شده است که هیچ کدام از باکتری‌های متیلوباکتریوم و میکروباکتریوم در محیط کشت TM، مانیتول را مصرف نمی‌کنند. به علاوه متیلوباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست با کلامیدوموناس نیز قادر به مصرف مانیتول نیست (شکل ۴-۵۷ (a)). در حالی که مصرف مانیتول با نرخ مشابه در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم مشاهده می‌شود.

آنالیز اسیدلاکتیک نشان می‌دهد که تنها کشت‌های هم‌زیستی که شامل میکروباکتریوم هستند در محیط کشت TM، اسیدلاکتیک تولید می‌کنند (شکل ۴-۵۸). کشت‌های کنترلی باکتری‌ها در محیط کشت‌های TAP و TM اسیدلاکتیک تولید نمی‌کنند.

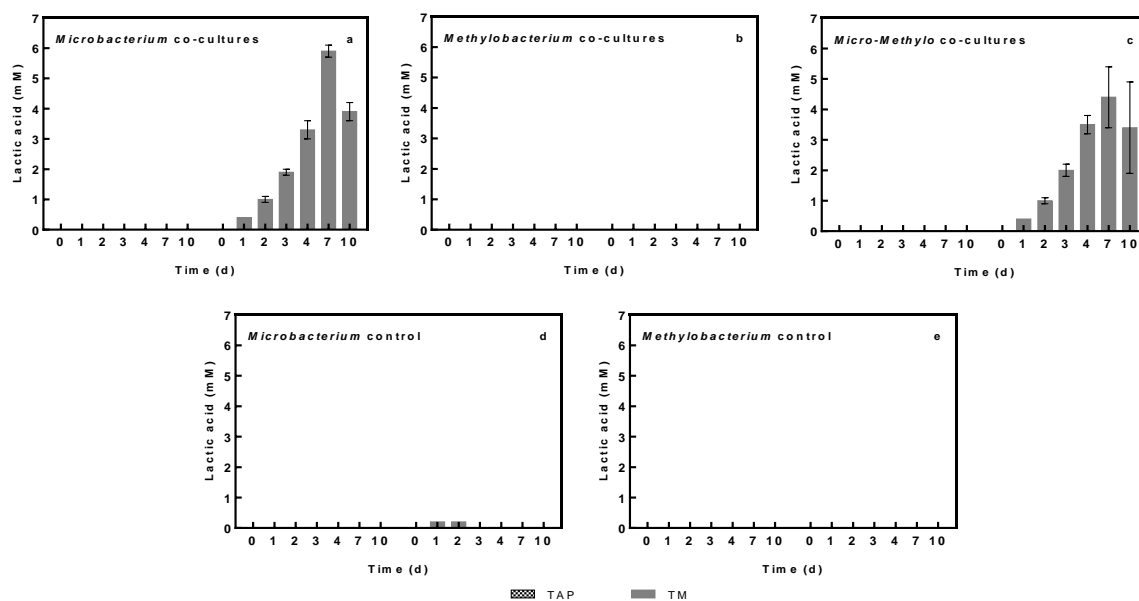
تولید قابل توجه اسیدفرمیک در کشت‌های هم‌زیست میکروباکتریوم-کلامیدوموناس در هر دو محیط کشت TAP و TM مشاهده می‌شود (شکل ۴-۵۹). همچنین میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت‌های کنترلی این باکتری در محیط کشت‌های TAP و TM اتانول تولید می‌کند (شکل ۴-۶۰).



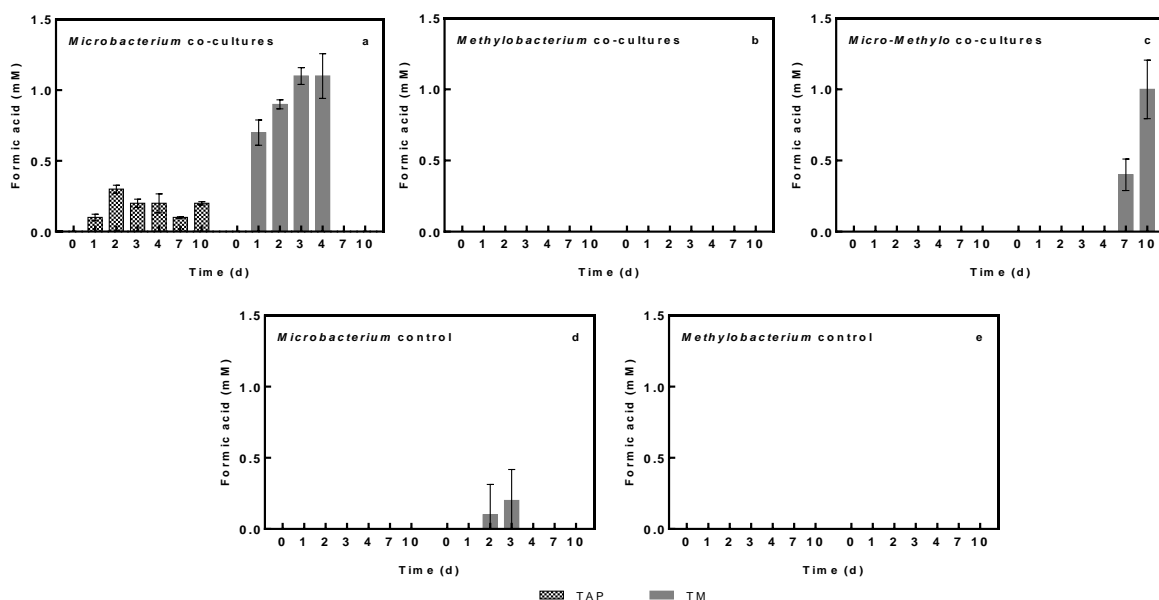
شکل ۴-۵۶. غلظت اسیداستیک در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a)، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم (b) و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (c) و کشت های کنترلی میکروباکتریوم (d) و متیلوباکتریوم (e) در محیط کشت های TAP و TM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



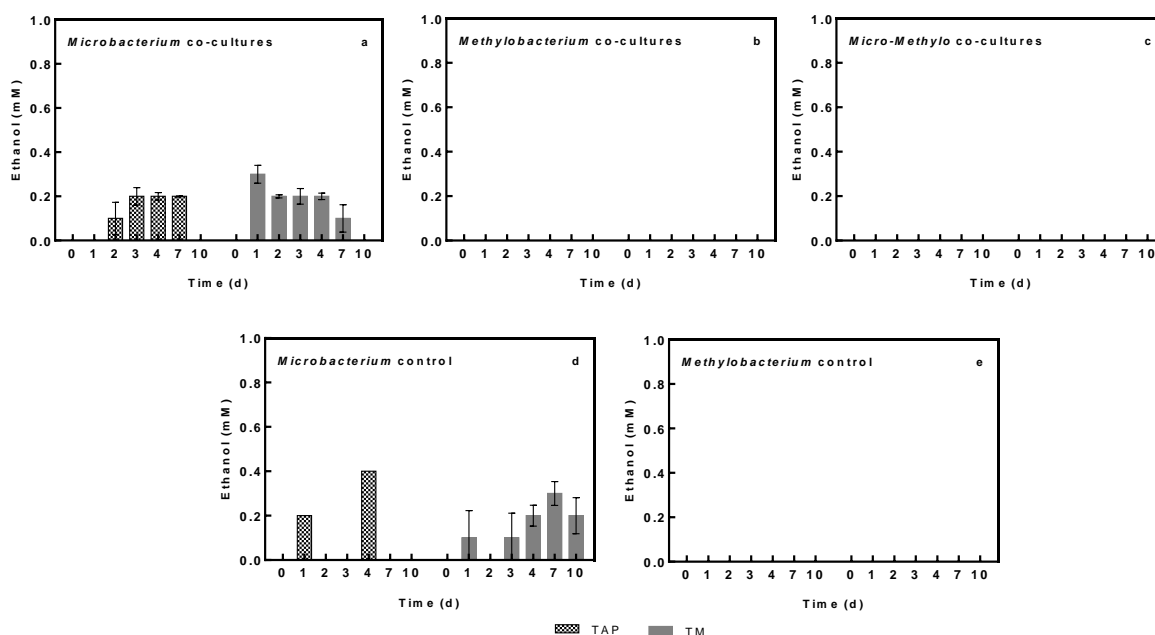
شکل ۴-۵۷. غلظت مانیتول در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (a) و کشت های کنترلی میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم (b) در محیط کشت TM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۵۸. غلظت اسیدلاکتیک در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a)، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم (b) و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (c) و کشت های کنترلی میکروباکتریوم (d) و متیلوباکتریوم (e) در محیط کشت های TAP و TM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۵۹. غلظت اسیدفرمیک در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a)، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم (b) و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (c) و کشت های کنترلی میکروباکتریوم (d) و متیلوباکتریوم (e) در محیط کشت های TAP و TM^L . اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۶. غلظت اتانول در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a)، کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم (b) و کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم (c) و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم (d) و متیلوباکتریوم (e) در محیط کشت‌های TAP و TM^L. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۸-۵. کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم در محیط کشت‌های TAP و TM

در بخش قبل (۴-۷-۱) نتایج نشان دادند که با افزودن متیلوباکتریوم به کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت TM، فعالیت تنفسی جامعه‌ی باکتریایی بیشتر شده و با فراهم‌سازی شرایط کم‌اکسیژنی، هیدروژن بیشتری تولید می‌شود. به دلیل استفاده از غلظت اولیه‌ی بیشتر دو باکتری در این بخش از تحقیق، اختلافی در تولید هیدروژن در این دو نوع کشت هم‌زیست تا روز ۱۰ ام آزمایش حاصل نمی‌شود. پس از آن تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم متوقف می‌شود ولی کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم با نرخ صعودی به تولید هیدروژن ادامه می‌دهند. همچنین در بخش قبل احتمال این که هم‌زیستی با متیلوباکتریوم برای رشد میکروباکتریوم سودمند باشد، بیان شد. آنالیز متابولیت‌ها نشان می‌دهند که در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-اسیدفرمیک و اتانول تولید می‌شوند، درحالی‌که در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم-متیلوباکتریوم به دلیل مصرف این مواد آلی توسط متیلوباکتریوم، اثری از این متابولیت‌ها یافت نمی‌شود. بنابراین احتمال برقراری ارتباط مفید متقابل بین کلامیدوموناس، میکروباکتریوم و متیلوباکتریوم در محیط کشت TM وجود دارد. به این ترتیب که

کلامیدوموناس و متیلوباکتریوم مشتقات پروتئینی مناسب رشد و فعالیت میکروباکتریوم را در اختیار این باکتری قرار می‌دهند. میکروباکتریوم اتانول و کلامیدوموناس اسیدفرمیک را برای رشد متیلوباکتریوم فراهم می‌کنند. اتانول، اسیدفرمیک و اسیداستیک از گروه منابع کربنی‌ای هستند که به وسیله بیش از ۹۵٪ سویه‌های متیلوباکتریوم مصرف می‌شوند [۱۰۵]. میکروباکتریوم اسیداستیک مورد نیاز رشد کلامیدوموناس را فراهم می‌کند. جالب توجه است که در محیط کشت TM، متیلوباکتریوم بر خلاف میکروباکتریوم مصرف کننده‌ی رقابتی اسیداستیک برای کلامیدوموناس است. از سوی دیگر کلامیدوموناس اکسیژن مورد نیاز باکتری‌ها را تامین کرده و باکتری‌ها با مصرف اکسیژن شرایط کم‌اکسیژنی مناسب برای تولید هیدروژن را مهیا می‌کنند. به علاوه، مقدار و نسبت اولیه‌ی غلظت باکتری‌ها در کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های کنترلی باکتری‌ها بر عملکرد آن‌ها موثر است. بنابراین بررسی رابطه‌ی بین این سه میکروارگانیسم و یافتن شرایط بهینه برای رشد و تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست نیازمند مطالعات دقیق‌تری است.

از دیگر دستاوردهای این بخش از تحقیق آن است که حضور مانیتول در رفتار کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-متیلوباکتریوم تاثیر قابل توجهی ندارد. به احتمال زیاد این باکتری مانند کلامیدوموناس مانیتول را مصرف نمی‌کند.

۴-۹-۴. بررسی عملکرد میکروباکتریوم در هم‌زیستی با کلامیدوموناس در محیط کشت‌های غنی

از قندها

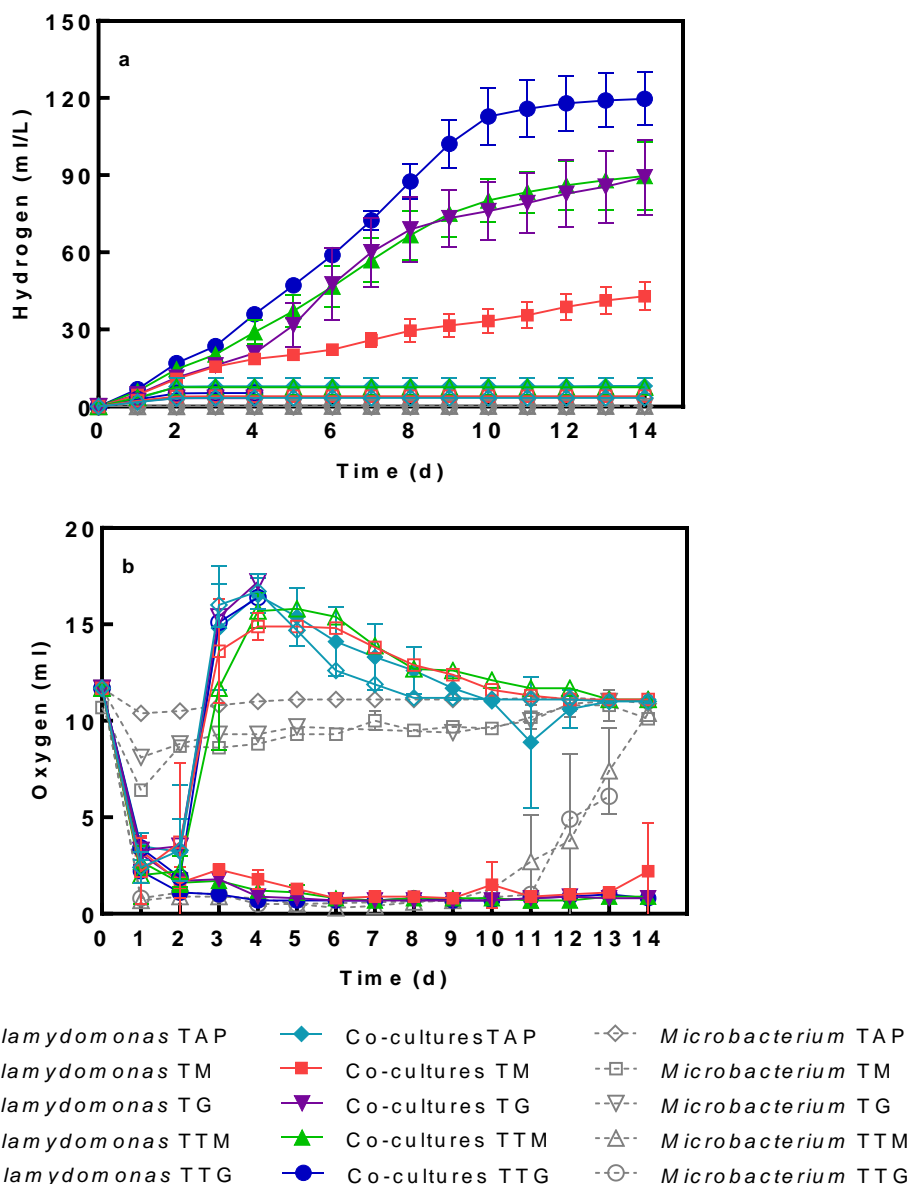
گلوکز فراوان‌ترین قند مونساکارییدی در طبیعت است که عموماً در گیاهان و جلبک‌ها در طول فتوسنتز با مصرف انرژی نور خورشید تولید می‌شود. این قند ساده منبع کربن مطلوب برای بیشتر باکتری‌ها محسوب می‌شود. بنابراین در این بخش از تحقیق رفتار کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت‌های غنی از گلوکز و مانیتول به طور جداگانه بررسی و با یکدیگر مقایسه شده است. روند تغییرات اکسیژن و تولید هیدروژن در فضای بالاسری بیوراکتورها به مدت دو هفته و غلظت کلروفیل کشت‌های هم‌زیست، دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم در کشت‌های کنترلی باکتری و آنالیز متابولیت‌ها در کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های کنترلی باکتری در روز ۱۲ ام آزمایش اندازه‌گیری شده است. آزمایش در محیط کشت‌های TAP، (مانیتول ۵ g/l + TM (TAP)، (مانیتول ۵ g/l + ۲/۵ g/l TAP) TTM، (گلوکز ۵ g/l + TAP) TG و (گلوکز ۵ g/l + ۲/۵ g/l TAP) TTG در معرض شدت نور ۵۰ PPFD انجام شده است. غلظت اولیه‌ی کلروفیل در بیوراکتورهای شامل کلامیدوموناس ۱۰ μg/ml است.

۴-۹-۴-۱. تولید هیدروژن و سطح اکسیژن در فضای بالاسری بیوراکتورها

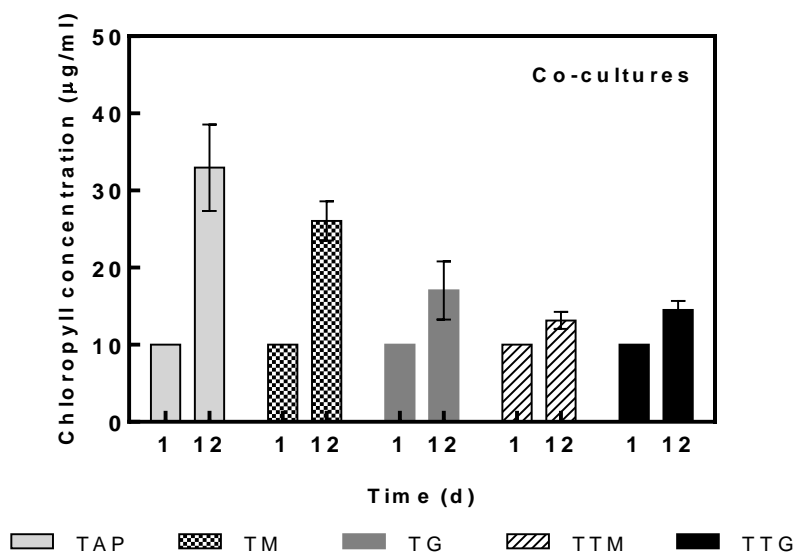
همانطور که شکل ۴-۶۱ (a) نشان می دهد، کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت های TM، TTM، TG و TTG برای مدت زمان طولانی هیدروژن تولید می کنند. در محیط کشت های غنی از هر دو قند، افزودن تریپتون سبب افزایش تولید هیدروژن می شود. همچنین کشت های همزیست در محیط کشت های غنی از گلوکز هیدروژن بیشتری نسبت به محیط کشت های غنی از مانیتول تولید می کنند. کشت های کنترلی باکتری تنها در محیط کشت های غنی از تریپتون اکسیژن را مصرف می کنند (شکل ۴-۶۱ (b)).

۴-۹-۲. غلظت کلروفیل کشت های همزیست و دانسیته ی نوری میکروباکتریوم در محیط کشت های غنی از گلوکز و مانیتول

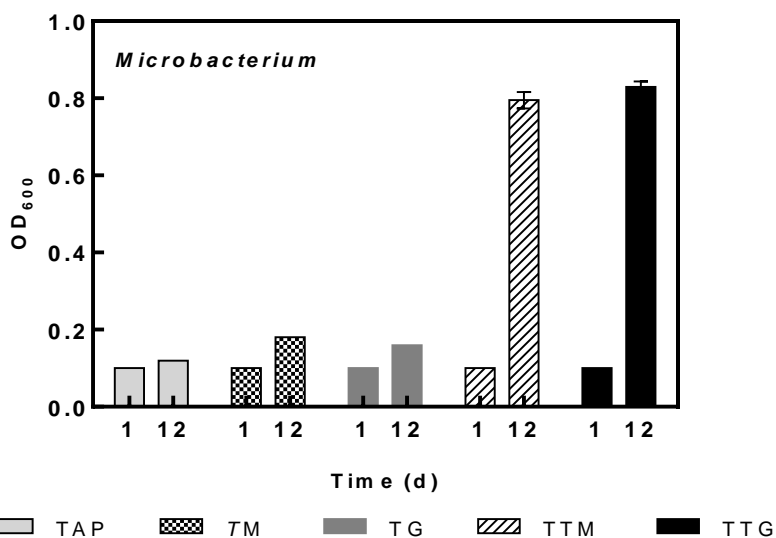
افزودن هر یک از قندها و تریپتون به محیط کشت ها سبب کاهش غلظت کلروفیل کلامیدوموناس در کشت های همزیست می شود (شکل ۴-۶۲). اثر اضافه کردن گلوکز به محیط کشت بر کاهش غلظت کلروفیل بیشتر از مانیتول است (غلظت کلروفیل در محیط کشت TG نسبت به محیط کشت TM). در حالی که در محیط کشت TTM و TTG اختلاف قابل توجهی بین غلظت های کلروفیل مشاهده نمی شود. از سوی دیگر در شکل ۴-۶۳ اختلاف ناچیزی بین دانسیته ی نوری کشت های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت های متناظر غنی از گلوکز و مانیتول دیده می شود. به علاوه این باکتری در محیط کشت های غنی از تریپتون به خوبی رشد می کند.



شکل ۴-۶. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت های هم زیست کلامیدوموناس- میکروباکتریوم و کشت های کنترلی در محیط کشت های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول). هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.



شکل ۴-۶۲. غلظت کلروفیل در کشت های هم زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت های کنترلی جلبک در محیط کشت های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول). اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.



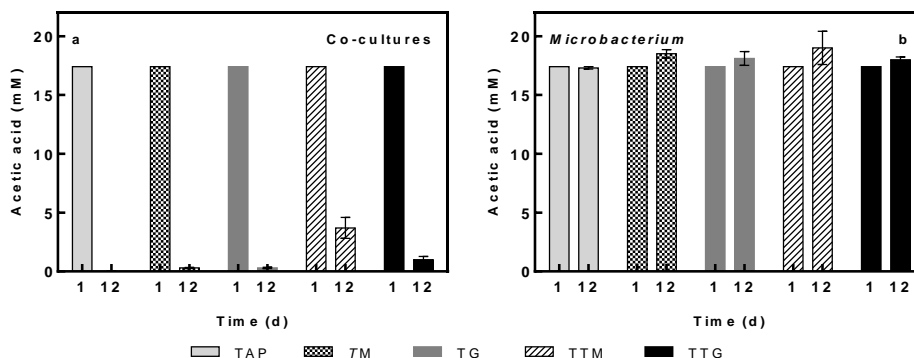
شکل ۴-۶۳. دانسیته ی نوری میکروباکتریوم در محیط کشت های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول). اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل شش تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۹-۳. آنالیز متابولیت‌ها

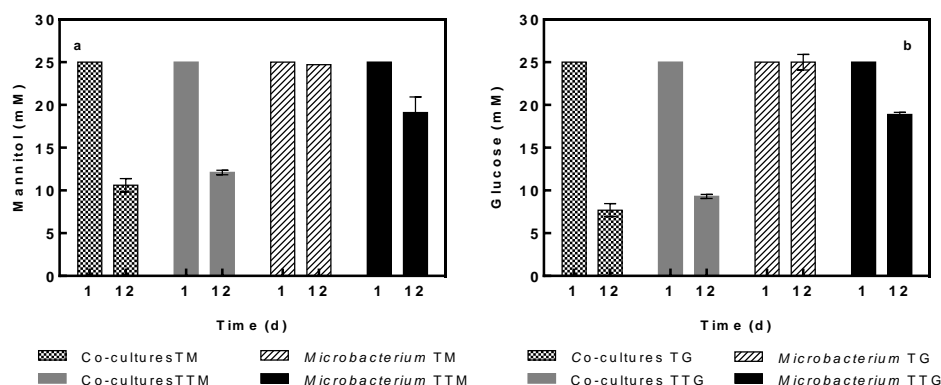
میکروباکتریوم در هیچ کدام از محیط کشت‌های TAP, TM, TTM, TG و TTT نه تنها اسیداستیک را مصرف نکرده، بلکه مقدار کمی از این اسید آلی را در محیط کشت‌های غنی از قندها تولید و ذخیره می‌کند (شکل ۴-۶۴). همچنین مقادیر اندکی از اسیداستیک در کشت‌های همزیست کلامیدوموناس میکروباکتریوم در محیط کشت‌های غنی از قندها در روز ۱۲م آزمایش دیده می‌شود (شکل ۴-۶۴ (b)).

کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم توانایی مصرف مانیتول و گلوکز را در محیط کشت‌های TM و TG ندارند. در حالی که در کشت‌های همزیست با کلامیدوموناس توانایی مصرف هر دو قند را دارند. به نظر می‌رسد میکروباکتریوم گلوکز را با نرخ کمی بالاتر نسبت به مانیتول مصرف می‌کند (شکل ۴-۶۵). همچنین در کشت‌های غنی از تریپتون هر دو کشت‌های همزیست و کشت‌های کنترلی باکتری، قندها را مصرف می‌کنند و آشکار است که در کشت‌های همزیست نرخ مصرف قندها بیشتر از کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم است.

در شکل ۴-۶۶ (a و b) مشاهده می‌شود که کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت‌های TTM و TTT و کشت‌های همزیست در تمام محیط کشت‌های غنی از قندها اسیدلاکتیک تولید می‌کند. کشت‌های همزیست تنها در محیط کشت‌های TAP و TM، اسیدفرمیک تولید می‌کنند و این نتایج با نتایج نشان داده شده در شکل ۴-۵۹ (a) سازگار است (شکل ۴-۶۶ (c)). به علاوه، کشت‌های همزیست در تمام محیط کشت‌ها مستقل از حضور قندها و تریپتون و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت‌های فاقد تریپتون اتانول تولید می‌کنند (شکل ۴-۶۶ (e و f)). در کشت‌های همزیست افزودن هر یک از ترکیبات قندی و تریپتون سبب افزایش تولید اتانول در این کشت‌ها می‌شود.



شکل ۴-۶۶. غلظت اسیداستیک در کشت‌های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم (a) و کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم (b) در محیط کشت‌های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول). اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

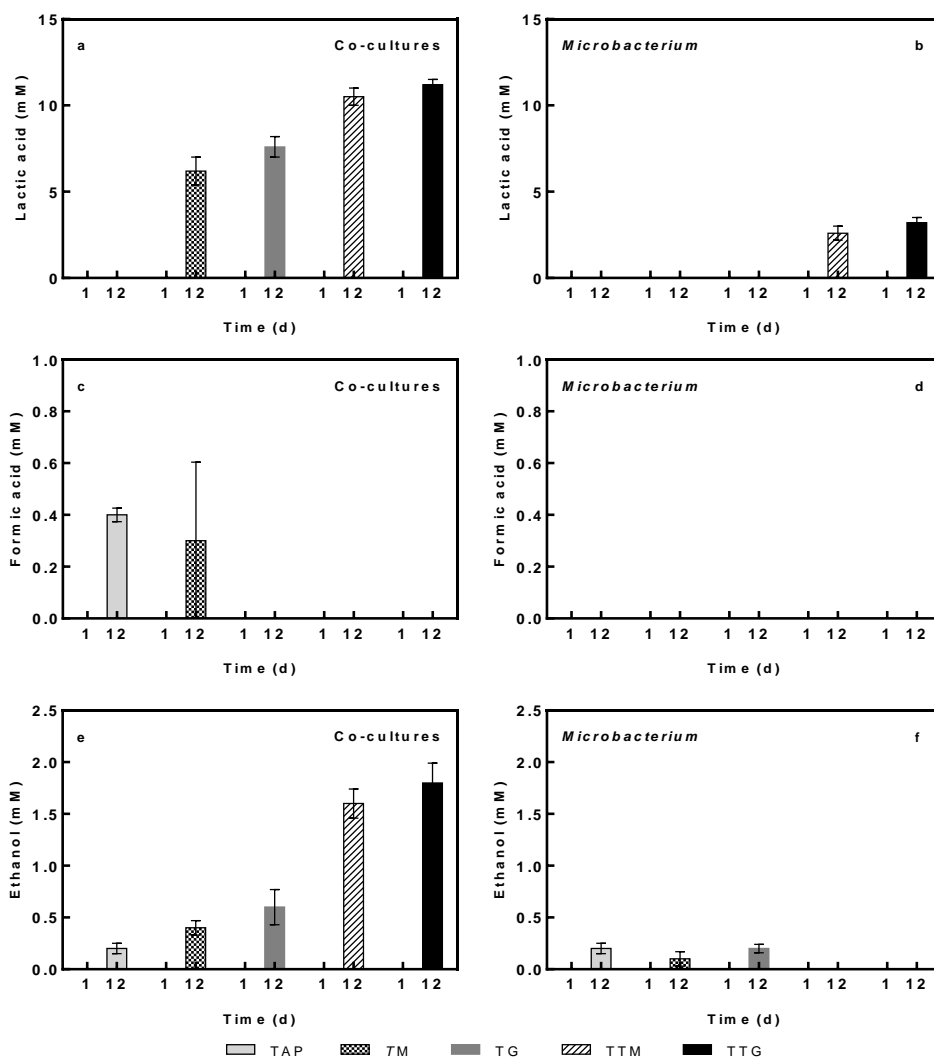


شکل ۴-۶۵. غلظت مانیتول (a) و گلوکز (b) در کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم و کشت های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول). اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۹-۴. پتانسیل بالای تولید هیدروژن و رابطه ی همزیستی در کشت های همزیست کلامیدوموناس و میکروباکتریوم در محیط کشت های غنی از قندها

کشت های همزیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت های غنی از قندها برای مدت زمان طولانی هیدروژن تولید می کنند. چنانچه علاوه بر قند، محیط کشت غنی از تریپتون (ترکیبات پپتیدی و آمینواسیدی) باشد، هیدروژن بیشتری تولید می شود که دلیل آن رشد بیشتر و احتمالاً فعالیت بیشتر میکروباکتریوم در این کشت ها است. با توجه به نرخ مصرف قندها و آنالیز محصولات تخمیری (به جز اسیداستیک)، در محیط کشت های غنی از گلوکز میکروباکتریوم در کشت های همزیست متابولیسم فعال تری نسبت به مانیتول دارد. با اینکه توجهی برای تجمع بیشتر اسیداستیک در کشت های همزیست در محیط کشت TTM نسبت به محیط کشت TTG وجود ندارد، آشکار است که اسیداستیک از محصولات تخمیری این باکتری در محیط کشت های غنی از قندها است.

چنانچه مصرف منبع کربنی و در نتیجه رشد میکروباکتریوم را وابسته به حضور مشتقات پروتئینی در محیط کشت در نظر بگیریم، به دلیل نرخ بالاتر مصرف قندها در کشت های همزیست نسبت به کشت های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت های TTM و TTG به احتمال زیاد همزیستی با کلامیدوموناس شرایط مناسبی فراتر از تامین این ترکیبات برای رشد میکروباکتریوم فراهم می کند و یا ترکیباتی که کلامیدوموناس در اختیار میکروباکتریوم قرار می دهد برای فعالیت میکروباکتریوم و مصرف منبع کربنی مطلوب تر از تریپتون است.



شکل ۴-۶۶. غلظت اسیدلاکتیک (a و b)، اسیدفرمیک (c و d) و اتانول (e و f) در کشت های هم زیست کلامیدوموناس- میکروباکتریوم و کشت های کنترلی میکروباکتریوم در محیط کشت های غنی از قندها (گلوکز و مانیتول). اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

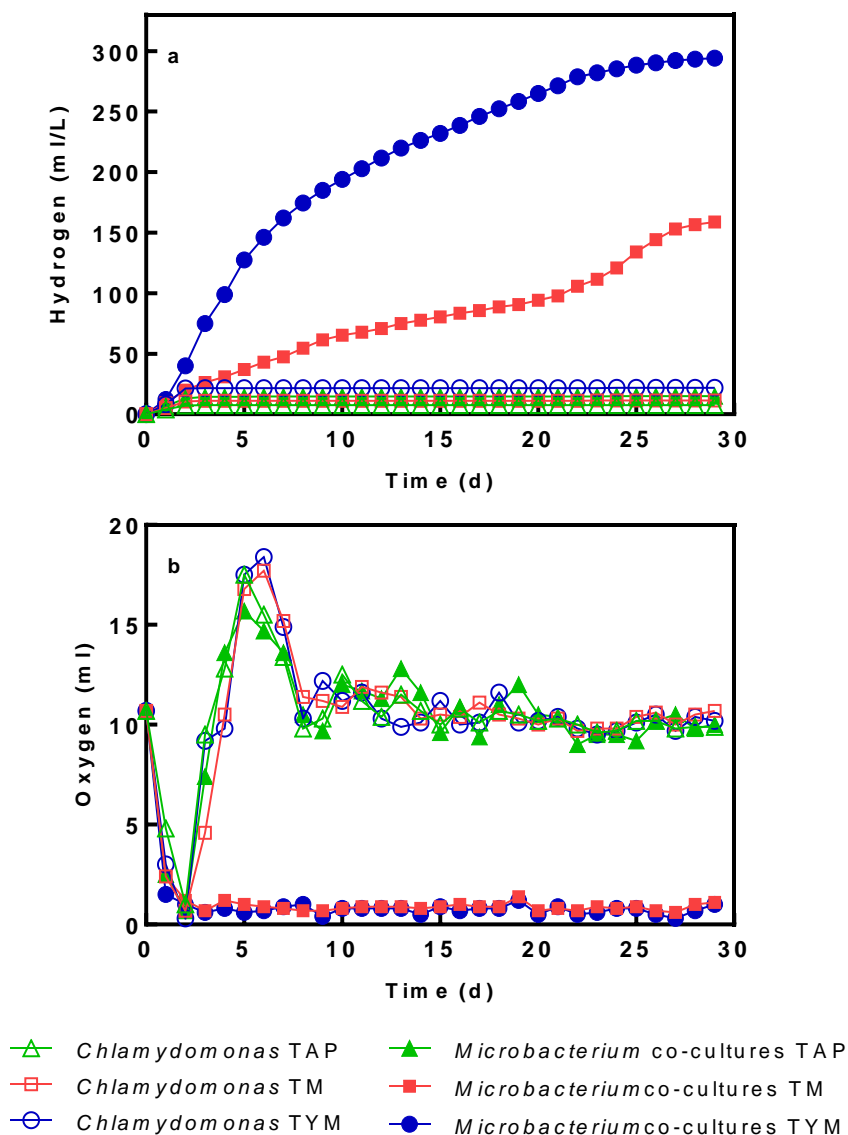
۴-۴-۱۰. تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم با غلظت بالای

کلروفیل

در بخش ۴-۴-۱ دیده شد که کشت‌های کلامیدوموناس که در روز ۱۶ ام آزمایش آلوده شدند هیدروژن بیشتری نسبت به کشت‌های آلوده شده از ابتدای آزمایش (کشت‌های هم‌زیست) تولید می‌کنند. یکی از دلایل آن غلظت بالاتر کلروفیل در کشت‌هایی است که دیرتر آلوده شدند ($70 \mu\text{g/ml}$) نسبت به کشت‌هایی که از روز اول به طور هم‌زمان با جامعه‌ی باکتریایی کشت‌داده شوند ($10 \mu\text{g/ml}$). بنابراین در این بخش از تحقیق به منظور بررسی اثر غلظت کلروفیل، در ابتدای آزمایش از غلظت بالاتر $50 \mu\text{g chl/ml}$ در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم استفاده شده است. دانسیته‌ی نوری میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست در شروع آزمایش ۰/۱ است. آزمایش در محیط کشت‌های TAP، (مانیتول 5 g/l TAP) TM و (مانیتول 5 g/l + عصاره‌ی مخمر $0/4 \text{ g/l}$ TAP) TYM و در معرض شدت نور 50 PPFd انجام شده‌اند.

همانطور که در شکل ۴-۶۷ مشاهده می‌شود کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت‌های TM و TYM تا پایان آزمایش (۲۹ روز) در شرایط کم‌اکسیژنی بوده و هیدروژن تولید می‌کنند. با مقایسه‌ی هیدروژن تولید شده تا روز ۱۴ ام آزمایش در شکل‌های ۴-۴۱ (a) و ۴-۶۷ (b) که به ترتیب $72/1$ و $226/1 \text{ ml/L}$ است، آشکار است که با افزایش غلظت کلروفیل هیدروژن بیشتری تولید می‌شود.

با در نظر گرفتن نتایج حاصل شده در اینجا و بخش‌های قبل (۴-۴-۶ و ۴-۴-۷) می‌توان نتیجه گرفت که غلظت کلروفیل اولیه و نسبت سلول‌های کلامیدوموناس و میکروباکتریوم پارامترهای کلیدی برای تولید بهینه‌ی هیدروژن هستند. Nagy و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کرده‌اند که در غلظت‌های بالای کلروفیل رسیدن به شرایط کم‌اکسیژنی آسان‌تر است [۵۳] و بنابراین شرایط برای بیان و فعالیت هیدروژناز مهیا بوده و هیدروژن بیشتری تولید می‌شود.



شکل ۴-۶۷. تولید هیدروژن (a) و مقدار اکسیژن (b) موجود در فضای گاز بالاسری کشت های همزیست کلامیدوموناس- میکروباکتریوم و کشت های کنترلی جلبک دارای غلظت بالای کلرفیل در محیط کشت های TAP، TM^L و TYM^L. هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است. اطلاعات نشان داده شده میانگین نتایج به دست آمده از حداقل سه تکرار مستقل هر آزمایش است.

۴-۵. مدل سازی شبکه‌ی متابولیک کنسرسیوم کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا

آگاهی از مکانیزم ارتباطات بین میکروارگانیسم‌ها در یک جامعه‌ی میکروبی اهمیت قابل توجهی در درک بهتر بسیاری از جنبه‌های حیات دارد. در سال‌های اخیر مدل سازی ریاضی به عنوان ابزاری مناسب برای فهم ارتباط‌های پیچیده بین ارگانیسم‌ها و درک رفتار جامعه‌ی میکروبی معرفی شده است [۱۰۶].

در این بخش از تحقیق مدل ترکیبی شبکه‌ی متابولیک کنسرسیوم کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا به منظور بررسی و مقایسه‌ی رشد جلبک، مصرف اسیداستیک و تولید هیدروژن در کشت‌های خالص کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس ساخته و مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در بخش روش‌های تحقیق بیان شده است. شبکه‌ی متابولیک کنسرسیوم از ترکیب شبکه‌های متابولیک کلامیدوموناس [۸۹] و سودوموناس پوتیدا [۹۰] حاصل شده است.

جدول ۴-۹. ابعاد مدل‌های تک جزئی ارگانیسم‌ها و مدل ترکیبی کنسرسیوم جلبک-باکتری

مدل	تعداد متابولیت‌ها	تعداد واکنش‌ها	مرجع
کلامیدوموناس	۱۸۴۵	۲۳۹۴	[۸۹]
سودوموناس پوتیدا	۱۱۰۴	۱۱۷۱	[۹۰]
کنسرسیوم	۲۹۸۲	۳۶۰۰	تحقیق حاضر

۴-۵-۱. مدل ترکیبی شبکه‌ی متابولیک

در مدل ترکیبی شبکه‌ی متابولیک، هر یک از ارگانیسم‌ها به عنوان یک بخش^۱ مستقل در نظر گرفته شده‌اند. علاوه بر آن، بخش جدیدی به نام بخش مبادله^۲ که شامل متابولیت‌های تبادلی بوده و نقش اتصال بین بخش‌های مربوط به ارگانیسم‌ها را دارد به دو بخش دیگر اضافه شده است. برای امکان پذیر بودن مصرف سوبسترا و ترشح محصولات تولید شده به محیط خارج از سلول، ارتباط بین بخش مبادله و محیط کشت باز است. در این مدل، شار ورود متابولیت‌های موجود در محیط کشت TAP، دی‌اکسیدکربن، اکسیژن و فوتون‌های نوری به مدل باز در نظر گرفته شده است. همچنین شار خروج تمام متابولیت‌ها از مدل، بدون قید باز در نظر گرفته شده است. برای شبیه سازی رفتار این کنسرسیوم فرض رشد متوازن که در آن رشد مخصوص^۳ اعضای جامعه‌ی میکروبی برای حفظ تعادل بین نسبت میکروارگانیسم‌ها یکسان در نظر گرفته می‌شود، اعمال شده است [۱۰۷, ۱۰۸].

¹ Compartment

² Exchange Compartment

³ Specific Growth Rate

به این ترتیب، مدل استوکیومتری کنسرسیوم کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا/ مطابق شکل ۴-۶۸ ساخته شده است. نکات زیر در مدل ترکیبی شبکه متابولیک در نظر گرفته شده اند:

- (۱) متابولیت های داخلی مربوط به هر میکروارگانیسم با نام مجزا که نشان دهنده ی تعلق به آن میکروب است تعریف شده اند، برای مثال: H_2 (Chlamy) و H_2 (P. putida).
- (۲) متابولیت های تبدالی مشترک با یک نام یکسان داخل بخش مبادله تعریف شده اند، برای مثال H_2 (ex).
- (۳) یک واکنش زیست توده کلی که شامل زیست توده هر دو ارگانیسم است مطابق مطالعه ی زیر برای کنسرسیوم در نظر گرفته شده است:

$$F_{Chlamy} \cdot BM_{Chlamy} + F_{P. putida} \cdot BM_{P. putida} \rightarrow 1 \text{ gram } BM_{total} \quad (1)$$

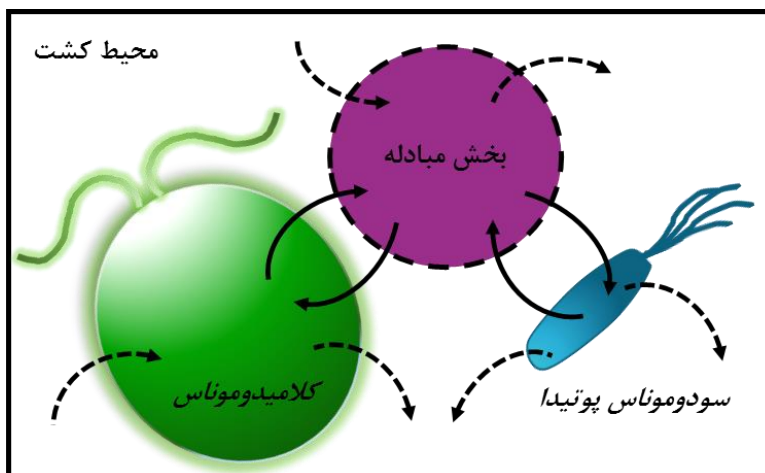
$$F_{Chlamy} = g \text{ Dry weight}_{Chlamy} / g \text{ Dry weight}_{total} \quad (2)$$

$$F_{P. putida} = 1 - F_{Chlamy} \quad (3)$$

سایز مدل ترکیبی ساخته شده برای شبکه متابولیک کنسرسیوم کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا/ به همراه سایز مدل های استفاده شده برای هر یک از اعضای کنسرسیوم در جدول ۴-۹ نشان داده شده است. قابل توجه است که تعداد متابولیت ها و واکنش ها در مدل ترکیبی از مجموع تعداد متابولیت ها و مجموع تعداد واکنش های موجود در مدل هر یک از ارگانیسم ها به دلیل اضافه کردن واکنش های مربوط به بخش مبادله و نیز واکنش زیست توده کل، بیشتر است.

در گام بعدی با استفاده از مدل حاصل شده، تولید هیدروژن، مصرف اسیداستیک در کشت های کنترلی کلامیدوموناس و سودوموناس پوتیدا/ و کشت های هم زیست این دو میکروارگانیسم در محیط کشت TAP و تحت شدت نورهای ۱۲،۵۰ و ۱۰۰ PPFD بررسی شد. به علاوه، رشد کلامیدوموناس در کشت های خالص این میکرو جلبک و در هم زیستی با سودوموناس پوتیدا/ در شدت نور ۱۰۰ PPFD مورد مطالعه قرار گرفت و در آخر نتایج حاصل شده از مدل سازی با نتایج تجربی مقایسه شدند. برای مقایسه، نتایج تجربی حاصل از هم زیستی کلامیدوموناس با سودوموناس پوتیدا/ ۱۲۲۶۴ و سودوموناس پوتیدا/ ۲۹۱ در نظر گرفته شده است.

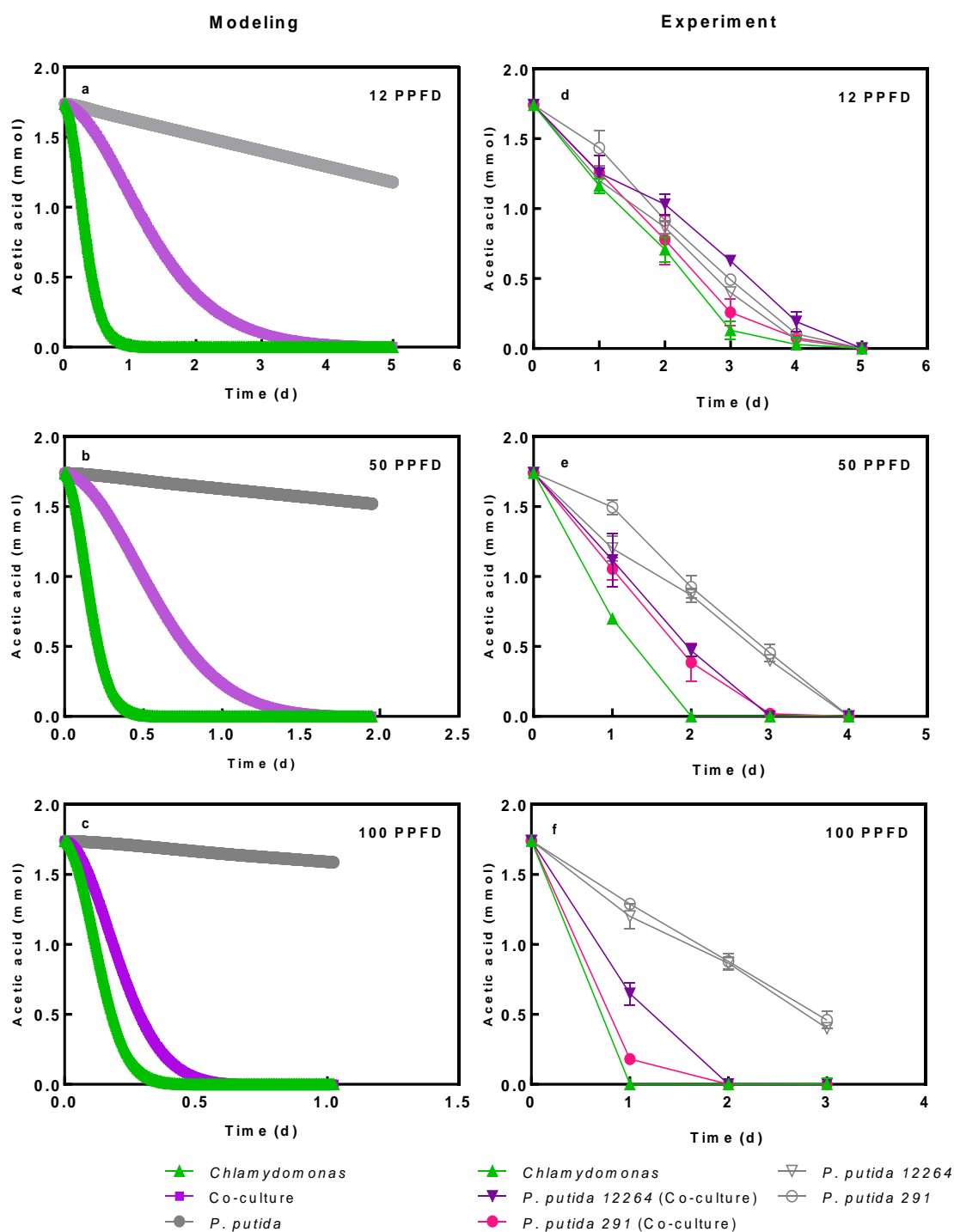
مقدار اولیه ی اسیداستیک در محیط کشت ها ۱/۷۴ mmol در نظر گرفته شده است. وزن خشک سلولی اولیه ی کلامیدوموناس در کشت های کنترلی میکرو جلبک و در کشت های هم زیست ۰/۰۰۷۲ g و وزن خشک سلولی اولیه ی سودوموناس پوتیدا/ در کشت های کنترلی باکتری و کشت های هم زیست ۰/۰۱۴ g است. نسبت وزن خشک سلولی زیست توده های سودوموناس : کلامیدوموناس برابر ۱:۲ در کشت های هم زیست در نظر گرفته شده است. بنابراین در مدل سازی $F_{Chlamy} = 0/33$ و $F_{P. putida} = 0/67$ در نظر گرفته شده اند.



شکل ۴-۶۸. نمایی از بخش‌های در نظر گرفته شده در تشکیل شبکه‌ی متابولیک کنسرسیون کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا. فلش‌ها راه‌های ارتباطی بین بخش‌های مختلف و هر یک از این بخش‌ها با محیط را نشان می‌دهند.

۴-۵-۱-۱. مصرف اسیداستیک

در اینجا روند تغییرات مقدار اسیداستیک در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و سودوموناس پوتیدا و کشت‌های هم‌زیست این دو میکروارگانیسم با استفاده از مدل شبکه متابولیک آن‌ها در سه شدت نور ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ PPFD پیش بینی شده است. همچنین در شکل ۴-۶۹ نتایج حاصل از مدل سازی با نتایج تجربی مقایسه شده‌اند. هم‌راستا با نتایج تجربی، نتایج مدل‌سازی نیز نشان می‌دهند که با افزایش شدت نور نرخ مصرف اسیداستیک در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس و کشت‌های هم‌زیست بیشتر می‌شود. به علاوه، در مقایسه با کشت‌های هم‌زیست، اسیداستیک در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس سریعتر مصرف می‌شود. همچنین نتایج مدل سازی همانند نتایج تجربی نشان می‌دهند که نرخ مصرف اسیداستیک در کشت‌های کنترلی سودوموناس پوتیدا کندتر از کشت‌های دیگر است.



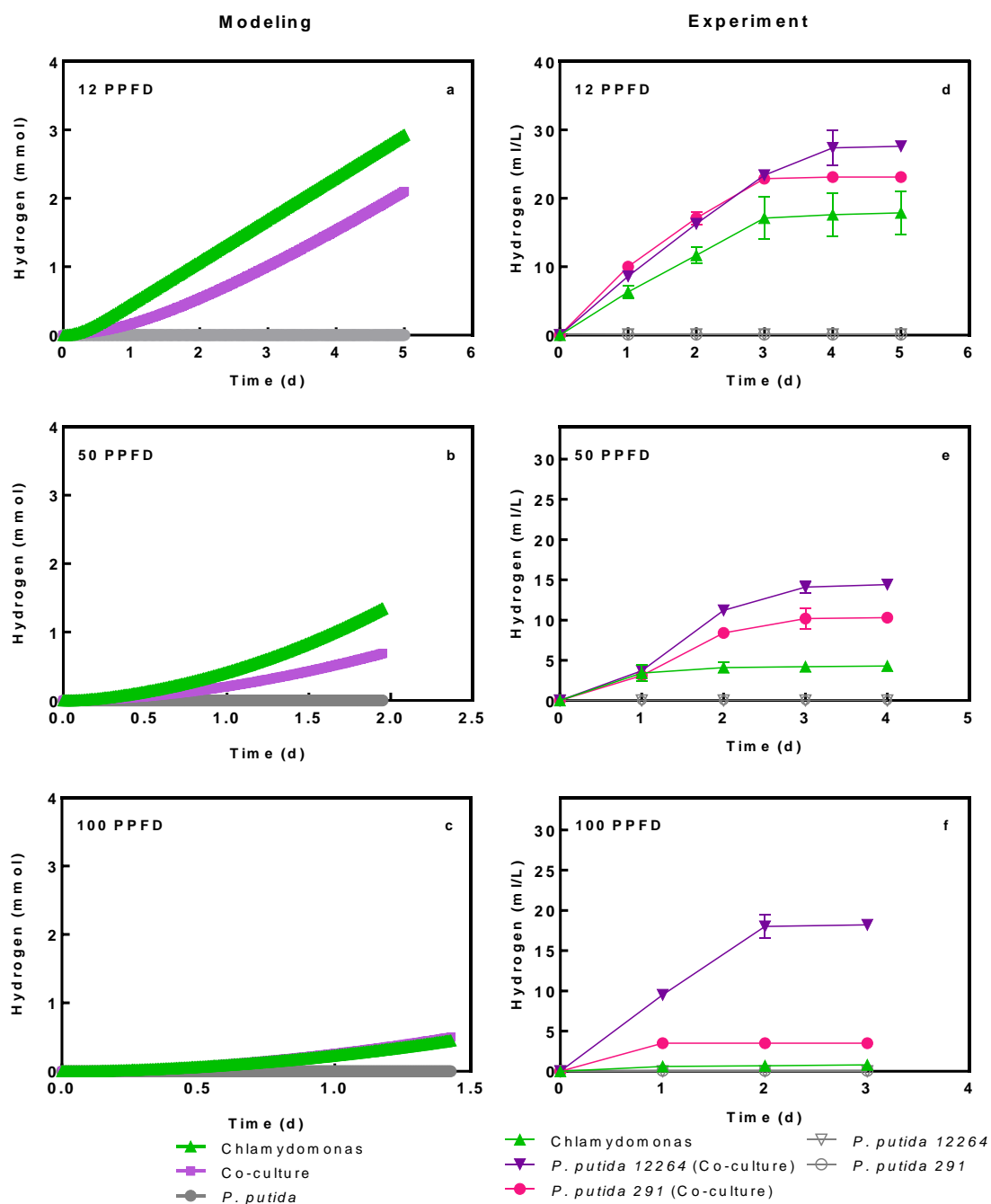
شکل ۴-۶۹. تغییرات غلظت اسیداستیک در کشت های همزیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا و کشت های کنترلی در شدت نورهای ۱۲، ۵۰، و ۱۰۰ PPFD. نتایج پیش بینی شده توسط مدل سازی (c,b,a) و نتایج به دست آمده از آزمایش های تجربی (f,e,d).

۴-۵-۱-۲. تولید هیدروژن

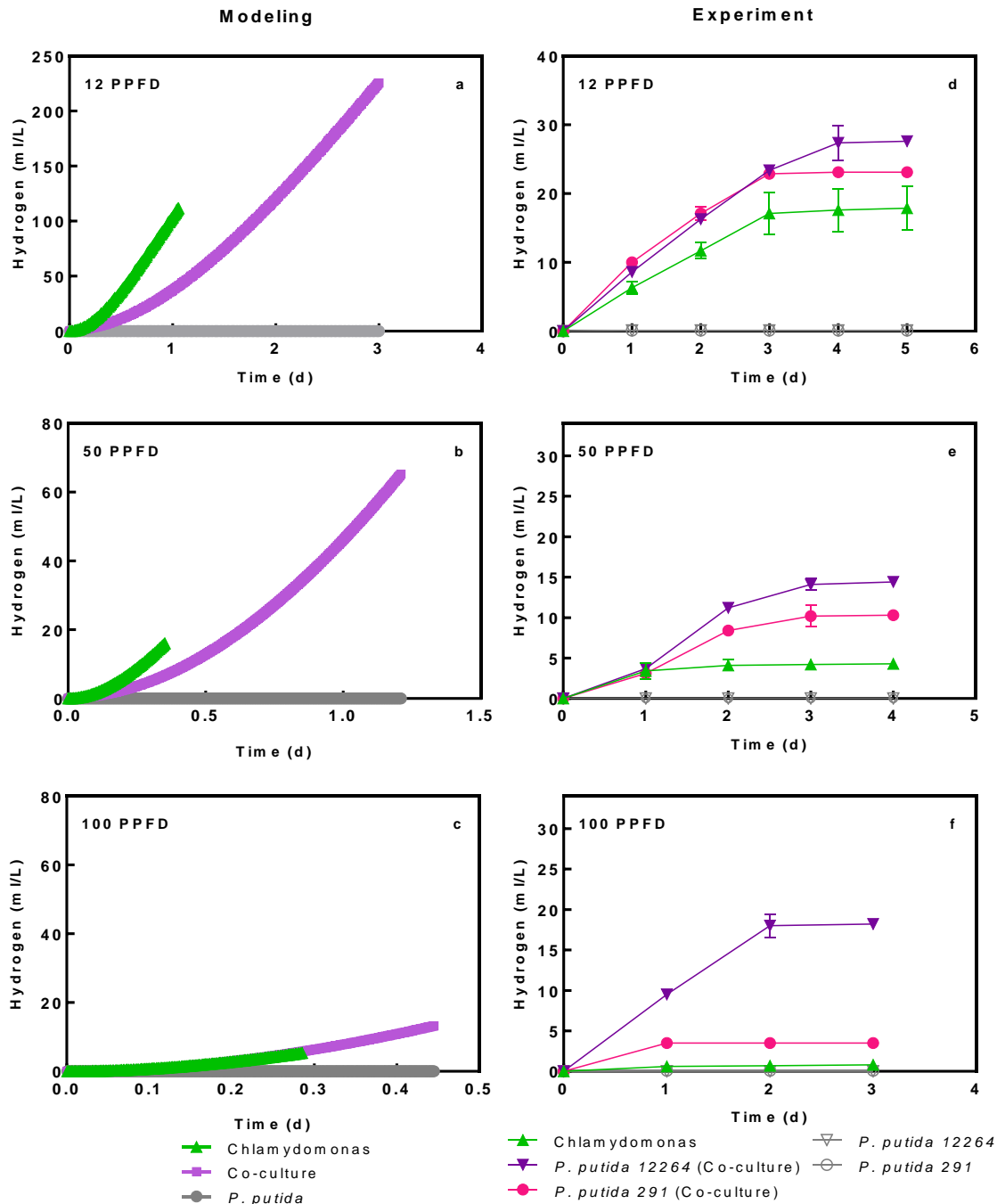
در این بخش از تحقیق با استفاده از مدل‌سازی شبکه‌های متابولیک کلامیدوموناس، سودوموناس پوتیدا/ و کنسرسیوم این دو میکروارگانیسم تولید هیدروژن در کشت‌های کنترلی این جلبک و باکتری و کشت‌های هم‌زیست آن‌ها شبیه‌سازی و با نتایج تجربی مقایسه شده است (شکل ۴-۷۰). با توجه به این که در این مطالعه از روش مدل‌سازی استوکیومتری مبتنی بر قید استفاده شده است، هیچ یک از فعالیت‌های تنظیمی و سیگنالی سلول‌ها که تعیین‌کننده‌ی فعالیت آنزیم‌ها و سرعت واکنش‌ها هستند در نظر گرفته نشده است.

در بخش ۴-۲-۳ مشاهده شد که بین تولید هیدروژن و حضور اسیداستیک در محیط کشت ارتباط مستقیمی وجود دارد. به این صورت که مادامی که اسیداستیک در محیط کشت موجود باشد، شرایط کم‌اکسیژنی برای فعالیت‌های آنزیم هیدروژناز و تولید هیدروژن مهیا است [۱۰۹]. بنابراین در اینجا تولید هیدروژن تخمین زده شده توسط مدل‌سازی تا زمانی که اسیداستیک در محیط کشت موجود باشد (شکل ۴-۶۹ (c,b,a)) در شکل ۴-۷۱ (c,b,a) رسم شده است.

همانند نتایج به دست آمده از آزمایش‌های تجربی، تولید هیدروژن در کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس با افزایش شدت نور، کاهش می‌یابد. سودوموناس پوتیدا/ همانند نتایج تجربی هیدروژن تولید نمی‌کند. در تمام شدت نورها کشت‌های هم‌زیست هیدروژن بیشتری نسبت به کشت‌های کنترلی کلامیدوموناس تولید می‌کنند. همانطور که مشاهده می‌شود، اگر چه از نظر مقدار تولید هیدروژن هماهنگی نزدیکی بین نتایج تجربی و نتایج به دست آمده از مدل‌سازی شبکه متابولیکی دیده نمی‌شود، مدل‌سازی توانایی پیش‌بینی رفتار کشت‌ها به صورت مقایسه‌ای را دارد.



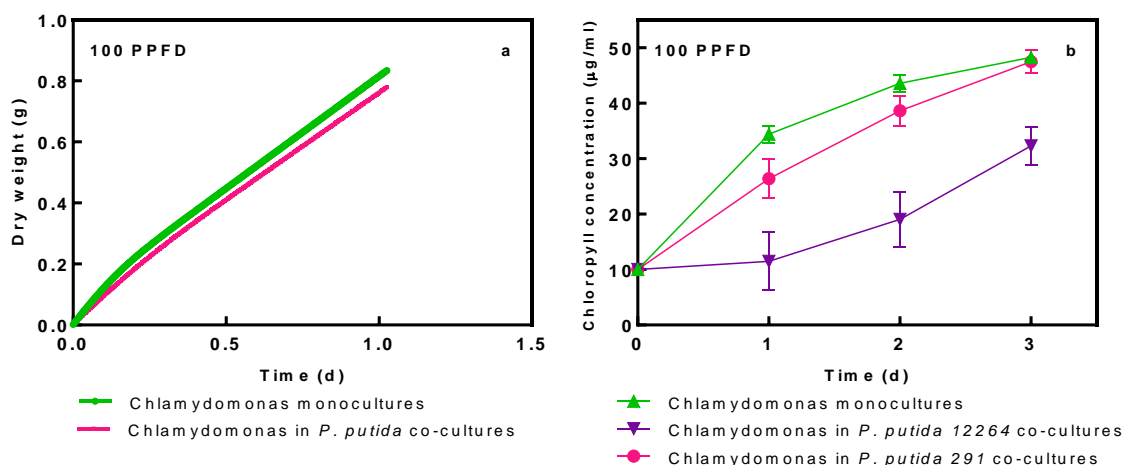
شکل ۴-۷۰. تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا و کشت های کنترلی در شدت نورهای ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ PPFD. نتایج پیش بینی شده توسط مدل سازی (c,b,a) و نتایج به دست آمده از آزمایش های تجربی (f,e,d). هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است.



شکل ۴-۷۱. تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا و کشت های کنترلی (شکل ۴-۶۹) تا زمانی که اسیداستیک در محیط کشت ها موجود باشد (شکل ۴-۶۸)، در شدت نورهای ۱۲، ۵۰ و ۱۰۰ PPFD. نتایج پیش بینی شده توسط مدل سازی (c,b,a) و نتایج به دست آمده از آزمایش های تجربی (f,e,d). هیدروژن تولید شده به صورت تجمعی نشان داده شده است.

۴-۵-۱-۳. رشد کلامیدوموناس

یکی از مهم‌ترین پارامترهای مورد بررسی در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری، تاثیر باکتری بر رشد جلبک است. در این بخش از تحقیق نتایج حاصل از پیش‌بینی اثر هم‌زیستی سودوموناس پوتیدا/ بر رشد کلامیدوموناس در محیط کشت TAP در معرض شدت نور ۱۰۰ PPFD با استفاده از مدل‌سازی با نتایج به دست آمده از آزمایش‌های تجربی مقایسه شده است. از آنجا که کلروفیل تنها در ساختار جلبک وجود دارد، در آزمایش‌های تجربی تغییرات غلظت کلروفیل به عنوان شاخصی برای رشد جلبک در نظر گرفته می‌شود. همانطور که در شکل ۴-۷۲ (b) نشان داده شده است، غلظت کلروفیل در هم‌زیستی با هر دو سودوموناس پوتیدا/ کاهش می‌یابد که نشان دهنده‌ی رشد کمتر کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست نسبت به کشت‌های کنترلی است. مدل‌سازی نیز کاهش رشد کلامیدوموناس در هم‌زیستی با سودوموناس پوتیدا/ در قالب وزن خشک سلولی را پیش‌بینی می‌کند (شکل ۴-۷۲ (a)).



شکل ۴-۷۲. مقایسه‌ی رشد کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا/ و کشت‌های کنترلی این جلبک در شدت نور ۱۰۰ PPFD. نتایج پیش‌بینی شده توسط مدل‌سازی بر اساس وزن خشک (a) و نتایج به دست آمده از آزمایش‌های تجربی بر اساس غلظت کلروفیل (b) ارائه شده‌اند.

۴-۵-۲. مدل‌سازی، گزینه‌ای مناسب برای پیش‌بینی رفتار کنسرسیوم کلامیدوموناس-سودوموناس پوتیدا/ است.

همانطور که بیان شد، مدل‌سازی مبتنی بر قید فعالیت‌های تنظیمی و سیگنالی سلول‌ها را در نظر نگرفته و تنها بر پایه‌ی معادلات استوکیومتری واکنش‌های متابولیسی انجام می‌شود. بنابراین پیش‌بینی دقیق رفتار سلولی به صورت عددی و با جزئیات کامل با استفاده از مدل‌سازی مبتنی بر قید، امری ناممکن است. درحالی‌که می‌توان

از آن برای شبیه سازی رفتار سلول ها استفاده کرد. نتایج حاصل شده در این بخش از تحقیق نشان می دهند که با استفاده از مدل سازی، روند تولید هیدروژن، مصرف اسیداستیک و رشد جلبک را می توان در کشت های کنترلی کلامیدوموناس و سودوموناس پوتیدا/ با کشت های همزیست این میکروارگانیسم ها مقایسه کرد. شباهت پیش بینی های مدل سازی و نتایج آزمایش های تجربی، نشان دهنده ی پتانسیل بالای مدل سازی ریاضی برای تخمین رفتار سلول ها در شرایط مختلف آزمایشگاهی است.

فصل پنجم:

نتیجه گیری و پیشنهادها

۵-۱. نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، در بخش اول نتایج، نشان داده شد که هم‌زیستی جلبک و باکتری در محیط کشت غنی و در روشنایی یک رویکرد امیدوارکننده برای تولید هیدروژن است. رشد هتروتروفی باکتری‌ها توانایی کاهش اکسیژن به مقدار مناسب برای تولید هیدروژن در شدت نورهای متوسط رو به بالا را دارد. بر خلاف باور عمومی افزایش نرخ مصرف اکسیژن توسط باکتری‌ها تنها دلیل بهبود تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست نبوده و بلکه غالباً توانایی کاهش نرخ مصرف اسیداستیک در این کشت‌ها سبب افزایش مقدار و مدت زمان تولید هیدروژن در سلول‌های کلامیدوموناس می‌شود. دانستن این اطلاعات اولیه زمینه‌ی مناسبی برای تحقیقات بعدی ما در راستای تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری ایجاد کرد.

بعضی از باکتری‌ها از طریق مسیرهای متابولیکی تخمیری هیدروژن تولید می‌کنند که مسیرهای متابولیکی فعال تولید هیدروژن در تاریکی نیز نامیده می‌شوند. گزارش شده است که مقدار هیدروژن تولید شده در روشنایی توسط ارگانیس‌م‌های فتوسنتزی کمتر از مقدار هیدروژن تولید شده از طریق مسیرهای متابولیکی تخمیری باکتری‌ها در تاریکی است [۱۶، ۱۱۰]. هیدروژن محصول نهایی مسیرهای متابولیکی تخمیری باکتری‌ها با مصرف تنوع زیادی از خوراک‌ها و ضایعات^۱ به عنوان منبع کربنی است. یکی از مهم‌ترین معضلات تولید تخمیری هیدروژن بازده پایین تولید به دلیل تجمع بیش از اندازه‌ی مواد آلی تولید شده مانند اسیداستیک در فرایند تخمیر است. تجمع این مواد آلی به رشد این ارگانیس‌م‌ها و تولید هیدروژن در آن‌ها آسیب می‌زند [۱۱۱]. تولید تخمیری هیدروژن در دو گروه مجزای باکتری‌ها به صورت گسترده‌ای مطالعه شده است. گروه باکتری‌های بی‌هوازی محض^۲ که سویه‌های کلاستریدیوم^۳ نمونه‌ای از آن‌ها هستند. در این گروه تولید هیدروژن به فرایند اکسیداسیون پیرووات به استیل کوآ توسط آنزیم پیرووات فردوکسین اکسیدوردوکتاز^۴ (PFOR) مرتبط است. بر اساس نام این آنزیم، مسیر PFOR نامیده می‌شود. پیشینه تولید هیدروژن در این مسیر متابولیکی زمانی حاصل می‌شود که استات

¹ Wastes

² Strict anaerobes

³ *Clostridium* spp.

⁴ Pyruvate ferredoxin oxidoreductase

محصول عمده‌ی نهایی فرایند تخمیر است. هر چند تجمع اسیداستیک در محیط کشت یکی از مشکلات اصلی تولید هیدروژن در این ارگانیسیم‌ها است [۱۱۱-۱۱۳]. گروه دوم شامل باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری^۱ است که ای‌کلای مثالی از آن‌ها است. در باکتری ای‌کلای تولید هیدروژن به کاتابولیسم فرمات توسط آنزیم فرمات هیدروژن لیاز^۲ (FHL) مرتبط است. در شرایط بی‌هوازی تخمیر مخلوط اسیدها در این ارگانیسیم‌ها اتفاق می‌افتد، جایی که پیرووات به طور عمده توسط پیرووات فرمات لیاز^۳ (PFL) مصرف شده و فرمات و استیل کوآ تولید می‌شوند. سپس فرمات به وسیله‌ی FHL به هیدروژن و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌شود. این فرایند مسیر متابولیکی تولید PFL- H_2 نامیده می‌شود. اسیداستیک و اتانول تولید شده از شکست استیل کوآ محصولات نهایی غیر قابل اجتناب این فرایند هستند. همانند مسیر متابولیکی PFOR، تجمع اسیداستیک یکی از مهم‌ترین مشکلات برای رشد و تولید هیدروژن در ای‌کلای است. مطالعات زیادی برای بهبود و تولید هیدروژن در سوبه‌های کلسترییدیوم و ای‌کلای از طریق دستکاری این ارگانیسیم‌ها به صورتی که مسیرهای متابولیکی تخمیری تغییر مسیر داده و تجمع محصولات نهایی ناخواسته مانند لاکتات، سوکسینات و بوتیرات کاهش یابد انجام شده است. در حالی که تجمع اسیداستیک غیر قابل اجتناب است زیرا تولید این اسید آلی هم‌زمان با تولید هیدروژن اتفاق افتاده و مسیرهای تولید آن‌ها به هم مرتبط هستند و به علاوه تولید اسیداستیک برای حفظ توازن بهینه‌ی انرژی/اکسایش-کاهش^۴ در سلول‌ها ضروری است [۱۱۱-۱۱۴]. نقش اسیداستیک در رشد کلامیدوموناس و تولید هیدروژن در این جلبک موضوع قابل توجهی برای ترکیب تولید هیدروژن در باکتری‌ها و کلامیدوموناس است که در بخش دوم این تحقیق بررسی شد. نتایج این بخش نشان دادند که باکتری‌ها در محیط کشت‌های غنی از قندها، اسیداستیک مورد نیاز رشد و تولید هیدروژن را تولید کرده و در اختیار کلامیدوموناس قرار می‌دهند و به این ترتیب تولید بلندمدت هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری ممکن می‌شود. به علاوه، مشاهده شد که در محیط کشت غنی از گلوکز، با استفاده از نحوه‌ی خوراک دهی مناسب در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-سویه‌ی تولید کننده‌ی هیدروژن ای‌کلای، هم‌افزایی تولید هیدروژن حاصل می‌شود. هم‌افزایی به این معنا است که در کشت‌های هم‌زیست این ارگانیسیم‌ها هیدروژن بیشتری نسبت به مجموع تولید در کشت‌های خالص آن‌ها حاصل می‌شود. از نظر رویکرد بیوتکنولوژی می‌توان در نظر گرفت که در شرایط مناسب رشد، باکتری‌ها می‌توانند منابع آلی کربن ارزان قیمت را مصرف کرده و هیدروژن و اسیداستیک تولید کنند. سپس کلامیدوموناس با مصرف اسیداستیک هیدروژن تولید می‌کند. باکتری‌ها به ازای تامین اسیداستیک برای کلامیدوموناس، اکسیژن تولید شده توسط ریزجلبک را مصرف می‌کنند. این داد و ستد بین کلامیدوموناس و باکتری‌ها هر دو سبب پایداری تولید هیدروژن در کلامیدوموناس می‌شوند. از سوی دیگر کلامیدوموناس اسیداستیک ترشح شده به محیط کشت

¹ Facultative anaerobes

² Formate hydrogen lyase

³ Pyruvate formate lyase

⁴ Energy/redox

را مصرف کرده و از طریق فتوسنتز برای باکتری‌ها اکسیژن تولید می‌کنند و به این ترتیب سبب بهبود رشد و تولید هیدروژن در باکتری‌ها می‌شوند.

از آن‌جا که زمان تقسیم^۱ بیشتر باکتری‌ها کمتر از ریزجلبک‌ها است، ریسک اینکه جمعیت باکتری‌ها بر جمعیت جلبک چیره شده که در نتیجه سبب اسیدی شدن محیط کشت و تمام شدن بیشتر مواد مغذی و یا اکسیژن موجود شود همیشه وجود دارد. تمام موارد ذکر شده سبب مرگ کلامیدوموناس و متوقف شدن تولید هیدروژن در این ریزجلبک می‌شوند. احتمال وقوع این مشکلات زمانی که منبع کربن غنی در اختیار باکتری‌ها باشد بیشتر است. یافتن شریک مناسب از جنس باکتری برای ریزجلبک‌ها و شرایط بهینه‌ی رشد با هدف تولید هیدروژن موضوعی چالش برانگیز است.

برای مثال در کشت‌های هم‌زمان کلامیدوموناس-ای‌کلای مقدار اسیداستیک تولید شده توسط ای‌کلای مستقیماً به مقدار گلوکز (منبع کربن) در دسترس این باکتری وابسته است. بنابراین با استفاده از فرایندهای فدیج و پیوسته می‌توان از تولید ناگهانی مقدار زیادی محصولات تخمیری (به خصوص اسیداستیک) توسط ای‌کلای جلوگیری کرد. مقدار اسیداستیک تولید شده از طریق فرایند تخمیر در ای‌کلای باید به اندازه‌ی کافی کم باشد تا pH را در محدوده‌ی مناسب برای رشد جلبک و باکتری نگه دارد و از طرفی برای مصرف کلامیدوموناس و ایفای نقش موثر در تولید هیدروژن در روش‌نایی کافی باشد. زمانی که سلول‌های کلامیدوموناس زنده و فعال باشند، اسیداستیک ترشح شده به محیط را مصرف کرده و پس از مدتی pH محیط تقریباً به مقدار اولیه افزایش می‌یابد. پیدا کردن مقدار مناسب منبع کربن و دیگر منابع مغذی با هدف تولید بهینه‌ی هیدروژن برای مدت زمان طولانی، نیازمند تحقیقات بیشتر است.

در بخش سوم آزمایش‌های تجربی رساله، نتایج قابل توجهی از تقویت تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس و یک جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته که از کشت ریزوبیوم لگومینوساروم جدا شده بود، حاصل شد. نکته‌ی حائز اهمیت در مورد این جامعه‌ی باکتریایی این است که در محیط کشت TAP، اسیداستیک را به طور قابل توجهی مصرف نمی‌کند. بنابراین بر خلاف باکتری‌های مطالعه شده در بخش‌های قبل، این جامعه‌ی باکتریایی رقابت چشم‌گیری برای مصرف اسیداستیک با کلامیدوموناس در کشت‌های هم‌زیست ندارد. در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-جامعه‌ی باکتریایی ناشناخته، در محیط کشت مجهز به مانیتول (قندی که توسط جامعه‌ی باکتریایی قابل مصرف است) رابطه‌ی مفید دو طرفه بین جلبک و جامعه‌ی باکتریایی برقرار می‌شود که از دستاوردهای آن تولید بلندمدت هیدروژن است.

¹ Doubling time

در پژوهش حاضر، سویه‌هایی از باکتری‌های *استنوتروفوموناس*، میکروباکتریوم و باسیلوس از جامعه‌ی باکتریایی جداسازی و شناسایی شدند. بررسی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس با اجزای جامعه‌ی باکتریایی نشان داد که میکروباکتریوم نقش موثری بر تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست دارد. در محیط کشت TYM، نه تنها میکروباکتریوم اسیداستیک را مصرف نمی‌کند، بلکه از تخمیر مانیتول اسیداستیک مورد نیاز رشد و تولید هیدروژن در کلامیدوموناس را به محیط کشت ترشح می‌کند.

نتایج رشد نشان دادند که میکروباکتریوم برای رشد به مشتقات پروتئینی احتیاج دارد. از آنجا که این باکتری در محیط کشت‌های عاری از این ترکیبات، در کنار کلامیدوموناس می‌تواند رشد کند، این نتیجه حاصل شد که کلامیدوموناس تامین‌کننده‌ی این ترکیبات برای رشد این باکتری است. بنابراین با توجه به اینکه کلامیدوموناس توانایی تولید مشتقات پروتئینی مورد نیاز رشد میکروباکتریوم را دارد و در عوض می‌تواند از اسیداستیک تولید شده توسط این باکتری در محیط کشت‌های مجهز به مانیتول مصرف کند، برقراری رابطه‌ی هم‌زیستی مفید متقابل به معنای بهبود رشد هر دو ارگانیسم در کشت‌های هم‌زیست نسبت به کشت‌های کنترلی هر کدام در شرایط هوازی مشاهده می‌شود. درحالی‌که در شرایط بی‌هوازی با وجود تولید پیوسته‌ی هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست در محیط کشت TYM، رشد جلبک در کشت‌های هم‌زیست نسبت به کشت‌های کنترلی آن کمتر است.

وجود مانیتول برای تولید بلندمدت هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم ضروری است. همچنین زمانی که محیط کشت از مشتقات پروتئینی غنی‌تر باشد، هیدروژن بیشتر برای مدت زمان طولانی‌تر تولید می‌شود. مشتقات پروتئینی، تعیین‌کننده‌ی رشد و فعالیت میکروباکتریوم در کشت‌های هم‌زیست هستند. افزایش این ترکیبات از طرفی سبب تقویت تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم شده و از طرف دیگر به رشد کلامیدوموناس آسیب می‌زند.

متیلوباکتریوم به عنوان باکتری تقویت‌کننده‌ی رشد گیاهان شناخته شده است [۱۰۳]. با اینکه اضافه کردن این باکتری به کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم، در محیط کشت TM به ظاهر بر رشد کلامیدوموناس اثر مثبتی ندارد، گزینه‌ای مناسب برای تقویت تولید هیدروژن برای مدت زمان طولانی است.

بررسی‌های بیشتر در محیط کشت‌های TTM و TTG نشان دادند که نرخ مصرف گلوکز و مانیتول در کشت‌های هم‌زیست بیشتر از کشت‌های کنترلی میکروباکتریوم است و این بیانگر این است که کلامیدوموناس نقشی فراتر از فراهم کردن مشتقات پروتئینی برای میکروباکتریوم دارد. همچنین به وضوح دیده شد که غلظت اولیه‌ی سلول‌های میکروباکتریوم و کلامیدوموناس اثر قابل توجهی بر بازده نهایی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست دارند.

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که شناخت اسیداستیک به عنوان عاملی ضروری برای تولید هیدروژن در شرایط آزمایش، یافتن پتانسیل هم‌افزایی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری و کشف کنسرسیوم جلبک-باکتری که توانایی تولید هیدروژن برای مدت زمان طولانی و با بازدهی بالاتر از تمام نتایج گزارش شده از تحقیقات مشابه را دارد، بزرگترین دستاوردهای بخش تجربی این رساله هستند.

همانطور که توضیح داده شد، استفاده از استراتژی‌های دیگر مانند دستکاری ژنتیکی [۴۲]، فقر مواد مغذی (مرور شده توسط [۴۷، ۱۱۵])، محدود کردن کربن دی‌اکسید موجود در بیوراکتور [۵۲، ۵۳]، پاکسازی فاز گاز به وسیله‌ی گازهای خنثی [۳۹]، کشت در شدت نورهای پایین [۵۴، ۵۶، ۵۷] و انتقال کشت از شرایط نوری به تاریکی [۵۲] در بیوراکتورهای در مقیاس بزرگ پرچالش بوده و از نظر اقتصادی ممکن است مقرون به صرفه نباشند. در مقایسه با این روش‌ها، ممکن است استفاده از کشت‌های هم‌زیست جلبک-باکتری رویکردی ساده‌تر و آسان‌تر برای تولید هیدروژن در جلبک در روشنایی باشد. زیرا با تکنولوژی ساده‌تر، بدون نیاز به تجهیزات پیچیده برای کشت جلبک به منظور تولید هیدروژن، قابل اجرا است. مطالعات کمی در زمینه‌ی تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیستی جلبک و باکتری به خصوص در محیط کشت‌های غنی انجام شده است. به همین دلیل در این رساله سعی شده است که پتانسیل تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-باکتری در محیط کشت‌های غنی از مواد مغذی و در روشنایی به طور گسترده‌تری بررسی و مطالعه شود. درک صحیح از مکانیسم تولید هیدروژن در محیط کشت‌های حاوی اسیداستیک و نیز فهم پیچیدگی‌های ارتباطی بین کلامیدوموناس و باکتری‌ها به ما کمک می‌کند که در آینده بتوانیم بازده تولید هیدروژن را از طریق اصلاحات فیزیولوژی و مهندسی ژنتیک افزایش دهیم.

به منظور درک آسان‌تر اهمیت و جایگاه تحقیق انجام شده، در جدول ۵-۱ خلاصه‌ای از بالاترین بازده‌ها و نرخ‌های تولید هیدروژن حاصل شده از انواع تکنیک‌های به کار برده شده برای تقویت تولید زیستی نوری هیدروژن در کلامیدوموناس جمع‌آوری و ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود از نظر مقدار بازده تولید هیدروژن نتایج تحقیق حاضر اهمیت به‌سزایی در زمینه‌ی بهبود تولید هیدروژن در جلبک کلامیدوموناس دارد. قابل توجه است که در هیچ یک از مراحل آزمایش‌های انجام شده در این رساله، بهینه‌سازی انجام نشده است و به احتمال زیاد بازده بالاتر تولید هیدروژن در شرایط بهینه امکان‌پذیر است. همچنین شایان ذکر است که علی‌رغم بیشتر بودن نرخ تولید هیدروژن در تکنیک‌های دیگر مانند جهش‌های ژنتیکی، شرایط فقر سولفور و استفاده از جاذب‌ها، نسبت به نرخ تولید به دست آمده در این تحقیق، تولید هیدروژن در آن شرایط غالباً برای مدت زمان کوتاهی ادامه دارد. در حالی که در این تحقیق تولید هیدروژن به مدت حداقل ۱۶ روز در کنسرسیوم کلامیدوموناس-میکروباکتریوم در محیط کشت غنی از مواد مغذی ادامه داشته است. بنابراین کنسرسیوم کلامیدوموناس-میکروباکتریوم پتانسیل امیدبخشی برای تولید بلندمدت هیدروژن است.

در بخش آخر تحقیقات این رساله نشان داده شد که مدل‌سازی مبتنی بر قید روشی کارآمد برای پیش‌بینی رفتار کنسرسیوم جلبک-باکتری در کشت‌های هم‌زیست و کشت‌های خالص هر یک از این ارگانیزم‌ها است. تا کنون به ندرت از مدل‌سازی مبتنی بر قید برای بررسی رفتار جوامع میکروبی استفاده شده است [۱۰۸]. به دلیل اینکه فعالیت‌های تنظیمی و سیگنالی سلول‌ها در این نوع مدل‌سازی در نظر گرفته نمی‌شود، نمی‌توان انتظار پیش‌بینی دقیق و کمی از رفتار کشت‌ها را داشت. با این وجود تخمین روند تولید هیدروژن، مصرف اسیداستیک و رشد جلبک به صورت مقایسه‌ای در کشت‌های کنترلی جلبک و باکتری و کشت‌های هم‌زیست آن‌ها هماهنگی قابل قبولی با نتایج تجربی دارد. بنابراین می‌توان امید داشت که در آینده با استفاده از پتانسیل مدل‌سازی مبتنی بر قید بتوان تخمین اولیه‌ی مناسبی از رفتار سیستم‌های پیچیده‌ی زیستی که امکان بررسی‌های تجربی آن‌ها ممکن نبوده و یا به صرف هزینه و انرژی زیادی نیاز دارند، به دست آورد.

جدول ۵-۱. بیشینه تولید هیدروژن در کلامیدوموناس با استفاده از تکنیک‌های مختلف به ترتیب نزولی. با توجه به متفاوت بودن واحدهای گزارش شده برای تولید هیدروژن در مطالعات گوناگون، در اینجا تلاش شده است که مقدار تولید هیدروژن با واحد یکسان (ml/L cultures) برای تمام روش‌ها تخمین زده شود. از قانون آووگادرو برای گازهای ایده‌آل استفاده شده است. بر اساس این قانون، حجم یک مول گاز در فشار ۱۰۱/۳۲۵ kPa و دمای ۲۷۳/۱۵ K، ۲۲/۴۱ L در نظر گرفته می‌شود. در این جدول بیشترین مقادیر گزارش شده برای تولید هیدروژن از میان تکنیک‌های مشابه گردآوری شده است.

مرجع	تخمین تولید روزانه‌ی هیدروژن (ml/L culture.day)	مقدار تخمین زده شده‌ی تولید هیدروژن به واحد (ml/L culture)	مقدار و مدت زمان تولید هیدروژن	استراتژی
[116]	~۸۷/۴	۴۳۶/۹۹ ~ ۱۲۰ ساعت	~ ۱/۵ mmol/mg chl ~ ۱۲۰ ساعت	سویهی جهش یافته‌ی PGRL1-ko در محیط کشت TAP-S و شدت نور ۶۰ $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$
[53]	۵۶/۷۵	۲۲۷ ۹۶ ساعت	۲۲۷ ml/L ۹۶ ساعت	جاذب نمک آهن در محیط کشت HS و شدت نور ۳۲۰ $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$
[117]	~۵۱/۰۶	<۴۰۰ ۱۸۸ ساعت	<۴۰۰ ml/L ۱۸۸ ساعت	<i>stm6Glc4L01</i> (سویهی جهش یافته پروتئین‌های پیچیده‌ی دریافت نور) در محیط کشت TAP-S + ۱ glucose و شدت نور ۴۵۰ $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$
[40]	~۴۵	۵۴۰ ~ ۱۲ روز	۵۴۰ ml/L ~ ۱۲ روز	<i>stm6</i> (سویهی جهش یافته، مسدود شده در state I transition) در محیط کشت TAP-S و شدت نور ۱۰۰ $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$
[49]	۴۲	۱۴۰ ۸۰ ساعت	۱۴۰ ml/L ۸۰ ساعت	TAP-S
[120]	۳۷/۳۵	۱۱۲/۰۵ ۷۲ ساعت	~ ۱۵۰ $\mu\text{mol}/۳۰\text{ ml culture}$ ۷۲ ساعت	افزودن مرحله‌ای ۱۳ mM NaHSO ₃ در محیط کشت TAP و شدت نور ۲۰۰ $\mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$

مرجع	تخمین تولید روزانه ی هیدروژن (ml/L culture.day)	مقدار تخمین زده شده ی تولید هیدروژن به واحد (ml/L culture)	مقدار و مدت زمان تولید هیدروژن	استراتژی
[121]	۳۵/۸۶	<۸۹/۶۴ ۶۰ ساعت	<۱۲۰ ۳۰ ml culture ۶۰ ساعت	استفاده از ۱۳ mM NaHSO ₃ در محیط کشت TAP و شدت نور ۲۰۰ μmol/m ² ·s
[69]	۳۴/۷۱	۱۹۶ ۱۳۵/۵ ساعت	۱۹۶ ml/L ۱۳۵/۵ ساعت	همزیستی با سودوموناس فلورسنس در محیط کشت TAP-S و شدت نور ۸۰ μmol/m ² ·s
[52]	۳۲/۴۷	۷۳/۰۶ ۵۴ ساعت	۳/۲۶ mmol/L ۵۴ ساعت	پالس های شدید روشنائی/تاریکی در فضای پر شده از گاز آرگون در محیط کشت TAP
این تحقیق	۱۹/۵۶	۳۱۳ ۱۶ روز	۳۱۳ ml/L ۱۶ روز	همزیستی کلامیدوموناس با جامعه ی باکتریایی شامل استنوتروفوموناس، میکروباکتریوم و باسیلوس در محیط کشت TYM و شدت نور ۵۰ μmol/m ² ·s
[118]	~۱۹/۲۱	>۱۳۴/۴۶ بیشتر از ۷ روز	>۶ mmol/L بیشتر از ۷ روز	فقر منیزیوم در شدت نور ۲۰۰ μmol/m ² ·s
[119]	۱۸/۱۵ ± ۰/۶۱	۱۱۸ ± ۴ ۱۵۶ ساعت	۱۱۸ ± ۴ ml/L ۱۵۶ ساعت	مکانیسم تغلیظ کربن (CCM) در محیط کشت TAP-S و شدت نور ۵۰ μmol/m ² ·s
[62]	۱۶/۴۷	۱۶۴/۷۱ ۱۰ روز	۱۴۷ μmol/mg chl ۱۰ روز	همزیستی با/زئوباکتر کروکوکوم در محیط کشت TAP-S و شدت نور ۲۰۰ μmol/m ² ·s

مرجع	تخمین تولید روزانه ی هیدروژن (ml/L culture.day)	مقدار تخمین زده شده ی تولید هیدروژن به واحد (ml/L culture)	مقدار و مدت زمان تولید هیدروژن	استراتژی
[122]	۱۳/۷۵	۸۲/۵ ۶ روز	۸۲/۵ ml/L ۶ روز	بیان ژن <i>hemHc</i> در کلروپلاست در محیط کشت TAP-S و شدت نور $۵۰ \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$
[63]	$۱۳/۱۴ \pm ۰/۹$	$۱۷۰/۸ \pm ۱۱/۷$ ۱۳ روز	$۱۷۰/۸ \pm ۱۱/۷$ ml/L ۱۳ روز	همزیستی با باکتری در محیط کشت TAP-S و شدت نور $۲۰۰ \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$
[61]	۱۳/۰۲	۲۰۸/۴۱ ۱۶ روز	$۳۱۰ \mu\text{mol/mg chl}$ ۱۶ روز	همزیستی با برادی ریزوبیوم جاپونیکوم در محیط کشت TAP-S و شدت نور $۲۰۰ \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$
[58]	۱۱/۹۲	۱۶۶/۹۵ ۱۴ روز	۲۹۸ $\mu\text{mol}/۴۰ \text{ ml culture}$ ۱۴ روز	همزیستی با برادی ریزوبیوم جاپونیکوم در محیط کشت TAP-S و شدت نور $۶۰ \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$
[30]	۹	۳۶ ۹۶ ساعت	۳ ~ ml/mg chl ۹۶ ساعت	<i>sda6</i> (سویه ی جهش یافته ی نشاسته) در محیط کشت TAP-S غنی شده از DCMU و شدت نور $۲۰۰ \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$
[57]	~۷/۷۸	<۷۰ ۹ روز	<۷۰ ml/L ۹ روز	شدت نور کم، افزودن اسیداستیک و هوادهی روزانه در محیط کشت TAP
[60]	$۶/۷۵ \pm ۰/۶۶$	$۴۷/۲۴۱ \pm ۴/۶۶۱$ ۷ روز	$۴۷/۲۴۱ \pm ۴/۶۶۱$ ml/L ۷ روز	همزیستی با سویه ی جهش یافته ی ای کلای فاقد آنزیم هیدروژناز در محیط کشت TAP-S و شدت نور $۵۰ \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$

مرجع	تخمین تولید روزانه‌ی هیدروژن (ml/L culture.day)	مقدار تخمین زده شده‌ی تولید هیدروژن به واحد (ml/L culture)	مقدار و مدت زمان تولید هیدروژن	استراتژی
[123]	۵/۳	۱۵/۸۹ ۷۲ ساعت	۸۸/۶۵ μmol/mg chl ۷۲ ساعت	Y67A (سویه‌ی جهش یافته‌ی آنزیم روبیسکو) در محیط کشت TAP-S و شدت نور ۳۷ μmol/m ² ·s
[59]	۴/۳۱	۳۴/۴۵ ۸ روز	۶۱/۵ μmol/۴۰ ml culture ۸ روز	هم‌زیستی با سویه‌ی سودوموناس در محیط کشت TAP-S و شدت نور ۶۰ μmol/m ² ·s
[56]	~۳/۰۷	>۴۴/۸۲ ۳۵۰ ساعت	>۲ mmol/L ۳۵۰ ساعت	تنظیم تعادل فتوسنتز/تنفس در شدت نور کم، غلظت بالای کلروفیل و محیط کشت TAP با غلظت دو برابر اسیداستیک
[70]	۰/۷۷	۴۰/۰۹ ۵۲ روز	۵۱۱/۱۲ ~ μmol/mg chl ۵۲ روز	هم‌زیستی با باکتری اکسید کننده‌ی سولفور در محیط کشت TAP-S غنی شده از Na ₂ S ₂ O ₃ و در سیکل روشنایی/تاریکی
[125]	۰/۵۶	۱/۱۲ ۴۸ ساعت	۱/۵ ~ μmol/۳۰ ml culture ۴۸ ساعت	بیان ژن پیرووات اکسیداز از ای کلای در کلامیدوموناس در محیط کشت TAP و شدت نور ۳۰ μmol/m ² ·s
[124]	۰/۲۵	۱/۵ ۶ روز	>۹۰ μl/mg chl	amiRNA-D1 القا شده به وسیله‌ی گرما در محیط کشت TAP

مرجع	تخمین تولید روزانه‌ی هیدروژن (ml/L culture.day)	مقدار تخمین زده شده‌ی تولید هیدروژن به واحد (ml/L culture)	مقدار و مدت زمان تولید هیدروژن	استراتژی
[122]	۰/۰۱۴	۰/۰۷ ~ ۵ روز	۶ روز ~ ۲/۸ μl/۴۰ ml culture ~ ۵ روز	جلبک تراریخته‌ی <i>hemHc-lbac</i> در محیط کشت TAP-S و شدت نور ۵۰ μmol/m ² ·s

۵-۲. پیشنهادها

در طی انجام این رساله و مرور منابع متعدد، سوالات و موضوعات ناشناخته‌ی بسیاری نمایان شدند که با ادامه‌ی تحقیقات و یافتن پاسخ این سوال‌ها می‌توان فرایند تولید زیستی هیدروژن در کنسرسیوم جلبک-باکتری را به رشد و تکامل بیشتری رساند. در این بخش پیشنهادهای زیر با هدف بهره‌مندی محققان و دانشجویان برای ادامه‌ی تحقیقات در آینده جمع‌آوری و ارائه شده‌اند.

(۱) نتایج اولیه‌ی ما نشان دادند تا زمانی که اسیداستیک در محیط کشت وجود داشته باشد، هیدروژن به صورت پیوسته تولید می‌شود. باور ما بر آن است که نقش اسیداستیک تنها به فراهم ساختن شرایط کم‌اکسیژنی محدود نشده و به احتمال زیاد متابولیسم مصرف آن به تولید هیدروژن در این ریزجلبک مرتبط است. بنابراین نقش اسیداستیک در تولید هیدروژن در کلامیدوموناس نیاز به تحقیق و بررسی دقیق دارد. دانستن مکانیزم دقیق تولید هیدروژن در حضور اسیداستیک به ما کمک می‌کند که بتوانیم در آینده بازده تولید را از طریق بهبود شرایط فیزیولوژی و دستکاری ژنتیکی افزایش دهیم.

(۲) هم‌زیستی کلامیدوموناس با باکتری‌ها روش امیدبخشی برای تولید هیدروژن از طریق هم‌افزایی بازده تولید هیدروژن در روشنایی در کلامیدوموناس و تولید تخمیری در باکتری‌ها است. تجمع اسیداستیک یکی از مهم‌ترین مشکلات تولید تخمیری هیدروژن در باکتری‌ها است. هرچند می‌توان با استفاده از هم‌زیستی این باکتری‌ها و کلامیدوموناس این معضل را تبدیل به یک فرصت کرد. با اینکه بازده و نرخ تولید هیدروژن تولید شده همچنان برای کاربرد بیوتکنولوژی کافی نیست، این رویکرد در هم‌زیستی بسیاری از جلبک‌ها و باکتری‌های دیگر نیز قابل تامل و بررسی است. یافتن شریک مناسب باکتریایی برای کلامیدوموناس (و یا هر ریزجلبک هتروتروف و تولیدکننده‌ی هیدروژن) و شرایط بهینه‌ی کشت برای رشد و عملکرد ارگانیسیم‌ها یک رویکرد زیستی امیدبخش برای تولید هیدروژن است که نیاز به مطالعات بیشتری دارد. به علاوه، در کنار انتخاب جلبک و باکتری همراه مناسب، انتخاب منبع تغذیه‌ی ارزان قیمت که باکتری‌ها از آن مصرف کرده و اسیداستیک مورد نیاز رشد و تولید هیدروژن را برای جلبک فراهم کنند، اهمیت به‌سزایی دارد. به عنوان پیشنهاد می‌توان از فاضلاب‌ها، آب‌های آلوده و پسماندهای مختلف، متناسب با باکتری مورد مطالعه استفاده کرد. در پایان بررسی رشد و تولید هیدروژن در کشت‌های هم‌زیست انتخابی در فرایندهای نیمه‌پیوسته (فدیچ) و پیوسته جالب توجه است.

(۳) کشت‌های هم‌زیست کلامیدوموناس-میکروباکتریوم پتانسیل بالایی برای تولید بلندمدت هیدروژن در محیط کشت‌های مجهز به قندها دارند. هرچند، ناشناخته‌های زیادی در مورد رابطه‌ی هم‌زیستی این ارگانیسیم‌ها وجود دارد که در ادامه دسته‌بندی شده‌اند:

- با توجه به اهمیت اسیداستیک در رشد و تولید هیدروژن در کلامیدوموناس، مشخص شدن متابولیسم تولید و مصرف این ماده ی آلی در میکروباکتریوم در شرایط مختلف، مهم و جالب توجه است.
 - روشن شدن نقش مشتقات پروتئینی در متابولیسم میکروباکتریوم مهم و ضروری است.
 - امکان تولید و ترشح آمینواسیدها و پپتیدها توسط کلامیدوموناس در شرایط مختلف نیاز به مطالعه و بررسی دارد.
 - تعیین شرایط بهینه برای رشد و عملکرد ارگانیسم ها در کشت های همزیست کلامیدوموناس- میکروباکتریوم با هدف تولید بیشینه و پایدار هیدروژن جالب توجه است. شرایط بهینه شامل محیط کشت، شدت نور، غلظت های اولیه ی جلبک و باکتری و شرایط عملیاتی مناسب است.
 - تعیین نقش متیلوباکتریوم در کشت های همزیست کلامیدوموناس- میکروباکتریوم- متیلوباکتریوم جالب توجه بوده و به مطالعات بیشتری نیاز دارد.
 - بررسی تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس- میکروباکتریوم در فرایندهای ناپیوسته، نیمه پیوسته و پیوسته حائز اهمیت است.
 - بررسی استفاده از منابع مغذی ارزان قیمت مانند پساب های کارخانه های روغن زیتون که سرشار از مانیتول هستند و پساب های لبنی که غنی از ترکیبات پروتئینی هستند، به منظور تولید هیدروژن در کشت های همزیست کلامیدوموناس- میکروباکتریوم از نظر کاربرد بیوتکنولوژی بسیار ارزشمند است.
- (۴) با توجه به موفق بودن مدل سازی مبتنی بر قید در مقایسه ی رفتار کشت همزیست کلامیدوموناس- سودوموناس پوتیدا/ با رفتار کشت های خالص هر یک از این ارگانیسم ها، بررسی رفتار کشت های همزیست کلامیدوموناس- میکروباکتریوم در شرایط مختلف با استفاده از مدل سازی جالب توجه است. هرچند تا کنون هیچ مدلی برای شبکه ی متابولیک میکروباکتریوم در منابع ارائه نشده است. بنابراین ساختن شبکه ی متابولیک میکروباکتریوم و سپس اتصال آن به شبکه ی متابولیک کلامیدوموناس از اهمیت بالایی برخوردار است.

فصل ششم:

مراجع

- [1] S. V. Mohan, "Biohydrogen Production: An Introduction," *Biohydrogen*, pp. 1–24, Jan. 2013.
- [2] S. J. Lee, S.-J. Lee, and D.-W. Lee, "Design and development of synthetic microbial platform cells for bioenergy," *Front. Microbiol.*, vol. 4, p. 92, Apr. 2013.
- [3] T. L. Kelly-Yong, K. T. Lee, A. R. Mohamed, and S. Bhatia, "Potential of hydrogen from oil palm biomass as a source of renewable energy worldwide," *Energy Policy*, vol. 35, no. 11, pp. 5692–5701, Nov. 2007.
- [4] Timothy Lipman, "An Overview of Hydrogen Production and Storage Systems with Renewable Hydrogen Case Studies," Oakland, 2011.
- [5] D. Das and T. N. Veziroğlu, "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 26, no. 1, pp. 13–28, Jan. 2001.
- [6] S. E. Hosseini, M. Abdul Wahid, M. M. Jamil, A. A. M. Azli, and M. F. Misbah, "A review on biomass-based hydrogen production for renewable energy supply," *Int. J. Energy Res.*, vol. 39, no. 12, pp. 1597–1615, Oct. 2015.
- [7] I. Dincer and C. Acar, "Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 40, no. 34, pp. 11094–11111, Sep. 2015.
- [8] P. Nikolaidis and A. Poullikkas, "A comparative overview of hydrogen production processes," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 67, pp. 597–611, Jan. 2017.
- [9] W. de Jong, "Sustainable Hydrogen Production by Thermochemical Biomass Processing," pp. 197–238, Jul. 2008.
- [10] K. Chandrasekhar, Y.-J. Lee, and D.-W. Lee, "Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 12, pp. 8266–8293, Apr. 2015.
- [11] J. D. Holladay, J. Hu, D. L. King, and Y. Wang, "An overview of hydrogen production technologies," *Catal. Today*, vol. 139, no. 4, pp. 244–260, Jan. 2009.
- [12] A. M. Abdalla, S. Hossain, O. B. Nisfindy, A. T. Azad, M. Dawood, and A. K. Azad, "Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review," *Energy Convers. Manag.*, vol. 165, pp. 602–627, Jun. 2018.
- [13] W. Khetkorn *et al.*, "Microalgal hydrogen production – A review," *Bioresour. Technol.*, vol. 243, pp. 1194–1206, Nov. 2017.
- [14] H. Wang, J. Xu, L. Sheng, X. Liu, Y. Lu, and W. Li, "A review on bio-hydrogen production technology," *Int. J. Energy Res.*, vol. 42, no. 11, pp. 3442–3453, Sep. 2018.
- [15] F. A. Lopes Pinto, O. Troshina, and P. Lindblad, "A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 27, no. 11–12, pp. 1209–1215, Nov. 2002.
- [16] D. B. Levin, L. Pitt, and M. Love, "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 29, no. 2, pp. 173–185, Feb. 2004.
- [17] R. Nandi and S. Sengupta, "Microbial Production of Hydrogen: An Overview," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 24, no. 1, pp. 61–84, Jan. 1998.

- [18] V. Laxman Pachapur *et al.*, "Co-culture strategies for increased biohydrogen production," *Int. J. Energy Res.*, vol. 39, no. 11, pp. 1479–1504, Sep. 2015.
- [19] Y.-K. Oh, E.-H. Seol, E. Y. Lee, and S. Park, "Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas Palustris* P4," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 27, no. 11–12, pp. 1373–1379, Nov. 2002.
- [20] D. Nagarajan, D.-J. Lee, A. Kondo, and J.-S. Chang, "Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation," *Bioresour. Technol.*, vol. 227, pp. 373–387, Mar. 2017.
- [21] G. Torzillo, A. Scoma, C. Faraloni, and L. Giannelli, "Advances in the biotechnology of hydrogen production with the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 35, no. 4, pp. 485–496, Oct. 2015.
- [22] M. Winkler, A. Hemschemeier, J. Jacobs, S. Stripp, and T. Happe, "Multiple ferredoxin isoforms in *Chlamydomonas reinhardtii* – Their role under stress conditions and biotechnological implications," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 89, no. 12, pp. 998–1004, Dec. 2010.
- [23] E. A. Peden *et al.*, "Identification of Global Ferredoxin Interaction Networks in *Chlamydomonas reinhardtii*," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 49, pp. 35192–35209, Dec. 2013.
- [24] F. Mus, L. Cournac, V. Cardellini, A. Caruana, and G. Peltier, "Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1708, no. 3, pp. 322–332, Jul. 2005.
- [25] F. Jans *et al.*, "A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 51, pp. 20546–51, Dec. 2008.
- [26] A. Baltz *et al.*, "Plastidial Expression of Type II NAD(P)H Dehydrogenase Increases the Reducing State of Plastoquinones and Hydrogen Photoproduction Rate by the Indirect Pathway in *Chlamydomonas reinhardtii* 1.," *Plant Physiol.*, vol. 165, no. 3, pp. 1344–1352, Jul. 2014.
- [27] T. Rühle, A. Hemschemeier, A. Melis, and T. Happe, "A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains," *BMC Plant Biol.*, vol. 8, no. 1, p. 107, Oct. 2008.
- [28] E. Mignolet, R. Lecler, B. Ghysels, C. Remacle, and F. Franck, "Function of the chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase Nda2 for H₂ photoproduction in sulphur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*," *J. Biotechnol.*, vol. 162, no. 1, pp. 81–88, Nov. 2012.
- [29] S. Fouchard *et al.*, "Autotrophic and Mixotrophic Hydrogen Photoproduction in Sulfur-Deprived *Chlamydomonas* Cells," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 10, pp. 6199–6205, Oct. 2005.
- [30] V. Chochois *et al.*, "Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 35, no. 19, pp. 10731–10740, Oct. 2010.
- [31] R. P. Gfeller and M. Gibbs, "Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: II.

- Role of Plastoquinone.,” *Plant Physiol.*, vol. 77, no. 2, pp. 509–511, Feb. 1985.
- [32] R. van Lis, C. Baffert, Y. Coute, W. Nitschke, and A. Atteia, “*Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts Contain a Homodimeric Pyruvate:Ferredoxin Oxidoreductase That Functions with FDX1,” *PLANT Physiol.*, vol. 161, no. 1, pp. 57–71, Jan. 2013.
- [33] F. Mus, A. Dubini, M. Seibert, M. C. Posewitz, and A. R. Grossman, “Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*: anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 35, pp. 25475–86, Aug. 2007.
- [34] J. Noth, D. Krawietz, A. Hemschemeier, and T. Happe, “Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is coupled to light-independent hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*,” *J Biol Chem*, vol. 288, no. 6, pp. 4368–4377, 2013.
- [35] D. B. Stern, G. Witman, and E. H. Harris, “The *Chlamydomonas* sourcebook,” *Elsevier Sci. B.V.*, 2008.
- [36] I. Akkerman, M. Janssen, J. Rocha, and R. H. Wijffels, “Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 27, no. 11–12, pp. 1195–1208, Nov. 2002.
- [37] P. C. Hallenbeck, C. Z. Lazaro, and E. Sagir, “CHAPTER 1. Photosynthesis and Hydrogen from Photosynthetic Microorganisms,” 2018, pp. 1–30.
- [38] A. Kothari, “Improving Cyanobacterial Hydrogen Production through Bioprospecting of Natural Microbial Communities,” 2013.
- [39] S. N. Kosourov, K. A. Batyrova, E. P. Petushkova, A. A. Tsygankov, M. L. Ghirardi, and M. Seibert, “Maximizing the hydrogen photoproduction yields in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures: The effect of the H₂ partial pressure,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 37, no. 10, pp. 8850–8858, May 2012.
- [40] O. Kruse, J. Rupprecht, J. H. Mussnug, G. C. Dismukes, and B. Hankamer, “Photosynthesis: a blueprint for solar energy capture and biohydrogen production technologies,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 4, no. 12, p. 957, Nov. 2005.
- [41] R. E. Blankenship *et al.*, “Comparing Photosynthetic and Photovoltaic Efficiencies and Recognizing the Potential for Improvement,” *Science (80-.)*, vol. 332, no. 6031, pp. 805–809, May 2011.
- [42] A. Dubini and M. L. Ghirardi, “Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen,” *Photosynth. Res.*, vol. 123, no. 3, pp. 241–253, Mar. 2015.
- [43] S. Kosourov, M. Seibert, and M. L. Ghirardi, “Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures.,” *Plant Cell Physiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 146–155, Feb. 2003.
- [44] L. Cournac, G. Latouche, Z. Cerovic, K. Redding, J. Ravenel, and G. Peltier, “In Vivo Interactions between Photosynthesis, Mitorespiration, and Chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii*,” *PLANT Physiol.*, vol. 129, no. 4, pp. 1921–1928, Aug. 2002.
- [45] T. Happe and J. D. Naber, “Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.,” *Eur. J.*

- Biochem.*, vol. 214, no. 2, pp. 475–81, Jun. 1993.
- [46] D. Das and T. N. Veziroglu, “Advances in biological hydrogen production processes,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 21, pp. 6046–6057, Nov. 2008.
- [47] T. K. Antal, “CHAPTER 10. The Metabolic Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to Depletion of Essential Nutrients: Application for Hydrogen Production,” 2018, pp. 235–264.
- [48] D. Gonzalez-Ballester, J. L. Jurado-Oller, and E. Fernandez, “Relevance of nutrient media composition for hydrogen production in *Chlamydomonas*,” *Photosynth. Res.*, vol. 125, no. 3, pp. 395–406, Sep. 2015.
- [49] A. Melis, L. Zhang, M. Forestier, M. L. Ghirardi, and M. Seibert, “Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Plant Physiol.*, vol. 122, no. 1, pp. 127–136, Jan. 2000.
- [50] D. D. Wykoff, J. P. Davies, A. Melis, and A. R. Grossman, “The Regulation of Photosynthetic Electron Transport during Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Plant Physiol.*, vol. 117, no. 1, pp. 129–139, May 1998.
- [51] T. K. Antal, T. E. Krendeleva, and A. B. Rubin, “Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 89, no. 1, pp. 3–15, Jan. 2011.
- [52] S. Kosourov, M. Jokel, E.-M. Aro, and Y. Allahverdiyeva, “A new approach for sustained and efficient H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Energy Environ. Sci.*, vol. 11, no. 6, pp. 1431–1436, Jun. 2018.
- [53] V. Nagy *et al.*, “Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin–Benson–Bassham cycle,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, no. 1, p. 69, Dec. 2018.
- [54] B. Degrenne, J. Pruvost, and J. Legrand, “Effect of prolonged hypoxia in autotrophic conditions in the hydrogen production by the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in photobioreactor,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 2, pp. 1035–1043, Jan. 2011.
- [55] T. Laurinavichene, I. Tolstygina, and A. Tsygankov, “The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*,” *J Biotechnol*, vol. 114, no. 1–2, pp. 143–151, 2004.
- [56] A. Scoma, L. Durante, L. Bertin, and F. Fava, “Acclimation to hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*: Can biophotolysis be the major trigger for long-term H₂ production?,” *New Phytol.*, vol. 204, no. 4, pp. 890–900, Dec. 2014.
- [57] J. L. Jurado-Oller, A. Dubini, A. Galván, E. Fernández, and D. González-Ballester, “Low oxygen levels contribute to improve photohydrogen production in mixotrophic non-stressed *Chlamydomonas* cultures,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 8, no. 1, p. 149, Dec. 2015.
- [58] S. Wu, X. Li, J. Yu, and Q. Wang, “Increased hydrogen production in co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 123, pp. 184–188, Nov. 2012.

- [59] X. Li, S. Huang, J. Yu, Q. Wang, and S. Wu, "Improvement of hydrogen production of *Chlamydomonas reinhardtii* by co-cultivation with isolated bacteria," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 25, pp. 10779–10787, Aug. 2013.
- [60] G. Lakatos *et al.*, "Bacterial symbionts enhance photo-fermentative hydrogen evolution of *Chlamydomonas algae*," *Green Chem.*, vol. 16, no. 11, pp. 4716–4727, Oct. 2014.
- [61] L. Xu, D. Li, Q. Wang, and S. Wu, "Improved hydrogen production and biomass through the co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Bradyrhizobium japonicum*," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 41, no. 22, pp. 9276–9283, Jun. 2016.
- [62] L. Xu, X. Cheng, S. Wu, and Q. Wang, "Co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* with *Azotobacter chroococcum* improved H₂ production," *Biotechnol. Lett.*, vol. 39, no. 5, pp. 731–738, May 2017.
- [63] S. Ban, W. Lin, F. Wu, and J. Luo, "Algal-bacterial cooperation improves algal photolysis-mediated hydrogen production," *Bioresour. Technol.*, vol. 251, pp. 350–357, Mar. 2018.
- [64] R. Wirth *et al.*, "Exploitation of algal-bacterial associations in a two-stage biohydrogen and biogas generation process," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 8, no. 1, p. 59, Dec. 2015.
- [65] G. Lakatos *et al.*, "Factors influencing algal photobiohydrogen production in algal-bacterial co-cultures," *Algal Res.*, vol. 28, pp. 161–171, Dec. 2017.
- [66] A. Melis and M. R. Melnicki, "Integrated biological hydrogen production," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 31, no. 11, pp. 1563–1573, Sep. 2006.
- [67] A. Kouzuma and K. Watanabe, "Exploring the potential of algae/bacteria interactions," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 33, pp. 125–129, Jun. 2015.
- [68] K. Miyamoto, S. Ohta, Y. Nawa, Y. Mori, and Y. Miura, "Hydrogen Production by a Mixed Culture of a Green Alga, *Chlamydomonas reinhardtii* and a Photosynthetic Bacterium, *Rhodospirillum rubrum*," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 51, no. 5, pp. 1319–1324, May 1987.
- [69] J. Edrei, "METHODS OF GENERATING HYDROGEN," Dec. 2012.
- [70] J. He *et al.*, "Enhanced hydrogen production through co-cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 and a facultative autotrophic sulfide-oxidizing bacterium under sulfurated conditions," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 43, no. 32, pp. 15005–15013, Aug. 2018.
- [71] N. Mrkovacki, "Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application | Request PDF," *Ann. Microbiol*, vol. 51, no. 2, pp. 145-158, Jan. 2001
- [72] S. G. Ball, L. Dirick, A. Decq, J.-C. Martiat, and R. Matagne, "Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*," *Plant Sci.*, vol. 66, no. 1, pp. 1–9, Jan. 1990.
- [73] M.-S. Kim, J.-S. Baek, Y.-S. Yun, S. Jun Sim, S. Park, and S.-C. Kim, "Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 31, no. 6, pp. 812–816, May 2006.

- [74] A. Ike, N. Toda, N. Tsuji, K. Hirata, and K. Miyamoto, "Hydrogen photoproduction from CO₂-fixing microalgal biomass: Application of halotolerant photosynthetic bacteria," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 84, no. 6, pp. 606–609, Jan. 1997.
- [75] H. Kawaguchi, K. Hashimoto, K. Hirata, and K. Miyamoto, "H₂ production from algal biomass by a mixed culture of *Rhodobium marinum* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 91, no. 3, pp. 277–282, 2001.
- [76] A. Ike, T. Murakawa, H. Kawaguchi, K. Hirata, and K. Miyamoto, "Photoproduction of hydrogen from raw starch using a halophilic bacterial community," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 88, no. 1, pp. 72–7, 1999.
- [77] Y. Miura, S. Ohta, M. Mano, and K. Miyamoto, "Isolation and Characterization of a Unicellular Marine Green Alga Exhibiting High Activity in Dark Hydrogen Production," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 50, no. 11, pp. 2837–2844, Nov. 1986.
- [78] R. P. Gfeller and M. Gibbs, "Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: I. Analysis of Fermentative Products from Starch in Dark and Light," *Plant Physiol.*, vol. 75, no. 1, pp. 212–8, May 1984.
- [79] Y. Miura, C. Saitoh, S. Matsuoka, and K. Miyamoto, "Stably Sustained Hydrogen Production with High Molar Yield through a Combination of a Marine Green Alga and a Photosynthetic Bacterium," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 56, no. 5, pp. 751–754, Jan. 1992.
- [80] A. Dubini and D. Gonzalez-Ballester, "Biohydrogen from Microalgae," 2016, pp. 165–193.
- [81] R. Loppes, M. Radoux, M. C. Ohresser, and R. F. Matagne, "Transcriptional regulation of the *Nia1* gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the *Nia1* promoter," *Plant Mol. Biol.*, vol. 41, no. 5, pp. 701–11, Nov. 1999.
- [82] T. Maier, U. Binder, and A. Bock, "Analysis of the *hydA* locus of *Escherichia coli*: Two genes *hydN* and *hypF* involved in formate and hydrogen metabolism," *Arch. Microbiol.*, vol. 165, no. 5, pp. 333–341, May. 1996.
- [83] E. H. Harris, "*Chlamydomonas* as a model organism," *Mol. Biol.*, vol. 52, no. 1, pp. 363–406, 2001.
- [84] J. F. G. M. Winternans and A. De Mots, "Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol," *Biochim. Biophys. Acta - Biophys. Incl. Photosynth.*, vol. 109, no. 2, pp. 448–453, Nov. 1965.
- [85] A. Varma and B. O. Palsson, "Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use," *Bio/Technology*, vol. 12, no. 10, pp. 994–998, Oct. 1994.
- [86] N. D. Price, J. A. Papin, C. H. Schilling, and B. O. Palsson, "Genome-scale microbial in silico models: the constraints-based approach," *Trends Biotechnol.*, vol. 21, no. 4, pp. 162–169, Apr. 2003.
- [87] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, "What is flux balance analysis?," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 3, pp. 245–248, Mar. 2010.
- [88] R. Mahadevan and C. H. Schilling, "The effects of alternate optimal solutions in

- constraint-based genome-scale metabolic models,” *Metab. Eng.*, vol. 5, no. 4, pp. 264–276, Oct. 2003.
- [89] S. Imam *et al.*, “A refined genome-scale reconstruction of *Chlamydomonas* metabolism provides a platform for systems-level analyses,” *Plant J.*, vol. 84, no. 6, pp. 1239–1256, Dec. 2015.
- [90] Q. Yuan *et al.*, “Pathway-Consensus Approach to Metabolic Network Reconstruction for *Pseudomonas putida* KT2440 by Systematic Comparison of Published Models,” *PLoS One*, vol. 12, no. 1, p. e0169437, Jan. 2017.
- [91] B.-H. Kim, R. Ramanan, D.-H. Cho, H.-M. Oh, and H.-S. Kim, “Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 69, pp. 95–105, Oct. 2014.
- [92] E. H. Harris, *The Chlamydomonas Sourcebook: a Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. Elsevier Science, 1989.
- [93] D. González-Ballester, J. L. Jurado-Oller, A. Galván, E. Fernández, and A. Dubini, “H₂ production pathways in nutrient-replete mixotrophic *Chlamydomonas* cultures under low light. Response to the commentary article ‘on the pathways feeding the H₂ production process in nutrient-replete, hypoxic conditions,’ by Alberto Scoma and Szilvia Z. Tó,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 10, no. 1, p. 117, 2017.
- [94] E. S. Bamberger, D. King, D. L. Erbes, and M. Gibbs, “H₂ and CO₂ Evolution by Anaerobically Adapted *Chlamydomonas reinhardtii* F-60,” *Plant Physiol.*, vol. 69, no. 6, pp. 1268–1273, Jun. 1982.
- [95] M. Gibbs, R. P. Gfeller, and C. Chen, “Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: III. Photoassimilation of Acetate,” *Plant Physiol.*, vol. 82, no. 1, pp. 160–6, Sep. 1986.
- [96] K. O. Willeford, Z. Gombos, and M. Gibbs, “Evidence for Chloroplastic Succinate Dehydrogenase Participating in the Chloroplastic Respiratory and Photosynthetic Electron Transport Chains of *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Plant Physiol.*, vol. 90, no. 3, pp. 1084–7, 1989.
- [97] K. O. Willeford and M. Gibbs, “Localization of the Enzymes Involved in the Photoevolution of H₂ from Acetate in *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Plant Physiol.*, vol. 90, no. 3, pp. 788–791, 1989.
- [98] M. Yoshikawa, N. Hirai, K. Wakabayashi, H. Sugizaki, and H. Iwamura, “Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizospheric *Pseudomonas putida*,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 39, no. 12, pp. 1150-1154, Dec. 1993.
- [99] J.-H. Hwang, A. N. Kabra, J. R. Kim, and B.-H. Jeon, “Photoheterotrophic microalgal hydrogen production using acetate- and butyrate-rich wastewater effluent,” *Energy*, vol. 78, pp. 887–894, Dec. 2014.
- [100] R. Chandra and S. Venkata Mohan, “Microalgal community and their growth conditions influence biohydrogen production during integration of dark-fermentation and photo-fermentation processes,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 36, no. 19, pp. 12211–12219, Sep. 2011.
- [101] H. Kawaguchi, K. Hashimoto, K. Hirata, and K. Miyamoto, “H₂ production from algal

- biomass by a mixed culture of *Rhodobium marinum* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 91, no. 3, pp. 277–82, 2001.
- [102] T. Müller, B. Walter, A. Wirtz, and A. Burkovski, “Ammonium Toxicity in Bacteria,” *Curr. Microbiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 400–406, May 2006.
- [103] V. Calatrava, E. F. Y. Hom, Á. Llamas, E. Fernández, and A. Galván, “OK, thanks! A new mutualism between *Chlamydomonas* and *methylobacteria* facilitates growth on amino acids and peptides,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 365, no. 7, Apr. 2018.
- [104] S. L. Vogel, H. L. Frisch, and I. J. Gotham, “Qualitative assay of dissolved amino acids and sugars excreted by *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyceae) and *Euglena gracilis* (Euglenophyceae),” *J. Phycol.*, vol. 14, no. 4, pp. 403–406, Dec. 1978.
- [105] P. N. Green, “*Methylobacterium*,” in *The Prokaryotes*, New York, NY: Springer New York, 2006, pp. 257–265.
- [106] K. Faust and J. Raes, “Microbial interactions: from networks to models,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 8, pp. 538–550, Aug. 2012.
- [107] R. A. Khandelwal, B. G. Olivier, W. F. M. Röling, B. Teusink, and F. J. Bruggeman, “Community Flux Balance Analysis for Microbial Consortia at Balanced Growth,” *PLoS One*, vol. 8, no. 5, p. e64567, May 2013.
- [108] S. Koch, D. Benndorf, K. Fronk, U. Reichl, and S. Klamt, “Predicting compositions of microbial communities from stoichiometric models with applications for the biogas process,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 9, no. 1, p. 17, Dec. 2016.
- [109] N. Fakhimi *et al.*, “Acetic acid uptake rate controls H₂ production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures,” *Algal Res.*, vol. 42, p. 101605, Sep. 2019.
- [110] H. Lee, W. F. J. Vermaas, and B. E. Rittmann, “Biological hydrogen production : prospects and challenges,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 5, pp. 262–271, 2010.
- [111] Y. K. Oh, S. M. Raj, G. Y. Jung, and S. Park, “Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 18, pp. 8357–8367, 2011.
- [112] J. Mathews and G. Wang, “Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 34, no. 17, pp. 7404–7416, Sep. 2009.
- [113] C. Ding, K. L. Yang, and J. He, *Biological and fermentative production of hydrogen*. 2016.
- [114] A. J. Stephen, S. A. Archer, R. L. Orozco, and L. E. Macaskie, “Advances and bottlenecks in microbial hydrogen production,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 10, no. 5, pp. 1120–1127, 2017.
- [115] D. Gonzalez-Ballester, J. L. Jurado-Oller, and E. Fernandez, “Relevance of nutrient media composition for hydrogen production in *Chlamydomonas*,” *Photosynth. Res.*, vol. 125, no. 3, pp. 395–406, Sep. 2015.
- [116] D. Tolleter *et al.*, “Control of Hydrogen Photoproduction by the Proton Gradient Generated by Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Plant Cell*, vol. 23, no. 7, pp. 2619–2630, Jul. 2011.

- [117] M. Oey *et al.*, “RNAi Knock-Down of LHCBM1, 2 and 3 Increases Photosynthetic H₂ Production Efficiency of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e61375, Apr. 2013.
- [118] A. Volgusheva, G. Kukarskikh, T. Krendeleva, A. Rubin, and F. Mamedov, “Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under magnesium deprivation,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 8, pp. 5633–5637, Dec. 2015.
- [119] M. E. Hong, Y. S. Shin, B. W. Kim, and S. J. Sim, “Autotrophic hydrogen photoproduction by operation of carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii* under sulfur deprivation condition,” *J. Biotechnol.*, vol. 221, pp. 55–61, Mar. 2016.
- [120] L. Wei, X. Li, B. Fan, Z. Ran, and W. Ma, “A Stepwise NaHSO₃ Addition Mode Greatly Improves H₂ Photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Front. Plant Sci.*, vol. 9, p. 1532, Oct. 2018.
- [121] L. Wei *et al.*, “Light Intensity is Important for Hydrogen Production in NaHSO₃ -Treated *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Plant Cell Physiol.*, vol. 58, no. 3, p. pcw216, Jan. 2017.
- [122] S. Wu, R. Huang, L. Xu, G. Yan, and Q. Wang, “Improved hydrogen production with expression of hemH and lba genes in chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*,” *J. Biotechnol.*, vol. 146, no. 3, pp. 120–125, Apr. 2010.
- [123] T. S. Pinto, F. X. Malcata, J. D. Arrabaça, J. M. Silva, R. J. Spreitzer, and M. G. Esquivel, “Rubisco mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* enhance photosynthetic hydrogen production,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 12, pp. 5635–5643, Jun. 2013.
- [124] H. Li *et al.*, “Improved photobio-H₂ production regulated by artificial miRNA targeting psbA in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, p. 36, 2018.
- [125] F.-Q. Xu, W.-M. Ma, and X.-G. Zhu, “Introducing pyruvate oxidase into the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* increases oxygen consumption and promotes hydrogen production,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 36, no. 17, pp. 10648–10654, Aug. 2011.
- [126] D. W. Mulder *et al.*, “Insights into [FeFe]-Hydrogenase Structure, Mechanism, and Maturation,” *Structure*, vol. 19, no. 8, pp. 1038–1052, Aug. 2011.
- [127] S. T. Stripp *et al.*, “How oxygen attacks [FeFe] hydrogenases from photosynthetic organisms,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 41, pp. 17331–6, Oct. 2009.
- [128] K. Pandey, S. T. A. Islam, T. Happe, and F. A. Armstrong, “Frequency and potential dependence of reversible electrocatalytic hydrogen interconversion by [FeFe]-hydrogenases,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 15, pp. 3843–3848, Mar. 2017.
- [129] M. Bortolus, P. Costantini, D. Doni, and D. Carbonera, “Overview of the Maturation Machinery of the H-Cluster of [FeFe]-Hydrogenases with a Focus on HydF,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 10, Oct. 2018.
- [130] Y.-L. Li *et al.*, “Investigations on the synthesis, structural characterization and electrochemical properties of diiron azadithiolate complexes and phosphine-substituted derivatives,” *Polyhedron*, vol. 135, pp. 231–236, Oct. 2017.
- [131] D. Das, N. Khanna, and N. Veziroğlu, “Recent developments in biological hydrogen

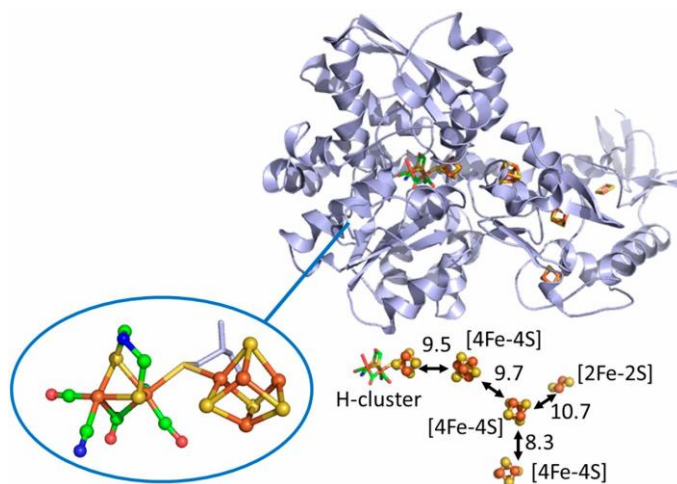
production processes,” *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, vol. 14, no. 2, pp. 57–67, 2008.

فصل هفتم:

پیوست ها

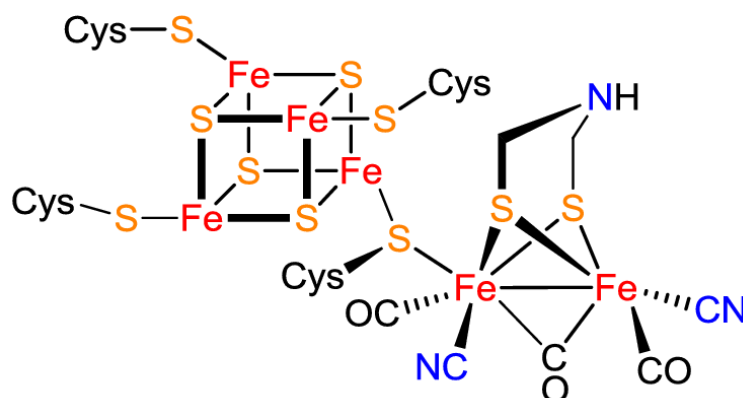
۱-۷. آنزیم هیدروژناز

هیدروژنازها، آنزیم‌های فلزی هستند که در متابولیسم انرژی بسیاری از جوامع میکروبی نقش کلیدی دارند. این آنزیم‌ها بسته به بخش فلزی که دارند به $[\text{Fe}]$ ، $[\text{FeFe}]$ و $[\text{NiFe}]$ -هیدروژناز تقسیم می‌شوند [۱۲۶]. ریزجلبک‌های سبز مانند کلامیدوموناس رینهاردتی $[\text{FeFe}]$ -هیدروژناز تولید می‌کنند. $[\text{FeFe}]$ -هیدروژنازها فعالیت بالایی در تولید هیدروژن دارند. حساسیت شدید این آنزیم‌ها به اکسیژن بزرگترین چالش تولید پایدار هیدروژن در کلامیدوموناس رینهاردتی است [۱۲۷]. همانطور که در شکل پ ۱-۷ نشان داده شده است، آنزیم $[\text{FeFe}]$ -هیدروژناز دارای یک سایت فعال به نام H-cluster است.



شکل پ ۱-۷. آنزیم هیدروژناز و سایت فعال H-cluster [۱۲۸].

سایت فعال این آنزیم از دو بخش Cubane sub-cluster و [2Fe] sub-cluster تشکیل می‌شود (شکل پ ۷-۲). این بخش‌ها در مسیرهای متابولیکی متفاوت سنتز می‌شوند [۱۲۹]. طیف‌سنجی جذب اشعه‌ی ایکس^۱ نشان داده است که واکنش با اکسیژن حوزه‌ی [4Fe-4S] در بخش Cubane sub-cluster را تخریب می‌کند. در حالی که حوزه‌ی [2Fe] sub-cluster اساساً دست نخورده باقی می‌ماند [۱۲۷].



شکل پ ۷-۲. ساختار سایت فعال H-cluster [۱۳۰].

۲-۷. تولید نیمه صنعتی هیدروژن توسط باکتری‌های بی‌هوازی

از میان روش‌های تولید زیستی هیدروژن، تولید هیدروژن توسط باکتری‌های بی‌هوازی به تولید صنعتی نزدیک‌تر است و تحقیقاتی تولید هیدروژن در این سیستم‌ها را در مقیاس بالا بررسی کرده‌اند. برای مثال در موسسه‌ی تحقیقاتی Indian Institute of Technology Kharangpur تولید هیدروژن توسط سلول‌های تثبیت شده‌ی *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 با مصرف ملاس نیشکر به عنوان سوبسترا در مقیاس نیمه صنعتی بررسی شده است (شکل پ ۷-۳) [۱۳۱].

¹ X-ray absorption spectroscopy



شکل پ ۳-۷. تصویر تولید نیمه صنعتی تخمیر هیدروژن در غیاب نور [۱۳۱].

فهرست مقالات منتشر شده

مقالات مستخرج از این رساله که در مجلات علمی به چاپ رسیده و یا در کنفرانس‌های معتبر بین‌المللی و ملی ارائه شده‌اند به شرح ذیل می‌باشند:

Journals:

- [1] N. Fakhimi, O. Tavakoli, S. A. Marashi, H. Moghimi, M. R. Mehrnia, A. Dubini, D. Gonzalez-Ballester. Acetic acid uptake rate controls H₂ production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures. *Algal Research*, 42, 101605, 2019.
- [2] N. Fakhimi, A. Dubini, O. Tavakoli, D. Gonzalez-Ballester. Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures. *Bioresource Technology*, 121648, 2019.
- [3] N. Fakhimi, O. Tavakoli. Improving hydrogen production using co-cultivation of bacteria with *Chlamydomonas reinhardtii* microalga. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(1), 1-7, 2019.

National and International Conferences:

- [1] N. Fakhimi, A. Dubini, O. Tavakoli, D. Gonzalez-Ballester. Acetic acid produced by bacteria drives hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. IWAAlgae2019, 1-2 July 2019, Valladolid, **Spain**.
- [2] N. Fakhimi, A. Dubini, O. Tavakoli, D. Gonzalez-Ballester. H₂ evolution in co-cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*-bacteria. VII congreso científico de investigadores en formación de la Universidad de Córdoba, 6-7 February 2019, Córdoba, **Spain**.
- [3] N. Fakhimi, O. Tavakoli, G. Alavi, A. Foruzandeh Far, D. Gonzalez-Ballester. Initial inoculum of bacteria can affect the growth of *Chlamydomonas reinhardtii* and hydrogen production in co-culture of algae-bacteria. 10th International Chemical Engineering Congress and Exhibition, 6-10 May 2018, Isfahan, **Iran**.
- [4] N. Fakhimi, O. Tavakoli, D. Gonzalez-Ballester. Hydrogen Production in Illuminated Co-cultures of Algae and Bacteria Using Nutrient Replete Medium. Algaeurope 2017, 5-7 December 2017, Berlin, **Germany**.

- [5] N. Fakhimi, O. Tavakoli, S. A. Marashi, D. Gonzalez-Ballester. Effect of Coculturing Ecoli with *Chlamydomonas reinhardtii* on Biohydrogen Production. 2nd International and 10th National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran, 29-31 August 2017, Karaj, **Iran**.
- [6] N. Fakhimi, O. Tavakoli, S. A. Marashi, D. Gonzalez-Ballester. Coculturing Rhizobium with *Chlamydomonas reinhardtii* improves biohydrogen production. 4th Hydrogen and Fuel Cell Conference, 2017, Tehran, **Iran**.

