PROPOSTA DI UN FOTO-BIOREATTORE PER LA PRODUZIONE DI IDROGENO

Antonella Mencacci[1], Ines Montecarlo[1], Elio Cenci[1], Naida Corsi [2], Michele Urbani [3], Francesco Bistoni[1]

[1]Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche,
Università degli Studi di Perugia, Via del Giochetto, 06122 Perugia
[2] IPASS-Consorzio Ingegneria Per l'Ambiente e lo Sviluppo Sostenibile, Via G. Guerra 23 – 06127 Perugia
[3]Università degli Studi di Perugia, via G. Duranti, 67 - 06125 Perugia

SOMMARIO

I processi di produzione fotobiologici riguardano la generazione dell'idrogeno da sistemi biologici che usano generalmente la luce solare. Alcune alghe e batteri sono in grado di produrre idrogeno in specifiche condizioni. I pigmenti delle alghe assorbono l'energia solare e gli enzimi cellulari agiscono da catalizzatori per scindere l'acqua in idrogeno e ossigeno.
Esistono numerose attività di ricerca che studiano i meccanismi alla base della produzione di idrogeno da parte di sistemi biologici. Gli studi indicano per questi processi un livello di efficienza di conversione in energia (rapporto tra l'ammontare di energia prodotta dall'idrogeno e l'entità della luce solare impiegata) non adeguato per una produzione di idrogeno su larga scala. La sperimentazione avviata si propone di studiare le condizioni ottimali di coltura di microrganismi produttori di idrogeno quali alghe blu-verdi (*Clamydomonas reinhardtii*) e cianobatteri (*Anabaena variabilis e Nostoc punctiforme*) al fine di progettare un foto-bio-reattore ad elevata efficienza per la produzione di idrogeno.

INTRODUZIONE

L'utilizzo indiscriminato di fonti non rinnovabili, e perciò esauribili, pone sia il problema di garantire la sicurezza dell'approvvigionamento di energia che quello di arginare l'impatto ambientale che tale uso comporta.

Ciò giustifica il bisogno di ricorrere a fonti di energia rinnovabili ovvero forme di energia che si rigenerano rapidamente mediante processi naturali. L'idrogeno costituisce una delle possibili alternative ai combustibili fossili in quanto è una fonte energetica pulita e può essere prodotto da fonti rinnovabili. L'affermarsi di questa tecnologia, se si tengono ben presenti i suoi limiti intrinseci, è sicuramente una delle più affascinanti e stimolanti prospettive nell'ottica di uno sviluppo della nostra società veramente sostenibile sia dal punto di vista ambientale che sociale.

Lo sviluppo di un'economia fondata sull'idrogeno richiede quindi l'implementazione di metodi di produzione economicamente e tecnicamente competitivi. La produzione di idrogeno a partire da molecole inorganiche da parte di microrganismi rappresenta una attraente e ambiziosa possibilità. Allo stato attuale delle conoscenze, gli studi indicano per tale processo un livello di efficienza di conversione energetica (rapporto tra energia prodotta dall'idrogeno ottenuto e energia solare impiegata) compreso tra il 5 e il 10%. Nonostante il rendimento energetico sia troppo basso per un'applicazione su larga scala in termini economicamente vantaggiosi, tale tecnologia rappresenta un'interessante alternativa ai sistemi di conversione che impiegano fonti energetiche tradizionali, anche in considerazione dei notevoli margini di miglioramento offerti dai sistemi biologici.

Il lavoro sperimentale descritto nel presente articolo ha lo scopo di individuare le condizioni ottimali per la produzione di idrogeno da parte di alghe blu-verdi (*Clamydomonas reinhardtii*) e cianobatteri (*Anabaena variabilis* e *Nostoc punctiforme*) al fine di progettare un fotobioreattore ad elevata efficienza per la produzione biologica d'idrogeno.

I MICRORGANISMI PRODUTTORI DI IDROGENO

La scoperta della produzione di idrogeno da parte di microrganismi risale al 1939 quando Hans Gaffron osservò che particolari alghe verdi unicellulari erano in grado di produrre idrogeno in presenza di luce [1]. Successivamente tale proprietà fu dimostrata anche per i cianobatteri. Questi microrganismi (batteri blu-verdi, alghe azzurre o blu-verdi, *Cyanophyceae, Cyanophytes*), provvisti di clorofilla e di ficocianina, costituiscono un gruppo di procarioti fotoautotrofi ben definito. La loro parete cellulare è simile a quella dei batteri e come questi si riproducono per scissione binaria. Sono ubiquitari, essendo presenti nelle regioni artiche, negli oceani, nei laghi, nelle acque termali e talvolta anche in ambienti terrestri umidi. Alcune specie costituiscono la componente algale di licheni. Le cellule si presentano isolate o in forma filamentosa, caratterizzata a volte dalla presenza di eterocisti. Queste sono cellule specializzate più grandi e con parete più spessa, che compaiono ad intervalli irregolari lungo i filamenti. I cianobatteri comprendono circa 40 specie. I generi principali sono *Nostoc, Rivularia, Anabaena*.

Da un punto di vista metabolico, tutti sono in grado di effettuare la fotosintesi ossigenica, analoga a quella operata dagli organismi eucarioti (piante superiori e alghe unicellulari) secondo la reazione: $CO_2 + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + O_2$. Viceversa, solo alcuni (azoto-fissatori) trasformano l'azoto atmosferico in ammoniaca, rendendolo così disponibile per ulteriori reazioni biochimiche. Tale caratteristica metabolica è appannaggio

esclusivo delle cellule procariotiche.

La fotosintesi ossigenica è una reazione che avviene in due fasi: conversione dell'energia luminosa in energia biochimica mediante una reazione fotochimica e riduzione di CO_2 atmosferica a composti organici mediante reazioni enzimatiche che utilizzano l'energia biochimica prodotta nella prima fase. In alcune alghe e cianobatteri e in specifiche condizioni quest'ultima reazione può non avvenire ed essere sostituita dalla produzione di idrogeno molecolare. Le reazioni biochimiche coinvolte in tale processo sono catalizzate da enzimi quali idrogenasi e nitrogenasi.

Produzione di idrogeno – idrogenasi dipendente

La reazione catalizzata dall'enzima idrogenasi avviene secondo la seguente formula:

$2H + 2X$ ridotto $\rightarrow 6H_2 + 2X$ ossidato

dove X è una molecola trasportatrice di elettroni, la ferredoxina [2].

Tale reazione è estremamente ossigeno-labile e cessa in pochi minuti a causa dell'ossigeno prodotto dalla fotosintesi stessa. Studi più recenti hanno dimostrato che la fase di incubazione anaerobica è indispensabile per l'induzione dell'enzima idrogenasi. Tale enzima poi catalizza la reazione per la produzione di idrogeno luce-dipendente [3]. L'attività dell'enzima idrogenasi è estremamente ossigeno-labile e cessa in pochi minuti a causa dell'ossigeno prodotto dalla fotosintesi stessa. Diversi tipi di idrogenasi coinvolte nei processi metabolici di produzione di idrogeno sono stati descritti anche in diverse specie di cianobatteri.

Produzione di idrogeno – nitogenasi-dipendente

Le nitrogenasi sono enzimi unicamente espressi nelle cellule procariotiche e catalizzano le reazioni coinvolte nel processo di fissazione dell'azoto, cioè la trasformazione dell'azoto inorganico in composti organici. Definita anche riduzione assimilativa dell'azoto gassoso, la fissazione dell'azoto è una idrogenazione essenziale per la biosfera così come la fotosintesi: la fissazione del carbonio (fotosintesi) è solo una delle tre tappe critiche nella sintesi globale delle proteine; le altre due sono la riduzione dell'azoto e quella dello zolfo. Solo la riduzione del carbonio richiede la presenza di piante verdi e luce solare; le altre due si svolgono solitamente in condizioni anaerobiche, in ambienti come terreno e fanghi privi di ossigeno e sono attività limitate ai batteri azoto-fissatori. L'azotofissazione nei cianobatteri può avvenire sia in condizioni anaerobiche (in alcuni ceppi unicellulari e in molti ceppi filamentosi come Oscillatoria) sia in condizioni aerobiche (in pochi ceppi filamentosi con eterocisti come per *Anabaena* e *Nostoc*). La produzione di idrogeno catalizzata dalle nitrogenasi si realizza come reazione accessoria nel processo della fissazione dell'azoto. Come le idrogenasi, anche le nitrogenasi sono estremamente ossigeno-labili, tuttavia, i cianobatteri hanno sviluppato meccanismi per proteggerle dall'ossigeno gassoso, a livello delle eterocisti.

MODELLI SPERIMENTALI PER LA PRODUZIONE DI IDROGENO MEDIANTE PROCESSI FOTOBIOLOGICI: STATO DELL'ARTE

La sperimentazione relativa alla produzione di idrogeno mediante sistemi fotobiologici può essere ricondotta, allo stato attuale delle conoscenze, a diversi modelli sperimentali:

1) Fotosintesi a due stadi mediante l'uso di *Clamydomonas reinhardtii*.

Modello di produzione a 2 stadi che ovvia al problema della sensibilità all'ossigeno della idrogenasi. Nello stadio 1 avviene la produzione di ossigeno e l'accumulo di composti carboniosi, nel secondo stadio avviene il metabolismo dei composti organici e la produzione di idrogeno. La transizione dallo stadio 1 allo stadio 2 viene effettuata mediante deprivazione dello zolfo dalla coltura, che inattiva in modo reversibile gli enzimi responsabili della produzione di ossigeno (PSII) e comporta l'instaurarsi di una condizione di anaerobiosi con attivazione delle idrogenasi e produzione di idrogeno. Una buona produzione di idrogeno era osservata in presenza di luce e non al buio. Il meccanismo di produzione presuppone il consumo di proteine e il trasporto degli elettroni dal substrato endogeno al citocromo h6→f e ai complessi PSI nei cloroplasti. L'assorbimento della luce da parte del complesso PSI era richiesto per la produzione di idrogeno. Ciò suggerisce che la foto-riduzione della ferredoxina è seguita dalla donazione di elettroni alla idrogenasi. Quest'ultima catalizza la riduzione dei protoni ad idrogeno molecolare nello stroma del cloroplasto [4].

2) Modello di produzione di idrogeno in tre stadi, mediante l'uso di *Chlamydomonas segnis*, *Lactobacillus amylophilus* e batteri rossi (ceppo selvaggio non classificato).

La successione delle reazioni chiave sarebbe la seguente:
fase 1= produzione di carboidrati da parte di *Chlamydomonas*;
fase 2= produzione di acido lattico da parte di *Lactobacillus*;
fase 3= produzione di idrogeno da parte dei batteri rossi.

3) Produzione di idrogeno mediante modificazione del sistema nitrogenasi in *Nostoc*.

Nostoc punctiforme ATCC 29133 è un cianobattero, fissatore di azoto, produttore di eterocisti. Durante i processi di fissazione dell'azoto questo batterio produce idrogeno molecolare, che ricattura grazie ad una idrogenasi di cattura. La quantità di idrogeno prodotto per molecola di azoto fissata varia al variare della illuminazione, aumentando proporzionalmente con l'intensità luminosa. La produzione di idrogeno da parte di un ceppo mutante idrogenasi-deficiente era aumentata rispetto a quella del ceppo selvaggio. Il lavoro pone le basi razionali per l'uso di batteri per la produzione di idrogeno da parte di nitrogenasi la cui attività è diretta alla produzione di idrogeno stesso piuttosto che alla fissazione dell'azoto.

Gli autori suggeriscono che per ottenere una buona produzione di idrogeno da parte di *Nostoc puntiforme NHM5* la crescita deve essere limitata dalla bassa disponibilità di anidride carbonica e la luce deve essere intensa [5].

4) Modello di produzione di idrogeno basato sull'impiego un ceppo mutante di *Anabaena variabilis*

Modello di produzione di idrogeno basato sull'impiego un ceppo mutante di *Anabaena variabilis* privo di idrogenasi in un fotobioreattore tubulare outdoor.

La produzione di idrogeno durerebbe fino a 40 giorni, senza ripristino di nuovi batteri o medium [6].

MATERIALI E METODI

La sperimentazione svolta si articola in diverse fasi: 1) allestimento di colture di diverse specie di cianobatteri (*Nostoc, Anabaena)* e/o alghe (C*hlamydomonas*) in differenti condizioni di incubazione (aerobiosi/anaerobiosi, colture bi-fasiche, presenza/assenza di luce); 2) studio della curva di

crescita dei microrganismi impiegati e standardizzazione delle condizioni di coltura per evidenziare la fase caratterizzata da una maggiore resa, al fine di mantenere i microrganismi in tale fase mediante l'uso di apparecchiature ad hoc (chemostati);3) valutazione e misura attraverso analisi gascromatografiche dell'idrogeno prodotto nelle diverse fasi di crescita; 4) identificazione delle condizioni ottimali per la produzione di idrogeno (tipo di microrganismo, terreno di coltura, condizioni e tempi di incubazione); 5) studio dei fattori che modulano tale produzione (pH, temperatura, esposizione alla luce etc).

Allestimento delle colture

Sono state allestite colture di *Chlamydomonas*. Tali alghe si ritrovano in ogni parte del mondo, nel suolo, nei corsi d'acqua, negli oceani, e perfino nei ghiacciai. Sono provviste di una parete cellulare, di un cloroplasto (corpuscoscolo intracellulare sensibile alla luce solare) e due flagelli anteriori responsabili del movimento di tale microrganismo in mezzi liquidi. Si conoscono più di 500 specie di *Chlamydomonas*, ma la ricerca scientifica è limitata a poche di esse e in particolare a *C. reinhardtii* (figura 1).

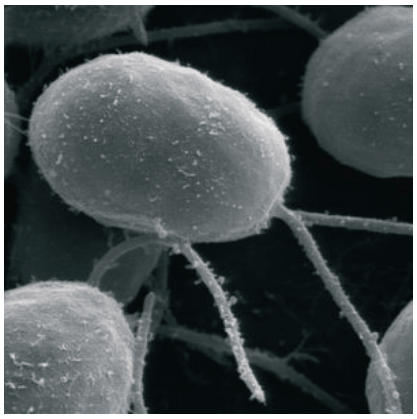


Figura 1. Fotografia al microscopio elettronico di *C. reinhardtii* (ingrandimento 10000 X)

In semplici terreni di coltura costituiti solo di acqua e sali minerali (terreni minimi) *C. reinhardtii* cresce in forma aploide con un metabolismo energetico fotosintetico. Tuttavia, in un terreno provvisto di acetato tale microrganismo può crescere anche in assenza di luce. In assenza di azoto, le cellule apolidi di segno opposto possono fondersi in zigospore diploidi che, grazie a una spessa parete cellulare esterna, possono resistere in condizioni ambientali sfavorevoli. Quando siano ripristinati l'azoto o migliorino le condizioni ambientali un nuovo ciclo vegetativo inizia con la divisione meiotica delle cellule diploidi con formazione di quattro cellule apolidi.

Al fine di individuare le condizioni ottimali di coltura il ceppo CC-1690 wild type mt+ di *C. reinhardtii* (Chlamy Center, Duke University, USA) è stato coltivato in diversi terreni, liquidi ed agarizzati. In particolare sono stati utilizzati terreni non selettivi comunemente impiegati per la coltura di cellule eucariotiche e procariotiche e terreni minimi specifici per *Chlamydomonas*. Il ceppo è stato coltivato in aerobiosi ed anaerobiosi, a differenti temperature di incubazione. La tabella 1 riassume i risultai ottenuti, evidenziando che:

- *C. reinhardtii* è in grado di sopravvivere e moltiplicarsi in differenti mezzi;

- il terreno minimo BG11 e il Tris Acetate Phosphate Medium (TAP) garantiscono entrambi una crescita ottimale al fine dello studio della curva di crescita del microrganismo;

- l'incubazione a 25°C, in aerobiosi in presenza di luce solare correla con il tasso di replicazione più elevato

Tabella 1. Replicazione di cellule aploidi di *C. reinhardtii* in differenti terreni e condizioni di incubazione.

	TASSO DI REPLICAZIONE			
TERRENO	25 °C	37 °C	Luce	Buio
DMEM (GIBCO)	Buono	Scarso	Buona	Nullo
Muller Hinton Broth (Necton Dickinson)	Molto buono	Scarso	Molto buono	Nullo
Thioglycollate (Becton Dickinson)	Nullo	Nullo	Nullo	Nullo
BG11[a]	Ottimo	Scarso	Ottimo	Nullo
TAP	Ottimo	Scarso	Ottimo	Nullo
Muller Hinton Agar (Biolife)	Buono	Scarso	Buono	Nullo
Enterococcosel Agar (Necton Dickinson)	Scarso	Scarso	Scarso	Nullo
[a] il terreno di coltura BG11 è stato preparato secondo Nerad [7]				

Dati preliminari della coltura in anaerobiosi indicherebbero che tale condizione potrebbe essere ottimale per la coltivazione finalizzata alla produzione di idrogeno, in presenza/assenza di specifici substrati.

La sperimentazione è proseguita mediante la coltivazione di *C. reinhardtii* in Tris- Acetate – Phosphate (TAP) Medium la cui composizione è riportanta nella tabella 2.

Tabella 2. Composizione per litro di terreno TAP utilizzato per le colture di *C. reinhardtii*

2X Filner's Beijernicks Solution 25 ml	
NH_4Cl	8 gr
$CaCl_2 * 2 H_2O$	1 gr
$MgSO_4 * 7 H_2O$	2 gr
1M Potassium Phosphate Stock (pH 7.2 a RT) 1 ml	
20 ml 1M stock KH_2PO_4 (1M stock: 6.8g/50ml)	
30 ml 1M stock K_2HPO_4 (1M stock: 8.7g/50ml)	
Trace Mineral Solution 5 ml	
EDTA di sodio 5 gr in 400 ml di H_2O e neutralizzato a pH 6,5 con 5N di NaOH	
$FeSO_4 * 7 H_2O$	0,5 gr
$ZnSO_4 * 7 H_2O$	2,2 gr
H_3BO_3	1,14 gr
$MnCl_2 * 4 H_2O$	0,51 gr
$CuSO_4 * 5 H_2O$	0,016 gr
$Na_2MoO_4 * 2 H_2O$	0,073 gr
$CoCl_2 * 6 H_2O$	0,016 gr
Tris Base 2,42 gr	
Glacial Acetic Acid (17.4 mM acetate) 1 ml per un pH finale di 7,2	

La coltivazione di *C. reinhardtii* è stata effettuata in sacche in tedlar da 1 litro (figura 2). Una volta stabilita la sterilità

delle sacche, sospensioni di *C. reinhardtii* in terreno TAP (6 x 106/ml) sono inoculate nelle sacche suddette attraverso il setto mediante una siringa provvista di ago, mantenute a 25°C ed esposte alla luce solare senza ausilio di dispositivi (termostati o lampade) e quindi senza consumo di energia elettrica.



Figura 2. Sacche in tedlar dotate di valvola ON/OFF con foro centrale e setto forabile in teflon e di un connettore

Per i ceppi di *Nostoc sp*. è stato utilizzazto l'ATCC Medium (#819: Blue-Green Nitrogen-fixing Medium), la cui composizione è riportanta nella tabella 3.

Tabella 3. Composizione per litro di terreno ATCC utilizzato per le colture di *Nostoc sp.*

K_2HPO_4	0,04 gr
$MgSO_4$ * 7 H_2O	0,075 gr
$CaCl_2$ * 2 H_2O	0,036 gr
Acido Citrico	6,0 mg
Ammonio Ferrino Citrato	6,0 mg
EDTA	1,0 mg
Na_2CO_3	0,02 gr
Trace Metal Mix A5	1 ml
H_3BO_3	2,86 gr
$MnCl_2$ * 4 H_2O	1,81 gr
$ZnSO_4$ * 7 H_2O	0,222 gr
$CuSO_4$ * 5 H_2O	0,079 gr
Na_2MoO_4 * 2 H_2O	0,39 gr
$Co(NO_3)_2$ * 6 H_2O	49,4 gr

Analogo approccio sperimentale verrà applicato alle colture di ceppi di *Nostoc puntiforme* (American Type Culture Collection, ATCC, ceppo 29133) e *Anabaena variabilis* (ATCC, ceppo 29413) al fine di individuare le migliori condizioni di coltivazione.

Dati preliminari indicano che *Nostoc puntiforme* coltivato in ATCC Medium, cresce in modo estremamente lento, non paragonabile a quello di *C. reinhardtii.*

STUDIO DELLA CURVA DI CRESCITA

La curva di crescita è stata costruita coltivando il ceppo CC-1690 di *C. reinhardtii* in terreno minimo BG11 a 25°C in presenza o assenza di luce solare. Le cellule vitali sono state contate al microscopio ottico in camera di Burker ad intervalli di tempo definiti. I risultati ottenuti dimostrano che, come è stato descritto [8], la replicazione di *Chlamydomonas* avviene in presenza di luce e similarmente alle colture di batteri sporigeni, la curva di crescita comprende diverse fasi (Figura 3) e termina con la conversione nella forma zigosporale La trasformazione delle cellule vegetative aploidi in zigospore impedisce la morte della coltura. Il ciclo vegetativo può riprendere ed è caratterizzato dalla stessa curva di crescita quando cellule in fase stazionaria (zigospore), coltivate al buio, siano esposte di nuovo alla luce solare

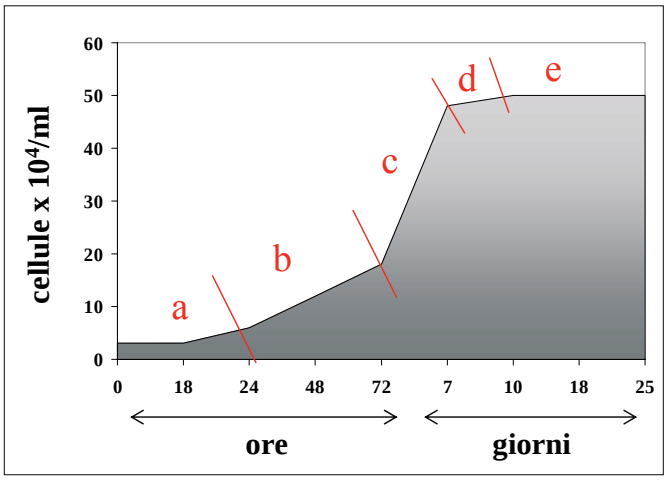


Figura 3. Curva di crescita di *C. reinhardtii* in terreno BG11. a, fase di latenza; b, fase di accelerazione della crescita; c, fase esponenziale; d, fase di decelerazione della crescita; e, fase stazionaria: progressiva trasformazione in zigospore.

DETERMINAZIONE DELL'H_2 PRODOTTO

Descrizione dello strumento e della metodologia utilizzata

Per le analisi è stato utilizzato un gas cromatografo microGC modello CP-4900 della VARIAN dotato di un rivelatore a conducibilità termica (TCD).

Lo strumento permette di analizzare le concentrazioni dei componenti di una miscela gassosa.

Il campione, che viene aspirato dallo strumento per mezzo una pompa, viene immesso attraverso un gas di trasporto (carrier) che costituisce la fase mobile, attraverso delle colonne cromatografiche in cui si trova la fase stazionaria che può essere un solido granulare poroso oppure un liquido. Ciascuna specie chimica depositata sulla fase stazionaria e immessa nella corrente di fase mobile si distribuisce dinamicamente tra le due fasi, in misura proporzionale alla diversa affinità che possiede per esse.

Il rilevatore TCD risponde alle differenze di conducibilità termica tra il gas di trasporto e i componenti del campione. In un TCD il segnale generato dal passaggio del gas di trasporto è confrontato con quello di un gas (equivalente) di confronto. Il passaggio dei componenti del campione all'interno del detector provoca uno sbilanciamento del segnale proporzionale alla sua concentrazione. Ogni sostanza in uscita dalla colonna genera dunque un segnale. Quando si misura la concentrazione delle sostanze in uscita dalla colonna si ottiene un cromatogramma che riporta le concentrazioni della

sostanza in uscita in funzione del tempo di ritenzione, cioè il tempo impiegato da ogni singolo componente per percorrere l'intera fase stazionaria. I cromatogrammi mostrano il procedere della separazione, con la distribuzione di ogni sostanza secondo picchi di concentrazione di forma gaussiana.

Il Micro-GC Varian, Inc CP-4900 è configurato per essere usato con diversi gas di trasporto (carrier). Per le prove è stato utilizzato come carrier Argon con una purezza del 99.9999%. La colonna cromatografica utilizzata è la Molsieve MS5A, particolarmente adatta per la rilevazione di idrogeno. Lo strumento è fornito di un software dedicato (SW STAR versione 6.41) che permette l'acquisizione, la gestione e l'analisi dei dati. L'analisi quantitativa effettuata tramite software è basata sul confronto delle aree dei picchi dei cromatogrammi utilizzando, per la calibrazione dello strumento il metodo della standardizzazione esterna con cui é possibile determinare la concentrazione dei soli componenti che interessano. Tale metodo consente di costruire una curva di taratura utilizzando delle miscele standard a concentrazione nota del componente da determinare, di tali miscele si iniettano quantitativi rigorosamente uguali. Automaticamente il software riporta su un grafico le aree dei picchi ottenuti in funzione della concentrazione dello standard corrispondente. Si analizza poi un'aliquota del campione rigorosamente uguale a quelle precedenti, si misura l'area del componente che interessa e, attraverso un confronto automatico, si risale alla sua concentrazione.

Misurazioni

Le misurazioni della concentrazione (in volume) dell'idrogeno prodotto sono state effettuate dopo 20, 28, 47 e 51 giorni dall'inoculo delle colture di *C. reinhardti* in terreno TAP all'interno delle sacche.

Oltre alla concentrazione di idrogeno è stata misurata anche quella di ossigeno.

Le misure sono state effettuate collegando il tubo di campionamento del gascromatografo al connettore delle sacche contenenti le colture. Il volume di gas campionato dallo strumento è costante per ogni misurazione.

Nella figura 4 sono riportati sullo stesso grafico i cromatogrammi ottenuti nel corso delle diverse misurazioni Ciascun cromatogramma rappresenta il segnale del TCD in funzione del tempo di ritenzione di ciascun composto. L'idrogeno è caratterizzato da un tempo di ritenzione minore rispetto a quello dell'ossigeno (0,77 min. rispetto a 1,18 min.). Nel grafico di figura 4 quindi, i picchi dell'idrogeno sono più vicini all'origine delle ascisse rispetto a quelli dell'ossigeno

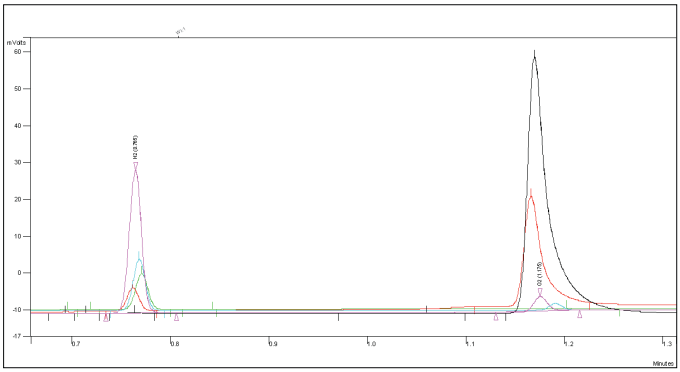


Figura 4. Cromatogrammi relativi alle diverse misurazioni

In figura 5 è riportato un dettaglio dei cromatogrammi di figura 4 che mette in evidenza i picchi relativi all'H_2.

L'incremento dell'area del picco indica un aumento della concentrazione dell'idrogeno all'interno delle sacche tra una misurazione e la successiva.

Al contrario per l'area del picco dell'ossigeno si è osservata una drastica riduzione (figura 6).

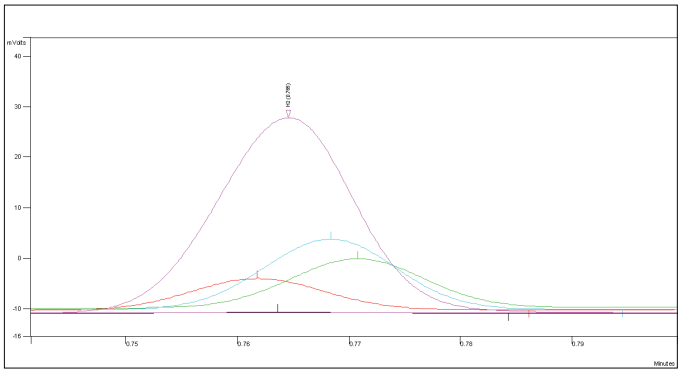


Figura 5. Picchi dell'idrogeno relativi alle diverse misurazioni

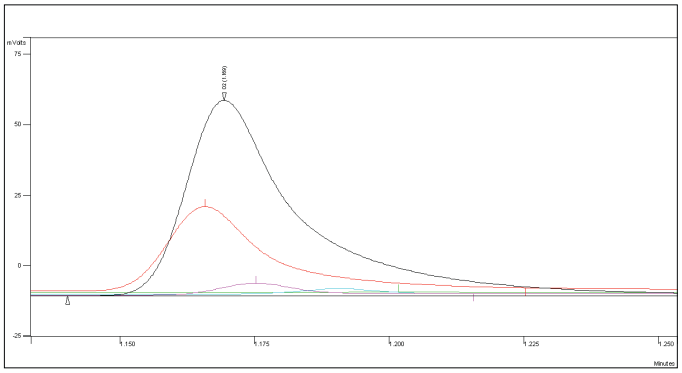


Figura 6. Picchi dell'ossigeno relativi alle diverse misurazioni

RISULTATI

Nella tabella 4 vengono riportate le concentrazioni di idrogeno e ossigeno rilevate analizzando il gas contenuto all'interno delle sacche dopo 20, 28, 47, 51 e 61 giorni dal primo inoculo delle colture di *Chlamydomonas reinhardtii*.

Tabella 4. Risultati delle misurazioni

Tempo trascorso dal primo inoculo (gg)	**Concentrazione H_2 (% vol)**	**Concentrazione O_2 (% vol)**
20	0,0019	10,9957
28	0,0537	3,6376
47	0,0845	0,0000
51	0,1200	0,0000
61	0,3343	0,0000

L'andamento nel tempo di tali concentrazioni è riportato nel grafico di figura 7 ed è di tipo crescente per l'idrogeno e decrescente per l'ossigeno.

L'analisi dei risultati mostra un aumento della

concentrazione di idrogeno tra la prima e l'ultima misurazione (dallo 0,0019% allo 0,12%).

La concentrazione di ossigeno invece si riduce, passando da un valore pari circa all'11% rilevato nel corso della prima misurazione, fino a valori prossimi allo zero nel corso delle ultime misurazioni.

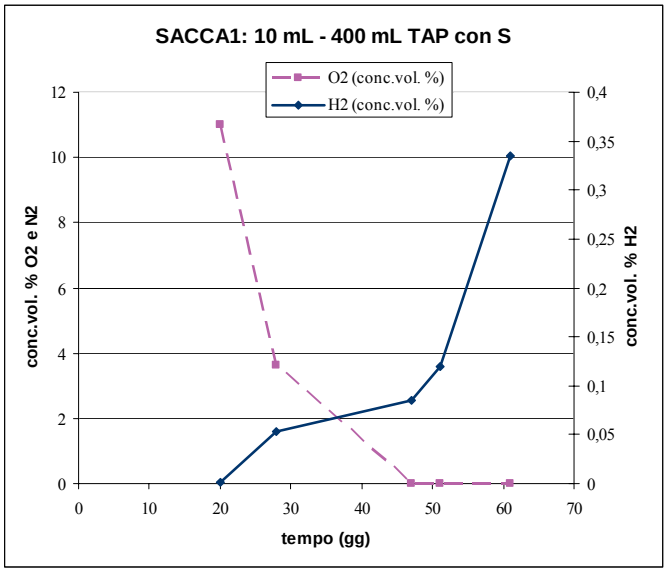


Figura 7. Andamento delle concentrazioni di idrogeno ed ossigeno in tempi successivi al primo inoculo delle colture

CONCLUSIONI

I risultati della sperimentazione condotta sulle colture di *C. reinhardtii* hanno permesso di dimostrare che le condizioni di coltura sperimentate individuate possono essere correlate ad una produzione di idrogeno crescente nel tempo.

Tale produzione si è verificata esponendo le colture alla luce solare senza ausilio di dispositivi quali termostati o lampade e pertanto senza consumo di energia elettrica.

La riduzione della quantità di ossigeno presente è relativa al metabolismo cellulare stesso [4]. Gli sviluppi futuri della ricerca prevedono la coltura di *C. reinhardtii* in AP medium sprovvisto di zolfo e in appositi contenitori in vetro che rendono più agevole la rilevazione gascromatografica. Dati preliminari indicano che la *C. reinhardtii* può essere coltivata ottimamente anche in tali dispositivi e, in terreno primo di zolfo, può produrre idrogeno in maniera più efficiente (dati non amostrati). Ulteriori sviluppi potranno inoltre scaturire dallo studio della coltivazione simultanea di quest'alga con *Nostoc*.

BIBLIOGRAFIA

[1]. Gaffron H. Reduction of CO2 with H2 in green plants. *Nature* 143:204-205, 1939.

[2]. Gaffron H. and Rubin *J. Journal of General Physilogy* 26:219-240, 1942

[3]. Greenbaum E. Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies. *Science* 196:879-880, 1982

[4]. Melis A, Happe T. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant physiology* 127:740-748, 2000, Melis A, et al Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Physiology* 122-127-135, 2000.

[5]. Lindberg P, Lindblad P, Cournac L. Gas exange in the filamentos cianobacteriun Nostoc punctiforme strain ATCC 29133 and its Hydrogenase-deficient mutant strain NHM5. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:2137-2145, 2004.

[6]. Tsygankov AA, Federov AS, Kosourov SN, Rao KK. Hydrogen production by cianobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions *Biotechnol Bioeng* 80:777-783, 2002.

[7]. T.A. Nerad, ATCC Catalogne of protists. *American Type Culture Collection*, Rockwille, Matiland, USA. 1991

[8]. H.Belcher and E. Swale, Culturing algae: a guide for school and colleges. *Culture collection of Algae ad Protozoa*, Ambleside, England, U.K. 1988.

SUMMARY

Photobiological hydrogen production systems use generally sunlignt. Some algae and bacteria can produce hydrogen under specific conditions. Pigment of algae absorb the solar energy and enzymes catalyze the water splitting reaction that permit to obtain hydrogen and oxygen from H_2O molecule.

In an effort to optimize this process the specific mechanisms of these systems has been studied. Studies indicate that the level of conversion of energy into hydrogen is not suitable for a large scale hydrogen production. The purpose of the experimental work presented is the determination of the optimal cultivation conditions of hydrogen producers micro organisms. The individuation of these condition is the base for the design of an high efficiency photobioreactor.