

Produzione di idrogeno Impiego dell'alga verde *Chlamydomonas Reinhardtii*

Il lavoro sperimentale descritto nel presente articolo ha lo scopo di individuare le condizioni ottimali di coltivazione dell'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, finalizzate alla produzione d'idrogeno. L'obiettivo è progettare un fotobioreattore ad elevata efficienza in cui i microrganismi possano essere coltivati in condizioni che ottimizzino la produzione biologica di tale gas.

L'attività sperimentale svolta a tal fine si articola nelle seguenti fasi:

- allestimento di colture di diverse specie di cianobatteri (generi *Nostoc* e *Anabaena*) e/o alghe (*Chlamydomonas reinhardtii*) in differenti condizioni di incubazione (aerobiosi/anaerobiosi, colture bi-fasiche, presenza/assenza di luce);
- 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);
- valutazione e misura gascromatografica dell'idrogeno prodotto nelle diverse fasi di crescita;
- identificazione delle condizioni ottimali per la produzione di idrogeno (tipo di microrganismo, terreno di coltura, condizioni e tempi di incubazione);
- studio dei fattori che modulano tale produzione.

Allestimento delle colture

Il genere *Chlamydomonas* appartiene alle alghe verdi unicellulari (*Chlorophyta*). 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 (corpuscolo 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*. 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 aploidi 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 ha inizio con la divisione meiotica delle cellule diploidi e la formazione di quattro cellule aploidi. 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 risultati ottenuti, evidenziando che:

La produzione fotobiologica di idrogeno da parte dell'alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* ha sviluppato notevole interesse nel campo della ricerca sulle energie rinnovabili. La quantità di idrogeno prodotto da quest'alga dipende da vari fattori quali la composizione del terreno di coltura, l'esposizione alla luce solare, la presenza di ossigeno ecc.

Nella sperimentazione avviata sono state analizzate le migliori condizioni di coltura dell'alga, al fine di ottenere una produzione ottimale di idrogeno. La sperimentazione relativa alla coltivazione di *C. reinhardtii* in terreni con diversa composizione chimica ha dimostrato che, in accordo con la letteratura specifica, la più elevata produzione di idrogeno si ottiene in terreno Tris-acetate phosphate (TAP) privo di zolfo e solfati. Sono stati condotti due esperimenti sottoponendo le colture a diverse condizioni di illuminamento. Nel primo esperimento sono stati utilizzati due tipi di lampade fluorescenti a vapori di mercurio con diverse temperature di colore (rispettivamente 5.600 e 2.700 K), e una lampada allo xeno con una temperatura di colore di 6.800 K. Nel secondo esperimento sono state impiegate due delle lampade già utilizzate nel primo esperimento (una lampada fluorescente a vapori di mercurio con una temperatura di colore di 2.700 K e una lampada allo xeno con una temperatura di colore di 6.800 K). Inoltre alcuni campioni sono stati sottoposti ad illuminazione naturale. Lo scopo è stato quello di stabilire l'effetto delle diverse condizioni di illuminamento sulla produzione di idrogeno da parte delle colture.

Francesco Bistoni, Antonella Mencacci, Elio Cenci, Ines Montecarlo, Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Perugia; Margherita Giuliobello, IPASS-Consorzio Ingegneria Per l'Ambiente e lo Sviluppo Sostenibile; Michele Goretti, TISS Srl, Spin-off Università degli Studi di Perugia.

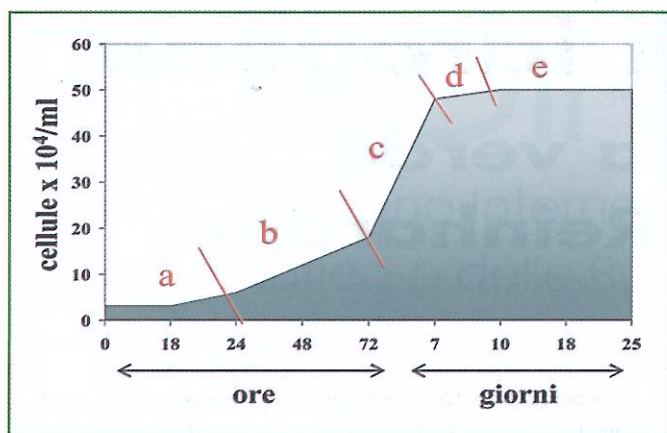


FIGURA 1 - Curva di crescita di *C. reinhardtii* in terreno BG11: a) fase di latenza; b) fase di accelerazione della crescita; c) fase esponenziale; d) fase di decelerazione della crescita; e) fase stazionaria: progressiva trasformazione in zigospore

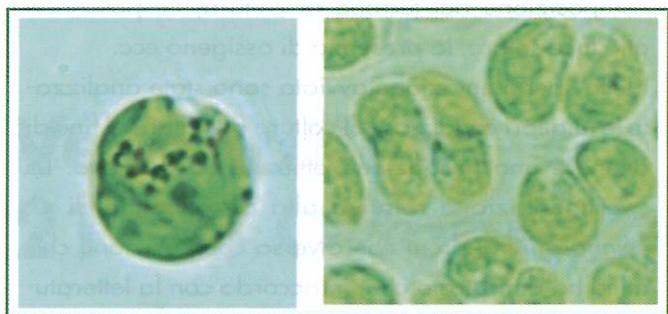


FIGURA 2 - Cellule di *Chlamydomonas reinhardtii* al microscopio ottico in forma aploide vegetativa (sinistra) e zigospore (destra)

- *C. reinhardtii* è in grado di sopravvivere e moltiplicarsi in differenti mezzi;
- il terreno minimo BG11 garantisce 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.

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

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

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 Burkner ad intervalli di tempo definiti. I risultati ottenuti dimostrano che la replicazione di *Chlamydomonas* avviene in presenza di luce e similmente alle colture di batteri sporigeni. La curva di crescita comprende diverse fasi (Figura 1) e termina

con la conversione nella forma zigospore (Figura 2). 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.

Individuazione delle condizioni ottimali

Coltivazione di *C. reinhardtii*

Le colture di *C. reinhardtii* (7.5×10^4 cellule/ml terreno di coltura) sono state inoculate all'interno di bottiglie graduate da 500 ml in vetro borosilicato. Le bottiglie sono dotate di tappo in Politereftalato di Butile (PBT) resistente fino a 180 °C con guarnizione in Politetra Fluoroetilene (PTFE). Ogni bottiglia presenta 5 attacchi con tappi forati dotati di setto poroso in butile/teflon.

Sono stati effettuati due esperimenti in cui le colture sono state sottoposte a diverse condizioni di illuminazione (naturale ed artificiale) ed è stata determinata la produzione di idrogeno a diversi tempi di coltura. A tal fine sono state allestite differenti postazioni, ognuna costituita da una scatola con pareti riflettenti rivestite in alluminio, all'interno delle quali sono state posizionate le bottiglie contenenti le colture.

Misurazione dell'idrogeno prodotto

Per la rilevazione dei gas contenuti nelle bottiglie è stato utilizzato un gascromatografo con rilevatore TCD, in grado di misurare la percentuale in termini di concentrazione in volume di idrogeno (ma anche di azoto, di ossigeno e di anidride carbonica) presente all'interno dei contenitori di vetro durante l'intero periodo di durata della prova.

In ognuno dei due esperimenti effettuati la prima di n misurazioni è stata condotta al momento dell'inoculo ($t_0 =$ tempo zero). Con T è indicato il periodo di durata totale della prova e con T_i l'intervallo di tempo tra una misurazione e l'altra, per $i = 0 \dots n - 1$. Indicando con x_i la percentuale in volume di idrogeno rilevata dallo strumento e con v_i il volume prelevato dal contenitore nel corso di ogni i -esima misurazione, il volume totale di idrogeno prodotto nel corso della prova sarà:

$$V_{H_2 \text{ prodotto}} = \sum_{i=0}^{n-1} (x_i \cdot v_i + V_{H_2 \text{ dopo prelievo } i}) \quad (1)$$

in cui:

$$V_{H_2 \text{ dopo prelievo } i} = x_i \cdot V_{\text{libero}} - \sum_{j=0}^i v_j \quad (2)$$

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

Terreno	Tasso di replicazione			
	25 °C	37 °C	Luce	Buio
DMEM (GIBCO)	Buono	Scarso	Buona	Nulla
Muller Hinton Broth (Becton Dickinson)	Molto buono	Scarso	Molto buono	Nulla
Thioglycollate (Becton Dickinson)	Nulla	Nulla	Nulla	Nulla
BG11*	Ottimo	Scarso	Ottimo	Nulla
Muller Hinton Agar (Biolife)	Buono	Scarso	Buono	Nulla
Enterococcosel Agar (Becton Dickinson)	Scarso	Scarso	Scarso	Nulla

* Il terreno di coltura BG11 (Nerad T.A., ATCC Catalogue of protists. American Type Culture Collection, Rockville, Mariland, USA. 1991).

TABELLA 2 - Caratteristiche delle lampade installate nelle tre postazioni

Tipo di lampada	Lampada fluorescente a vapori di mercurio 765 BASIC OSRAM	Lampada fluorescente a vapori di mercurio 865 LUMINUX OSRAM	Lampada allo xeno
Tonalità di luce	Luce bianca diurna DAYLIGHT	Luce bianca tono caldo WARM WHITE	ULTRA WHITE
Potenza nominale (W)	3x30 = 90	3x30 = 90	35
Indice di resa cromatica Ra	70...79	80...89	> 90
Flusso luminoso (lm)	1.900 (63 lm/W)	2.400 (80 lm/W)	2.500 (70 lm/W)
Lunghezza x diametro (mm)	895x26	895x26	40x7
Temperatura di colore TC (K)	6.500 (misur. 5.600)	3.000 (misur. 2.700)	8.000 (misur. 6.800)
Illuminamento EV (lux)	12.600	15.300	3.400

Condizioni di coltura nel primo esperimento

Nel primo studio *C. reinhardtii* è stata coltivata parallelamente in terreni con diversa composizione chimica: Tris-acetate-phosphate (TAP) con zolfo e TAP privo di zolfo e solfati (15×10^6 *C. reinhardtii* in 200 ml di terreno TAP/ bottiglia). Le colture sono state esposte contemporaneamente a diverse temperature di colore mediante l'impiego di due tipi di lampade fluorescenti a vapori di mercurio, con temperature di colore di 5.600 e 2.700 K, e una lampada allo xeno con temperatura di colore di 6.800 K (Tabella 2). Per la sperimentazione svolta sono stati preparati 6 campioni codificati in base al tipo di terreno e alla lampada utilizzata. La codifica dei campioni è riportata nella Tabella 3.

Condizioni di coltura nel secondo esperimento

Colture di *C. reinhardtii* in terreno TAP senza zolfo sono state sottoposte ad illuminazione continua con lampada fluorescente avente $T_C = 2.700$ K e lampada allo xeno; parallelamente le stesse colture sono state esposte alla sola luce del sole.

Sono stati preparati 6 campioni codificati in base al tipo di terreno e alla lampada della postazione di prova in cui è stato posizionato il campione. La codifica dei campioni è riportata nella Tabella 4.

Risultati

Primo esperimento

I campioni che hanno dato i migliori risultati in termini di idrogeno prodotto nel primo esperimento sono quelli delle colture A e C, ovvero *C. reinhardtii* coltivata in terreno senza zolfo, sottoposto ad illuminazione continua con lampada fluorescente avente $T_C = 2.700$ K (coltura A) e con lampada allo xeno avente $T_C = 6.800$ K (coltura C). In particolare (Figura 3) per il campione A la quantità totale di idrogeno prodotto è stata crescente nel tempo fino all'undicesimo giorno dall'inoculo, in corrispondenza del quale è stato raggiunto il valore massimo di 164 mmol. Dall'undicesimo al ventiduesimo giorno dall'inoculo si è registrato un andamento decrescente e la quantità totale di idrogeno è scesa fino a 96 mmol. Dal giorno 22 al giorno 32 si è registrato un andamento oscillante con valore massimo di idrogeno prodotto di circa 120 mmol.

Per il campione C la quantità totale di idrogeno prodotto è stata crescente nel tempo fino al ventesimo giorno dall'inoculo, in corrispondenza del quale è stato raggiunto il valore massimo di 177 mmol. Dal ventesimo al ventiduesimo giorno si è registrato un andamento decrescente e la quantità totale di idrogeno è scesa

TABELLA 3 - Codifica dei campioni primo esperimento

Tipologie di colture	Lampade - T_C (K)		
	2.700	5.600	6.800
<i>C. reinhardtii</i> in terreno senza zolfo	A	B	C
<i>C. reinhardtii</i> in terreno con zolfo	AS	BS	CS

sa fino a 105 mmol. Dal giorno 22 al giorno 32 si è registrato un andamento oscillante, con valore massimo di idrogeno prodotto di circa 140 mmol. Per quanto riguarda i campioni delle colture in terreno con zolfo (AS, BS e CS), gli andamenti della quantità totale di idrogeno prodotto sono oscillati durante i primi 11 giorni dall'inoculo (Figura 4).

Tuttavia è durante tale periodo che sono stati raggiunti i valori massimi per i campioni AS (coltura di *C. reinhardtii* in terreno con zolfo sottoposto ad illuminazione continua con lampada fluorescente avente $T_C = 2.700$ K) e BS (coltura di *C. reinhardtii* in terreno con zolfo sottoposto ad illuminazione continua con lampada fluorescente avente $T_C = 5.600$ K). Tali valori sono pari a 15 mmol per il campione AS e 7 mmol per il campione BS. Il campione CS (coltura di *C. reinhardtii* in terreno con zolfo sottoposto ad illuminazione continua con lampada allo xeno) ha presentato un andamento crescente nel tempo durante tutto il periodo di durata della prova raggiungendo un valore massimo di 7,6 mmol dopo 27 giorni dall'inoculo.

I risultati ottenuti permettono di trarre le seguenti conclusioni:

- a parità di condizioni di illuminazione il terreno di crescita migliore è risultato essere quello senza zolfo;
- le condizioni di luce più favorevoli per una maggiore produzione di idrogeno da parte delle colture sono state ottenute con la lampada

TABELLA 4 - Codifica dei campioni secondo esperimento

Tipologia di coltura	Tipo di illuminazione		
	Lampada A fluorescente $T_C = 2.700$ K	Lampada C allo xeno $T_C = 6.800$ K	Luce solare
15×10^6 <i>C. reinhardtii</i> /200 ml TAP	1		
15×10^6 <i>C. reinhardtii</i> /200 ml TAP		2	
15×10^6 <i>C. reinhardtii</i> /200 ml TAP			3
30×10^6 <i>C. reinhardtii</i> /400 ml TAP	4		
30×10^6 <i>C. reinhardtii</i> /400 ml TAP		5	
30×10^6 <i>C. reinhardtii</i> /400 ml TAP			6

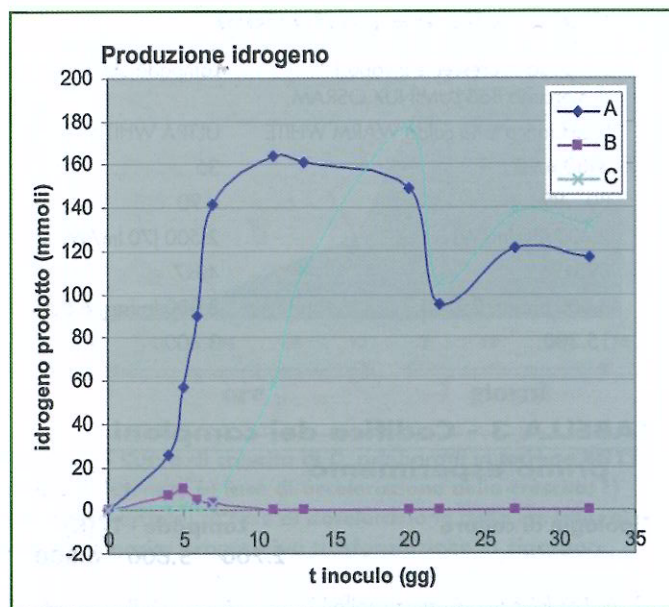


FIGURA 3 - Quantità totale di idrogeno prodotto dalle colture di *C. reinhardtii* in 200 ml di terreno TAP senza zolfo in funzione del tempo

fluorescente che presenta temperatura di colore di 2.700 K e con la lampada allo xeno. Con quest'ultima è stata registrata la massima produzione di idrogeno (177 mmol) dopo 20 giorni dall'inoculo.

Secondo esperimento

Le colture di *C. reinhardtii* sottoposte a lampada fluorescente e lampada allo xeno nel secondo esperimento hanno permesso di ottenere andamenti e valori di idrogeno prodotto abbastanza simili tra loro e sicuramente migliori rispetto alle condizioni di illuminazione naturale. In particolare i risultati più soddisfacenti sono stati raggiunti con il cam-

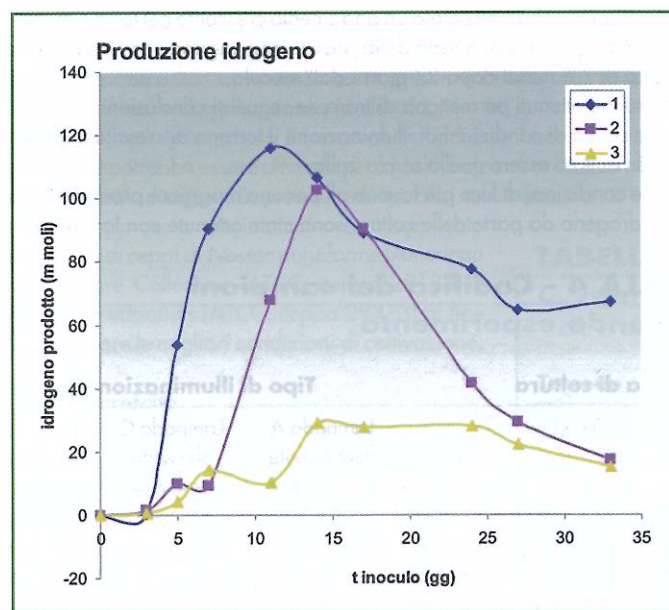


FIGURA 5 - Quantità totale di idrogeno prodotto dalle colture di *C. reinhardtii* in 200 ml di terreno TAP senza zolfo in funzione del tempo

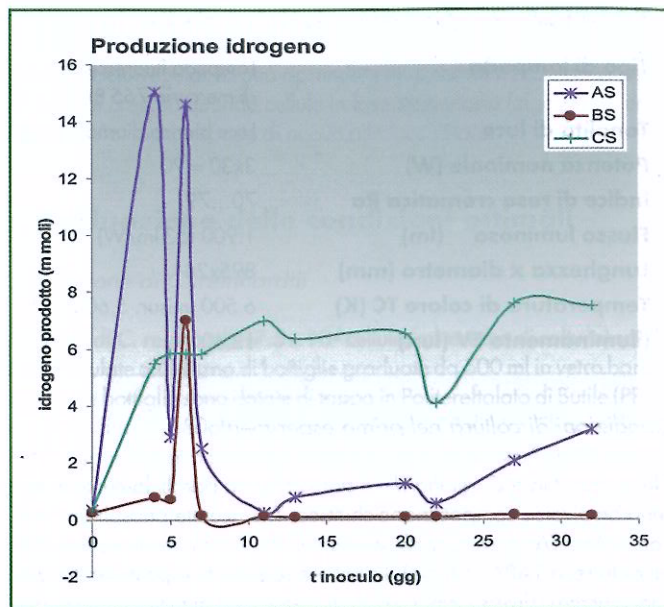


FIGURA 4 - Andamento della quantità totale di idrogeno prodotto dalle colture coltivate in 200 ml di terreno TAP con zolfo in funzione del tempo

pione 1 (*C. reinhardtii* sottoposta a illuminazione artificiale con lampada fluorescente avente $T_C = 2.700$ K), in cui la quantità totale di idrogeno prodotto è stata crescente nel tempo fino all'undicesimo giorno dall'inoculo, in corrispondenza del quale è stato raggiunto il valore massimo di 116 mmol (Figura 5). Dall'undicesimo al trentatreesimo giorno dall'inoculo si è registrato un andamento decrescente e la quantità totale di idrogeno è scesa fino a 67 mmol. Per le colture 4, 5, e 6, in cui la quantità di terreno all'interno di ciascuna bottiglia è stata doppia rispetto alle colture 1, 2 e 3, e, di conseguenza, è stata raddoppiata la quantità di cellule coltivate, i risultati più soddisfacenti sono stati raggiunti con il campione 5 (*C. reinhardtii* sottoposta a illuminazio-

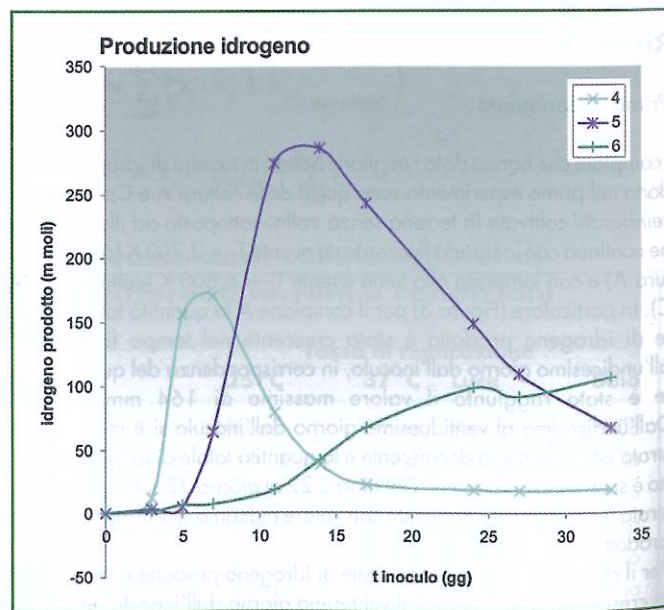


FIGURA 6 - Quantità totale di idrogeno prodotto dalle colture di *C. reinhardtii* in 400 ml di terreno TAP senza zolfo in funzione del tempo

ne artificiale con lampada allo xeno avente $T_C = 6.800\text{ K}$), in cui la quantità totale di idrogeno prodotto è stata crescente nel tempo fino al quattordicesimo giorno dall'inoculo, in corrispondenza del quale è stato raggiunto il valore massimo di $286\text{ mmol}/400\text{ ml}$ di TAP (Figura 6). Dal quattordicesimo al diciassettesimo giorno dall'inoculo si è registrato un andamento decrescente.

Conclusioni

I risultati della sperimentazione descritta dimostrano che:

- l'uso di terreno TAP privo di zolfo e solfati per la coltivazione dell'alga *C. reinhardtii* si associa ad una maggiore produzione di idrogeno;
- la quantità di idrogeno prodotto è proporzionale al numero di cellule di *Chlamydomonas* coltivate;
- l'esposizione delle colture a luce artificiale è associata ad una maggiore produzione di idrogeno rispetto all'esposizione a luce solare;
- la massima produzione di idrogeno ($286\text{ mmol}/400\text{ml}$ di TAP) è stata registrata a seguito di esposizione alla luce generata da lampada allo xeno, dopo 14 giorni dall'inoculo.

Non si è ritenuto opportuno normalizzare i quantitativi di idrogeno prodotto rispetto al volume di terreno, poiché tale produzione dipende sia dal volume della coltura, sia dalla superficie libera di interfaccia con l'aria e con la superficie direttamente esposta alla luce solare.

Bibliografia

- [1] Bistoni F., Mencacci A., Cenci E., Montecarlo I., Corbucci C., Rossi F., Giuliobello M., *Sviluppo di un dispositivo per l'ottenimento di idrogeno mediante processi fotobiologici*, 6° Congresso Nazionale CIRIAF - Atti (Perugia, 7/8 aprile 2006).
- [2] Belcher H. and Swale E., *Culturing algae: a guide for school and colleges - Culture collection of Algae ad Protozoa*, Ambleside - England, U.K., 1988.
- [3] Gaffron H., *Reduction of CO_2 with H_2 in green plants*, *Nature*, vol. 143, pp. 204-205, 1939.
- [4] Gaffron H. and Rubin J., *Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae*, *Journal of General Physiology*, vol. 26, pp. 219-240, 1942.
- [5] Greenbaum E., *Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies*, *Science*, vol. 196, pp. 879-880, 1982.
- [6] Ji Hye Jo, Dae Sung Lee, Jong Moon Park, *Modelling and Optimization of Photosynthetic Hydrogen Gas Production by Green Alga Chlamydomonas reinhardtii in Sulfur-Deprived Circumstance*, *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, pp. 431-437, 2006.
- [7] Melis A., Zhang L., Forestier M., Ghirardi M.L., Seibert M., *Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiology*, vol. 122, pp. 127-135, 2000.
- [8] Mencacci A., Montecarlo I., Cenci E., Corsi N., Urbani M., Bistoni F., *Proposta di un fotobioreattore per la produzione di idrogeno*, 61° Congresso Nazionale ATI - Atti (Perugia, 12-15 settembre 2006).
- [9] Myake M and Asada Y., *Abstracts of the 4th Int. Conference on the Mol Biol. Hydrogenases*, pp. 104-105, 1994.
- [10] Nerad T.A., *ATCC Catalogue of protests*, American Type Culture Collection, Rockville-Mariland, USA, 1991. ■

1958-2008
50
YEARS
OF MEASUREMENT.
AND COUNTING.

Analizzatori di combustione



- Ampia gamma di modelli che coprono ogni esigenza; dall'idraulico alla società termotecnica
- Fornibile versione che include 8 strumenti in 1
- Calcolo del rendimento a norma UNI 10389 e di condensazione per tutti i tipi di combustibili, pellet incluso
- Rilevazione CO , CO_2 , O_2 , temperatura e pressione differenziale. Tiraggio a norma UNI 10845
- Integrazione della prova di tenuta a norma UNI 7129 e 11137 e del cercafughe gas
- Trasferimento dati su stampa anche in carta comune e verso PC e PDA via Bluetooth
- Certificazioni UNI EN 50379 e TUV

Per maggiori informazioni sul prodotto: isothermic@isoil.it



Cinisello B.- Mi (Italy)
tel. +39 02660271
www.isoil.com

ISOIL
INDUSTRIA

Le soluzioni che contano