

SVILUPPO DI UN DISPOSITIVO PER L'OTTENIMENTO DI IDROGENO MEDIANTE PROCESSI FOTOBIOLOGICI

Francesco Bistoni¹, Antonella Mencacci¹, Elio Cenci¹, Ines Montecarlo¹, Cristina Corbucci¹,
Federico Rossi², Margherita Giuliobello³

¹Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche,
Università degli Studi di Perugia, Via del Giochetto, 06122 Perugia

²Sezione di Fisica Tecnica, Dipartimento di Ingegneria Industriale
Università degli Studi di Perugia, Via Duranti 67, 06125 Perugia

³Università di Roma "La Sapienza", Via Eudossiana, 18, Roma

SOMMARIO

La produzione di idrogeno a partire da molecole inorganiche da parte di microrganismi rappresenta una attraente e ambiziosa possibilità. Nel 1939 fu osservato che particolari alghe verdi unicellulari erano in grado di produrre idrogeno in presenza di luce e, successivamente, tale proprietà fu dimostrata anche per i cianobatteri. La produzione di idrogeno mediante processi fotobiologici è stata dimostrata in diversi modelli sperimentali, tuttavia, il livello di conversione energetica risulta essere troppo basso per una applicazione su larga scala in termini economicamente vantaggiosi.

Nella sperimentazione avviata microrganismi quali alghe blu-verdi (*Chlamydomonas reinhardtii*) e cianobatteri (*Anabaena variabilis* e *Nostoc punctiforme*) vengono coltivati in diverse condizioni fisico-chimiche e la produzione di idrogeno viene rilevata mediante gas-cromatografia, allo scopo di progettare un foto-bio-reattore in cui i microrganismi cui corrisponde la maggiore produzione di idrogeno possano essere coltivati in condizioni ottimali.

INTRODUZIONE

La scoperta della produzione di idrogeno da parte di microrganismi risale al 1939 quando fu osservato 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 costituiscono un gruppo di procarioti fotoautotrofi ben definito, capaci di effettuare la fotosintesi ossigenica, analoga a quella operata dagli organismi eucarioti, secondo la reazione: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{O}_2$. La fotosintesi ossigenica avviene in due fasi: conversione fotochimica dell'energia luminosa in energia biochimica 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 fisico-chimiche quest'ultima reazione può non avvenire ed essere sostituita dalla produzione di idrogeno molecolare idrogenasi-dipendente.

La produzione di idrogeno da parte dei cianobatteri può avvenire inoltre anche in modo nitrogenasi-dipendente come reazione accessoria del processo di fissazione dell'azoto operato da questi microrganismi capaci di trasformare l'azoto atmosferico in ammoniacale.

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 un livello di efficienza di conversione energetica (rapporto tra energia prodotta dall'idrogeno ottenuto e energia solare impiegata) pari al 5%. Tale valore è da ritenersi troppo basso per una applicazione su larga scala in termini economicamente vantaggiosi. Il maggiore ostacolo sarebbe rappresentato dalla estrema ossigeno-labilità di idrogenasi e nitrogenasi che cesserebbero

la loro attività a causa della produzione di ossigeno da parte della reazione stessa.

La sperimentazione avviata si propone di studiare le condizioni ottimali di coltura di microrganismi produttori di idrogeno al fine di progettare un foto-bio-reattore utile all'ottenimento di tale gas mediante processi fotobiologici.

DESCRIZIONE DELLA SPERIMENTAZIONE

La sperimentazione avviata prevede la progettazione di un foto-bio-reattore in cui i microrganismi possano venire coltivati in condizioni che ottimizzino la produzione di idrogeno e si articola in diverse fasi: 1) 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); 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 gas-cromatografica 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.

Allestimento di 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 (corpuscoloscopo 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 inizia con la divisione meiotica delle cellule diploidi con 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 i) *C. reinhardtii* è in grado di sopravvivere e moltiplicarsi in differenti mezzi; ii) il terreno minimo BG11 garantisce una crescita ottimale al fine dello studio della curva di crescita del microrganismo; iii) 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.

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 ^a	Ottimo	Scarso	Ottimo	Nulla
Muller Hinton Agar (Biolife)	Buono	Scarso	Buono	Nulla
Enterococcosel Agar (Becton Dickinson)	Scarso	Scarso	Scarso	Nulla

^a Il terreno di coltura BG11 è stato preparato secondo Nerad [2].

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, come descritto [3], 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 zigosporeale (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.

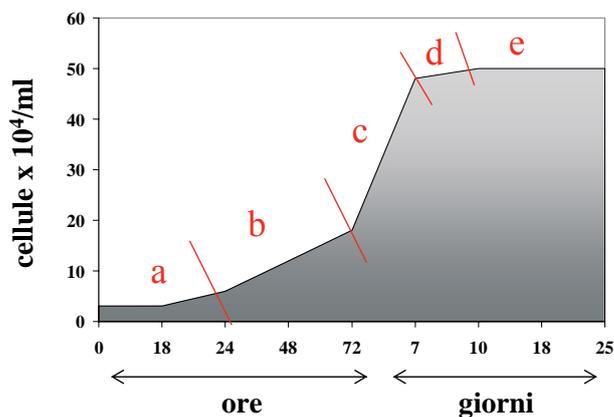


Figura 1. Curva di crescita di *C. reinhardtii* in terreno BG11. a, fase di latenza; b, fase di accelerazione della crescita; c, fase esponenziale; d, fase di decelerazione della crescita; e, fase stazionaria: progressiva trasformazione in zigospore.

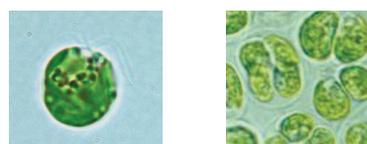


Figura 2. Cellule di *Chlamydomonas reinhardtii* al microscopio ottico in forma aploide vegetativa (sinistra) e zigosporeale (destra).

Misura dell'idrogeno prodotto

Sono in corso gli esperimenti di coltivazione del microrganismo in sacche speciali adatte alla misurazione gas-

cromatografica dei gas contenuti. Una volta stabilita la sterilità delle sacche, sospensioni di *C. reinhardtii* in terreno BG11 saranno inoculate nelle sacche suddette mediante una siringa provvista di ago e mantenute a 25°C esposte alla luce solare. Le colture in sacca verranno allestite in diverse condizioni di incubazione e i prelievi verranno effettuati in fase esponenziale e stazionaria al fine di rilevare la produzione di idrogeno di base e dopo stimolazione fisica o chimica.

PROSPETTIVE

I microrganismi in grado operare la fotosintesi ossigenica comprendono le alghe verdi come *Chlamydomonas* e i cianobatteri (generi *Nostoc* e *Anabaena*). Durante tale processo e in specifiche condizioni la riduzione di CO₂ atmosferica a composti organici può essere sostituita con una reazione di produzione di idrogeno molecolare [1, 4, 5]. Le reazioni biochimiche coinvolte in tale processo sono catalizzate da enzimi quali idrogenasi e nitrogenasi.

Gaffron dimostrò che *Scenedesmus*, un'alga verde, produce idrogeno molecolare in presenza di luce, dopo incubazione al buio in condizioni di anaerobiosi. La reazione è catalizzata dall'enzima idrogenasi secondo la seguente formula: $2H^+ + 2X_{ridotto} \rightarrow 6H_2 + 2X_{ossidato}$, dove X è una molecola trasportatrice di elettroni, la *ferredoxina* [6]. Studi più recenti hanno dimostrato che la fase di incubazione anaerobia è indispensabile per l'induzione dell'enzima idrogenasi. Tale enzima poi catalizza la reazione per la produzione di idrogeno luce-dipendente [7]. Tuttavia, l'attività dell'enzima idrogenasi è estremamente ossigeno-labile e cessa in pochi minuti a causa dell'ossigeno prodotto dalla fotosintesi stessa.

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. La fissazione dell'azoto 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.

La sperimentazione avviata con *C. reinhardtii* continuerà con i ceppi di cianobatteri secondo lo schema sopra riportato, al fine di evidenziare le condizioni di crescita ottimali. Verrà quindi valutata la possibilità di riprodurre tali condizioni nelle sacche speciali che consentono la misura gas-cromatografica dell'idrogeno. Questo consentirà di identificare le condizioni di crescita che meglio correlano con la produzione di idrogeno e di studiare i fattori chimici e fisici che la modulano. Tali parametri costituiranno la base razionale per la progettazione di un foto-bio-reattore finalizzato alla produzione di idrogeno.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. H. Gaffron H, Reduction of CO₂ with H₂ in green plants. *Nature*, vol. 143, pp 204-205, 1939.
2. T.A. Nerad, ATCC Catalogue of protists. American Type Culture Collection, Rockville, Mariland, USA. 1991.
3. H. Belcher and E. Swale, Culturing algae: a guide for school and colleges. Culture collection of Algae ad Protozoa, Ambleside, England, U.K. 1988.
4. P. Lindberg, P. Lindblad and L. Cournac, Gas exange in the filamentous cianobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its hydrogenase-deficient mutant strain NHM5. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, pp. 2137-2145, 2004.
5. A.A Tsygankov, A.S. Federov, S.N. Kosourov, K.K. Rao, Hydrogen production by cianobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions *Biotechnol Bioeng*, vol. 80, pp.777-783, 2002.
6. H. Gaffron and J. Rubin, Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *Journal of General Physiology*, vol. 26, pp. 219-240, 1942.
7. E Greenbaum, Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies. *Science*, vol. 196, pp 879-880, 1982.