

GIUSEPPE TORZILLO*, CECILIA FARALONI*

Produzione fotobiologica d'idrogeno da fonti rinnovabili (acqua e energia solare) attraverso l'uso di microalghe

INTRODUZIONE

Secondo le previsioni della commissione europea, la richiesta di energia per il 2030 dovrebbe salire del 30% rispetto al 2005. Il contributo delle energie rinnovabili al maggiore fabbisogno energetico dovrebbe salire a oltre il 90% rispetto a oggi. Entro il 2020 la quota dell'energie rinnovabili si stima raggiunga il 12,7%, un obiettivo ancora lontano rispetto al target del 20%, fissato dall'EU. Una sorgente di energia rinnovabile (RES) deve avere le seguenti caratteristiche: 1) sostenibilità (evitare cambiamenti climatici); 2) sicurezza nel rifornimento; 3) competitività. In particolare la sostenibilità nel settore dei trasporti deve consentire un riduzione nell'emissione di gas serra del 35%, che dovrebbe incrementare al 50% entro il 2017 e al 60% per nuove installazioni.

La Terra riceve 176.000 terawatt di energia incidente, mentre il tasso mondiale di consumo di energia è di circa 13,5 terawatt, pari a circa 0,01% dell'energia solare ricevuta dalla Terra. Sebbene l'energia solare arriva sulla Terra in modo disperso, la Natura ha messo a disposizione un efficace sistema di cattura dell'energia luminosa per mezzo della fotosintesi. La fotosintesi immagazzina oltre 10 volte l'energia che ogni anno è correntemente utilizzata dall'umanità. Nel corso della storia dell'uomo la fotosintesi ha sostenuto l'attività umana attraverso varie vie, produzione di ossigeno da respirare, alimenti di cui nutrirsi, legno per le costruzioni, e i carburanti che usiamo. Con l'avvento della rivoluzione industriale, il legno ha rappresentato negli anni 1740-1885 il combustibile per sostenere la richiesta di energia. Negli anni successivi al 1850 il carbone rimpiazzò il massiccio uso del legno come combustibile, che a sua volta venne

* *Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sezione di Firenze*

rimpiazzato dal petrolio intorno agli anni 1950. L'energia nucleare entrò in uso intorno al 1950. Complessivamente, le centrali nucleari nel mondo producono 352 gigawatt, pari al 16% del rifornimento globale d'energia. L'Europa soddisfa mediamente il 35% del proprio fabbisogno energetico interno tramite l'uso di centrali nucleari. Sul dato medio però, pesano fortemente i reattori nucleari francesi. Nonostante i dati favorevoli al nucleare (soprattutto la situazione francese) secondo l'IAEA (International Atomic Energy Agency) il peso dell'energia nucleare rispetto alle altre fonti di energia è destinato a ridursi entro il 2020. L'energia nucleare, infatti, non è considerabile rinnovabile e al corrente tasso di consumo dell'energia, insieme al petrolio si prevede potrà sostenere la richiesta di energia per circa un altro secolo al massimo. Il mondo attualmente usa l'energia a un tasso di circa 200 miliardi di barili equivalenti per giorno, ma la domanda per il 2050 potrebbe raggiungere circa 30 terawatt cioè circa 2,5 volte più elevata rispetto al consumo attuale. Si stima che il picco della produzione mondiale di petrolio verrà raggiunto entro il 2020. Il livello di CO₂ nell'atmosfera (387 ppm nella primavera del 2008), ai correnti tassi di produzione, potrebbe raggiungere 600 ppm entro il 2035. Questa situazione spinge a trovare vie alternative per la produzione di energia. Fortunatamente esistono varie opzioni per la produzione di energia alternative, ad es. il fotovoltaico, geotermica, solare, termico ecc. Tra le fonti rinnovabili per eccellenza può essere inclusa la produzione biologica di idrogeno. L'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Sezione di Firenze, ha negli anni recenti dato un notevole impulso alle ricerche sulla produzione fotobiologica d'idrogeno attraverso il progetto Idrobio (www.idrobio.it) finanziato dal MIUR a cui hanno preso parte altri istituti CNR, l'Enea, e l'Università di Firenze, Verona e Padova. Il progetto ha avuto lo scopo di esplorare la fattibilità e di individuare i punti critici del processo. Gli argomenti di cui si intensivamente concentrata l'attività di ricerca dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi- Sezione di Firenze, del Consiglio Nazionale delle Ricerche, ha riguardato 3 importanti aspetti: 1) La selezione di ceppi di microalghe per la produzione d'idrogeno; 2) Lo sviluppo di fotobioreattori su scala di laboratorio e ottimizzazione della produzione d'idrogeno; 3) Prove di produzione d'idrogeno all'esterno ovvero in condizioni di luce solare. In questa comunicazione vengono riassunti i principali risultati ottenuti.

I. SELEZIONE DI CEPPI MUTANTI DI «CHLAMYDOMONAS REINHARDTII»

Per quanto riguarda questo primo punto, l'ISE-FI ha collezionato un numero di mutanti di *Chlamydomonas reinhardtii*, la specie universalmente usata per



Fig. 1 Collezione di ceppi di *C. «reinhardtii»* recanti una mutazione a livello della proteina D1

le prove di produzione di idrogeno (fig. 1). Tutti i mutanti sono caratterizzati da una o più sostituzioni aminoacidiche, o delezioni, localizzate fra la terza e quarta elica della proteina D1, una proteina facente parte del core del fotosistema II dove svolge un ruolo cruciale nel trasporto elettronico. L'ISE-FI attualmente dispone di una collezione di 54 ceppi di *Chlamydomonas reinhardtii* ed è considerata un vero e proprio patrimonio dell'Istituto. Durante il periodo del progetto è stata confrontata la produttività di oltre 24 ceppi scelti per differenti regioni interessate alla mutazione. I risultati di produttività ottenuti sono stati confrontati rispetto al wild type (WT) e al ceppo CC124 universalmente studiato da tutti i laboratori che si occupano di produzione fotobiologica di idrogeno da microalghe (Melis et al., 2000; Kosourov e Seibert 2008; Kruse et al., 2005).

Per condurre gli esperimenti, le cellule sono state prima cresciute su mezzo di coltura completo (Tris-Acetato-Fosfato, TAP), e successivamente sono state trasferite in mezzo di coltura privo di zolfo, in modo da indurre l'abbassamento dell'attività fotosintetica e l'anaerobiosi, per permettere la sintesi e il funzionamento dell'enzima idrogenasi, deputato alla produzione di idrogeno,

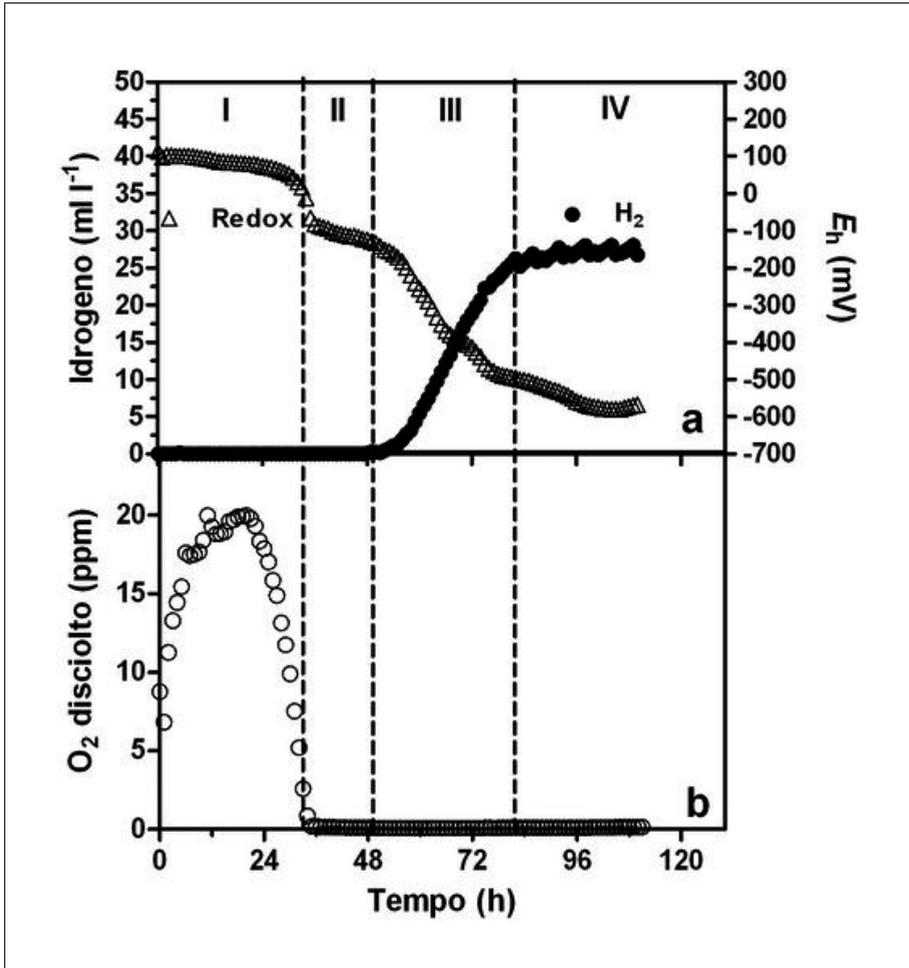


Fig. 2 Andamento dei parametri culturali durante la produzione di idrogeno nel ceppo wild type di «*Chlamydomonas reinhardtii*». Pannello a: idrogeno prodotto (□), potenziale redox (Δ); pannello b: concentrazione dell'ossigeno disciolto nella coltura (□). Le linee verticali indicano le diverse fasi del processo durante la privazione di zolfo: I) fase aerobica; II) fase di latenza; III) fase di produzione di idrogeno; IV) fine della produzione di idrogeno

estremamente sensibile all'ossigeno. Le colture private di zolfo, sono state allestite in fotobioreattori chiusi ermeticamente in modo da permettere il raggiungimento dell'anaerobiosi, nel momento in cui il tasso di evoluzione di ossigeno eguagliava quello della respirazione. In particolare durante la privazione di zolfo si possono distinguere diverse fasi: 1) fase aerobica, che corri-

CEPPI	FASE AEROBICA	FASE DI LATENZA	PERIODO DI PRODUZIONE	VOLUME TOTALE DI H ₂ PRODOTTO	TASSO DI PRODUZIONE MEDIO	TASSO DI PRODUZIONE MASSIMO
	(h)	(h)	(h)	(ml l ⁻¹)	(ml l ⁻¹ h ⁻¹)	(ml l ⁻¹ h ⁻¹)
WT	34 ± 1	16 ± 5	55 ± 5	26 ± 5	0.47 ± 0.11	1.25 ± 0.13
D240	2 ± 1	26 ± 4	207 ± 40	318 ± 23	1.54 ± 0.31	3.54 ± 0.26
D239-40	3 ± 2	30 ± 1	183 ± 30	475 ± 50	2.60 ± 0.18	7.10 ± 1.10
L159I/N230Y	0.0	37 ± 6	285 ± 53	504 ± 22	1.81 ± 0.35	6.01 ± 0.24
CC124	20 ± 1	1 ± 0.5	53 ± 4	99.7 ± 11.5	1.51 ± 0.04	2.23 ± 0.32

Tab. 1 *Produzione d'idrogeno ottenuta con il wild type (WT), e con alcuni ceppi di mutanti D1 di «C. reinhardtii». A titolo di comparazione è riportata anche la produzione d'idrogeno ottenuta con il ceppo CC124 normalmente usato per esperimenti di produzione d'idrogeno in differenti laboratori nel mondo. Sono mostrati i valori della deviazione standard (±SD)*

sponde al periodo di tempo necessario per raggiungere l'anaerobiosi; 2) fase di latenza, prima che inizi il processo di produzione di idrogeno, una volta raggiunta l'anaerobiosi; 3) fase di produzione di idrogeno (fig. 2).

I risultati hanno chiaramente dimostrato la netta superiorità nella produzione di idrogeno ottenuta con alcuni mutanti D1. In alcuni casi (es. ceppo L159I-N230Y) la produttività è aumentata di oltre un ordine di grandezza rispetto al WT e di oltre 5 volte rispetto al CC124. In tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti con alcuni ceppi mutanti che hanno mostrato le migliori prestazioni in termini di produzione di idrogeno. Le produttività ottenute con i ceppi mutanti sono confrontati con il wild type, e con il ceppo CC124. I ceppi dotati di elevata produttività sono stati caratterizzati fenotipicamente rispetto al WT. Essi sono caratterizzati da: 1) capacità di accumulare elevate quantità di carboidrati utilizzabili per la produzione d'idrogeno per via fermentativa; 2) un sistema di fotoprotezione più efficiente (elevata induzione del ciclo delle xantofille); 3) un contenuto più elevato di proteina D1; 4) una più elevata capacità fotosintetica e respiratoria (Torzillo et al., 2009; Faraloni e Torzillo, 2010).

2. SVILUPPO DI FOTOBIOREATTORI SU SCALA DI LABORATORIO E OTTIMIZZAZIONE DELLA PRODUZIONE DI IDROGENO

Un altro aspetto particolarmente studiato ha riguardato l'ottimizzazione delle condizioni colturali per l'ottenimento di elevate rese in idrogeno in ben definite condizioni di laboratorio. Allo scopo di ottimizzare la produzione di idrogeno sono state studiate differenti combinazioni fra intensità luminosa incidente e concentrazioni di clorofilla della coltura. Gli esperimenti sono

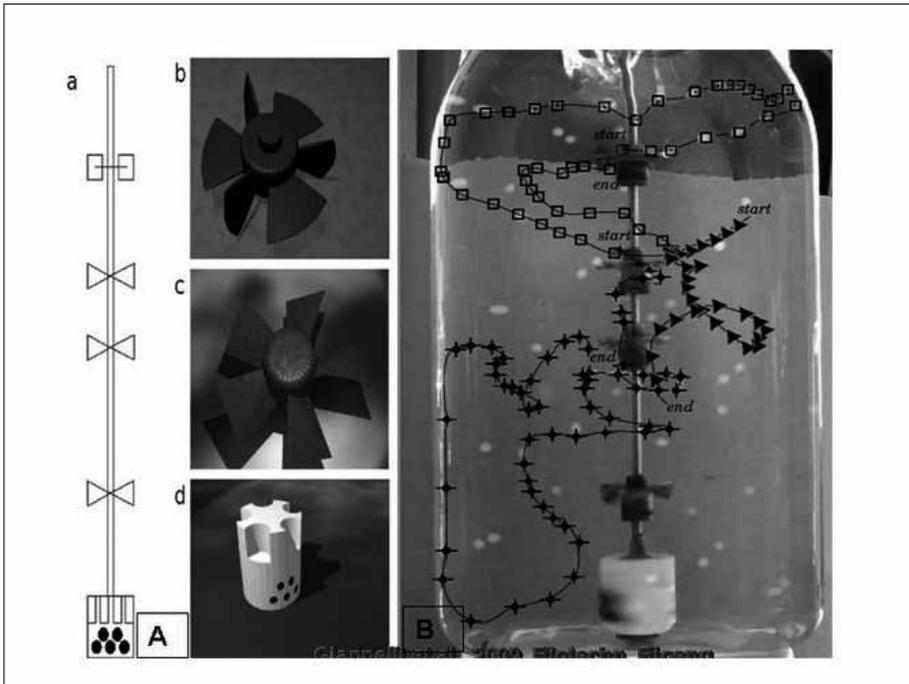


Fig. 3 A. Schema della girante utilizzata per il rimescolamento delle colture a) vista laterale, b, d. turbine rushton, c. turbina a pale inclinate. B. Esempio di traiettorie percorse da particelle sottoposte a mescolamento dalla turbina calcolate usando tecniche di analisi d'immagine. (from Giannelli et al., (2009) with permission)

stati compiuti paragonando due sistemi di agitazione della coltura. Uno ottenuto utilizzando il sistema classico dell'ancorina magnetica sul fondo della bottiglia, l'altro utilizzando una girante dotata di turbine appropriatamente disegnate in grado di sottoporre le cellule a un adeguato ciclo luce-buio in modo da migliorare l'efficienza di conversione della luce in idrogeno (fig. 3). Secondo i nostri calcoli idrodinamici, le cellule sono sottoposte a cicli luce-buio sufficientemente corti (circa 50 ms) in modo da utilizzare almeno parzialmente l'effetto flash (Giannelli et al., 2009). Entrambi i reattori, volume 1.1 litri, sono stati connessi a un sistema completamente computerizzato per il controllo dei parametri colturali e la rilevazione *on-line* dell'idrogeno prodotto (fig. 4). I risultati di questi esperimenti sono mostrati in tabella 2.

Risulta evidente che la migliore combinazione fra intensità di luce incidente e contenuto in clorofilla della coltura è risultata $140 + 140 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiati su entrambe le facce del reattore, in combinazione con 24 mg l^{-1} di clorofilla. In base alle misure di assorbanza della coltura, con concentrazioni di



Fig. 4 Apparato utilizzato nello studio di produzione di idrogeno con microalghe. Si possono osservare: fotobioreattore; bottiglia intermedia per la conversione gas (H_2) liquido; bottiglia per l'accumulo del liquido (acqua); sonde il monitoraggio e memorizzazione dei parametri colturali e interfaccia; bilancia elettronica per la misura dell'equivalente idrogeno prodotto

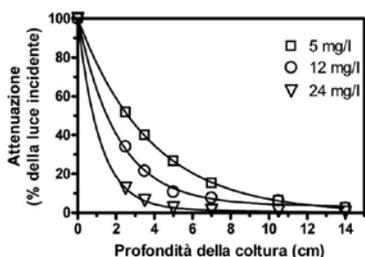


Fig. 5 Misure di attenuazione della luce effettuate in colture di «*Chlamydomonas reinhardtii*» (ceppo CC124) con differenti concentrazioni di clorofilla

clorofilla di 24 mg l^{-1} , il 90% della luce incidente è assorbita entro 2,5 cm dello spessore del reattore (5 cm) (fig. 5). Questa condizione ottimale ha permesso di innalzare di oltre il 50% la resa in idrogeno (Giannelli et al., 2009).

Dai risultati riassunti in tabella 3, risulta evidente che la più alta efficienza è ottenuta con colture con più elevata concentrazione di clorofilla oppure

CONDIZIONI COLTURALI		SISTEMA DI AGITAZIONE DELLA COLTURA	PRODUTTIVITÀ TOTALE (REATTORE I LITRO)	PRODUTTIVITÀ ORARIA (ml h ₂ l ⁻¹ h ⁻¹)		PRODUTTIVITÀ ORARIA (ml h ₂ g ⁻¹ chl h ⁻¹)	
PPD (μmol fotoni m ⁻² s ⁻¹)	CHL (mg l ⁻¹)			MEDIA	MASSIMA	MEDIA	MASSIMA
70 + 70	12	ancorina	99.7 ± 11	0.99 ± 0.11	2.23 ± 0.32	82.5 ± 9.2	185.8 ± 27
	12	girante	87.2 ± 8	1.39 ± 0.04	2.44 ± 0.23	115.8 ± 3.3	203.3 ± 19
70 + 70	24	ancorina	82.1 ± 26	0.98 ± 0.34	1.90 ± 0.07	40.8 ± 14.2	79.2 ± 3
	24	girante	132.9 ± 18	2.05 ± 0.28	2.87 ± 0.51	85.4 ± 11.7	119.6 ± 21
140 + 140	12	ancorina	48.8 ± 29	0.78 ± 0.39	1.61 ± 0.12	65.0 ± 32.5	134 ± 10
	12	girante	95.0 ± 26	1.35 ± 0.38	2.38 ± 0.18	112.5 ± 32	198.3 ± 15
140 + 140	24	ancorina	118.9 ± 2	2.49 ± 0.04	3.72 ± 0.30	103.8 ± 1.7	155 ± 16
	24	girante	167.6 ± 17	4.02 ± 0.21	5.66 ± 0.05	167.5 ± 8.5	236 ± 2.1

Tab. 2 Riassunto delle produttività di idrogeno osservate in differenti combinazioni fra intensità luminosa incidente e concentrazione di clorofilla della coltura. I dati rappresentano la media di 4-10 indipendenti esperimenti (±SD)

CONDIZIONI COLTURALI		VALORI MEDI DI EFFICIENZA (%)		VALORI MASSIMI DI EFFICIENZA (%)	
PPD (μmol fotoni m ⁻² s ⁻¹)	CONTENUTO IN CLOROFILLA (mg l ⁻¹)	SISTEMA DI AGITAZIONE		SISTEMA DI AGITAZIONE	
		ANCORINA	TURBINA	ANCORINA	TURBINA
70 + 70	12	0.468	0.547	1.26	1.42
70 + 70	24	0.477	0.965	1.10	1.67
140 + 140	12	0.150	0.265	0.46	0.69
140 + 140	24	0.563	0.805	1.08	1.64

Tab. 3 Efficienza di conversione dell'energia luminosa in idrogeno misurata in colture di «*Chlamydomonas reinhardtii*» ceppo CC124 in differenti condizioni di luce e contenuto in clorofilla

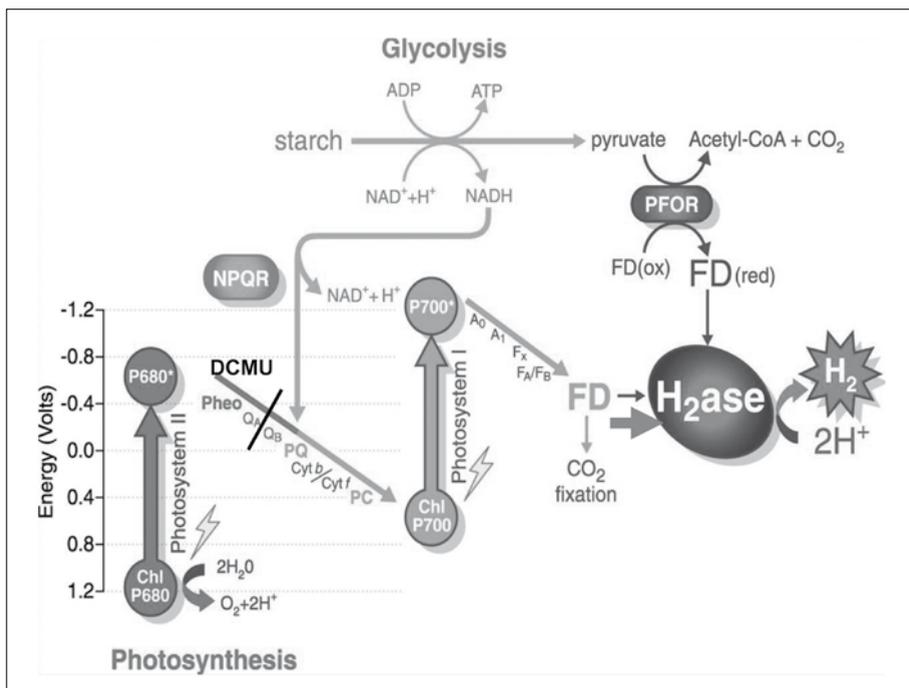


Fig. 6 Possibili vie metaboliche utilizzate dalla microalga «*Chlamydomonas reinhardtii*» per la produzione di idrogeno. La produzione di idrogeno attraverso la fotosintesi diretta può essere bloccata dall'aggiunta dell'erbicida DCMU che blocca il trasporto elettronico fra in semichinone Q_A al Q_B

esponendo le colture a bassa illuminazione, in entrambi i casi le colture sono nella fase fotolimitata di attività fotosintetica. Comunque, il raggiungimento di una elevata efficienza fotosintetica per sé non è una condizione sufficiente a realizzare elevate produzioni di idrogeno. Per questo motivo sono state sperimentate illuminazioni superiori a quelle necessarie per saturare la fotosintesi in combinazione con elevate concentrazioni. È importante osservare che il mantenimento di una elevata efficienza passando da $70+70 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.965 %) a $140+140 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.805 %), è ottenuto con colture agitate con il sistema a turbina in grado di realizzare appropriati cicli luce-buio nello spessore della coltura. I risultati hanno anche messo in evidenza che con il ceppo CC124 è possibile realizzare livelli di efficienza fotosintetica pari a circa 1,64 % (Giannelli et al., 2009).

Deve essere inoltre fatto osservare che i valori riportati sono stati ottenuti con colture sottoposte a privazione di zolfo, secondo il metodo Melis et al. (2000), con attività residua del fotosistema II ridotta a circa il 10% del valore

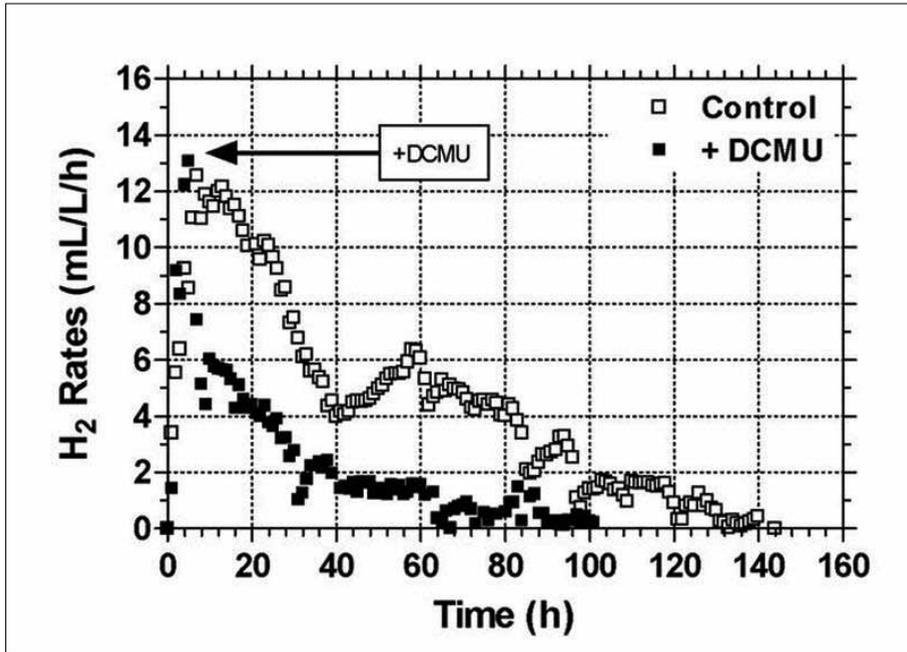


Fig. 7 Effetto dell'aggiunta di DCMU sui tassi di produzione di idrogeno in L159I-N230Y. T_0 = inizio produzione di idrogeno. L'area sottostante il tracciato contrassegnato con i quadrati pieni (\blacksquare) indica il contributo della fotofermentazione nella produzione d'idrogeno, mentre l'area compresa fra il tracciato rappresentato da quadrati vuoti e pieni indica il contributo del fotosistema II

potenziale. Come è noto, la privazione di zolfo e la conseguente riduzione di attività del fotosistema II, in mancanza di una idrogenasi resistente all'ossigeno, rappresenta per ora l'unica via praticabile per produrre idrogeno in modo apprezzabile.

2.1 Fotosintesi diretta e indiretta: il contributo diretto del PSII

La produzione di idrogeno in *Chlamydomonas reinhardtii* si realizza sia attraverso il contributo diretto del fotosistema II (attraverso la scissione dell'acqua) che indiretto attraverso il metabolismo dei carboidrati accumulati durante la fase aerobica di privazione di zolfo (fig. 6). Anche la degradazione delle proteine contribuisce a generare potere riducente successivamente utilizzato per la produzione di idrogeno, ma il loro contributo è nettamente inferiore rispetto a quello dei carboidrati. È di notevole importanza sia dal

punto di vista scientifico che applicativo valutare il contributo delle due vie. Il diverso contributo diretto del PSII alla produzione di idrogeno è stato valutato nel ceppo L159I-N230Y, il più produttivo presente nella nostra collezione di ceppi di *Chlamydomonas reinhardtii*. Questo ceppo è in grado di accumulare notevoli quantità di carboidrati durante la fase aerobica di privazione di zolfo che precede la produzione d'idrogeno. L'esperimento è stato messo a punto aggiungendo DCMU (concentrazione finale 10^{-5} M) al momento del raggiungimento dei tassi massimi. Il DCMU è un inibitore specifico della fotosintesi che blocca il passaggio degli elettroni a monte del plastochinone, riducendo la produzione di idrogeno alla sola via fermentativa. Non appena il DCMU è stato addizionato alla coltura, la fluorescenza (F_v/F_m) è crollata a zero nel giro di pochi secondi (dati non mostrati). L'aggiunta di DCMU ha causato un repentino abbassamento del tasso di produzione di H_2 di oltre il 50% (da 13 a 6 ml H_2 l⁻¹ h⁻¹) riducendo la produzione totale del 60% (da 622 a 244 ml H_2 l⁻¹) (fig. 7). I risultati ottenuti hanno dimostrato come il PSII rivesta un ruolo chiave per l'ottenimento di elevati tassi di produzione e quindi più alte produttività totali. Il contributo del PSII alla produzione totale di idrogeno trovato da noi, è risultato del 50%, valore significativamente inferiore a quello riportato da Ghirardi et al. (2000) utilizzando il ceppo CC124 (80%). È evidente che il contributo del PSII può variare da ceppo a ceppo in funzione della capacità di accumulo di carboidrati.

2.2 Produzione di idrogeno da biomasse di *Chlamydomonas reinhardtii* cresciute su acque di vegetazione pretrattate

La possibilità di produrre idrogeno con *Chlamydomonas reinhardtii* attraverso il metabolismo dei carboidrati rappresenta una interessante prospettiva in quanto questo organismo in condizioni di carenze nutrizionali (in particolare azoto) indirizza l'attività fotosintetica principalmente verso la sintesi di carboidrati. L'accumulo di carboidrati incrementa ulteriormente se alla carenza di nutrienti è accoppiata la presenza di un eccesso di sostanze organiche a basso peso molecolare, quali acetato, malato, e zuccheri semplici.

Una prospettiva per la crescita di colture microalgali è rappresentata dall'utilizzo di acque reflue di varia provenienza (reflui oleari, industriali, civili) che risultano ricche di substrati organici, quali zuccheri, acidi volatili, polialcol e grassi. Sono infatti noti studi sulla crescita delle microalghe *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* e *Chlorella* su acque reflue, per la rimozione di nutrienti presenti

COMPOSIZIONE		TAP	TAP-OMW
Carboidrati	% su peso secco	18.8 ± 1.9	32.6 ± 1.3
Proteine		68.44 ± 2.32	53.87 ± 1.25
Chl/DW ratio	%	3.9 ± 0.04	3.5 ± 0.02
Composizione elementare			
C	%	53.55 ± 0.03	52.22 ± 1.08
N		10.95 ± 0.37	8.62 ± 0.20
H		7.11 ± 0.20	7.08 ± 0.01
S		3.37 ± 0.38	4.34 ± 0.60
O		25.01 ± 0.76	27.74 ± 0.68
C/N ratio		4.81 ± 0.03	6.06 ± 0.02
Grado di riduzione		43.4 ± 1.53	43.0 ± 0.97

Tab. 4 *Caratterizzazione biochimica di cellule di «Chlamydomonas reinhardtii» cresciute su mezzo standard (TAP) e acque reflue olearie diluite al 50 % con TAP (TAP-OMW), in fase esponenziale di crescita. Ogni valore rappresenta la media di tre diversi esperimenti (± SD)*

in eccesso, quali azoto e fosforo, e per la produzione di biomassa a elevato valore aggiunto (Aziz et al., 1992; Kong et al., 2010; Hodaifa et al., 2008; Pinto et al., 2008).

In particolare è risultato interessante utilizzare per la crescita di *C. reinhardtii* acque di vegetazione olearie trattate (OMW). Questi reflui, essendo ricchi di composti organici, tra i quali glucosio, fruttosio, e acidi organici (acido acetico, lattico, malico, succinico, citrico), e con una scarsa quantità di azoto totale, sono caratterizzati da un elevato rapporto carbonio-azoto (C/N). Le acque di vegetazione pre-trattate sono state utilizzate per la crescita del ceppo CC124 di *C. reinhardtii*, allo scopo di ottenere della biomassa da utilizzare per la produzione di idrogeno. Le colture sono state cresciute su un mezzo di coltura ottenuto diluendo al 50% il mezzo standard usato per la crescita di *C. reinhardtii* (TAP) con acqua di vegetazione olearia trattata, precedentemente diluita con acqua distillata, per ottenere un COD di circa 5000, mantenendo un elevato rapporto C/N di 268. La composizione del mezzo così ottenuto ha influenzato il metabolismo cellulare, che durante la crescita è stato diretto verso la produzione di carboidrati. La biomassa cresciuta utilizzando TAP diluito con OMW è risultata particolarmente arricchita in carboidrati di circa il 30 % in più, rispetto alle colture cresciute in mezzo TAP (32,6% e 18,8% di carboidrati su peso secco, rispettivamente) (tab. 4). Queste cellule, poste in condizioni di privazione di zolfo, hanno mostrato una miglior resa in termini sia di tassi di produzione che di volume totale di biogas (150 ml H₂ in TAP(50%)-OMW(50%) e 100 ml (100% TAP)) (fig. 8). Il maggior contenuto in

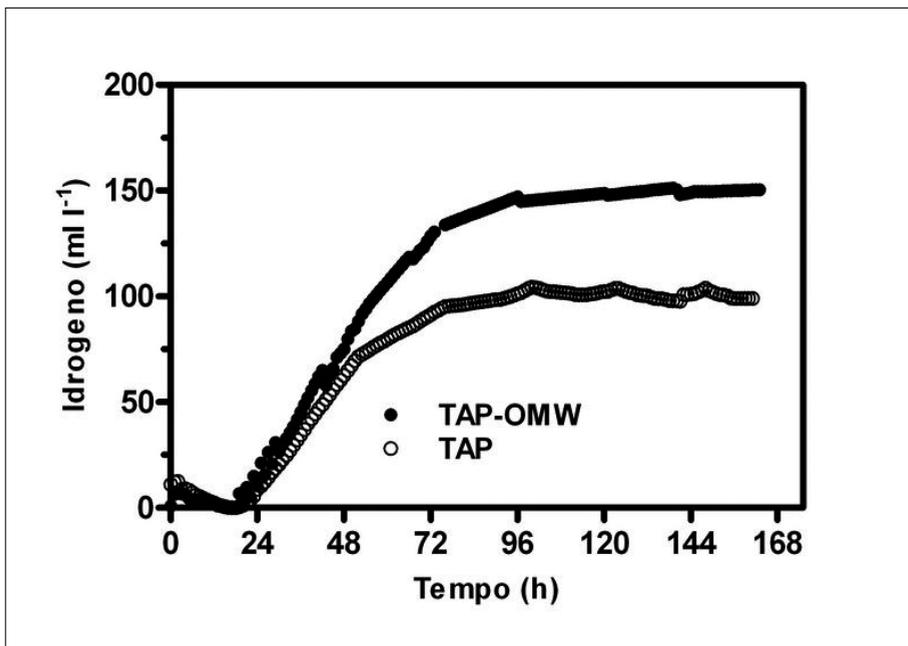


Fig. 8 Andamento della produzione di idrogeno nel ceppo di «*Chlamydomonas reinhardtii*» CC124 con cellule cresciute in mezzo composto da acque di vegetazione olearie diluite al 50% con mezzo standard (TAP-OMW) e nelle colture di controllo (TAP)

carboidrati in queste colture, costituendo il substrato della respirazione, ha contribuito alla minor durata della fase aerobica, con una anticipata induzione della fase di produzione di idrogeno, rispetto alla coltura di controllo. Inoltre, la fase produttiva è stata più lunga, sempre per il maggior contributo dei carboidrati che hanno mantenuto l'anaerobiosi, e hanno fornito potere riducente per la produzione di idrogeno (biofotolisi indiretta).

Alla fine del processo produttivo, il consumo totale di carboidrati è risultato maggiore nelle colture precedentemente cresciute su TAP diluito con OMW, evidenziando che la maggior produzione di idrogeno in queste colture è stata sostenuta dal contributo dei carboidrati.

3. SPERIMENTAZIONE ALL'APERTO IN FOTOBIOREATTORI

Una parte importante dell'attività di ricerca condotta dall'ISE-FI ha riguardato lo scale-up della produzione di idrogeno da prototipi di fotobioreattori laboratorio del volume di 1 litro fino a volumi di 50-100 litri. La sperimen-



Fig. 9 *Colture di «Chlamydomonas reinhardtii» durante la crescita in condizioni di laboratorio*

tazione è stata in un primo tempo effettuata in fotobioreattori convenzionali opportunamente riadattati per la produzione di idrogeno e successivamente utilizzando fotobioreattori appositamente disegnati con caratteristiche costruttive completamente nuove.

3.1 *Crescita delle colture per l'inoculo del reattore*

L'inoculo per il fotobioreattore all'esterno è stato inizialmente cresciuto in laboratorio. La prima fase di crescita è stata effettuata come di consueto in colonne di vetro con volume di 400 ml. Le colture sono state cresciute in mezzo TAP completo, esposte a una irradiazione costante di $70 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per lato (lampade OSRAM, Dulux L), alla temperatura di 28°C . L'agitazione delle colture è stata realizzata mediante insufflazione di una miscela di aria/ CO_2 (98,5/1,5; v/v). In seguito, la coltura è stata scalata in bottiglioni di vetro Pyrex dal volume di 5 e 10 litri. In questo caso, la luce è stata incrementata a circa $600 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per lato e la CO_2 è stata aumentata al 3%. Queste ultime fasi di crescita sono state necessarie per incrementare la biomassa al fine di ottenere un volume di coltura sufficiente per l'inoculo del reattore all'esterno. Tutti i passaggi sono stati compiuti salvaguardando la sterilità della coltura. Alcune immagini descrittive di questa fase di crescita sono riportate in figura 9.



Fig. 10 *Fotobioreattore tubolare utilizzato per la crescita e produzione d'idrogeno all'esterno con colture di «Chlamydomonas» reinhardtii*

3.2 *Esperimenti di produzione d'idrogeno in fotobioreattore tubolare da 50 litri*

Il PBR tubolare, è costituito da una serie di 10 tubi paralleli in Pyrex, della lunghezza di 2 metri ciascuno (diametro interno 4,85 cm), connessi da delle curve in PVC a formare un circuito lungo complessivamente 23 metri. Il fotobioreattore è posto orizzontalmente dentro una vasca (300 litri) in acciaio (misure 120-240-20 cm) piena d'acqua per la termostatazione della coltura. La circolazione della coltura è realizzata con una pompa centrifuga a palette a basso numero di giri appositamente disegnata allo scopo di ridurre il più possibile il danneggiamento delle cellule. Una visione generale del fotobioreattore è riportato in figura 10.

Il monitoraggio e controllo dei parametri colturali durante gli esperimenti è stato effettuato utilizzando un software sviluppato da Chemitec (Scandicci, Firenze), precedentemente sperimentato con colture di laboratorio, grazie al quale parametri colturali pH, ossigeno disciolto, potenziale redox, temperatura e produzione di biogas sono stati registrati in continuo.

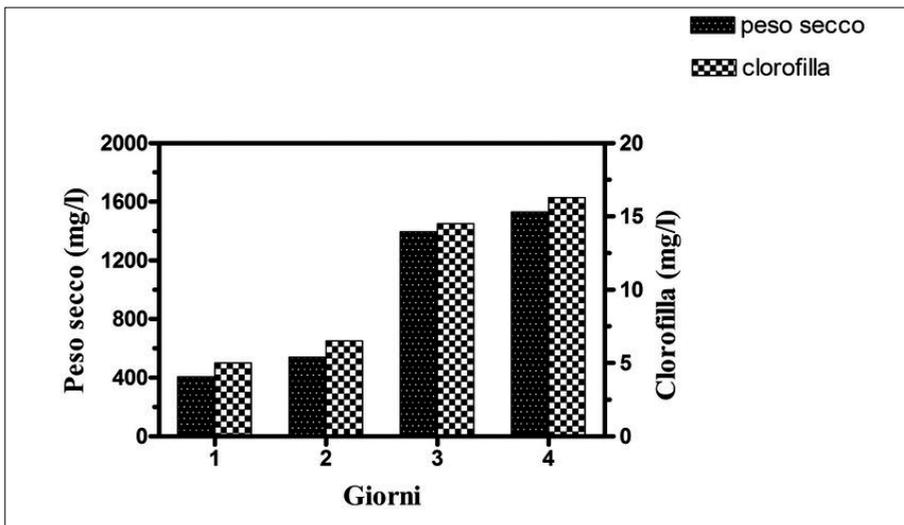


Fig. 11 Curva di crescita di una coltura di «*C. reinhardtii*» mutante L159I-N230Y secondo il peso secco e la clorofilla cresciuta all'aperto in fotobioreattore tubolare

3.2.1 Crescita del ceppo L159I-N230Y di *C. reinhardtii* all'aperto

La sperimentazione all'esterno è stata condotta utilizzando vari ceppi. Qui di seguito sono mostrati i risultati della sperimentazione con il ceppo L159I-N230Y, uno dei ceppi mutanti di *C. reinhardtii* più produttivi in esperimenti di laboratorio. Una curva di crescita all'esterno in biomassa e clorofilla del ceppo mutante di *C. reinhardtii* L159I-N230Y è mostrata in figura 11.

Dopo 4 giorni di crescita è stato raggiunto un peso di $1,6 \text{ g l}^{-1}$, nello stesso intervallo di tempo il contenuto in clorofilla (Chl) ha raggiunto è pari a circa 16 mg l^{-1} . Il contenuto percentuale di clorofilla rispetto al peso secco è stato circa l'1%. Questo valore è inferiore alle colture cresciute in laboratorio e dimostra che all'aperto le colture si acclimatano all'alta luce diminuendo il contenuto di clorofilla. Questo è un vantaggio in quanto la riduzione di clorofilla per unità di peso secco e per cellula permette una migliore penetrazione della luce nello spessore della coltura (Torzillo et al., 2009).

3.2.2 Esperimenti di produzione di idrogeno con il ceppo L159I-N230Y

I risultati di un esperimento di produzione di idrogeno nel fotobioreattore di 50 litri sono mostrati in figura 12. Durante la notte le colture sono state

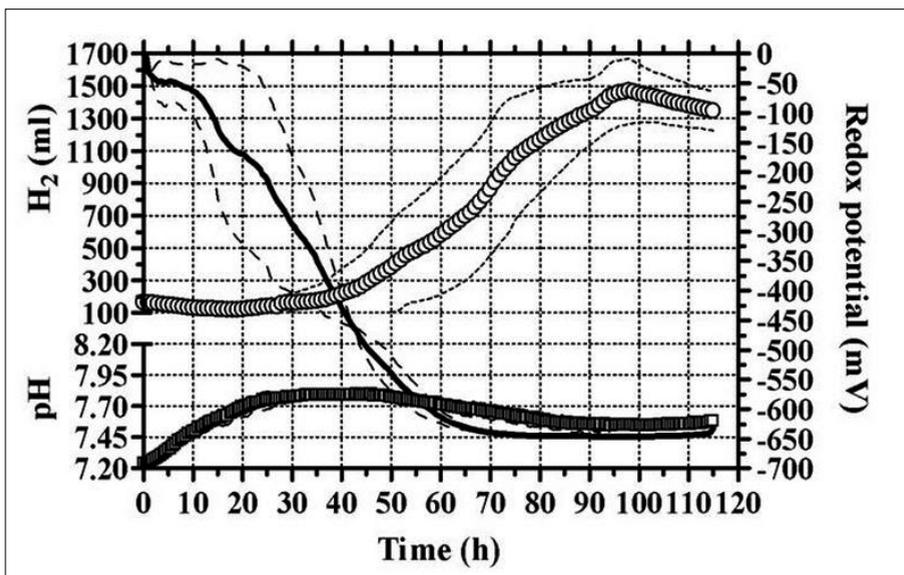


Fig. 12 Cambiamenti culturali caratteristici in una coltura di «*C. reinhardtii*» del mutante L159I-N230Y durante la produzione di idrogeno (coltura a 6 mg l⁻¹ di chl). Durante la notte la coltura è stata irradiata con 200 μmoli fotoni m⁻² s⁻¹. Quadrato vuoto, pH; cerchio vuoto, idrogeno; linea continua, potenziale redox. La linea tratteggiata indica la deviazione standard

illuminate con luce artificiale allo scopo di non interrompere la produzione d'idrogeno.

La produzione di idrogeno è iniziata alla 40esima ora dall'inoculo e ha raggiunto 1500 ml, pari a 0,5 ml l⁻¹ coltura h⁻¹. La produttività della coltura all'esterno è risultata pari a circa il 30% di quella realizzabile in laboratorio con la stessa coltura. Vari fattori giustificano le minori prestazioni delle colture all'esterno. Rispetto alle colture di laboratorio le colture sono illuminate in modo variabile, con valori di intensità luminosa che oscillano da valori in eccesso alla saturazione della fotosintesi nel mezzo del giorno, fino a diventare foto limitante la mattina e nel pomeriggio. L'illuminazione della coltura in fotobioreattori all'aperto è meno omogenea interessando solo una faccia del reattore. Al contrario in piccoli dispositivi di laboratorio le colture sono illuminate da entrambe le facce. Inoltre, in fotobioreattori tubolari (lungi 23 metri) il tempo di miscelazione della coltura è relativamente lungo (1 ora), e ciò prolunga il tempo necessario per l'eliminazione dell'ossigeno e di conseguenza il tempo per il raggiungimento dell'anaerobiosi (Scoma et al., in press). Durante il processo il sistema di mescolamento della coltura generalmente effettuato con pompe può essere responsabile di danni alle cellule dovuti al loro continuo passaggio attraverso le valvole delle pompe.

CONCLUSIONI

Gli studi sulla produzione fotobiologica d'idrogeno effettuati nel corso di 3 anni del progetto idrobio hanno permesso di raggiungere le seguenti conclusioni.

1) La selezione di ceppi di *Chlamydomonas reinhardtii* e in particolare di mutanti recanti sostituzioni aminoacidiche al livello della proteina D1 del fotosistema II si è rivelata particolarmente efficace per migliorare la produzione d'idrogeno. Sono stati selezionati alcuni mutanti capaci di produrre quantità d'idrogeno di un ordine di grandezza superiori al ceppo selvaggio.

2) La caratterizzazione fenotipica di questi mutanti ha messo in evidenza alcune peculiarità importanti per la produzione di idrogeno. Essi sono in genere caratterizzati da un contenuto in pigmenti più basso che permette di aumentare la penetrazione della luce, e da un più elevato contenuto di carboidrati il cui metabolismo contribuisce fino al 50% nella produzione d'idrogeno.

3) Gli esperimenti hanno messo in evidenza che certe acque di scarico, caratterizzate da un elevato rapporto carbonio – azoto (es. acque di vegetazione pretrattate), rappresentano substrati ideali per la produzione di biomasse ricche in carboidrati che successivamente vengono degradati per produrre idrogeno. Questi risultati aprono interessanti prospettive future.

3) La produzione di idrogeno all'esterno sotto luce artificiale è risultata pari a circa il 30% di quella realizzata in laboratorio. La disomogeneità dell'illuminazione delle colture sembra la ragione più importante che ne limita la produttività. Sotto questo aspetto la ricerca è appena all'inizio essendo le prove presentate in questa comunicazione le prime effettuate a livello mondiale.

4) La necessità di effettuare le prove di produzione di idrogeno con colture private di zolfo, per garantire l'anaerobiosi, condizione essenziale per il funzionamento dell'enzima idrogenasi, limita fortemente il processo produttivo specialmente all'esterno in cui i volumi di coltura da trattare per eliminare lo zolfo sono notevoli.

In conclusione, mentre il limite teorico di efficienza per la produzione fotosintetica d'idrogeno è fissato intorno al 10% della luce solare totale, i migliori ceppi a disposizione, in laboratorio, hanno raggiunto circa l'1.35%. Detta efficienza cala a meno dell'1% in condizioni di coltura all'esterno. La causa principale che determina la scarsa efficienza delle colture è la necessità di usare colture private di zolfo che abbassano l'efficienza del PSII a meno del 10% delle sue potenzialità.

Sono in corso prove presso il nostro istituto per ridurre il forte gap tuttora esistente fra produzione teorica ed effettiva progettando un nuovo disegno di fotobioreattore in grado di illuminare uniformemente le colture.

RINGRAZIAMENTI

Le ricerche condotte presso l'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi del CNR sono state finanziate dal MIUR, Progetto FISR, Hydrobio, contratto numero 1756. Parziale supporto è stato ottenuto dall'Ente Cassa di Risparmio di Firenze nell'ambito del Progetto Firenze Hydrolab, (progetto *motu proprio*).

RIASSUNTO

La produzione di idrogeno mediante l'uso di microalghe può essere considerata una via sostenibile per la produzione di energia rinnovabile. La selezione di ceppi della microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, mutati a livello della proteina D1 del fotosistema II, ha permesso di innalzare la produzione d'idrogeno di un ordine di grandezza rispetto al ceppo selvaggio. Inoltre, sono stati effettuati esperimenti di produzione di biomasse di microalghe utilizzando come substrato di crescita le acque di vegetazione preventivamente trattate allo scopo di eliminare i polifenoli. I risultati hanno messo in evidenza un incremento del 50% della produzione di idrogeno. Le biomasse cresciute su acque di vegetazione pretrattate hanno mostrato un elevato contenuto in carboidrati che sono stati successivamente fermentati contribuendo in tal modo al significativo aumento di produttività. La produzione di idrogeno è stata anche studiata in fotobioreattori di relativamente elevato volume (50-100 litri). La produzione d'idrogeno è risultata pari a circa il 30% di quella realizzata in fotobioreattori a scala di laboratorio. L'obiettivo futuro è quello di ridurre il forte gap tuttora esistente fra produzione teorica ed effettiva progettando un nuovo disegno di fotobioreattore in grado di illuminare uniformemente le colture.

ABSTRACT

The photobiological production of hydrogen is considered a renewable source of energy. The screening of strains of the microalga *C. reinhardtii* carrying mutations at the level of D1 protein of photosystem II has allowed to increase the hydrogen productivity by an order of magnitude with respect to the wild type. Other experiments have shown a 50% increase in the production of hydrogen, using cells grown on pretreated olive mill waste waters (OMWW). The OMWW are characterized by a high carbon to nitrogen ratio, which represents an optimal condition for the production of microalgal biomass rich in carbohydrates, which can be fermented to sustain the hydrogen production. Encouraging results of hydrogen production were also obtained in large scale reactors (50-100 litres). However, the production was approximately 30% of than achieved in laboratory photobioreactors. The non homogeneous illumination of the cultures seems to be one of the most important reasons limiting hydrogen output. The future goal is to reduce the gap still existing between theoretical and actual hydrogen production by planning a new design of photobioreactor which can evenly illuminate the cultures.

BIBLIOGRAFIA

- AZIZ M.A. AND NG W.J. (1992): *Feasibility of wastewater treatment using the activated-algae process*, «Bioresource Technology», 40, pp. 205-208.
- FARALONI C., TORZILLO G. (2010): *Phenotypic characterization and hydrogen production in Chlamydomonas reinhardtii Q_b binding D1 protein mutants under sulfur starvation: changes in chlorophyll fluorescence and pigment composition*, «Journal of Phycology», 46 (4), pp. 788-799.
- GIANNELLI L., SCOMA A., TORZILLO G. (2009): *Interplay between light intensity, chlorophyll concentration and culture mixing on the hydrogen production in sulphur-deprived Chlamydomonas reinhardtii cultures grown in laboratory photobioreactors*, «Biotechnol. Bioeng.», 104, pp. 76-90.
- KONG Q., LI L., MARTINEZ B., CHEN P., RUAN R. (2010): *Culture of microalgae Chlamydomonas reinhardtii in wastewaters for biomass feedstock production*, «Appl Biochem Biotechnol», 160, pp. 9-18.
- HODAIFA G., MARTINEZ M.E., SÁNCHEZ S. (2008): *Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of Scenedesmus obliquus*, «Biores Biotechnol», 99, pp. 1111-1117.
- PINTO G., POLLIO A., PREVITERA L., STANZIONE M., TEMUSSI F. (2003): *Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae*, «Biotechnol Lett.», 25, pp. 1657-1659.
- TORZILLO G., SCOMA A., FARALONI C., ENA A., JOHANNINGMEIER U. (2009): *Increased hydrogen photoproduction by means of a sulfur-deprived Chlamydomonas reinhardtii D1 protein mutant*, «Int. J. Hydrogen Energy», 34, pp. 4529-4536.
- KOSOurov S., SEIBERT M. (2008): *Hydrogen photoproduction by nutrient-deprived Chlamydomonas reinhardtii cells immobilized within alginate films under aerobic and anaerobic conditions*, «Biotechnol. Bioeng.», 102, pp. 50-58.
- KRUSE O., RUPPRECHT J., BADER K.P., THOMAS-HALL S., SCHENK P.M., FINAZZI G., HANKAMER B. (2005): *Improved Photobiological H_2 Production in Engineered Green Algal Cells*, «J. Biol. Chem.», 280 (40), pp. 34170-34177.
- MELIS A., ZHANG L., FORESTIER M., GHIRARDI M.L., SEIBERT M. (2000): *Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*, «Plant Physiol.», 122, pp. 127-136.
- SCOMA A., GIANNELLI C., TORZILLO G. (2011): *Outdoor hydrogen production in a 50-L tubular photobioreactor by means of a sulfur-deprived culture of the microalga Chlamydomonas reinhardtii*, «J. Biotechnol.» (in press).