



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00563**

(22) Data de depozit: **25.07.2013**

(41) Data publicării cererii:  
**27.02.2015** BOPI nr. 2/2015

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE  
CLUJ FILIALĂ A INCDSB BUCUREȘTI,  
STR. REPUBLICII NR.48, CLUJ-NAPOCA,  
CJ, RO

(72) Inventatori:  
• COMAN CRISTIAN, STR.RĂȘĂRITULUI  
NR.104, AP.11, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• DRUGĂ BOGDAN, STR. MEHEDIŢI  
NR.61, AP.120, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• HEGEDUS ADRIANA, STR. FLORILOR  
NR.164, AP.24, FLOREȘTI, CJ, RO;  
• MITULEȚU MIHAI, STR.CAREI NR.28,  
AP.4, TIMIȘOARA, TM, RO;  
• SICORA COSMIN, STR. STADIONULUI  
NR.2A, AP.12, JIBOU, SJ, RO

(54) **TULPINĂ DE ANABAENOPSIS SP. ȘI METODĂ  
ÎMBUNĂTĂȚITĂ DE PRODUCERE A HIDROGENULUI  
DIZOLVAT PRIN CULTIVAREA ACESTEIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o tulpină de *Anabaenopsis sp* și la o metodă îmbunătățită de producere a hidrogenului dizolvat prin cultivarea acesteia. Tulpina de *Anabaenopsis sp*. AICB 717 depozitată în cultură pură la *Culture Collection of Algae and Protozoa*, cu numărul de depozit CCIP 1402/2, este caracterizată prin capacitate crescută de producere a hidrogenului. Metoda conform invenției constă din cultivarea tulpinii pe mediu de cultură BG-11 modificat, concentrarea culturii, barbotarea acesteia cu argon timp de 15 min, pentru insta-

larea microaerobiozei, reglarea pH la valoarea 8, urmată de incubarea în fiole ermetice închise, timp de 1 h la o intensitate luminoasă de  $150 \mu\text{mol xm}^{-2}\text{xs}^{-1}$  și 23 h la întuneric la temperatura de  $23^\circ\text{C}$ , care conduce la creșterea cantității de hidrogen dizolvat de la  $1,5 \mu\text{mol/mg}$  la  $3,25 \mu\text{mol/mg}$  clorofilă.

Revendicări: 2  
Figuri: 9



42

## TULPINĂ DE *ANABAENOPSIS* SP. ȘI METODĂ ÎMBUNĂTĂȚITĂ DE PRODUCERE A HIDROGENULUI DIZOLVAT PRIN CULTIVAREA ACESTEIA

Prezentul brevet de invenție se referă la o tulpină cianobacteriană de *Anabaenopsis* sp. cu potențial ridicat de producere a biohidrogenului și la o metodă optimizată de biosinteză a acestuia.

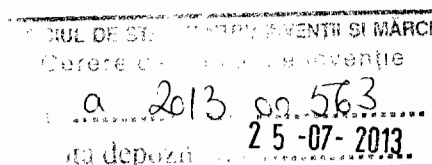
Hidrogenul este o alternativă ecologică la combustibilii fosili. Puterea energetică per unitate de masă este mai ridicată decât cel al oricărui alt combustibil convențional, cu excepția energiei nucleare. Avantajele sale ca sursă de energie sunt numeroase: este nepoluant, eficient, regenerabil, iar în producerea sa nu se generează dioxid de carbon. În virtutea atributelor sus-menționate, hidrogenul poate fi utilizat ca sursă de energie.

Implementarea la nivel industrial a unor tehnologii nepoluante, coroborată cu dezvoltarea de biotehnologii de obținere de energie verde din surse regenerabile, nepoluante (vânt, radiație solară, biomasă vegetală) reprezintă marile provocări ale secolului actual. Hidrogenul, cel mai abundent element chimic din Univers, a intrat în atenția cercetătorilor în ultimele decade datorită proprietăților sale fizico-chimice: înmagazinează cea mai mare cantitate de energie per unitatea de masă și eliberează această energie cu producere de apă, fără eliberare de produși poluanți.

Microorganismele fotosintetice producătoare de hidrogen (de ex., cianobacteriile) au fost luate în considerare datorită capacității lor de a sintetiza hidrogen într-o manieră nepoluantă. Cianobacteriile, unul dintre cele mai largi și importante grupuri de bacterii de pe Pământ, sunt capabile de fotosinteză oxigenică, utilizând apa ca și donor de electroni și sunt întâlnite în majoritatea nișelor ecologice, de la apele dulci până la cele sărate sau în mediile extreme (Whitton și Potts, 2000). În timpul fotosintezei, electronii produși sunt utilizați în ciclul Calvin pentru a fixa dioxidul de carbon sub forma unor compuși intermediari sau de rezervă. La întuneric, acești produși sunt utilizați pentru generarea de energie, ceea ce duce la producerea diversilor compuși secundari, inclusiv hidrogen.

Cercetările efectuate până în prezent la cianobacterii arată că este nevoie de o continuă identificare a unor tulpini cu potențial crescut de producere a hidrogenului și totodată de o continuă optimizare a condițiilor de creștere ale culturilor pentru îmbunătățirea ratei de producere a hidrogenului (Benemann, 1997; Kaushik și Anjana, 2011). Este foarte importantă studiarea influenței diversilor factori cheie (prezența oxigenului, lumina, temperatura etc.) asupra evoluției producerii H<sub>2</sub> (Pinto și colab., 2002).

Până în prezent nu au fost descrise în brevete de invenție tulpini de *Anabaenopsis* capabile de producere a biohidrogenului în cantități ridicate. Astfel de tulpini ar fi deosebit de utile pentru conversia dioxidului de carbon rezidual în biocombustibil sub forma hidrogenului. Literatura non-brevet descrie o serie de tulpini cianobacteriene producătoare de biohidrogen și o gamă largă de concentrații maxime obținute prin cultivarea acestora (Tabel 1). Între aceste tulpini este descrisă și cea de *Anabaenopsis circularis* IAM M-4 cu o productivitate maximă de 0,31 μmol H<sub>2</sub> /mg clorofilă.



Tabel 1

Productivitatea producerii de hidrogen la diferite tulpini cianobacteriene

Nr. crt.	Denumire	Productivitate maximă	Referințe
1.	<i>Anabaenopsis circularis</i> IAM M-4	0,31 $\mu\text{mol H}_2$ /mg clorofilă	Pinto și colab., 2002
2.	<i>Anabaena</i> sp.PCC 7120	2,6 $\mu\text{mol H}_2$ /mg clorofilă	Masukawa și colab., 2001
3.	<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX 1444	1,7 $\mu\text{mol H}_2$ /mg clorofilă	Masukawa și colab., 2001
4.	<i>Microcystis</i> sp. PCC 6830	0,16 $\mu\text{mol H}_2$ /mg clorofilă	Moezellar și colab., 1996
5.	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	2,6 $\mu\text{mol H}_2$ /mg clorofilă	Masukawa și colab., 2001
6.	<i>Nostoc muscorum</i> IAM M-14	0,60 $\mu\text{mol H}_2$ /mg clorofilă	Masukawa și colab., 2001
7.	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	0,60 $\mu\text{mol H}_2$ /mg clorofilă	Antal și Lindblad, 2005
8.	<i>Gloeobacter violaceus</i>	1,38 $\mu\text{mol H}_2$ /mg clorofilă	Moezelaar și colab., 1996

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția se referă la o tulpină de *Anabaenopsis* sp. cu potențial crescut de producere a biohidrogenului și la optimizarea procesului de obținere a hidrogenului dizolvat folosind această tulpină. Invenția este ilustrată printr-un exemplu și folosește o serie de figuri a căror descriere este:

Fig. 1. Tulpina *Anabaenopsis* AICB 717 în microscopie optică. Bara = 20  $\mu\text{m}$  (a-e, g), 10  $\mu\text{m}$  (f).

Fig. 2. Arborele filogenetic al genelor ARNr 16S ce prezintă încadrarea secvenței marker provenite de la *Anabaenopsis* sp. AICB 717 în grupul *A. nadsonii*-*A. circularis*. Arborele a fost construit folosind algoritmul Maximum Likelihood în MEGA 5.1, cu o valoare Bootstrap de 500 de replicate.

Fig. 3. Modalitatea de eșantionare a culturilor cianobacteriene în vederea măsurării cantității de  $\text{H}_2$  dizolvat și a clorofilei.

Fig. 4. Sistemul de prelevare a eșantioanelor de cultură cianobacteriană în vederea măsurării cantității de  $\text{H}_2$  dizolvat și a clorofilei.

Fig. 5. Efectul microaerobiozei/anaerobiozei, indusă prin barbotare cu argon, asupra producerii de biohidrogen de către tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis* sp. AICB 717. Cantitatea de  $\text{H}_2$  dizolvat variază între 1,02 – 2,90  $\mu\text{mol/mg}$  clorofilă, maximul fiind atins prin barbotarea cu argon a culturii timp de 15 min, urmată de incubare 24h la întuneric.

Fig. 6. Efectul ciclurilor lumină/întuneric de durată variabilă asupra producerii de biohidrogen de către tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis* sp. AICB 717, în condiții de microaerobioză. Cantitatea de  $\text{H}_2$  dizolvat variază între 1,41 – 2,88  $\mu\text{mol/mg}$  clorofilă, maximul fiind atins prin barbotarea cu argon a culturii timp de 15 min, urmată de incubarea la întuneric timp de 24 de ore, la o temperatură de 22C.

Fig. 7. Efectul ciclurilor lumină/întuneric de durată variabilă în intervalul 24D-6L/18D asupra producerii de biohidrogen de către tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis* sp. AICB 717, în condiții de microaerobioză. Cantitatea de  $\text{H}_2$  dizolvat variază între 2,05 – 2,86  $\mu\text{mol/mg}$  clorofilă, maximul fiind atins prin

barbotarea cu argon a culturii timp de 15 min, urmată de incubarea timp de 1 oră la lumină și 23 de ore la întuneric, la o temperatură de 22°C.

Fig. 8. Efectul variației pH-ului asupra producerii de biohidrogen de către tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis* sp. AICB 717, în condiții de microaerobioză. Cantitatea de H<sub>2</sub> dizolvat variază între 2,03 – 3,20 μmol/mg clorofilă, maximul fiind atins prin barbotarea cu argon a culturii timp de 15 min, urmată de incubarea la un pH 8 timp de 1 oră la lumină și 23 de ore la întuneric, la o temperatură de 22°C.

Fig. 9. Efectul influenței temperaturii asupra cantității de clorofilă în eșantioanele prelevate din cultura cianobacteriană *Anabaenopsis* sp. AICB 717 și incubate la diferite temperaturi în condiții de 1 oră lumină/23 ore întuneric, microaerobioză indusă, pH 8. Se poate observa o variație de sub 10% în intervalul 23°C-38°C și o scădere cu 25-40% în eșantioanele incubate la 43°C-48°C.

Fig. 10. Efectul influenței temperaturii asupra producerii de biohidrogen de către tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis* sp. AICB 717. Eșantioanele au fost incubate la diferite temperaturi în condiții de 1 oră lumină/23 ore întuneric, microaerobioză indusă, pH 8. Se poate observa o variație de aproximativ 30% în intervalul 23°C-38°C, cea mai mare cantitate de hidrogen (3,25 μmol/mg clorofilă) fiind obținută prin incubare la 23°C.

**Exemplu.** Tulpina *Anabaenopsis* sp. AICB 717 a fost izolată prin micromanipulare din material fitoplanctonic colectat dintr-o baltă eutrofă situată lângă localitatea Turda (jud. Cluj). A fost depozitată inițial în Colecția de Alge și Cianobacterii a Institutului de Cercetări Biologice Cluj-Napoca (AICB) pe mediul lichid BG 11.

#### Descriere morfologică și încadrare filogenetică

Tulpina *Anabaenopsis* AICB 717 se caracterizează din punct de vedere morfologic prin trichomii săi spiralați (fig. 1, c, c, d), capabili de plutire în mediul de creștere. Spirele sunt în număr redus (frecvent 1-3) datorită fragmentării trichomului. Trichomul, neînvelit de mucilagiu, este format dintr-un număr variabil de celule vegetative și include, în afara acestora, alte 2 tipuri celulare specializate: heterociste și akineți. Celulele vegetative au formă de butoiăș (fig. 1, a, b) și se divid frecvent în culturile active prin fisiune binară. La nivelul pereților transversali celulele în curs de diviziune apar cu constricții evidente. Celulele vegetative de culoare albastră-verde conțin vezicule cu gaz (aerotopi) puternic refringente în microscopia optică, care conferă citoplasmei celulelor un aspect granular (fig. 1, a, b, g). Frecvent, aerotopii apar sub forma unor granulații alungite (fig. 1, e). Dimensiunile celulelor vegetative ale acestei tulpini, măsurate în microscopia optică, au fost următoarele: lungimea – 5,3-10,1 μm (cu o valoare medie de aprox. 7,4 μm) și lățimea – 5,0-5,6 μm (cu o medie de 5,3 μm). Heterocistele apar în interiorul trichomului (intercalar) ca urmare a diviziunii asimetrice a două celule vegetative învecinate. Proheterocistele (fig 1, a, e, săgețile scurte) își pierd treptat structurile fotosintetizante (tilacoidele) și devin omogene în ceea ce privește conținutul celular. Culoare lor devine verzuie, chiar verde-gălbuie iar forma una sferică (fig. 1, a-g). Dezintegrarea trichomului la nivel heterocistelor (între heterociste) are ca finalitate dispunerea tipică a heterocistelor la capetele acestuia (fig. 1, a, b). Funcția lor în trichom (fixarea N<sub>2</sub> atmosferic) a fost bine documentată la toate cianobacteriile heterocistate. Dimensiunea heterocistelor sferice la AICB 717 a fost de 3,8-5,6 μm (cu o medie de 5,3 μm). Akineții sunt spori de rezistență și sunt rari în culturile active ale acestei tulpini. Localizarea lor este variabilă, în interiorul trichomului (fig. 1, d) sau lângă heterocistul terminal (fig. 1, e, g – marcați prin săgeți). Akineții au o formă care o aproximează pe cea sferică (fig 1, e, g) dar

au fost observați și akineți ovali (fig. 1, d, f). S-a constatat de asemenea și o variabilitate a ornamentațiilor, heterocistele putând fi (fig. 1, e, g) sau nu ornamentate (fig. 1, d, f). Dimensiunile akineților: lățimea – 9,8-10,4 μ (media 9,7 μm) și lungimea – 10,0-11,1 μm (media 10,4 μm). Prin morfologia sa tulpina AICB 717 prezintă similarități (caractere comune) cu *Anabaenopsis elenkinii*, *A. nadsonii* și *A. circularis*, toți acești taxoni fiind semnalati în această zonă geografică de către Hegewald și colab. (1975).

Analiza filogenetică pe baza genei pentru ARNr 16S nu a condus la determinarea AICB 717 până la nivel de specie (Fig. 2), secvența marker de la *Anabaenopsis* sp. AICB 717 fiind încadrată într-un grup comun format din *Anabaenopsis nadsonii* și *Anabaenopsis circularis* (Fig. 2).

Testarea producerii de hidrogen și optimizarea procesului

Pentru testarea producerii de hidrogen, tulpina cianobacterienă *Anabaenopsis* sp. AICB 717 a fost crescută pentru fiecare experiment timp de 14 zile pe mediu de cultură BG 11 modificat (Tabel 2) la 22°-23°C, iluminare continuă cu 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> și barbotare continuă cu aer.

**Tabel 2**

Mediul de cultură specific tulpinii cianobacteriene brevetate

Nr. crt.	Tulpina	Componenta	Cant.	Observații
1.	<i>Anabaenopsis</i> sp. AICB 717	NaNO <sub>3</sub>	496mg/l	După autoclavare se adaugă câte 1 ml din soluțiile Micro-1* și Micro-2* 1 ml.
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22,62mg/l	
		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	75mg/l	
		CaCl <sub>2</sub>	27,1mg/l	
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ·10H <sub>2</sub> O	20mg/l	
		Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	25,92mg/l	
		Acid citric	6mg/l	
		Na <sub>2</sub> EDTA	16,8 mg/l	
		FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	14,38 mg/l	

\*Componenta soluțiilor Micro1 și Micro2 este descrisă în Tabel 3.

**Tabel 3**

Componenta soluțiilor Micro1 și Micro2

Nr. crt.	Soluția	Componeta	Cantitate	Observații
1.	Micro1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86g/l	Soluția se autoclavează și se păstrează în sticlă brună.
		MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,81g/l	
		ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,22g/l	
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,08g/l	
		MoO <sub>3</sub>	0,015g/l	
2.	Micro2	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,023g/l	Soluția se autoclavează și se păstrează în sticlă brună.
		Cr <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,096g/l	
		NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,047g/l	
		Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,0179g/l	
		K <sub>2</sub> TiF <sub>6</sub>	0,055g/l	
		Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,044g/l	

Cultura a fost concentrată la un volum de 150 ml prin centrifugare timp de 5 min la o viteză de 5000 rpm. Optimizarea procesului de producere a biohidrogenului și a fost efectuată prin testarea variației diferiților factori fizico-chimici:

- microaerobioza indusă prin barbotare cu argon
- diferite cicluri lumină-întuneric de durată variabilă
- pH
- temperatură

*Influența microaerobiozei induse prin barbotare cu argon asupra producerii de hidrogen*

Cultura cianobacteriană concentrată a fost barbotată cu argon timp de 120 minute în vederea inducerii stării de microaerobioză/anaerobioză. Modalitatea de eșantionare în vederea măsurării concentrației de hidrogen dizolvat și a clorofilei este prezentată în Fig. 3 și 4. Astfel, au fost prelevate 4 probe control a câte 4 ml fiecare în fiole închise, cu un capac prevăzut cu un sept de silicon. După începeerea barbotării au fost prelevate eșantioane la intervale de 5, 15, 30, 60 și 120 min. Fiolele cu eșantioanele prelevate au fost incubate 24h la întuneric, la o temperatură de 22°-23°C, după care au fost efectuate măsurătorile. Cantitatea de H<sub>2</sub> dizolvată a fost determinată cu ajutorul Needle Sensor H<sub>2</sub> (Unisense), iar cantitatea de clorofilă prin metoda lui Arnon (1949). Astfel, clorofila *a* a fost extrasă în acetonă prin mojararea celulelor de cianobacterii în prezența de CaCO<sub>3</sub>. Conținutul în clorofila *a* a fost estimat pe baza coeficientului specific de absorbție și a vârfului maxim de absorbție identificat cu spectrofotometrul Jasco V-630.

Barbotarea cu argon a culturii concentrate de *Anabaenopsis* sp. AICB 717 a dus la o variație a cantității de hidrogen dizolvat ce a fost cuprinsă între valorile 1,02-2,90 μmol H<sub>2</sub>/mg clorofilă (Fig. 5). Astfel, microaerobioza indusă prin barbotare cu argon timp de 15 minute duce la creșterea cantității de hidrogen dizolvat cu 100% față de control și cu 200% față de anaerobioză (se consideră îndeplinită după barbotare cu argon timp de 120 minute).

*Influența ciclurilor variabile de lumină-întuneric asupra producerii de hidrogen*

Cultura concentrată de *Anabaenopsis* sp. AICB 717 a fost barbotată timp de 15 minute cu argon în vederea inducerii microaerobiozei, după care au fost prelevate 6 eșantioane a câte 4 repetiții de 4 ml fiecare, în fiole închise, cu un capac prevăzut cu un sept de silicon. Cele 6 eșantioane au fost supuse unor cicluri variabile de lumină (150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)/întuneric (Tabel 4), la o temperatură de 22°-23°C. Cantitatea de clorofilă și de hidrogen dizolvat au fost determinate în aceleași condiții descrise anterior.

**Tabel 4**

Eșantionarea culturilor cianobacteriene în vederea testării influenței diferitelor cicluri lumină/întuneric asupra producerii de hidrogen

Eșantion	Durată lumină (L)/întuneric (D) (ore)
1	24L
2	24D
3	3L/21D
4	6L/18D
5	18L/6D
6	21L/3D

Cantitatea de hidrogen dizolvat a variat în cele 6 eșantioane între 1,41 și 2,88  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  clorofilă. Maximul concentrației de  $\text{H}_2$  dizolvat a fost atins folosind o cultură barbotată timp de 15 min cu argon și incubată la întuneric timp de 24 de ore, fiind urmată de ciclul 6 ore lumină – 18 ore întuneric (Fig. 6).

Soluția creșterii unei culturi de *Anabaenopsis* sp. AICB 717 la întuneric pentru un randament mai crescut de producere a biohidrogenului nu este o soluție viabilă din punct de vedere biotehnologic deoarece o astfel de cultură nu poate supraviețui în lipsa luminii. Astfel, în continuare a fost testată influența ciclurilor lumină/întuneric de durată mai scurtă în intervalul 24D-6L/18D asupra producerii de hidrogen. Modalitatea de eșantionare și de dozare a hidrogenului și a clorofilei sunt identice cu cele descrise anterior. Diferența a constat în durata timpilor de incubare la lumină sau întuneric (Tabel 5).

**Tabel 5**

Eșantionarea culturilor cianobacteriene în vederea testării influenței diferitelor cicluri lumină/întuneric asupra producerii de hidrogen

Eșantion	Durată lumină (L)/întuneric (D) (ore)
1	24D
2	1L/23D
3	2L/22D
4	3L/21D
5	4L/20D
6	5L/19D

Cantitatea de hidrogen dizolvat a variat în cele 6 eșantioane între 2,05 și 2,86  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  clorofilă. Maximul concentrației de  $\text{H}_2$  dizolvat a fost atins folosind o cultură barbotată timp de 15 min cu argon și incubată timp de 1 oră la lumină, urmată de 23 de ore la întuneric (Fig. 7). Așadar, putem afirma că acest interval este optim atât în ceea ce privește productivitatea de hidrogen, cât și din punctul de vedere al aplicabilității biotehnologice, cel mai probabil viabilitatea culturii celulare pe termen lung nefiind afectată.

*Influența variației pH-ului asupra producerii de hidrogen*

Au fost obținute 8 culturi concentrate de *Anabaenopsis* sp. AICB 717 care au fost barbotate timp de 15 minute cu argon în vederea inducerii microaerobiozei. În timpul barbotării a fost reglat pH-ul la o valoare prestabilită (Tabel 6), după care au fost prelevate 8 eșantioane a câte 4 repetiții de 4 ml fiecare, în fiole închise, cu un capac prevăzut cu un sept de silicon. Cele 6 eșantioane au fost incubate 1 oră la lumină/23 ore la întuneric la temperatura camerei (22°-23°C). Cantitatea de clorofilă și de hidrogen dizolvat au fost determinate în aceleași condiții descrise anterior.

**Tabel 6**

Eșantionarea culturilor cianobacteriene în vederea testării influenței pH-ului asupra producerii de hidrogen

Eșantion	pH
1	6,5
2	7
3	7,5
4	8
5	8,5
6	9
7	9,5
8	10

Cantitatea de hidrogen dizolvat a variat în cele 8 eșantioane între 2,03 și 3,20  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  clorofilă. Maximul concentrației de  $\text{H}_2$  dizolvat a fost atins folosind o cultură barbotată timp de 15 min cu argon și incubată la o valoare a pH-ului de 8 timp de 1 oră la lumină și 23 de ore la întuneric, la o temperatură de 22°-23°C (Fig. 8).

#### *Influența variației temperaturii asupra producerii de hidrogen*

Au fost obținute 2 culturi concentrate de *Anabaenopsis* sp. AICB 717, având în vedere 2 scopuri: i) testarea viabilității la diferite temperaturi, exprimată prin cantitatea de clorofilă determinată la 24 de ore după incubare; ii) testarea influenței temperaturii asupra producerii de biohidrogen raportat la cantitatea de clorofilă. Culturile au fost barbotate timp de 15 minute cu argon în vederea inducerii microaerobiozei. A fost reglat pH-ul la valoarea 8, după care au fost prelevate 6 eșantioane a câte 4 repetiții de 4 ml fiecare, în fiole închise, cu un capac prevăzut cu un sept de silicon. Cele 6 eșantioane au fost incubate 1 oră la lumină/23 ore la întuneric la diferite temperaturi (Tabel 6). După cele 24 ore, toate eșantioanele au fost aduse la temperatura camerei (22°C-23°C) și a fost determinată cantitatea de clorofilă și de hidrogen dizolvat în aceleași condiții descrise anterior.

**Tabel 6**

Eșantionarea culturilor cianobacteriene în vederea testării influenței temperaturii asupra producerii de hidrogen

Eșantion	Temperatura (°C)
1	23
2	28
3	33
4	38
5	43
6	48

Cantitatea de clorofilă determinată din eșantioanele incubate 1 oră lumină/23 ore întuneric, în condiții de microaerobioză, la pH 8 a prezentat o variație de sub 10% în intervalul 23°C-38°C, dar a scăzut cu 25-40% în eșantioanele incubate la 43°C-48°C (Fig. 9). Așadar, testarea influenței temperaturii asupra producerii de hidrogen a fost efectuată în intervalul 23°C-38°C, cultura nefiind viabilă pe termen lung la 43°C-48°C.

Cantitatea de hidrogen dizolvat a variat în cele 4 eșantioane cu aproximativ 30%, situându-se în intervalul 2,31 și 3,25  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  clorofilă, cea mai mare cantitate fiind obținută prin incubare la 23°C (Fig. 10).

#### **Referințe bibliografice**

- Antal, T.K. și Lindblad, P. (2005) Production of  $\text{H}_2$  by sulphurdeprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. J Appl Microbiol, 98:114–120.
- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenyloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 24:1-15
- Benemann, J.R. (1997) Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. Int J Hydrogen Energy, 22:979-987.
- Hegewald, E., Jeeji-Bai, N., Hesse, M. (1975) Taxonomische und floristic Studien an Planktonalgen aus ungarischen Gewässern. Algol Stud, 13:392-432.



- Kaushik, A., Anjana, K. (2011) Biohydrogen production by *Lyngbya perelegans*: Influence of physico-chemical environment. *Biomass and Bioenergy*, 35:1041-1045.
- Masukawa, H., Nakamura, K., Mochimaru, M. și Sakurai, H. (2001) Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria, in J. Miyake, T. Matsunaga, and A. San Pietro (ed.), *Biohydrogen II*. Elsevier Science Ltd., Oxford, United Kingdom, p. 63–66.
- Moezelaar, R., Bijvank, S.M. and Stal, L.J. (1996) Fermentation and sulfur reduction in the mat-building cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*, *Appl Environ Microbiol*, 62:1752–1758.
- Pinto F.A.L., Troshina O., Lindblad, P. (2002) A brief look at three decades of reserach on cyanobacterial hydrogen evolution. *Int J Hydrogen Energy*, 27:1209-1215.
- Whitton, B.A., Potts, M. *The ecology of cyanobacteria*. Springer, 2000, pp. 18-32

## TULPINĂ DE *ANABAENOPSIS* SP. ȘI METODĂ ÎMBUNĂTĂȚITĂ DE PRODUCERE A HIDROGENULUI DIZOLVAT PRIN CULTIVAREA ACESTEIA

### Revendicări

1. Tulpina de *Anabaenopsis* sp. AICB 717 depozitată în cultură pură la Culture Collection of Algae and Protozoa cu numărul de depozit CCAP 1402/2 și care este caracterizată prin capacitatea crescută de producere a biohidrogenului comparativ cu alte tulpini cianobacteriene din genul *Anabaenopsis* și nu numai.
2. Metoda îmbunătățită de producere a biohidrogenului dizolvat folosind tulpina cianobacteriană *Anabaenopsis* sp. AICB 717. Aceasta constă în cultivarea tulpinii pe mediu de cultură BG-11 modificat, concentrarea culturii, barbotarea acesteia cu argon timp de 15 minute pentru instalarea microaerobiozei, reglarea pH-ului la valoarea 8 și urmată de incubarea în fiole închise ermetic, timp de 1 oră la o intensitate luminoasă de  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  și 23 de ore la întuneric la temperatura de  $23^{\circ}\text{C}$  duce la creșterea cantității de hidrogen dizolvat de la  $1,5 \mu\text{mol}/\text{mg}$  clorofilă la  $3,25 \mu\text{mol}/\text{mg}$  clorofilă.

33

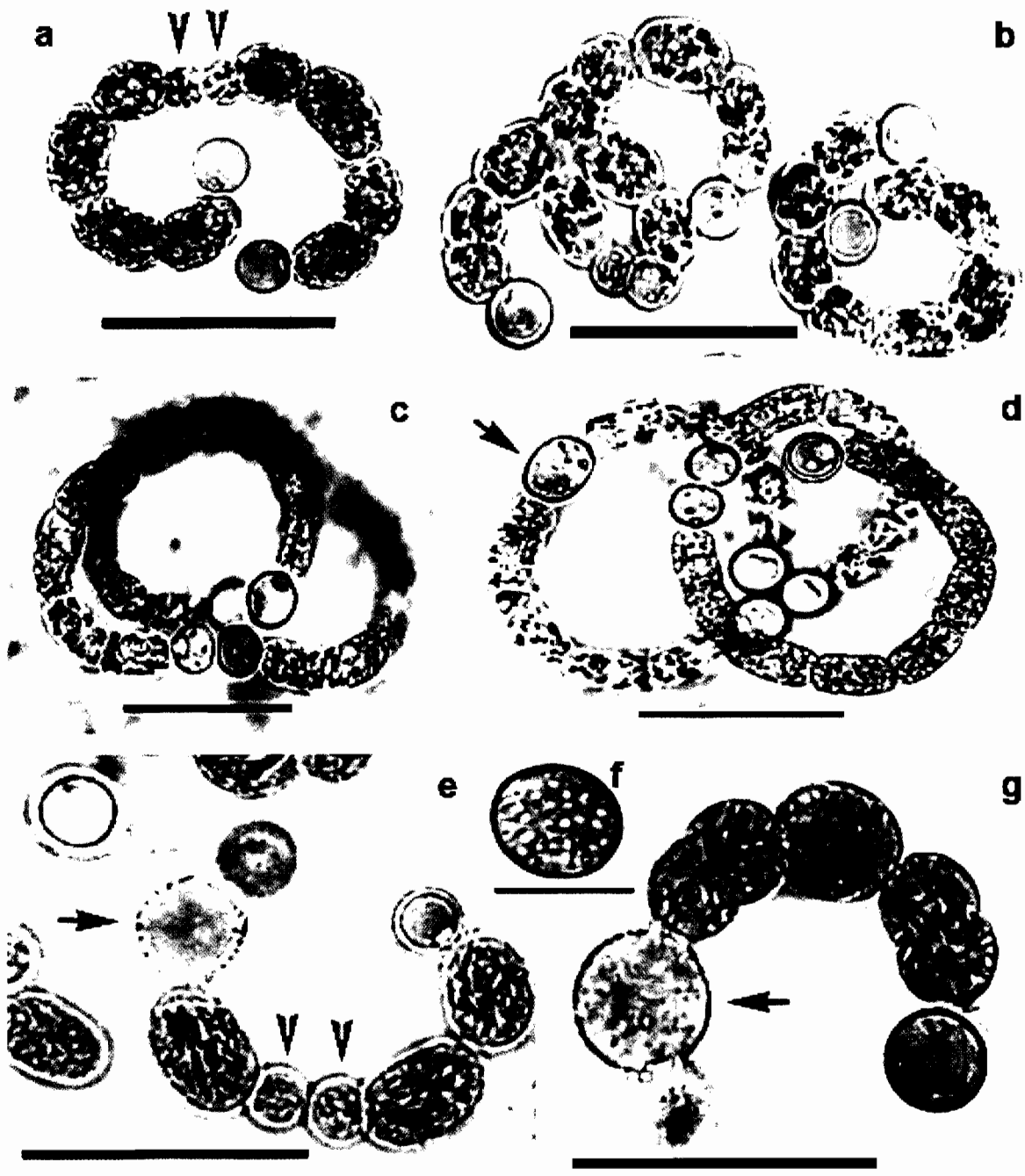


Figura 1

zv

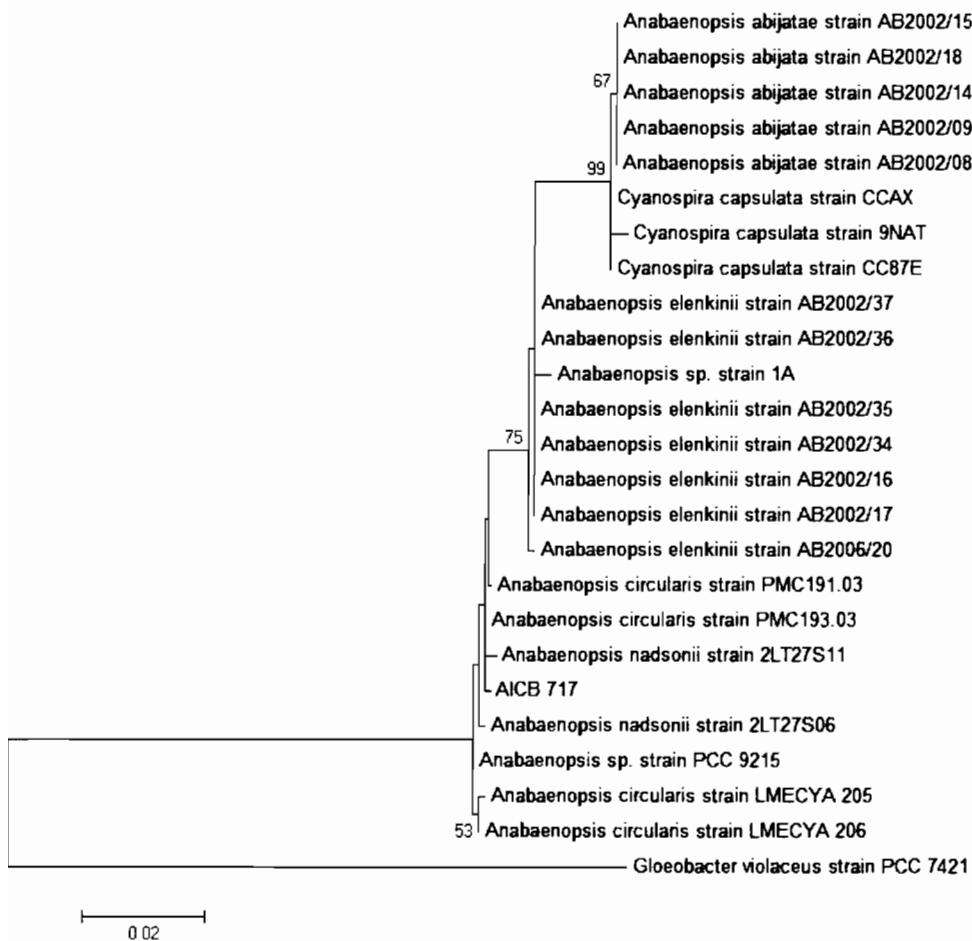


Figura 2

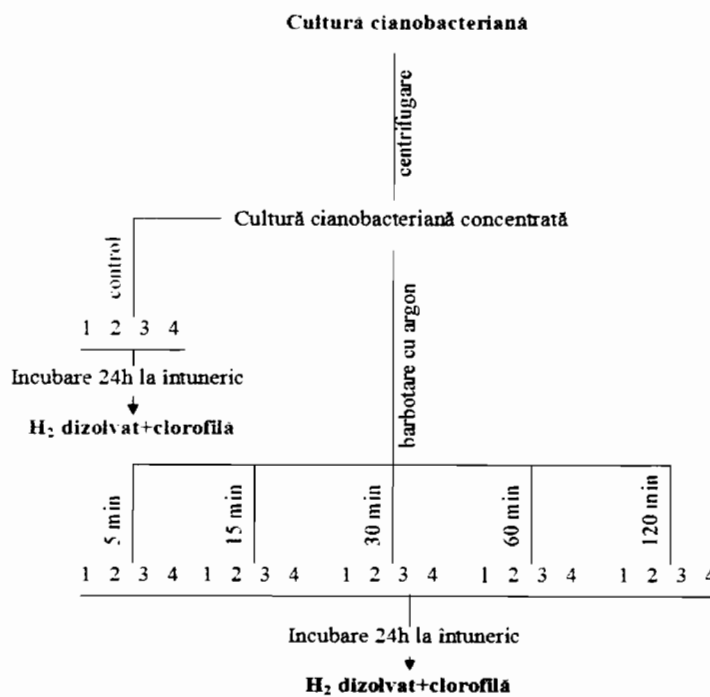


Figura 3

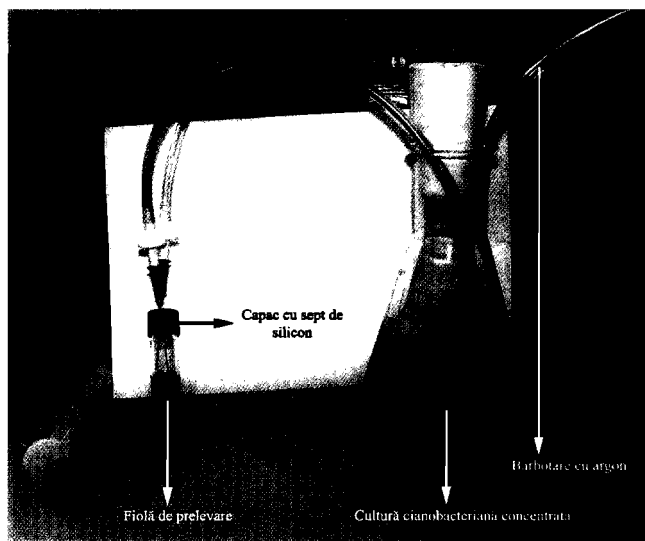


Figura 4

AICB 717

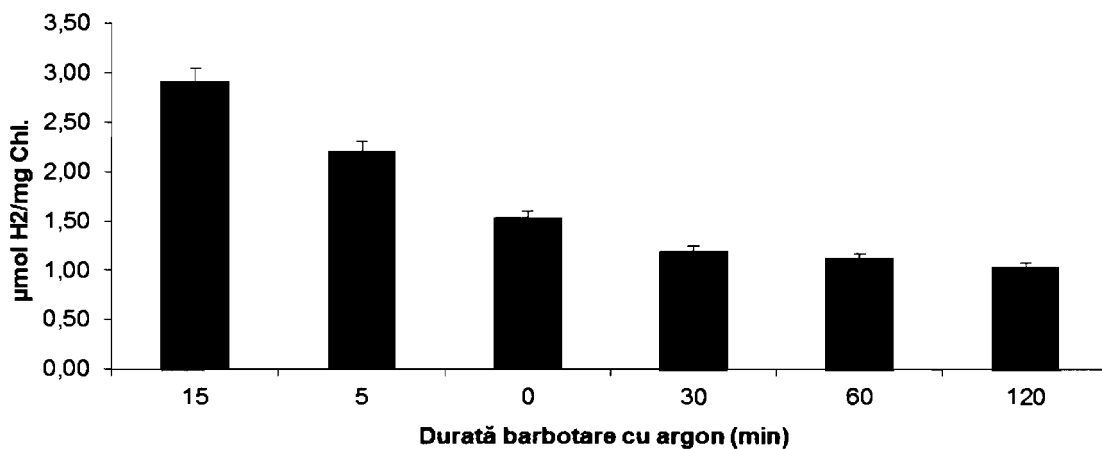


Figura 5

AICB 717

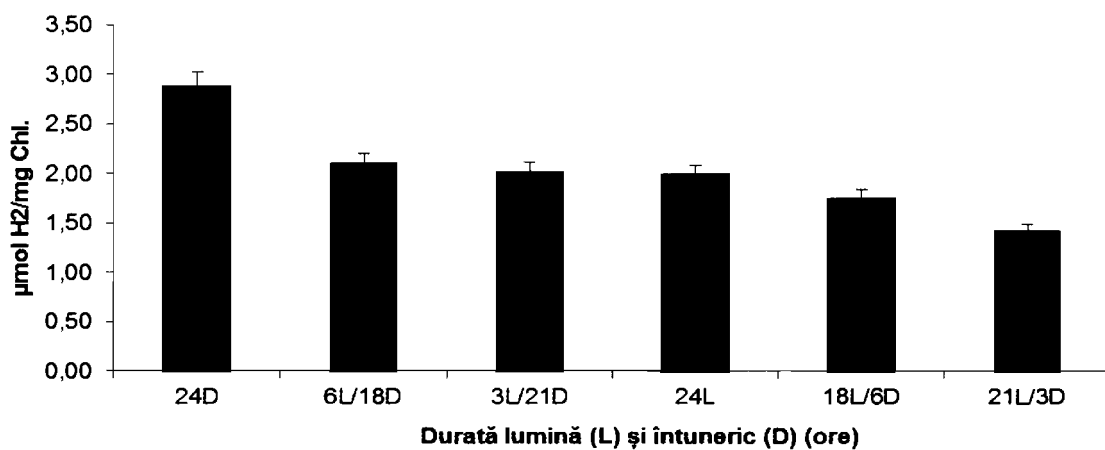


Figura 6

AICB 717

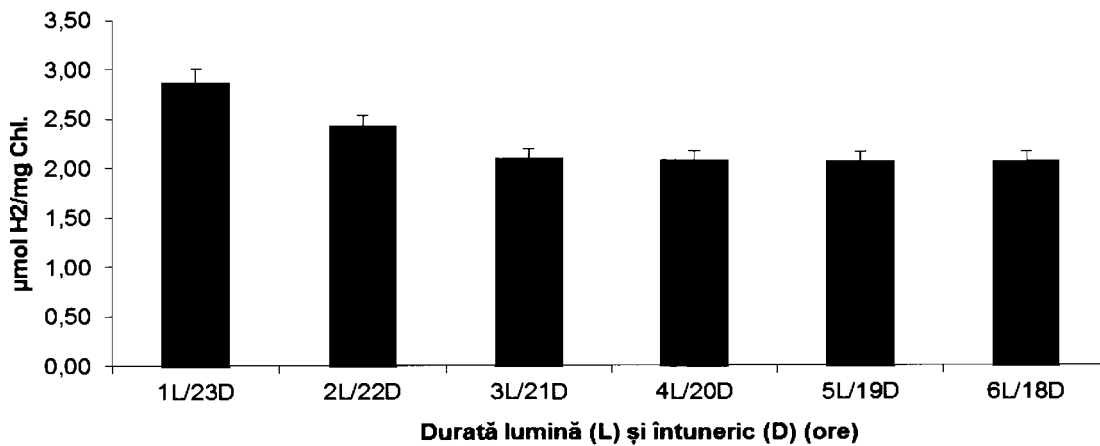


Figura 7

AICB 717

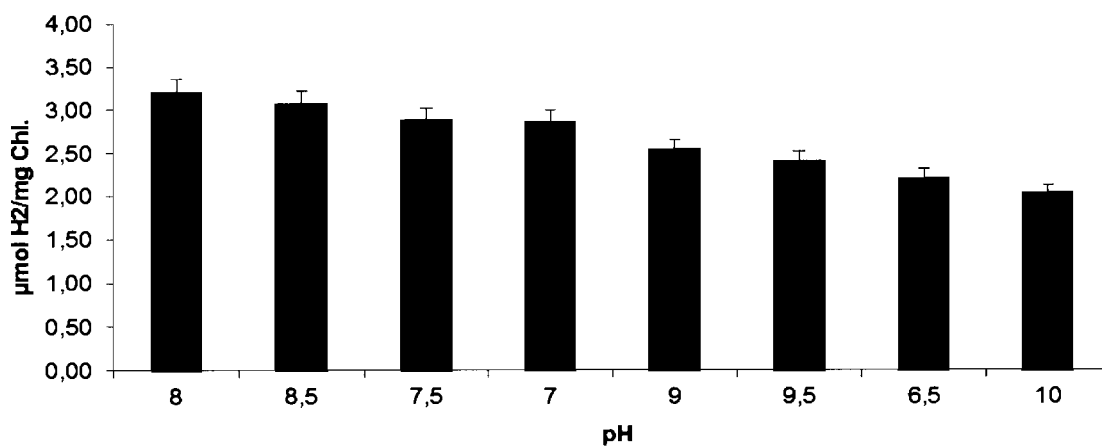


Figura 8

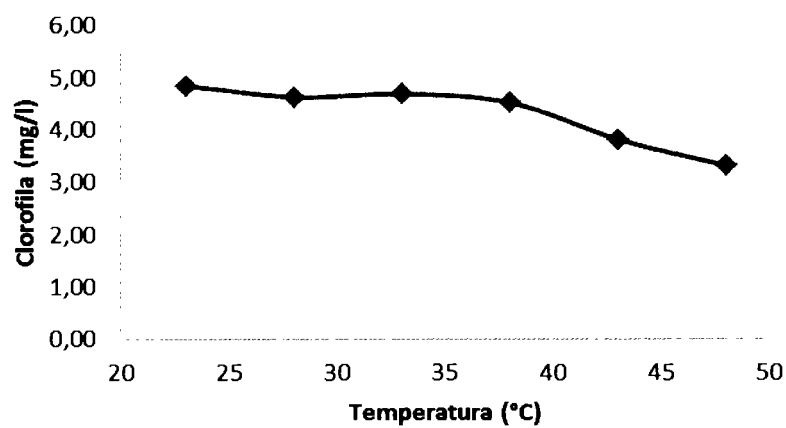


Figura 9