



Ana Cristina Evangelista Marques

Licenciatura em Microbiologia

**Produção de biohidrogénio por cianobactérias:
Optimização da produção de biohidrogénio pela
Anabaena sp. PCC 7120 wild type e mutantes**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Energia e Bioenergia

Orientador: Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva, LNEG
Co-orientador: Professora Doutora Benilde Mendes,
FCT/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves – FCT/UNL

Vogais: Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando – FCT/UNL

Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva - LNEG



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Abril de 2014

Ana Cristina Evangelista Marques

Produção de biohidrogénio por cianobactérias

**Optimização da produção de biohidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e
mutantes**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Energia e Bioenergia

Orientadora: Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva

Co-orientadora: Professora Doutora Benilde Mendes

Monte da Caparica

Fevereiro, 2014

FICHA TÉCNICA

Título: Produção de biohidrogénio por cianobactérias. Optimização da produção de biohidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes

Autor: Ana Cristina Evangelista Marques

Objectivo do presente trabalho: Dissertação apresentada à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, para a obtenção do grau de Mestre em Energia e Bioenergia

Orientadora: Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva (Investigadora Auxiliar LNEG)

Co-Orientadora: Professora Doutora Benilde Mendes

Contactos do autor: acemarques@gmail.com

Local: Monte da Caparica

Data: Fevereiro de 2014

Copyright ©

O conteúdo da presente dissertação é da inteira responsabilidade do autor.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Este trabalho não foi escrito ao abrigo do novo acordo ortográfico.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto PTDC/ENR/68457/2006), designado por “Produção de biohidrogénio pela cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes”, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

Este trabalho experimental contribuiu para a publicação dos seguintes artigos:

Marques, AE. Barbosa, AT. Jotta, J. Coelho, MC. Tamagnini, P. Gouveia L. (2011). Biohydrogen production by *Anabaena* sp. PCC 7120 wild-type and mutants under different conditions: Light, nickel, propane, carbon dioxide and nitrogen. *Biomass and Bioenergy*. 35(10): 4426-4434.

Ferreira, AF. Marques, AC. Batista, AP. Marques, PAS. Gouveia, L. Silva, CM. (2012). Biological hydrogen production by *Anabaena* sp. e Yield, energy and CO₂ analysis including fermentative biomass recovery. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37: 179-190.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Doutora Luísa Gouveia, por toda a confiança em mim depositada, pela sua disponibilidade, força, conhecimentos transmitidos, e pela simplicidade e simpatia que sempre demonstrou, tornando este trabalho uma paixão e fazendo de mim uma melhor profissional.

À Professora Doutora Benilde Mendes, por ter aceite acompanhar-me e orientar-me neste desafio, mostrando-se sempre disponível e um exemplo como Professora.

A todos os colaboradores da Unidade de Bioenergia do LNEG, pelo acolhimento nesta equipa, pelo apoio, simpatia e boa disposição que contribuem para um bom ambiente de trabalho e motivação.

Ao LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia, por permitir e proporcionar a minha integração na realização deste projecto.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia – FCT pelo financiamento do projecto PTDC/ENR/68457/2006, que permitiu a aquisição de equipamentos e material para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, sogros, namorado, irmão, cunhadas, cunhados e sobrinhos, pela família maravilhosa que são, por todo o apoio, amizade e amor.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A procura de novas fontes de energia, limpas e sustentáveis é um dos principais desafios da nossa geração. O hidrogénio (H₂) é provavelmente o futuro vector energético ideal. Pode ser produzido por microalgas e cianobactérias utilizando apenas energia solar e outros requisitos simples, e com a particularidade importante de captura de CO₂.

O aumento da consciencialização para os problemas ambientais causados pelo uso corrente de energia de combustível fóssil, tem levado à busca de alternativas. O hidrogénio é uma boa alternativa e a cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 é naturalmente capaz de produzir hidrogénio molecular através da fotossíntese, utilizando água e luz. No entanto, este H₂ produzido é rapidamente consumido pela hidrogenase de consumo.

Este trabalho avaliou a produção de hidrogénio na *Anabaena* sp. PCC 7120 na estirpe *wild type* (selvagem) e mutantes: *hupL*⁻ (deficiente na hidrogenase de consumo), *hoxH*⁻ (deficiente na hidrogenase bidirecional) e *hupL*⁻/*hoxH*⁻ (deficiente em ambas as hidrogenases) em várias condições experimentais, tais como a atmosfera gasosa (árgon com ou sem adição de N₂ e/ou adição de CO₂ e atmosfera de propano), a intensidade da luminosa (4,20; 4,69 e 9,46 Klux), o regime de luz (contínua e com ciclos de luz/escuro de 16 h/8 h) e a concentração de níquel no meio de cultura.

Para os ensaios efectuados os mutantes *hupL*⁻ e *hupL*⁻/*hoxH*⁻ destacaram-se das estirpes *wild type* e mutante *hoxH*⁻ com máximos de produção de 62,62 e 54,82 μmolH₂/mg chl_a/h para as estirpes *hupL*⁻ e *hupL*⁻/*hoxH*⁻ respectivamente. Para as estirpes *wild type* e mutante *hoxH*⁻ obteve-se máximos de produção de 11,4 e 4,38 μmolH₂/mg chl_a/h respectivamente. A mutante *hupL*⁻ apresentou a melhor produção de hidrogénio, excepto na atmosfera de árgon sob ciclos de 16 h de luz/8 h escuro em 4,20 Klux no período de luz, com 1 mM de suplementação de NiCl₂ no meio de cultura, e sob uma atmosfera de propano.

Verificou-se para todas as estirpes que uma maior intensidade de luz conduz a uma maior produção de hidrogénio. Este aumento da produção acontece também com a adição CO₂ e/ou de N₂ na atmosfera gasosa, e está relacionado com o aumento na diferenciação de heterocistos. A suplementação de níquel no meio de cultura não resulta num aumento na produção de hidrogénio.

Palavras-chave: Biohidrogénio, *Anabaena* sp. PCC 7120, nitrogenase, mutantes *hoxH*⁻, *hupL*⁻ e *hupL*⁻/*hoxH*⁻.

ABSTRACT

The search of new, clean and sustainable energy sources is one of the main challenges of our generation, and probably the hydrogen (H₂) is an ideal future energy carrier. It can be produced by microalgae and cyanobacteria using solar energy and other few requisites, with an important feature of CO₂ sequestration.

Increasing awareness of environmental problems caused by the current use of fossil fuel based energy, has led to the search for alternatives. Hydrogen is a good alternative and the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is naturally able to produce molecular hydrogen, photosynthetically from water and light. However, this produced H₂ is rapidly consumed by the uptake hydrogenase.

This work evaluated the hydrogen production of *Anabaena* sp. PCC 7120 wild-type and mutants: *hupL*⁻ (deficient in the uptake hydrogenase), *hoxH*⁻ (deficient in the bidirectional hydrogenase) and *hupL*⁻/*hoxH*⁻ (deficient in both hydrogenases) at several experimental conditions, such as gas atmosphere (argon with or without N₂ and/or CO₂ addition and propane), light intensity (4,20; 4,69 and 9,46 Klux), light regime (continuous and light/dark cycles 16 h/8 h) and nickel concentrations in the culture medium.

In every assay, the *hupL*⁻ and *hupL*⁻/*hoxH*⁻ mutants stood out over wild-type cells and the *hoxH*⁻ mutant with maximum production of 62,62 and 54,82 μmolH₂/mg chl_a/h for *hupL*⁻ and *hupL*⁻/*hoxH*⁻ respectively. For the *wild type* and *hoxH*⁻ mutant maximum production was 11,4 and 4,38 μmolH₂/mg chl_a/h respectively. Nevertheless, the *hupL*⁻ mutant showed the best hydrogen production except in an argon atmosphere under 16 h light/8 h dark cycles at 4,20 Klux in the light period, with 1 mM of NiCl₂ supplementation in the culture medium, and under a propane atmosphere.

In all strains, higher light intensity leads to a higher hydrogen production. In addition, if there is a CO₂ and/or N₂ addition in the gas atmosphere, hydrogen production increases. This is related to the great increase in heterocysts differentiation, whereas nickel supplementation in the culture medium was not shown to increase hydrogen production.

Keywords: Biohydrogen, *Anabaena* sp. PCC 7120, nitrogenase, mutants *hoxH*⁻, *hupL*⁻ and *hupL*⁻/*hoxH*⁻.

ÍNDICE DE MATÉRIAS

FICHA TÉCNICA.....	V
AGRADECIMENTOS.....	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT.....	XIII
ÍNDICE DE MATÉRIAS	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
ÍNDICE DE TABELAS	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XXI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hidrogénio como vector energético	4
1.2 Hidrogénio: principais marcos históricos.....	5
1.3 O custo do Hidrogénio	7
1.4 Produção de Hidrogénio por cianobactérias.....	8
1.4.1 Biofotólise directa	8
1.4.2 Biofotólise indirecta	8
1.4.3 Nitrogenase e produção de hidrogénio	9
1.4.4 Hidrogenases e produção de hidrogénio	12
2 METODOLOGIA.....	15
2.1 Origem das culturas	15
2.2 Ensaio efectuados.....	15
2.3 Crescimento da <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 e mutantes	17
2.4 Análise de gases	17
3 ANÁLISE DE RESULTADOS.....	19
3.1 Efeito da intensidade luminosa na produção de hidrogénio	19
3.2 Efeito da adição de níquel no meio de cultura na produção de Hidrogénio	20
3.3 Efeito da adição de CO ₂ e N ₂ na produção de hidrogénio pela <i>Anabaena</i> sp. PCC <i>wild type</i> 7120 e mutantes	23

3.4	Relação entre produção de hidrogénio e formação de heterocistos	25
3.5	Produção de hidrogénio numa atmosfera de propano.....	27
3.6	Produção e consumo de gases pela estirpe mais produtiva: <i>hupL</i> -.....	29
3.6.1	Produção de biohidrogénio pela <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 mutante <i>hupL</i> ⁻	30
3.6.2	Produção de oxigénio pela <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 mutante <i>hupL</i> ⁻	32
3.6.3	Consumo de dióxido de carbono pela <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 mutante <i>hupL</i> ⁻ .	34
3.6.4	Consumo de azoto pela <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 mutante <i>hupL</i> ⁻	36
4	CONCLUSÕES.....	39
5	REFERÊNCIAS.....	41
	ANEXO I	49
	ANEXO II	51
	ANEXO III	53
	ANEXO IV	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Diferentes espécies de microalgas que mostram a variedade fenotípica deste grupo de microrganismos (Marques <i>et al.</i> , 2013).....	1
Figura 1.2- O papel da fotossíntese na produção de biocombustíveis (adaptado de Gouveia, 2011).	2
Figura 1.3 – Produção de energia através da conversão de biomassa microalgal usando processos bioquímicos, termoquímicos, químicos e de combustão directa (adaptado de Wang <i>et al.</i> , 2008).	4
Figura 1.4 - Estação de abastecimento de hidrogénio na Islândia.....	6
Figura 1.5 - Custo do hidrogénio (€/kgH ₂) obtido através de diferentes processos (Njakou, 2009).	7
Figura 1.6 – Observação microscópica de células vegetativas e heterocistos (células diferenciadas) de um mutante de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120. Ampliação total= 1000x.....	9
Figura 1.7 - Esquema genérico da fotossíntese nas células vegetativas e produção de hidrogénio pelo mutante <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>hupL</i> ⁻ através da nitrogenase pelos heterocistos sob luz contínua (Cumino <i>et al.</i> , 2007).....	10
Figura 1.8 - Produção de hidrogénio por cianobactérias através da nitrogenase (www.fao.org).	11
Figura 1.9 - Enzimas envolvidas no metabolismo do hidrogénio na <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 e respectivas alterações genéticas que levaram à inactivação das enzimas bidireccional e/ou de consumo (uptake) Musakawa (2002).....	14
Figura 2.1 – Representação esquemática do fotobiorreactor no qual estão representadas algumas das variáveis experimentais, tais como a luz incidente, o oxigénio e hidrogénio produzidos, o dióxido de carbono e azoto consumidos.	16
Figura 3.1 – Efeito da intensidade da luz na produção de Hidrogénio pelas culturas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>Wild type</i> e mutantes, numa atmosfera de árgon, sob luz contínua a 4,20 e 4,69 Klux. Dados resultantes de duplicados.....	19
Figura 3.2 – Efeito do regime luminoso e adição de níquel às culturas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>wild type</i> e mutantes (<i>hupL</i> ⁻ , <i>hoxH</i> ⁻ , <i>hupL</i> ⁻ / <i>hoxH</i> ⁻) numa atmosfera de árgon em regime de 16h luz/8h escuro a 4,20 Klux no período de luz. Culturas sem adição e com adição de 0,5 e 1 µM de NiCl ₂ no meio de cultura. Dados resultantes de duplicados.	21
Figura 3.3 – Efeito da adição de CO ₂ e N ₂ na produção de hidrogénio em culturas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>wild type</i> e mutantes (<i>hupL</i> ⁻ , <i>hoxH</i> ⁻ , <i>hupL</i> ⁻ / <i>hoxH</i> ⁻) numa atmosfera de árgon com luz contínua a 4,69klux e com adição diária de 1% CO ₂ na atmosfera e de 1% CO ₂ e 1% N ₂ . Dados resultantes de duplicados.	24

Figura 3.4 – Frequência de heterocistos da <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>wild type</i> e mutantes (<i>hupL</i> ⁻ , <i>hoxH</i> ⁻ , <i>hupL</i> ⁻ / <i>hoxH</i> ⁻) expostos a luz contínua a 4,69 Klux com adição diária de 1% CO ₂ e de 1% CO ₂ e 1% N ₂ na atmosfera. Dados resultantes de duplicados.	26
Figura 3.5 – Observação microscópica do mutante <i>hupL</i> ⁻ exposto a luz contínua a 4,69 Klux a) numa atmosfera de árgon, b) numa atmosfera de árgon com adição diária de 1% CO ₂ e c) numa atmosfera de árgon com adição diária de 1% CO ₂ e 1% N ₂ . As setas indicam os heterocistos. Todas as fotos microscópicas foram tiradas com a mesma ampliação (1000x). ..	26
Figura 3.6 – Produção de hidrogénio em culturas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>wild type</i> e mutantes (<i>hupL</i> ⁻ , <i>hoxH</i> ⁻ , <i>hupL</i> ⁻ / <i>hoxH</i> ⁻) com luz contínua a 4,69 Klux numa atmosfera de propano e com adição diária de 1% CO ₂ na atmosfera de propano. Dados resultantes de duplicados. ..	29
Figura 3.7 – Produção de hidrogénio em culturas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>wild type</i> e mutante <i>hupL</i> ⁻ , sob diferentes intensidades luminosas (4,20 Klux – I1; 4,69 Klux – I2; 9,46 Klux – I3) e sob diferentes atmosferas gasosas (<i>hupL</i> : atmosfera de árgon; <i>hupL</i> C: 1-5% de CO ₂ ; <i>hupL</i> CN: 1-5% de CO ₂ e 1-5% de N ₂ ; <i>hupL</i> CN20: 1-5% de CO ₂ e 20% de N ₂ ; <i>hupL</i> N: atmosfera de 100% de N ₂).	31
Figura 3.8 - Produção de oxigénio em culturas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>wild type</i> e mutante <i>hupL</i> ⁻ , sob diferentes intensidades luminosas (4,20 Klux – I1; 4,69 Klux – I2; 9,46 Klux – I3) e sob diferentes atmosferas gasosas (<i>hupL</i> : atmosfera de árgon; <i>hupL</i> C: 1-5% de CO ₂ ; <i>hupL</i> CN: 1-5% de CO ₂ e 1-5% de azoto; <i>hupL</i> CN20: 1-5% de CO ₂ e 20% de N ₂ ; <i>hupL</i> N: atmosfera de 100% de N ₂).	33
Figura 3.9 – Consumo de CO ₂ em culturas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 <i>wild type</i> e mutante <i>hupL</i> ⁻ , sob diferentes intensidades luminosas (4,20 Klux – I1; 4,69 Klux – I2; 9,46 Klux – I3) e sob diferentes atmosferas gasosas (<i>hupL</i> C: 1-5% de CO ₂ ; <i>hupL</i> CN: 1-5% de CO ₂ e 1-5% de N ₂ ; <i>hupL</i> CN20: 1-5% de CO ₂ e 20% de N ₂).	35
Figura 3.10 - Consumo de N ₂ em culturas de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 mutante <i>hupL</i> ⁻ , sob diferentes intensidades luminosas (4,20 Klux – I1; 4,69 Klux – I2; 9,46 Klux – I3) e sob diferentes atmosferas gasosas (<i>hupL</i> CN: 1-5% de CO ₂ e 1-5% de N ₂ ; <i>hupL</i> CN20: 1-5% de CO ₂ e 20% de N ₂).	37
Figura 6.1 - Evolução da Densidade óptica das 4 estirpes de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 ao longo do tempo.	51
Figura 6.2 - Consumo de Azoto em atmosferas de 100% de azoto para as três intensidades luminosas testadas (4,20 Klux, 4,69 Klux e 9,46 Klux). Dados indicados em anexo devido aos elevados desvios padrão.	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Taxa de produção máxima de hidrogénio para cada estirpe nas condições aplicadas.....	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP – Adenosina Tri - fosfato

batch – Produção em sistema fechado

BG11₀ – Blue Green medium sem fonte de azoto

bio-ETBE - ethyl-tertio-butyl-ether

bio-MTBE - methyl-tertiobutyl- ether

BTL – Biomass to Liquids

CaCl₂.2H₂O – Cloreto de cálcio dihidratado

*chl*a - clorofila

Co(NO₃)₂.6H₂O – Nitrato de cobalto hexahidratado

CO₂ – Dióxido de carbono

CuSO₄.5H₂O – Sulfato de cobre pentahidratado

DO – Densidade Óptica

e⁻ - electrão

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

Eq. – Equação

EUA – Estados Unidos da América

Fd - ferredoxina

Fe - Ferro

h - hora

H⁺ - ião Hidrogénio

H₂ - Hidrogénio

H₂O - Água

H₃BO₃ - Ácido bórico

hoxH - mutante deficiente no gene da enzima bidireccional

hupL⁻ - mutante deficiente no gene da enzima de consumo

hupL⁻/*hoxH*⁻ - mutante deficiente no gene das enzima bidireccional e de consumo

I1 – Intensidade luminosa testada de 4,20 Klux

I2 - Intensidade luminosa testada de 4,69 Klux

I3 - Intensidade luminosa testada de 9,46 Klux

K₂HPO₄.3H₂O – Hidrogenofosfato de potássio trihidratado

KJ – KiloJoule

Klux - Kilolux

mg – miligrama

MgSO₄.7H₂O – Sulfato de magnésio heptahidratado

MnCl₂.4H₂O – Cloreto de manganês tetrahidratado

MTA – Material Transfer Agreement (Acordo de transferência de material)

N₂ - Azoto

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

Na₂MoO₄.2H₂O – Molibdato de sódio dihidratado

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

Ni - Níquel

NiCl₂ – Cloreto de níquel

NO₃⁻ - nitrato

NTR – nitrogenase

O₂ - Oxigénio

P - fosfato

Pi – fosfato inorgânico

PSI – fotossistema I

PSII – Fotossistema II

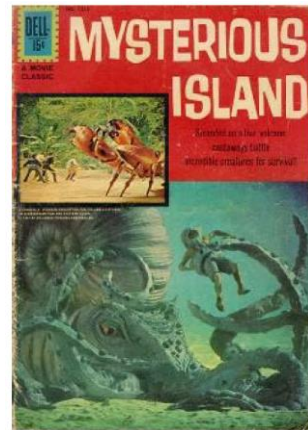
s¹ - segundo

Wt – *wild type*

ZnSO₄.7H₂O – Sulfato de zinco heptahidratado

ΔG – Energia de Gibbs

μmol - micromol



“I believe that water will one day be employed as fuel, that hydrogen and oxygen which constitute it, used singly or together, will furnish an inexhaustible source of heat and light, of an intensity of which coal is not capable.”

Jules Verne, *The Mysterious Island* (1874)

1 INTRODUÇÃO

As microalgas (eucariotas) e as cianobactérias (procariotas) fazem parte de um grupo diverso de organismos fotossintéticos (Figura 1.1) que têm sido estudados ao longo dos anos para a produção de compostos de alto valor acrescentado, na alimentação humana e animal, produtos cosméticos e farmacêuticos e, mais recentemente, para a obtenção de biocombustíveis (Spolaore *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 2008; Rajaab *et al.*, 2008; Gouveia *et al.*, 2009; Gouveia *et al.*, 2010).

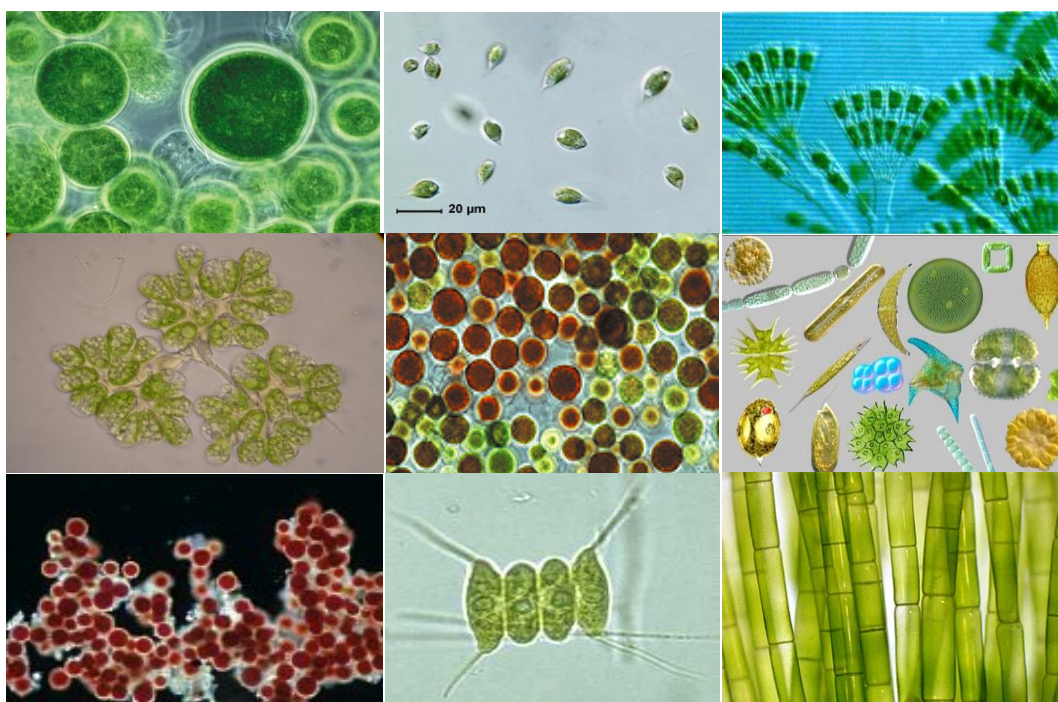


Figura 1.1 – Diferentes espécies de microalgas que mostram a variedade fenotípica deste grupo de microrganismos (Marques *et al.*, 2013).

Uma das características mais atractiva na produção de microalgas e cianobactérias é a sua capacidade de fixar o CO₂ atmosférico. Por cada grama de biomassa de microalgas produzida, cerca de 1,6 – 2 g de CO₂ é mitigado (Zeng *et al.*, 2011).

Os biocombustíveis têm sido alvo de interesse por todo o Mundo, de forma a reduzir a dependência dos combustíveis fósseis. A directiva europeia 2003/30/EC promove a utilização de biocombustíveis e outras fontes renováveis com o intuito de substituir os combustíveis derivados do petróleo para o sector dos transportes em cada Estado Membro. De acordo com a directiva (2003/30/EC, 2003) pelo menos os seguintes produtos deverão ser considerados

biocombustíveis: bioetanol, biodiesel, biogás, biodimetiléter, bio-ETBE, bio-MTBE, biocombustíveis de síntese, biohidrogénio e óleo vegetal puro.

Os biocombustíveis derivados de biomassa microalgal enquadram-se nos “biocombustíveis de terceira geração” (Figura 1.2). Estes podem resolver a maior parte das preocupações relativamente aos biocombustíveis de primeira e segunda geração (Sander and Murthy, 2010; Gouveia, 2011).

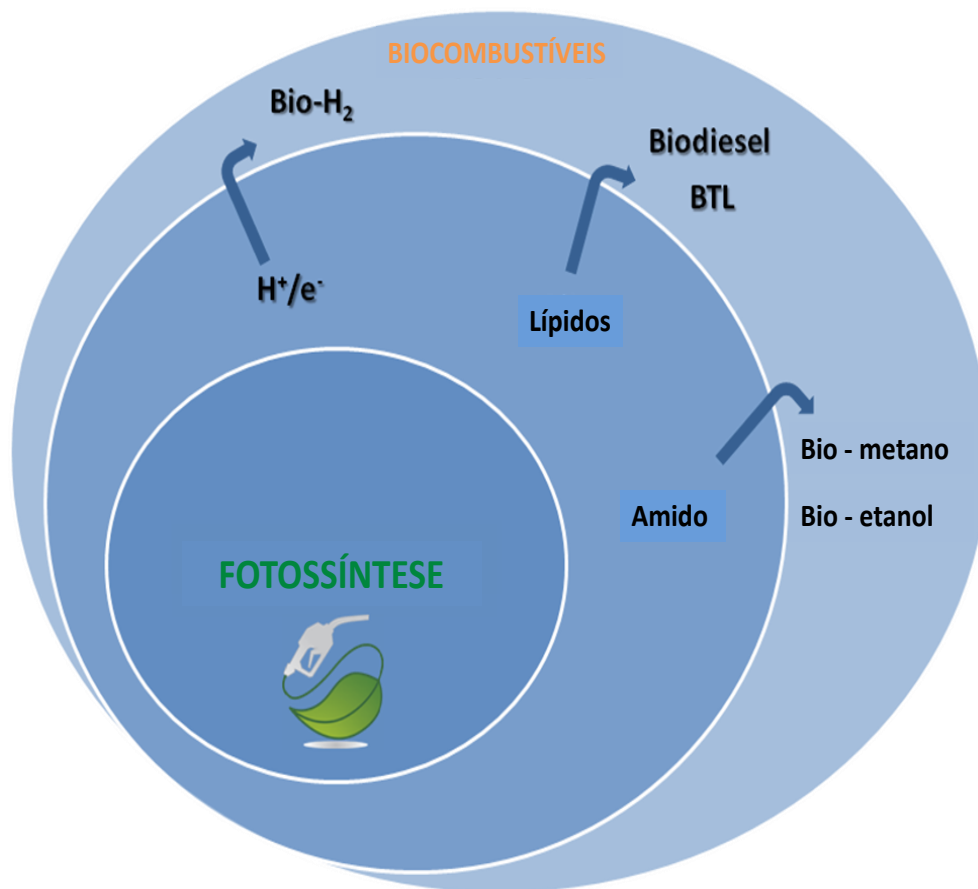


Figura 1.2- O papel da fotossíntese na produção de biocombustíveis (adaptado de Gouveia, 2011).

As principais vantagens da utilização de microalgas ou cianobactérias em relação a outras matérias-primas são (Wang *et al.*, 2008) (Figura 1.3):

- Maior eficiência fotossintética, aproximadamente 3-8% contra 0,5% para as plantas terrestres.
- Maior capacidade de sequestração de CO₂.
- Capacidade de crescer em meio líquido (facilidade de operação) e a capacidade de utilizar água salgada e águas residuais, reduzindo assim o uso de água doce.
- Não competem com terrenos aráveis para produção de alimentos.
- A produção não é sazonal e a colheita pode ser feita ao longo de todo o ano. As culturas podem ser induzidas a produzir altas concentrações de matéria-prima (óleos, amido, biomassa).
- Os sistemas de produção podem ser facilmente adaptados a vários níveis de capacidades operacionais e tecnológicas.
- Podem ser cultivadas sem recurso à utilização de pesticidas ou fertilizantes, originando menos resíduos e causando menos poluição.
- Têm um impacte ambiental mínimo, se comparado com a desflorestação.
- A conversão de luz solar pode ser responsável por uma ampla gama de síntese de combustíveis: prótons e electrões para o biohidrogénio, açúcares e amido (para o bioetanol), óleos (para o biodiesel) e biomassa (para BTL e biometano), via processos bioquímicos, termoquímicos, químicos e de combustão directa.
- A co-produção de produtos de alto valor acrescentado, tais como proteínas, polissacáridos, ácidos gordos polinsaturados, antioxidantes, biopolímeros, bioplásticos, produtos para a alimentação animal, humana, fertilizantes, cosméticos e produtos farmacêuticos (Gouveia, 2011; Bikram *et al.*, 2013; Wulf e Kaltschmitt, 2013).

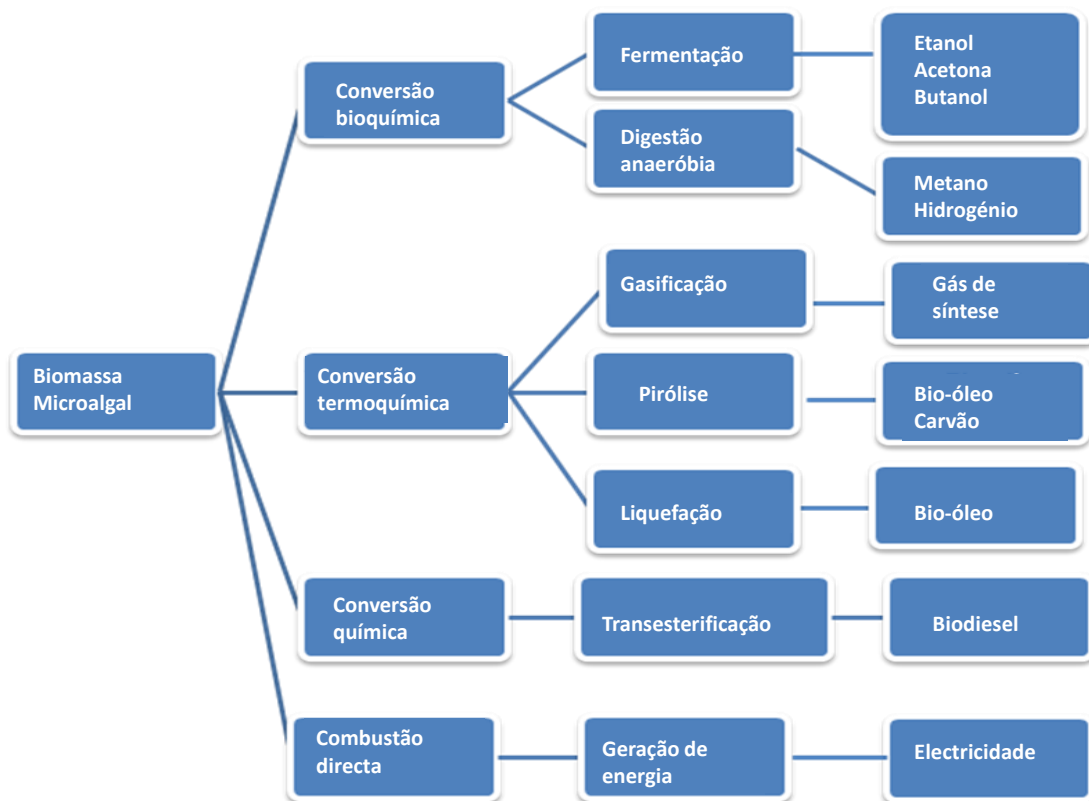


Figura 1.3 – Produção de energia através da conversão de biomassa microalgal usando processos bioquímicos, termoquímicos, químicos e de combustão directa (adaptado de Wang *et al.*, 2008).

1.1 Hidrogénio como vector energético

O hidrogénio é um dos dois elementos naturais, que juntamente com o oxigénio, combinam para formar a água. O hidrogénio não é uma fonte energética, mas um vector energético, pois é necessário uma grande quantidade de energia para extraí-lo da água. É muito útil como fonte de energia compactada em baterias e pilhas de combustível (*fuel cells*). Algumas empresas desenvolvem arduamente novas tecnologias que possam utilizar eficientemente todo o potencial do hidrogénio.

O hidrogénio tem um grande potencial no sector dos transportes, aplicações domésticas e industriais, onde tem sido explorado no uso de motores de combustão e veículos eléctricos alimentados por pilhas de combustível. Assim, a médio e longo prazo, é expectável que a necessidade de hidrogénio aumente significativamente (Benemann, 2000; Rao e Cammack, 2001; Abrahan, 2002; Prince and Khesghi, 2005; Balat, 2005, 2009).

O hidrogénio gasoso pode ser produzido de várias formas (Madamwar *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 2004) incluindo a reformação a vapor do gás natural ou outros hidrocarbonetos,

gasificação ou oxidação parcial de combustíveis fósseis e biomassa. Processos não-biológicos químicos ou termoquímicos, a electrólise ou fotólise da água e através de processos naturais fermentativos e fotossintéticos. Destes métodos, a produção fotobiológica de hidrogénio por cianobactérias é um processo ideal, devido aos baixos requisitos nutricionais, nomeadamente de ar, água, sais minerais e luz como fonte principal de energia (Hall *et al.*, 1995; Lindblad *et al.*, 2002; Tamagnini *et al.*, 2007; Ghiardi *et al.*, 2009).

1.2 Hidrogénio: principais marcos históricos

O hidrogénio tem recebido muita atenção como uma opção energética renovável e “amiga” do ambiente para ajudar a complementar as necessidades energéticas actuais.

Em 1766, o hidrogénio foi identificado como um elemento distinto pelo cientista Britânico Henry Cavendish depois do surgimento de hidrogénio gasoso resultante da reacção de zinco metálico com ácido clorídrico. Numa demonstração ao *Royal Society of London*, Cavendish aplicou uma faísca ao gás hidrogénio, resultando água. Esta constatação levou à sua última descoberta de que a água (H₂O) é constituída por oxigénio e hidrogénio (Cavendish, 1766).

Em 1800, os cientistas ingleses William Nicholson e Sir Anthony Carlisle descobrem que aplicando uma corrente eléctrica à água, dá-se a produção de dois gases, oxigénio e hidrogénio. Este processo foi mais tarde denominado de “electrólise” (Bensaude-Vincent, 1996).

O efeito da pilha de combustível, que combina os gases hidrogénio e oxigénio e produz água e corrente eléctrica foi descoberto por um químico suíço Christian Friedrich Schoenbein em 1838 (www.fuelcelltoday.com).

Em 1845, Sir William Grove, um cientista inglês e juiz, demonstrou a descoberta de Schoenbein numa escala prática, criando uma “bateria de gás” e ganhou o título de “Pai da pilha de combustível” pela sua descoberta (www.fuelcelltoday.com).

Daí para a frente, outros marcos importantes surgiram, tais como a conversão de motores de combustão interna de camiões, autocarros e submarinos para o uso de hidrogénio ou misturas de hidrogénio (1920), até à aplicação deste combustível nas naves espaciais

lançadas pela NASA (1958), são alguns exemplos dos avanços na aplicação do hidrogénio (www.nyserda.org).

Em 1939, um investigador alemão, Hans Gaffron, enquanto trabalhava na Universidade de Chicago observou que a microalga que estudava, *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlorophyta*), por vezes alternava o seu metabolismo de produção de oxigénio, para a produção de hidrogénio. Gaffron nunca descobriu a causa desta troca e por alguns anos outros cientistas falharam nas suas tentativas de descoberta (www.wired.com).

No final dos anos 1990, o professor Anastasios Melis, um investigador da Universidade da Califórnia em Berkeley descobriu que se o meio de cultura da microalga não tem fonte de enxofre, o metabolismo de produção de oxigénio (fotossíntese normal) da microalga será inibido e dar-se-á a produção de hidrogénio (www.wired.com). A enzima responsável por esta reacção é a hidrogenase, no entanto, a hidrogenase perde esta função na presença de oxigénio. Melis descobriu que a carência de enxofre interrompe o fluxo interno de oxigénio, dando à hidrogenase um ambiente no qual poderá reagir, permitindo a produção de hidrogénio pela microalga (Melis and Chen, 2007).

Em 1999, o Royal Dutch/Shell company comprometeu-se com o hidrogénio no futuro, formando uma divisão do hidrogénio. As primeiras estações de abastecimento de hidrogénio na Europa abriram em cidades alemãs, tais como Hamburgo e Munique (www.wired.com).



Figura 1.4 - Estação de abastecimento de hidrogénio na Islândia.

Pensa-se que no futuro, a água substituirá os combustíveis fósseis como principal recurso para o hidrogénio. O hidrogénio será distribuído por redes nacionais de transporte de hidrogénio, ductos de transporte e estações de abastecimento. A energia proveniente do hidrogénio e as pilhas de hidrogénio serão limpas, abundantes, confiáveis, acessíveis e uma parte integrante de todos os sectores da economia em todas as regiões dos EUA (www.nyserda.org).

1.3 O custo do Hidrogénio

A fim de compreender a dimensão económica do aumento de escala deste projecto inovador, é realizada uma análise comparativa de custos, na produção de hidrogénio. Na Figura 1.5 pode-se observar que o preço para o hidrogénio fotobiológico está acima dos praticados nos principais métodos que utilizam combustíveis fósseis que constituem actualmente mais de 96% da produção de hidrogénio do mundo (2,20 a 4,5€/Kg para a biofotólise e cerca de 1,20€/Kg a partir de gás natural) (Dunn, 2002; Njakou, 2009; Romagnoli *et al.*, 2011).

O gráfico seguinte dá uma indicação dos custos de produção de hidrogénio.

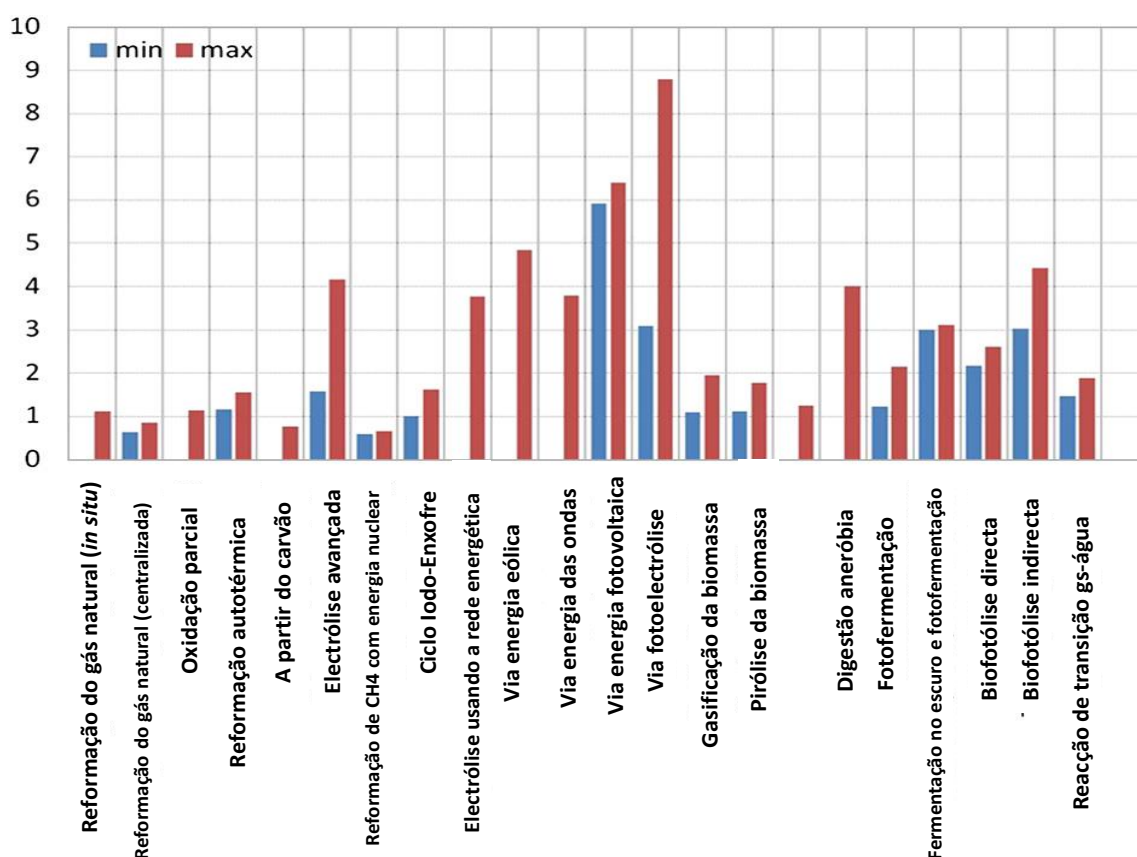


Figura 1.5 - Custo do hidrogénio (€/kgH₂) obtido através de diferentes processos (Njakou, 2009).

1.4 Produção de Hidrogénio por cianobactérias

1.4.1 Biofotólise directa

A biofotólise directa envolve a reacção da fotossíntese, quando a energia solar é convertida a energia química (Eq.1).



$$\Delta G_0 = +749 \text{ KJ/mol}$$

Os microrganismos, fotoautotróficos, usados na fotólise directa são diferentes espécies de algas verdes (*Chlorophyta*). As microalgas de água doce são frequentemente usadas na produção de H_2 , mas as algas marinhas que utilizam água salgada são também utilizadas para a produção de hidrogénio. A *Chlamydomonas reinhardtii* é a mais utilizada, além da *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella fusca* (Sen *et al.*, 2008).

1.4.2 Biofotólise indirecta

Na biofotólise indirecta, H_2 e O_2 são produzidos num processo de dois passos, que se inicia com a fotossíntese e produção de açúcares, seguindo-se um processo induzido pela luz no qual o açúcar e água originam H_2 e CO_2 (Eq. 2 e 3).



As cianobactérias são candidatas ideais para este processo, pois têm os requisitos nutricionais mais simples. As espécies mais usadas têm sido *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Calothrix* e *Gloeocapsa* (Sen *et al.*, 2008).

A cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 tem a capacidade de produzir hidrogénio molecular em determinadas condições. A composição da biomassa e a formação de produtos dependem fortemente das condições de cultura, tais como os nutrientes, temperatura, pH e iluminação (intensidade e ciclos luz/escuro). Nas cianobactérias, a produção de hidrogénio é catalisada por dois tipos de enzimas, as nitrogenases e/ou as hidrogenases (Lindblad *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2002; Cumino *et al.*, 2007).

1.4.3 Nitrogenase e produção de hidrogénio

A ausência de uma fonte de azoto no meio de cultura, e a sua presença na atmosfera, leva a que algumas células vegetativas se diferenciem em células especializadas, denominadas heterocistos (Figura 1.6). Os heterocistos possuem uma enzima fixadora de N_2 , que reduz azoto molecular a amónia, libertando hidrogénio molecular neste processo (Gordon, 1981; Bothe, 1982; Pinto *et al.*, 2002; Tamagnini *et al.*, 2004; Yu e Takahashi, 2007).

A *Anabaena* sp. PCC 7120 possui a enzima nitrogenase, que está confinada aos heterocistos (Figura 1.6)., uma célula especializada que possui uma série de características específicas que proporcionam um certo nível de protecção do oxigénio (Hallenbeck e Benemann, 2002).

A ausência de uma fonte de azoto no meio de cultura e a sua presença na atmosfera permite à nitrogenase manter-se activa. Na ausência de uma fonte de azoto, como por exemplo numa atmosfera de árgon, a nitrogenase permanece activa e reage com a água para formar hidrogénio gasoso (Marques *et al.*, 2011).

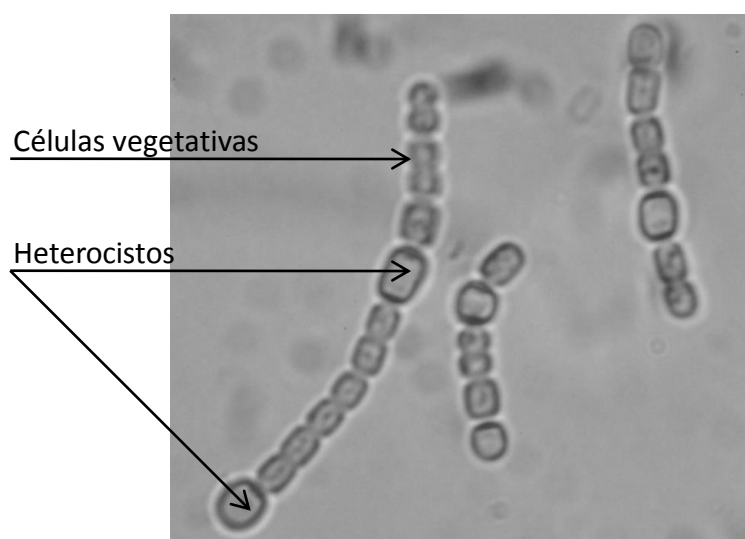
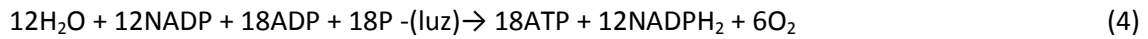


Figura 1.6 – Observação microscópica de células vegetativas e heterocistos (células diferenciadas) de um mutante de *Anabaena* sp. PCC 7120. Ampliação total= 1000x.

A estrutura interna e fisiológica das células é bastante complexa. Numa simples bactéria podem ocorrer mais de 2000 reacções enzimáticas (Schneider *et al.*, 2007). De uma forma simplificada, a rede metabólica deverá ser reduzida aos passos mais relevantes, formulando estequiometrias e balanços. Na produção de hidrogénio, algumas vias metabólicas são especialmente importantes, nomeadamente a fotossíntese, incluindo a produção de oxigénio, produção de ATP e NADPH (Eq. 4).



No ciclo de Calvin o ATP e NADPH são usados para a fixação de CO_2 e produção de carbono fixo - CH_2O - (Eq. 5). Até à data não se conhece exactamente que tipo de açúcar é formado pela *Anabaena* sp. PCC 7120 na fotossíntese, mas pensa-se que poderá ser a sacarose (Cumino *et al.*, 2007). Alguns destes hidratos de carbono são usados pela célula para manter a sua actividade e para exportar para os heterocistos, essencialmente para a fixação de azoto e produção de hidrogénio (Figura 1.7).

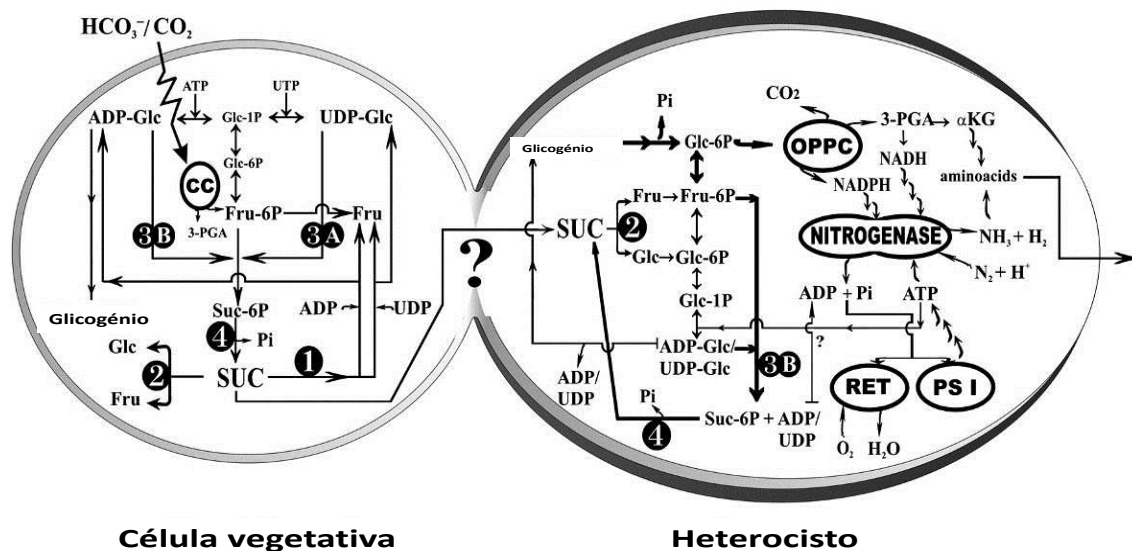


Figura 1.7 - Esquema genérico da fotossíntese nas células vegetativas e produção de hidrogénio pelo mutante *Anabaena* sp. PCC 7120 *hupL*⁻ através da nitrogenase pelos heterocistos sob luz contínua (Cumino *et al.*, 2007).

Os filamentos da cianobactéria, constituídos por células vegetativas e heterocistos iniciam as suas reacções. A luz incide nas células vegetativas e inicia-se a fotossíntese, que resulta na quebra de ligações da água e produção de oxigénio. Depois das reacções fotoquímicas, o dióxido de carbono presente na atmosfera é sequestrado pelas células vegetativas, a fim de serem fixados em hidratos de carbono – fase química (Cumino *et al.*, 2007).

Estes hidratos de carbono são depois utilizados em vias anabólicas essenciais para a viabilidade celular e exportação para os heterocistos para a produção de hidrogénio. Se existir azoto na atmosfera, este irá ser utilizado pela nitrogenase, nos heterocistos e há uma conseqüente produção de hidrogénio que é libertado para a atmosfera (Cumino *et al.*, 2007).

Os heterocistos e as células vegetativas são interdependentes. Os heterocistos importam os hidratos de carbono e utilizam-nos como fonte de poder redutor para a nitrogenase. Os heterocistos não possuem o PSII (fotossistema II) e fixação do dióxido de carbono (Kumar *et al.*, 2010). Estes são dependentes das células vegetativas pela fonte redutora de carbono (Figura 1.8).

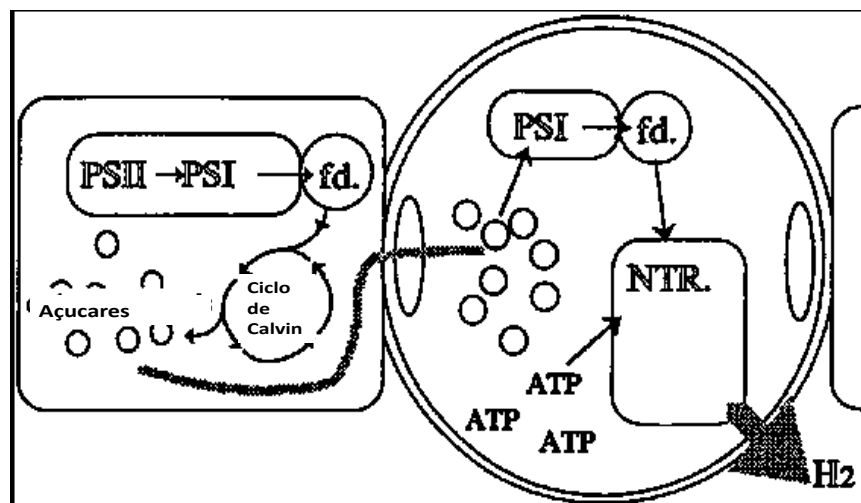
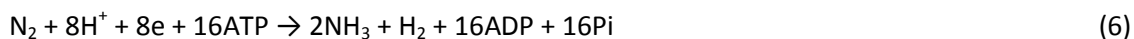


Figura 1.8 - Produção de hidrogénio por cianobactérias através da nitrogenase (www.fao.org).

A formação dos heterocistos é acompanhada por alterações no mecanismo fotossintético e no metabolismo do carbono para fornecer ATP e poder redutor para a fixação do azoto. O ATP, anteriormente mencionado, provém da degradação dos açúcares (glicólise e via das pentoses fosfato) e também da fotofosforilação cíclica, pelo PSI (fotossistema I), activo

nos heterocistos. O azoto fixado nos heterocistos é rapidamente exportado e distribuído para as células vegetativas mais próximas (Cumino *et al.*, 2007; Yu e Takahashi, 2007).

Numa atmosfera que contenha N₂, a fixação do azoto é a reacção predominante, o H₂ torna-se um subproduto da reacção (Eq. 6). É possível obter uma maior quantidade de H₂ na ausência de azoto molecular (Eq. 7).



Numa atmosfera de árgon, sem N₂ disponível para a fixação pela nitrogenase, todos os electrões são direccionados para a produção de H₂ em vez de serem utilizados na sua maioria para a fixação de azoto molecular. Teoricamente, na ausência de N₂, a taxa de produção de H₂ pela nitrogenase deverá ser quatro vezes maior, o que está de acordo com Lindblad (2002) onde se observou um valor superior de 3,5 vezes.

Neste trabalho testaram-se diferentes concentrações de azoto molecular, chegando em alguns destes ensaios à ausência de azoto molecular. O objectivo era manter a viabilidade celular, uma vez que o azoto é um nutriente essencial, mas ao mesmo tempo, usar uma concentração mínima de azoto que não se torne competitivo com os electrões disponíveis.

1.4.4 Hidrogenases e produção de hidrogénio

Existem dois tipos de hidrogenases funcionais NiFe. Cada hidrogenase (de consumo ou *uptake* – Hup e bidireccional – Hox) encontradas nas cianobactérias ligam-se a um átomo de ferro e um átomo de níquel no seu sítio activo e tipicamente átomos de ferro adicionais associados a *clusters* de ferro e enxofre. Assim, é necessário algum níquel disponível para a actividade das hidrogenases nas cianobactérias. Estas enzimas são caracterizadas pela sua elevada sensibilidade ao oxigénio, termotolerância e alta afinidade para o hidrogénio (Ramchandran e Mitsui, 1984; Przybyla *et al.*, 1992; Vignais *et al.*, 2001; Yu e Takahashi, 2007; Carrieri *et al.*, 2008).

A função da enzima de consumo é recuperar poder redutor do H₂ produzido pela nitrogenase. A enzima bidireccional tem a dupla função de produzir ou consumir H₂. A função biológica da enzima bidireccional não está totalmente esclarecida, mas três funções foram sugeridas: remover o excesso de poder redutor durante fermentações anaeróbias, crescimento fotoautotrófico ou para fornecer electrões ao transporte de electrões da cadeia respiratória através da oxidação do H₂ (Houchins, 1984; Schulz, 1996; Bergman *et al.*, 1997; Appel e Schulz, 1998; Hansel e Lindblad, 1998; Appel *et al.*, 2000; Tamagnini *et al.*, 2002; Hallenbeck e Benemann, 2002; Angermayr *et al.*, 2009; Ghiardi *et al.*, 2009).

Nas células vegetativas, durante a fotossíntese, o CO₂ é reduzido a hidratos de carbono, tal como referido no subcapítulo 1.4.3. O oxigénio produzido pode inibir as enzimas envolvidas no metabolismo do hidrogénio, principalmente as hidrogenases, uma vez que a nitrogenase está protegida pelos heterocistos (Yu eTakahashi, 2007; Angermayr *et al.*, 2009; Ghirardi e Mohanty, 2010).

A inibição da hidrogenase de consumo leva a um aumento na produção de H₂. A inibição da hidrogenase bidireccional poderá levar a um aumento ou decréscimo na produção de H₂, uma vez que as células teriam ainda a enzima de consumo (Masukawa *et al.*, 2002).

Neste trabalho foram estudadas quatro estirpes da cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120, a estirpe selvagem e três alteradas geneticamente (Figura 1.9):

- *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* (estirpe selvagem)
- *Anabaena* sp. PCC 7120 *hupL*⁻ (estirpe deficiente no gene que codifica a hidrogenase de consumo)
- *Anabaena* sp. PCC 7120 *hoxH*⁻ (estirpe deficiente no gene que codifica a hidrogenase bidireccional)
- *Anabaena* sp. PCC 7120 *hupL*⁻/*hoxH*⁻ (estirpe deficiente nos genes que codificam as hidrogenases de consumo e bidireccional)

Enzimas envolvidas no metabolismo do H_2 - *Anabaena* sp. PCC7120

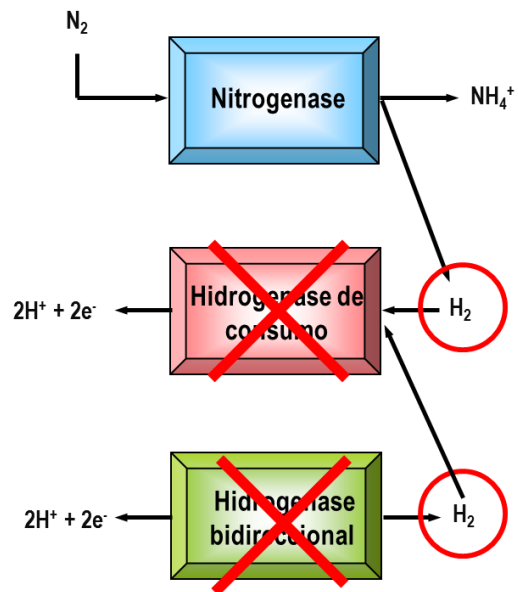


Figura 1.9 - Enzimas envolvidas no metabolismo do hidrogénio na *Anabaena* sp. PCC 7120 e respectivas alterações genéticas que levaram à inativação das enzimas bidireccional e/ou de consumo (uptake) Musakawa (2002).

2 METODOLOGIA

2.1 Origem das culturas

Anabaena sp. PCC 7120 e mutantes (*hupL*⁻, *hoxH*⁻ e *hupL*⁻ /*hoxH*⁻) alterados geneticamente por Musakawa (2002) foram gentilmente cedidas pelo Prof. H. Sakurai através de um acordo MTA (Material Transfer Agreement) com *Waseda University-Japan*.

2.2 Ensaios efectuados

Neste trabalho estudaram-se várias condições que influenciam a produção de hidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes, assim como algumas condições de cultura que conduzem à diferenciação de heterocistos, que, tanto quanto se sabe, não foi estudado anteriormente. As culturas foram observadas ao microscópio óptico (SWIFT, modelo SRL-D).

Para a determinação da percentagem de heterocistos nas células vegetativas foram realizadas contagens a aproximadamente 500 células.

Para a produção de H₂, as culturas foram preparadas como descrito no subcapítulo 2.3 até à fase exponencial.

De seguida as estirpes *wild type* e mutantes foram transferidos para fotobiorreactores (frascos de vidro de 120 mL de capacidade) e foram realizados ensaios em *batch*, em duplicado. Cada fotobiorreactor continha 30 mL de cultura, e foram borbulhados por dois minutos com gás árgon, propano ou azoto, dependendo do ensaio.

Os fotobiorreactores foram selados com rolhas de borracha e colocados numa posição invertida numa câmara de fitoclima P-SELECTA Hotcold-GL 2101507 a 25°C com irradiação contínua a 4,20; 4,69 ou 9,46 Klux, dependendo do ensaio. Nos testes com enriquecimento com CO₂ e N₂, os gases foram adicionados diariamente com auxílio de uma seringa de gases.

A fim de estudar o efeito da intensidade luminosa e regime (ciclos luz/escuro), atmosfera gasosa e concentração de níquel no meio de cultura na produção de hidrogénio pela cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes, foram realizados vários

ensaios, descritos abaixo. Como os ensaios foram realizados em *batch*, os gases formados não foram removidos (Figura 2.1).

- Efeito da intensidade luminosa na produção de hidrogénio (4,20; 4,69 e 9,46 Klux) pela *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes
- Efeito da adição de níquel no meio de cultura na produção de hidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes
- Efeito da adição de CO₂ e N₂ na produção de hidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes
- Relação entre produção de hidrogénio e formação de heterocistos na *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes
- Produção de hidrogénio numa atmosfera de propano pela *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes
- Testes de produção e consumo de gases pela estirpe mais produtiva: *hupL*⁻
 - Produção de biohidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante *hupL*⁻
 - Produção de oxigénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante *hupL*⁻
 - Consumo de dióxido de carbono pela *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante *hupL*⁻
 - Consumo de azoto pela *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante *hupL*⁻

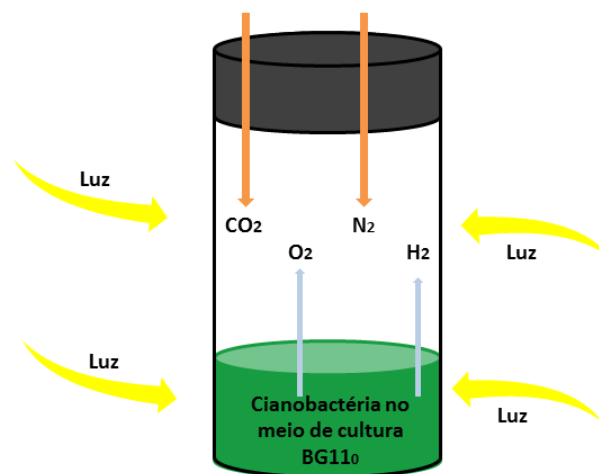


Figura 2.1 – Representação esquemática do fotobiorreator no qual estão representadas algumas das variáveis experimentais, tais como a luz incidente, o oxigénio e hidrogénio produzidos, o dióxido de carbono e azoto consumidos.

2.3 Crescimento da *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes

A *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes cresceram num meio de cultura sem fonte de azoto (BG11₀) (ANEXO I) para estimular a actividade da nitrogenase, em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL com ar atmosférico a 25°C e sob iluminação contínua de 4,20 Klux, com agitação orbital.

O pH foi medido com um eléctrodo *Inolab level DWTW*.

A densidade óptica (DO) foi medida num espectrofotómetro Hitachi U-2000 ao comprimento de onda de 700 nm (ANEXO II).

O peso seco (P.S.) foi efectuado com filtros GF/C Whatman 0,2 µm.

A intensidade de luz foi determinada através do uso de um luxímetro Phywe Lux-Meter.

A clorofila a foi determinada pelo método Meeks *et al.*,(1971), descrita no ANEXO III.

2.4 Análise de gases

Para os ensaios descritos nos subcapítulos 3.1 a 3.5, o hidrogénio foi analisado no cromatógrafo Varian CP3800 TCD (Detector de condutividade Térmica) com coluna Porapack S de 3m x 1/8 polegadas, com azoto como gás de arraste. De cada frasco, foram retiradas diariamente, amostras duplicadas de 0,2 mL.

Para os ensaios descritos nos subcapítulos 3.5 e 3.6, o hidrogénio, dióxido de carbono, azoto e oxigénio foram analisados no cromatógrafo a Varian 430-GC TCD com coluna de sílica Molsieve 5a/Borabound Q tandem CP 7430. A coluna esteve a uma temperatura de 80°C e o detector a 120°C. O gás de arraste foi o argón a um fluxo de 32,4 mL/min. De cada frasco, foram retiradas diariamente 0,5 mL, com uma seringa de gases para injeção no cromatógrafo.

3 ANÁLISE DE RESULTADOS

Neste trabalho foram realizados vários ensaios com a microalga *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e três mutantes: *hupL*⁻, *hoxH*⁻ e *hupL*⁻/*hoxH*⁻, com o objectivo de seleccionar a melhor estirpe produtora de hidrogénio, e otimizar os parâmetros de cultura para o aumento da produção de hidrogénio.

3.1 Efeito da intensidade luminosa na produção de hidrogénio

A luz é a fonte de ATP nestes ensaios. Quando a luz aumenta, as células obtêm mais energia para a nitrogenase reduzir os iões H⁺ a hidrogénio molecular (H₂) (Postgate, 1998). Por outro lado, o aumento da intensidade luminosa poderá levar à foto-oxidação das células, o que não se verificou neste trabalho usando a maior intensidade luminosa testada (4,69 KJlux), uma vez que a produção de hidrogénio aumentou com o aumento da intensidade luminosa (Figura 3.1).

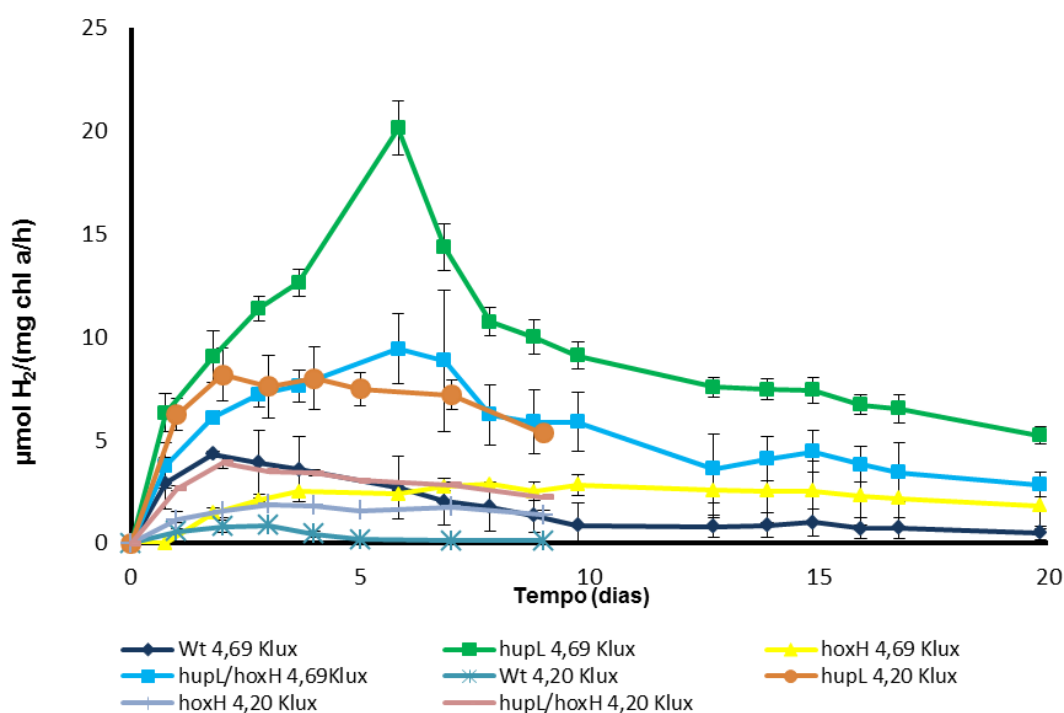


Figura 3.1 – Efeito da intensidade da luz na produção de Hidrogénio pelas culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 *Wild type* e mutantes, numa atmosfera de árgon, sob luz contínua a 4,20 e 4,69 Klux. Dados resultantes de duplicados.

A Figura 3.1 mostra a produção de hidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes sob luz contínua a 4,20 e 4,69 Klux. Estes resultados mostram que a *hupL*⁻ é a melhor produtora nas duas intensidades luminosas testadas, e estão de acordo com Musakawa *et al.* (2002). A estirpe mutante *hupL*⁻ produziu 8,2 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/\text{h}$ como máximo após dois dias de ensaio a 4,20 Klux, seguindo-se a estirpe *hupL*⁻/*hoxH* com 3,9 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/\text{h}$ após dois dias de ensaio. A estirpe *wild type* e a *hoxH* mostraram-se menos produtivas, com máximos de produção de 0,9 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/\text{h}$ e 1,9 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/\text{h}$ após três dias de ensaio, respectivamente.

Aumentando a intensidade luminosa, os melhores produtores mantêm-se, sendo a estirpe *hupL*⁻, *hupL*⁻ a melhor produtora, seguindo-se a *hupL*⁻/*hoxH*, *hoxH* e *wild-type*.

A 4,69 Klux a produção de hidrogénio é cinco vezes maior na estirpe *wild-type*; 2,4; 2,5 e 1,5 vezes maior nas estirpes mutantes *hupL*⁻/*hoxH*, *hupL*⁻ e *hoxH*, respectivamente em comparação com a intensidade de 4,20 Klux.

3.2 Efeito da adição de níquel no meio de cultura na produção de Hidrogénio

Tal como referido em 1.4.4, as hidrogenases (de consumo – Hup e bidireccional – Hox) existentes em cianobactérias encontram-se ligadas a um átomo de ferro e um átomo de níquel no seu sítio activo. É portanto necessário algum níquel disponível para a actividade das hidrogenases na cianobactéria (Carrieri *et al.*, 2008).

Uma vez que as hidrogenases são extremamente sensíveis ao oxigénio, usou-se luz descontínua num fotoperíodo de 16h luz/8h, de forma que as células consumam algum oxigénio na fase de respiração (no escuro), evitando a inibição das hidrogenases, sobretudo a hidrogenase bidireccional, que poderá contribuir para a produção de hidrogénio.

A Figura 3.2 mostra a influência do níquel na produção de hidrogénio numa atmosfera de árgon em regime de 16h luz/8h escuro a 4,20 Klux na *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes.

Verificou-se que para a mesma intensidade luminosa (4,20 Klux), usando iluminação contínua (Figura 3.1) ou um regime de 16h luz/8h escuro, a produção de hidrogénio aumenta no regime de luminosidade/escuro. No período de escuro dá-se o consumo de oxigénio, o que

permite uma diminuição da inibição da nitrogenase, apesar de esta enzima estar protegida pelos heterocistos e permite também que a hidrogenase bidireccional esteja activa para a produção de hidrogénio.

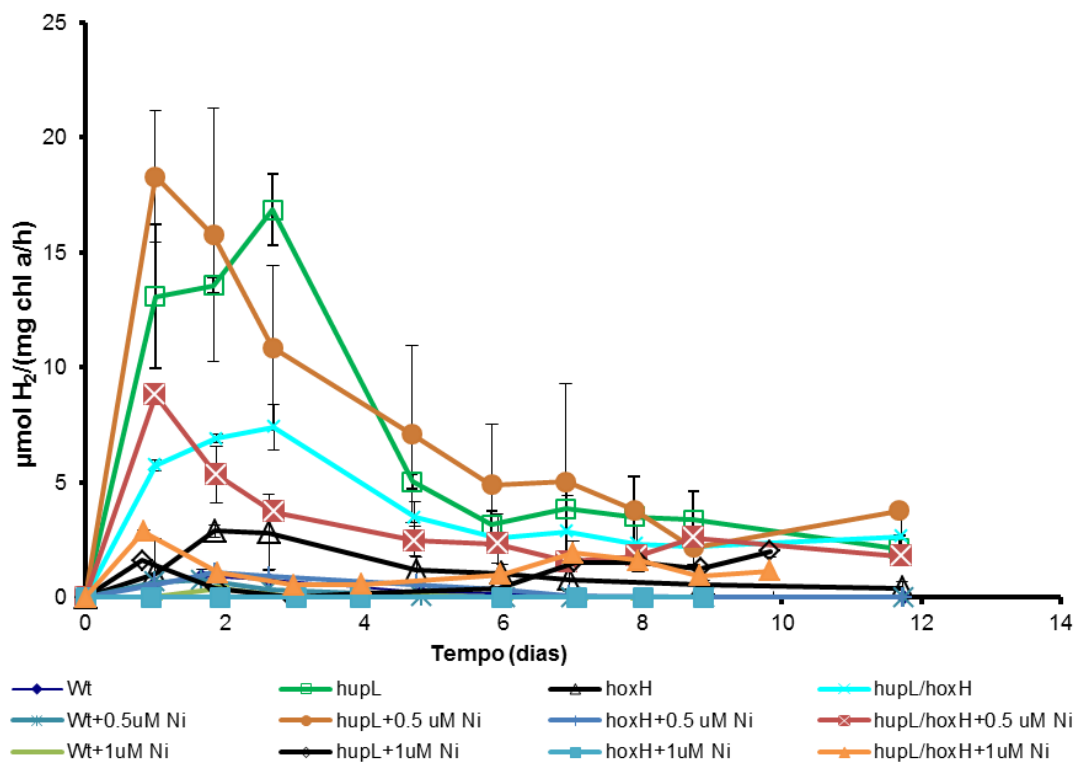


Figura 3.2 – Efeito do regime luminoso e adição de níquel às culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 wild type e mutantes (*hupL*, *hoxH*, *hupL/hoxH*) numa atmosfera de árgon em regime de 16h luz/8h escuro a 4,20 Klux no período de luz. Culturas sem adição e com adição de 0,5 e 1 µM de NiCl₂ no meio de cultura. Dados resultantes de duplicados.

Observou-se que de uma forma geral, a produção de hidrogénio não aumenta com a suplementação com níquel, nas concentrações testadas sob esta intensidade luminosa, no regime de regime de 16h luz/8h escuro.

Tal como descrito por Carrieri (2008), a adição de níquel no meio de cultura da estirpe *wild type* poderá aumentar o consumo ou produção de hidrogénio, uma vez que o níquel poderá estimular a hidrogenase de consumo ou a hidrogenase bidireccional, que consome ou produz hidrogénio.

Verificou-se que nestas condições a estirpe *wild type*, após dois dias de ensaio, produziu um máximo de 0,92 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/h$, sem adição de níquel. Com 0,5 $\mu\text{M NiCl}_2$ no meio esta produz um máximo de 0,76 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/h$, e com 1 $\mu\text{M NiCl}_2$ produz apenas 0,42 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/h$. Era esperado que com a suplementação de níquel a produção de hidrogénio aumentasse. Tal não se verificou, o que poderá ser explicado pela activação das hidrogenases de consumo e bidireccional no sentido de consumo do hidrogénio ou pela toxicidade celular causada pelo níquel.

A estirpe *hupL⁻* não possui a hidrogenase de consumo de H_2 , por isto, seria esperado que a adição de níquel no meio de cultura aumentasse a quantidade de H_2 produzida, estimulando a hidrogenase bidireccional no sentido da produção, o que na realidade não se verificou. A produção de H_2 praticamente não sofreu alteração com adição de 0,5 $\mu\text{M NiCl}_2$, e com 1 $\mu\text{M NiCl}_2$, a produção de H_2 diminui cerca de 5 vezes, comparando com a produção sem adição de níquel. Este comportamento sugere que a adição de níquel favoreceu a hidrogenase bidireccional no sentido de consumo do H_2 ou que a concentração de 1 $\mu\text{M NiCl}_2$ será inibitória ou tóxica para as células, inibindo o seu metabolismo e consequentemente um decréscimo na produção.

Para a estirpe *hupL⁻/hoxH⁻* seria esperado que a adição de níquel não tivesse qualquer influência na produção de H_2 , pois esta estirpe não possui nenhuma das hidrogenases, de consumo ou bidireccional. Este mutante produziu 7,4 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/h$ e 8,8 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/h$ em meios sem suplementação e com 0,5 $\mu\text{M NiCl}_2$, respectivamente. Esta diferença não é significativa, tendo em conta o desvio padrão das medições. No meio com 1 $\mu\text{M NiCl}_2$, a produção de H_2 diminuiu cerca de 2,5 vezes, face ao meio sem adição de níquel. Este resultado reforça a hipótese desta concentração de níquel se tornar tóxica ou de alguma forma inibitória para o metabolismo da produção de H_2 . Alguns dos efeitos da toxicidade do níquel em cianobactérias foram já descritos por Asthana (1990).

Para a estirpe *hoxH*, verificou-se um decréscimo na produção de hidrogénio de 2,8 para 1,08 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/\text{h}$, com a adição de 0,5 $\mu\text{M NiCl}_2$ ao meio de cultura. Com 1 $\mu\text{M NiCl}_2$ não houve produção de H_2 . Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos para as restantes estirpes.

Verifica-se que a suplementação de níquel no meio de cultura nas concentrações de 0,5 e 1 μM de NiCl_2 não leva a um aumento na produção de H_2 . Os resultados obtidos sugerem que nestas concentrações o níquel é inibitório ou tóxico para as estirpes em estudo, uma vez que a produção de hidrogénio diminui com esta adição.

3.3 Efeito da adição de CO_2 e N_2 na produção de hidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC *wild type* 7120 e mutantes

O CO_2 é essencial para a viabilidade celular, obtenção de açúcares e poder redutor para as células, através da fotossíntese. Tal como este, o N_2 é essencial para a formação de alguns constituintes da célula, tais como as bases azotadas do DNA e proteínas.

Na produção de H_2 , o CO_2 e o N_2 têm um papel fundamental, pois através da fixação de CO_2 pela fotossíntese obtém-se energia e poder redutor, que de seguida é direccionado para os heterocistos onde se dá a fixação de N_2 e conseqüente produção de H_2 .

O comportamento da *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes na produção de hidrogénio sob 4,69 Klux, com adição diária de 1% CO_2 e de 1% de CO_2 e 1% de N_2 na fase gasosa estão indicados na Figura 3.3.

A mutante *hupL*⁻ mostra ser a melhor produtora de H_2 , com uma produção máxima de 62,6 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/\text{h}$, aproximadamente três vezes mais do que sem adição de gases (Tabela 3.1). Segue-se a mutante *hupL/hoxH* com um máximo de 54,8, a *wild type* com 11,4 e a mutante *hoxH* com 4,4 $\mu\text{molH}_2/\text{mg chl } a/\text{h}$, o que representa 5,8; 2,7 e 1,5 vezes mais do que apenas com atmosfera de argón.

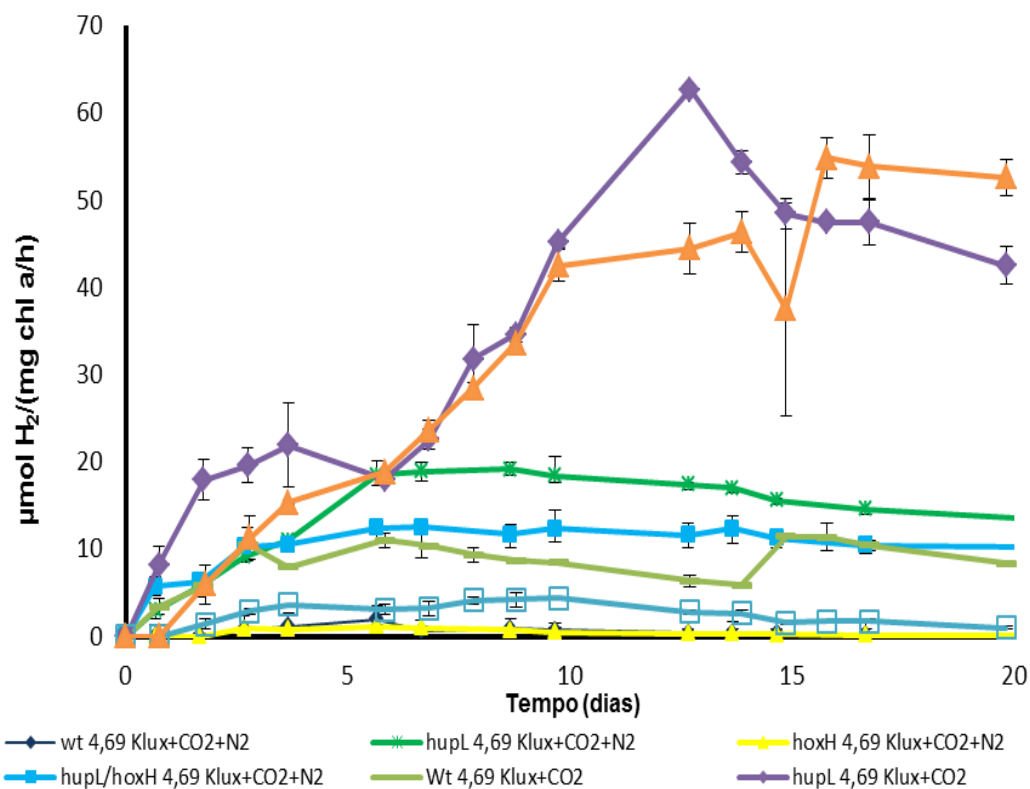


Figura 3.3 – Efeito da adição de CO₂ e N₂ na produção de hidrogénio em culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes (*hupL*⁻, *hoxH*⁻, *hupL*⁻/*hoxH*⁻) numa atmosfera de árgon com luz contínua a 4,69klux e com adição diária de 1% CO₂ na atmosfera e de 1% CO₂ e 1% N₂. Dados resultantes de duplicados.

A adição diária de 1% de CO₂ e 1% de N₂ mostra que a mutante *hupL*⁻ é também nestas condições a melhor produtora de H₂, com uma taxa máxima de produção de 19,2 µmolH₂/mg chl a/h, semelhante à produção com atmosfera de árgon e cerca de três vezes menor do que com adição de 1% de CO₂ diariamente (Tabela 3.1). Mais uma vez a mutante *hupL*⁻/*hoxH*⁻ segue-se à mutante *hupL*⁻ produzindo 12,5 µmolH₂/mg chl a/h, que representa cerca de 1,3 vezes mais do que sem adição de gases na atmosfera de árgon. A estirpe menos produtora de H₂ é *hoxH*⁻ com 1,1 µmolH₂/mg chl a/h.

É importante referir que neste ensaio se deu a adição diária de cada um destes gases, independentemente do seu consumo, uma vez que com o cromatógrafo disponível não foi possível determinar o CO₂ e azoto disponível na atmosfera. Provavelmente o azoto estaria em excesso, uma vez que se verifica que para a atmosfera de árgon com adição diária de 1% de CO₂ e 1% de N₂ diariamente, a taxa de produção de H₂ é inferior à atmosfera de árgon com

adição diária de 1% de CO₂. Quando o N₂ está em excesso há competição pelo ATP para formação de amónia e H₂, e conseqüentemente diminuição do H₂ produzido.

Aqui a produção de H₂ dá-se essencialmente pela nitrogenase, uma vez que as células estão sob luz contínua, o que resulta numa maior produção de oxigénio (não contabilizado neste ensaio) e conseqüentemente na inactivação total ou parcial das hidrogenases. É possível que a hidrogenase bidireccional contribua nestas condições para a produção de H₂, pois a estirpe *hupL*⁻ mostra ser a melhor produtora.

Tabela 3.1 – Taxa de produção máxima de hidrogénio para cada estirpe nas condições aplicadas.

Estirpe	4,20 Klux luz contínua ($\mu\text{molH}_2/\text{mg}$ chl a/h)	4,20 Klux 16/8h ($\mu\text{molH}_2/\text{mg}$ chl a/h)	4,20 Klux 0.5 Ni 16/8h ($\mu\text{molH}_2/\text{mg}$ chl a/h)	4,20 Klux 1 Ni 16/8h ($\mu\text{molH}_2/\text{mg}$ chl a/h)	4,69 Klux luz contínua ($\mu\text{molH}_2/\text{mg}$ chl a/h)	4,69 Klux CO ₂ luz contínua ($\mu\text{molH}_2/\text{mg}$ chl a/h)	4,69 Klux CO ₂ +N ₂ luz contínua ($\mu\text{molH}_2/\text{mg}$ chl a/h)
Wt	0,86	0,92	0,76	0,42	4,3	11,4	1,97
<i>hupL</i> ⁻	8,2	16,86	15,76	2	20,14	62,62	19,17
<i>hoxH</i> ⁻	1,88	2,89	1,08	0	2,86	4,38	1,14
<i>hupL</i> ⁻ / <i>hoxH</i> ⁻	3,9	7,4	8,8	2,87	9,43	54,82	12,47

3.4 Relação entre produção de hidrogénio e formação de heterocistos

Na tentativa de relacionar a produção de H₂ com a frequência de heterocistos nas células de *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes, uma vez que nestas condições (Figura 3.3) a produção de H₂ far-se-á essencialmente pela nitrogenase, determinou-se a frequência de heterocistos através de contagens microscópicas. Os resultados estão indicados na Figura 3.4.

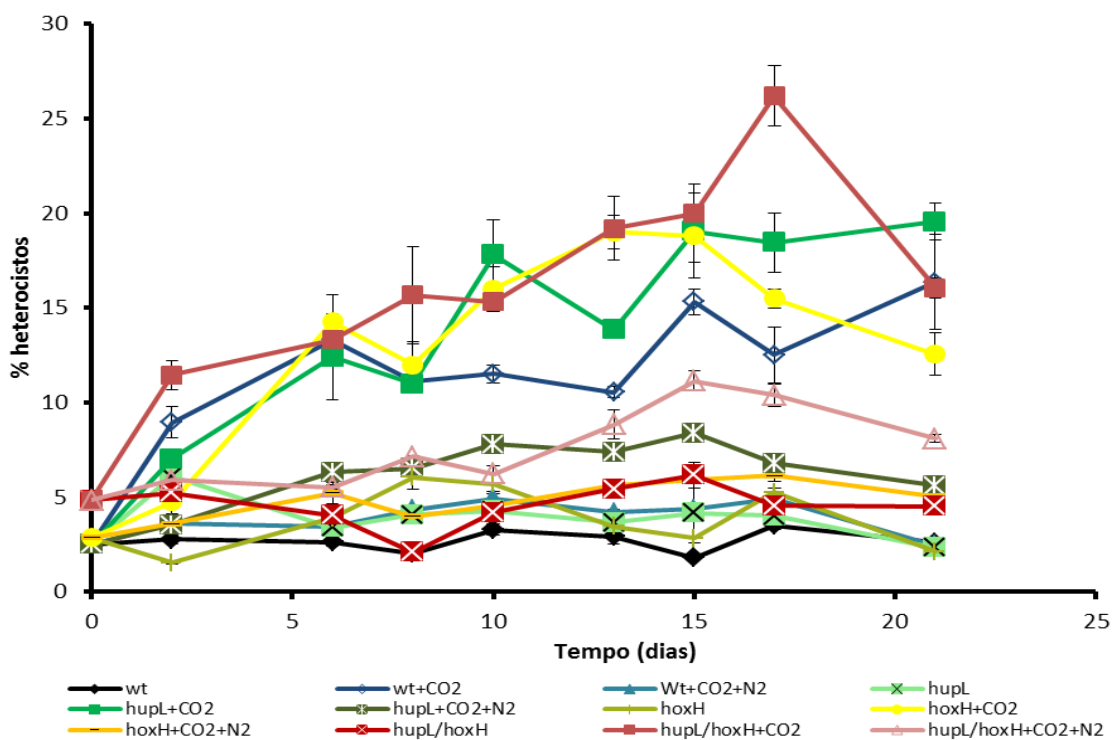


Figura 3.4 – Frequência de heterocistos da *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes (*hupL*⁻, *hoxH*⁻, *hupL/hoxH*⁻) expostos a luz contínua a 4,69 Klux com adição diária de 1% CO₂ e de 1% CO₂ e 1% N₂ na atmosfera. Dados resultantes de duplicados.

Algumas imagens microscópicas da diferenciação dos heterocistos estão indicadas na Figura 3.5) para a estirpe mutante *hupL*⁻ sob luz contínua a 4,69 Klux numa atmosfera de árgon (Figura 3.5a), com a adição diária de 1% de CO₂ (Figura 3.5b), com a adição diária de 1% de CO₂ e 1% de N₂ (Figura 3.5c). Nas condições testadas, a adição diária de 1% de CO₂ na atmosfera de árgon leva a um aumento da diferenciação de heterocistos, seguindo-se a atmosfera de árgon com adição diária de 1% de CO₂ e 1% de N₂, e finalmente a atmosfera de árgon é aquela que mostra menor efeito na diferenciação de heterocistos, para as quatro estirpes testadas.



Figura 3.5 – Observação microscópica do mutante *hupL*⁻ exposto a luz contínua a 4,69 Klux a) numa atmosfera de árgon, b) numa atmosfera de árgon com adição diária de 1% CO₂ e c) numa atmosfera de árgon com adição diária de 1% CO₂ e 1% N₂. As setas indicam os heterocistos. Todas as fotos microscópicas foram tiradas com a mesma ampliação (1000x).

Os ensaios de produção de hidrogénio sob diferentes atmosferas gasosas (Figura 3.3) e diferenciação de heterocistos (Figura 3.4), mostram correspondência próxima, indicando uma maior correlação entre a produção de hidrogénio e a diferenciação de heterocistos, nestas condições.

A estirpe *hupL⁻/hoxH⁻* mostra maior frequência de heterocistos (26,2%), seguindo-se a *hupL⁻* (19,6 %), *hoxH⁻* (19,0%) e *wild type* (16,4%), obtidos com adição de CO₂. O aumento da frequência de heterocistos (mais nitrogenase) ou o aumento de percursos glicolíticos nos heterocistos existentes (mais ATP) induzidos pelo CO₂ poderão ser responsáveis pelo aumento da produção de H₂.

Apesar de a melhor produtora de H₂ ser a estirpe *hupL⁻*, é na estirpe *hupL⁻/hoxH⁻* onde se verifica maior frequência de heterocistos, o que poderá ser explicado pela ausência da hidrogenase bidireccional, que poderá na estirpe *hupL⁻* estar a produzir H₂. Na estirpe *Wild type* também se verificou um aumento na frequência de heterocistos, no entanto a produção de H₂ permaneceu baixa, provavelmente devido ao consumo de H₂ pelas hidrogenases de consumo e/ou bidireccional.

A adição de CO₂ e N₂ não aumentou significativamente a produção de H₂, apesar de existir maior frequência de heterocistos nestas condições. Isto poderá explicar-se pelo facto de ser necessária elevada quantidade de energia e poder reductor para completar a assimilação do N₂ (Kang *et al.*, 2005). Uma vez que neste ensaio não foi possível contabilizar o N₂ presente na atmosfera, devido ao tipo de cromatógrafo utilizado, é possível que este gás estivesse em excesso, causando inibição e/ou competição pela energia e poder reductor como mencionado acima.

3.5 Produção de hidrogénio numa atmosfera de propano

Um dos grandes obstáculos à produção do biohidrogénio é o custo e complexidade nos processos de separação deste gás. Uma atmosfera de propano foi usada nestes ensaios, pelo facto de a sua separação e purificação se tornar tecnicamente mais simples e economicamente mais atractivo, quando comparado com atmosfera de árgon.

A utilização de propano como atmosfera gasosa para a produção de H₂ pela *Anabaena* sp. PCC 7120 permite que as células produzam H₂ (Figura 3.6). Nestas condições a estirpe *hupL*⁻/*hoxH* produz mais H₂ do que as restantes estirpes. Usando o mesmo desenho experimental (Figura 3.3) excepto a atmosfera gasosa com adição diária de 1% de CO₂ e 1% de N₂, as taxas de produção foram superiores na atmosfera de propano com adição diária de 1% de CO₂, chegando a máximos de 28,3; 21,2; 4,85 e 3,44 μmolH₂/ mg chl a/h para as estirpes *hupL*⁻/*hoxH*, *hupL*⁻, *wild type* e *hoxH*, respectivamente.

Na atmosfera de propano as taxas máximas de produção de H₂ que se verificam são 19,4; 5,9; 3,82 e 0,64 μmolH₂/ mg chl a/h para as estirpes *hupL*⁻/*hoxH*, *hupL*⁻, *hoxH* e *wild type*, respectivamente.

A adição de CO₂ na atmosfera de propano aumenta a produção de H₂, tal como verificado anteriormente no subcapítulo 3.3 para a atmosfera de árgon suplementada com CO₂, no entanto a produção nas atmosferas de propano é menor que a produção obtida nas atmosferas de árgon. Em ambas as atmosferas (árgon ou propano), a disponibilidade de CO₂ no meio é essencial para o aumento da produção de H₂.

Devido às propriedades físico-químicas do propano, este gás é facilmente compressível e condensado ao estado líquido, com o H₂ no estado gasoso. O O₂ poderia ser previamente removido da atmosfera através de um agente redutor, por exemplo. No entanto, o consumo de propano (derivado de combustíveis fósseis) é negligenciável, e portanto a recolha e a reutilização será possível. É contudo necessário desenvolver estudos neste sentido.

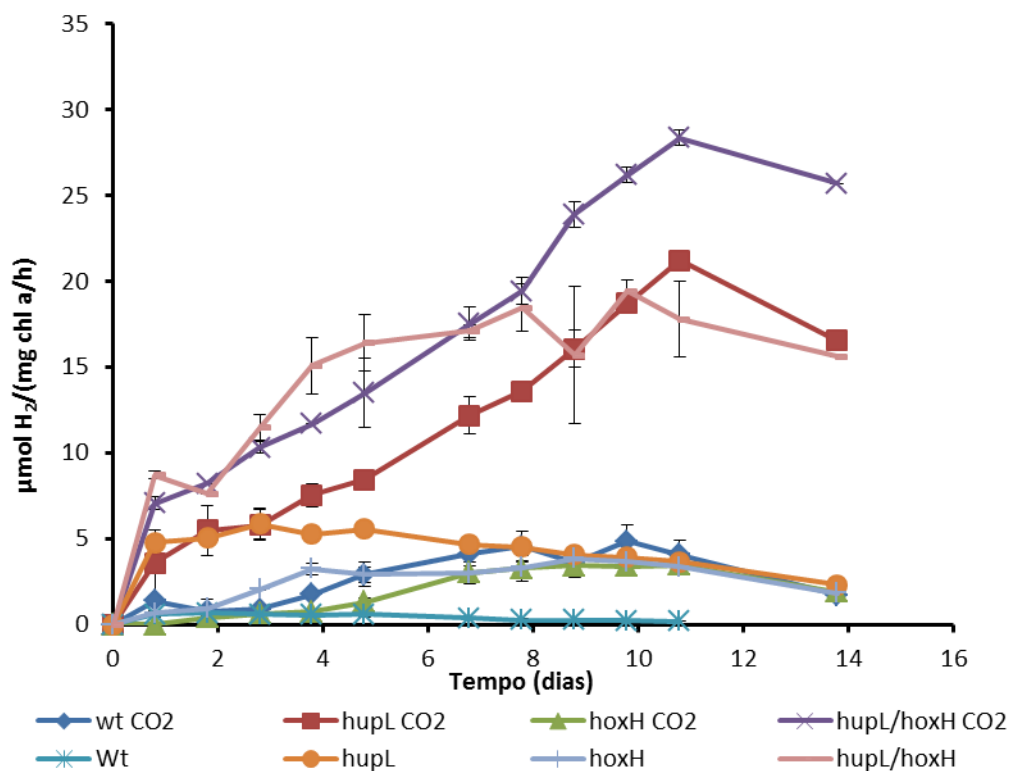


Figura 3.6 – Produção de hidrogénio em culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes (*hupL*⁻, *hoxH*⁻, *hupL*⁻/*hoxH*⁻) com luz contínua a 4,69 Klux numa atmosfera de propano e com adição diária de 1% CO₂ na atmosfera de propano. Dados resultantes de duplicados.

3.6 Produção e consumo de gases pela estirpe mais produtiva: *hupL*⁻

Uma vez que a estirpe mutante *hupL*⁻ mostrou ser a melhor produtora de hidrogénio em atmosfera de árgon, seguiram-se testes de produção de H₂, produção de O₂, consumo de CO₂ e consumo de N₂ por esta estirpe, sob diferentes intensidades luminosas, de forma a verificar o aumento de produtividade ou inibição da produção.

As intensidades luminosas testadas foram 4,20 Klux (I1); 4,69 Klux (I2) e 9,46 Klux (I3). As condições dos ensaios estão descritas nos materiais e métodos. As atmosferas testadas foram:

- Árgon na fase gasosa (*hupL*)
- Árgon na fase gasosa com 1-5% de CO₂ (*hupL* C)
- Árgon na fase gasosa com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ (*hupL* CN)
- Árgon na fase gasosa com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ (*hupL* CN20)
- Azoto na fase gasosa (*hupL* N)

3.6.1 Produção de biohidrogénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante *hupL⁻*

Sob a intensidade luminosa mais baixa testada (I1 ou 4,20 Klux), a adição de 1-5% de CO₂ diariamente e a adição de 1-5% de CO₂ com 1-5% de N₂ apresentam taxas de produção de hidrogénio muito próximas, atingindo 27,70 e 25,44 μmolH₂/mg chl_a/h, respectivamente. A atmosfera CN20 (1-5% de CO₂ e 20% de N₂ na atmosfera de árgon) apresenta um máximo de produção de hidrogénio de 9,3 μmolH₂/mg chl_a/h. Numa atmosfera de 100% de N₂ a produção de hidrogénio é 0 μmolH₂/mg chl_a/h ou muito próximo de zero (Figura 3.7).

Sob a intensidade luminosa de 4,69 Klux, a condição onde se obtêm melhores taxas de produção de hidrogénio verifica-se em 1-5% de CO₂ na atmosfera de árgon atingindo 35,06 μmolH₂/mg chl_a/h. Segue-se a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ com 23,05 μmolH₂/mg chl_a/h de taxa máxima de produção. As atmosferas de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ e 100% de árgon apresentam máximos de 13,07 μmolH₂/mg chl_a/h e 13,0 μmolH₂/mg chl_a/h, respectivamente. Tal como para 4,20Klux, a taxa de produção de hidrogénio na atmosfera de 100% de N₂ é próxima de 0 μmolH₂/mg chl_a/h.

Sob 9,46 Klux, a condição na qual se obtém maior taxa de produção de hidrogénio é a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂, atingindo um máximo de 62,35 μmolH₂/mg chl_a/h. Segue-se a atmosfera de árgon com adição de 1-5% de CO₂ com um máximo de produção de hidrogénio de 34,43 μmolH₂/mg chl_a/h. Segue-se em terceiro, tal como para 4,20 Klux e 4,69 Klux, a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ com um máximo de produção de 16,30 μmolH₂/mg chl_a/h. Na atmosfera de árgon obteve-se um máximo de 5 μmolH₂/mg chl_a/h. Tal como nas intensidades luminosas inferiores, a produção de hidrogénio numa atmosfera de 100% de N₂ é nula.

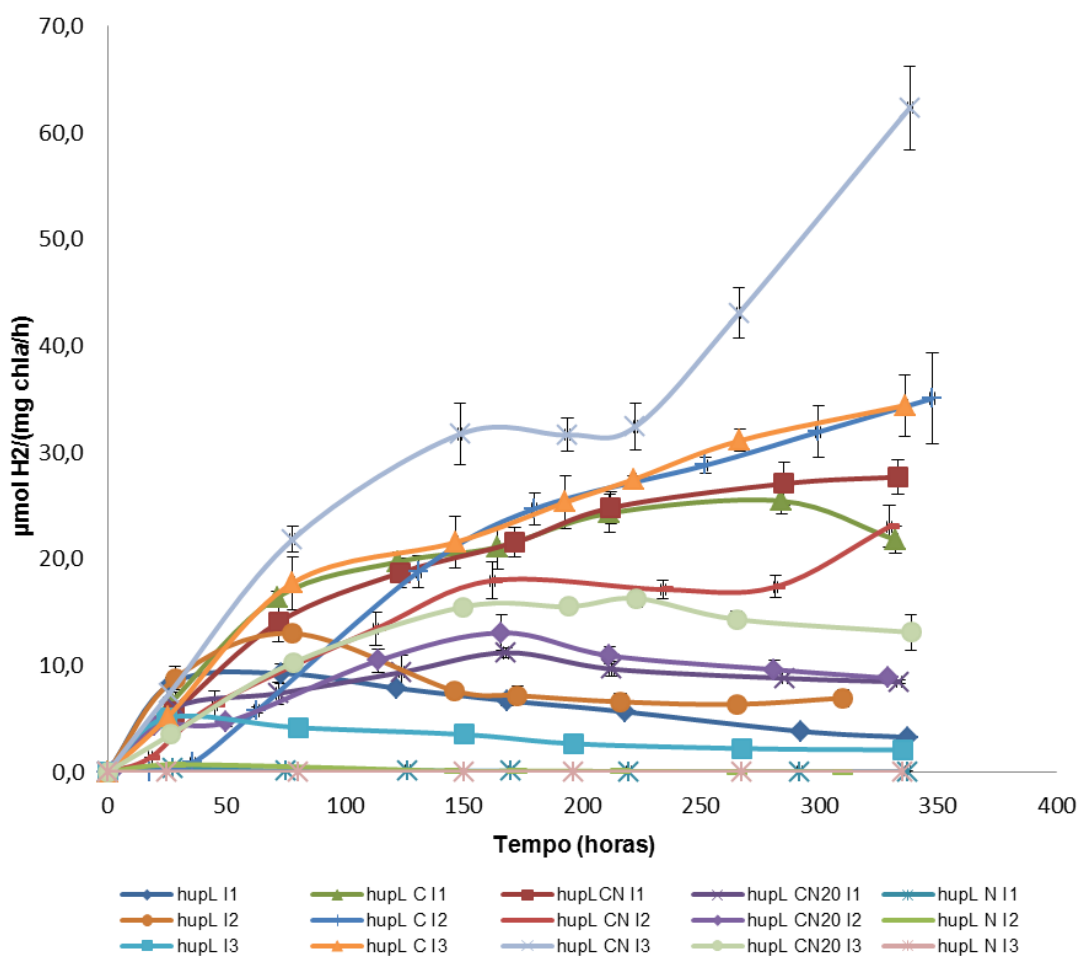


Figura 3.7 – Produção de hidrogénio em culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutante *hupL*⁻, sob diferentes intensidades luminosas (4,20 Klux – I1; 4,69 Klux – I2; 9,46 Klux – I3) e sob diferentes atmosferas gasosas (hupL: atmosfera de árgon; hupL C: 1-5% de CO₂; hupL CN: 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂; hupL CN20: 1-5% de CO₂ e 20% de N₂; hupL N: atmosfera de 100% de N₂).

Verifica-se que de uma forma geral à medida que a intensidade luminosa aumenta, a produção de biohidrogénio também aumenta. Isto verifica-se para as atmosferas de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ e árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂.

Para a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ dá-se um aumento na produção de 4,20 Klux para 4,69 Klux, mas aos 9,46 Klux mantém-se a mesma produção que em 4,69 Klux. Estes dados sugerem que para 9,46 Klux existirá um reagente limitante que será o azoto, assim como para a atmosfera de 100% de árgon, que terá como limitantes o carbono e azoto, uma

vez que a produção de biohidrogénio diminui com o aumento da intensidade luminosa de 4,69 para 9,46 Klux.

Por outro lado, verifica-se que a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de azoto tem uma produção de biohidrogénio inferior à atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂, o que será explicado pelas reacções da nitrogenase indicadas pelas Eq. 6 e Eq.7 no subcapítulo 1.4.3.

Numa atmosfera que contenha N₂, ou excesso deste gás, a fixação de azoto é a reacção predominante e o H₂ torna-se um subproduto da reacção. É possível obter uma maior quantidade de H₂ na ausência de azoto molecular.

É importante existir nestas condições um compromisso de adição de azoto, pois na sua ausência ou limitação as células produzirão maior quantidade de biohidrogénio, mas permanecerão viáveis durante menos tempo, uma vez que não existem compostos azotados que permitem a manutenção e viabilidade celular para compostos tais como os ácidos nucleicos, proteínas, etc... Por outro lado, se o objectivo for apenas a produção de hidrogénio, num aspecto industrial, este processo será possivelmente desenvolvido em *batch*, na tentativa de se obter taxas de produção máximas de biohidrogénio.

3.6.2 Produção de oxigénio pela *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante *hupL*⁻

A produção de oxigénio resultante da iluminação a 4,20 Klux foi semelhante para as atmosferas de 1-5% de CO₂ no árgon, assim como para 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ no árgon, sendo de 46,5 e 43,96 µmolO₂/mg chl_a/h, respectivamente. Na atmosfera de 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ no árgon obteve-se uma taxa máxima de produção de oxigénio de 16,35 µmolO₂/mg chl_a/h. Na atmosfera de árgon a taxa máxima de produção foi de 6,91 µmolO₂/mg chl_a/h enquanto que na atmosfera de 100% de N₂ apenas se obteve um máximo de produção de 3,75 µmolO₂/mg chl_a/h para esta intensidade luminosa (Figura 3.8).

Ao contrário do que seria esperado, em algumas das condições testadas quando se aumenta a intensidade luminosa, a taxa de produção de oxigénio diminui, como é o caso da cinobactéria sob 4,69 Klux nas atmosferas de 1-5% de CO₂ em árgon e a atmosfera de 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ em árgon que apresentam 35,47 e 30,55 μmolO₂/mg chla/h, respectivamente.

A atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ com o aumento de 4,20 para 4,69 Klux praticamente não há alteração na produção de oxigénio (16,35 para 17,81 μmolO₂/mg chla/h). Na atmosfera de 100% de N₂ obteve-se um máximo de produção de 5,63 μmolO₂/mg chla/h sob 4,69 Klux (Figura 3.8).

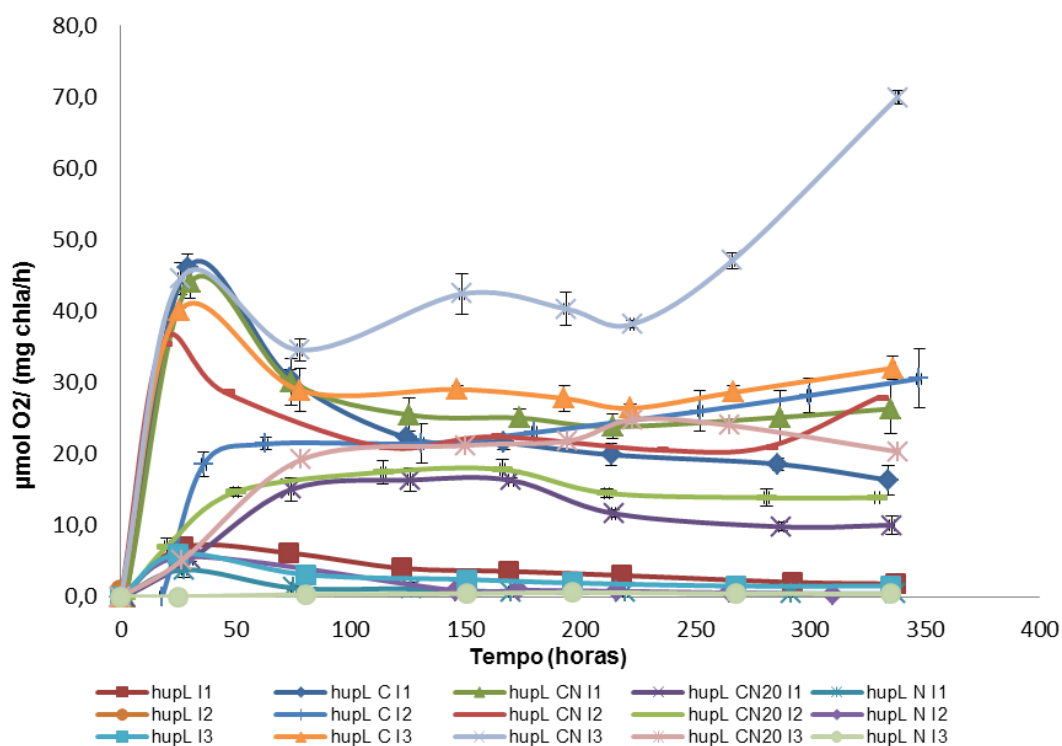


Figura 3.8 - Produção de oxigénio em culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 wild type e mutante *hupL*⁻, sob diferentes intensidades luminosas (4,20 Klux – I1; 4,69 Klux – I2; 9,46 Klux – I3) e sob diferentes atmosferas gasosas (hupL: atmosfera de árgon; hupL C: 1-5% de CO₂; hupL CN: 1-5% de CO₂ e 1-5% de azoto; hupL CN20: 1-5% de CO₂ e 20% de N₂; hupL N: atmosfera de 100% de N₂).

Sob 9,46 Klux, o máximo de produção de oxigénio é de 69,94 μmolO₂/mg chla/h para a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂, condição na qual se dá o máximo de produção de hidrogénio (Figura 3.8). Seguem-se as atmosferas de árgon com 1-5% de CO₂, a

atmosfera de árgon com adição de 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ com 40,13 e 24,81 μmolO₂/mg chla/h, respectivamente. Por último, a atmosfera de árgon e a atmosfera de azoto com taxas de produção máxima de 5,07 e 0,58 μmolO₂/mg chla/h, respectivamente.

Estes resultados mostram que a fotossíntese produzida pela *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes através da nitrogenase, tal como descrito na bibliografia, está relacionada com a fotossíntese. A fotossíntese, por outro lado está directamente relacionada com a quantidade de luz que chega às células. Na fotossíntese dá-se a produção de oxigénio e hidratos de carbono. O oxigénio é libertado para a atmosfera, enquanto que os hidratos de carbono são direccionados para os heterocistos e para a viabilidade celular.

3.6.3 Consumo de dióxido de carbono pela *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante *hupL*⁻

Para as três intensidades luminosas testadas, o consumo de CO₂ para as atmosferas de árgon com 1-5% de CO₂ e de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ variam entre 30,9 e 59 μmol CO₂/mg chla/h. Na atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ verifica-se um consumo de CO₂ mais baixo, na ordem dos 13,5 e 15,6 μmol CO₂/mg chla/h (Figura 3.9).

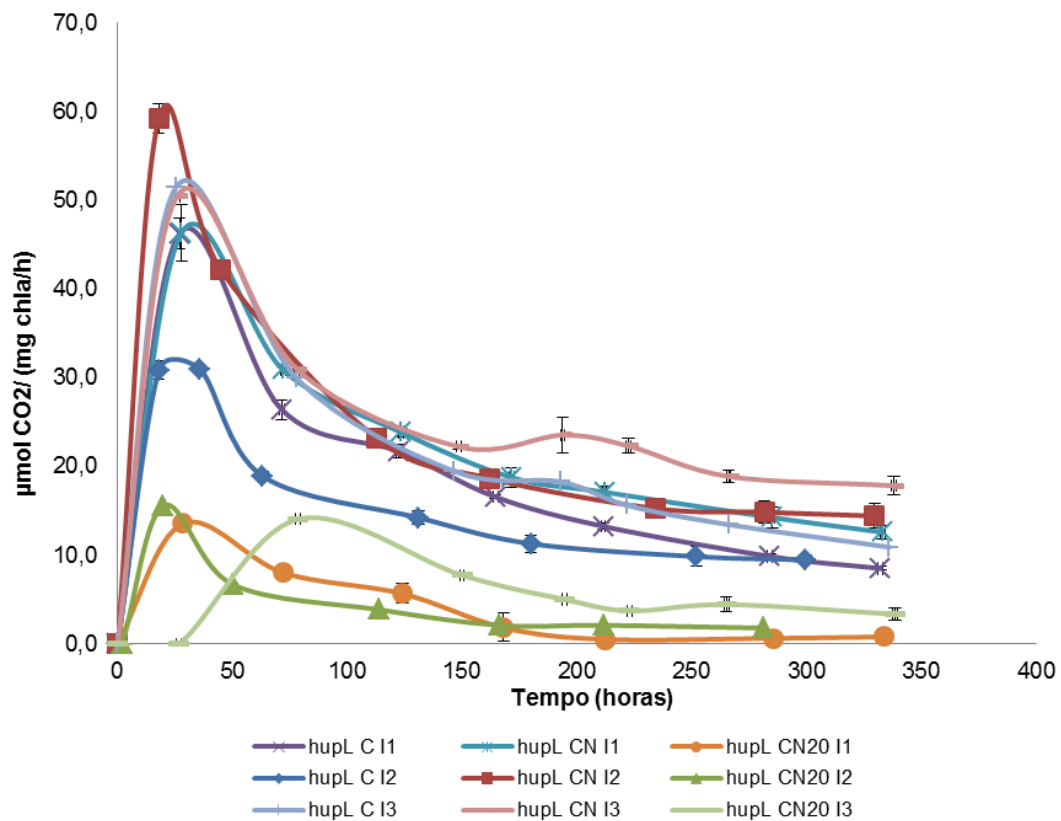


Figura 3.9 – Consumo de CO₂ em culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 wild type e mutante *hupL*⁻, sob diferentes intensidades luminosas (4,20 Klux – I1; 4,69 Klux – I2; 9,46 Klux – I3) e sob diferentes atmosferas gasosas (hupL C: 1-5% de CO₂; hupL CN: 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂; hupL CN20: 1-5% de CO₂ e 20% de N₂).

Sob 4,20 Klux, o consumo máximo de CO₂ foi igual para as atmosferas de árgon com 1-5% de CO₂ e a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ (46 µmol CO₂/mg chla/h) às 28h de ensaio, tendo depois desse tempo, a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ uma taxa de consumo ligeiramente acima, mas com o mesmo padrão. A atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ teve um máximo de consumo de CO₂ às 29h de ensaio, na ordem dos 13,5 µmol CO₂/mg chla/h.

Sob 4,69 Klux, a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ é a que apresenta maior consumo de CO₂, atingindo 59 µmol CO₂/mg chla/h às 18 horas de ensaio. Segue-se a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ com 30,9 µmol CO₂/mg chla/h e por último a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ com um consumo de 15,6 µmol CO₂/mg chla/h.

Sob 9,46 Klux, as atmosferas de árgon com 1-5% de CO₂ e árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ apresentam consumos de CO₂ semelhantes, com máximos de 50 e 51 μmol CO₂/mg chla/h, respectivamente, às 26 horas de ensaio. A atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ teve um máximo de 14,4 μmol CO₂/mg chla/h às 79 horas de ensaio.

Tal como para a produção de H₂ e de O₂, verifica-se que o consumo de CO₂ aumenta com a intensidade luminosa a que as células são submetidas. Os consumos de CO₂ nas atmosferas de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ apresentam consumos de CO₂ semelhantes para as intensidades luminosas testadas.

3.6.4 Consumo de azoto pela *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante *hupL*⁻

Numa atmosfera de 100% de azoto, qualquer que seja a intensidade luminosa aplicada, os consumos de azoto são muito baixos (menor que 14,7 μmol N₂/mg chla/h), o que sugere que esta atmosfera se torna inibitória. O metabolismo da cianobactéria fica praticamente inactivo, como se pode ver pelo comportamento da cianobactéria, tanto na produção de oxigénio e hidrogénio, como no consumo de dióxido de carbono e azoto. O consumo de N₂ nesta atmosfera apresenta um desvio padrão elevado, sendo algumas das vezes de 100%. Isto deve-se ao baixo consumo, mas também à baixa sensibilidade do cromatógrafo utilizado, para análise deste gás. Estes dados são apresentados no ANEXO IV devido aos elevados desvios padrão.

Sob 4,20 Klux na atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de a N₂ verifica-se um maior consumo de azoto do que na atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂, tendo como máximo de consumo 9,5 e 3,1 μmol N₂/mg chla/h, respectivamente.

Sob 4,69 Klux é a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ que apresenta maior consumo de azoto, com 14,8 μmol N₂/mg chla/h. A atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ a 4,69 Klux tem um consumo máximo de 4 μmol N₂/mg chla/h (Figura 3.10).

Para a máxima intensidade luminosa testada (9,46 Klux), o consumo de azoto na atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂ é muito semelhante ao consumo para a menor intensidade luminosa testada, apresentado um máximo de 3,0 μmol N₂/mg chla/h às 19h de ensaio. Para a atmosfera de árgon com 1-5% de CO₂ e 20% de N₂ o consumo máximo é de 2,7 μmol N₂/mg chla/h às 27h de ensaio.

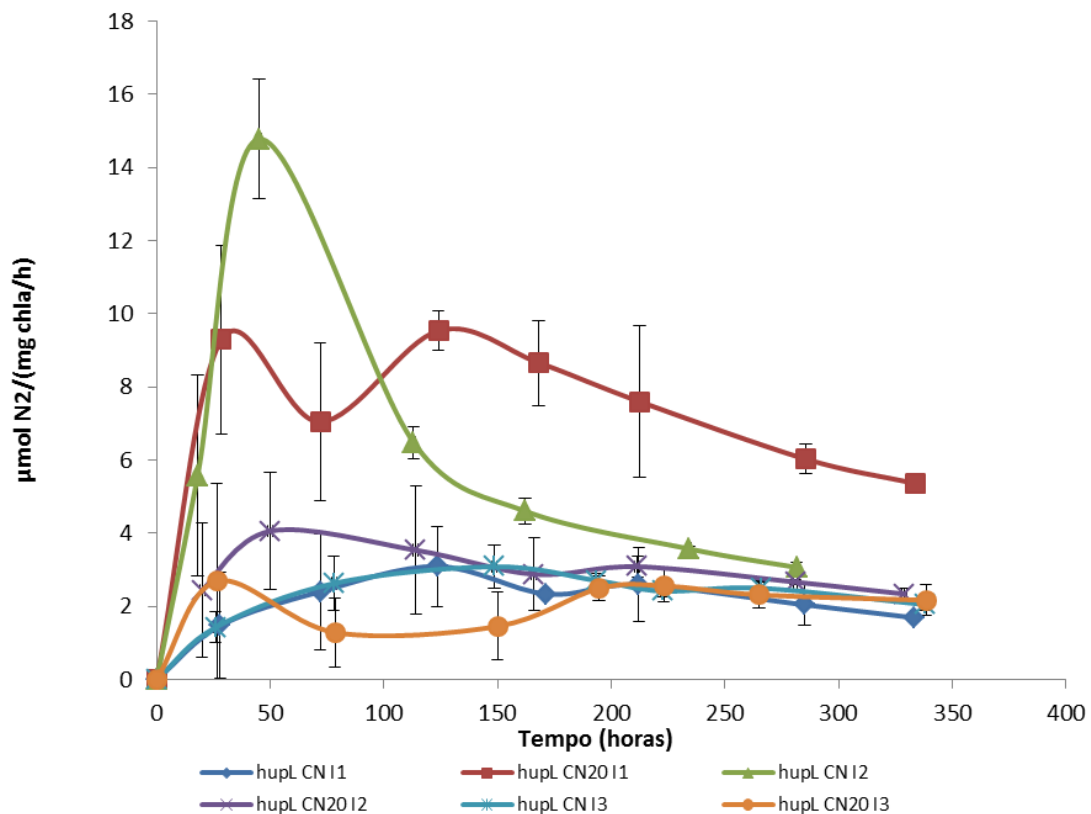


Figura 3.10 - Consumo de N₂ em culturas de *Anabaena* sp. PCC 7120 mutante *hupL*⁻, sob diferentes intensidades luminosas (4,20 Klux – I1; 4,69 Klux – I2; 9,46 Klux – I3) e sob diferentes atmosferas gasosas (hupL CN: 1-5% de CO₂ e 1-5% de N₂; hupL CN20: 1-5% de CO₂ e 20% de N₂).

O consumo de azoto é essencial para manter a viabilidade celular, no entanto, quanto maior a disponibilidade de azoto na atmosfera, menor a produção de hidrogénio, como se pôde verificar no subcapítulo 3.6.1. Se existisse azoto disponível no meio líquido, sob forma de nitrato ou amónia, por exemplo, a produção de hidrogénio pela nitrogenase seriam nula, pois uma vez disponível azoto dissolvido no meio não se dá a formação de heterocistos e consequentemente não existe a enzima nitrogenase nem produção de hidrogénio por esta via.

4 CONCLUSÕES

A produção biológica de hidrogénio é importante como um futuro recurso energético renovável.

Na produção fototrófica de H₂ pela *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes é essencial a ausência de oxigénio e baixas concentrações de azoto.

Entre as quatro estirpes da cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 *wild type* e mutantes testadas, a mutante *hupL*⁻ destacou-se como a melhor produtora de hidrogénio, excepto sob atmosfera de árgon em ciclos de 16h de luz/ 8 h de escuro a 4,20 Klux no período de luz e suplementação de 1 μM de NiCl₂. Na atmosfera de gás propano a mutante *hupL*⁻/*hoxH* também se mostrou mais produtiva do que a mutante *hupL*⁻.

O uso do propano como atmosfera gasosa poderá ser uma boa alternativa, uma vez que em teoria os processos de separação e purificação seriam mais simples e provavelmente económica e tecnicamente mais viáveis. No entanto outros estudos serão necessários, além de que neste trabalho se obteve produções de biohidrogénio muito superiores noutras condições.

Os ciclos de luz/escuro aumentam a produção de hidrogénio, no entanto a adição de níquel no meio de cultura para aumentar a produção de hidrogénio estimulando a hidrogenase não se verificou.

Numa atmosfera de árgon com adição diária de 1% CO₂ mostrou que a produção de hidrogénio aumenta, assim como a frequência de heterocistos, sugerindo uma relação entre os dois parâmetros.

Para as três intensidades luminosas testadas (4,20; 4,69 e 9,46 Klux) a maior intensidade mostrou ser a melhor para a produção de biohidrogénio, atingindo 62,35 μmol H₂/mg chl_a/h. A adição de azoto na atmosfera pode aumentar a produção de hidrogénio, se não estiver em excesso (1-5% na atmosfera). Se o azoto estiver em excesso, este requererá ATP para a produção de amónia e restarão menos ATP para a formação de biohidrogénio. Numa atmosfera de 100% de azoto, para qualquer intensidade testada, as produções são próximas de zero. Sem adição de carbono ou azoto na atmosfera de árgon, a 4,69 Klux há uma maior produção de hidrogénio do que a 9,46 Klux, sugerindo que 9,46 Klux nestas condições poderá torna-se inibitório.

A fim de aumentar o rendimento de produção de hidrogénio, a biomassa de *Anabaena* residual recuperada após o processo de produção de hidrogénio fototrófico, poderá ser usada em processos de aproveitamento e rentabilização da biomassa, como por exemplo a fermentação, pirólise, combustão, etc.

As taxas de produção não são ainda suficientemente boas para aplicar este processo por si só industrialmente. De forma a produzir biohidrogénio no futuro, de forma economicamente viável, mais investigação será necessária desenvolver neste campo. Além disso, os biorreactores deverão ser estudados e desenvolvidos com o objectivo de aumentar a produtividade e separação de gases. Técnicas para uma produção contínua e monitorização da cultura e produção de hidrogénio deverão ser também desenvolvidas.

A engenharia genética de espécies produtoras de biohidrogénio deverá ser continuamente estudada, pois o metabolismo do hidrogénio não é totalmente conhecido e como se pôde ver por este trabalho, estas alterações poderão aumentar significativamente a produção. Algumas das alterações futuras poderão passar por além de inibir genes que codificam para enzimas de consumo do hidrogénio, como as estirpes utilizadas neste trabalho, a sobreexpressão de genes da produção.

5 REFERÊNCIAS

Abraham, S. (2002) *Toward a more secure and cleaner energy. Future for America: National Hydrogen Energy Roadmap; Production, delivery, storage, conversion, applications, public education and outreach.* Washigton, D.C: U.S. Department of Energy, 2002.

Angermayr, SA. Hellingwerf, KJ. Lindblad, P. Teixeira de Matos, MJ. (2009) Energy biotechnology with cyanobacteria, *Curr. Opinion Biotechnol.*, 20: 257-63.

Appel, J. Phunpruch, S. Steinmüller, K. Schulz, R. (2000) The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol*, 173: 333-8.

Appel, J. Schulz, R. (1998) Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising? *J Photochem Photobiol Biol.*, 47: 1-11.

Asthana, R. Pandey, P. Ingh, S. (1990) Nickel regulation of photoautotrophy in a cyanobacterium. *Water, Air, & Soil Pollution*, 52: 263-276.

Balat, M. (2005) Current alternative engine fuels. *Energy Sources Part A*, 27: 569-77.

Balat, M. (2009) Possible methods for hydrogen production." *Energy Sources*, 21: 39-50.

Benemann JR. (2000) Hydrogen production by microalgae. *J Appl Phycol*, 12: 291-300.

Bergman, B. Gallon, JR. Rai, AN. Stal, LJ. (1997) N₂ fixation by nonheterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 19: 139-185.

Bensaude-Vincent, B. (1996) *A History of Chemistry.* Harvard University Press, 108. ISBN: 9780674396593

Bikram K. Nayak, Shantonu, R. Debabrata, D. (2013) Biohydrogen production from algal biomass (*Anabaena* sp. PCC 7120) cultivated in airlift photobioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1-8.

Bothe, H. (1982) Hydrogen production by algae. In: *New Trends in Research and Utilization of Solar Energy Through Biological Systems*. Mislin, H. and Bachofen, R. (Eds.), Birkhauser - Verlag, Basel, 65. ISBN: 9783764313357

Carrieri, D. Ananyev, G. Costas, A. Bryant, D. Dismukes, G. (2008) Renewable hydrogen production by cyanobacteria: Nickel requirements for optimal hydrogenase activity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 2014-2022.

Cavendish, H. (1766) Three Papers Containing Experiments on Factitious Air, by the Hon. Henry Cavendish". *Philosophical Transactions (The University Press)*, 56: 141–184. Recuperado a Novembro 2007.

Cumino, A. Marcozzi, C. Barreiro, R. Salerno, G. (2007) Carbon Cycling in *Anabaena* sp. PCC 7120. Sucrose Synthesis in the Heterocysts and Possible Role in Nitrogen Fixation. *Plant Physiology*. 143: 1385–1397.

Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the Council of 8 May 2003 on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport, 2003.

Dunn, S. (2002) Hydrogen futures: toward a sustainable energy system. *Int J Hydrogen Energy*, 27: 235-264.

Ghirardi, ML. Dubini, A. Yu, J. Maness, PC (2009) Photobiological hydrogen-producing systems. *Chem Soc Rev*, 38:52-61.

Ghirardi, ML. Mohanty, P. (2010) Oxygenic hydrogen photoproduction and current status of the technology. *Curr Sci*, 98: 499-507.

Gordon, JK. (1981) *Introduction to the nitrogen fixing prokaryotes, in The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Starr, M. P., Stolp, H., Trupper, H. G., Balows, A., and Schlegel, H. G., Eds., Springer-Verlag, Berlin, 781. ISBN: 0387088717

Gouveia, L. (2011) Microalgae as a feedstock for biofuels. *Springer*.

Gouveia, L. Marques, A. Sousa, JM. Moura, P. Bandarra, NM. (2010) *Microalgae: source of natural bioactives as functional ingredients*. IFIS Publishing's online journal. Food Science and Technology Bulletin™: Functional Foods. 9780860141921

Gouveia, L. Oliveira, C. (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36, 269-274.

Hall, DO. Markov, SA. Watanabe, Y. Rao, K. (1995) The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynth Res*, 46: 159-67.

Hallenbeck, P. Benemann, J. (2002) Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrog Energy*, 27: 1185-93.

Hansel, A. Lindblad, P. (1998) Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50: 153-160.

Houchins, JP. (1984) The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Bioch Biophys Acta*, 768: 227-255.

Kang, RJ. Shi, DJ. Cong, W. Cai, ZL. Ouyang, F. (2005) Regulation of CO₂ on heterocyst differentiation and nitrate uptake in cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 693-698.

Kumar, K. Mella-Herrera, RA. Golden, JW. (2010) Cyanobacterial Heterocysts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1-19.

Levin, DB. Pitt, L. Love, M. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrog Energy*.

Lindblad, P. Christensson, K. Lindberg, P. Fedorov, A. Pinto, F. Tsygankov, A. (2002) Photoproduction of H₂ by wildtype *Anabaena* sp. PCC 7120 and a hydrogen uptake deficient mutant: from laboratory experiments to outdoor culture. *Int J Hydrog Energy*, 27: 1271-81.

Madamwar, D. Garg, N. Shah, V. (2000) Cyanobacterial hydrogen production. *World J Microbiol Biotechnol*, 16:757-67.

Marques, AE. Barbosa, AT. Jotta, J. Coelho, MC. Tamagnini, P. Gouveia L. (2011). Biohydrogen production by *Anabaena* sp. PCC 7120 wild-type and mutants under different conditions: Light, nickel, propane, carbon dioxide and nitrogen. *Biomass and Bioenergy*. 35(10): 4426-4434.

Marques, AE. Miranda, JR. Batista, AP. Gouveia, L. (2013) Microalgae Biotechnological Applications: Nutrition, Health and Environment. Marine Biology. Editor: Melanie N. Johansen. Nova Publishers. 1-60.

Masukawa, H. Mochimaru, M. Sakurai, H. (2002) Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58: 618-24.

Meeks, JC. Castenholz, RW. (1971) Growth and photosynthesis in an extreme thermophile *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Arch Microbiol*, 78:25-41.

Melis, A. Chen, HC. (2007) Modulation of sulfate permease for photosynthetic hydrogen production. *United States Patent 7*.

Njakou Djomo, S. (2009) Life cycle assessment of biohydrogen production and applications for modeling the transition to hydrogen economy [dissertação]. Riga (Latvia): *Riga Technical University*.

Pinto, FAL. Troshina, O. Lindblad, P. (2002) A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1209-1215.

Postgate, J. (1998) *Nitrogen Fixation*. In: Postgate, J.R. (Ed.), Cambridge University Press, UK. ISBN: 9780521648530

Prince, RC. Ksheshgi, HS. (2005) The photobiological production of Hydrogen: potential efficiency and effectiveness as renewable fuel. *Crit Rev Microbiol.*, 31: 19-31.

Przybyla, AE. Robbins, J. Menon, N. Peck, Jr HD. (1992) Structure function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* 88: 109-36.

Rajaab, R. Hemaiswaryab, S. Ashok Kumarac, N. Sridharad, S. Rengasamya, R. (2008) A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34, 77-88.

Ramchandran, S. Mitsui, A. (1984) Recycling of hydrogen photoproduction system using an immobilized marine blue green algae *Oscillatoria* sp. Miami BG7, solar energy and seawater. *VII Int Biotechnol Symp*, 183-184.

Rao, KK. Cammack, R. (2001) Producing hydrogen as a fuel. In: Commack R, Frey M, Robson M, editors. *Hydrogen as a fuel-learning from nature*. London: Taylor & Francis, 201-230.

Romagnoli, F. Blumberga, D. Pilicka, I. (2011) Life cycle assessment of biohydrogen production in photosynthetic processes. *Int J Hydrog Energy*, 36: 7866-7871.

Rosenberg, J.N. Oyler, G.A. Wilkinson, L. Betenbaugh, M.J. (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current opinion in Biotechnology*, 19, 430-436.

Sander, K. Murthy, GS. (2010) Life cycle analysis of algae biodiesel. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 15:704-714.

Schneider, P. Lehr, F. Posten, C. (2007) Modelling of growth and product formation of *Porphyridium purpureum*. *Journal of Biotechnology*, 132: 134–141.

Schulz, R. (1996) Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria. *J Mar Biotechnol*, 4:16-22.

- Sen, U. Shakti, M. Banerjee, R. (2008) Status of biological hydrogen production. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67: 989-993.
- Spolaore, P. Joannis-Cassan, C. Duran, E. Isambert, A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.
- Tamagnini, P. Axelsson, R. Lindberg, P. Oxelfelt, F. Wunschiers, R. Lindblad, P. (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66: 1-20.
- Tamagnini, P. Leitão, E. Oliveira, P. Ferreira, D. Pinto, F. Harris, D. (2007) Cyanobacterial hydrogenases. Diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol Rev*, 31: 692-720.
- Tamagnini, P. Leitão, E. Oxelfelt, F. (2004) *Uptake hydrogenase in cyanobacteria: novel input from non-heterocystous strains*. International Hydrogenases Conference, 67-69.
- Verne, J. (1874) *The Mysterious Island*.
- Vignais, PM. Billoud, B. Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev*, 25: 455-501.
- Wang, J. Wan, W. (2008) Experimental Design Methods for Fermentative Hydrogen Production: A Review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, 235-244.
- Wulf, C. Kaltschmitt, M. (2013) Life cycle assessment of biohydrogen production as a transportation fuel in Germany. *Bioresource Technology*.
- Yu, J. Takahashi, P. (2007) *Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae*. In: Mendez-Vilas A. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Formatex.
- Zeng, X. Danquah, MK. Chen, XD. Lu, Y. (2011) Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15: 3252-3260.

Recursos online:

<http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0g.htm#TopOfPage>. Acedido em Janeiro de 2014.

<http://www.nyserda.org>. Acedido em Janeiro de 2014.

<http://www.wired.com/science/discoveries/news/2002/08/54456>. Acedido em Agosto de 2013.

<http://www.fuelcelltoday.com/about-fuel-cells/history>. Acedido em Janeiro de 2014.

ANEXO I

Composição do meio BG110:

- $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0.04 g/l)
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.075g/l)
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.036g/l)
- Ácido cítrico (0.006 g/l)
- citrate de ammonia e ferro (0.006 g/l)
- EDTA (0.001 g/l)
- Na_2CO_3 (0.02 g/l)
- H_3BO_3 (0.00286 g/l)
- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.00181 g/l)
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.000222 g/l)
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.00039 g/l)
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.000079 g/l)
- $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0.0000494 g/l)

ANEXO II

Evolução da Densidade Óptica das 4 estirpes de *Anabaena sp. PCC 7120* ao longo do tempo

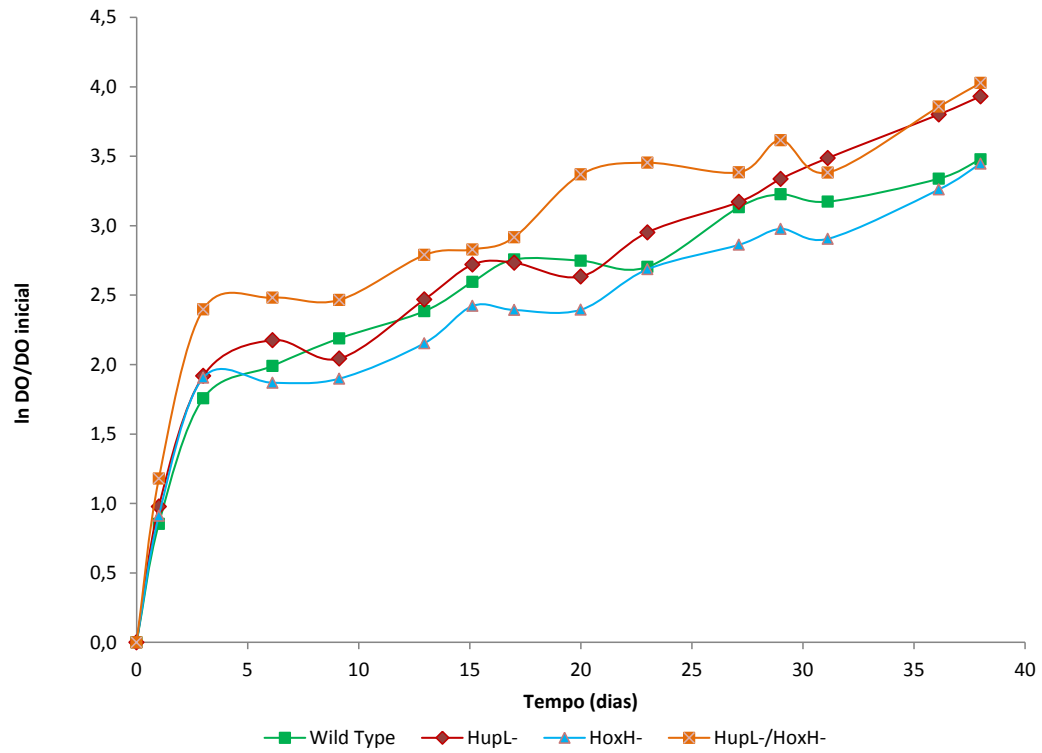


Figura 6.1 - Evolução da Densidade óptica das 4 estirpes de *Anabaena sp. PCC 7120* ao longo do tempo.

ANEXO III

Método para determinação da Clorofila a (Meeks et al., 1971):

A suspensão (1 mL) foi centrifugada a 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 C) durante 3 minutos, retirou-se o sobrenadante e a extracção de clorofila a foi feita com 1 mL de metanol a 90% (v/v), à temperatura ambiente, no escuro. A absorvância foi determinada a 663 nm (UV mini 1240, Shimadzu). A quantidade de Chl a foi determinada recorrendo ao uso da equação:

$$C (\mu\text{g/mL}) = DO_{663\text{nm}} * 12,7.$$

ANEXO IV

Consumo de Azoto em atmosferas de 100% de azoto

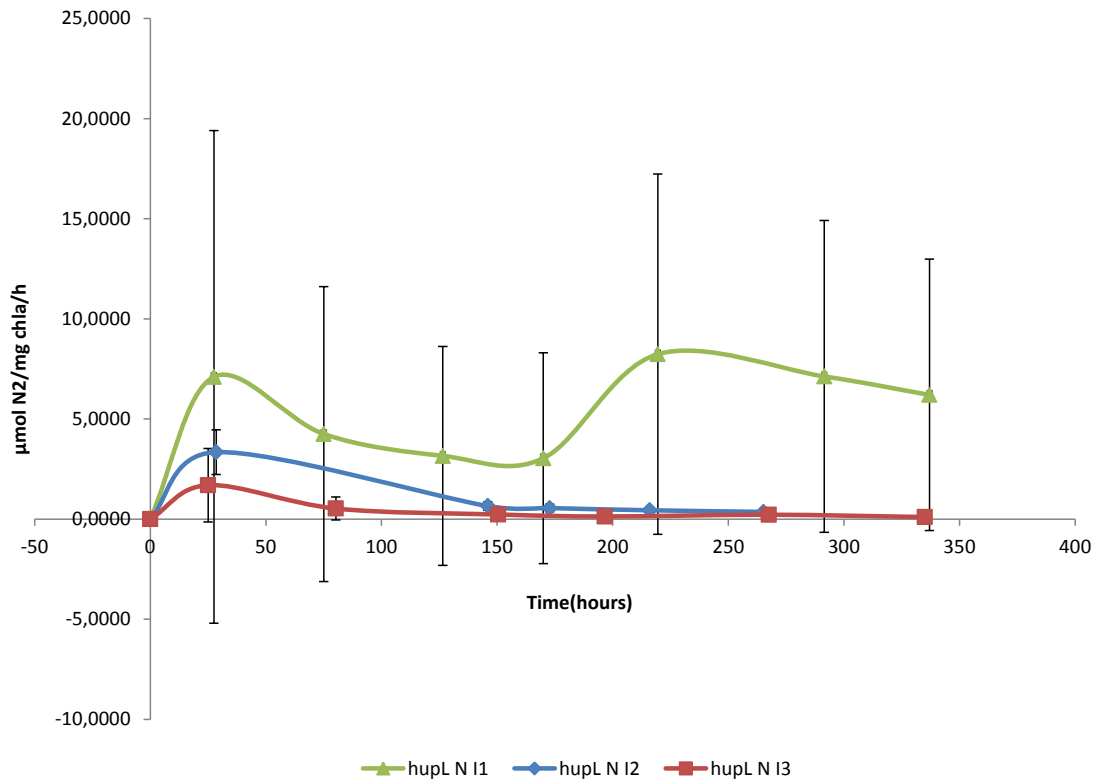


Figura 6.2 - Consumo de Azoto em atmosferas de 100% de azoto para as três intensidades luminosas testadas (4,20 Klux, 4,69 Klux e 9,46 Klux). Dados indicados em anexo devido aos elevados desvios padrão.