

I microrganismi per la produzione di idrogeno: una via a basso impatto ambientale che sfrutta fonti di energia rinnovabili

INTRODUZIONE

La produzione biologica di idrogeno presenta caratteristiche tali da renderla potenzialmente vantaggiosa rispetto alle tecniche termochimiche ed elettrochimiche attualmente in uso, dal momento che i microrganismi possono produrre questo gas a partire da fonti di energia rinnovabili in processi a basso impatto ambientale, operanti a temperatura e pressione ambiente, i quali possono anche essere alimentati da rifiuti di natura organica (scarti vegetali, sottoprodotti di industrie alimentari etc.) (Lee et al., 2010). I processi biologici capaci di produrre H_2 sono di tre tipi: (a) la biofotolisi dell'acqua, condotta da alcune microalghe e cianobatteri; (b) la fermentazione di composti organici condotta da batteri chemoeterotrofi (in particolare Clostridi, Enterobatteri e alcuni batteri termofili appartenenti ai generi *Caldicellulosiruptor* e *Thermotoga*); (c) la fermentazione di composti organici condotta da batteri fotosintetici anossigenici (in particolare i batteri rossi non sulfurei).

Negli ultimi dieci anni, al fine di ampliare il campo di applicabilità dei sistemi biologici nella produzione di idrogeno, è stato suggerito di combinare processi diversi, realizzando sistemi biologici misti, che operano attraverso una prima fase di fermentazione, condotta da batteri chemoeterotrofi anaerobi, e una fase successiva di fotodegradazione, condotta con batteri fotosintetici anossigenici che utilizzano gli acidi grassi a basso peso molecolare prodotti nella fase precedente. È stato infatti ipotizzato che l'uso dei due processi fermentativi in serie (il primo processo condotto da batteri chemoeterotrofi e il secondo condotto da batteri fotosintetici) potesse consentire di avvicinare la

* Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università degli Studi di Firenze

produzione massima teoricamente ottenibile di 12 moli di idrogeno per mole di glucosio consumata (Redwood et al., 2009).

Alla luce di queste considerazioni, le ricerche condotte nell'ambito del Progetto FI-Hydrolab (2004-2009) avevano come obiettivo l'approfondimento delle conoscenze sui sistemi combinati di produzione di idrogeno al fine di individuare le condizioni adeguate all'ottimizzazione delle rese di conversione dei substrati organici, in particolare di residui vegetali, in idrogeno. Lo scopo principale del progetto era quindi quello di sperimentare e ottimizzare, in scala di laboratorio, la produzione di idrogeno attraverso la combinazione dei due processi microbici sopra menzionati, fermentazione al buio e successiva fotodegradazione, utilizzando come substrati iniziali scarti di natura vegetale.

In questo resoconto vengono riportati i principali risultati ottenuti nel corso dei sei anni di attività di studio condotte dal gruppo di ricerca appartenente al Dipartimento di Biotecnologie agrarie nell'ambito del Progetto *Firenze Hydrolab*.

PROCESSI BIOLOGICI DI PRODUZIONE DI IDROGENO

Come sopra menzionato, i processi biologici che portano alla produzione di idrogeno sono i seguenti: (i) produzione di idrogeno dalla biofotolisi dell'acqua, condotta da microalghe e da cianobatteri, (ii) produzione di idrogeno per via fermentativa (fermentazione al buio), condotta da microrganismi chemoeterotrofi, (iii) produzione di idrogeno per via fotofermentativa (fotofermentazione), condotta da batteri fotoeterotrofi, (iv) sistemi integrati di produzione di idrogeno, che uniscono fermentazione al buio e fotofermentazione.

Biofotolisi dell'acqua

La possibilità di utilizzare microrganismi fotosintetici ossigenici (cianobatteri e microalghe) per la produzione simultanea di idrogeno e ossigeno sfruttando la fotolisi dell'acqua dovuta al processo fotosintetico è considerata un'opzione molto interessante per la produzione di idrogeno biologico. In effetti, questo processo utilizza fonti di energia e di idrogeno ampiamente disponibili, quali la luce solare e l'acqua, per produrre H_2 in un processo pulito e a bilancio di carbonio neutro. Uno schema semplificato di questo processo è riportato in figura 1: i fotoni che derivano dalla luce del sole determinano la reazione di scissione dell'acqua al fotosistema II (PSII) di cellule di microalghe o cianobatteri e gli elettroni che derivano da questo processo sono convogliati,

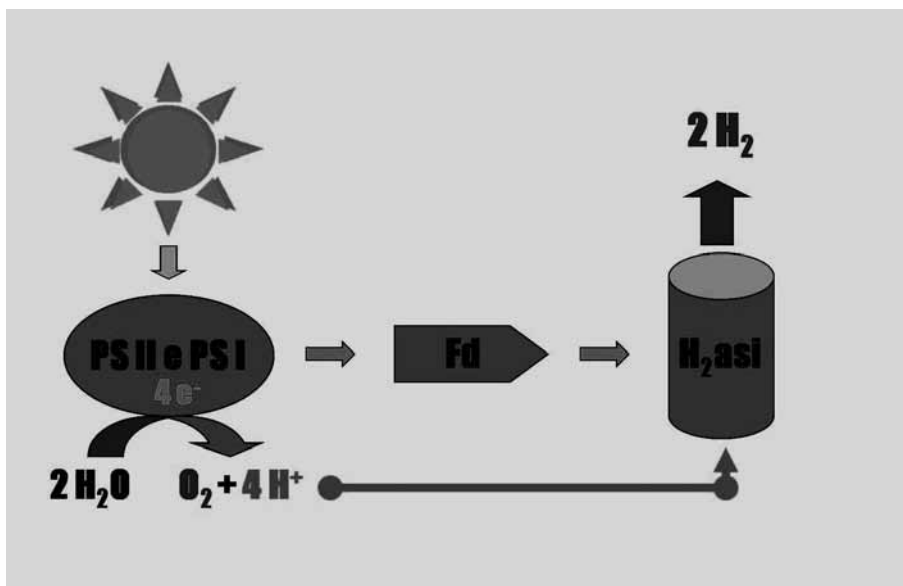
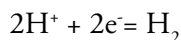


Fig. 1 Schema di produzione di H_2 da una microalga mediante biofotosintesi dell'acqua
 PSII = fotosistema II; PSI = fotosistema I; Fd = ferredossina

attraverso la ferredossina, alla idrogenasi (una Fe-Fe idrogenasi nel caso delle microalghe o una Ni-Fe idrogenasi nel caso di alcuni cianobatteri) o alla nitrogenasi (nella maggior parte dei cianobatteri), entrambi enzimi in grado di catalizzare la reazione di formazione di idrogeno:



Le idrogenasi sono enzimi reversibili, vale a dire catalizzano la reazione in entrambe le direzioni, a seconda delle condizioni ambientali, mentre la nitrogenasi è unidirezionale, ma richiede ATP per poter trasferire gli elettroni allo ione H^+ .

Nonostante il fascino esercitato da questa via pulita ed elegante per ottenere idrogeno da acqua e sole, ci sono tre principali limitazioni che ostacolano lo sfruttamento industriale di questo processo per la produzione di H_2 : (a) sia l'idrogenasi che la nitrogenasi sono enzimi sensibili all'ossigeno che viene prodotto in grandi quantità durante la fotosintesi, (b) nel processo si sviluppano miscele di idrogeno e ossigeno che sono potenzialmente esplosive, (c) il processo è caratterizzato da bassi tassi di produzione di H_2 in confronto con altri metodi biologici (Rupprecht et al., 2006).

Produzione di idrogeno per via fermentativa (fermentazione al buio)

Molti batteri chemoeterotrofi sono in grado di produrre idrogeno in condizioni anaerobiche degradando materia organica in processi fermentativi chiamati comunemente “fermentazione al buio” per distinguerli dalla “fotofermentazione”, descritta nel paragrafo successivo. La produzione di idrogeno durante la fermentazione è conseguenza della necessità delle cellule di eliminare l'eccesso di potere riducente prodottosi nell'ossidazione dei substrati organici. Gli elettroni in eccesso vengono quindi incanalati verso l'idrogenasi, l'enzima che catalizza la formazione di idrogeno gassoso nei batteri chemoeterotrofi. Se il materiale organico fermentato deriva da biomasse vegetali (residui agricoli, rifiuti derivanti da prodotti alimentari, ecc.) il bioidrogeno così ottenuto è considerato come derivante da fonte energetica rinnovabile in quanto le biomasse vegetali hanno tratto origine dalla fotosintesi.

Tuttavia, i batteri fermentativi possono anche in parte avvalersi di altre vie metaboliche per eliminare il potere riducente in eccesso, con il conseguente rilascio di altri composti solubili ridotti, quali acetato, butirrato, etanolo ecc., a seconda del via fermentativa utilizzata, diminuendo in tal modo la resa di produzione in idrogeno.

Le vie fermentative che portano alla produzione di idrogeno iniziano sempre con la degradazione della frazione zuccherina presente nei substrati fermentescibili. I carboidrati sono degradati, attraverso la via glicolitica o la via dei pentosi fosfato, a piruvato il quale può essere ulteriormente ossidato seguendo due percorsi differenti, uno catalizzato dalla piruvato:ferredossina ossidoriduttasi (PFOR) e l'altro dalla piruvato:formiato liasi (PFL). Nel primo percorso, tipico dei clostridi, il piruvato viene degradato ad acetil-CoA, CO_2 e ferredossina ridotta, in una reazione catalizzata dalla PFOR. Quindi, la ferredossina ridotta dona gli elettroni a una [Fe-Fe] idrogenasi, con la conseguente formazione di idrogeno. In aggiunta all'idrogeno prodotto per questa via, anche il NADH prodotto durante la glicolisi può essere riossidato, in presenza di bassi valori di pressione parziale di idrogeno e con la partecipazione di una [FeFe] idrogenasi, dando luogo così alla formazione di quantità addizionali di idrogeno. Tuttavia, quando la pressione parziale di idrogeno è a valori moderati o alti, la reazione sopra descritta diventa sfavorevole e la quindi riossidazione del NADH viene condotta utilizzando l'acetil-CoA come substrato, con la conseguente produzione di butirrato invece che di idrogeno (Hallenbeck, 2009).

Nella fermentazione acido-mista, tipica dei batteri enterici, il piruvato derivante dalla degradazione dei carboidrati viene scisso in acetil-CoA e for-

miato, il quale a sua volta viene convertito in H_2 e CO_2 in una reazione catalizzata dalla PFL in condizioni di basso pH. Occorre però sottolineare che, a bassi valori di pH, è attiva la lattato deidrogenasi (LDH), la quale catalizza la riduzione del piruvato a lattato, con la conseguente sottrazione di NADH e di una molecola di piruvato non più disponibili quindi per la reazione di formazione di idrogeno. L'acetil-CoA prodotto insieme al formiato può essere convertito in acetato o in etanolo, a seconda delle condizioni di coltura (Hallenbeck, 2009).

È stato dimostrato che, nelle fermentazioni condotte dai batteri chemotrofici si possono ottenere un massimo di 4 moli di H_2 per mole di glucosio consumata a causa di limitazioni metaboliche e termodinamiche. Questo limite, chiamato limite di *Thauer*, è determinato dalla necessità per le cellule di ottenere, tramite fosforilazione a livello del substrato, almeno 1 mole di ATP per mole di glucosio consumata per sostenere i processi metabolici (Thauer, 1977).

Produzione di idrogeno per via fotofermentativa (fotofermentazione)

Nella fotofermentazione, batteri fotosintetici anossigenici, in particolare i batteri rossi non sulfurei (BRNS) riducono gli ioni H^+ a H_2 gassoso utilizzando il potere riducente derivante dall'ossidazione di composti organici (quali ad esempio acidi grassi a basso peso molecolare) e l'energia derivante dalla luce del sole. Questo processo è generalmente considerato molto promettente a causa delle alte rese di conversione del substrato in idrogeno, della capacità dei BRNS di utilizzare un ampio spettro di lunghezze d'onda della luce solare, dell'assenza di reazioni che portano allo sviluppo di O_2 (che abbiamo visto inibire gli enzimi che catalizzano la produzione di H_2) e della possibilità di associare la produzione di H_2 a processi di smaltimento di rifiuti organici (Basak e Das, 2007). Nel processo fotofermentativo, i BRNS ossidano composti organici a basso peso molecolare (PM), quali ad esempio acidi organici come acetato, lattato, malato, ecc; il potere riducente così ottenuto viene quindi convogliato, attraverso il flusso inverso di elettroni, alla ferredossina e successivamente alla nitrogenasi, l'enzima che catalizza la formazione di idrogeno nei BRNS (fig. 2). Questo processo richiede grandi quantità di ATP sia per attivare il flusso inverso di elettroni che per l'attività della nitrogenasi.

La quantità massima di idrogeno ottenibile dagli acidi organici più fre-

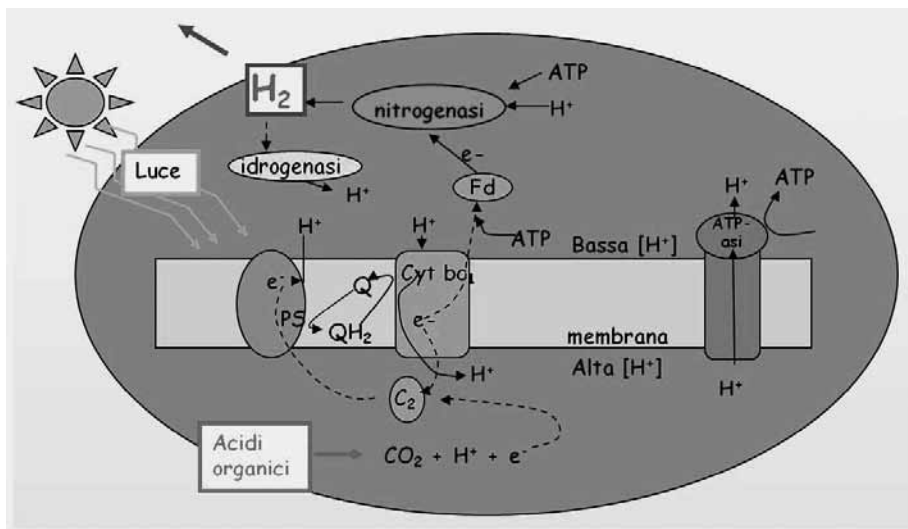
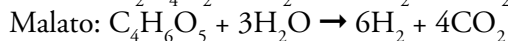
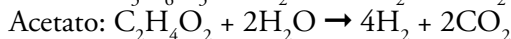
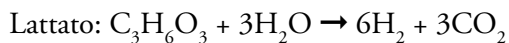


Fig. 2 Fotofermentazione nei batteri rossi non solforati. PS = fotosistema; Fd = ferredossina; $Cyt\ bc_1$ = Citocromo bc_1 ; c_2 = citocromo c_2

quentemente utilizzati può essere calcolata dalle reazioni stechiometriche della loro ossidazione completa:



Tuttavia, va sottolineato che una parte del substrato organico è utilizzato come fonte di carbonio per la crescita cellulare e che alcuni acidi organici, come l'acetato e il butirato, possono essere utilizzati dalle cellule per la sintesi di poli-beta-idrossibutirrato (PHB) anziché per la produzione di H_2 (Vincenzini et al., 1997). Così, molto frequentemente la conversione del substrato in idrogeno rimane al di sotto del valore teorico. Infatti, con l'unica eccezione di un'efficienza di conversione del 100% riportata da Sasikala et al. (1990) per una cultura di 2 ml, sono state riportate efficienze di conversione comprese tra il 69 e il 75% per l'acetato, tra il 50 e l'85% per il lattato e tra il 25 e l'88% per il malato (Adessi e De Philippis, 2011).

L'efficienza di conversione è fortemente influenzata dal rapporto carbonio/azoto nella cultura: un elevato rapporto C/N nei terreni di coltura solitamente porta a un'alta produzione di idrogeno, mentre un basso rapporto C/N porta a un'elevata crescita cellulare, con conseguente bassa resa di produzione di H_2 (Redwood et al., 2009).

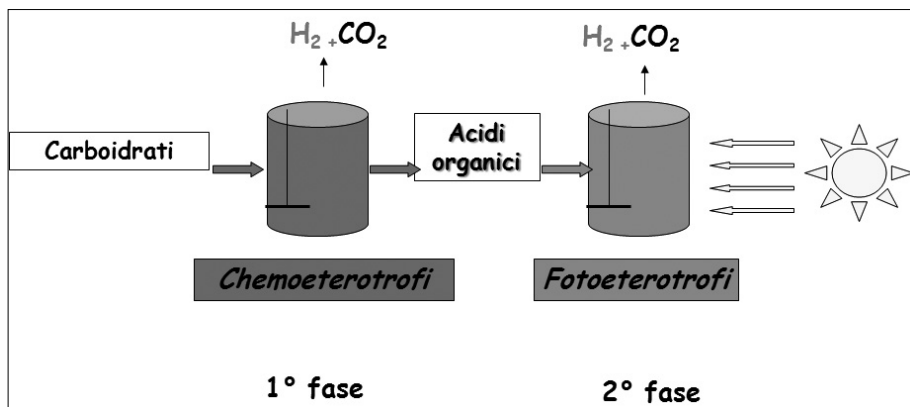


Fig. 3 Schema dei processi integrati a due fasi per la produzione di bioidrogeno

Sistemi integrati di produzione di idrogeno

Come sopra riportato, la fermentazione al buio può portare alla produzione massima di 4 moli di H_2 per mole di glucosio consumato, con il rilascio contemporaneo nel terreno di coltura di un certo numero di composti organici parzialmente ossidati, prevalentemente acidi grassi a basso PM, che ancora potrebbero essere utilizzati come donatori di elettroni. Tuttavia, la loro ossidazione per ottenere ulteriore potere riducente è termodinamicamente sfavorevole a causa dei valori molto positivi di $\Delta G^{0'}$ di queste reazioni. Per esempio, nel caso dell'ossidazione di acetato a CO_2 e H_2 il valore di $\Delta G^{0'}$ è di $104,6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Di conseguenza, questo processo è impraticabile per i batteri chemoeterotrofi ma diventa possibile attraverso la fotofermentazione dell'acetato o di altri composti analoghi effettuata dai BRNS, i quali ricavano dalla luce solare l'energia necessaria per queste reazioni endoergiche.

Muovendo da queste considerazioni, negli ultimi anni molti gruppi di ricerca hanno studiato la possibilità di utilizzare un processo in due fasi in cui, nella prima fase, la fermentazione di substrati organici viene condotta utilizzando batteri chemoeterotrofi, i quali producono H_2 e acidi organici a basso PM, mentre nella seconda fase gli acidi precedentemente prodotti sono utilizzati dai BRNS come donatori di elettroni per la fotoevoluzione di idrogeno catalizzata dalla nitrogenasi (fig. 3).

Molti studi sono stati condotti negli ultimi anni sui sistemi integrati, ottenendo in alcuni casi risultati molto promettenti (vedi le rassegne di Redwood et al., 2009, e di Adessi e De Philippis, 2011). Per esempio, risultati molto interessanti sono stati riportati da Kim et al. (2006), i quali, utilizzando bio-

PROCESSO	MICROORGANISMI	VANTAGGI	SVANTAGGI
Biofotolisi dell'acqua	Microalghe verdi Cianobatteri	- Produzione da H_2O e luce solare	- Enzimi coinvolti nella produzione di H_2 sono sensibili a O_2 - Bassi tassi di produzione di H_2
Fermentazione al buio	Batteri chemoteterotrofi fermentanti (vari generi)	- Processo anaerobico - Può utilizzare substrati rinnovabili e di scarto di altri processi industriali - Non è influenzato dai cicli luce/buio - Alti tassi di produzione	- Ossidazione incompleta dei substrati - E' influenzato negativamente dalla pressione parziale di H_2 - Produce CO_2 , che occorre separare da H_2
Fotofermentazione	Batteri fotosintetici anossigenici (batteri rossi non solfurei -BNRS)	- Usa composti presenti in acque reflue industriali o derivanti dalla fermentazione al buio - Usa un'ampia gamma di lunghezze d'onda della luce solare	- La nitrogenasi consuma grandi quantità di ATP - La nitrogenasi è sensibile a NH_4^+ - Bassa efficienza di conversione dell'energia luminosa in H_2

Tab. 1 *Principali vantaggi e svantaggi dei processi biologici di produzione di idrogeno*

massa algale come substrato di partenza per la produzione di idrogeno hanno raggiunto una produttività complessiva di 8,3 moli di H_2 per mole di glucosio. Ottimi risultati sono stati ottenuti anche utilizzando come substrato residui di fecola di patate dolci, con i quali è stata ottenuta una produttività di 7,2 moli di H_2 per mole di glucosio (Yokoi et al., 2001; 2002). Con i melassi di barbabietola sono state ottenute 6,85 moli di H_2 per mole di glucosio consumata (Özgür et al., 2010).

Limiti dei sistemi biologici di produzione di idrogeno e problemi da risolvere

I principali vantaggi e svantaggi dei processi biologici di produzione di idrogeno sono riassunti nella tabella 1.

In particolare, a causa dei bassi tassi di produzione dell'idrogeno e dell'inibizione degli enzimi che catalizzano la formazione di H_2 dovuta all'ossigeno prodotto dalla fotosintesi, non sembra per il momento molto realistico proporre la biofotolisi dell'acqua per la produzione industriale di idrogeno per via microbiologica.

D'altra parte, la fermentazione al buio mostra i più alti tassi di produzione di H_2 rispetto agli altri sistemi biologici e ha il vantaggio di poter utilizzare substrati organici complessi di scarto (cellulosa, rifiuti alimentari, rifiuti urbani, ecc) per

la produzione del gas. Occorre però sottolineare come la resa in idrogeno sia bassa, circa il 17%, e come l'ossidazione incompleta dei carboidrati lasci nel brodo di fermentazione un certo numero di composti solo parzialmente ossidati. La fotofermentazione sembra essere piuttosto promettente, grazie alla sua capacità di utilizzare un gran numero di composti organici rilasciati dalla fermentazione al buio o presenti in rifiuti industriali e alla sua capacità di sfruttare l'energia della luce solare con un processo fotosintetico che non rilascia O_2 . D'altra parte, la fotofermentazione mostra una bassa efficienza di conversione della luce e la nitrogenasi, l'enzima che catalizza la formazione di H_2 nei BRNS, è sensibile all'ammoniaca, un composto spesso presente ad alte concentrazioni nei brodi derivanti dalla fermentazione al buio.

A questo proposito, l'uso di sistemi integrati in due fasi è realisticamente il processo più adatto per la futura produzione di idrogeno per via biologica.

Come sopra riportato, i microrganismi più frequentemente utilizzati nei processi fermentativi di produzione di idrogeno al buio sono batteri chemoeterotrofi mesofili, appartenenti ai Clostridi o agli Enterobatteri, e alcuni batteri termofili appartenenti ai generi *Caldicellulosiruptor* e *Thermotoga*. I vantaggi nell'utilizzo di batteri termofili sono correlati alla cinetica più veloce di produzione di H_2 e a un miglior controllo della contaminazione del bioreattore da parte di altri microrganismi. Questi vantaggi potrebbero controbilanciare i maggiori costi energetici dovuti all'uso di batteri termofili; inoltre, va sottolineato come l'uso per la termostatazione di questi processi di acque ad alta temperatura derivanti da cicli di raffreddamento di processi industriali potrebbe portare a una significativa riduzione dei costi di un processo condotto con batteri termofili. Per quanto riguarda la fase di fotofermentazione, i BRNS sono gli organismi più adatti a causa delle alte rese di conversione substrato che possono essere raggiunte, della possibilità di utilizzare un'ampia gamma di lunghezze d'onda della luce solare, e dell'ampia varietà di composti organici che possono utilizzare come substrato per la produzione di idrogeno.

Anche se l'integrazione di questi due processi sembra essere la soluzione migliore per la produzione di idrogeno per via biologica, restano aperti una serie di problemi da affrontare e risolvere per rendere economicamente sostenibile questo processo.

Infatti, in aggiunta alle limitazioni dei due processi presi singolarmente, l'integrazione implica l'insorgere di ulteriori problemi specifici: in primo luogo, le modalità di coltura possono influenzare le strategie di integrazione dei due processi, in particolare per quanto riguarda la separazione dal fermentato della biomassa sviluppatasi nella prima fase del processo. Inoltre, se si

intende operare in condizioni axeniche con il solo microrganismo inoculato, l'effluente deve essere sterilizzato e trattato in maniera adeguata (cioè integrato con alcuni nutrienti presenti in quantità limitanti la crescita o modificato nella composizione di azoto), portando così a un aumento dei costi. Inoltre, nel caso della fase di fotofermentazione, vi è la necessità di garantire una distribuzione ottimale della luce all'interno del fotobioreattore, parametro che influenza in maniera significativa l'efficienza di conversione della luce in idrogeno (Dasgupta et al., 2010; Gadhamshetty et al., 2011).

RISULTATI OTTENUTI NELL'AMBITO DEL PROGETTO «FIRENZE HYDROLAB»

Le ricerche condotte nell'ambito del Progetto *Firenze Hydrolab* dal gruppo di ricerca appartenente al Dipartimento di Biotecnologie agrarie dell'Università degli Studi di Firenze sono state indirizzate all'approfondimento delle conoscenze del processo di fotofermentazione condotto da batteri rossi non sulfurei. In particolare, ci si proponeva di:

1. selezionare, tra batteri fotosintetici rossi non sulfurei isolati da ambienti naturali in apposite campagne di campionamento, ceppi dotati della migliore capacità di produrre idrogeno;
2. creare una collezione di ceppi di batteri fotosintetici rossi non sulfurei a fini di studio e applicativi;
3. ottimizzare, con i ceppi prescelti, le condizioni di coltura per la produzione di idrogeno con substrati organici di varia natura e origine;
4. sperimentare, in scala laboratorio e di impianto semipilota, la possibilità di accoppiare il processo fermentativo di decomposizione di composti organici di vario tipo (reflui civili e/o industriali, rifiuti organici di varia origine, ecc.), condotto da batteri eterotrofi anaerobi, e la fotodecomposizione, da parte dei BRNS, delle molecole organiche a basso peso molecolare formatesi nel corso della fermentazione.

Qui di seguito vengono riportati i principali risultati ottenuti, alcuni dei quali sono già stati oggetto di pubblicazione su riviste internazionali del settore (De Philippis et al., 2007; Melnicki et al., 2008; Bianchi et al., 2010).

Isolamento di nuovi ceppi di batteri rossi non sulfurei da ambienti naturali

Questa linea di ricerca era indirizzata a individuare nuovi ceppi di batteri rossi non sulfurei caratterizzati da alta produzione di idrogeno e da capacità

CEPPI	PROFONDITÀ DI CAMPIONAMENTO	SPECIE
AV1A	- 1m	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
AV1B, AV1C	-1n	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
AV3	-3m	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
AV5A, AV5B, AV6, AV9, AV15A, AV15B, AV21A, AV21B, AV21C, AV27, AV32A, AV32B, AV33	da -5 m a -33 m	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>

Tab. 2 *Identificazione tassonomica relativa ai ceppi isolati*

di adattamento a condizioni di stress ambientali. La ricerca è stata quindi indirizzata all'isolamento di nuovi ceppi di batteri rossi da corpi idrici naturali (laghi vulcanici, fossi stagnanti, ecc.) nei quali era presente una stratificazione tale da consentire lo sviluppo di comunità batteriche capaci di buona attività di produzione di idrogeno. Nel corso del periodo di studio sono stati effettuati campionamenti a varie profondità nel Lago di Averno, lago di natura vulcanica situato a sud di Pozzuoli (NA). Dai campioni così prelevati, sono stati isolati 17 nuovi ceppi di batteri rossi non sulfurei che sono stati caratterizzati per quanto riguardava la loro capacità di produzione di idrogeno su quattro tipi diversi di substrato, acido malico, lattico, acetico e succinico.

Gli isolati batterici sono stati identificati tramite l'analisi dell'rDNA 16S e sono risultati appartenere a quattro diverse specie: *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* e *Rhodospirillum rubrum*. La tabella 2 mostra la diversità tassonomica dei ceppi: è interessante notare come nei primi strati del lago siano state isolate specie diverse di BRNS, mentre a partire da 5 metri di profondità siano stati isolati solo ceppi di *Rhodopseudomonas palustris*.

I risultati del sequenziamento sono stati inoltre utilizzati per fare un'analisi di tipo filogenetico con la creazione di un albero di distanza filogenetica tra i nuovi isolati (Bianchi et al., 2010).

Valutazione della capacità produttiva in idrogeno dei nuovi isolati

Tutti i 17 ceppi di BRNS isolati dal Lago d'Averno sono stati saggiati per la loro capacità di produrre idrogeno su quattro substrati organici diversi (acido acetico, lattico, malico e succinico).

Questa prima valutazione aveva lo scopo di individuare i ceppi produttori di idrogeno e quindi il saggio è stato di tipo qualitativo e i risultati sono rife-

Ceppi	Acido malico	Acido lattico	Acido acetico	Acido succinico
AV1A	+	+	-	+
AV1B	+	+	-	+
AV1C	+	+	-	+
AV3	+	+	-	-
AV5A	+	+	-	+
AV5B	+	+	-	-
AV6	+	+	-	-
AV9	+	+	-	+
AV15A	+	+	-	+
AV15B	+	+	-	+
AV21A	+	+	-	+
AV21B	+	+	-	-
AV21C	+	+	-	-
AV27	+	+	-	-
AV32A	+	+	-	-
AV32B	+	+	-	+
AV33	+	+	+	-

Tab. 3 *Saggi di produzione di idrogeno da parte di ceppi di batteri rossi non sulfurei, isolati dal lago d'Averno, in coltura su acidi organici diversi. Note: (+) = sviluppo di idrogeno; (-) assenza di produzione di idrogeno*

riti alla presenza o alla assenza di produzione di idrogeno sui vari substrati. I saggi di produzione di idrogeno sono stati condotti con terreni di produzione contenenti, singolarmente i quattro diversi acidi organici (acido acetico, lattico, malico e succinico) e hanno mostrato che tutti i ceppi erano in grado di produrre idrogeno sia su acido malico che su acido lattico, mentre soltan-

to nove producevano idrogeno su acido succinico e solo uno (*Rp. palustris* AV33) su acido acetico (tab. 3). Dieci ceppi hanno mostrato la capacità di produrre idrogeno su tre dei quattro substrati saggiati, mentre gli altri sette erano in grado di utilizzare soltanto due substrati.

Prove quantitative di produzione di H_2 da parte dei nuovi isolati

Per questa fase della ricerca sono stati utilizzati tre ceppi di *Rhodopseudomonas palustris* (AV32a, AV32b e AV33), che nelle prove qualitative avevano mostrato di essere in grado di crescere in maniera soddisfacente.

La sperimentazione è stata condotta con colture cresciute su substrato artificiale contenente acido acetico e/o lattico utilizzati singolarmente. Sono stati scelti questi due acidi perché erano quelli prodotti nel corso di prove di fermentazione spontanea di residui vegetali condotte in parallelo (vedi paragrafo successivo).

Il ceppo AV32b è stato saggiato per la produzione di H_2 su terreno contenente acido lattico come substrato organico. Il tasso di produzione è stato di 6,3 mL (H_2) $L^{-1} h^{-1}$, con una conversione del substrato utilizzato in H_2 di circa il 26% del valore teorico. Il ceppo *Rhodopseudomonas palustris* AV32a ha mostrato nello stesso tipo di prova, un tasso di produzione medio di circa 15,7 mL (H_2) $L^{-1} h^{-1}$, con una conversione del 51,8%. Nel caso del ceppo AV33 si è osservata una produzione di H_2 su acido lattico a un tasso medio di 22,5 (+/- 5,1) mL (H_2) $L^{-1} h^{-1}$, e una conversione del substrato del 43,5%, mentre la produzione di H_2 su acido acetico è stata molto bassa e non quantificabile.

I saggi di produzione con acido lattico sono stati successivamente ripetuti, in un fermentatore planare da circa 1,2 L di volume complessivo, con il ceppo AV33 che aveva precedentemente mostrato i tassi di produzione più alti (fig. 4). Nel nuovo tipo di fotobioreattore il tasso medio di produzione è stato di 30,9 (+/- 8,6) mL (H_2) $L^{-1} h^{-1}$, con una conversione del substrato organico in idrogeno di circa il 39%. Il tasso massimo, mantenuto per 24 ore, è stato di 58,0 (+/- 9,3) mL (H_2) $L^{-1} h^{-1}$, quindi circa il doppio del tasso medio di produzione. Da questo tasso di produzione si può calcolare una produzione giornaliera di 1,39 litri di idrogeno per litro di fotobioreattore, un tasso molto interessante se confrontato con i valori riportati in letteratura (MacKinley e Harwood, 2010).

Durante la prova di produzione di H_2 con acido acetico come substrato organico, è stato osservato accumulo di materiale biancastro sul fondo del

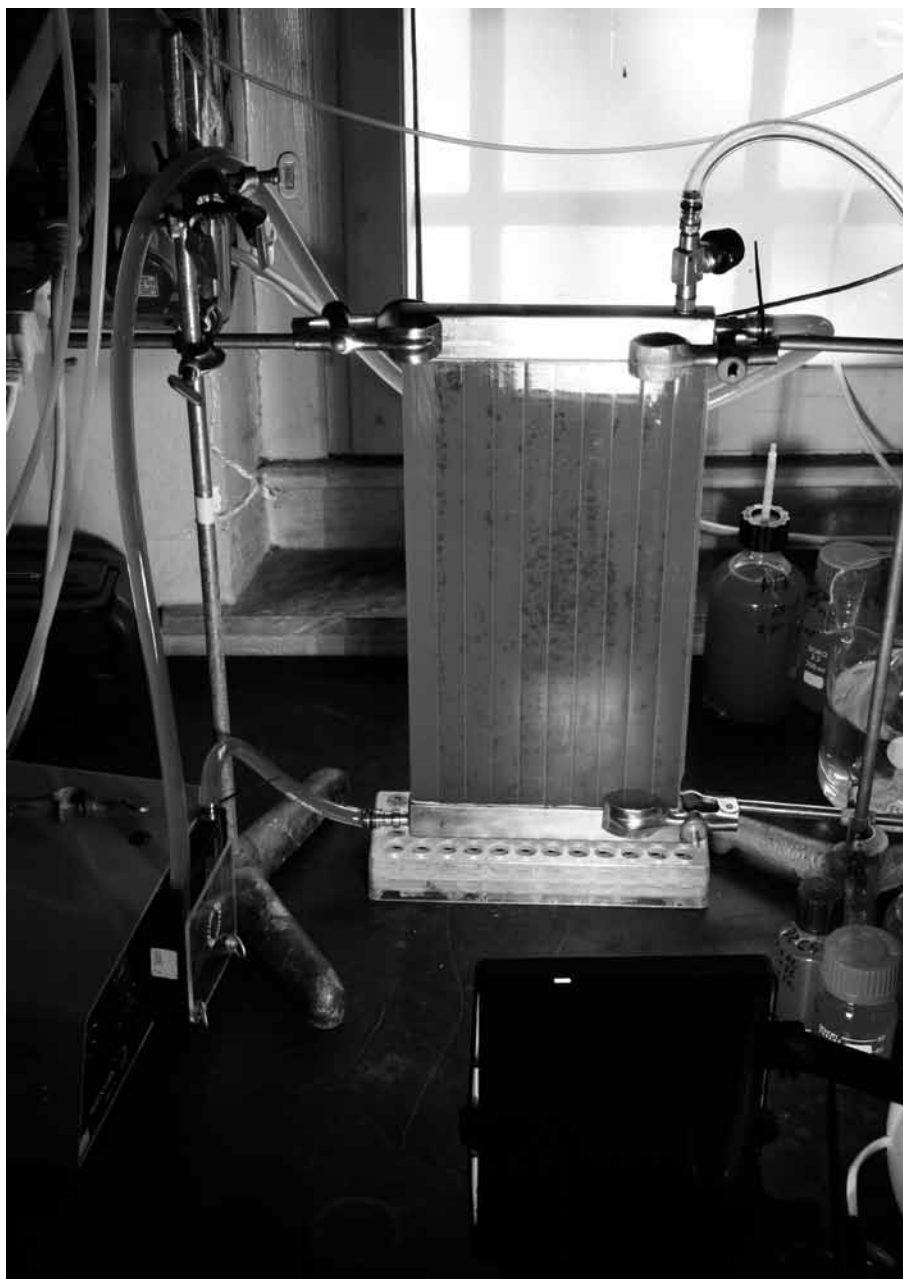


Fig. 4 Fotobioreattore planare da 1.2 L contenente *Rp. palustris* AV33 in fase di produzione di idrogeno (realizzato in collaborazione con Dr Giulio Izzo, ENEA- Centro Ricerche Casaccia)

reattore, che è risultato essere poli- β -idrossibutirrato (PHB). La quantità di PHB presente in cellule di *Rp. palustris* cresciuto su acetato (21%) è risultata circa il doppio di quella coltivata su lattico (11%); inoltre, è risultato che più del 90% dell'acido acetico consumato è stato trasformato in PHB.

*Fermentazione spontanea di residui vegetali e preparazione
del fermentato da utilizzare per la produzione di idrogeno con BRNS*

Lo scopo di questa attività era quello di verificare la possibilità di utilizzare i residui vegetali provenienti dal mercato ortofrutticolo generale di Firenze per la produzione di idrogeno con BNRS e di valutare la possibilità di utilizzare l'idrogeno così ottenuto per produrre energia elettrica tramite celle a combustibile (attività condotta in collaborazione con il gruppo di ricerca ICCOM-CNR partecipante al Progetto *Firenze Hydrolab*).

Le prove sono state effettuate utilizzando residui di frutta e verdura del mercato ortofrutticolo generale di Novoli, forniti già grossolanamente tritati.

La fermentazione spontanea dei residui vegetali è stata effettuata in condizioni di anaerobiosi, in assenza di luce e alla temperatura di 30-35 °C. Sono state effettuate due fermentazioni, la prima a partire dai residui vegetali forniti nel mese di aprile 2006 e la seconda a partire dai residui vegetali del mese di ottobre 2006. Entrambe i processi di acidogenesi sono stati condotti dai microrganismi autoctoni presenti sui residui vegetali, ma utilizzando due diversi rapporti di concentrazione dei residui stessi e due tipi diversi di fermentatore.

La prima fermentazione è stata effettuata utilizzando 5 kg dei rifiuti vegetali tritati immessi in un reattore da 10 L di capacità totale e portato a volume con acqua distillata. Dopo sei giorni la fermentazione è cessata, probabilmente a causa dell'esaurimento dei substrati facilmente fermentescibili presenti nei residui vegetali.

Il fermentato liquido così ottenuto è risultato contenere: acido lattico 13,3 g L⁻¹; acido acetico 2,2 g L⁻¹; etanolo 3,4 g L⁻¹. È stata inoltre determinata la presenza di ammonio in concentrazione pari a 0,38 g L⁻¹. Il pH è variato, nell'arco dei sei giorni, da un valore di 3,9 a 3,5.

La seconda fermentazione è stata condotta in un fermentatore costituito da un contenitore di circa 50L di volume contenente 35 L di H₂O deionizzata e da una cartuccia forata di acciaio inox, di circa 10 L di volume e contenente circa 16 chili di residui vegetali, rivestita da una membrana filtrante che permettesse il rilascio nell'acqua della parte solubile del fermentato. La

concentrazione di acidi organici nel fermentatore è risultata diversa in funzione della frazione analizzata. Sono stati riscontrati nella frazione alta del fermentatore $3,2 \text{ g L}^{-1}$ di acido lattico, $0,55 \text{ g L}^{-1}$ di acido acetico mentre nella frazione di fondo sono stati rinvenuti $6,5 \text{ g L}^{-1}$ di acido lattico e $1,2 \text{ g L}^{-1}$ di acido acetico.

Per procedere alle prove di produzione di H_2 è stato necessario portare il pH della soluzione derivante da fermentazione al valore di 6,8, essendo questo il valore ottimale per la produzione di idrogeno con i batteri rossi non sulfurei. Questo trattamento di neutralizzazione ha causato però la variazione del colore del fermentato, il quale ha virato da un colore giallo/marrone relativamente trasparente a un colore blu/nero. Questo cambiamento ha reso la soluzione non più trasparente, ostacolando così il passaggio della luce e impedendo quindi l'attività di fotoevoluzione di H_2 dei BRNS. Per ovviare a questo problema e alle problematiche connesse con l'alta concentrazione di ammonio presente nel fermentato, sono state allestite prove preliminari qualitative di produzione di H_2 con *R. palustris* 42OL utilizzando il substrato diluito in varie proporzioni.

Produzione di H_2 su brodo di fermentazione

Sono state effettuate due serie di prove con il brodo di fermentazione diluito in modo da ottenere una concentrazione iniziale di acido lattico e acetico rispettivamente di circa $2,5$ e $0,6 \text{ g L}^{-1}$.

Le due serie differivano tra loro per il brodo di fermentazione utilizzato, il quale proveniva da due distinti processi fermentativi dei residui organici vegetali.

Il primo brodo di fermentazione era stato ottenuto a partire dai residui vegetali forniti nel mese di aprile 2006, mentre la seconda fermentazione era stata effettuata su residui vegetali del mese di ottobre 2006. I due processi di acidogenesi erano stati condotti entrambi dai microrganismi autoctoni, ma utilizzando due diversi rapporti di concentrazione dei residui vegetali e due diversi tipi di fermentatore (vedi sopra).

La prima serie di esperimenti è stata effettuata con una concentrazione cellulare iniziale di circa $0,93 \text{ g L}^{-1}$ e con una intensità luminosa di $130 \text{ micromoli (fotoni) m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$. Il tasso di produzione medio è stato di circa $15,6 \text{ mL}$ di idrogeno per L di coltura per ora.

L'efficienza di conversione degli acidi organici in idrogeno è stata di circa il 43,4%; parte del substrato organico è stata infatti utilizzata per la crescita,



Fig. 5 Fotobioreattore da 11 L operante con *Rp palustris* 42OL in produzione di idrogeno su fermentato vegetale

essendo aumentato il peso secco della coltura finale fino a circa $2,0 \text{ g L}^{-1}$. La crescita era certamente dovuta alla presenza di ammonio nel brodo di fermentazione, il quale ha favorito, nella fase iniziale della coltura, l'utilizzazione del substrato consumato per la crescita cellulare a discapito della produzione di idrogeno. Una volta consumato l'ammonio presente, le cellule possono utilizzare il substrato organico per la produzione di idrogeno. La durata della fase di produzione di idrogeno è stata di circa 5/6 giorni e ha portato al consumo totale degli acidi organici presenti.

La seconda serie di esperimenti è stata effettuata con una concentrazione cellulare iniziale di circa $1,25 \text{ g L}^{-1}$ e con una intensità luminosa di $130 \text{ micromoli (fotoni) m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$. I risultati ottenuti sono stati comparabili con quelli della prima serie. Il tasso di produzione medio è stato di $17,0 \text{ mL(H}_2\text{) L}^{-1}\text{h}^{-1}$, con una produzione totale media di idrogeno di $612,1 \text{ mL}$ e un tasso di conversione del substrato in idrogeno pari al $47,4\%$.

Il tasso di produzione di idrogeno rispetto al peso secco della coltura è stato nel primo esperimento di circa $10,61 \text{ mL(H}_2\text{) mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ e nel secondo di $10,97 \text{ mL(H}_2\text{) mg}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Queste prime prove, effettuate utilizzando residui vegetali reali, hanno dimostrato la fattibilità del sistema a due fasi e l'ottima efficienza del processo di fotoproduzione di idrogeno condotto con il brodo di fermentazione dei residui vegetali come substrato.

Inoltre la produzione di idrogeno sui due brodi di fermentazione si è dimostrata comparabile, evidenziando così che l'utilizzo di residui vegetali di due diverse stagioni non ha influenzato significativamente la produzione di idrogeno.

In una fase successiva, sono state effettuate due prove di fotofermentazione in un bioreattore contenente un volume di coltura pari a 11 L (fig. 5).

Entrambe le prove sono state condotte utilizzando il brodo di fermentazione derivante dalla seconda fermentazione dei residui vegetali (vedi sopra), il quale è stato diluito in modo da ottenere una concentrazione iniziale di acido lattico e acetico rispettivamente di circa $2,5$ e $0,6 \text{ g L}^{-1}$, comparabile con quella delle prove di produzione di idrogeno condotte precedentemente.

La prima prova di fotofermentazione è stata condotta con la frazione di fermentato a più alta concentrazione di acidi organici, opportunamente diluita in modo da avere la concentrazione iniziale di acidi organici sopra indicata.

La prima sperimentazione è stata effettuata con una concentrazione cellulare iniziale di circa 150 mg L^{-1} . Il tasso di produzione medio è stato di circa $6,3 \text{ mL}$ di idrogeno per L di coltura per ora, mentre il massimo tasso di produzione, sostenuto per circa 1 giorno, è stato di $17,2 \text{ mL H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ L}^{-1}$. La

produzione totale di idrogeno è stata di 11,5 L. L'efficienza di conversione degli acidi organici in idrogeno è stata di circa il 24,2 %; parte del substrato organico è stata utilizzata per la crescita, come mostrato dall'incremento di peso secco della coltura, che è arrivata a un peso secco finale di circa 1,4 gL⁻¹. La durata della fase di produzione di idrogeno è stata di 6/7 gg e ha portato al consumo totale dell'acido lattico, ma non dell'acido acetico, il quale non è stato utilizzato. La seconda prova è stata effettuata diluendo la frazione 2 del brodo di fermentazione; la concentrazione cellulare iniziale è stata di circa 290 mg L⁻¹, mentre la concentrazione cellulare raggiunta a fine della prova è stato di circa 1,5 g L⁻¹.

Il tasso di produzione medio di idrogeno è stato di 4,5 mL(H₂) L⁻¹h⁻¹ con un tasso di produzione massimo di 7,7 mL(H₂) L⁻¹h⁻¹ e un tasso di conversione del substrato in idrogeno pari al 33,3 %, con consumo, anche in questo caso, del solo acido lattico. La produzione totale di idrogeno è stata di circa 14 L. Questa seconda prova ha avuto una durata di circa 16 giorni, e può essere suddivisa in tre successive fasi, la prima fase, di circa tre giorni, in cui è stata osservata produzione di idrogeno, seguita da una seconda, di 3 giorni, in cui la produzione di idrogeno era cessata e una ultima fase di produzione di idrogeno, la quale è stata riavviata dall'aggiunta di vitamine e sali minerali al mezzo. I dati sul tasso di produzione sono stati calcolati sui due periodi di produzione (1° e 3° fase).

Il diverso comportamento riscontrato nelle due fotofermentazioni è probabilmente attribuibile all'uso di una frazione diversa del brodo di fermentazione.

La differenza tra le due frazioni è stata definita da una diversa concentrazione di acidi organici, ma è probabilmente associata anche a una diversa concentrazione di altri nutrienti che possono aver avuto una diversa solubilità nelle varie frazioni del brodo di fermentazione, divenendo carenti per il processo di fotoproduzione di idrogeno in questa seconda prova.

Nonostante il diverso andamento nella produzione di idrogeno, le due fotofermentazioni hanno mostrato una produzione totale di idrogeno e una efficienza di conversione dei substrati comparabile.

L'idrogeno prodotto in continuo da *R. palustris* nel fermentatore da 11L, in ambedue le prove effettuate, è stato utilizzato per alimentare una cella a combustibile di tipo PEMFC (Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cell) capace di produrre energia elettrica (fig. 6).

La cella a combustibile utilizzata era stata prodotta dal Dr Francesco Vizza, dell'Unità di Ricerca ICCOM-CNR partecipante al Progetto *Firenze Hydrolab*. L'unità ICCOM-CNR ha appositamente sintetizzato, nell'am-

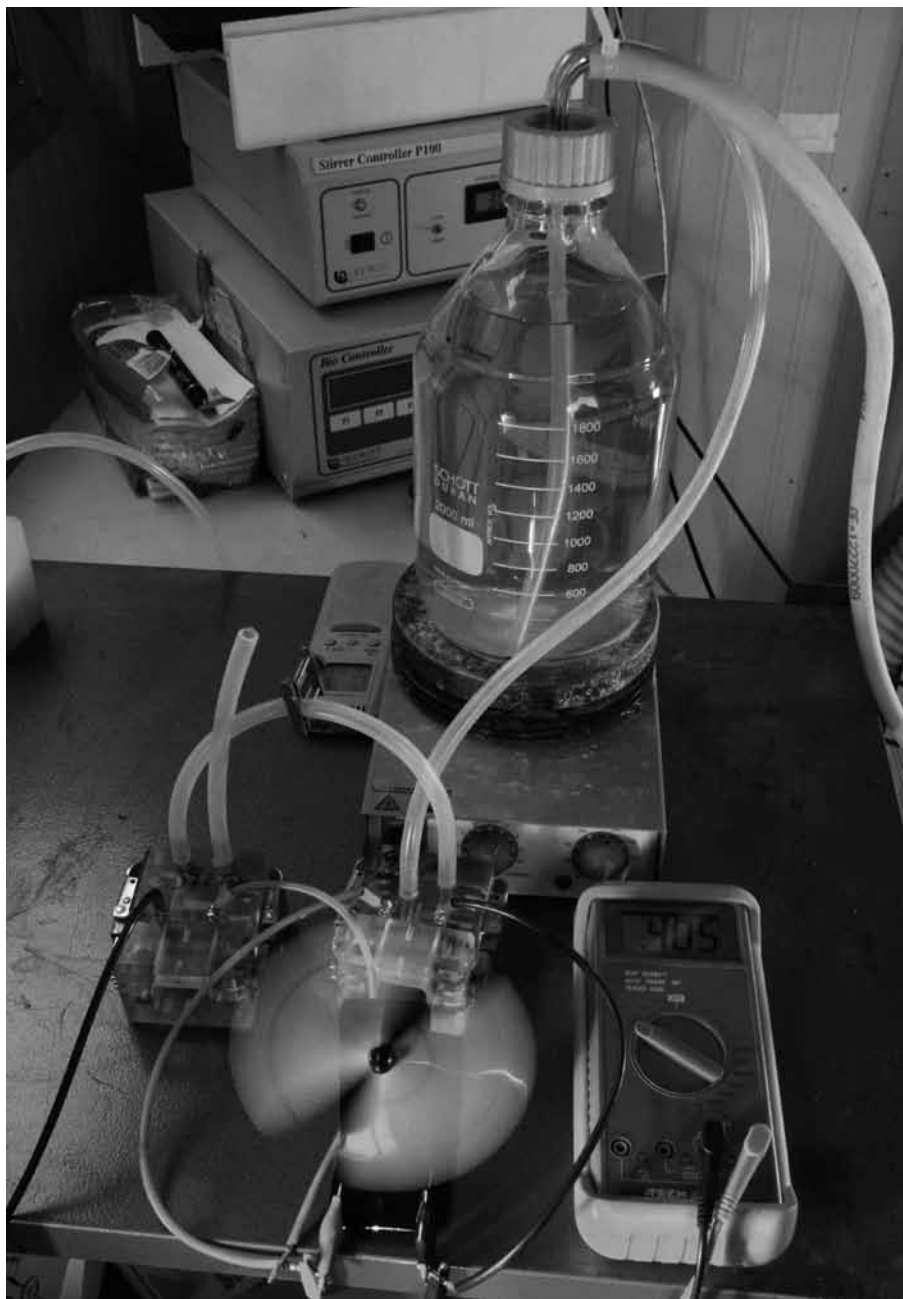


Fig. 6 Cella a combustibile di tipo PEMFC collegata alla coltura di *R. palustris* 42OL in produzione di idrogeno su brodo di fermentazione derivato dalla fermentazione di rifiuti vegetali (cella prodotta dal Dr F. Vizza, ICCOM-CNR)

bito del Progetto *Firenze Hydrolab*, una famiglia di elettrocatalizzatori nanostrutturati per celle a combustibile, formati da leghe binarie e ternarie di metalli di transizione non-nobili (es. Fe, Co, Ni, Sn) e metalli nobili (es. Pt, Pd, Ru). In questi elettrocatalizzatori la quantità di metallo nobile presente, è di gran lunga inferiore rispetto ai catalizzatori per celle a combustibile di arte nota. Questa cella, alimentata in continuo con idrogeno prodotto dal processo di fotofermentazione e da aria, ha operato per alcune ore senza alcun problema sviluppando una densità di potenza massima di circa 60 mW/cm² a temperatura ambiente. Dato che le dimensioni degli elettrodi erano di 5 cm², ogni cella produceva 300 mW. Questa sperimentazione ha quindi messo in evidenza la possibilità di produrre energia elettrica tramite l'impiego di una cella a combustibile dotata di elettrocatalizzatori a basso contenuto di platino e alimentata direttamente da idrogeno prodotto per via biologica da residui vegetali.

CONCLUSIONI

Le attività condotte nell'ambito del Progetto *Firenze Hydrolab* hanno consentito di ottenere alcuni importanti risultati che possono essere così riassunti:

- sono stati isolati nuovi ceppi di batteri rossi non sulfurei capaci di produrre idrogeno in grandi quantità (con *Rp. palustris* AV33 sono stati ottenuti tassi giornalieri massimi di circa 1.4 litri di idrogeno per litro di coltura);
- è stata dimostrata la fattibilità dell'integrazione tra fermentazioni condotte al buio con chemoeterotrofi e fermentazioni condotte alla luce con fotoeterotrofi per produrre idrogeno per via biologica. Le sperimentazioni condotte hanno però anche messo in evidenza che il principale aspetto da studiare al fine di ottenere alte rese di conversione del substrato in idrogeno è legato alla presenza di composti azotati nei fermentati derivanti dai chemoeterotrofi;
- è stata dimostrata la possibilità di collegare direttamente una cella a combustibile al fotobioreattore producendo così energia elettrica a partire dal bioidrogeno ottenuto per fotofermentazione di residui vegetali. Questi risultati hanno messo in evidenza la possibilità di sviluppare a medio termine l'uso di questi sistemi.

Nel prossimo futuro, nuovi sforzi di ricerca dovranno essere compiuti nello sviluppo di sistemi integrati, sia per migliorare l'efficienza di ciascuna delle due fasi che per ridurre l'impatto negativo esercitato sui batteri fotoeterotrofi da parte di alcuni dei composti contenuti nei brodi di fermentazione deri-

vanti dalla prima fase. Inoltre, occorrerà lavorare per aumentare l'efficienza di conversione della luce della fase condotta con fotoeterotrofi, miglioramento che potrebbe essere realizzato manipolando geneticamente i BRNS utilizzati oppure ottimizzando la distribuzione della luce nei fotobioreattori.

RINGRAZIAMENTI

I risultati riportati in questo lavoro sono frutto dell'attività condotta con entusiasmo e competenza da un gruppo di giovani ricercatori che hanno partecipato, in qualità di borsisti del Progetto *Firenze Hydrolab* o di dottorandi di ricerca, agli studi condotti presso il Dipartimento di Biotecnologie agrarie. In particolare si ringraziano le Dottoresse Lucia Bianchi, Francesca Mannelli e Alessandra Adessi e il Dottor Giovanni Colica, che hanno condotto sperimentalmente la maggior parte degli studi sopra descritti svolti nell'ambito del Progetto *Firenze Hydrolab*. Le ricerche sopra riportate sono state oggetto di finanziamento da parte dell'Ente Cassa di Risparmio di Firenze nell'ambito del Progetto *Firenze Hydrolab*, (progetto *motu proprio*). Inoltre, le attività sono state in parte cofinanziate dal MIUR, nell'ambito del Programma strategico "Nuovi sistemi di produzione e gestione dell'energia" (fondi FISR del Ministero dell'Università e della Ricerca), e dalla Regione Toscana, nell'ambito del Programma *Ricerca per l'ambiente - PRAA 2004-2006*.

RIASSUNTO

Dopo una breve descrizione degli aspetti fondamentali della produzione biologica di idrogeno e dello stato di avanzamento delle ricerche sui diversi sistemi produttivi, vengono esposti i principali risultati ottenuti nell'ambito del Progetto *Firenze Hydrolab*. In particolare, sono stati isolati nuovi ceppi di batteri rossi non sulfurei capaci di produrre idrogeno in grandi quantità. Inoltre, è stata dimostrata la fattibilità dell'integrazione tra fermentazioni condotte al buio con chemoeterotrofi e fermentazioni condotte alla luce con fotoeterotrofi per produrre idrogeno per via biologica da residui vegetali. Infine, è stata dimostrata la possibilità di utilizzare l'idrogeno così prodotto in celle a combustibile collegate direttamente all'ambiente di produzione di idrogeno, mettendo in evidenza le potenzialità di una efficiente applicazione a medio termine di questi sistemi.

ABSTRACT

After a brief description of the basic aspects of the biological production of hydrogen and of the researches carried out on the different production systems, the main results

obtained in the framework of the *Firenze Hydrolab* Project are reported. In particular, new purple non sulfur bacterial strains, capable of producing hydrogen in large quantities, have been isolated. It was also demonstrated the feasibility of an integrated system for the biological production of hydrogen that combines dark and photofermentation of vegetable residues. Finally, it has been demonstrated the feasibility of directly using the biohydrogen produced in fuel cells for the production of electricity.

BIBLIOGRAFIA

- ADESSI A., DE PHILIPPIS R. (2011): *Hydrogen production: photofermentation*, in *Microbial technologies in advanced biofuels production*, a cura di P.C. Hallenbeck, Springer Verlag (in stampa).
- BASAK N., DAS D. (2007): *The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art*, «World J Microbiol Biotechnol», 23, pp. 31-42.
- BIANCHI L., MANNELLI F., VITI C., ADESSI A., DE PHILIPPIS R. (2010): *Hydrogen-producing purple non sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy)*, «Int J Hydrogen Energy», 35, pp. 12216-12223.
- DASGUPTA C.N., GILBERT J.J., LINDBLAD P., HEIDORN T., BORVANG S.A., SKJANES K., DAS D. (2010): *Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production*, «Int J Hydrogen Energy», 35, pp. 10218-10238.
- DE PHILIPPIS R., BIANCHI L., COLICA G., BIANCHINI C., PERUZZINI M., VIZZA F. (2007): *From vegetable residues to hydrogen and electric power: feasibility of a two step process operating with purple non sulfur bacteria*, «J Biotechnol», 131S, S122-S123.
- FRANCHI E., TOSI C., SCOLLA G., PENNA D.G., RODRIGUEZ F., PEDRONI M.P. (2004): *Metabolically engineered Rhodobacter sphaeroides RV strains for improved biohydrogen photoproduction combined with disposal of food wastes*, «Marine Biotechnology», 6, pp. 552-565.
- GADHAMSHETTY V., SUKUMARAN A., NIRMALAKHANDAN N. (2011): *Photoparameters in photofermentative biohydrogen production*, «Critical Rev Environ Science Technol», 41, pp. 1-51.
- HALLENBECK P.C. (2009): *Fermentative hydrogen production: principles, progress, and prognosis*, «Int J Hydrogen Energy», 34, pp. 7379-7389.
- HALLENBECK P.C., GHOSH D. (2009): *Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?*, «Trends Biotechnol», 27, pp. 287-297.
- KARS G., GÜNDÜZ U., RAKHELY G., YÜCEL M., EROĞLU I., KOVACS L.K. (2008): *Improved hydrogen production by hydrogenase deficient mutant strain of Rhodobacter sphaeroides O.U.001*, «Int J Hydrogen Energy», 33, pp. 3056-3060.
- KIM M.S., BAEK J.S., LEE J.K. (2006): *Comparison of H_2 accumulation by Rhodobacter sphaeroides KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficient mutant*, «Int J Hydrogen Energy», 31, pp. 121-127.
- LARIMER F.W., CHAIN P., HAUSER L., LAMERDIN J., Malfatti S., DO L., LAND M.L., PELLETIER D.A., BEATTY J.T., LANG A.S., TABITA F.R., GIBSON J.L., HANSON T.E., BOBST C., TORRES Y TORRES J.L., PERES C., HARRISON F.H., GIBSON J., HARWOOD C.S. (2004): *Complete genome sequence of the metabolic versatile photosynthetic bacterium Rhodopseudomonas palustris*, «Nature Biotechnol», 22, 55-61.

- LEE H.S., VERMAAS W.F.J., RITTMANN B.E. (2010): *Biological hydrogen production: prospects and challenges*, «Trends Biotechnol», 28, pp. 262-271.
- McKINLAY J.B., HARWOOD C.S. (2010): *Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel*, «Curr Opin Biotechnol», 21, pp. 244-251.
- MELNICKI M.R., BIANCHI L., DE PHILIPPIS R., MELIS A. (2008): *Hydrogen production during stationary phase in purple photosynthetic bacteria*, «Int J Hydrogen Energy», 33, pp. 6525-6534.
- OOSHIMA H., TAKAKUWA S., KATSUDA T., OKUDA M., SHIRASAWA T., AZUMA M., KATO J. (1998): *Production of hydrogen by a hydrogenase deficient mutant of Rhodobacter capsulatus*, «J Ferment Bioeng», 85, pp. 470-475.
- ÖZGÜR E., MARS A.E., PEKSEL B., LOUWERSE A., YÜCEL M., GÜNDÜZ U., CLAASSEN P.A.M., EROĞLU I. (2010): *Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation*, «Int J Hydrogen Energy», 35, pp. 511-517.
- ÖZTÜRK Y., YÜCEL M., DALDAL F., MANDACI S., GÜNDÜZ U., TÜRKER L., EROĞLU I. (2006): *Hydrogen production by using Rhodobacter capsulatus mutants with genetically modified electron transfer chains*, «Int J Hydrogen Energy», 31, pp. 1545-1552.
- REDWOOD M.D., PATERSON-BEEDLE M., MACASKIE L.E. (2009): *Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: towards the hydrogen economy*, «Rev EnvironSci Biotechnol», 8, pp. 149-185.
- RUPPRECHT J., HANKAMER B., MUSSGNUM J.H., ANANYEV G., DISMUKES C., KRUSE O. (2006): *Perspectives and advances of biological H_2 production in microorganisms*, «Appl Microbiol Biotechnol», 72, pp. 442-449.
- SASIKALA K., RAMANA C.V., RAGHUVeer RAO P., SUBRAHMANYAM M. (1990): *Effect of gas phase on the photoproduction of hydrogen and substrate conversion efficiency in the photosynthetic bacterium Rhodobacter sphaeroides O.U. 001*, «Int J Hydrogen Energy», 15, pp. 795-797.
- THAUER R. (1977): *Limitation of microbial H_2 -formation via fermentation*. In *Microbial energy conversion*, a cura di Schlegel, H.G., Barnea, J. Pergamon, Oxford, pp. 201-204.
- VIGNAIS P.M. (2008): *Regulation of hydrogenase gene expression*, in *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol 28: *The Purple Phototrophic Bacteria*, a cura di Hunter, C.D., Daldal, F., Thurnauer, M.C., Beatty, J.T. Springer, The Netherlands, pp. 743-757.
- VINCENZINI M., MARCHINI A., ENA A., DE PHILIPPIS R. (1997): *H_2 and poly- β -hydroxybutyrate, two alternative chemicals from purple non sulfur bacteria*, «Biotechnol Lett», 19, pp. 759-762.
- YOKOI H., MORI S., HIROSE J., HAYASHI S., TAKASAKI Y. (1998): *H_2 production from starch by a mixed culture of Clostridium butyricum and Rhodobacter sp. M-19*, «BiotechnolLett», 20, pp. 895-899.
- YOKOI H., MAKI R., HIROSE J., HAYASHI S. (2002): *Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes*, «Biomass Bioenergy», 22, pp. 389-395.