

Anno Accademico 2017-2018

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA  
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE

## "LA PRODUZIONE DI IDROGENO ATTRAVERSO I MICRORGANISMI"

*Laureando:*  
Giovanni Schiesaro

*Relatore:*  
Prof. Marco Scocchi

*Co-Relatrice:*  
Prof. Lucia Gardossi

### TAVOLA DEI CONTENUTI

1	INTRODUZIONE.....	pag. 1
	1.1 Fonti alternative di energia.....	pag. 1
	1.2 Idrogeno molecolare.....	pag. 2
	1.3 Glossario.....	pag. 4

2	PRODUZIONE DI H <sub>2</sub> IN NATURA.....	pag. 5
2.1	<i>Dark Fermentation</i> .....	pag. 7
2.2	Biophotolysis.....	pag. 9
2.2.1	Direct biophotolysis.....	pag. 10
2.2.2	Indirect biophotolysis.....	pag. 11
2.4	Fotofermentazione.....	pag. 13
3	IDROGENASI .....	pag. 14
4	LA CELLA DI ELETTROLISI MICROBICA (MEC) .....	pag. 17
4.1	Formazione del biofilm e quorum-sensing.....	pag. 20
4.1.1	Adesione alla superficie.....	pag. 21
4.1.2	Formazione di microcolonie.....	pag. 23
4.1.3	Maturazione del biofilm.....	pag. 24
4.2	H <sub>2</sub> prodotto da bioelettrosintesi.....	pag. 25
4.3	Corrente MEC e bioelettrosintesi di H <sub>2</sub> .....	pag. 27
4.4	Materiale da utilizzare all'elettrodo e pre trattamento.....	pag. 27
4.5	Arricchimento.....	pag. 28
4.6	Singola camera.....	pag. 29
4.7	Sfide future.....	pag. 31
5	CONCLUSIONI.....	pag. 33
6	BIBLIOGRAFIA .....	pag. 35

## 1. INTRODUZIONE

Lo sviluppo di nuove forme di energia sostenibile è necessario per soddisfare una sempre maggiore richiesta energetica e col tempo sostituire i combustibili fossili. Questo elaborato si prefigge l'obiettivo di approfondire le più recenti ricerche scientifiche in merito alla produzione di idrogeno molecolare analizzando le vie biosintetiche che esistono in natura e in particolare una nuova tecnologia emergente: la cella di elettrolisi microbica (MEC).

Attualmente l'idrogeno molecolare ( $H_2$ ) è principalmente sintetizzato dalla reazione di reforming con vapore, un processo non rinnovabile. Esistono strategie biosintetiche per la produzione di  $H_2$ ; tuttavia, sono associate a scarse rese e hanno costi elevati. L'applicazione di una forza motrice elettrochimica in una cella di elettrolisi microbica (MEC) migliora la resa delle reazioni biologiche. Le prestazioni del MEC sono influenzate da parametri sperimentali come il materiale dell'elettrodo, il design del reattore, i consorzi microbici e il substrato.

### *1.1 Fonti Alternative di Energia*

L'aumento della richiesta energetica globale mette a dura prova le riserve di combustibili fossili, necessarie anche per fini industriali non energetici. L'utilizzo di combustibili fossili produce gas serra, come la  $CO_2$ , contribuendo ai cambiamenti climatici. Nell'ambito della produzione di energia sostenibile e nell'ottica di un'economia circolare [1] sono necessarie nuove tecnologie di recupero energetico da integrare alle fonti rinnovabili (energia solare e eolica). Per essere adatte agli investimenti e all'implementazione su larga scala, le tecnologie di recupero energetico dovranno soddisfare 2 requisiti fondamentali: essere competitive, in termine di costi, con le fonti già esistenti sul mercato, e avere un basso impatto

ambientale sull'intero ciclo di vita [2]. La tecnologia di recupero energetico da risorse considerate scarto (es. rifiuti solidi e acque reflue) dovrebbe essere applicabile all'infrastruttura esistente con costi di implementazione minimi. Il recupero di energia dalle acque reflue e dai rifiuti solidi agricoli o alimentari si compie attraverso la produzione di biocarburati, compreso l'idrogeno e alcoli [3-5]. Di seguito, verranno analizzate le strategie di sintesi dell'idrogeno molecolare  $H_2$ .

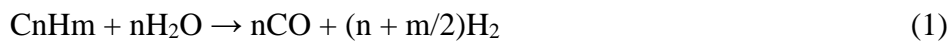
### *1.2 Idrogeno Molecolare - $H_2$*

L'idrogeno molecolare è un combustibile sostenibile ad alta energia (contenuto di energia di  $121 \text{ MJ kg}^{-1}$ ) [6].  $H_2$  è utilizzato come carburante in turbine, in motori a combustione interna, in celle a combustione, forni e stufe [7]. Ha il più basso punto di infiammabilità dei più comuni combustibili, caratteristica che consente strumenti di avviamento e accensione meno complessi. I dispositivi che utilizzano  $H_2$  hanno la caratteristica di funzionare bene anche a basse temperature [7]. Nonostante la lenta crescita nell'utilizzo dell'idrogeno molecolare come sostituto dei carburanti di derivazione dal petrolio (benzina, gasolio, ecc.) l'uso di  $H_2$  risulta essere già vasto su scale industriale.  $H_2$  è utilizzato come reagente per il processo di Haber per produrre ammoniaca, il più importante composto prodotto su scala industriale (144 MT nel mondo) e il maggior intermedio per i fertilizzanti [8]. Tra gli altri utilizzi industriali  $H_2$  è necessario per convertire oli pesanti in carburanti per motori e come riducente per svariati processi industriali.

L'impiego di  $H_2$  ha un rischio maggiore rispetto al metano ( $CH_4$ ) perché le sue fiamme sono incolori a occhio nudo ed è un gas inodore al quale non si possono aggiungere molecole odoranti. Data la pericolosità una possibile soluzione a questo problema potrebbe essere l'aggiunta di  $H_2$  ad altri gas per ridurre la formazione di

CO<sub>2</sub> [9].

H<sub>2</sub> è principalmente prodotto dalla reazione di reforming con vapore, un processo industriale non rinnovabile che raggiungerà probabilmente il picco di produzione nei prossimi 15-20 anni [10,11]. Il reforming con vapore richiede alte temperature (970-1100 K) alte pressioni 3,5 MPa (in presenza di un catalizzatore al Ni) e rilascia CO<sub>2</sub> come sottoprodotto aumentando l'impatto ambientale (eq. (1)-(2)) [12].



Attualmente il 4% della produzione mondiale di H<sub>2</sub> è rappresentato dall'elettrolisi dell'acqua, che si basa sulla combustione di combustibili fossili per generare l'energia elettrica necessaria per il processo di idrolisi dell'acqua [13]. Un processo alternativo per l'elettrolisi dell'acqua coinvolge fotocatalizzatori che catalizzano l'ossidazione dell'acqua per formare l'O<sub>2</sub> [14]. Tuttavia, sono necessarie grandi quantità di reagenti a causa della difficoltà nel rilascio di O<sub>2</sub> dalla superficie del catalizzatore. I fotocatalizzatori, inoltre, sono preparati con materiali rari e costosi e hanno una stabilità limitata [15].

Le fonti di energia rinnovabile (ad esempio, celle fotovoltaiche, energia eolica e idroelettrica) possono essere utilizzate per produrre l'energia elettrica necessaria per il processo di elettrolisi dell'acqua [13]. Questo approccio è fattibile nei paesi con infrastrutture per la produzione di energia solare ed eolica, come Irlanda e Cina [16]. Tuttavia, a livello mondiale c'è ancora bisogno di una produzione di H<sub>2</sub> a basso costo con un basso impatto ambientale. Sfruttare i benefici di questo gas senza incorrere nella produzione di gas serra potrebbe rivoluzionare il mondo attuale.

### *1.3 Glossario*

Trasferimento extracellulare di elettroni (EET): trasporto di elettroni che avviene al di fuori delle cellule nella respirazione microbica.

Anodo-respiring bacteria (ARB): batteri che possono respirare anaerobicamente (in assenza di ossigeno) utilizzando l'anodo come accettore finale degli elettroni.

Electroactive microorganisms (EAM): microorganismi, solitamente batteri, in grado di interagire elettricamente con un mezzo solido esterno in grado di accettare elettroni.

Cella di elettrolisi microbica (MEC): un sistema elettrochimico batterico nel quale un donatore organico è ossidato tramite ARB all'anodo e gli elettroni generati giungono al catodo riducendo protoni a H<sub>2</sub>.

Tempo di ritenzione idraulico (HRT): tempo medio di permanenza dell'acqua applicato a un sistema a flusso continuo:  $HRT = V / Q$ , in cui V è il volume del sistema e Q è la portata continua.

Domanda di ossigeno biochimico (BOD): indicatore della quantità di inquinamento organico nell'acqua.

## 2. PRODUZIONE BIOLOGICA DI H<sub>2</sub>

La produzione di idrogeno molecolare attraverso organismi biologici offre la possibilità di produrre H<sub>2</sub> (BioH<sub>2</sub>) rinnovabile e potenzialmente a emissioni zero di carbonio. Attualmente il BioH<sub>2</sub> può essere ottenuto tramite 4 modalità: la fotolisi, la *dark fermentation*, la fotofermentazione e le celle di elettrolisi microbica (MEC). In questo elaborato si andranno ad analizzare le modalità soprariportate considerando i vantaggi e le sfide per ogni approccio.

Il BioH<sub>2</sub> fotosintetico utilizza fonti inesauribili: la luce del sole e gli elettroni provenienti dall'acqua. Tuttavia, esso presenta ancora molte sfide tecniche soprattutto a causa della sensibilità delle idrogenasi all'ossigeno [17].

Il BioH<sub>2</sub> da fermentazione offre un'alta velocità di produzione ma una scarsa efficienza di conversione del substrato organico a H<sub>2</sub> [18]. Una via di mezzo tra queste due modalità è la fotofermentazione che risulta però essere troppo lenta per poter essere applicata [19]. Un'elevata efficienza di conversione potrebbe essere raggiunta attraverso le celle di elettrolisi microbica una tecnologia che ha finora dato responsi positivi risultando la più promettente e che verrà trattata nel dettaglio alla sezione 4. Tutti questi procedimenti si basano sulla capacità dei microrganismi di utilizzare protoni (H<sup>+</sup>) come accettori di due elettroni equivalenti (e<sup>-</sup>) come riportato nell'equazione (3):



Avvenuta la reazione l'idrogeno è scarsamente solubile in acqua e la sua raccolta avviene come gas che si genera dalla soluzione. A differenziare questi diversi approcci è invece la molecola in grado di donare l'elettrone, il potenziale redox per formare H<sub>2</sub> da 2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup> e i microrganismi sfruttati per le diverse vie metaboliche. Nonostante

le grandi prospettive che si ipotizzano per il futuro la produzione di BioH<sub>2</sub> non è ancora praticabile a causa delle limitazioni di ciascuno di questi approcci [2].

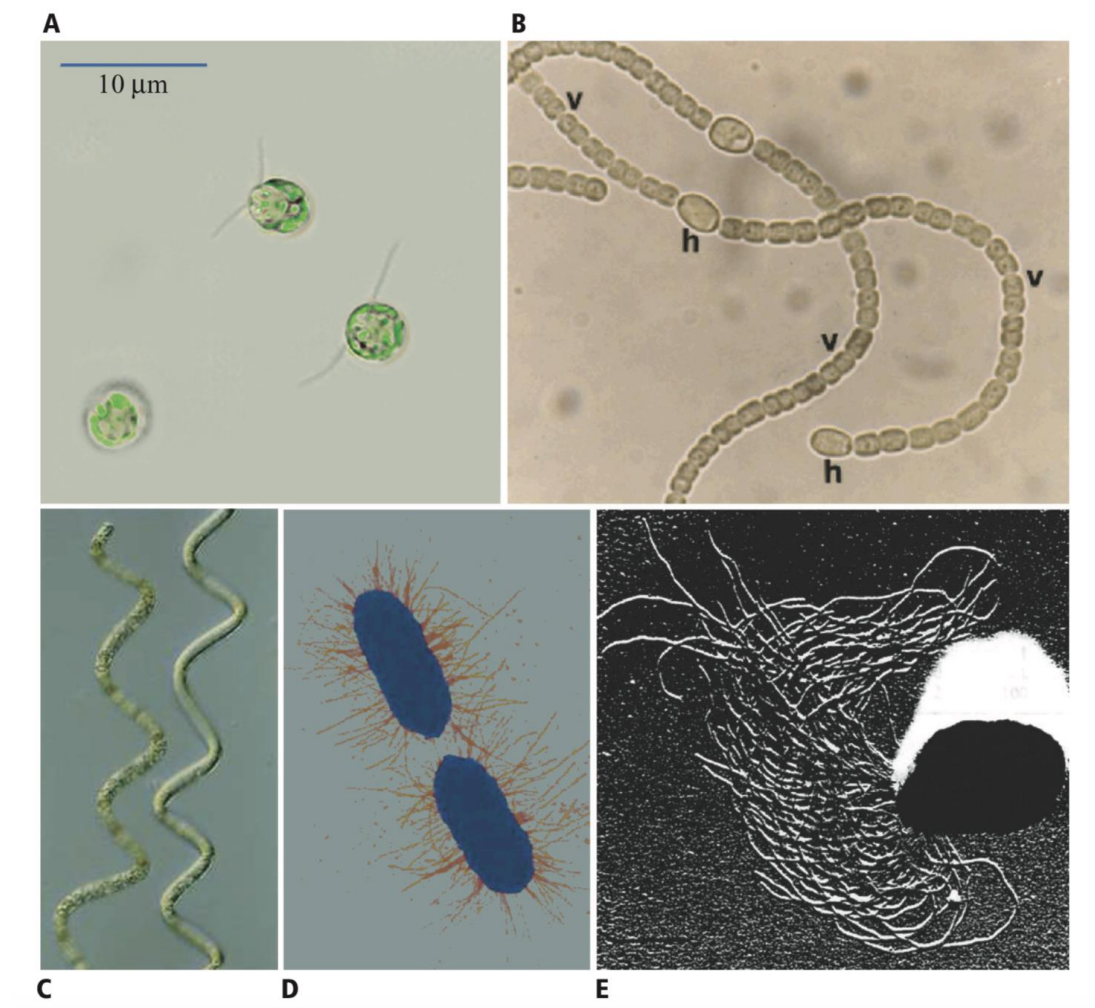


Figura 1 Culture di produttori di idrogeno microbico. A, alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* ; B, cianobatterio eterocitoso *Nostoc punctiforme* ATCC 73102, con cellule vegetative (v) ed eterocisti (h) (lunghezza delle cellule di eterocisti circa 10 mm); C, non-eterocitoso cianobatterio *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (spessore del filamento di circa 10 mm); D, batterio facoltativo *Escherichia coli* (dimensione approssimativa della cellula 2 mm); E, batterio fermentativo termofilo *Pyrococcus furiosus* (misura approssimativa 2 mm) – Fonte: *ENCYCLOPAEDIA OF HYDROCARBONS - VOL III - NEW DEVELOPMENTS: ENERGY, TRANSPORT, SUSTAINABILITY*

## 2.1 DARK FERMENTATION

Per *dark fermentation* si intende un processo fermentativo che converte la materia organica in idrogeno. Quando la *dark fermentation* avviene in condizioni anossiche o anaerobiche, i batteri riducono i protoni attraverso l'enzima idrogenasi per poi riutilizzare i propri trasportatori di elettroni (es. NADH). Questo processo può avvenire sia attraverso la glicolisi (reazioni da (4) a (6)) o sia attraverso il processamento del piruvato a acido formico il quale è degradato a H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> dall'enzima idrogenasi formica (reazioni da (7) e (8)) [20].



La sfida più importante da superare per questo processo fermentativo sta nell'aumentare la resa finale. A livello teorico se il substrato di partenza fosse il glucosio e il 100% dei suoi elettroni equivalenti venissero convertiti a H<sub>2</sub> la resa finale potrebbe essere di 12 moli H<sub>2</sub>/moli glucosio. Tuttavia, in base alle reazioni fermentative note la resa massima teorica è di soli 4 moli H<sub>2</sub>/moli glucosio, ottenibile quando gli accettori di elettroni risultano essere solamente H<sub>2</sub> e acetato [21,22]. Pertanto, la resa massima teorica rappresenta solo il 25% della conversione degli elettroni equivalenti in BioH<sub>2</sub>. Va notato che durante il processo vengono generati butirrato, propionato, etanolo, lattato e altre molecole organiche in grado di sottrarre

elettroni in grande quantità. Oltre a inficiare la resa, i prodotti organici generati in un sistema fermentativo di BioH<sub>2</sub> possono causare problemi per la loro elevata domanda di ossigeno biochimico (BOD) rendendo necessario un ulteriore trattamento dell'effluente (high-BOD) prima di essere rilasciato nell'ambiente. In aggiunta, alcuni di questi prodotti organici hanno odori sgradevoli (butirrato) e nel processo si può avere la riduzione dei solfati a H<sub>2</sub>S altamente odoroso e tossico [23].

La *dark fermentation* è adatta alla degradazione degli scarti alimentari dell'industria ed attualmente la fermentazione di biomasse di lignocellulosa è il processo più vicino alla commercializzazione [24]. Tuttavia, nel mix microbico utilizzato per questa fermentazione sono presenti batteri metanogenici in grado di consumare H<sub>2</sub> per produrre metano (CH<sub>4</sub>) riducendo la resa. Questo problema può essere superato attraverso una bassa ritenzione idraulica (HRTs) [25] o acidificando il pH [26] il quale però può inibire l'azione dei microrganismi in grado di sintetizzare H<sub>2</sub>. Anche gli acidi organici prodotti durante la fermentazione possono causare la diminuzione del pH della soluzione [27]. Inoltre la pressione parziale di H<sub>2</sub> nella fase liquida riduce l'azione della ferredossina che vede diminuita la sua capacità di ossidarsi quando ridotta. Sebbene l'inibizione possa essere attenuata iniettando nel reattore dei gas (N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) inevitabilmente i costi operativi aumentano e l'H<sub>2</sub> prodotto risulta diluito [28].

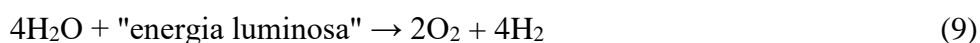
Infine, un prodotto della *dark fermentation* è l'acetato, molecola che la maggior parte dei microrganismi non è in grado di consumare e che si accumula abbassando il pH [29,30]. A causa di tutte queste variabili di cui bisogna tener conto, la resa complessiva del processo è inferiore a quella teorica di circa il 15%.

Ottenere dei mezzi efficaci per catturare gli elettroni equivalenti e sfruttare il contenuto energetico dei substrati organici sono i due fattori essenziali per la produzione di BioH<sub>2</sub> mediante fermentazione. Una possibile soluzione è l'utilizzo dei

MEC per aumentare la resa (sezione 4.). Combinando il processo fermentativo al MEC si può migliorare la resa fino all' 81% (9,6 moli H<sub>2</sub>/ moli glucosio) [31-32]. Un'altra possibilità di impiego della *dark fermentation*, che esula dalla produzione di idrogeno molecolare, è la metanogenesi, una tecnologia già matura che accoppiata al BioH<sub>2</sub> da fermentazione la produzione di CH<sub>4</sub> utilizzando l'acetato come accettore finale degli elettroni. Riguardare non sta in piedi la frase

## 2.2 BIOFOTOLISI

La biofotolisi fornisce un modo sostenibile ed ecocompatibile per produrre energia pulita da risorse rinnovabili. In condizioni specifiche alcuni cianobatteri e microalghe verdi scindono la molecola d'acqua, trasformandola in idrogeno molecolare e ossigeno, utilizzando la luce solare. Questi organismi producono idrogeno mediante fotolisi diretta dell'acqua in condizioni anaerobiche (Eq. (9)) [33].



La produzione di H<sub>2</sub> nella biofotolisi avviene per assorbimento diretto di luce e trasferimento di elettroni dalle molecole d'acqua agli enzimi (idrogenasi o nitrogenasi) in condizioni anaerobiche [34]. Le idrogenasi si trovano nel cloroplasto delle microalghe (organismi eucariotici) che non possiedono nitrogenasi [35], mentre nei cianobatteri (procarioti) le idrogenasi sono situate nel citoplasma in cui compaiono anche delle nitrogenasi [35]. Condizioni di processo specifiche possono influenzare l'attivazione di questi enzimi: ad esempio l'idrogenasi si attiva solo a pH elevato ed in seguito ad intensi stimoli luminosi [36]. Le nitrogenasi vengono attivate in assenza di azoto (N<sub>2</sub>) e presenza della luce. La struttura dell'enzima idrogenasi è trattata nel dettaglio nella sezione 3. Il processo di biofotolisi viene definito diretto se la ferredossina ridotta venutasi a generare durante il processo di fotosintesi (in

particolare quando avviene la scissione della molecola d'acqua) viene utilizzata per ridurre direttamente le idrogenasi che catalizzano la formazione di H<sub>2</sub>, senza fissazione intermedia di CO<sub>2</sub>. La generazione di H<sub>2</sub> associata alla fissazione della CO<sub>2</sub> viene definita indiretta.

### 2.2.1 BIOFOTOLISI DIRETTA

Nel processo di biofotolisi diretta, le microalghe producono idrogeno (oltre all'ossigeno) utilizzando molecole d'acqua. Il vantaggio di questo processo è che l'energia è fornita dalla luce solare, l'unica vera fonte di energia rinnovabile sulla terra. Questo scenario risulta essere molto interessante perché non comporta il coinvolgimento di nessun carbonio [37]. Analogamente a quanto succede nella fotosintesi clorofilliana la molecola d'acqua viene scissa per rilasciare gli elettroni utilizzati per ridurre la CO<sub>2</sub> ad elementi organici. Nella biofotolisi questi elettroni non vengono utilizzati per ridurre la CO<sub>2</sub> ma sono necessari a ridurre i protoni a H<sub>2</sub>. Il fotosistema II utilizzando l'energia luminosa scinde le molecole d'acqua andando a formare protoni, ossigeno ed elettroni. Questi elettroni viaggiano fino al fotosistema I, riducendo la ferredossina, cofattore dell'idrogenasi, che a sua volta riduce H<sup>+</sup> in H<sub>2</sub>.

La reazione generale della biofotolisi diretta è rappresentata all'eq (10) e (11).



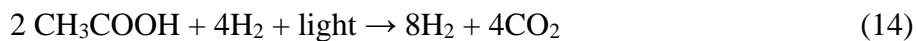
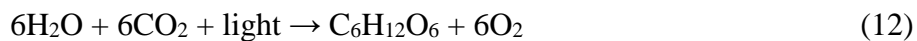
Questo processo, tuttavia, si auto limita perché i sottoprodotti dell'ossigeno inibiscono le idrogenasi (con centro [FeFe] in particolare) ed il mix dei gas H<sub>2</sub> - O<sub>2</sub> è esplosivo [17]. Per ovviare a questi problemi i bioreattori richiedono ampie superfici

e costi elevati rendendo questa tecnologia non vantaggiosa [37].

### 2.2.2 FOTOLISI INDIRETTA

La fotolisi indiretta è simile alla fotolisi diretta con l'eccezione di un passaggio aggiuntivo dove la CO<sub>2</sub> viene fissata. Questo processo può avvenire in un singolo passaggio o in due passaggi. Il singolo passaggio utilizza batteri fotosintetici e cianobatteri come catalizzatori. I cianobatteri fotosintetici utilizzano la luce per scindere la molecola d'acqua e fissare la CO<sub>2</sub>. Le eterocisti dei cianobatteri metabolizzano la materia organica producendo acqua che a sua volta viene scissa utilizzando energia luminosa. In assenza di azoto le nitrogenasi riducono H<sup>+</sup> a H<sub>2</sub>. Le nitrogenasi comunque portano ad una bassa resa di H<sub>2</sub>.

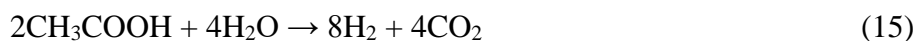
Il processo a due passaggi, dove si ha la separazione tra il processo di produzione di O<sub>2</sub> e il processo di produzione di H<sub>2</sub> in due reazioni differenti, è evidenziato nelle equazioni dalla (12) alla (14) [38].



Nonostante i bioreattori necessari alla fotolisi indiretta siano più piccoli, rimangono comunque molto costosi e non ancora applicabili all'industria [18].

## 2.4 FOTOFERMENTAZIONE

I batteri fotosintetici viola (ad es. rappresentanti dei generi *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas* e *Rhodospirillum*) sono attrattori alternative alla biofotolisi per la produzione di BioH<sub>2</sub> perché possono utilizzare la luce come fonte di energia e gli acidi carbossilici a catena corta come donatori di elettroni. Quest'ultimi sono disponibili in quanto prodotti nella fermentazione. Questi batteri decompongono piccole molecole organiche in H<sub>2</sub> in presenza di luce come descritto nell'eq. (15).

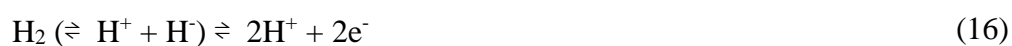


I batteri viola non producono idrogeno molecolare attraverso un'idrogenasi ma si avvalgono dell'utilizzo di una nitrogenasi che normalmente catalizza il processo di fissazione dell'azoto producendo H<sub>2</sub> come sottoprodotto. Il risultato stechiometrico tra la fissazione dell'azoto e la produzione di idrogeno molecolare varia in base alla nitrogenasi utilizzata. Questo processo (15) può avere una resa di H<sub>2</sub> maggiore rispetto alla *dark fermentation* e può utilizzare una gamma più ampia di substrati rispetto alla biofotolisi. Tuttavia, la produzione volumetrica di H<sub>2</sub> è inferiore a

quanto ottenibile con la *dark fermentation* ed ancora troppo lenta e discontinua per l'applicazione commerciale [19]. Una possibile soluzione alla discontinuità di produzione è lo sviluppo di ceppi mutati in grado di sintetizzare BioH<sub>2</sub> anche in presenza di ammoniaca, inibitore della reazione [40]. Un'ulteriore possibilità è stata evidenziata nello studio di pellicole di lattice contenenti una coltura di cellule di *Rhodospseudomonas palustris* non in crescita alle quali è stata fornito regolarmente acetato. Queste colture hanno continuato a produrre basse quantità di BioH<sub>2</sub> per molti mesi [41].

### 3. IDROGENASI

Le idrogenasi sono metalloenzimi eterogenei appartenenti alla classe delle ossidoriduttasi (EC 1.12.98.2) che catalizzano una delle più semplici reazioni molecolari: la conversione di diidrogeno in protoni e elettroni e la reazione inversa (16) [42,43,44].



La reazione avviene in un centro metallico specializzato che aumenta notevolmente l'acidità di H<sub>2</sub> e permette una separazione eterolitica della molecola che risulta essere notevolmente accelerata dalla presenza nell'intorno di una base. La reazione inversa, l'eterogenesi di H<sub>2</sub>, coinvolge il rispettivo accoppiamento di H<sup>+</sup> e H<sup>-</sup>. Le idrogenasi sono diffuse in natura, sono presenti in batteri, archea e in alcuni eucarioti [42,43,45]. Vengono classificate in base alla composizione atomica dei metalli nei loro siti attivi: [NiFe], [FeFe] e [Fe] idrogenasi [42,43,46]. Il sito attivo è situato nella struttura più interna dell'enzima accanto al cluster FeS in grado di permettere il

trasferimento elettronico (ET) dalla superficie della proteina.

*Figura 4 Strutture dell'idrogenasi con centro catalitico [NiFe] e [FeFe]. Sono indicate schematicamente la catena di ET (tramite i centri ferro-zolfo), i percorsi per il diidrogeno e il trasferimento H+. In basso, vengono fornite le strutture chimiche. – Fonte [48]*

Una caratteristica comune delle idrogenasi aventi nel loro sito attivo [NiFe] o [FeFe] sta nel fatto che gli atomi di ferro sono legati tramite piccole molecole inorganiche che fungono da ligando (CO e CN<sup>-</sup>). Questi enzimi contengono due centri metallici con ponti solfuro, solitamente con un sito aperto di coordinazione su un metallo (figura 4). Una terza classe di idrogenasi possiede un singolo atomo di ferro con un centro di coordinazione che contiene a sua volta ligandi quali per esempio CO [47].

*Figura 5 Composizione delle subunità, cofattori e posizione cellulare delle tre principali classi di idrogenasi presenti in Ralstonia eutropha, (i) idrogenasi legata alla membrana (MBH) vengono rappresentate: le tre subunità HoxG, K e Z, il centro catalitico [NiFe], i cluster FeS e il citocromo b (2 eme) nella membrana; l'MBH si trova sul lato periplasmatico; (ii) l'RH per il rilevamento di H<sub>2</sub> con due subunità HoxB e C che sono collegate a un' istidina protein chinasi per la trasduzione del segnale; (iii) la SH idrogenasi con quattro principali subunità HoxH, U, Y e F. L'RH e SH sono localizzati nel citoplasma della cellula. – Fonte [48]*

Le idrogenasi sono presenti nel periplasma o citoplasma in forma solubile o legate a membrane. Nelle cellule eucariotiche sono spesso localizzate in compartimenti specializzati. Le funzioni primarie delle idrogenasi sono di fornire energia agli organismi mediante l'ossidazione dell'idrogeno molecolare e di bilanciare il potenziale redox della cellula. Questi enzimi possono rimuovere gli equivalenti riducenti mediante produzione di idrogeno molecolare o fornire elettroni scindendo H<sub>2</sub>. A seconda della posizione nella cellula, l'idrogenasi può favorire lo sviluppo o l'utilizzo dell'idrogeno. Il principio di legare l'idrogeno al sito attivo (come ad esempio nel centro [NiFe]) durante il processo catalitico è anche utilizzato per rilevare la presenza di idrogeno e regolare l'espressione di quei geni necessari per la biosintesi delle idrogenasi. Queste proteine sono chiamate idrogenasi regolatrici

(RH) e mostrano una bassissima attività di conversione. In figura (5) si possono osservare idrogenasi da *Ralstonia eutropha* legate a membrane (MBH), solubili (SH) e regolatrici (RH). A influenzare la direzione della reazione delle idrogenasi agisce il contesto fisiologico della cellula. Le [NiFe] idrogenasi sono più attive nell'ossidazione di  $H_2$  e le [FeFe] nella produzione dell'idrogeno molecolare.

#### 4. LE CELLE DI ELETTROLISI MICROBICA (MEC)

Le celle di elettrolisi microbica (MEC) sono una tecnologia emergente che combina il metabolismo batterico e l'elettrochimica per ottenere  $H_2$  come prodotto [49]. Come mostrato in figura (6), i batteri elettroattivi (EAM) quali ad esempio il genere *Geobacter*, *Clostridium*, *Desulfuromonas* o *Shewanella*, sono in contatto con l'anodo

mentre ossidano semplici composti (acetato, butirrato, etanolo, lattato ecc) e in assenza di accettori solubili di elettroni questi microrganismi trasferiscono elettroni al mezzo conduttivo solido [50-53] producendo una corrente.

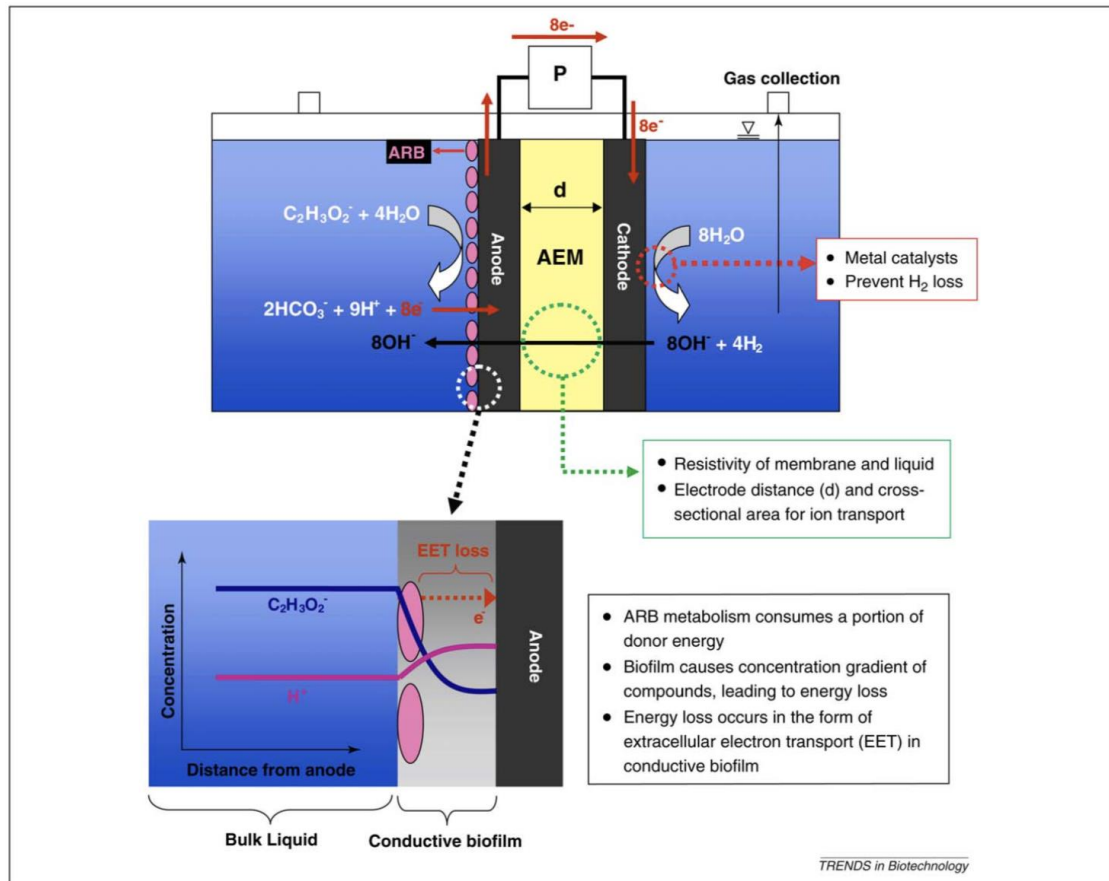


Figura 6 Illustrazione schematica di un tipico MEC a due camere. Una membrana di scambio anionico (AEM) viene utilizzata per separare le camere e consentire il trasporto di anioni per la neutralità della carica. I batteri ossidano  $C_2H_3O_2^-$  in  $CO_2$  in una camera anodica. Parti di energia della conversione dell'acetato vengono perse per molteplici ragioni: il biofilm dell'anodo, il metabolismo batterico, il gradiente di concentrazione (substrato e protoni) e dall'EET. La perdita di energia si verifica anche nel catodo dove buoni catalizzatori metallici sono essenziali per mitigare la perdita. La perdita di energia è significativa in un MEC a doppia camera, a causa della resistenza della membrana. Una membrana altamente conduttiva, distanza degli elettrodi ridotta e ampia area della sezione trasversale possono ridurre la perdita.

Fonte [18]

Questa corrente si genera tramite trasferimento extracellulare di elettroni (EET).

Il trasferimento di elettroni tra la superficie della cellula e l'elettrodo allo stato solido avviene attraverso il trasferimento elettronico diretto (DET) tramite proteine della superficie cellulare quali i citocromi di tipo C [58] o le idrogenasi [59], oppure mediante lo sviluppo di pili conduttivi detti “nanofilamenti” [60].

Quando il trasferimento di elettroni è prevalentemente ottenuto attraverso trasportatori di elettroni solubili, viene definito trasferimento di elettroni mediato (MET). Questi *shuttle* elettronici possono essere esogeni (es. tionina [61], metilviologeno [62], idrossil naftochinoni [63]) o prodotti dagli stessi microrganismi (es. fenazina da *Pseudomonas sp.* [64], flavine da *Shewanella sp.* [65] e chinoni da *Escherichia coli* [66]). Il contributo relativo di DET e MET all'intero EET complessivo dipende dalle specie elettroattive e dalle proprietà fisico-chimiche della superficie degli elettrodi [67]. Uno schema dei modelli di trasferimento degli elettroni è riassunto all'immagine (7). A livello molecolare, tuttavia, i dettagli del meccanismo EET sono spesso sconosciuti, in particolare per quanto riguarda i consorzi microbici.

Venendo trasportati attraverso un circuito elettrico esterno gli elettroni raggiungono il catodo dove reagiscono con  $H_2O$  per produrre  $H_2$  che si sviluppa nel compartimento del catodo. Per raggiungere l'energia sufficiente a compiere questa reazione (ridurre una molecola di  $H_2O$  in  $H_2$ ) è necessario un alimentatore per aumentare la tensione degli elettroni che raggiungono il catodo. Il potenziale standard di un donatore di elettroni (per esempio  $E^0$  acetato = -0.28V) è più positivo rispetto all' $H_2$  ( $E^0 H_2 = -0.41V$ ), pertanto il voltaggio teorico necessario per la produzione di  $H_2$  è di circa 0,13 V, vale a dire nove volte inferiore alla tensione richiesta per l'elettrolisi dell'acqua ( $E^0 H_2O = +0.82V$ ). A livello pratico, a causa dell'energia persa nei MECs, il voltaggio da applicare è maggiore di 0,13 V e rientra

nel range di 0,6-1,2 V [54,55,56].

Il principale vantaggio di questa tecnologia è l'alta resa di H<sub>2</sub>, e l'efficienza di cattura dell'H<sub>2</sub> prodotto varia da 67% a 91% in funzione dei diversi substrati donatori (es. glucosio, cellulosa, lattato, acetato...) [56,57]. L'alta resa determina il duplice vantaggio di massimizzare il prodotto desiderato e minimizzare il BOD dell'effluente. Questo vantaggio rispetto alla *dark fermentation* è reso possibile dal fatto che i batteri sfruttati nel MEC possono ossidare completamente la materia organica a CO<sub>2</sub> attraverso il ciclo dell'acido citrico, processo anaerobico, generando così elettroni che passano all'anodo. Siccome la produzione di H<sub>2</sub> avviene attraverso un processo respiratorio, viene eliminata la necessità di avere un bilanciamento di elettroni e carbonio - come richiesto nella *dark fermentation* - per poter rilasciare numerosi elettroni sotto forma di prodotti organici solubili.

I MEC possono essere combinati alla *dark fermentation* che è in grado di produrre semplici sostanze organiche partendo da sostanze organiche complesse. Questo permette una resa maggiore di BioH<sub>2</sub> rispetto all'utilizzo dei soli MEC quando la biomassa substrato contiene sostanze complesse che non possono essere degradate dai batteri EAM.

La più promettente applicazione dei MEC è nel trattamento delle acque reflue. La rimozione della richiesta biochimica di ossigeno (BOD) è accoppiata alla produzione di una piccola corrente elettrica [68,69]. Esistono però ancora dei problemi irrisolti principalmente associati alla scarsa capacità tamponante delle acque reflue con il risultato di avere un pH basso (e quindi troppo acido) nel compartimento dell'anodo [70]. In aggiunta è necessario sviluppare catalizzatori chimici o biologici al catodo che limitino l'energia complessiva in output nei MEC.

Le celle di elettrolisi microbica consentono di combinare la biocatalisi con l'input di energia esterna, aumentando così le potenziali applicazioni. L'attuale ricerca sui

MEC mira ad accoppiare la rimozione BOD ed il recupero di energia dai rifiuti con la sintesi chimica (ad es. metano, etanolo, acido formico,  $H_2O_2$ , acetato e  $H_2$  [49]). Questo processo, definito bioelettrosintesi o biosintesi assistita elettricamente, ha una migliore efficienza energetica rispetto agli studi precedenti ed ha maggiori possibilità di passare ad un'applicazione pratica [50]. In questo elaborato, verrà solamente preso in considerazione l'utilizzo di MEC per la produzione di  $H_2$  ed i miglioramenti che rimangono ancora necessari per l'implementazione di questa tecnologia su larga scala.

#### *4.1 Formazione del biofilm ed il quorum-sensing*

In natura i microrganismi sono attirati da superfici solide su cui si depositano, aderiscono e si moltiplicano attivamente formando colonie. Questo accumulo di cellule può aumentare nelle dimensioni a tal punto da includere detriti organici ed inorganici, nutrienti ed anche altri microrganismi formando così un biofilm [72]. I batteri planctonici possono aderire alle superfici ed iniziare la formazione del biofilm anche in presenza di flussi continui. Una volta che un biofilm si è formato e la matrice esopolisaccaridica è stata secreta dalle cellule sessili, la struttura risultante è altamente viscoelastica con caratteristiche di materiale gommoso [74]. Quando i biofilm si accrescono su piccole superfici, hanno una bassa resistenza alla trazione e si rompono facilmente, ma sono notevolmente forti e resistenti a rottura meccanica se si sviluppano su superfici più estese [71]. La formazione di un biofilm, comunque, è un processo dinamico e complesso che si articola in diverse fasi:

- 1) adesione alla superficie;
- 2) formazione di microcolonie;
- 3) maturazione del biofilm.

La maturazione del biofilm, nell'architettura e nello spessore, è regolata dal quorum-sensing: quest'ultimo è un sistema di comunicazione conservato tra diverse specie batteriche in grado di rispondere all'aumento della densità di popolazione modificando l'espressione genica.

#### *4.1.1 Adesione alla superficie*

Il primo punto nella formazione del biofilm implica l'adesione delle cellule batteriche ad una superficie o ad un'interfaccia solido-liquido (figura 8). È un processo che dipende sia dalla probabilità che il batterio entri in contatto diretto con la superficie, sia dall'instaurarsi di interazioni cellula-superficie in grado di superare le forze repulsive che si generano fra le superfici. Anche se il contatto iniziale di una cellula batterica con una superficie non è regolato geneticamente, ci sono prove che dimostrano l'esistenza di meccanismi che regolano la formazione di interazioni stabili tra cellula e superficie. Alcune di queste derivano dagli studi sul sistema Cpx di *Escherichia coli* ed indicano che i batteri possono percepire il contatto con una superficie e rispondere regolando l'espressione genica per promuovere interazioni stabili cellula- superficie. Infatti, quando le cellule di *E. coli* si trovano a contatto con una superficie queste attivano il sistema di controllo a due componenti Cpx. Questo è formato da due geni che codificano rispettivamente la proteina CpxA, una chinasi sensore, e la proteina CpxR, un regolatore del segnale [76]. L'attivazione di questo sistema dipende dalla proteina di membrana NlpE che potrebbe essere un sensore diretto del contatto. Inoltre il sistema Cpx è coinvolto nella regolazione della biogenesi dei pili di tipo IV [77], i quali hanno un ruolo nell'adesione di superficie, e di altre appendici cellulari coinvolte nell'interazione cellula-superficie e cellula-

cellula [78]. Le interazioni cellula-superficie, oltre ad essere regolate dal semplice contatto della cellula con la superficie, possono anche essere regolate dalle condizioni ambientali come l'osmolarità. In cellule di *E. coli*, che colonizzano superfici ad alta osmolarità, viene attivato il sistema EnvZ/OmpR, un sistema costituito da due proteine coinvolte nella stabilizzazione delle interazioni cellula-superficie in condizioni di alta osmolarità. In presenza di alte pressioni osmotiche la proteina EnvZ fosforila e attiva la proteina OmpR che regola la formazione del biofilm attivando a sua volta la trascrizione del gene *csgD*. La proteina CsgD codifica per un regolatore positivo della trascrizione dei geni *csgAB* e *adrA*, coinvolti rispettivamente nella sintesi dei pili curli e della cellulosa, precursore dei componenti della matrice [84]. I pili curli sono presenti in *E. coli* ed in alcune specie del genere *Salmonella*, dove sono conosciuti come fibre aggregative [79]. Di numero variabile da cellula a cellula, queste appendici si formano a livello della membrana cellulare, sono più piccole dei flagelli e non sono coinvolte nel movimento cellulare.

#### *4.1.2 Formazione di microcolonie*

Le microcolonie sono comunità batteriche con uno spessore di circa tre-cinque cellule che si sviluppano in seguito all'adesione di alcune cellule alle superfici (figura 8) [74]. Tuttavia, non è necessaria la sola interazione stabile con la superficie per formare una microcolonia, ma sono necessari anche uno sviluppo clonale e interazioni stabili cellula-cellula. Alcuni batteri possono esibire un programma più complicato in cui la motilità di superficie riunisce le cellule per formare una microcolonia [77].

Lo sviluppo clonale è controllato semplicemente dai nutrienti presenti. Tuttavia sono necessarie distinte vie di trasduzione del segnale sia per la produzione delle strutture di superficie responsabili della motilità (quali i pili) che per la produzione della matrice esopolisaccaridica, struttura predominante che media le interazioni stabili cellula-cellula [79-82]. Durante la fase iniziale della formazione di biofilm, dopo l'adesione alla superficie e la formazione della microcolonia, è attivata la trascrizione di specifici geni, quali *algC*, *algD*, *algU* la cui trascrizione è necessaria per la sintesi del polisaccaride extracellulare, che nel caso di *P. aeruginosa* è costituito da arginato [75]. La proteina Crc, regolatore globale Crc del metabolismo del carbonio, attiva la trascrizione del gene *pilA*, che è richiesto per la produzione di pili di tipo IV in *P. aeruginosa* [83]. Ceppi di *P. aeruginosa* con mutazione nulla nel gene Crc sono in grado di aderire a superfici ma non di formare microcolonie [83]. In *Staphylococcus aureus* e in *Staphylococcus epidermidis*, la formazione della microcolonia è mediata dalla produzione di un polisaccaride intercellulare adesivo (PIA). Parecchi fattori ambientali influenzano la produzione del PIA, compresi il glucosio, l'anaerobiosi, l'osmolarità, la temperatura elevata, la concentrazione di etanolo e ferro [84]. Molti dei fattori ambientali che aumentano la produzione del PIA inducono l'over-espressione dei geni che codificano gli enzimi per la sintesi del PIA, organizzati nell'operone *icaADBC*.

#### 4.1.3 Maturazione del biofilm

Dopo le fasi iniziali dell'adesione, le microcolonie si sviluppano in un biofilm maturo; questo stadio è associato alla produzione di EPS. Il biofilm maturo può essere costituito da uno strato omogeneo di cellule, o da una struttura complessa di cellule formanti canali dell'acqua la cui funzione è quella di permettere la diffusione

dei nutrienti [74].

La struttura di un biofilm maturo, sia mono che multi-specie, può variare non solo in funzione delle diverse specie batteriche che lo compongono, ma anche in funzione dei differenti parametri che caratterizzano l'ambiente. Sono stati identificati ceppi mutanti con alterata profondità o alterata architettura del biofilm rispetto al ceppo selvatico. Questi mutanti suggeriscono che la maturazione del biofilm è controllata dalla disponibilità di nutrienti e dal quorum-sensing, cioè la capacità delle cellule di percepire un'alta densità cellulare [75].

#### *4.2 H<sub>2</sub> prodotto da bioelettrosintesi*

La principale limitazione nella biosintesi dell'H<sub>2</sub> è la scarsa resa a causa dell'inibizione del processo dovuta alla produzione di acidi organici e all'inibizione parziale di H<sub>2</sub> dalla ferredossina e del metabolismo non orientato (e desiderato) della comunità microbica. L'aggiunta di una forza motrice (cioè, un potenziale elettrochimico o corrente) migliora la resa volumetrica della reazione biologica: per esempio la produzione di H<sub>2</sub> aumenta di un fattore di 1,7 della cultura di *Enterococcus aerogenes* che degradano scarti di glicerolo provenienti da impianti per la produzione di biodiesel [85].

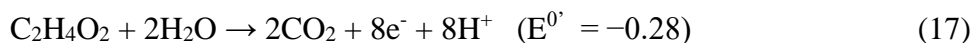
Il potenziale applicato al MEC influenza il metabolismo dei consorzi microbici. Call e Logan hanno dimostrato che la velocità di produzione di H<sub>2</sub> è aumentata quando la tensione applicata è diminuita (vale a dire, viene spostata su un valore più negativo). Questo aumento della produzione di H<sub>2</sub> potrebbe essere dovuto alla minore resistenza del MEC o all'inibizione dei metanogeni [86]. Sasaki e collaboratori hanno dimostrato che un alto potenziale anodico (1,61 V vs. Ag / AgCl) inibisce l'attività

del metanogeno [87-89]. Nel loro lavoro, la bassa attività metanogenica era dovuta alla rimozione dei metanogeni dal reattore poiché le copie del gene dell'RNA 16 s dei microrganismi metanogeni erano diminuiti sotto il limite di rilevazione attraverso *la reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) [90]. Questo effetto del potenziale è stato suggerito anche da altri ricercatori [91].

La sintesi bioelettrochimica di H<sub>2</sub> è simile all'elettrolisi convenzionale dell'acqua.

L'elettrolisi dell'acqua, a causa dell'elevato potenziale richiesto ( $E^0 = 1,23$  V) richiede un'elevata energia (5,6 kW m<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>) e l'elettrolizzatore H<sub>2</sub> tipico ha un'efficienza compresa tra il 56 e il 73% [6sopra]. Il metabolismo microbico dei composti organici genera CO<sub>2</sub>, H<sup>+</sup> ed elettroni all'anodo da molecole organiche disciolte come l'acetato (equazione 12). Gli elettroni viaggiano attraverso il circuito elettrico dove si ricombinano con gli ioni H<sup>+</sup> al catodo (equazione 13), che si diffondono dall'anodo al catodo, di solito attraverso la membrana di scambio cationico per formare H<sub>2</sub> [92].

La riduzione degli ioni H<sup>+</sup> può avvenire direttamente sulla superficie dell'elettrodo o attraverso idrogenasi o citocromi da membrana esterna da parte di EAM sul biocanodo. La reazione generale è convenzionalmente separata in due semi-reazioni, per ciascun compartimento, come nelle equazioni 17 (anodo) e 18 (catodo), dove l'acetato è usato come un substrato organico non fermentabile. Il potenziale aggiuntivo a condizioni standard (pH 7, concentrazione di acetato 1 M, P 1bar) è -0,14 V, quindi è necessaria energia aggiuntiva per supportare la reazione generale



Nei MEC, il potenziale richiesto per la sintesi di H<sub>2</sub> è molto più basso, in quanto i consorzi microbici producono i protoni richiesti come sottoprodotti del loro metabolismo. In condizioni standard, il potenziale reversibile di H<sup>+</sup> / H<sub>2</sub> è -414 mV,

mentre il tipico potenziale di equilibrio all'anodo generato dall'ossidazione batterica di composti organici è intorno a -300 mV. Pertanto, il potenziale aggiuntivo minimo richiesto per la sintesi di  $H_2$  è di circa 114 mV, molto più basso del potenziale necessario per l'elettrolisi dell'acqua [93]. In condizioni pratiche, è necessario un potenziale superiore al potenziale minimo teorico a causa dei sovrapotenziali e del consumo degli elettroni nelle reazioni collaterali cataboliche da parte di microrganismi.

#### *4.3 Corrente elettrica nel MEC e bioelettrosintesi di $H_2$*

Ad un dato potenziale imposto dall'esterno, la produzione attuale di MEC dipende dalla concentrazione e dall'attività degli organismi elettroattivi, dalla loro localizzazione nei biofilm, dalle limitazioni di diffusione delle sostanze e dalla conducibilità del biofilm [94,95]. La produzione di  $H_2$  viene solitamente misurata in funzione della corrente catodica. L'output di corrente può essere registrato facilmente e continuamente su un potenziostato o un registratore di dati, mentre il monitoraggio della produzione di  $H_2$  richiede strumenti aggiuntivi e tempi più lunghi. Pertanto, l'ottimizzazione della produzione della corrente generata può essere utilizzata al posto dell'ottimizzazione della produzione di  $H_2$ , almeno negli studi preliminari di laboratorio. È interessante notare che i rapporti che calcolano il tasso di produzione di  $H_2$  sia dalla corrente che dall'analisi vera e propria della produzione di  $H_2$  indicano che il tasso di produzione di  $H_2$  è superiore al tasso teorico calcolato dalla corrente. Questo ulteriore idrogeno molecolare può essere prodotto dalla *dark fermentation* di composti organici, **che si verificano** A CHI E' RIFERITO IL "CHE"? POCO CHIARO anche in condizioni elettroattive [96].

#### 4.4 Materiale da utilizzare all'elettrodo e pre trattamento

Nella possibilità dell'applicazione su vasta scala, la bioelettrosintesi di  $H_2$  deve avere un costo paragonabile al reforming catalitico degli idrocarburi e di altri processi produttivi legati al petrolio. È stata eseguita un'analisi dei costi della produzione di  $H_2$  mediante reforming con vapore da Cruz et al., i quali hanno calcolato che il costo di produzione dell' $H_2$  è pari a 1,18 USD \$ kg<sup>-1</sup> [97]. Gli elettrodi sono un costo importante nel processo di bioelettrosintesi. Il materiale ideale per gli elettrodi dovrebbe avere un'elevata porosità [98], un basso costo ed un'elevata conduttività.

#### 4.5. Arricchimento

Studi precedenti che descrivono esperimenti a lungo termine hanno mostrato che la popolazione dei consorzi microbici cambia per adattarsi alle condizioni del bioelettroreattore. Gli EAM vengono arricchiti durante il processo di bioelettrosintesi, come comunemente osservato in altri reattori bioelettrochimici. Il sequenziamento del gene 16S del RNA dei consorzi microbici nel MEC hanno rivelato un arricchimento di EAM come *Geobacter* [99] e *Desulfovibrio* [99]. L'arricchimento microbico è influenzato dal substrato. Zhan e colleghi, utilizzando una comunità microbica adatta alla sintesi di  $H_2$  da sola ammoniaca, hanno dimostrato la presenza dei batteri ammoniaco-ossidanti con capacità di riduzione (*Nitrosomonas europaea*) sull'anodo, assieme a batteri che assimilavano l'ammoniaca (*Stentrophomonas sp.*) i quali competevano con i batteri ossidanti dell'ammoniaca, abbassando la resa di  $H_2$ . Gli autori suggeriscono che potrebbe esserci un possibile meccanismo sintrofico per l'ossidazione dell'ammoniaca da parte di *Nitrosomonas*, *Comamomas* e *Paracoccus* [100].

Croese e collaboratori hanno osservato un'influenza relativamente trascurabile della dimensione dell'elettrodo (22 vs 100 cm<sup>2</sup> catodo in grafite) grazie alla disponibilità di un'ampia area superficiale dell'elettrodo, fattore che ha favorito l'adesione dei microrganismi presenti all'inizio dell'esperimento piuttosto che l'adesione dei microrganismi derivanti dal processo di arricchimento durante le fasi successive. Le differenze nel flusso e percorso dei nutrienti possono influenzare la popolazione anodica, a causa delle differenze di miscelazione, trasferimento di massa e forze di taglio nel sistema [101].

I proteobatteri contengono batteri elettroattivi come *Shewanella* e *Geobacter*, mentre non ci sono membri del phylum di *Bacteroidetes* che abbiano dimostrato di essere EAM fino ad oggi. Tuttavia, dati sperimentali indicano che potrebbero dar luogo a una possibile relazione simbiotica in condizioni elettrogeniche [102].

#### 4.6 MEC a singola camera

Un approccio utilizzato al fine di eliminare le perdite di energia consiste nella rimozione della membrana, creando così un MEC a singola camera. Sebbene in questo caso sia possibile ridurre al minimo le perdite di energia [103,104], una configurazione MEC monocamerale accentua la perdita di H<sub>2</sub> causata da reazioni microbiche indesiderate, (come mostrato nella figura 10). In primo luogo è la metanogenesi a causare una sottrazione degli elettroni [104], fenomeno difficile da sopprimere completamente in un MEC monocamerale, poiché i metanogeni sono in grado di raccogliere H<sub>2</sub> alle concentrazioni nano-molari [105]. Inoltre, i metanogeni H<sub>2</sub>-ossidanti si possono trovare in un MEC monocamerale sia nei biofilm dell'anodo che del catodo [104], il che implica che i metanogeni siano resistenti al dilavamento dal flusso continuo impiegato. Esistono, inoltre, altri utilizzatori dell'idrogeno

molecolare non desiderati che trasformano l' $\text{H}_2$  prodotto nel catodo. Tra questi ci sono i batteri EAM che utilizzano come substrato di partenza l' $\text{H}_2$  e gli omo-acetogeni, che trasformano l' $\text{H}_2$  in acetato che, a sua volta, viene convertito in corrente (Figura 10). La corrente addizionale prodotta dal riutilizzo dell'idrogeno aumenta le perdite potenziali mentre non aumenta la resa netta di  $\text{H}_2$ . Pertanto, il prelievo e riutilizzo indesiderato di  $\text{H}_2$  è un altro motivo per cui la raccolta rapida di  $\text{H}_2$  è cruciale. Gli sforzi della ricerca dovrebbero essere indirizzati a trovare modi per separare l'anodo e il catodo senza introdurre perdite di energia dovuti ai gradienti del pH o dal trasporto di ioni.

#### *4.7 Sfide future*

La sfida principale per rendere sostenibile il MEC è minimizzare la fornitura di energia esterna per aumentare l'energia degli elettroni generati. Le perdite di energia si verificano in diverse parti di un MEC e la loro somma determina la tensione da applicare al sistema. Se la tensione che deve essere applicata diventa troppo grande, il valore energetico del gas  $\text{H}_2$  prodotto è inferiore all'energia necessaria per la sua produzione. Per ottenere un bilancio energetico positivo da un MEC, la tensione applicata deve essere inferiore a 0,6 V [106], il che implica che la somma delle perdite non deve eccedere 0,5 V.

La seconda sfida associata ai MEC sta nel raggiungimento di un alto tasso di

produzione di  $H_2$ , importante per mantenere bassi i costi. La velocità di produzione volumetrica (ad esempio  $L H_2 / L h^{-1}$ ) dipende dalla densità di corrente all'anodo ( $A / m^2$ ) e dalla superficie specifica dell'anodo ( $m^2 / m^3$ ), poiché la velocità di produzione dell' $H_2$  è proporzionale alla corrente.

Un alto tasso di produzione volumetrico è in contrasto con il mantenimento di una bassa tensione, poiché le perdite sono approssimativamente proporzionali alla densità di corrente [107]. Le densità di corrente più elevate ottenute in un MEC, circa  $10 A / m^2$ , richiedono una tensione applicata di 1 V. Raggiungere gli obiettivi di alta produzione di  $H_2$  e bassa tensione applicata richiederà importanti progressi nei materiali ad alta efficienza per elettrodi e membrane. Inoltre saranno necessarie configurazioni di MEC ed EAM con cinetica di rapido utilizzo del substrato. La cinetica di utilizzo del substrato dei batteri EAM può essere un passo limitante della velocità di produzione di  $H_2$  nei MEC [108]; quindi, la comprensione della cinetica dei microrganismi EAM è essenziale. Il microrganismo ideale e altamente efficiente dovrebbe avere un alto tasso di ossidazione del substrato, esportare elettroni verso l'anodo a un basso potenziale e produce una matrice di biofilm conduttivo che consenta il trasferimento extracellulare di elettroni (EET) con una minima perdita di potenziale [109]. È noto che gli EAM utilizzano rapidamente l'acetato, ma il grado di utilizzo di altri prodotti di fermentazione è scarsamente definito. I lavori precedenti mostrano che gli EAM sono in grado di produrre corrente da altri prodotti di fermentazione [110], ma i tassi sono notevolmente più lenti rispetto all'acetato [110]. Idealmente, alcuni EAM potrebbero essere sufficientemente versatili per utilizzare rapidamente un intervallo di prodotti di fermentazione (ad esempio propionato o etanolo). In alternativa, i biofilm formati dagli EAM che utilizzano acetato dovrebbero contenere anche fermentatori in grado di convertire rapidamente il materiale organico di partenza [111].

## **5. CONCLUSIONE**

Sebbene promettente, la sintesi bioelettrochimica di  $H_2$  nei MEC soffre ancora di una scarsa velocità di sintesi. Ulteriori miglioramenti alla tecnologia MEC attuale dovrebbero concentrarsi sull'aumento della superficie dell'elettrodo attivo e della densità di corrente per unità di superficie geometrica. Materiali conduttori tridimensionalmente porosi, eventualmente pre-trattati o funzionalizzati per migliorare la biocompatibilità, aumentano la superficie disponibile per l'attacco delle cellule microbiche e la successiva formazione di biofilm elettroattivo. Un problema evidente resta la competizione per il precursore  $H^+$  da parte di altri microrganismi, come i metanogeni. L'uso di un inoculo misto definito e/o l'ottimizzazione di

parametri operativi come la temperatura del reattore, il pH, la HRT e il potenziale elettrochimico applicato all'elettrodo miglioreranno la resa e dovrebbero essere considerati in tutte le fasi dello sviluppo dei MEC, dal laboratorio agli studi su vasta scala. Le tecnologie MEC e di *dark fermentation* per la produzione di  $H_2$  sono simili in termini di velocità di sintesi volumetrica. Tuttavia, la concentrazione di cellule vitali nei biofilm di MEC può ampiamente superare la concentrazione di cellule planctoniche nei fermentatori. Poiché la produzione di  $H_2$  è una funzione dell'abbondanza del catalizzatore microbico, il MEC può superare in performance la tecnologia di *dark fermentation* nei bioreattori su larga scala.

A livello sperimentale, la produzione bioelettrochimica di  $H_2$  in MEC ha mostrato un impatto ambientale inferiore rispetto al convenzionale processo di reforming con vapore. I biocattodi popolati da consorzi microbici producono una corrente più elevata rispetto alle singole specie, aumentando così il tasso di produzione di  $H_2$ . Tuttavia, le vie metaboliche di altri microrganismi consumano  $H_2$ , richiedendo quindi inibizione selettiva, tempi di permanenza più brevi o altre misure progettuali. La valutazione critica dei pochi studi di *scale-up* già pubblicati mostra che un'ulteriore ottimizzazione del materiale e della morfologia degli elettrodi, possibilmente includendo un pre-trattamento della superficie, potrebbe migliorare l'adesione dei microrganismi elettroattivi, aumentando così la produzione di  $H_2$ .

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Pellis, Alessandro, Cantone, Sara, Ebert, Cynthia, Gardossi, Lucia, Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. *New Biotechnology*  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.005>
- [2] J. Foley, R. Rozendal, C. Hertle, P. Lant, K. Rabaey, Life cycle assessment of high-rate anaerobic treatment, microbial fuel cells, and microbial electrolysis cells, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 3629–3637.
- [3] C. Lu, J. Zhao, S.-T. Yang, D. Wei, Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping, *Bioresource Technol.* 104 (2011) 380–387.
- [4] C. Barca, A. Soric, D. Ranava, M.-T. Giudici-Orticoni, J.-H. Ferrasse, Anaerobic biofilm reactors for dark fermentative hydrogen production from wastewater: a review, *Bioresource Technol.* 185 (2015) 386–398.
- [5] A. ElMekawy, S. Srikanth, S. Bajracharya, H.M. Hegabd, P.S. Nigam, A. Singh, S. Mohanh, D. Pant, Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): the

- synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment, *Food Res. Int.* 73 (2015) 213–225.
- [6] A. Haryanto, S. Fernando, N. Murali, S. Adhikari, Current status of hydrogen production techniques by steam reforming of ethanol: a review, *Energy Fuels* 19 (2005) 2098–2106.
- [7] K. Mazloomi, C. Gomes, Hydrogen as an energy carrier: prospects and challenges, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16 (2012) 3024–3033.
- [8] N. Cherkasov, A. Ibadon, P. Fitzpatrick, A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation, *Chem. Eng. Process.* 90 (2015) 24–33.
- [9] P. Dodds, I. Staffell, A.D. Hawkes, F. Li, P. Grünewal, W. McDowall, Hydrogen and fuel cell technologies for heating: a review, *Int. J. Hydrogen Energy* 40 (2015).
- [10] R. Bentley, Y. Bentley, Explaining the price of oil 1971–2014: the need to use reliable data on oil discovery and to account for ‘mid-point’ peak, *Energ. Policy* 86 (2015) 880–890.
- [11] Maggio, Cacciola, When will oil, natural gas, and coal peak? *Fuel* 98 (2012) 111–123.
- [12] G. Zheng, W. Liao, F. Zhang, Z. He, Energy extraction from a large-scale microbial fuel cell system treating municipal wastewater, *J. Power Sources* 300 (2015) 260–264.
- [13] R. Kothari, D. Buddhi, R. Sawhney, Comparison of environmental and economic aspects of various hydrogen production methods, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 12 (2008) 553–563.
- [14] F. Meng, J. Li, S.K. Cushing, J. Bright, M. Zhi, J.D. Rowley, Z. Hong, A. Manivannan, A.D. Bristow, N. Wu, Photocatalytic Water oxidation by hematite/reduced graphene oxide composites, *ACS Catal.* 3 (2013) 746–751.
- [15] J. Liu, Y. Liu, N. Liu, Y. Han, X. Zhang, H. Huang, Y. Lifshitz, S.T. Lee, J. Zhong, Z. Kang, Metal-free efficient photocatalyst for stable visible water splitting via a two-electron pathway, *Science* 347 (2015) 970–974.
- [16] J. Carton, A. Olabi, Wind/hydrogen hybrid systems: opportunity for Ireland’s wind resource to provide consistent sustainable energy supply, *Energy* 35 (2010) 4536–4544.
- [17] Armstrong, F.A. (2009) Dynamic electrochemical experiments on hydrogenases. *Photosynth. Res.* 102, 541–550
- [18] Hyung-Sool Lee<sup>1</sup>, Wim F.J. Vermaas<sup>2</sup> and Bruce E. Rittmann<sup>1</sup>, Biological hydrogen production: prospects and challenges, *Trends in Biotechnology* Vol.28 No.5
- [19] J. Liu, Y. Liu, N. Liu, Y. Han, X. Zhang, H. Huang, Y. Lifshitz, S.T. Lee, J. Zhong, Z. Kang, Metal-free efficient photocatalyst for stable visible water splitting via a two-electron pathway, *Science* 347 (2015) 970–974.

- [20] P. Dodds, I. Staffell, A.D. Hawkes, F. Li, P. Grünewal, W. McDowall, Hydrogen and fuel cell technologies for heating: a review, *Int. J. Hydrogen Energy* 40 (2015).
- [21] Logan, B.E. (2004) Extracting hydrogen and electricity from Renewable resources. *Environ. Sci. Technol.* 38, 160A–167A
- [22] Thauer, R.K. et al. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180
- [23] Li, C.L. and Fang, H.H.P. (2007) Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37, 1–39
- [24] A. Singh, S. Sevda, I.M. Abu Reesh, K. Vanbroekhoven, D. Rathore, D. Pant, Biohydrogen production from lignocellulosic biomass: technology and sustainability, *Energies* 8 (2015) 13062–13080.
- [25] R. Bentley, Y. Bentley, Explaining the price of oil 1971–2014: the need to use reliable data on oil discovery and to account for ‘mid-point’ peak, *Energy Policy* 86 (2015) 880–890.
- [26] K. Mazloomi, C. Gomes, Hydrogen as an energy carrier: prospects and challenges, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16 (2012) 3024–3033.
- [27] I. Kapdan, F. Kargi, Bio-hydrogen production from waste materials, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 569–582.
- [28] A. Singh, S. Sevda, I.M. Abu Reesh, K. Vanbroekhoven, D. Rathore, D. Pant, Biohydrogen production from lignocellulosic biomass: technology and sustainability, *Energies* 8 (2015) 13062–13080.
- [29] R. Kothari, D. Buddhi, R. Sawhney, Comparison of environmental and economic aspects of various hydrogen production methods, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 12 (2008) 553–563.
- [30] F. Meng, J. Li, S.K. Cushing, J. Bright, M. Zhi, J.D. Rowley, Z. Hong, A. Manivannan, A.D. Bristow, N. Wu, Photocatalytic Water oxidation by hematite/reduced graphene oxide composites, *ACS Catal.* 3 (2013) 746–751.
- [31] Scoma A, Krawietz D, Faraloni C, Giannelli L, Happe T, Torzillo G. Sustained H<sub>2</sub> production in a *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant. *J Biotechnol* 2012;157:613–9.
- [32] Yoon J, Haeshin J, Kim M, Junsim S, Park T. Evaluation of conversion efficiency of light to hydrogen energy by *Anabaena variabilis*. *Int J Hydrog Energy* 2006;31:721–7.
- [33] Das D, Khanna N, Dasgupta CN. Biohydrogen production: fundamentals and technology advances. Boca Raton, USA: CRC Press; 2014

- [34] Manish S, Banerjee R. Comparison of biohydrogen production processes. *Int J Hydrog Energy* 2008; 33:279–86.
- [35] Mathews J, Wang G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *Int J Hydrog Energy* 2009; 34:7404–16.
- [36] Tamburic B, Zemichael FW, Maitland GC, Hellgardt K. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int J Hydrog Energy* 2011; 36:7872–6.
- [37] F. Meng, J. Li, S.K. Cushing, J. Bright, M. Zhi, J.D. Rowley, Z. Hong, A. Manivannan, A.D. Bristow, N. Wu, Photocatalytic Water oxidation by hematite/reduced graphene oxide composites, *ACS Catal.* 3 (2013) 746–751.
- [38] S.N.A. Rahman, M.S. Masdar, M.I. Rosli, E.H. Majlan, T. Husaleni, Overview of biohydrogen production technologies and application in fuel cell, *Am. J. Chem.* 5 (2015) 12–23.
- [39] Hallenbeck PC, Benemann JR. Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrog Energy* 2002; 27:1185–93.
- [40] Harwood, C.S. (2008) Nitrogenase-catalyzed hydrogen production by purple nonsulfur photosynthetic bacteria. In *Bioenergy* (Wall, J.D., Harwood, C.S. and Demain, A., eds), pp. 259–271, ASM Press
- [41] Flickinger, M.C. et al. (2007) Painting and printing living bacteria: engineering nanoporous biocatalytic coatings to preserve microbial viability. *Biotechnol. Progr.* 23, 2–17
- [42] Vignais, P. M.; Billoud, B.; Meyer, J. *FEMS Microbiol. Rev.* 2001, 25, 455.
- [43] Vignais, P. M.; Billoud, B. *Chem. Rev.* 2007, 107, 4206.
- [44] *Hydrogen as a Fuel: Learning from Nature*; Cammack, R., Frey, M., Robson, R., Eds.; Taylor & Francis: London, 2001.
- [45] Tamagnini, P.; Axelsson, R.; Lindberg, P.; Oxelfelt, F.; Wünschiers, R.; Lindblad, P. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002, 66, 1.
- [46] Fontecilla-Camps, J. C.; Volbeda, A.; Cavazza, C.; Nicolet, Y. *Chem. Rev.* 2007, 107, 4273.
- [47] Lyon, E. J.; Shima, S.; Boecher, R.; Thauer, R. K.; Grevels, F. W.; Bill, E.; Roseboom, W.; Albracht, S. P. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 14239
- [48] Wolfgang Lubitz, Hideaki Ogata, Olaf Rüdiger, and Edward Reijerse, *Hydrogenases*, *Chem. Rev.* 2014
- [49] Liu, H. et al. (2005) Electrochemically assisted microbial production of hydrogen from acetate.

Environ. Sci. Technol. 39, 4317–4320

- [50] Reguera, G. et al. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435, 1098–1101
- [51] Bond, D.R. and Lovley, D.R. (2003) Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1548–1555
- [52] Gorby, Y.A. et al. (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11358–11363
- [53] Pham, T.H. et al. (2008) Metabolites produced by *Pseudomonas* sp enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1119–1129
- [54] Tartakovsky, B. et al. (2009) High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 672–677
- [55] Lee, H.S. and Rittmann, B.E. (2010) Characterization of energy losses in an upflow single-chamber microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 920–927
- [56] Call, D.F. and Logan, B.E. (2008) Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking a membrane. *Environ. Sci. Technol.* 42, 3401–3406
- [57] Segura, D. et al. (2008) Computational and experimental analysis of redundancy in the central metabolism of *Geobacter sulfurreducens*. *PLoS Comput. Biol.* 4, e36
- [58] L. Shi, D.J. Richardson, Z. Wang, S.N. Kerisit, K.M. Rosso, J.M. Zachara, J.K. Fredrickson, The roles of outer membrane cytochromes of *Shewanella* and *Geobacter* in extracellular electron transfer, *Environ. Microbiol. Rep.* 1 (2009) 220–227.
- [59] T. Kihara, X.Y. Liu, C. Nakamura, K.M. Park, S.W. Ha, D.J. Qian, K. Kawasaki, N.A. Zorin, S. Yasuda, K. Hata, T. Wakayama, J. Miyake, Direct electron transfer to hydrogenase for catalytic hydrogen production using a single-walled carbon nanotube forest, *Int. J. Hydrogen Energy* 36 (2011) 7523–7529.
- [60] Y. A. Gorby, S. Yanina, J. S. McLean, K. M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, T. J. Beveridge, I. S. Chang, B. H. Kim, K. S. Kim, D. E. Culley, S. B. Reed, M. F. Romine, D. A. Saffarini, E. A. Hill, L. Shi, D. A. Elias, D. W. Kennedy, G. Pinchuk, K. Watanabe, S. Ishii, B. Logan, K. H. Nealson, J. K. Fredrickson, “Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Giugno 2006, Vol. 103, No. 30, pp. 11358–11363.
- [61] M. Rahimnejad, G.D. Najafpour, A.A. Ghoreyshi, F. Talebnia, G.C. Premier, G. Bakeri, J.R.

- Kim, S.E. Oh, Thionine increases electricity generation from microbial fuel cell using *Saccharomyces cerevisiae* and exoelectrogenic mixed culture, *J. Microbiol.* 50 (2012) 575–580.
- [62] F. Aulenta, A. Catervi, M. Majone, S. Panero, P. Reale, S. Rossetti, Electron transfer from a solid-state electrode assisted by methyl viologen sustains efficient microbial reductive dechlorination of TCE, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 2554–2559.
- [63] D. Park, J. Zeikus, Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 1292–1297.
- [64] S. Freguia, S. Tsujimura, K. Kano, Electron transfer pathways in microbial oxygen biocathodes, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 813–818.
- [65] M. Epifanio, S. Inguva, M. Kitching, J.-P. Mosnier, E. Marsili, Effects of atmospheric air plasma treatment of graphite and carbon felt electrodes on the anodic current from *Shewanella* attached cells, *Bioelectrochemistry* 106 (2015) 186–193.
- [66] J. Geelhoed, A. Stams, Electricity-assisted biological hydrogen production from acetate by *Geobacter sulfurreducens*, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 815–820.
- [67] Y. Zhang, J. Sun, Y. Hu, S. Li, Q. Xu, Bio-cathode materials evaluation in microbial fuel cells: a comparison of graphite felt, carbon paper and stainless steel mesh materials, *Int. J. Hydrogen Energy* 37 (2012) 16935–16942.
- [68] G. Zheng, W. Liao, F. Zhang, Z. He, Energy extraction from a large-scale microbial fuel cell system treating municipal wastewater, *J. Power Sources* 300 (2015) 260–264.
- [69] L. Huang, S. Cheng, F. Rezaei, B. Logan, Reducing organic loads in wastewater effluents from paper recycling plants using microbial fuel cells, *Environ. Technol.* 30 (2009) 499–504.
- [70] Q. Wen, Y. Wu, L. Zhao, Q. Sun, F. Kong, Electricity generation and brewery wastewater treatment from sequential anode-cathode microbial fuel cell, *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 11 (2010) 87–93.
- [71] R. M. Donlan, W. Costerton, “Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms”, *Clinical Microbiological Reviews*, 2002, Vol. 15, No. 2, pp. 167-193.
- [72] G. P. Di Sansebastiano, N. Paris, S. Marc-Martin, J. M. Neuhaus, “Regeneration of a lytic central vacuole and of neutral peripheral vacuoles can be visualized by green fluorescent proteins targeted to either type of vacuoles”, *Plant Physiol.*, 2001, Vol. 126, pp. 78-86.
- [73] P. Stoodley, Z. Lewandowski, J. D. Boyle, H. M. Lappin-Scott, “Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology”, *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, Vol. 65, pp. 83-92.

- [74] M. E. Davey, G. A. O'Toole, "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Dicembre 2000, Vol. 64, No. 4, pp. 847- 867.
- [75] N. R. Stanley, B. A. Lazazzera, "Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation", *Mol. Microbiol.*, Maggio 2004, Vol. 52, No. 4, pp. 917- 924.
- [76] C. -C. Hung, P. H. Santschi, "Spectrophotometric determination of total uronic acids in seawater using cation exchange separation and pre-concentration by lyophilization", *Analyt. Chim. Acta*, 2001, Vol. 427, pp. 111-117.
- [77] G. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter, "Biofilm formation as microbial development", *Annual Review of Microbiology*, Ottobre 2000, Vol. 54, pp. 49-79.
- [78] F. Brombacher, R. A. Kastelein, G. Alber, "Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses", *Trends Immunol.*, Aprile 2003, Vol. 24, No. 4, pp. 207-12.
- [79] C. Heilmann, O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, F. Gotz, "Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*", *Mol. Microbiol.*, 1996, Vol. 20, pp. 1083-1091.
- [80] S. E. Cramton, C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, F. Götz, "The intercellular adhesion (ica) locus in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation", *Infect. Immun.*, 1967, pp. 5427-5433.
- [81] P. I. Watnick, R. Kolter, "Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm", *Molecular Microbiology*, 1999, Vol. 34, pp.586-595.
- [82] F. H. Yildiz, G. K. Schoolnik, "Vibrio cholerae O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Marzo 1999, Vol. 96, pp. 4028- 4033.
- [83] G. A. O'Toole, K. A. Gibbs, P. W. Hager, P. V. Phibbs, R. Kolter, "The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Bacteriol.*, 2000, Vol. 182, pp. 425-431.
- [84] F. Götz, "Staphylococcus and biofilms", *Mol. Microbiol.*, Marzo 2002, Vol. 43, No. 6, pp. 1367-1378.
- [85] S. Sakai, T. Yagishita, Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol-containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine, *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007) 340–348.
- [86] D. Call, B.E. Logan, Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell lacking

- a membrane, *Environ. Sci. Technol.* 42 (9) (2008) 3401–3406.
- [87] Sasaki, M. Morita, D. Sasaki, N. Ohmura, Y. Igarashi, The membraneless bioelectrochemical reactor stimulates hydrogen fermentation by inhibiting methanogenic archaea, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2012) 7005–7013.
- [88] K. Sasaki, M. Morita, N. Matsumoto, D. Sasaki, S. Hirano, N. Ohmura, Y. Igarashi, Construction of hydrogen fermentation from garbage slurry using the membrane free bioelectrochemical system, *J. Biosci. Bioeng.* 114 (2012) 64–69.
- [89] K. Sasaki, M. Morita, D. Sasaki, Y. Igarashi, Single-chamber bioelectrochemical hydrogen fermentation from garbage slurry, *Biochem. Eng. J.* 68 (2012) 104–108.
- [90] B. Logan, D. Call, S. Cheng, H.M.V. Hamelers, T.H.J.A. Sleutels, A.W. Jeremiasse, R.A. Rozendal, Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8630–8640.
- [91] P. Selembo, M. Merrill, B. Logan, The use of stainless steel and nickel alloys as low-cost cathodes in microbial electrolysis cells, *J. Power Sources* 190 (2009) 271–278.
- [92] R.A. Rozendal, H.V.M. Hamelers, G.J.W. Euverink, S.J. Metz, C.J.N. Buisman, Principle and perspectives of hydrogen production through biocatalyzed electrolysis, *Int. J. Hydrogen Energy* 31 (2006) 1632–1640.
- [93] M. Villano, L. Bonis, S. Rossetti, F. Aulenta, M. Majone, Bioelectrochemical hydrogen production with hydrogenophilic dechlorinating bacteria as electrocatalytic agents, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 3193–3199.
- [94] C. Picioreanu, M. Loosdrecht, K. Katuri, K. Scott, I. Head, Mathematical model for microbial fuel cells with anodic biofilms and anaerobic digestion, *Water Sci. Technol.* 57 (2008) 965.
- [95] K. Fischer, D. Batstone, M. Loosdrecht, C. Picioreanu, A mathematical model for electrochemically active filamentous sulfide-oxidising bacteria, *Bioelectrochemistry* 102 (2015) 1020.
- [96] K. Sasaki, M. Morita, D. Sasaki, Y. Igarashi, Single-chamber bioelectrochemical hydrogen fermentation from garbage slurry, *Biochem. Eng. J.* 68 (2012) 104–108.
- [97] F.E. Cruz, S. de O. Junior, Petroleum refinery hydrogen production unit: exergy and production cost evaluation, *Int. J. Thermodyn.* 11 (2008) 187–193.
- [98] C. Santoro, M. Guilizzoni, J.P.C. Baena, U. Pasaogullari, A. Casalegno, B. Lia, S. Babanova, K. Artyushkova, P. Atanassov, The effects of carbon electrode surface properties on bacteria attachment and start up time of microbial fuel cells, *Carbon* 67 (2014) 128–139.

- [99] L. Lu, N. Ren, X. Zhao, H. Wang, D. Wua, D. Xing, Hydrogen production, methanogen inhibition and microbial community structures in psychrophilic single-chamber microbial electrolysis cells, *Energy Environ. Sci.* 4 (2011) 1329–1336.
- [100] G. Zhan, D. Li, Y. Tao, X. Zhu, L. Zhang, Y. Wang, X. He, Ammonia as carbon-free substrate for hydrogen production in bioelectrochemical systems, *Int. J. Hydrogen Energy* 39 (2014) 11854–11859.
- [101] E. Croese, A.W. Jeremiasse, I.P.G. Marshall, A.M. Spormann, G.J. Euverink, J.S. Geelhoeda, A.J.M. Stams, C.M. Plugge, Influence of setup and carbon source on the bacterial community of biocathodes in microbial electrolysis cells, *Enzyme Microb. Technol.* (2014) 67–75.
- [102] E. LaBelle, C. Marshall, J. Gilbert, H. May, Influence of acidic pH on hydrogen and acetate production by an electrosynthetic microbiome, *PLoS One* 9 (2014).
- [103] Tartakovsky, B. et al. (2009) High rate membrane-less microbial electrolysis cell for continuous hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 672–677
- [104] Lee, H.S. et al. (2009) Fate of H<sub>2</sub> in an upflow single-chamber microbial electrolysis cell using a metal-catalyst-free cathode. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7971–7976
- [105] Robinson, J.A. and Tiedje, J.M. (1984) Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H<sub>2</sub> under resting and growing conditions. *Arch. Microbiol.* 137, 26–32
- [106] Lee, H.S. and Rittmann, B.E. (2010) Characterization of energy losses in an upflow single-chamber microbial electrolysis cell. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 920–927.
- [107] Bard, A.J. and Faulkner, L.R. (2004) *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons
- [108] Torres, C.I. et al. (2008) Kinetic experiments for evaluating the Nernst-Monod model for anode-respiring bacteria (ARB) in a biofilm anode. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6593–6597
- [109] Torres, C.I. et al. (2008) Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 872–881
- [110] Kim, J.R. et al. (2007) Electricity generation and microbial community analysis of alcohol powered microbial fuel cells. *Bioresour. Technol.* 98, 2568–2577
- [111] Parameswaran, P. et al. (2010) Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 69–78

