

Etude de la production d'hydrogène en bioréacteur par la bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus* 2. Transformation du lactate et bilans carbonés
Hydrogen production in bioreactor by a photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* 2. Lactate transformation and carbon balances

S. Delachapelle, M. Renaud et P. M. Vignais

Volume 4, numéro 1, 1991

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/705092ar>

DOI : <https://doi.org/10.7202/705092ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (imprimé)

1718-8598 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Delachapelle, S., Renaud, M. & Vignais, P. M. (1991). Etude de la production d'hydrogène en bioréacteur par la bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus* 2. Transformation du lactate et bilans carbonés. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 4(1), 101–120.
<https://doi.org/10.7202/705092ar>

Résumé de l'article

La dégradation du lactate par la bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus* cultivée dans un photobioréacteur en anaérobiose, à la lumière, en limitation d'azote, a été mesurée ainsi que la production d'hydrogène par la nitrogénase. En réacteur ouvert à faible taux de dilution ($D = 0,04 \text{ h}^{-1}$), le lactate initialement à 30 mM est dégradé à près de 90 % avec une faible accumulation ($< 1\text{-}2 \text{ mM}$) des produits de dégradation (formiate et acétate). C'est dans ces conditions qu'on observe la meilleure production d'hydrogène ($44 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Lorsque la culture bactérienne devient trop dense en réacteur fermé ou au recyclage des bactéries, il y a apparemment passage à un métabolisme de type fermentatif, chute de la production d'hydrogène et accumulation d'acides organiques (formique, acétique, propionique) provenant du lactate. Dans ces conditions, il n'y a pas diminution de la charge de carbone organique. Outre la présence de ces acides à courtes chaînes, les bilans carbonés; font apparaître la présence, dans le surnageant de la culture, de substances carbonées exocellulaires non identifiées pouvant représenter jusqu'à 50 % du flux carboné sortant.

Etude de la production d'hydrogène en bioréacteur par la bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus*

2. Transformation du lactate et bilans carbonés

Hydrogen production in bioreactor by a photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*

2. Lactate transformation and carbon balances

S. DELACHAPELLE¹, M. RENAUD², P. VIGNAIS³

Reçu le 30 janvier 1989, accepté pour publication le 19 septembre 1990*

RÉSUMÉ

La dégradation du lactate par la bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus* cultivée dans un photobioréacteur en anaérobiose, à la lumière, en limitation d'azote, a été mesurée ainsi que la production d'hydrogène par la nitrogénase. En réacteur ouvert à faible taux de dilution ($D = 0,04 \text{ h}^{-1}$), le lactate initialement à 30 mM est dégradé à près de 90 % avec une faible accumulation ($< 1-2 \text{ mM}$) des produits de dégradation (formiate et acétate). C'est dans ces conditions qu'on observe la meilleure production d'hydrogène ($44 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$). Lorsque la culture bactérienne devient trop dense en réacteur fermé ou en recyclage des bactéries, il y a apparemment passage à un métabolisme de type fermentatif, chute de la production d'hydrogène et accumulation d'acides organiques (formique, acétique, propionique) provenant du lactate. Dans ces conditions, il n'y a pas diminution de la charge de carbone organique. Outre la présence de ces acides à courtes chaînes, les bilans carbonés font apparaître la présence, dans le surnageant de la culture, de substances carbonées exocellulaires non identifiées pouvant représenter jusqu'à 50 % du flux carboné sortant.

Mots clés : *Rhodobacter capsulatus*, dégradation du lactate, photobioréacteur, production d'hydrogène.

SUMMARY

A 10 l photobioreactor, consisting of a PVC tubing, spiral-coiled so as to form a plane light captor (DELACHAPELLE *et al.*, 1990), was used to study the degradation of lactate by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* strain B10. The bacterial culture was continuously circulated in the reactor so as to

1. Adresse actuelle : Société 3M France, rue Geneviève Couturier, BP 324, 92506 Rueil Malmaison.
 2. Laboratoire de Génie des Procédés Papetiers (URA CNRS 1100), EFGP, BP 65, 38402 Saint-Martin-d'Hères.
 3. Laboratoire de Biochimie Microbienne (CNRS URA 1130 alliée à l'INSERM), CENG, BP 85X, 38041 Grenoble Cedex.
- * Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 octobre 1991.

maintain a homogeneous suspension, to optimize illumination of the cells, and make a well-mixed reactor for optimal nutrient transfers and degassing of the medium. The bacterium was cultivated anaerobically under photoheterotrophic and N-limited conditions. The bioreactor was operated in three modes : as an open system (chemostat), as a closed system (batch), and as an open system with phases of bacteria recycling through the use of an ultrafiltration cell.

When the bioreactor functioned as a chemostat, at low dilution rate ($D < 0.04 \text{ h}^{-1}$) and at relatively low bacterial density ($A_{660 \text{ nm}} < 2.5$), up to 90 % of the added lactate (initial concentration 30 mM) was degraded ; the concentration of degradation products (formate, acetate) remained low ($< 2 \text{ mM}$). Under these conditions nitrogenase-mediated H_2 production was maximal ($44 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$). In batch cultures or when the cells were « recycled » in the chemostat by ultrafiltration, the increase in absorbancy led to a decrease in cell illumination and the bacteria apparently switched from a photosynthetic of a fermentative type of metabolism ; lactate was converted into formate + acetate + propionate, no H_2 was produced. From the determination of the carbon balance between the influent and the effluent medium, the presence of non identified extracellular carbon compounds (up to 50 % of the C content of the effluent) was proved.

Key-words : *Rhodobacter capsulatus*, lactate degradation, photobioreactor, hydrogen production.

INTRODUCTION

Les bactéries photosynthétiques possèdent un métabolisme très versatile qui leur permet de vivre dans des environnements très variés (en aérobiose ou en anaérobiose, à la lumière ou à l'obscurité...). Elles utilisent divers substrats carbonés comme source de carbone et d'électrons et peuvent constituer des agents de dépollution efficaces (voir KOBAYASHI, 1976 ; KOBAYASHI *et al.*, 1978 ; BOLLINGER *et al.*, 1985 ; LISSOLO *et al.*, 1989). Elles sont d'ailleurs présentes naturellement dans les stations d'épuration. Leur forte activité respiratoire, leur capacité à dégrader les acides organiques à courtes chaînes et à produire de l'hydrogène lors de la dégradation anaérobie de ces acides en présence de lumière ont déjà conduit plusieurs groupes de recherche à concevoir des bioréacteurs où la dégradation de substrats carbonés polluants, comme le lactate, serait associée à la récupération d'énergie sous forme d'hydrogène (ZÜRRER et BACHOFEN, 1979, 1981 ; VINCENZINI *et al.*, 1981 ; JOUANNEAU *et al.*, 1982 ; STEVENS *et al.*, 1983).

Rhodobacter capsulatus, bactérie phototrophe à métabolisme très versatile, à croissance rapide, pouvant synthétiser de grandes quantités de nitrogénase catalysant la réduction des protons en hydrogène, et manipulable génétiquement (voir revue de VIGNAIS *et al.*, 1985), représente pratiquement une bactérie d'intérêt industriel.

Dans l'article précédent (DELACHAPPELLE *et al.*, 1990), nous avons décrit le photobioréacteur avec lequel nous avons déterminé les conditions optimales

de production d'hydrogène moléculaire par *R. capsulatus*, souche B10. Cette production de H_2 , liée à l'activité de la nitrogénase, peut chuter brutalement lorsqu'on s'écarte de ces conditions idéales.

Dans ce travail, nous nous attachons à évaluer l'action de dépollution de cultures de *R. capsulatus* dans le même photobioréacteur en suivant le devenir des molécules carbonées issues du lactate présent dans le milieu nutritif. Par analyse des différentes fractions (solubles et non solubles) du flux sortant (et du flux entrant) correspondant à l'apport de milieu nutritif au bioréacteur, assimilé à une boîte noire, nous avons pu dresser des bilans massiques. Les résultats des analyses qui ont porté sur le carbone organique total (COT), sur les acides organiques, sur la biomasse, sont présentés dans cet article. Les bilans massiques réalisés conduisent à conclure que des métabolismes différents s'établissent dans la population bactérienne d'un réacteur ouvert avec ou sans recyclage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les conditions de culture et les méthodes de mesure de la biomasse bactérienne par l'absorbance à 660 nm ou par poids sec bactérien, de dosage de lactate et d'acides gras à courtes chaînes par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sont décrites dans l'article précédent (DELACHAPPELLE *et al.*, 1990).

Le dosage du carbone organique total (COT) repose sur l'oxydation, par combustion, du carbone en gaz carbonique (CO_2). La totalité du carbone présent dans les matières organiques dissoutes et en suspension dans le milieu est brûlé et le CO_2 ainsi formé est directement dosé par spectrophotométrie Infra Rouge (IR). L'appareillage est un analyseur de carbone total d'OI Corporation type TCS modèle 524. La détermination quantitative de carbone est effectuée par comparaison avec une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution mère d'hydrogénophthalate de potassium (carbone organique = $1\ 000\text{ mg carbone} \cdot l^{-1}$). Le résultat obtenu est exprimé en g de carbone $\cdot l^{-1}$. A pH neutre, le CO_2 dissous doit être présent sous forme d'ion bicarbonate (HCO_3^-). Il est dosé au préalable par simple acidification de la solution.

Le bilan massique est établi à partir des dosages de carbone organique total (COT) et des mesures de poids sec bactérien. Le réacteur est assimilé à une boîte noire dans lequel l'apport de milieu nutritif (lactate + glutamate) représente le flux entrant et la suspension bactérienne le flux sortant ; la suspension bactérienne comprend la masse bactérienne (psb) et la matière carbonée présente dans le surnageant. le poids sec bactérien est ramené en g de carbone $\cdot l^{-1}$ en considérant que la masse moyenne de carbone dans les cellules est sensiblement égale à la moitié de la masse de l'extrait sec obtenu par dessiccation et pesée (LEVEAU et BOUXX, 1982).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Nous avons utilisé le photobioréacteur de 10 litres décrit dans l'article précédent (DELACHAPPELLE *et al.*, 1990). Il est réalisé en tubulure PVC cristal, formant un capteur plan, dans lequel circule la suspension bactérienne. La circulation permet une parfaite homogénéisation du milieu, des transferts optimisés de la lumière et du milieu nutritif vers les cellules ainsi que du gaz formé vers un bac de récupération ou bac de dégazage. Ce réacteur a été utilisé sous 3 régimes : en système ouvert (chémostat), en système fermé (batch), en système ouvert avec recyclage des bactéries grâce à la présence d'une unité d'ultrafiltration.

1. Fonctionnement en chémostat

Le réacteur renferme dix litres de milieu nutritif stérilisé à 120 °C contenant du lactate (30 mM), du glutamate (7 mM), la solution d'oligoéléments et une solution tampon à pH 6,9 à base de phosphate de potassium (WEAVER *et al.*, 1975). Il estensemencé avec un litre de préculture ayant poussé en anaérobiose, à la lumière, à 30 °C. La culture se développe en système batch pour atteindre une absorbance $A_{660\text{ nm}} = 2,5$. Le réacteur est alors alimenté avec le même milieu nutritif à un débit fixe. La suspension bactérienne est soutirée au même débit que celui d'entrée de manière à maintenir un volume constant dans le réacteur. Dans l'expérience de la figure 1, deux pompes péristaltiques de type Gilson étalonnées sont utilisées pour l'alimentation et le soutirage. On fait varier le débit (ou taux de dilution) lorsque le régime permanent (mesures à l'équilibre) est atteint. La pompe de circulation de la suspension bactérienne à l'intérieur de la tubulure est la pompe à membrane Téflon décrite précédemment fonctionnant au débit de $250\text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$.

Influence du taux de dilution sur la vitesse de dégradation du lactate et la production d'hydrogène

La figure 1 montre une culture continue limitée par la source d'azote, soumise à des taux de dilution croissants. Pour chaque taux de dilution appliqué, la densité bactérienne passe par un régime transitoire, puis un régime d'équilibre où le taux de croissance μ s'égalise au taux de dilution. Les valeurs rapportées sur la figure 1 correspondent au régime permanent pour chaque taux de dilution. On observe une diminution lente de la densité bactérienne ($A_{660\text{ nm}}$) au fur et à mesure que le taux de dilution augmente. Le rapport Y_x de la masse bactérienne formée (en g de poids sec bactérien, psb) à la masse de carbone (en g) de lactate dégradée reste pratiquement constant, entre 0,45 et 0,52, lorsque le taux de dilution varie de $0,03$ à $0,14\text{ h}^{-1}$. Les dosages de lactate montrent que celui-ci est largement en excès et que c'est bien le glutamate (concentration résiduelle non détectable) qui est le facteur limitant de la croissance. Lorsque le taux de dilution augmente, le temps de séjour moyen des bactéries diminue ; à densité optique sensiblement constante, le temps de croissance est plus court, donc l'âge moyen de la population doit baisser.

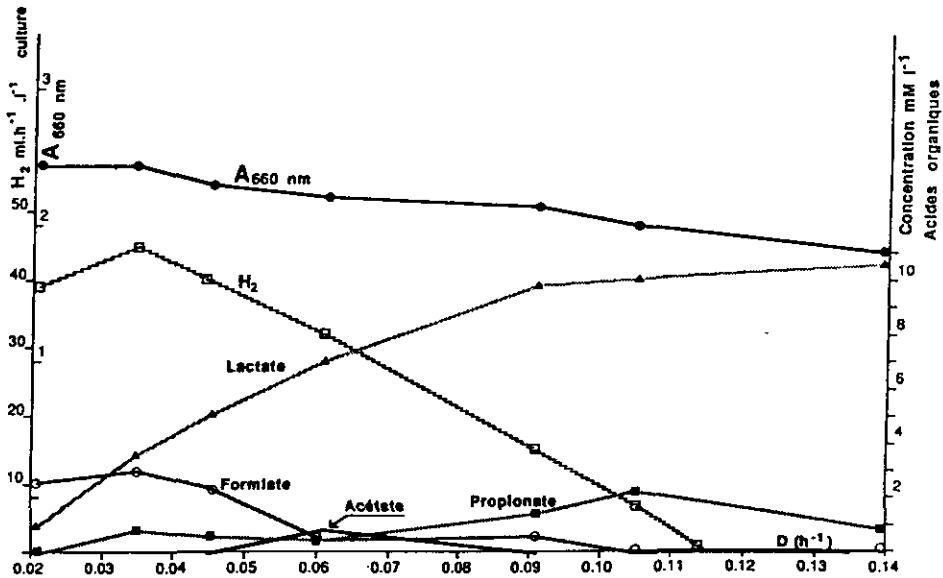


Figure 1 Culture continue de *R. capsulatus*, souche B10, en limitation par le glutamate 7 mM. Concentration initiale en lactate 30 mM. Variations de la production de H₂ (ml · h⁻¹ · l⁻¹), de la densité bactérienne (A_{660 nm}), de la concentration en lactate résiduel et en acides formés (mM) en fonction du taux de dilution D (h⁻¹).

La production d'hydrogène décroît au fur et à mesure que le taux de dilution augmente et s'annule à une valeur voisine de 0,12 h⁻¹. La production maximale de 44 ml H₂ · h⁻¹ · l⁻¹ de culture est observée pour un taux de dilution de 0,04 h⁻¹, soit un temps de renouvellement de 25 h. La transformation de lactate correspondante est de 87 %. Comme on le voit sur la figure 1, le taux de transformation de lactate en H₂ est le plus élevé aux taux de dilution les plus faibles.

Dans l'objectif d'améliorer la production d'hydrogène, nous avons réalisé une expérience similaire à la précédente mais en doublant l'intensité lumineuse (40 000 lumens). Les lampes à vapeur de sodium haute pression sont remplacées par des lampes à iode de 1 000 W chacune émettant à des longueurs d'ondes de 800-900 nm (longueurs d'ondes absorbées par la bactériochlorophylle *a* de *R. capsulatus*) au lieu de 500-600 nm (longueurs d'ondes correspondant à l'absorption par les caroténoïdes). La production d'hydrogène suit la même évolution pour une variation du taux de dilution de 0,026 h⁻¹ à 0,07 h⁻¹ avec un maximum de 40 ml · h⁻¹ à D = 0,04 h⁻¹. L'énergie lumineuse émise par les lampes à vapeur de sodium était donc bien captée par les bactéries et était déjà saturante pour la culture dans le photobioréacteur puisqu'on n'a pas réussi à augmenter la production d'hydrogène en augmentant l'énergie lumineuse comme l'avaient observé JOUANNEAU *et al.* (1985).

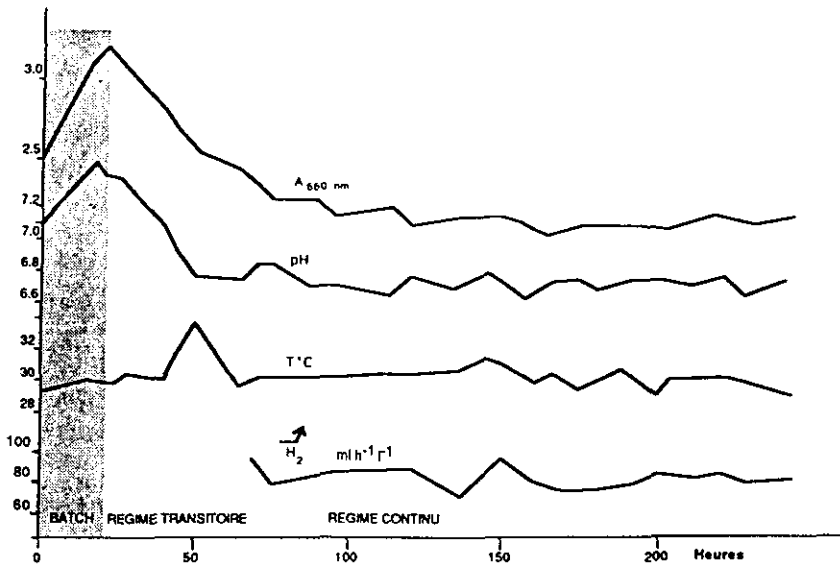
La consommation de lactate s'accompagne de la synthèse de biomasse et de la formation de produits de dégradation carbonés, en faibles concentrations, comme le formiate, l'acétate, le propionate. Pour chaque taux de dilution, des mesures ont été faites à l'équilibre pour établir des bilans massiques. Le flux carboné entrant (en $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$) est égal à la concentration du milieu nutritif (lactate + glutamate) et le flux carboné sortant (en $\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$) correspond à la matière sèche et aux acides organiques dosés (y compris le lactate résiduel). Pour deux expériences réalisées avec du milieu nutritif contenant 30 mM lactate + 7 mM glutamate, l'une sous 15 000 lumens (2 lampes à vapeur de sodium) et l'autre sous 40 000 lumens (2 lampes à iode), à des taux de dilution allant de $0,02 \text{ h}^{-1}$ à $0,14 \text{ h}^{-1}$, les rapports du flux sortant ($\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$) au flux entrant ($\text{g} \cdot \text{h}^{-1}$) ont été trouvés pratiquement constants et égaux à $0,47 \pm 0,05$. Ce bilan fait donc apparaître une perte massique de 50 % qui correspond à la synthèse probable de composés exocellulaires que nous n'avons pas dosés dans cette première série d'expériences. D'autre part, la production d'hydrogène paraît dépendre de facteurs autres que le seul métabolisme carboné (on sait effectivement que H_2 produit résulte de l'activité, ATP-dépendante, de la nitrogénase).

Culture continue en limitation de glutamate à taux de dilution constant

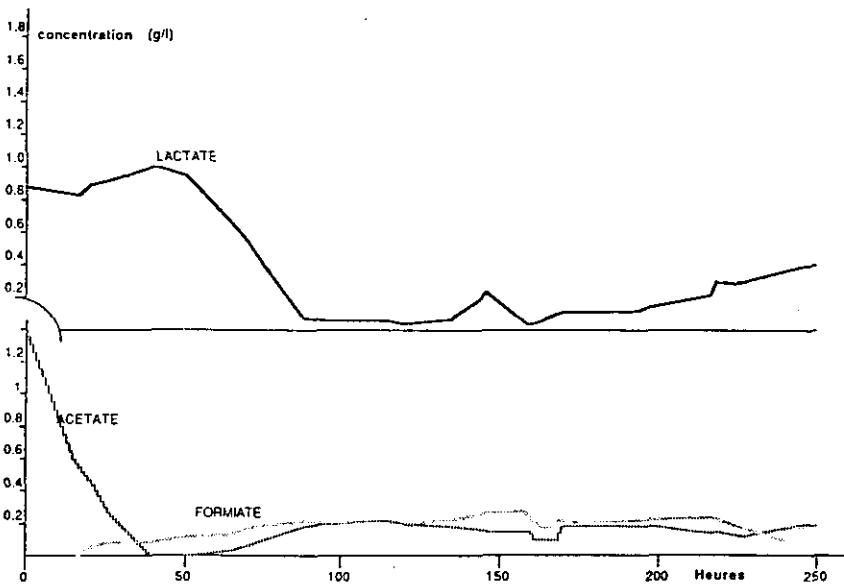
Une culture à taux de dilution constant ($D = 0,04 \text{ h}^{-1}$) a été maintenue pendant 300 h sur une solution contenant 25 mM de lactate et 5 mM de glutamate après développement de la culture en batch pendant 48 h. Le débit d'alimentation et de soutirage est réglé précisément par une commande automatique actionnant des pompes à piston. Cette commande est réalisée par un régulateur analogique PID en fonction de la mesure de niveau du bac de dégazage et d'une consigne. La mesure est effectuée par l'intermédiaire d'une sonde capacitive de niveau. Les électrodes de référence et de mesure de pH, pressurisées avec de l'air comprimé, la sonde de température en platine sont placés dans une chambre de mesure installée en fin de circuit (avant le bac de dégazage). Le capteur plan est éclairé par deux lampes à iode de 500 W chacune, nécessitant un refroidissement de la suspension afin de maintenir la température à $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

La figure 2 montre l'évolution des paramètres mesurés en fonction du temps. La période « batch » de la figure correspond à la deuxième moitié de la période batch de 48 h mentionnée plus haut. Cette période est suivie d'une phase transitoire qui correspond aux 50 premières heures de fonctionnement du réacteur en continu, caractérisée par une décroissance cellulaire (fig. 2a), une diminution du lactate résiduel et des acides organiques provenant du lactate (fig. 2b).

La figure 3 représente le bilan matière (en g de carbone $\cdot \text{l}^{-1}$) pour une culture continue ($D = 0,04 \text{ h}^{-1}$) similaire à celle décrite ci-dessus (fig. 2) mais avec un milieu nutritif contenant 2 mM de glutamate (et 25 mM de lactate). On voit que le COT du surnageant + la biomasse bactérienne (psb) représentant le flux sortant est pratiquement égal au flux entrant (milieu nutritif) mais que le poids en carbone des acides organiques dosés par HPLC ne représente guère que 34 % du COT du surnageant. Ces dosages montrent aussi que le CO_2 dissous dans la suspension est faible puisque le flux sortant carboné équilibre pratiquement le flux entrant.



a. Suivi de la densité bactérienne ($A_{660 \text{ nm}}$), du pH, de la température et de la production d'hydrogène (H_2) exprimée en $\text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$.



b. Variations des concentrations en lactate résiduel, acétate et formiate exprimées en $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Figure 2 Culture continue de *R. capsulatus*, souche B10, en limitation par le glutamate 5 mM à taux de dilution constant ($D = 0,04 \text{ h}^{-1}$).

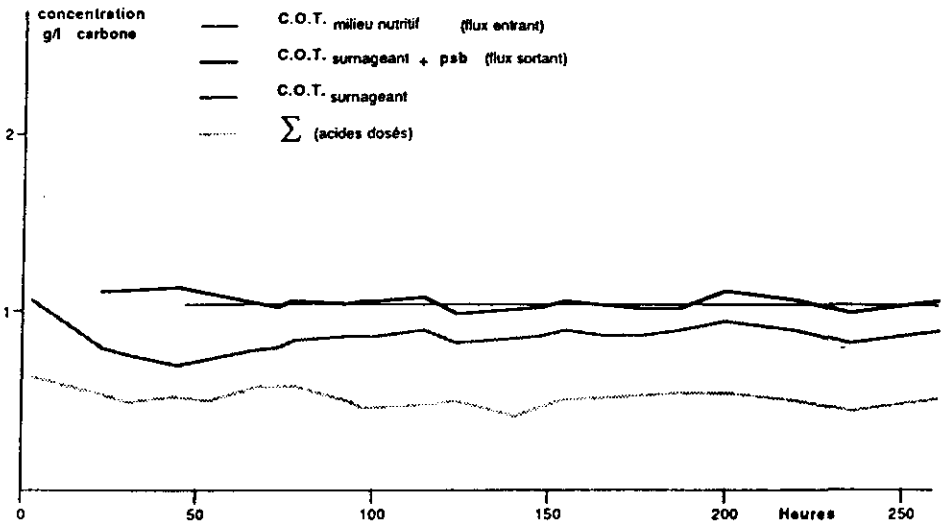


Figure 3 Bilan carboné en limitation d'azote. Le milieu nutritif initial contient soit 2 mM de glutamate ; il est ajouté à taux de dilution constant $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$. Le carbone COT et les acides organiques totaux, dosés par CLHP, sont exprimés en g de carbone par litre.

Avec 25 mM de lactate et 5 mM de glutamate, on note encore une faible teneur en CO_2 dissous qui peut s'expliquer par une dégradation partielle du lactate puisque, dans ce cas, 50 % du flux sortant sont représentés par les acides organiques (lactate non métabolisé, acétate, formiate, propionate) (résultats non montrés) mais aussi parce que les bactéries photosynthétiques, et *R. capsulatus* en particulier, sont capables de fixer le CO_2 , par photoréduction du CO_2 en présence de H_2 et de lumière (JOUANNEAU *et al.*, 1980) ou par carboxylation du pyruvate (WILLISON, 1988).

Le bilan matière carbonée fait apparaître une quantité non négligeable de composés organiques non identifiés (CNI) en solution dans le surnageant. La proportion de la biomasse par rapport au flux entrant est de 25 % ; il reste alors 40 % d'espèces organiques solubles ou produits exocellulaires qui sont probablement des exopolysaccharides. Nous avons observé une bonne corrélation entre l'absorbance et la biomasse bactérienne ; mais, dans l'expérience des figures 2 et 3, nous avons obtenu un rapport $\text{psb} (\text{g})/A_{660 \text{ nm}}$ de 0,3, valeur inférieure à celle déterminée par JOUANNEAU (1982), égale à 0,45. Cette différence peut être due à des quantités variables de substances endocellulaires et de substances de réserves (glycogène, poly- β -hydroxybutyrate) qui varient suivant les conditions de croissance (EIDELS et PREISS, 1970). Ces composés peuvent ensuite être utilisés par les bactéries pour former des produits exocellulaires, qui pourraient être induits par la circulation intense de la suspension bactérienne dans le réacteur. Dans nos conditions expérimentales, la quantité de carbone organique non identifié (40 % des acides organiques du flux sortant) est importante, ce qui peut expliquer le faible rapport $\text{psb}/A_{660 \text{ nm}}$ obtenu dans ces conditions.

Si on compare les bilans massiques en fonction de la concentration initiale en glutamate (tableau 1), on observe que le rendement en biomasse, par rapport au lactate consommé, croît avec la concentration initiale en glutamate (ce qui est normal puisque le glutamate est le facteur limitant de la croissance) mais que le rendement en production d'hydrogène est plus élevé à 5 mM de glutamate et qu'à cette concentration, la quantité d'acides organiques et de produits carbonés exocellulaires est plus faible dans le surnageant. La présence d'acides organiques formés à partir du lactate, en concentration variable en fonction du temps, reflète des changements dans le métabolisme carboné. WILLISON (1988) a montré, par exemple, que l'activité de la pyruvate déshydrogénase est élevée chez des cellules de *R. capsulatus* B10 ayant poussé sur DL-lactate ou DL-malate comme source carbonée mais faible chez des cellules ayant poussé sur acétate. Par analogie, on peut penser que les différentes enzymes impliquées dans les réactions du métabolisme du lactate réajustent leur activité en fonction des produits (carbonés et azotés) qui se trouvent dans le milieu, ce qui résulte en des produits excrétés variables (en quantité sinon, en qualité) en fonction des conditions de culture. Ainsi, pour une concentration initiale en glutamate de 2 mM, qui conduit à une faible croissance cellulaire, le lactate est mal dégradé et le taux de produits exocellulaires élevé (rapport de carbone_{CNI} au carbone du lactate = 70 %) (tableau 1). De façon similaire, NORBERG et ENFORS (1982) ont aussi observé une augmentation du rendement de conversion de la source carbonée en exopolysaccharides lors de la diminution de la concentration en source azotée chez des cellules de *Zooglia ramigera*.

Tableau 1 Rendement en hydrogène (Y_{H_2}), en biomasse (Y_x) et en composés organiques non identifiés (Y_{CNI}) par rapport au lactate dégradé dans des cultures continues de *R. capsulatus*.

Glutamate conc. initiale (mM)	Biomasse (g · l ⁻¹)	Y_{H_2} (mol H ₂ · mol ⁻¹)	Y_x (g · g ⁻¹)	Répartition du carbone dans le flux sortant (%)			Y_{CNI} (g · g ⁻¹)
				Biomasse	Acides organiques	Produits exocellu- laires (CNI)	
2	0,35	1,07	0,27	17	48	35	0,7
5	0,65	2,39	0,3	25	34	42	0,6
7	0,96	1,9	0,46	35	15	50	0,7

Le taux de dilution est $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$.

X = poids sec en g de matière vivante formée par litre de solution.

Y_{H_2} = nombre de moles de H₂ formé par mole de lactate dégradé.

Y_x = masse (g) (psb) de matière vivante formée par gramme de lactate dégradé.

Y_{CNI} = masse (g) de composés organiques non identifiés formés par gramme de lactate dégradé.

2. Fonctionnement en réacteur fermé avec ajouts successifs de milieu nutritif concentré

Le réacteur est rempli de 10 l de milieu nutritif stérile contenant 25 mM de lactate et 5 mM de glutamate, pH 6,9. Il estensemencé avec un litre de préculture ayant poussé à la lumière en anaérobiose à 30 °C. La suspension

bactérienne circule dans le bioréacteur à l'aide d'une pompe à aubes en caoutchouc à un débit de $175 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$. Le but de l'expérience est de vérifier si l'augmentation de la population bactérienne va conduire à une meilleure dégradation du lactate. L'augmentation de la population bactérienne est assurée par des rajouts de milieu nutritif concentré, chaque addition ramenant le milieu aux concentrations initiales en sels minéraux, en lactate (25 mM) et en glutamate (5 mM).

La concentration en lactate décroît rapidement après chaque ajout et celle des autres acides organiques, formique, acétique et propionique, croît. Ces derniers augmentent de façon spectaculaire pour des concentrations bactériennes élevées ($A_{660 \text{ nm}} \sim 8-9$) (fig. 4). A ces grandes densités cellulaires, l'activité nitrogénase chute (à $A_{660 \text{ nm}} = 5$), elle est le quart de celle qu'on observe à $A_{660 \text{ nm}} = 2$) et par conséquent, chute aussi la production d'hydrogène. Chez une autre bactérie photosynthétique, *Rhodospirillum rubrum*, la dégradation du pyruvate par voie fermentative conduit à la formation de formiate, acétate et propionate (VOELSKOW et SCHÖN, 1976, 1978, 1980, 1981). Deux voies de dégradation ont été décrites : l'une faisant intervenir la pyruvate-formiate lyase, l'autre la pyruvate déshydrogénase (VOELSKOW et SCHÖN, 1978 ; SOLAIMAN et UFFEN, 1982). La pyruvate-formiate lyase catalyse la dégradation du pyruvate en formiate et en acétyl-COA ; le formiate est ensuite transformé en H_2 et CO_2 et l'acétyl-COA en acétate. Chez *R. rubrum*, la production de H_2 à partir du formiate – qui implique une hydrogénase – est très inférieure à celle catalysée par la nitrogénase (VOELSKOW et SCHÖN, 1980). La pyruvate déshydrogénase dégrade le pyruvate en acétyl-COA qui se transforme aussi en acétate et en CO_2 . VOELSKOW et SCHÖN (1978) ont montré que les conditions de croissance des précultures influent sur l'activité des enzymes de dégradation du pyruvate. Ainsi, à partir d'une préculture ayant poussé en anaérobiose à la lumière, la fermentation du pyruvate s'effectue de façon préférentielle par décarboxylation oxydative, c'est-à-dire par la réaction catalysée par la pyruvate déshydrogénase. Dans ce cas, la pyruvate-formiate lyase est peu ou pas active.

La présence de formiate, d'acétate et de propionate dans notre culture en bioréacteur représente une situation similaire à celle observée chez *R. rubrum*. Le formiate est le premier produit qui apparait, viennent ensuite l'acétate et le propionate qui apparaissent comme produits finaux à des concentrations bactériennes élevées (conditions d'anaérobiose sans lumière) comme l'ont observé également VOELSKOW et SCHÖN (1978). Ces auteurs ont montré que chez *R. rubrum*, la production du propionate n'était pas liée à la synthèse d'enzymes au cours du métabolisme fermentatif mais que les enzymes nécessaires, catalysant la synthèse de propionate, étaient déjà présents dans la préculture de bactéries ayant poussé en photohétérotrophie (lumière, anaérobiose). Néanmoins, la présence de propionate n'a pas été observée, par SCHULTZ et WEAVER (1982), dans les produits de fermentation du fructose par *R. capsulatus*.

Pour confirmer les résultats obtenus dans le bioréacteur en PVC, qu'il est difficile de stériliser, nous avons cultivé *R. capsulatus* B10 en erlenmeyers de 50 ml contenant 25 ml de milieu de culture, soigneusement stérilisés et fermés par des bouchons en caoutchouc à jupe rabattable. La source de

carbone était soit du DL-lactate, soit du pyruvate (50 mM) avec 10 mM de glutamate. Dans ces erlenmeyers, nous avons observé une bonne production de H_2 liée à une forte activité nitrogénase ; en ce qui concerne la dégradation du substrat carboné, celle du pyruvate était plus rapide que celle du lactate, et il y avait production de formiate et de propionate en faible quantité. Nous avons vérifié, par étalement de la culture sur boîte de Petri, que la culture ne contenait que des cellules de *R. capsulatus* et pas d'organismes contaminants. Donc, il semble bien que la souche B10 de *R. capsulatus*, utilisée dans le photobioréacteur, puisse produire du propionate en anaérobiose en quasi absence de lumière, c'est-à-dire adopter un métabolisme de type fermentatif.

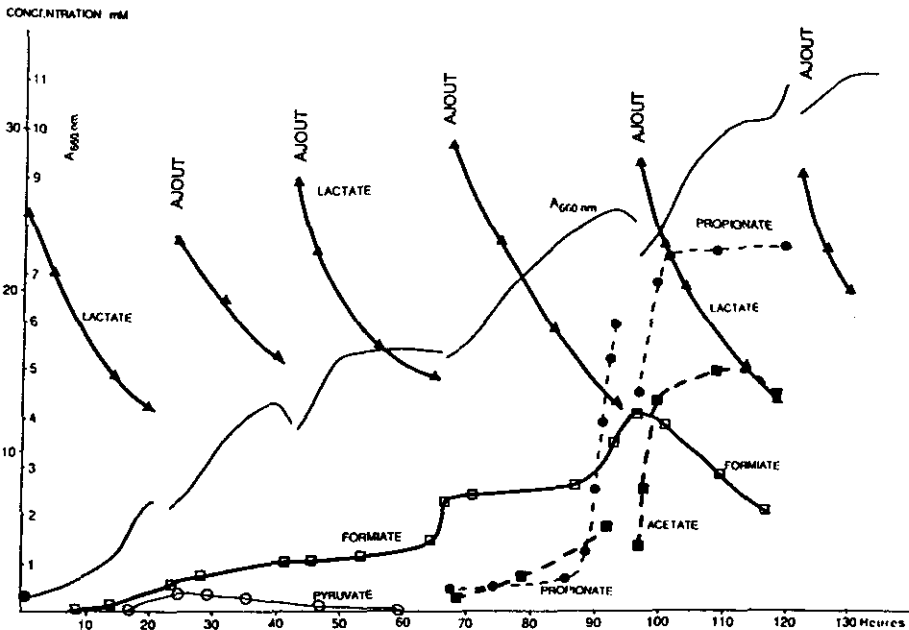


Figure 4 Culture en réacteur fermé avec ajouts successifs de milieu nutritif concentré. Courbes de disparition du lactate (—) et de production de métabolites [formiate (—), acétate (—), propionate (—), pyruvate (—)]. Le milieu nutritif initial contient lactate 25 mM, glutamate 5 mM.

3. Fonctionnement en réacteur ouvert avec recyclage

Pour augmenter le taux de dégradation des substrats carbonés, un autre type d'expérience a été réalisé. La croissance bactérienne a été limitée par apport de 2 mM glutamate dans le milieu nutritif et la population bactérienne a été augmentée par recyclage de la suspension à travers une unité d'ultrafiltration. Nous avons alterné des cycles de cultures avec recyclages à 100 % et des cultures continues sans recyclage.

Le réacteur contenant 10 l de milieu nutritif (25 mM lactate et 5 mM glutamate) a été ensemencé par 1 litre de préculture ayant poussé en anaérobiose à la lumière sur le même milieu. On laisse la culture se développer en batch pendant 48 h pour atteindre une absorbance $A_{660 \text{ nm}}$ de 2,3. Le réacteur est ensuite alimenté en continu à deux taux de dilution $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$, puis $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$ avec du milieu nutritif contenant 25 mM de lactate et 2 mM de glutamate à pH 3. Le pH est amené à 7,7 par addition de soude N dans la suspension bactérienne (régulation du pH). Lorsque le régime stationnaire est atteint, le système fonctionne en semi-ouvert avec recyclage des bactéries par l'intermédiaire de la cellule d'ultrafiltration. Le filtrat (flux sortant) est prélevé de façon continue, son débit est le même que celui du débit d'entrée pour garder un volume constant dans le réacteur. L'expérience a duré 1 000 heures. Le résultat des 500 premières heures seulement est présenté sur la figure 5a. La zone 1 comprend la période entre 45 et 285 h, sans recyclage, à un taux de dilution $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$. La zone 2 va de 285 à 365 h, avec recyclage, à $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ (en grisé sur la figure). La zone 3 (365-520 h) sans recyclage est à un taux de dilution $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$. Puis il y a eu plusieurs cycles de recyclage – non recyclage, à $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$ jusqu'à 1 000 h.

Le pH a été maintenu à 7,7 tout au long de l'expérience pendant les 1 000 heures. De la soude 1N permet de réguler précisément le pH pour un volume négligeable (pris en compte pour la régulation du niveau) sans être apparemment trop traumatique pour les micro-organismes à cause de la forte agitation du milieu. Les sondes de pH placées dans une chambre de mesure permettent une mesure précise du pH de la suspension avec un temps de réponse de 3,6 min, le débit de circulation du milieu dans le bioréacteur est de $175 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$. La température fluctue autour de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Les lampes utilisées sont des lampes à iode de 500 Watts chacune, situées à 40 cm au-dessus du capteur plan. Le refroidissement de la suspension est assuré par une circulation d'eau froide dans le bac où plonge le capteur. Le réglage manuel n'étant pas suffisamment précis pour compenser les écarts de température entre le jour et la nuit, nous avons installé quatre ventilateurs dont le fonctionnement est thermorégulé.

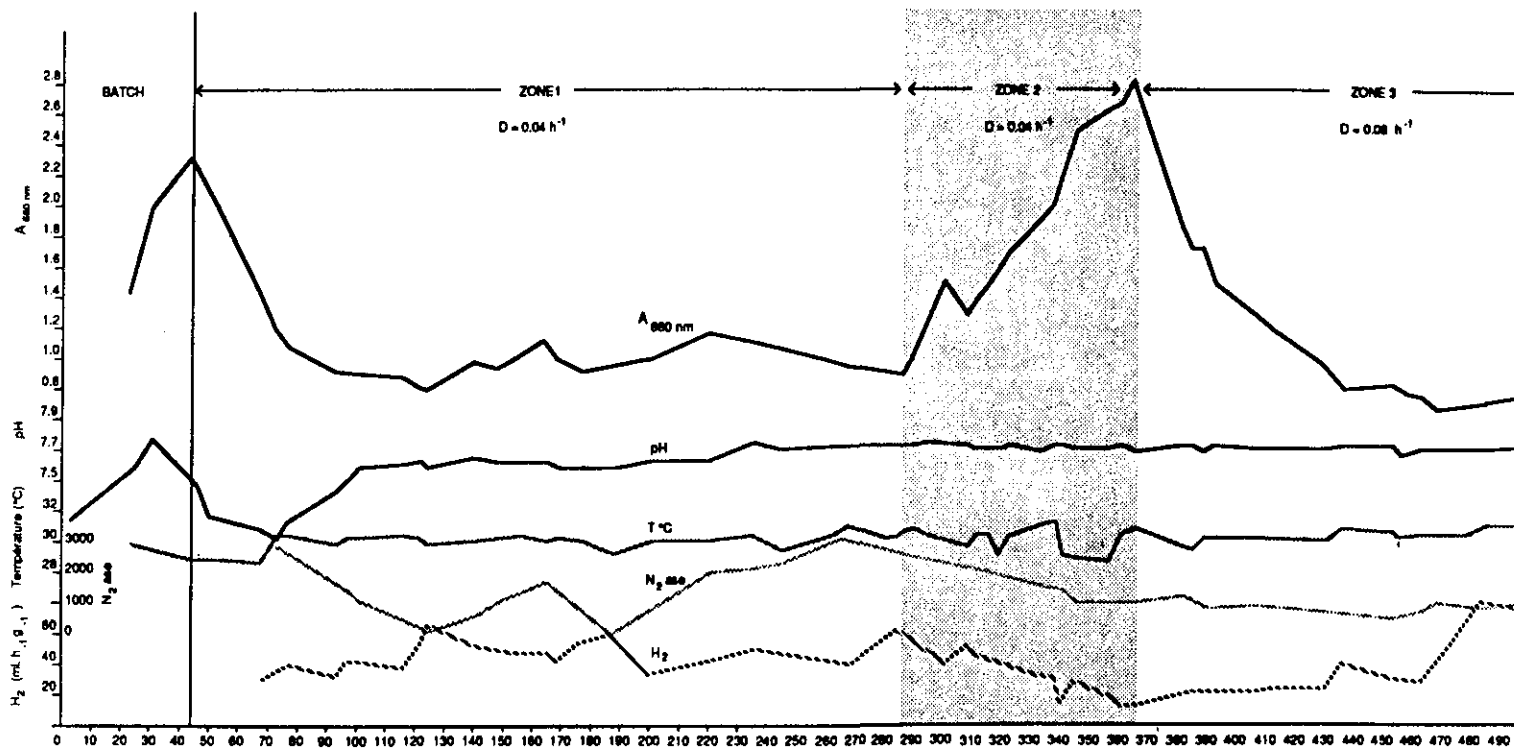
Après la croissance en batch, la densité de la population bactérienne décroît pendant la phase transitoire, puis se stabilise à une valeur d'équilibre correspondant au fonctionnement en réacteur ouvert. En recyclage, la densité bactérienne augmente linéairement en fonction du temps sans jamais atteindre d'équilibre (zone en grisée, *fig. 5a*), et ce d'autant plus vite que le taux de dilution est plus élevé. Après arrêt de la filtration, on assiste à une élution de la suspension bactérienne jusqu'à ce qu'un nouvel équilibre soit atteint. Le poids sec bactérien (psb) mesuré suit la même évolution que l'absorbance ($A_{660 \text{ nm}}$) (*fig. 5b*). Le rapport $\text{psb}/A_{660 \text{ nm}}$ est approximativement de 0,3 pour la zone 1 comme pour l'expérience précédente avec 5 mM glutamate. Ce rapport augmente à 0,4 – 0,45 en recyclage (zone 2) et se stabilise à cette valeur. Le retour à l'état d'équilibre après recyclage (zone 3) ne ramène pas ce rapport à sa valeur initiale. Le recyclage entraîne une accumulation bactérienne et un vieillissement de la population puisque le temps de séjour correspond à la durée du recyclage. Dans ces conditions, les bactéries ont tendance à s'enchaîner les unes aux autres en forme de zig-zag,

phénomène caractéristique d'une culture en fin de phase exponentielle (WEAVER *et al.*, 1975). La formation de polysaccharides exocellulaires et l'enchaînement des bactéries contribuent au colmatage de l'ultrafiltre. A partir de 580 h de fonctionnement, la cellule d'ultrafiltration se colmate et il devient difficile de maintenir la culture en recyclage. Il est alors nécessaire de passer périodiquement à un fonctionnement en continu pour décolmater les membranes de filtration. Le dernier recyclage a été réalisé entre 730 et 750 heures.

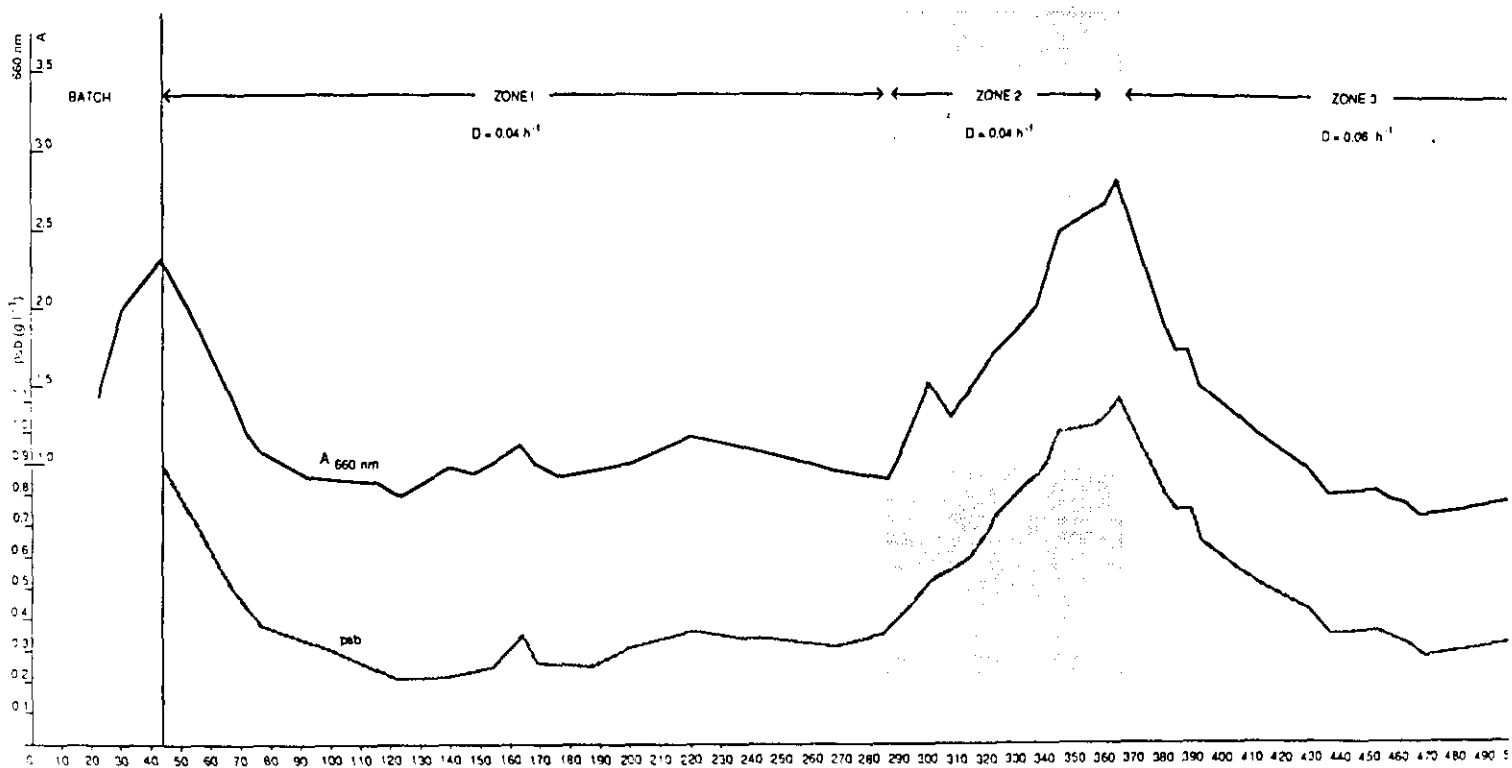
L'activité nitrogénase, mesurée indépendamment sur des prises aliquotes par la réduction d'acétylène, et la production d'hydrogène mesurée *in situ*, présentent une corrélation assez satisfaisante. Les fluctuations observées dans l'activité nitrogénase sont dues au fait que le sulfate de magnésium a d'abord été remplacé par du chlorure de magnésium pour prévenir le développement possible de bactéries sulfato-réductrices (180 premières heures) ; comme la nitrogénase est très riche en centres fer-soufre, nous avons ensuite craint qu'il ne manque du soufre dans le milieu et c'est pourquoi le sulfate de magnésium a été réintroduit dans le milieu nutritif vers la 180^e heure. On observe alors une remontée de l'activité nitrogénase (*fig. 5a*). En régime stationnaire, la production d'hydrogène se stabilise à environ $40 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{g de poids sec})^{-1}$. Pendant les périodes de recyclage, qui s'accompagnent d'une augmentation de la population bactérienne, donc d'une moins bonne illumination de chaque cellule, la production de H_2 baisse. Après l'arrêt du recyclage et après la zone transitoire nécessaire au rétablissement des conditions initiales ($A_{660 \text{ nm}}$ faible), la production d'hydrogène augmente et se stabilise à nouveau (zone 3, *fig. 5a*). Le meilleur rendement de production d'hydrogène est obtenu pour un temps de séjour dans le réacteur de 16,5 h ; il correspond à une production de $70 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{g matière sèche})^{-1}$ (zone 3). Le recyclage bactérien induit donc une baisse de l'activité de la nitrogénase et ne favorise pas la production de H_2 . Favorise-t-il la dégradation totale du lactate ?

Les acides organiques présents dans le flux sortant, dosés par CLHP, sont les acides lactique (résiduel), formique, acétique, propionique et pyruvique (*fig. 6*). Le pyruvate, présent en faibles quantités, n'a pas été reporté sur la figure 6c. Pendant le régime d'équilibre correspondant à un fonctionnement stable du réacteur en continu, et caractérisé par une absorbance de la population bactérienne proche de 1, le lactate est partiellement dégradé, le lactate résiduel étant d'environ 6 mM.

Au cours des 280 premières heures (zone 1), les acides formique, acétique et propionique sont présents à la concentration du millimolaire. A partir de la 170^e heure, on observe une montée d'acétate et l'apparition du propionate. Dans la phase de recyclage (zone 2), au cours de laquelle l'absorbance passe d'environ 1 à 3, la chute de la teneur en lactate de 10 à 20 mM correspond à une accumulation d'acétate (3 mM) et surtout de propionate dont la concentration passe de 0,9 à 11 mM. Le recyclage des bactéries ne fait donc pas chuter sensiblement la charge en carbone du milieu. Le retour au fonctionnement en réacteur ouvert (zone 3) ramène vers des états proches de ceux observés en zone 1, le propionate ($\sim 3 \text{ mM}$), l'acétate ($\sim 1,5 \text{ mM}$) se stabilisant à des concentrations un peu supérieures à celles de la zone 1, et le lactate résiduel remontant à 6-7 mM.



a. Suivi de la concentration bactérienne ($A_{660\text{ nm}}$), du pH, de la température, de l'activité nitrogénase ($N_2\text{ase}$) et de la production d'hydrogène (H_2). L'activité nitrogénase est exprimée en $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{ psb}$, la production d' H_2 est exprimée en $\text{ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{ psb}$.



b. Corrélation entre la densité bactérienne ($A_{660 \text{ nm}}$) et le poids sec bactérien (psb) exprimé en $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Figure 5 Culture en continu avec recyclage, à taux de dilution $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ et $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$. Les zones blanches représentent le système ouvert en continu. La zone grise représente le système en recyclage. Milieu nutritif : lactate 25 mM, glutamate 2 mM.

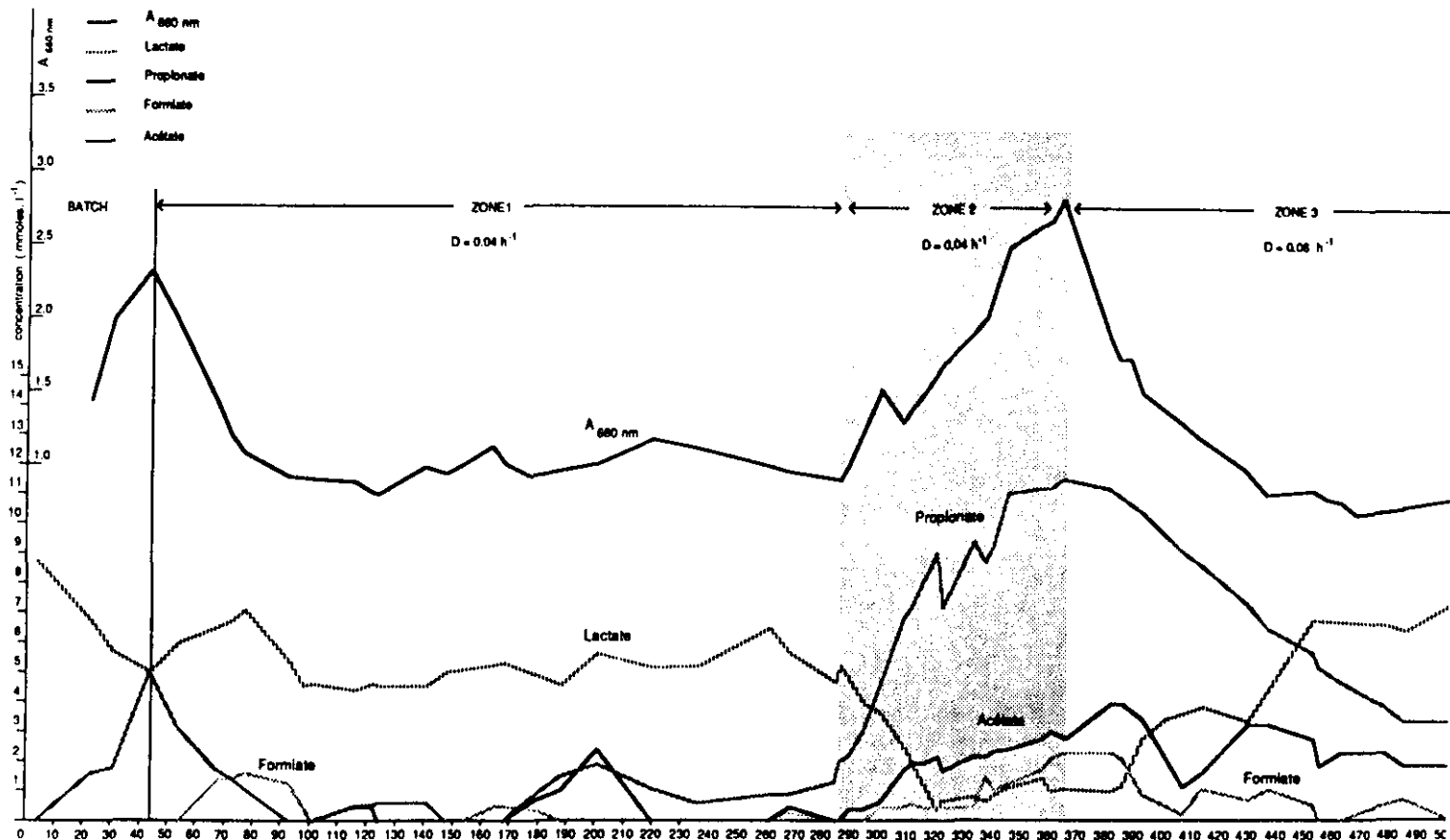


Figure 6 Culture en continu avec recyclage, à taux de dilution $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ et $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$. Suivi de la concentration bactérienne ($A_{660 \text{ nm}}$) et des acides organiques dosés par CLHP (lactate résiduel, propionate, formiate, acétate). Les concentrations sont exprimées en mm^{-1} .

Les bilans massiques établis pour cette expérience sont donnés sur la figure 7. Exprimés en g de carbone $\cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$, ils incluent pour le flux sortant : le poids sec bactérien, la somme des acides organiques, le COT du surnageant, le COT de la suspension bactérienne (COT total), le COT du filtrat pour les zones de recyclage. La quantité de matière carbonée dans le flux entrant correspond au lactate et au glutamate. Le bilan massique s'équilibre lorsque le réacteur est en régime ouvert stable (zone 1 et 3) ; le flux entrant est égal au flux sortant quel que soit le taux de dilution. On en déduit alors l'inexistence de bicarbonate dans la suspension, ce qui confirme les résultats antérieurs.

Au taux de dilution le plus élevé ($0,06 h^{-1}$), bien que la concentration en biomasse (psb) soit un peu plus grande, la teneur en carbone des acides organiques présents dans le surnageant est plus grande. Lorsque ces résultats sont exprimés par rapport au flux sortant, on obtient 17 % et 14,5 % pour le carbone organique de la matière vivante et 48 % et 65 % pour le carbone des acides organiques, respectivement pour les taux de dilution de $0,04 h^{-1}$ et $0,06 h^{-1}$. Il s'ensuit que le carbone organique des produits exocellulaires représente 35 % et 20 % du flux sortant aux taux de dilution, respectivement de $0,04 h^{-1}$ et $0,06 h^{-1}$; ces produits exocellulaires représentent 70 % et 55 % du lactate dégradé.

Les conclusions que l'on peut tirer de cette série d'expériences sont les suivantes :

- A taux de dilution relativement faible ($0,04 h^{-1}$), en forte limitation d'azote (glutamate initial 2 mM), la concentration bactérienne se stabilise à une absorbance voisine de 1, ce qui permet un métabolisme photosynthétique. Celui-ci, associé à la synthèse de la nitrogénase, conduit à une bonne production d'hydrogène. Une bonne partie du lactate entrant (60 %) est dégradée et l'on n'observe pas d'accumulation notable des acides organiques intermédiaires (pyruvate, formiate, acétate). Les bactéries avec un psb moyen de $0,3 g \cdot l^{-1}$ ne semblent pas accumuler de grandes quantités de matériel de réserve mais, par contre, 70 % du carbone du lactate dégradé se retrouve dans les produits exocellulaires synthétisés.

- En période de recyclage (zone 2), il y a augmentation de la densité bactérienne. Les bactéries se trouvant dans un environnement différent - en particulier plus faible éclairément - modifient leur métabolisme qui devient de type fermentatif (accumulation de propionate, formation d'acétate). Le lactate, qui disparaît à 92 %, est en fait en grande partie remplacé par d'autres acides organiques et il n'y a pas élimination du carbone organique du milieu, donc pas action de dépollution.

- La période de fonctionnement en chémostat qui suit, avec un taux de dilution de $0,06 h^{-1}$ (zone 3), doit prendre en compte la période de recyclage qui a induit un métabolisme de type fermentatif, donc la synthèse des enzymes nécessaires à ce métabolisme. Les deux facteurs, taux de dilution plus élevé et induction de nouvelles enzymes, peuvent rendre compte du fait que l'état du réacteur en zone 3 ne revient pas tout à fait à l'état observé en zone 1.

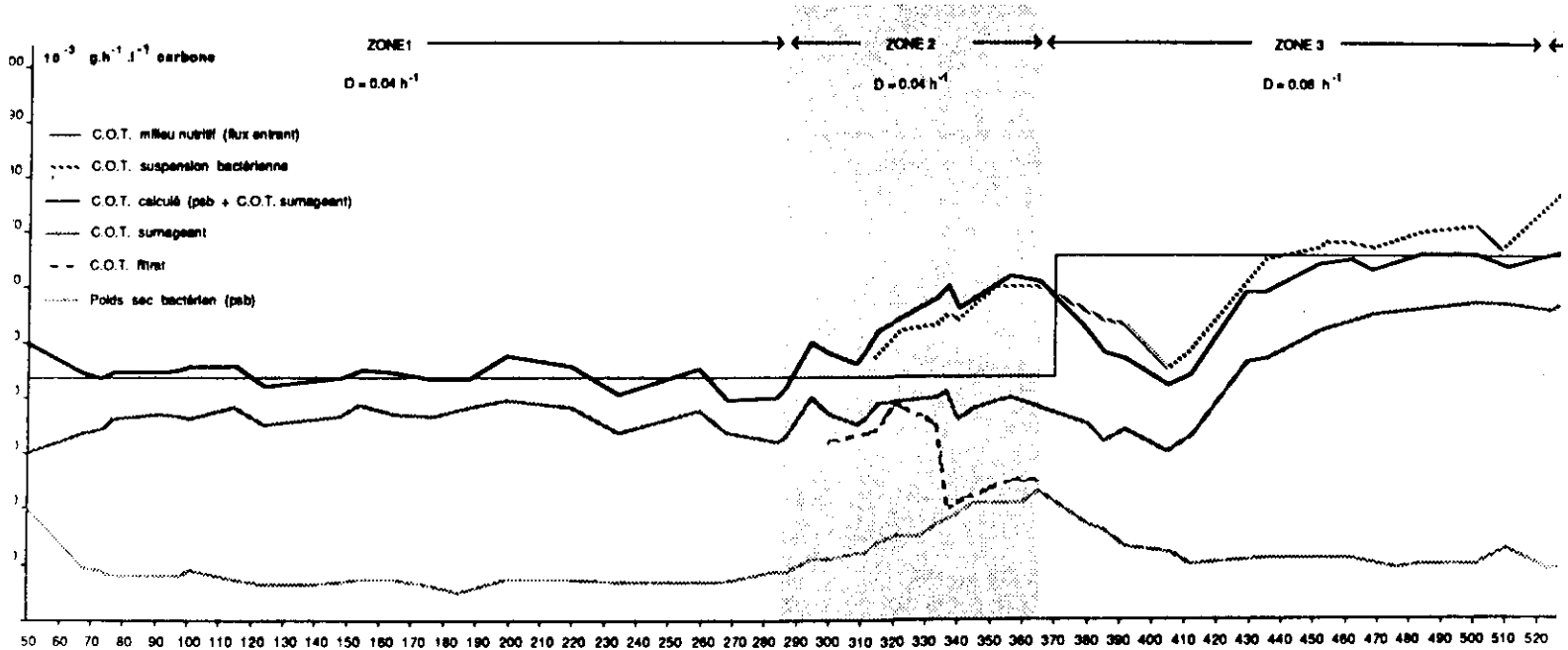


Figure 7 Culture en continu avec recyclage, à taux de dilution $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$ et $D = 0,06 \text{ h}^{-1}$. Bilans massiques en g de carbone $\text{h}^{-1} \text{ l}^{-1}$. Dosages de COT et du poids sec bactérien (psb).

REMERCIEMENTS

Ces recherches ont bénéficié de subventions de recherche du CNRS (PIRDES - URA 1130) et des Communautés Economiques Européennes (DG XII). Nous remercions vivement Mme BOYER pour sa contribution à la réalisation de cet article.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOLLINGER R., ZURRER H., BACHOFEN R., 1985. Photoproduction of molecular hydrogen from waste water of a sugar refinery by photosynthetic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 147-151.
- DELACHAPPELLE S., RENAUD M., VIGNAIS P.M., 1990. Etude de la production d'hydrogène en bioréacteur par la bactérie photosynthétique *Rhodobacter capsulatus*. 1 - Photobioréacteur et conditions optimales de production d'hydrogène. Sciences de l'eau (soumis pour publication).
- EIDELS L., PREISS J., 1970. Carbohydrate metabolism in *Rhodospseudomonas capsulata*: Enzyme, titers, glucose metabolism and polyglucose polymer synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 140, 75-89.
- JOUANNEAU Y., KELLEY B.C., BERLIER Y., LESPINAT P.A., VIGNAIS P.M., 1980. Continuous monitoring by mass spectrometry of H₂ production and recycling in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.*, 143, 628-636.
- JOUANNEAU Y., 1982. Etude de la fixation de l'azote et la photoproduction d'hydrogène chez la bactérie photosynthétique *Rhodospseudomonas capsulata*. Thèse de Doctorat d'Etat, Grenoble.
- JOUANNEAU Y., WILLISON J.C., COLBEAU A., HALLENBECK P.C., RIOLACCI C., VIGNAIS P.M., 1982. Enhancement of the photoproduction of H₂ by *Rhodospseudomonas capsulata*: optimization in continuous culture, role of uptake hydrogenase, genetic characterization and economic evaluation. In: Photochemical, Photoelectrochemical and Photobiological Processes (D.O. Hall and W. Patz, eds.), Solar Energy Research and Development in the European Community, Series D, vol. 1, 174-179. Reidel, Dordrecht.
- JOUANNEAU Y., WONG B., VIGNAIS P.M., 1985. Stimulation by light of nitrogenase synthesis in cells of *Rhodospseudomonas capsulata* growing in N-limited continuous cultures. *Biochim. Biophys. Acta*, 808, 149-155.
- JOUANNEAU Y., THIERRY J.P., VIGNAIS P.M., RENAUD M., 1986. Epuration et photoproduction d'hydrogène par des bactéries photosynthétiques. *Entropie*, 127, 18-19.
- KOBAYASHI M., 1976. Utilization and disposal of wastes by photosynthetic bacteria. In: Microbial Energy Conversion (H.G. Schlegel and J. Barnea, eds), 443-453. Goltze Verlag, Göttingen.
- KOBAYASHI M., FUJII K., SHIMAMOTO I., MAKI T., 1978. Treatment and re-use of industrial waste water by phototrophic bacteria. *Prog. Wat. Tech.*, 11, 279-284.
- LISSOLO T., LENON G., BERNARD A., VIGNAIS P.M., 1989. Use of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* for the treatment of waste waters from food industry. In: Photoconversion processes for energy and chemicals (D.O. Hall and G. Grassi, eds), 258-262. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- NORBERG A.B., ENFORS S.O., 1982. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1231-1237.

- SCHULTZ J.E., WEAVER P.F., 1982. Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.*, 149, 181-190.
- SOLAIMAN D., UFFEN R., 1982. Pyruvate-dependent diauxic growth of *Rhodospirillum rubrum* in light. *J. Bacteriol.*, 152, 1175-1187.
- STEVENS P., VAN DER SYPT H., DE VOS P., DE LEY P., 1983. Comparative study on H₂ evolution from DL-lactate acetate and butyrate by different strains of *Rhodopseudomonas capsulata* in a new type of reactor. *Biotechnol. Letters*, 5, 369-374.
- VIGNAIS P.M., COLBEAU A., WILLISON J.C., JOUANNEAU Y., 1985. Hydrogenase, Nitrogenase and Hydrogen Metabolism in the Photosynthetic Bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 26, 155-234.
- VINGENZINI M., BALLONI W., MANNELLI D., FLORENZANO G., 1981. A bioreactor for continuous treatment of waste waters with immobilized cells of photosynthetic bacteria. *Experientia*, 37, 710-711.
- VOELSKOW H., SCHON G., 1976. Pyruvate fermentation in *Rhodospirillum rubrum* and after transfer from aerobic to anaerobic conditions in the dark. *Archiv. Microbiol.*, 107, 87-92.
- VOELSKOW H., SCHON G., 1978. Pyruvate fermentation in light grown cells of *Rhodospirillum rubrum* during adaptation of anaerobic dark conditions. *Archiv. Microbiol.*, 119, 129-133.
- VOELSKOW H., SCHON G., 1980. H₂ production of *Rhodospirillum rubrum* during adaptation to anaerobic dark conditions. *Archiv. Microbiol.*, 125, 245-249.
- VOELSKOW H., SCHON G., 1981. Propionate formation in *Rhodospirillum rubrum* under anaerobic dark conditions. *All. Mikrobiol.*, 21, 545-553.
- WEAVER P.F., WALL J.D., GEST H., 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Archiv. Microbiol.*, 105, 207-216.
- WILLISON J.C., 1988. Pyruvate and acetate metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 2429-2439.
- ZURRER H., BACHOFEN R., 1979. Hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 789-793.
- ZURRER H., BACHOFEN R., 1981. Hydrogen production from lactate and lactate containing wastes by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Studies in Environmental Sciences*, 9, 31-36.