



Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia
e lo sviluppo economico sostenibile



Ministero dello Sviluppo Economico

RICERCA DI SISTEMA ELETTRICO

Valorizzazione bioenergetica di scarti agrozootecnici

Aliboni A., De Luca E., De Mei M., De Poli F., Fiocchetti F., Izzo G., Marone A., Massini G., Mentuccia L., Patriarca C., Rosa S., Sau S., Signorini A., Varrone C.

Report RdS/2012/304

VALORIZZAZIONE BIOENERGETICA DI SCARTI AGROZOOTECNICI

Aliboni A., De Luca E., De Mei M., De Poli F., Fiocchetti F., Izzo G., Marone A., Massini G., Mentuccia L., Patriarca C., Rosa S., Sau S., Signorini A., Varrone C.

Settembre 2012

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Studi sulla produzione elettrica locale da biomasse a scarti

Responsabile Progetto: Vito Pignatelli, ENEA

Ringraziamo gli studenti del laboratorio UTRINN BIO che con passione hanno collaborato allo svolgimento delle attività sperimentali ed alla organizzazione dei dati ottenuti: Vincenzo Sgulò, Simone Cinquepalmi, Angela Palumbo.

INDICE

Sommario	4
1. Introduzione	5
2. Attività svolta e risultati ottenuti	6
<i>2.1 Obiettivo A2.3: Sviluppo e ottimizzazione di sistemi di produzione del biogas</i>	6
2.1.1. Materiali e metodi	6
2.1.2. Caratterizzazione dei substrati	7
2.1.3 Caratterizzazione molecolare degli inoculi idrogeno produttori	7
2.1.3.1 Caratterizzazione dell'inoculo F ₂₁₀	8
2.1.3.2 Caratterizzazione dell'inoculo GM	12
2.1.4 Produzione di idrogeno: ottimizzazione statistica di mix di substrati	15
2.1.5 Produzione di metano: ottimizzazione del processo di digestione anaerobica	20
2.1.5.1 Potenziamento della produzione di metano dal liquame mediante inoculo di una comunità di idrogeno produttori	20
2.1.5.2 Produzione di metano da liquame: separazione delle fasi di idrogenogenesi e metanogenesi mediante variazione del pH	21
2.1.5.3 Evidenza sperimentale della presenza di una comunità di idrogeno produttori nel liquame	22
2.1.5.4 Scaling-up del processo di produzione di idrogeno e metano dal glicerolo.....	24
<i>2.2 Obiettivo A2.4: Studio di processi di DA innovativi in grado di utilizzare biomasse lignocellulosiche</i>	25
2.2.1 Idrolisi fungina in aerobiosi e produzione di idrogeno da scarti ligninici	25
2.2.2 Idrolisi batterica in anaerobiosi e produzione di idrogeno da scarti vegetali	26
<i>2.3 Obiettivo A.2.1: Studio e sperimentazione di metodi biologici per la purificazione del biogas</i>	31
Riferimenti bibliografici	37

Sommario

Le attività svolte in questi due anni di studio sull'ottimizzazione della digestione anaerobica (DA) hanno dimostrato che c'è ampio spazio per innovazione di processo e probabile sviluppo di nuove tecnologie nazionali se si affiancherà alla fase di laboratorio, una nuova fase di sperimentazione su scala pilota.

La strategia di ricerca che ha consentito di pervenire a questa affermazione è l'adozione di un approccio centrato sull'ecologia microbica e l'adozione di metodi sperimentali statistici per valutare la composizione dei substrati da porre in codigestione. La prima ha portato a dimostrare la validità dell'approccio biomimetico della separazione delle fasi del processo, mentre la seconda ha dimostrato che qualsiasi scarto organico opportunamente miscelato in codigestione può dare buone rese energetiche. I due approcci non sono indipendenti l'uno dall'altro ma strettamente collegati, in quanto qualsiasi scarto organico con un contenuto energetico potenziale troverà una opportuna valorizzazione se si troverà la giusta miscelazione di codigestione e la comunità microbica sintrofica più idonea ad operare nelle condizioni di separazione di fasi che meglio imitano le condizioni naturali. Questo può portare alla realizzazione di impianti di digestione polifasici, laddove è necessario per la complessità del substrato/scarto e ove la valutazione economica lo giustifichi. La sperimentazione sull'idrolisi di substrati ligno/cellulosici ha fin qui dimostrato che per la cellulosa c'è un'efficace idrolisi anaerobica nella stessa fase di idrogenogenesi, mentre per la lignina, l'esperimento con funghi in aerobiosi fa immaginare una fase di pretrattamento separata. Andrà in futuro approfondito lo studio di microfunghi anaerobi per verificare se si può attivare un efficace processo idrolitico nella fase idrogenogenica.

Anche per il "clean up" del biogas è stata intrapresa una strada innovativa che ha le sue fondamenta nella conoscenza dell'ecologia microbica. La capacità dei batteri anaerobi fotosintetici di trasformare i solfuri in zolfo elementare era ben nota, ma non si era ancora sperimentata un'applicazione industriale di questo processo. L'idea è nata dalla considerazione che il forte sviluppo dei led monocromatici ad alta efficienza può offrire una nuova conveniente applicazione biotecnologica da portare a prodotto industriale. La sperimentazione è in fase iniziale e va sicuramente continuata fino alla verifica costo/benefici del processo.

1. Introduzione

Scopo di questo studio sperimentale è stato “l’ottimizzazione” dei processi di produzione di digestione anaerobica (DA). Il termine ottimizzazione ha un significato molto ampio che nel nostro caso significa sviluppo del processo e delle tecnologie che servono a rendere il processo più efficiente e più produttivo in termini di resa energetica e “clean up” dell’intero ciclo dei prodotti e sottoprodotti.

Il processo di digestione anaerobica (DA) della sostanza organica può essere suddiviso in tre fasi: idrolisi, acidogenesi/acetogenesi con produzione di idrogeno e successiva metanogenesi.

E’ noto che l’idrogeno può costituire il substrato limitante per la metanogenesi [1] dal momento che sono pochi i microorganismi capaci di degradare l’acetato in metano e anidride carbonica rispetto a quelli in grado di usare l’idrogeno per la produzione di metano. Lo sviluppo della produzione di idrogeno costituisce quindi un nodo fondamentale nell’ottimizzazione dei sistemi di produzione di biogas.

Le attività in merito sono state avviate nel precedente anno di lavoro sui temi:

- identificazione dei principali parametri di esercizio di nuovi processi fermentativi basati su miscele di scarti dell’industria agro-zootecnica e dell’industria di produzione di biofuel;
- studio dei processi di digestione anaerobica innovativi per la digestione di biomasse lignocellulosiche;
- studi sulla degradazione biologica delle biomasse ligno-cellulosiche attraverso processi innovativi;
- studio e sperimentazione di metodi biologici per la purificazione del biogas

e sono proseguite nel secondo anno (obiettivo A2.3) con approccio innovativo, studiando e sperimentando il processo di digestione anaerobica nelle diverse fasi - idrolisi, acidogenesi/acetogenesi, metanogenesi - in processi a singolo e a doppio stadio. Il 90% degli impianti di biogas presenti in Europa è a singolo stadio [2] ma un numero crescente di ricerche mette in luce come il potenziamento della fase di idrogenogenesi avvantaggi la produzione di metano.

Le attività sono state svolte utilizzando i substrati selezionati nel primo anno ed è stata condotto uno studio applicando il metodo statistico sperimentale Mixture Design per definire le migliori proporzioni di substrati nelle miscele destinate alla produzione di idrogeno. A tale scopo è stato impiegato il nuovo software statistico della Camo, l’Unscrambler X, il quale, mediante la progettazione del piano sperimentale e l’analisi statistica multivariata, consente l’ottimizzazione statistica del processo.

Parallelamente a queste attività, mediante tecniche di biologia molecolare, sono stati caratterizzati i pool microbici fermentanti precedentemente selezionati nei laboratori ENEA anche al fine di individuare le migliori associazioni di questi con i substrati e miscele di substrati.

In collaborazione con l’Università della Tuscia, sono state condotte sperimentazioni sull’idrolisi della lignina (obiettivo A2.4) verificando l’efficacia di pretrattamenti fungini (white-rot) di materiale ligno-cellulosico per renderlo più fermentescibile nei confronti della produzione di idrogeno.

Una ulteriore linea di ricerca si è rivolta ai metodi biologici per la purificazione del biogas (obiettivo A2.1) studiando e sperimentando l’abbattimento dell’idrogeno solforato (H_2S) in esso contenuto mediante processo di fotosintesi anossigenica operato da solfobatteri. Per la crescita dei ceppi batterici sono state messe a punto tecniche colturali innovative utilizzando un illuminatore appositamente progettato e allestito (prototipo ENEA—UTRINN BIO) dotato di LED monocromatici in grado di emettere luce a specifiche lunghezze d’onda.

2. Attività svolta e risultati ottenuti

2.1 Obiettivo A2.3: Sviluppo e ottimizzazione di sistemi di produzione del biogas

2.1.1. Materiali e metodi

Substrati: sulla base dei risultati sperimentali del precedente anno sono stati selezionati ed utilizzati glicerolo grezzo, scotta (siero deproteinizzato) e liquame bufalino.

La determinazione dei solidi totali (TS), volatili (VS) e del COD dei substrati è stata effettuata secondo APHA, 2005 [3].

Quando necessario, i substrati sono stati sterilizzati (121°C 15 min) per eliminare la comunità microbica autoctona.

Inoculi: per le produzioni di idrogeno sono stati utilizzati due inoculi F₂₁₀ e GM. L'efficacia dell'inoculo F₂₁₀ nelle produzioni di idrogeno è stata verificata nel corso di altre attività sperimentali. L'inoculo F₂₁₀, derivante da sedimenti marino costieri e acclimatato su glucosio in un reattore in continuo (CSTR), è stato caratterizzato mediante tecniche di biologia molecolare ed i risultati sono presentati nel paragrafo 2.1.3 insieme al completamento della caratterizzazione dell'inoculo GM ottenuto per arricchimento su glicerolo grezzo.

Gli inoculi erano conservati a -20°C in glicerolo 30%, prima di ogni esperimento il pool microbico F₂₁₀ è stato riattivato in terreno BFM [4] in reattori batch da 590ml con un volume di lavoro di 250 ml e 1% di inoculo, incubato a 37° per 24 ore. Allo scadere delle 24 ore veniva misurata la produzione di biogas (ml) e la percentuale di idrogeno contenuta nel biogas al fine di valutare la corretta attivazione del pool microbico e quindi l'idoneità ad essere utilizzato come inoculo.

Allestimento esperimenti per la produzione di biogas: i substrati sono stati diluiti in acqua distillata e, se del caso, sterilizzati in autoclave. I contenitori chiusi ermeticamente sono stati insufflati con azoto (10 min) e inoculati (20% v/v). Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C in bagno termostato e con agitazione (120 rpm). Parte degli esperimenti, tra cui quelli relativi al Disegno Sperimentale, sono stati svolti utilizzando *batch* con un volume di fermentazione circa cinque volte superiore a quello degli esperimenti dello scorso anno.

Ad intervalli di tempo di 24 ore sono stati misurati il pH del liquido di coltura ed i prodotti della fermentazione, sia liquidi (HPLC) che gassosi (GC), secondo quanto descritto in seguito. Il biogas prodotto era misurato con la tecnica del *water displacement* [5].

Analisi dei metaboliti: i prodotti metabolici della fermentazione e della digestione anaerobica (acidi grassi volatili, acido lattico, alcoli) sono stati analizzati mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Thermo Spectrasystem P4000, equipaggiato con rilevatore UV ($\lambda = 210$ nm) e Indice di Rifrazione, utilizzando il metodo di analisi isocratica a 65°C con Colonna Rezex ROA Organic Acid H+ (8%) della Phenomenex, 300 x 7.8 mm, con particelle da 8 μ m, precolonna con cartucce Carbo-H (Phenomenex); fase mobile H₂SO₄ 5mN (flusso: 0.6 ml/min). I campioni liquidi sono stati diluiti 1:10 in H₂SO₄ 5mN, centrifugati a 5000 rpm per 10 minuti e filtrati (filtri con porosità 0.22 μ m) prima dell'iniezione in HPLC.

Analisi del biogas: la percentuale di H₂, CH₄ e CO₂ nel biogas prodotto è stata quantificata tramite l'utilizzo di un gascromatografo Thermo equipaggiato con colonna impaccata (Hayesep Q 800/100 mesh), rilevatore a conducibilità termica (TCD) e con l'azoto come *gas carrier* (30-35 ml/min). Le temperature di esercizio della colonna, iniettore e rivelatore erano rispettivamente di 120°C, 120°C e 200°C;

Calcolo delle produzioni cumulative: la produzione cumulativa di H₂, CH₄ è stata calcolata utilizzando l'equazione, "Eq. (1)", di bilancio di massa [6]:

$$V_{H,i} = V_{H,i-1} + C_{H,i} (V_{G,i} - V_{G,i-1}) + V_H (C_{H,i} - C_{H,i-1}) \quad (1)$$

Dove $V_{H,i}$ e $V_{H,i-1}$ sono i volumi di gas cumulativi agli intervalli di tempo in corso (i) e quelli precedenti (i-1), rispettivamente. $V_{G,i}$ e $V_{G,i-1}$ sono i volumi del biogas totale prodotto e $C_{H,i}$ e $C_{H,i-1}$ sono le frazioni di H_2 agli intervalli di tempo in corso e quello immediatamente precedente, rispettivamente. V_H è il volume totale dello spazio testa nel reattore.

2.1.2. Caratterizzazione dei substrati

I substrati utilizzati in questa sperimentazione sono tipici scarti industriali e zootecnici destinati allo smaltimento con costi alti e problematiche ambientali di non facile soluzione. In tabella 1 vengono riportate le principali caratteristiche chimico-fisiche dei substrati utilizzati.

Tab.1 Range dei principali parametri chimico-fisici dei substrati utilizzati

Parametri	COD	TS	VS	Potere calorifico	densità	pH
	g O ₂ /g TS	TS% tq	VS% tq	kJ/g TS	g/ml	
Glicerolo	1,05-1,39	91,8-96,1	86,6-91,4	14,90	1,28-1,33	6,39
Scotta	0,588-1,17	5,16-6,22	4,49-6,7	6,83-16,64	1,007-1,037	4,5-6,46
Liquame	0,44-0,94	0,95-2,67	0,7-2,06	6,26-13,32	0,988-1,014	6,7-7,16

Glicerolo – è un sottoprodotto nella transesterificazione degli acidi grassi nella produzione di biodiesel; a causa dell'incremento delle produzioni la sua disponibilità è in continuo aumento con conseguente deprezzamento del prodotto. E' stato fornito dalla Casa Olearia di Monopoli (Bari) che possiede un impianto di trasformazione di oli vegetali ed una centrale elettrica ad oli combustibili.

Scotta – è costituita da siero di latte deproteinizzato ed è lo scarto ultimo delle produzioni casearie. Esce dalla filiera produttiva ad una temperatura di 90-100°C ed il suo smaltimento incide significativamente sui costi di produzione. La scotta è stata fornita da Formaggi Boccea s.r.l Roma. La produzione giornaliera dell'azienda si attesta intorno a 80-90 q al giorno.

Liquame bufalino – è stato prelevato presso gli allevamenti del Centro Ricerche per l'Agricoltura (C.R.A.) di Montelibretti Roma. Il liquame veniva raccolto dalla vasca di raccolta prossima alle stalle dopo circa 10' di funzionamento delle pompe al fine di omogeneizzare il materiale.

2.1.3 Caratterizzazione molecolare degli inoculi idrogeno produttori

Premessa

La seguente linea di attività riguarda la caratterizzazione della struttura e della diversità delle comunità microbiche presenti in inoculi selezionati provenienti da un fango di depurazione (GM) e da un fango marino costiero (F₂₁₀), ed utilizzati, rispettivamente, per fermentazioni anaerobiche di glicerolo grezzo ed altre tipologie di biomasse (principalmente liquame bufalino e scotta) in condizioni di mesofilia. L'identificazione delle comunità microbiche coinvolte nei processi di fermentazione anaerobica di substrati complessi rappresenta un passaggio importante per descrivere le interazioni tra i diversi gruppi e le rispettive funzioni all'interno del consorzio ed ha lo scopo di ottimizzare l'intero processo.

L'inoculo GM è stato ottenuto da un fango di depurazione con un procedimento di arricchimenti successivi per selezionare i microorganismi in grado di fermentare in condizioni anaerobiche il glicerolo grezzo (prodotto come scarto nella produzione di biodiesel) e senza l'utilizzo di altre fonti di carbonio.

L'inoculo F₂₁₀ è stato selezionato da sedimenti marini costieri per acclimatazione in un processo di produzione di idrogeno in un reattore con agitazione in continuo (CSTR), utilizzando il glucosio come substrato.

Gli inoculi GM e F₂₁₀ sono stati caratterizzati tramite la costruzione delle rispettive librerie genetiche, utilizzando i geni che codificano per l'rRNA ribosomale 16S (16S rDNA) come marker molecolare.

Una libreria genetica consiste nell'inserimento del *pool* di frammenti del 16S rDNA amplificati tramite PCR in un plasmide idoneo caratterizzato da un sito di clonaggio provvisto di marcatori genetici, la cui presenza o assenza permette di selezionare le cellule batteriche trasformate con il plasmide (resistenze ad antibiotici o marcatori nutrizionali). I plasmidi ricombinanti, contenenti cioè ogni singolo frammento di DNA, sono inseriti all'interno di un ceppo batterico idoneo (ceppo trasformato) che è seminato su un terreno agarizzato contenente l'agente selettivo. Le colonie positive sono isolate e sottoposte ad estrazione del DNA plasmidico, utilizzato per le analisi di restrizione e di sequenziamento nelle fasi successive della caratterizzazione.

Attività pregressa ed avanzamento del lavoro

Nel corso delle attività già svolte [7], è stata isolata la libreria genetica dell'inoculo GM e con il proseguimento dell'attività i cloni isolati sono stati identificati allo scopo di definire la struttura e la composizione della comunità microbica.

L'inoculo F₂₁₀ era stato precedentemente caratterizzato presso l'Università della Tuscia con un altro metodo di *fingerprint* molecolare, la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), che aveva rilevato la presenza di organismi appartenenti al genere *Clostridium*. Con il proseguimento delle attività è stato svolto il lavoro sperimentale per la costruzione della libreria genetica.

2.1.3.1 Caratterizzazione dell'inoculo F₂₁₀

Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dall'inoculo F₂₁₀ ha seguito il seguente protocollo sperimentale: 1 ml di sospensione batterica prelevata nel corso della riattivazione dell'inoculo congelato è stata centrifugata (5 min, 3000g) ed i pellets ottenuti sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo. Successivamente, dopo il lavaggio dei pellets con soluzione salina (PBS buffer), si è proceduto all'estrazione del DNA utilizzando il kit commerciale: Bacterial & yeast genomic DNA purification kit dell'EURX (forniti dalla ditta Carlilbiotech) e applicando il protocollo operativo consigliato.

Amplificazione del gene 16S rDNA

Per ottenere una buona efficienza di trasformazione e quindi un elevato numero di colonie trasformate è importante che la reazione di PCR produca frammenti definiti e specifici. Il DNA genomico purificato dell'inoculo F₂₁₀ è stato amplificato utilizzando i *primers* universali per Eubatteri 27f (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492r (5' CTACGGCTACCTTGTTACGA 3') per ottenere i frammenti 16S rDNA di circa 1450 bp, corrispondenti alla sequenza del quasi intero gene batterico, usando il kit commerciale Perpetual taq PCR Master Mix dell'EURx, fornito dalla ditta Carli Biotech. Il protocollo finale di amplificazione, selezionato in seguito a diverse prove sperimentali, è stato il seguente:

denaturazione : 95°C -2 minuti

poi 25 cicli:

denaturazione : 95°C - 30 secondi

annealing : 55°C - 30 secondi

estensione : 72°C – 1.40 minuti

1 ciclo :

estensione finale : 72°C - 10 minuti

Per ogni reazione (50 µl) sono stati amplificati 15 ng di DNA in una mix contenente 1,25 U di Taq polimerasi, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM di ogni nucleotide, 0,2 µM di ogni *primers*.

Il ciclo di estensione finale ha permesso l'aggiunta ai frammenti amplificati delle adenine (A) sporgenti all'estremità 3' necessarie per il successivo clonaggio.

Cinque reazioni di PCR indipendenti sono state unite prima di procedere al clonaggio.

Libreria genetica

Il clonaggio dei frammenti di 1450 bp amplificati tramite PCR è stato effettuato con il kit TOPO TA cloning® (Invitrogen). Il vettore pCR®2.1-TOPO è fornito linearizzato con singole timine (T) sporgenti all'estremità 3' a cui è legata la topoisomerasi I di *Vaccinia virus*, e consente di clonare in un passaggio i prodotti di PCR attraverso l'*annealing* delle A terminali del frammento con le T del vettore e l'azione della topoisomerasi. Il sito di clonaggio è inserito tra il promotore *Plac* ed il gene *lacZα* per consentire la selezione delle colonie che sono state trasformate dal solo vettore (vettore non ricombinante, colonie blu) o dal vettore con il frammento inserito (vettore ricombinante, colonie bianche) mediante saggio colorimetrico su piastra di agar contenente il substrato X-gal, ed è fiancheggiato dalle sequenze *forward* e *reverse* di priming per M13 e da siti di taglio per diversi enzimi di restrizione.

La reazione di clonaggio è stata svolta seguendo le relative istruzioni, e, parallelamente, con un campione di controllo : a 3,5 µl di miscela dei frammenti di 1450 bp amplificati (2µl di acqua sterile per il controllo), sono stati aggiunti 1 µl di vettore pCR®2.1-TOPO, 1 µl di *salt solution* e si è effettuata l'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente. 2 µl di questo prodotto sono stati sufficienti per trasformare 100 µl di cellule batteriche competenti Top10. Tre diverse concentrazioni (40 µl, 20 µl, 10 µl) di queste ultime sono state seminate su piastre di agar addizionate con kanamicina (50 µg/ml) e precedentemente trattate con X-gal (40 mg/ml) e preriscaldate a 37°C. Le piastre sono state incubate a 37°C per una notte.

150 cloni positivi (colonie bianche) sono stati isolati, trasferiti in coltura di terreno LB addizionato con kanamicina (50 µg/ml) e lasciati crescere a 37°C per 24 ore. Successivamente 2 ml della coltura sono stati centrifugati per procedere con l'estrazione del plasmide, ed il resto è stato congelato in 15%glicerolo e conservato a -80°C.

Estrazione dei plasmidi e PCR- ARDRA

Dopo l'isolamento dei cloni, si è reso necessario effettuare lo *screening* dei vettori ricombinanti. E' stata effettuata l'estrazione dei plasmidi utilizzando il kit commerciale dell'EURx (fornito dalla ditta CarliBiotech) seguendo il protocollo operativo e si è proceduto alla loro caratterizzazione tramite l' Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA). L'ARDRA consiste nella digestione enzimatica dei frammenti 16S rDNA nuovamente amplificati dal plasmide purificato con la coppia dei primers 27f/1492r e nella successiva analisi dei *patterns* di restrizione su gel di agarosio. I cloni che producono lo stesso profilo di restrizione costituiscono una singola Operational Taxonomic Unit (OTU). Sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione *RsaI*, *MboI* e *HaeIII*, prodotti dall'EURx (forniti dalla ditta CarliBiotech), tutti con siti di taglio tetramerici, in reazioni di digestione con gli enzimi singoli ed in combinazione tra loro.

La reazione di PCR è stata svolta con 3ng di plasmide e applicando le stesse condizioni descritte sopra. 10 µl di reazione di PCR sono stati incubati con 3U di ogni enzima ed incubati a 37°C overnight.

2 µl di ogni campione digerito sono stati separati su gel di agarosio al 2%, corso a 90V in TBE per 2.30 ore e successivamente colorato con SYBR green (Invitrogen).

Sequenziamento ed analisi filogenetica

Per ogni singola OTU è stato sequenziato il 50% dei cloni, utilizzando i primers del vettore di clonaggio M13f e M13r allo scopo di ottenere le sequenze di entrambi i filamenti del frammento 16S rDNA. Il sequenziamento dei frammenti è stato eseguito con l'analizzatore ABI 3730 DNA analyzer presso i laboratori del servizio Genechron (CR ENEA-Casaccia).

Le sequenze dei DNA generati ottenuti dagli inoculi GM e F₂₁₀ sono state assemblate allineando le sequenze del forward e del reverse utilizzando il programma Clustal X (versione 2.0) e gli allineamenti sono stati corretti a mano utilizzando il programma Chromas Pro (versione 1.5). Le sequenze risultanti sono state comparate con il database del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizzando il software BLAST-*nucleotide* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), mentre la classificazione filogenetica è stata svolta utilizzando l'RDP classifier del database Ribosomal Database project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Le relazioni filogenetiche tra le sequenze ottenute dalle librerie genetiche degli inoculi GM e F₂₁₀ e le sequenze di riferimento di maggiore omologia sono state messe in evidenza mediante la costruzione di alberi filogenetici utilizzando il software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA, versione 5). Gli alberi filogenetici sono stati ottenuti utilizzando l'algoritmo Neighbor-joining (NJ) [8] e la matrice di distanza Kimura2 [9]. La robustezza degli alberi ottenuti è stata verificata con l'analisi statistica del *bootstrap* applicata a 1000 repliche.

Libreria genetica dell'inoculo F₂₁₀

Per caratterizzare l'inoculo F₂₁₀, selezionato da sedimenti marini costieri dopo 210 ore di acclimatazione su glucosio, è stata isolata la libreria genetica dei cloni contenenti il frammento di 1450 bp del 16S rDNA. Sono stati isolati 150 cloni che sono stati sottoposti allo screening tramite la metodica ARDRA allo scopo di limitare il successivo sequenziamento ad un numero limitato di OTUs (Operational Taxonomic Unit). L'ARDRA consiste nell'analisi del profilo elettroforetico ottenuto dai frammenti amplificati dai plasmidi isolati con la coppia dei primers 27f/1492r. Per ottimizzare la metodica sono state svolte diverse prove preliminari con quattro cloni rappresentativi utilizzando gli enzimi di restrizione RsaI, MboI e HaeIII singolarmente ed in combinazione tra loro. La migliore capacità discriminante è stata ottenuta utilizzando in combinazione gli enzimi HaeIII + RsaI.

La figura 1 mostra un gel di agarosio con alcuni profili enzimatici rappresentativi.



Fig.1 Gel di agarosio al 2% che mostra l'ARDRA di 14 cloni isolati dalla libreria genetica dell'inoculo F₂₁₀
 lane a: *marker* Perfect Ladder (EURx) (1500bp,1000bp,900bp,800bp,700bp,600bp,500 bp,400bp,300bp,200bp,100bp);
 lane b-q : profili di restrizione dei frammenti di 1450 bp amplificati dai cloni F₂₁₀ con i primers 27f/1492r e digeriti con HaeIII + RsaI.

L'analisi ARDRA ha permesso di suddividere i 150 cloni della libreria F₂₁₀ in quattro OTUs (A, B, C, D) all'interno delle quali si è distribuito il 96% dei cloni e cinque OTUs secondarie rappresentate da singole sequenze (4% in totale). Il 50% delle sequenze 16S rDNA dei cloni all'interno di ogni OTUs sono state sequenziate ed elaborate; le sequenze delle OTUs secondarie sono risultate di qualità non buona e quindi escluse dalle successive valutazioni. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 2.

Tab 2 Affiliazione filogenetica delle OTUs identificate nell'inoculo F₂₁₀

OTUs	Closest relatives	n.o accessione	identità °	relazione filogenetica*			abbondanza ⁺ (%)
				Ordine	Famiglia	Genere	
F210-A	Uncultured gammaproteobacteria clone OTU-9_BBA	JN981929	99%	<i>Enterobacteriales</i> [100%]	<i>Enterobacteriaceae</i> [100%]	<i>Enterobacter</i> [67%]	7,33
F210-B1	<i>Enterobacter</i> sp. B2-3	HQ189499	99%	<i>Enterobacteriales</i> [100%]	<i>Enterobacteriaceae</i> [100%]	<i>Enterobacter</i> [100%]	48,00
F210-B2	<i>Enterobacter</i> sp. FC99	JF772097	99%	<i>Enterobacteriales</i> [100%]	<i>Enterobacteriaceae</i> [100%]		
F210-C	<i>Clostridium butyricum</i> NCIMB8082	X68178	99%	<i>Clostridiales</i> [100%]	<i>Clostridiaceae</i> [100%]	<i>Clostridium</i> sensu stricto [100%]	23,33
F210-D1	<i>Clostridium bifermentans</i> strain JCM1386 AB618787	EF052864	99%	<i>Clostridiales</i> [100%]	<i>Peptostreptococcaceae</i> e [100%]	<i>Clostridium</i> cluster XI [100%]	17,33
F210-D2	<i>Clostridium</i> sp. zx5	EF052864	99%	<i>Clostridiales</i> [100%]	<i>Peptostreptococcaceae</i> e [100%]		

° Similarità tra le sequenze 16S rDNA della libreria F₂₁₀ e le sequenze presenti nel NCBI database

* Classificazione filogenetica delle sequenze 16S rDNA della libreria F₂₁₀ condotta con l' RDP Classification Algorithm. Sono riportati i valori di confidenza di bootstrap (la classificazione è ben supportata da valori >80%)

+ % di cloni F₂₁₀ affiliati a livello di genere all'interno di ogni OTUs

Le comunità microbiche dell'inoculo F₂₁₀ sono distribuite in due ordini principali: *Enterobacteriales* (phylum: *Gammaproteobacteria* - 55.33% dei cloni isolati) e *Clostridiales* (phylum: *Firmicutes* - 37.66%).

All'interno del primo, si distinguono due differenti OTUs : F₂₁₀-A e F₂₁₀-B entrambe affiliate con la famiglia delle *Enterobacteriaceae* e il genere *Enterobacter*. La OTU F₂₁₀-A è risultata correlata, con una similarità del 99%, con un batterio incultivabile (Uncultured proteobacteria clone OTU-9_BBA) e, considerando l'affiliazione a livello di genere non significativa (67%), si può ipotizzare che questa OTU identifichi un *taxa* non conosciuto.

La OTU F₂₁₀-B, risultata dominante nell'intera comunità microbica (48% dei cloni), si suddivide in due sottoclassi in conseguenza della diversa omologia con le rispettive sequenze di *Enterobacter*: la OTU F₂₁₀-B1 omologa alla specie B2-3 e la OTU F₂₁₀-B2 omologa alla specie FC99 (99% in entrambe i casi).

L'identificazione di *Enterobacter* spp. nella comunità microbica dell'inoculo F₂₁₀ non è sorprendente considerando che all'interno di questo genere sono compresi numerosi organismi caratterizzati per la capacità di produrre idrogeno attraverso la fermentazione anaerobica del glucosio e di altri zuccheri pentosi e disaccaridi [10].

All'ordine *Clostridiales* appartengono due OTUs: F₂₁₀-C e F₂₁₀-D corrispondenti, rispettivamente, alla famiglia *Clostridiaceae* e *Peptostreptococcaceae*. La OTU C, affiliata al genere *Clostridium*, è risultata strettamente correlata (99%) a *C. butyricum*, mentre la OTU D, affiliata al genere *Clostridium* cluster XI, si suddivide in due sottoclassi D1 e D2 omologhe, rispettivamente, a *C. bifermentans* e *C. sp. zx5*.

Il genere *Clostridium* comprende un gran numero di specie batteriche isolate dagli ambienti più diversi. Il genere non forma un gruppo monofiletico e include, oltre il genere *Clostridium* in sensu stricto (cluster I) diversi gruppi filogenetici e ben caratterizzati come produttori di idrogeno da diversi substrati organici [11]. Le informazioni ottenute dall'analisi della libreria genetica dell'inoculo F₂₁₀, hanno evidenziato una struttura della comunità microbica ben definita e costituita da due componenti ben differenziate di batteri idrogeno produttori appartenenti al genere *Enterobacter*, anaerobi facoltativi, e al genere *Clostridium*, anaerobi obbligati e con la proprietà di formare spore resistenti al calore. Questa struttura rappresenta un prototipo di consorzio microbico, così come evidenziato da Hung [12], secondo il quale *Enterobacter* provvede a rimuovere l'ossigeno che può essere introdotto nel bioreattore e a creare l'ambiente anossico ideale e necessario per la fermentazione da parte di *Clostridium*.

I sedimenti marini costieri, da cui l'inoculo F₂₁₀ è derivato, non sono stati sottoposti ad alcun trattamento prima di procedere all'innesto del bioreattore CSTR. L'acclimatazione dell'inoculo, avvenuta in seguito a 210 ore di produzione di idrogeno, è anche supportata da buone rese di produzione stabile del biogas con la formazione di acido acetico e di acido butirrico come metaboliti solubili prodotti dalla fermentazione (dati non mostrati).

Inoltre, l'uso della tecnica del clonaggio e dell'analisi della libreria genetica ha consentito una caratterizzazione più completa dell'inoculo F₂₁₀ rispetto a quella ottenuta precedentemente [7] che aveva individuato, tramite la DGGE, solamente la comunità di Clostridi.

2.1.3.2 Caratterizzazione dell'inoculo GM

Analisi della comunità microbica dell'inoculo GM

L'inoculo GM è stato selezionato da un fango attivo attraverso una procedura di arricchimento stringente e diretta sul substrato (glicerolo grezzo) e senza l'aggiunta di altre fonti di carbonio; successivamente, è stato utilizzato per ottimizzare la fermentazione anaerobica di diversi tipologie di glicerolo [14; 15].

Dalla libreria genetica dell'inoculo GM sono stati isolati 102 cloni contenenti il frammento di 1350bp del gene 16S rDNA. 90 cloni hanno prodotto sequenze di ottima qualità che hanno mostrato una alta similarità (identità ≥99%) con le sequenze presenti nel database NCBI (Tab 3).

Tab. 3 Similarità tra le sequenze della libreria GM e le sequenze presenti nel NCBI database

No cloni	Abbondanza (%)	Closest relative	no. accessione	Similarità (%)
10	11.11	<i>Klebsiella</i> sp. ANctcri2	HQ286642	99-100
3	3.33	Uncultured <i>Klebsiella</i> sp. clone F5feb.43	GQ416012	99
3	3.33	Uncultured <i>Klebsiella</i> sp. clone SL08	HQ264068	99
5	5.56	<i>klebsiella pneumoniae</i> KCTC2242	CP002910	99
17	18.89	Uncultured bacterium clone 16slp87-10f02.w2k	GQ158955	99-100
1	1.11	<i>klebsiella</i> sp.A18-1 strain A18-1	AB244431	100
1	1.11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain SF5	JF489150	99
4	4.44	Uncultured <i>Klebsiella</i> sp. Clone F5feb.60	GQ416029	99-100
2	2.22	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae NTUH-K2044	AP006725	99
2	2.22	Uncultured bacterium clone ncd1468d11c1	JF118845	99
1	1.11	uncultured bacterium clone ncd1413a11c1	JF122956	99
1	1.11	<i>Klebsiella</i> sp. VITPGP5AA	HM462444	100
2	2.22	Uncultured bacterium clone 16slp87-10d05.p1k	GQ158941	99
5	5.56	<i>Escherichia coli</i> O7:K1 str. CE10	CP003034	99
9	10.00	<i>Escherichia coli</i> UMNK88	CP002729	99
2	2.22	<i>Escherichia coli</i> O111:H	AP010960	99-100
6	6.67	<i>Escherichia coli</i> W	CP002185	99-100
1	1.11	<i>Escherichia coli</i> UM146	CP002167	99
6	6.67	<i>Shigella sonnei</i> strain FBD025	EU009199	99
9	10.00	<i>Cupriavidus metallidurans</i> NBRC-101272	AB681431	99-100

Tutte le sequenze sono risultate filogeneticamente classificabili, a livello di ordine, famiglia e genere con un livello di confidenza affidabile e compreso tra 95-100% (Tab 4).

Tab.4 Classificazione filogenetica delle sequenze della libreria GM

Affiliazione filogenetica*				Gruppi filogenetici ^o
Classe	Ordine	Famiglia	Genere	%
<i>Gamma proteobacteria</i> 100%	<i>Enterobacteriales</i> 100%	<i>Enterobacteriaceae</i> 100%	<i>Klebsiella</i> 99-100%	57.78
			<i>Escherichia</i> 95-100%	25,56
			<i>Shigella</i> 100%	6.67
<i>Beta proteobacteria</i> 100%	<i>Burkholderiales</i> 100%	<i>Burkholderiaceae</i> 100%	<i>Cupriavidus</i> 100%	10.00

*la classificazione è stata ottenuta con l' RDP Classification Algorithm. Sono riportati i valori di confidenza di bootstrap (la classificazione è ben supportata da valori >80%).

^o % di cloni GM affiliati a livello di genere

Le sequenze del genere *Klebsiella* hanno mostrato una elevata omologia, compresa tra 99%-100%, con diverse specie (Tab.4) e trentuno sequenze sono risultate *uncultured* (59.61% di tutte le sequenze *Klebsiella*). Tra le diverse specie rilevate, otto sequenze (15.38%) sono state identificate come *K.pneumoniae*, e dieci (19.23%) come *K. ANctcri2*. Le rimanenti sequenze (1.73%/ognuna) sono state affiliate alle specie *K. GBK1*, *K. A18-1* e *K. VITPGP5AA*.

I cloni appartenenti al genere *Escherichia/Shigella* sono stati correlati alle specie *E. coli* (79.31%) e *S. sonnei* (18.76%). All'interno della classe dei *Betaproteobatteri* (10% dei cloni GM) è stato identificato il genere *Cupriavidus* appartenente alla famiglia delle *Burkholderiaceae*. Tutte le sequenze sono state identificate come *C. metallidurans*.

L'albero filogenetico ottenuto con il metodo del Neighbor-joining (NJ) è mostrato in figura 2. I cloni GM sono distribuiti in 3 clusters (*Klebsiella*, *Escherichia/Shigella* e *Cupriavidus*) ognuno corrispondente al genere identificato all'interno della comunità microbica.

La struttura così evidenziata, rappresenta anche i tre gruppi funzionali dell'inoculo GM coinvolti nel metabolismo anaerobico del glicerolo e nella produzione di idrogeno. Le comunità dominanti *Klebsiella* spp. ed *Escherichia* spp. sono direttamente coinvolte nella produzione di idrogeno. Evidenze sperimentali indicano che diversi ceppi di *K. pneumoniae* sono in grado di fermentare anaerobicamente sia il glicerolo [16] che il glicerolo grezzo [17], mentre i dati che riguardano la produzione di idrogeno da glicerolo [18] e da glicerolo derivato da biodiesel utilizzano ceppi puri [19; 20] e, più raramente, consorzi microbici [10; 21]. Analogamente, diversi ceppi di *E. coli* sono stati utilizzati per la fermentazione anaerobica del glicerolo e del glicerolo grezzo in colture singole e il più delle volte [22; 23] per migliorare l'efficienza di produzione di idrogeno. Il ruolo svolto da *S.sonnei* e da *C.metallidurans* all'interno della comunità microbica ai fini della produzione di idrogeno è meno chiaro.

S.sonnei, il clone con la minore percentuale di gruppi filogenetici dell'intero consorzio, non sembra possedere caratteristiche metaboliche funzionali alla fermentazione anaerobica del glicerolo grezzo. D'altra parte, la sua presenza non è sorprendente se si considera l'origine dell'inoculo GM, e, al momento, si può pensare che *Shigella* sopravviva nella comunità senza svolgere alcun ruolo particolare ai fini della produzione di idrogeno.

C. metallidurans è un batterio versatile, resistente ai metalli, metilotrofo e chemiolitoautotrofo [24; 25]. Di conseguenza, *C. metallidurans* può svolgere una funzione detossificante del substrato, degradando il metanolo presente nel glicerolo grezzo, ma, all'opposto, può anche consumare l'idrogeno e i metaboliti prodotti nel corso della fermentazione, svolgendo un ruolo antagonista ai batteri produttori di idrogeno.

Per approfondire e chiarire il ruolo dei diversi gruppi filogenetici rilevati nell'inoculo GM, sono in corso ulteriori prove seguendo due approcci sperimentali:

- la diluizione dell'inoculo, fino a raggiungere la massima diluizione che conservi la sua 'funzionalità' e, parallelamente, la caratterizzazione molecolare delle diverse fasi di diluizione;
- la ricostruzione dell'inoculo GM, assemblando i diversi ceppi isolati e la valutazione dei parametri di fermentazione al variare della composizione dell'inoculo .

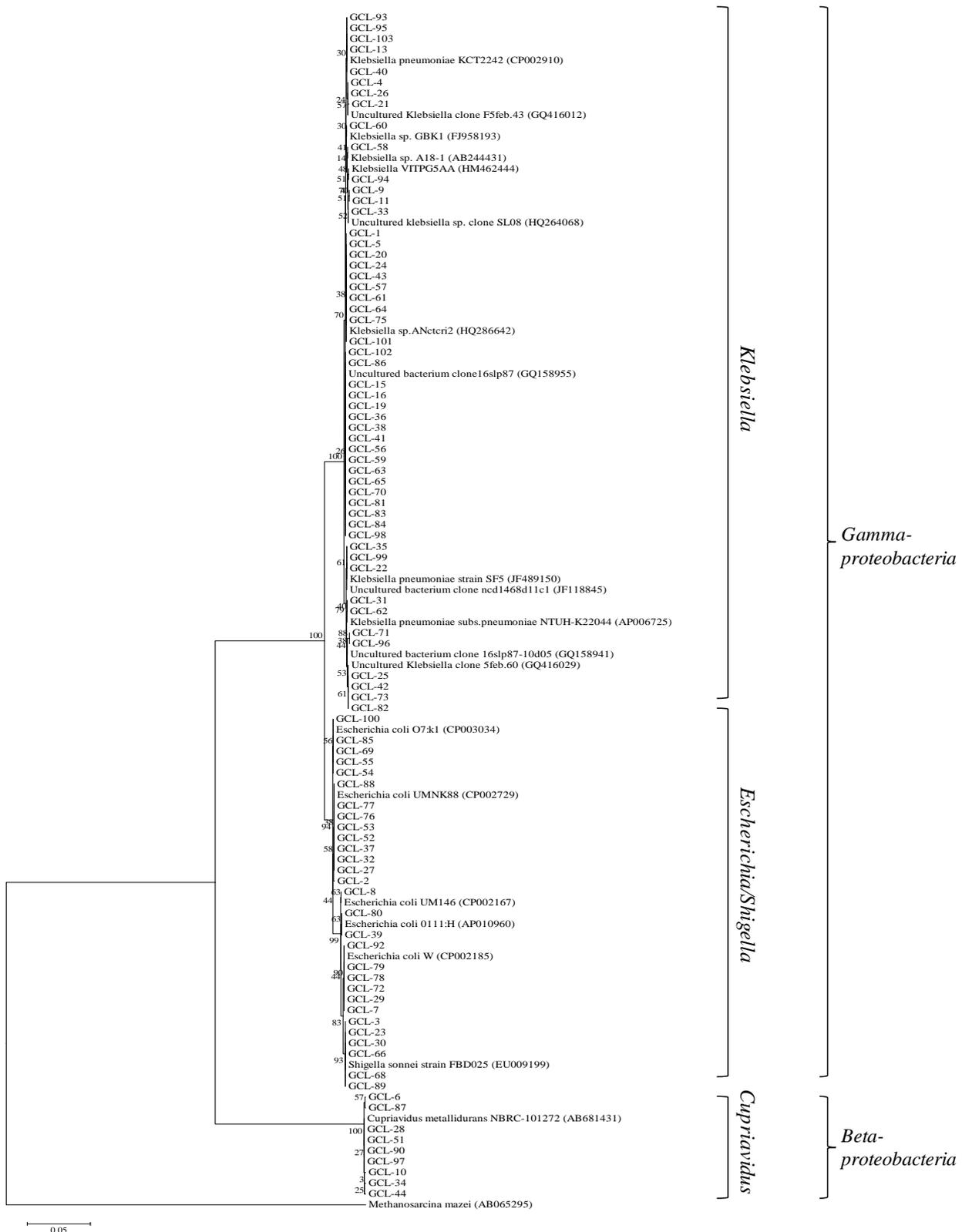


Fig 2 Albero filogenetico che mostra le relazioni tra le sequenze isolate dalla libreria GM (GCL-) con le sequenze di maggiore omologia scaricate da GenBank (i numeri in parentesi indicano gli *accession number*). L'albero è stato ruotato con l'inserimento di *Methanosarcina mazei* come *outgroup*. La barra indica una divergenza di sequenza del 5%.

Le sequenze 16S rDNA dell'inoculo GM sono state depositate in GenBank con gli *accession number*: JX310739-JX310754 e JX416353- JX416361.

Conclusioni

E' ormai riconosciuto che la più efficiente produzione di idrogeno e metano da biomasse complesse si ottiene con l'utilizzo di consorzi microbici, piuttosto che di colture singole. Infatti, le colture miste possiedono *pathway* metabolici diversi che, interagendo e/o complementandosi (sinergia e sintrofismo), favoriscono la degradazione dei substrati aumentando, di conseguenza, il flusso di metaboliti coinvolti nella produzione di idrogeno. L'ottimizzazione del processo di fermentazione richiede, quindi, l'uso di un inoculo idoneo, nel senso sopra descritto, al substrato. Generalmente, per selezionare gli inoculi si ricorre a diverse procedure che prevedono trattamenti chimici e fisici [26]. Nella nostra esperienza, abbiamo usato l'arricchimento come procedura di selezione dell'inoculo GM e di acclimatazione per l'inoculo F_{210} , senza ricorrere ad alcun tipo di pretrattamento ma indirizzando la modalità di selezione alla finalità di uso dell'inoculo.

GM è stato selezionato dal fango attivo e arricchito direttamente sul glicerolo grezzo, il 'suo' substrato: ne è risultato un inoculo specializzato nella fermentazione del glicerolo grezzo con una comunità microbica che coopera metabolicamente a tale fine, ma meno efficiente nella fermentazione di altri substrati [1]. L'inoculo F_{210} è stato selezionato da sedimenti marini in un bioreattore CSTR in seguito all'acclimatazione sul glucosio, un substrato più generico e meno complesso. Ne è derivato un inoculo più versatile, con una comunità microbica adattabile alla fermentazione di scarti industriali e zootecnici, come riportato nella presente relazione, ma meno efficiente nella fermentazione del glicerolo grezzo, rispetto al solo inoculo GM.

2.1.4 Produzione di idrogeno: ottimizzazione statistica di mix di substrati

Uno degli obiettivi prefissati da questa ricerca è stato quello di effettuare un'ottimizzazione statistica della composizione dei substrati per la produzione di idrogeno. A tale scopo è stato impiegato il nuovo software statistico della Camo, l'Unscrambler X. Questo software consente, attraverso la progettazione del piano sperimentale e l'analisi statistica multivariata, l'ottimizzazione statistica del processo, nel nostro caso per la produzione di idrogeno. L'uso di questi nuovi metodi di ottimizzazione statistica applicato alle biotecnologie sembra essere molto promettente, e può portare ad un incremento delle rese di produzione di idrogeno prossime al 100% [4].

Il disegno sperimentale serve principalmente a definire le variabili più importanti di un processo, valutare se ci sono interazioni tra le variabili, ottenere la massima informazione con il minimo costo (minor numero di esperimenti possibili, per la massima informazione), definire le superfici di risposta ottimali, definire la zona stabile di un processo e costruire un buon set di calibrazione/validazione per costruire un modello predittivo. Esistono diversi modelli statistici (ad es. il Plakett-Burman Screening Design, Box-Behnken Optimization Design, Central Composit Design, etc), che vanno scelti in funzione del processo che si vuole studiare ed ottimizzare e, quindi, dell'informazione che si vuole ottenere.

Nel nostro caso, volendo individuare 1) la composizione migliore di substrati per massimizzare la produzione di idrogeno, da una parte, e 2) la degradazione preferenziale di liquame, dall'altra, abbiamo scelto un *Mixture Design*, che viene utilizzato nel caso di miscele e che ha mostrato risultati positivi anche nel caso di bio-produzione di idrogeno da scarti agricoli [27]. Il vantaggio di questo approccio non risiede solo nel fatto di poter ottenere un modello matematico predittivo del processo, ma anche nella possibilità di effettuare un numero limitato di esperimenti ed inferire quindi i risultati per qualsiasi altra composizione dei substrati (sarebbe infatti impossibile effettuare esperimenti per tutte le possibili combinazioni di miscele).

In questa serie sperimentale è stato utilizzato l'inoculo F_{210} : per garantire l'omogeneità dell'inoculo sono stati considerati idonei unicamente i pools microbici che dopo 24 ore di incubazione mostravano una produzione di biogas di 1000-1200 ml con percentuali di idrogeno intorno al 40-50%. Una volta appurata l'idoneità, gli inoculi venivano centrifugati, il surnatante eliminato ed i *pellets* risospesi in tampone fosfato 0,1M sterile pH 6,78, in tal modo si preveniva l'inserimento di potenziali substrati (residui di glucosio,

estratto di lievito e peptone) e inibitori del processo fermentativo (acidi grassi e alcoli) contenuti nel terreno di riattivazione.

I substrati - glicerolo grezzo, scotta, liquame bufalino - conservati a -20°C fino all'utilizzo, sono stati sterilizzati (121°C 15 min) per eliminare la comunità microbica autoctona. Il modello statistico, infatti, richiede di limitare al minimo le sorgenti di variabilità affinché possa essere valutata correttamente la variabilità intrinseca delle caratteristiche chimico-fisiche dei substrati e quindi la composizione ottimale che favorisca la produzione di idrogeno.

Gli esperimenti per la produzione di idrogeno sono state effettuate in reattori *batch* da 590 ml con un volume di fermentazione di 250 ml e con un inoculo al 20%. Le prove sperimentali e relative repliche sono state determinate dal modello statistico.

Gli esperimenti sono stati condotti con un contenuto di solidi volatili (VS) di 2,06 %. Tale quantità è stata determinata per garantire il massimo contenuto di VS possibile in quanto rappresenta il contenuto in solidi volatili del liquame, il substrato più diluito. Per ottenere tale concentrazione quindi il liquame è stato utilizzato tal quale mentre scotta e glicerolo sono stati opportunamente diluiti con acqua di rubinetto. Prima dell'inoculo i batch contenenti i substrati sono stati sterilizzati in autoclave a 120°C per 20 minuti. Una volta inoculati i reattori, il pH è stato portato a 6,5 tramite aggiunta di soluzioni di NaOH o KCl. I contenitori chiusi ermeticamente sono stati insufflati per 10 min con azoto. Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C in un bagnetto termostato e con agitazione a 120 rpm. Ad intervalli di tempo di 24 ore sono stati misurati il pH del liquido di coltura, i prodotti della fermentazione liquidi (acidi grassi volatili, acido lattico, alcoli) e gassosi (H₂, CH₄ e CO₂) e il biogas prodotto.

In tabella 5 sono riportate le condizioni sperimentali ed i valori medi (con le relative deviazioni standard) dei principali parametri del processo di produzione di idrogeno: contenuto di idrogeno nel biogas (%), produzione volumetrica di idrogeno (ml), resa (ml H₂/g VS) e il pH a fine fermentazione. La produzione volumetrica di idrogeno (in rosso) è stata utilizzata come parametro target per l'ottimizzazione statistica.

I diversi parametri di produzione variano da valori minimi ottenuti utilizzando come substrato il 100% di liquame a valori massimi ottenuti utilizzando la scotta come unico substrato, mentre il pH a fine fermentazione segue un andamento inverso andando da un minimo di 4,45±0,02 ottenuto per la scotta ad un massimo di 6,57±0,01 ottenuto per il liquame. Tali risultati confermano la scotta come substrato ottimale per la produzione di idrogeno e l'elevato potere tamponante del liquame.

Tab. 5 Condizioni sperimentali e principali parametri del processo di produzione di idrogeno

	Composizione del substrato (%VS)			H ₂ (%)		H ₂ (ml)		ml H ₂ / g VS		pH finale	
	Liquame	Scotta	Glicerolo	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st
Complete	33,3333	33,3333	33,3333	39,25	2,45	401,28	52,40	97,40	12,72	4,85	0,12
Edge 01	66,6667	33,3333	0	35,68	1,99	341,97	36,41	83,00	8,84	5,30	0,45
Edge 02	33,3333	66,6667	0	41,19	0,69	459,57	89,89	111,55	21,82	4,73	0,04
Edge 03	66,6667	0	33,3333	25,37	1,97	149,74	66,26	36,35	16,08	5,43	0,00
Edge 04	0	66,6667	33,3333	39,20	1,06	390,62	38,74	94,81	9,40	4,49	0,06
Edge 05	33,3333	0	66,6667	17,42	0,82	98,82	2,60	23,99	0,63	5,33	0,16
Edge 06	0	33,3333	66,6667	38,77	3,33	295,42	31,32	71,70	7,60	4,66	0,09
Vertice 01	100	0	0	3,18	0,60	11,61	2,26	2,82	0,55	6,57	0,01
Vertice 02	0	100	0	42,05	4,47	420,12	135,50	101,97	32,89	4,45	0,02
Vertice 03	0	0	100	24,76	2,14	131,99	9,99	32,04	2,43	5,01	0,10

In tabella 6 sono riportate i valori di fine fermentazione dei principali metaboliti prodotti durante il processo di produzione di idrogeno nelle diverse condizioni testate. I valori riportati sono relativi ai campioni più rappresentativi (con produzione di idrogeno vicina al valor medio) di tutte le condizioni sperimentali testate. Le deviazioni standard delle tre repliche strumentali sono inferiori al 20% e non sono

state riportate a favore di una maggiore leggibilità della tabella stessa. Come mostrato in tutte le condizioni sperimentali si rileva un tipo di fermentazione acido mista con scarsa produzione di etanolo. Ad eccezione del Vertice 01, contenente solo liquame, il principale metabolita associato alla produzione di idrogeno sembra essere l'acido butirrico, seguito da acido acetico ed acido formico. Per quanto riguarda i metaboliti non associati alla produzione di idrogeno l'acido propionico si rileva in concentrazioni piuttosto elevate mentre l'acido lattico si riscontra solo in piccole quantità. Come atteso, il 1,3 propandiolo e il 2,3 butandiolo, metaboliti associati ai pathways metabolici coinvolti nella degradazione del glicerolo, si riscontrano unicamente nelle prove contenenti tale substrato.

Tab. 6 Metaboliti prodotti (ppm) a fine fermentazione nelle diverse condizioni sperimentali.

	succinico	lattico	formico	acetico	propionico	butirrico	1,3 propandiolo	2,3 butandiolo	etanolo
Complete	154	0,00	371	658	514	2140	1437	0,00	0,00
Edge 01	183	1,73	455	1153	2182	2025	0,00	0,00	109
Edge 02	100,	47,9	582	882	2841	2043	0,00	1504	506
Edge 03	4,56	0,00	213	469	401	2190	3034	0,00	162
Edge 04	216	101	78,1	637	2,56	1756	0,00	2998	87,7
Edge 05	70,8	0,00	137	482	126	1572	3744	0,00	0,00
Edge 06	64,7	37,9	51,5	696	9,01	1348	72,9	1324	30,9
Vertice 01	0,00	5,12	78,1	1121	1200	161	0,00	0,00	158
Vertice 02	623	803	308	720	168	1403	0,00	3974	0,00
Vertice 03	0,00	133	67,9	471	11,6	1479	2204	2046	19,3

Al fine di valutare l'effettiva bio-conversione del substrato in idrogeno è stata calcolata l'efficienza di degradazione del lattosio contenuto nella scotta e dei suoi prodotti di idrolisi, il glucosio e il galattosio. Tale scelta è stata determinata sia dal fatto che gli zuccheri rappresentano il substrato ottimale per la produzione di idrogeno, sia perché, tramite analisi cromatografiche (HPLC), è possibile monitorare la loro concentrazione durante il processo fermentativo. Come si nota in tabella 7, l'efficienza di utilizzo degli zuccheri diminuisce in funzione della quantità di scotta e quindi della concentrazione degli zuccheri stessi presenti nel substrato iniziale. Tale risultato fa supporre che il carico organico utilizzato nelle prove sperimentali (2.06% in VS) sia eccessivo e che quindi si potrebbe migliorare ulteriormente la produzione di idrogeno diluendo il substrato. Tale ipotesi è ben rappresentata dall'efficienza di degradazione del lattosio la quale è praticamente totale (98 o 100%) a contenuto di scotta pari al 33.333% mentre scende a circa il 40% per le mix contenenti il 66.6667% di scotta, fino ad arrivare al 31% al Vertice 02, costituito da 100% di scotta.

Tab. 7 Efficienza % di degradazione degli zuccheri nelle diverse condizioni sperimentali.

	Substrate composition %			efficienza degradazione %		
	Cow_Manure	Cheese_Whey	Crude_Glycerol	lattosio	glucosio	galattosio
Complete	33,3333	33,3333	33,3333	98	100	100
Edge 01	66,6667	33,3333	0	100	100	100
Edge 02	33,3333	66,6667	0	43	100	100
Edge 04	0	66,6667	33,3333	39	82	63
Edge 05	33,3333	0	66,6667	–	–	–
Edge 06	0	33,3333	66,6667	nd	nd	nd
Vertice 01	100	0	0	–	–	–
Vertice 02	0	100	0	31	93	48
Vertice 03	0	0	100	–	–	–

nd = non determinato

Come si può vedere nella figura 3, il valore medio della produzione massima di idrogeno predetta dal modello oscilla intorno ai 458 ml di idrogeno (*range* della superficie di risposta ottimale : 432-484 ml di H₂), con il massimo rilevato sperimentalmente pari ad 459,57±36,41 ml di H₂, ed ottenuto miscelando il 66% di scotta con 33% di liquame.

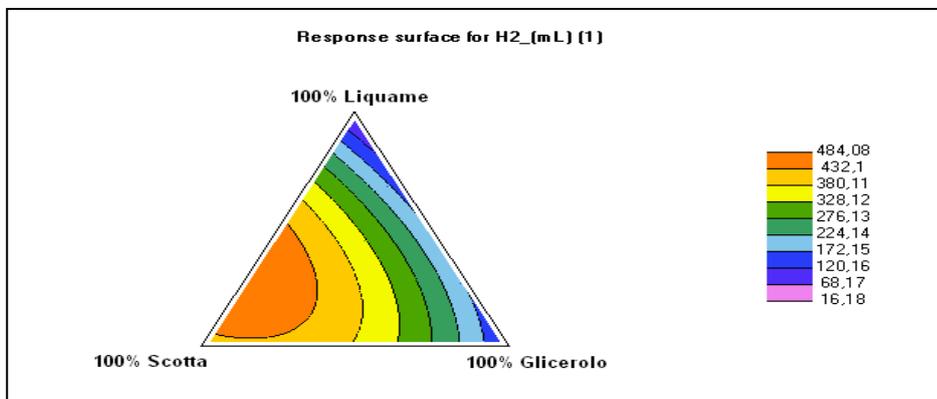


Fig. 3 Superficie di risposta del Mixture Design per la produzione di idrogeno (ml)

La superficie di risposta ottimale mostra inoltre la possibilità di miscelare i substrati in modo diverso, a seconda delle rispettive disponibilità, pur mantenendo la massima produzione entro un range ottimale (in arancione scuro), sufficientemente ampio (Tab.8). Per quanto riguarda la scotta, la percentuale massima che consente di rimanere all’interno di tale superficie di risposta ottimale è pari al 92%, con 8% di liquame. Il contributo del glicerolo, invece, è più modesto, con una percentuale massima pari al 28%, insieme al 16% di liquame e 56% di scotta. Infine, per quanto riguarda il liquame, la composizione ottimale può raggiungere al massimo il 54%, insieme con il 46% di scotta. Tuttavia, è interessante notare come in condizioni sub-ottimali (arancione chiaro, Fig.3), con una risposta che oscilla comunque tra i 380-432 ml di H₂, sia possibile aumentare la percentuale di liquame utilizzato fino al 64%, miscelandolo con un 36% di scotta. Quest’ultima rappresenta sicuramente il tipo di substrato più idoneo e prontamente disponibile per la bio-conversione in idrogeno, con un contributo, all’interno della risposta ottimale, in ogni caso superiore al 46%.

Tab. 8 Range ottimali dei 3 substrati ai fini della produzione di idrogeno.

	% min	% max
Liquame	8	54
Scotta	46	92
Glicerolo	0	28

E’ importante sottolineare che lo studio tramite tali superfici di risposta permette di operare in modo molto flessibile con i suddetti substrati, in base alle esigenze e quantità da smaltire. Il glicerolo, ad esempio, che rappresenta il substrato meno influente, in condizioni sub-ottimali (quindi con una produzione di idrogeno comunque superiore ai 379 ml) può arrivare al 47%, insieme al 49% della scotta ed il 4% del liquame. Questa informazione sarebbe molto importante nel caso si avesse interesse a smaltire un maggior quantitativo di tale substrato. Ciò conferma l’utilità del disegno sperimentale come strumento di gestione per un processo di questo tipo, visto che le disponibilità dei vari substrati possono anche cambiare nell’arco delle stagioni e che impianti installati in aziende diverse avranno disponibilità e/o quantitativi di substrati differenti. Avere quindi uno strumento predittivo che consente di stimare il range all’interno del quale si possono miscelare vari substrati (a seconda delle proprie esigenze e disponibilità) per mantenere una produzione di idrogeno ottimale o sub-ottimale, offre un notevole vantaggio dal punto di vista della gestione efficiente di un tale impianto.

Tab. 9 Analisi della varianza ANOVA

ANOVA Table - H2_(mL)					
ANOVA	SS	DF	MS	F-ratio	p-value
Summary					
Model	247584,5000	5,0000	49516,9023	35,7785	0,0001
Error	9687,9033	7,0000	1383,9862		
Corr. total	257272,4063	12,0000			
Variables					
Linear Mixture	169282,3125	3,0000	56427,4336	40,7717	0,0001
cow_manure*cheese_whey (AB)	58146,1523	1,0000	58146,1523	42,0135	0,0003
cow_manure*glycerol (AC)	8495,8438	1,0000	8495,8438	6,1387	0,0424
cheese_whey*glycerol (BC)	14374,2354	1,0000	14374,2354	10,3861	0,0146
Model check					
Mean					
Linear	169282,3125	3,0000	56427,4336	40,7717	0,0001
Interaction 2	78302,1953	3,0000	26100,7324	18,8591	0,0010
Interaction 3	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
Quadratic					
Cubic					
Total					
Lack of Fit					
Lack of fit	7227,6108	5,0000	1445,5221	1,1751	0,5193
Pure Error	2460,2930	2,0000	1230,1465		
Error	9687,9033	7,0000	1383,9862		
Quality					
Method used	design				
R-square	0,9623				
Adjusted R-square	0,9354				
R-square prediction	0,7420				
S	37,2020				
Mean	296,0515				
C.V. in %	12,5660				
PRESS	66372,2500				

Tab. 10 Tabella di confronto tra i dati sperimentali (Actual Value) e quelli predetti dal modello (Predicted Value). I campioni cp01-cp03 vengono utilizzati dal modello per confrontare la variabilità intra (variabilità tra repliche) con quella extra (variabilità tra condizioni sperimentali diverse).

Diagnostics for H2_(mL)								
Diagnostics	Random Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage(hii)	Student Residual	Cook Distance	Std Order
Complete	12	401,2800	370,5716	30,7084	0,1618	0,9016	0,0261	1
Edge01	3	341,9700	352,3880	-10,4180	0,4594	-0,3809	0,0205	2
Edge02	13	459,5700	482,4137	-22,8437	0,4594	-0,8351	0,0988	3
Edge03	11	149,7400	125,6052	24,1348	0,4594	0,8823	0,1103	4
Edge04	6	390,6200	409,3580	-18,7380	0,4594	-0,6850	0,0665	5
Edge05	1	98,8200	156,2166	-57,3966	0,4594	-2,0983	0,6236	6
Edge06	10	295,4200	309,9438	-14,5237	0,4594	-0,5310	0,0399	7
Vertice01	8	11,6100	16,1823	-4,5723	0,8655	-0,3352	0,1205	8
Vertice02	9	420,1200	406,2594	13,8606	0,8655	1,0161	1,1077	9
Vertice03	7	131,9900	108,0166	23,9734	0,8655	1,7574	3,3138	10
cp01	4	345,2600	370,5716	-25,3116	0,1618	-0,7431	0,0178	11
cp02	2	387,3700	370,5716	16,7984	0,1618	0,4932	0,0078	12
cp03	5	414,9000	370,5716	44,3284	0,1618	1,3015	0,0545	13

Come si può osservare in tabella 9, l'analisi della varianza ANOVA mostra un R^2 pari a 0,962 (il che significa che il modello è in grado di descrivere il 96% della variabilità totale del sistema) ed un valore di p altamente significativo (p -value = 0,0001). Inoltre la bontà del modello è anche confermata da un lack of fit > 0,05. La capacità predittiva risulta sufficientemente buona (tabella 10), con l'eccezione del punto sperimentale Edge 5, che potrebbe dipendere da un set di esperimenti non andato bene (ad es. a causa di problemi di perdita di gas, di attivazione dell'inoculo, od altro). Questo motivo potrebbe spiegare anche l'abbassamento dell' R^2 in predizione, che scende a 0,742. Ad ogni modo la differenza tra il valore predetto e quello sperimentale si

attesta intorno al 16,11 % (valore medio), malgrado la notevole variabilità riscontrata in questo sistema, a riprova della validità del modello.

2.1.5 Produzione di metano: ottimizzazione del processo di digestione anaerobica

I processi di digestione anaerobica a singolo e doppio stadio sono stati recentemente impiegati per la produzione di metano da differenti tipologie di biomasse, sia a scala di laboratorio, che pilota e di impianto. E' ampiamente riconosciuto che la digestione anaerobica a doppio stadio oltre ad essere necessaria per substrati con valori di pH bassi e scarso potere tamponante, presenta il vantaggio di produrre al primo stadio l'idrogeno.

Uno degli aspetti, scarsamente indagati ma fortemente suggeriti nell'ambito di questo processo, è quello relativo alle comunità microbiche coinvolte in entrambi gli stadi [28]. D'altronde l'importanza delle relazioni simbiotiche tra i microorganismi nella produzione di metano è stata fondamentale per la comprensione del processo di digestione anaerobica. In particolare sebbene sia stato riconosciuto che la produzione di idrogeno possa essere un fattore limitante per la metanogenesi, esistono pochi studi sul ruolo di questi microorganismi nei consorzi utilizzati per la produzione di metano.

Ad esempio, Bagi et al., nel 2007 [29] ottengono un incremento della produzione di metano del 160-170% da liquame di maiale arricchito con l'effluente di un digestore anaerobico, tramite l'aggiunta di un ceppo batterico idrogeno produttore (*Caldicellulosyruptor saccharolyticus*) al naturale consorzio di produzione di biogas. Questo approccio, a nostra conoscenza, non ha avuto un giusto seguito nei molti lavori pubblicati che indagano il processo della digestione anaerobica sia a singolo che a doppio stadio.

Inoltre nel liquame/letame animale sono presenti consorzi microbici in grado di effettuare tutti gli step necessari al processo di digestione anaerobica: idrolisi, acidogenesi-acetogenesi e metanogenesi. Tuttavia, per la presenza preponderante di microorganismi metanigeni e per la bassa concentrazione di carboidrati, sono pochi i lavori che hanno indagato la produzione di idrogeno da questi substrati [30; 31].

La finalità di questa attività sperimentale è stato, quindi, quello di:

- studiare il ruolo dell'inoculo di un consorzio di idrogeno produttori (F_{210}) nella produzione di metano dal liquame
- separare gli stadi di idrogenogenesi e metanogenesi mediante variazione del pH
- verificare le potenzialità della comunità di idrogeno produttori nel liquame nel processo di produzione di idrogeno utilizzando un substrato, la scotta, ricca in carboidrati (lattosio).

Per le tre prove sperimentali è stato utilizzato liquame bufalino ad una concentrazione di VS di 8g/l e le rese sono state corrette per i VS aggiuntivi dell'inoculo sia di idrogeno produttori che di metanigeni.

2.1.5.1 Potenziamento della produzione di metano dal liquame mediante inoculo di una comunità di idrogeno produttori

Al fine di mettere in evidenza il ruolo di un'inoculo di idrogeno produttori (F_{210}) nella complessiva produzione di metano sono state allestite prove di produzione di metano dal liquame non trattato (assenza di trattamenti di sterilizzazione o di pH) con e senza l'aggiunta dell'inoculo F_{210} . In figura 4 sono poste a confronto le curve cumulative di produzione ed in tabella 11 i parametri di processo.

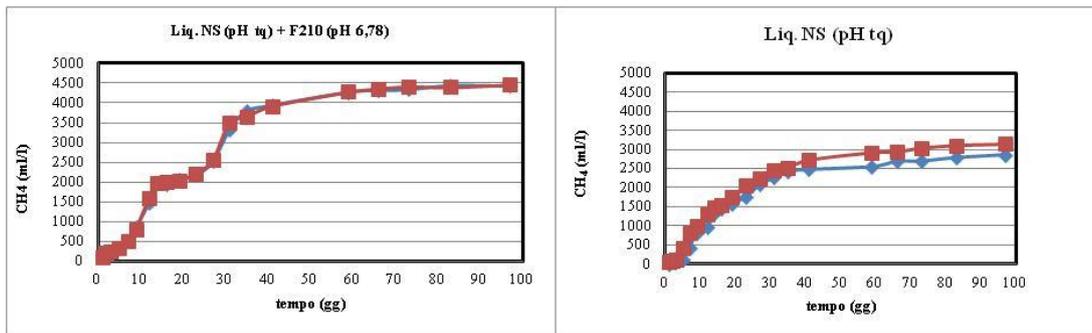


Fig. 4 Produzione cumulativa di metano dal liquame in presenza e assenza dell'inoculo F_{210} .

Tab 11 Parametri di processo di produzione di metano dal liquame in presenza dell'inoculo F_{210}

	CH ₄ (ml/l)	Resa CH ₄ (ml/gVS)	CH ₄ (%)	Resa H ₂ (ml/gVS)	H ₂ (%)
Liq NS + F ₂₁₀ (pH 6,78)	4433 ± 30	477 ± 3,28	62-64	2	1
Liq NS (pH 6,78)	3000 ± 202	373 ± 25,3	56-59	0	0,02

I risultati possono così essere riassunti:

- la produzione volumetrica di CH₄ (ml/l) e la percentuale di CH₄ nel biogas incrementano in presenza dell'inoculo F_{210}
- solo nel reattore con l'aggiunta di F_{210} veniva rilevata, nelle prime 24 di fermentazione, una percentuale di H₂ nel biogas del 6% che scendeva al 3% nelle successive 72 ore fino a scomparire del tutto. E possibile ipotizzare che con l'inoculo F_{210} sia attiva, nel corso del processo, una produzione di idrogeno concomitante al suo consumo
- Le rese ottenute e corrette per il VS dell'inoculo confermano l'efficienza maggiore del processo di digestione anaerobica del reattore con F_{210}

2.1.5.2 Produzione di metano da liquame: separazione delle fasi di idrogenogenesi e metanogenesi mediante variazione del pH

E' stata allestita una serie sperimentale per verificare la possibilità di separare le fasi di idrogenogenesi e metanogenesi mediante variazione del pH del liquame. A tal fin il pH iniziale del liquame inoculato e non con F_{210} è stato portato a pH 5,5 e non è stato poi modificato nel corso dell'esperimento. Nella figura 5 e in tabella 12 sono presentati i risultati.

Come si può osservare:

- il pH 5.5 permette di separare le due fasi produttive
- separando le fasi tramite pH si ottiene un incremento della produzione volumetrica di CH₄, della % di CH₄ nel biogas e delle rese;
- la produzione complessiva di bioenergia nel doppio stadio risulta ulteriormente incrementata dalla produzione di idrogeno.

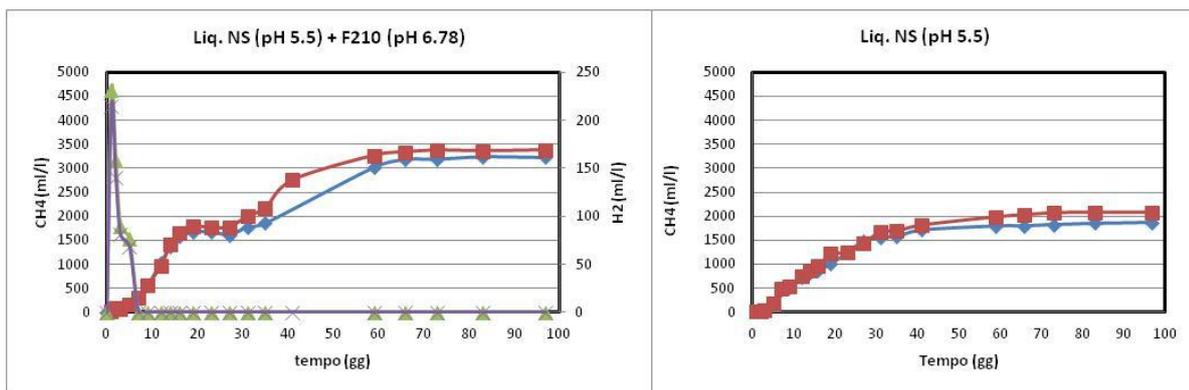


Fig. 5 Produzione cumulativa di idrogeno (in viola e verde) e metano dal liquame acidificato, con e senza inoculo F₂₁₀ . Sono presentati gli andamenti delle due repliche.

Tab 12 Parametri di processo di produzione di metano dal liquame a singolo e doppio stadio

Produzione di metano a singolo stadio											
pretrattamento liquame	inoculo H ₂ produttori	Reattore	Tempo fine produzione H ₂ (h)	H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	ml H ₂ /g VS	pH fine produzione H ₂	CH ₄ (%)	CH ₄ (ml/l)	ml CH ₄ /g VS	pH fin
-	-	L	72	0,02-0,03	-	-	6,4-6,6	54-56	1978 ±148	247 ±18,5	6,5-6,8
Produzione di metano a doppio stadio											
pretrattamento liquame	inoculo H ₂ produttori	Reattore	Tempo fine produzione H ₂ (h)	H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	ml H ₂ /g VS		CH ₄ (%)	CH ₄ (ml/l)	ml CH ₄ /g VS	pH fin
pH5.5	F ₂₁₀	M	24	11 ±0,43	224 ±12	24 ±1,3	5,4-5,7	61-65	3261 ±107	351 ±14	6,5-6,8

2.1.5.3 Evidenza sperimentale della presenza di una comunità di idrogeno produttori nel liquame

Avendo sperimentalmente verificato sia la produzione di H₂, anche se in bassa percentuale, nel liquame non inoculato sia l’incremento di produzione di metano con l’aggiunta di F₂₁₀, si è proceduto a realizzare una nuova serie sperimentale mirata ad evidenziare la presenza funzionale di microorganismi idrogeno produttori nel liquame. A tal fine le prove sono state allestite utilizzando come substrato la scotta che, come detto precedentemente, è un substrato favorevole agli idrogeno produttori. Per questo esperimento è stato effettuato un scaling up di cinque volte inoculando batch da 590 ml, contenenti scotta sterile, con una comunità di metanigeni (M₁₂) proveniente dalla digestione anaerobica di liquame a 37°C. La percentuale di metano nel biogas al momento del prelievo dell’inoculo e dopo 12 giorni era del 45%. La prova è stata effettuata a due condizioni di pH, la prima di 6,2, cioè al naturale valore di pH della scotta, la seconda a pH 5,5, condizione ritenuta favorevole agli idrogeno produttori e sfavorevole per i metanigeni. Una seconda serie di batch è stata preparata allo stesso modo aggiungendo però anche F₂₁₀, per verificare se comunque l’aggiunta di un consorzio specifico di idrogeno produttori potesse ulteriormente incrementare la produzione di metano. Nelle due prove il pH, dopo la fase ad idrogeno, è stato portato a 7. In tabella 13 sono presentati i risultati dei parametri di processo riguardo all’idrogeno ed al metano ottenuti mentre in figura 6 la produzione cumulativa di metano è mostrata in relazione alla produzione dei principali metaboliti.

Tab 13 Parametri di processo relativi alla produzione di metano da scotta sterile inoculata con metanigeni (liquame acclimatato M_{12}) e con un inoculo misto di idrogeno produttori e metanigeni ($F_{210} + M_{12}$) a due condizioni di pH: pH 6,2 (tal quale) e a pH corretto a 5,5.

	fine prod. H_2 (h)	% H_2	ml H_2 /g VS	H_2 (ml/l)	% CH_4	ml CH_4 /g VS	CH_4 (ml/l)	fine prod. CH_4 (gg)
Scotta sterile pH 6,2 + M_{12}	120	31,7 ± 2,37	95,5 ± 6,08	1025 ± 66,1	68,1 ± 0,83	271 ± 10,9	2939 ± 118	85
Scotta sterile pH 5,5 + M_{12}	168	30,2 ± 1,85	100 ± 9,75	1087 ± 11,7	68,1 ± 1,56	252 ± 20	2742 ± 222	85
Scotta sterile pH 6,2 ($M_{12} + F_{210}$)	48	35,0 ± 0,70	109 ± 12,5	1332 ± 153	71,1 ± 1,21	316 ± 7,00	3853 ± 82	57
Scotta sterile pH 5,5 ($M_{12} + F_{210}$)	48	33,5 ± 0,83	106 ± 5,29	1290 ± 215	70,4 ± 1,21	276 ± 21,0	3366 ± 255	57

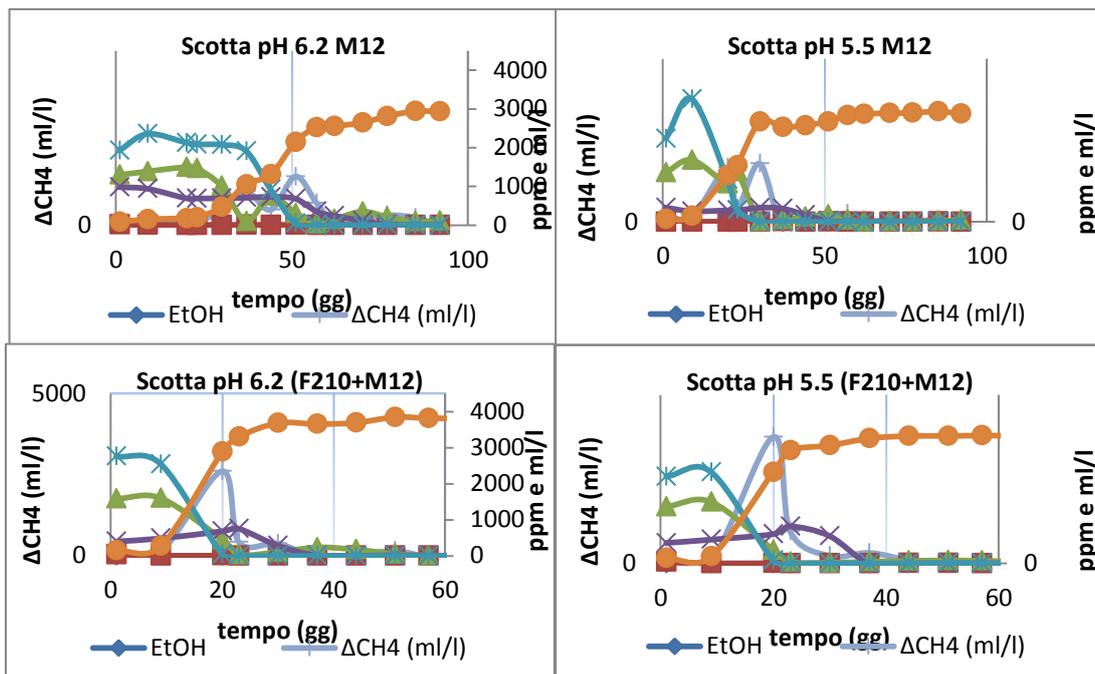


Fig. 6 Produzione cumulativa di metano dalla scotta (in arancione) inoculata con metanigeni (liquame acclimatato M_{12}) e con un inoculo misto di idrogeno produttori e metanigeni ($F_{210} + M_{12}$) a due condizioni di pH, tal quale (pH 6.2) e 5,5 in relazione alla produzione dei principali metaboliti

I risultati più salienti possono essere riassunti come segue:

- come ipotizzato nel liquame (M_{12}) è presente una comunità di idrogeno produttori. La produzione di idrogeno ad entrambi i pH è inferiore, ma tuttavia paragonabile, a quella ottenuta per l'inoculo F_{210} dalla scotta in precedenti esperimenti (1447 ml H_2 /l, 39,2% H_2)
- non si rilevano sostanziali differenze nella produzione di H_2 per le due condizioni di pH. Con l'aggiunta di F_{210} si riducono i tempi di produzione di H_2 e si ottiene un incremento sia delle % di idrogeno nel biogas che della produzione
- l'aggiunta di un substrato favorevole alla produzione di idrogeno avvantaggia la comunità idrogeno produttrice
- l'aggiunta di F_{210} abbassa i tempi di massima produzione di metano da 80 a 57 giorni. Inoltre, come si può osservare dagli andamenti della produzione di metano non cumulativa (ΔCH_4 ml/l), la velocità di produzione è molto più elevata negli esperimenti con l'aggiunta di F_{210}

- per entrambe le condizioni sperimentali alla fase esponenziale della curva di produzione di metano corrisponde il consumo di acido acetico e butirrico mentre il propionico è utilizzato nella fase di produzione più lenta
- dal confronto con i risultati di produzione di metano dal liquame inoculato con F₂₁₀ è possibile ipotizzare che, oltre all'aggiunta di un substrato ricco in carboidrati (come è nella maggior parte degli impianti a biogas), un potenziamento della comunità degli idrogeno produttori nel reattore a metano dovrebbe ulteriormente migliorare il processo, in termini di produzione volumetrica, di % di metano nel biogas e di resa

2.1.5.4 Scaling-up del processo di produzione di idrogeno e metano dal glicerolo

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando bioreattore BioFlo / CelliGen 115 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) da 3 litri, con 1L di volume di lavoro, alla temperatura di 37 ° C con agitazione continua (120rpm). Sulla base dei risultati di ottimizzazione statistica, il pH iniziale è stato fissato a 8 con KOH soluzione 6M, e non è stato poi successivamente controllato durante la fermentazione. Come substrato è stato utilizzato il glicerolo Novaol non sterile diluito con il terreno minimo, (senza l'uso di nutrienti aggiuntivi quali estratto di lievito, vitamine, triptone o elementi in traccia) in modo da raggiungere una concentrazione iniziale di circa 15 g / L. Le condizioni anaerobiche sono stati ottenute inizialmente con lo sparging del terreno con azoto puro per 10 minuti, ad una portata di 1L/min. Il bioreattore è dotato di condensatore per ridurre al minimo l'evaporazione del terreno. Il bioreattore è stato inoculato con il 10% v / v dell'inoculo GM, preattivato in bottiglie da 120 ml, con 50 ml di mezzo di coltura per 21 h, alla stessa temperatura. L'equazione di Gompertz modificata è stato utilizzato per misura la produzione cumulativa di idrogeno e calcolare tasso di produzione.

Come si può osservare in figura 7, l'equazione di Gompertz modificata è stata in grado di descrivere l'evoluzione della produzione di idrogeno correttamente ($R^2 > 0,98$). Il substrato veniva quasi completamente degradato, con una efficienza di degradazione glicerolo, espressa come percentuale della concentrazione iniziale, del 97,42% \pm 0,98. Al termine della fermentazione il contenuto di idrogeno nel biogas raggiunge in media 54,05 \pm 0,99%. Il potenziale medio di produzione di idrogeno cumulativa (Pmax) ha raggiunto 3451ml H₂, con una velocità di produzione di 3152 H₂/L/day e una resa di 0,90 mol H₂/ mol di glicerolo.

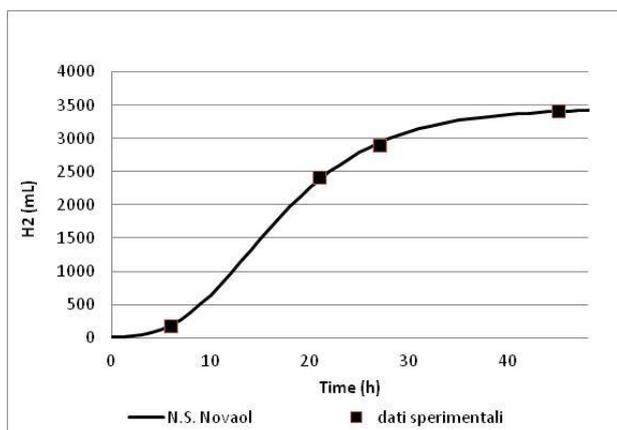


Fig 7 Curva dell'evoluzione della produzione di idrogeno ottenuta applicando l'equazione di Gompertz: la curva ottenuta è congruente con i dati sperimentali ($R^2 > 0,98$)

A fine produzione, 800 ml del fermentato sono stati inoculati con 200 ml di una comunità di metanigeni proveniente da un fermentatore di 2 litri con liquame inoculato con una comunità di idrogeno produttori (F₂₁₀). La percentuale di metano nel biogas al momento del prelievo dell'inoculo e dopo 30 giorni di

digestione anaerobica aveva raggiunto il 73%. Dopo inoculato il bioreattore è stato portato a pH 7 e flussato 10' con azoto e messo a 37°C.

In figura 8 viene presentata la produzione cumulativa di metano. La percentuale di metano nel biogas arrivava al 76,7% con una produzione finale di 2,29 L CH₄/L

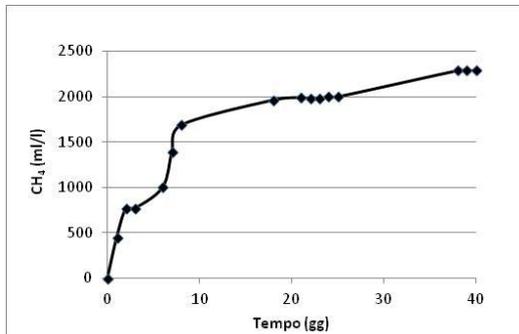


Fig 8 Produzione cumulativa di metano su glicerolo grezzo, avviata al termine della produzione di idrogeno

2.2 Obiettivo A2.4: Studio di processi di DA innovativi in grado di utilizzare biomasse lignocellulosiche

Le biomasse lignocellulosiche rappresentano la componente più abbondante dell'intera biomassa terrestre, infatti circa la metà della CO₂ atmosferica fissata per via fotosintetica viene incorporata nelle pareti cellulari lignocellulosiche delle piante arboree [32], con una produzione annua pari a 10-50 miliardi di tonnellate [33;34].

Per tali motivi sono in corso numerosi studi sulla possibilità di convertire le biomasse in bioenergie mediante processi innovativi che coniughino sostenibilità economica e sostenibilità ecologica. Tra questi processi grande attenzione è rivolta alla produzione di biogas, idrogeno e metano, per via fermentativa.

Da un punto di vista biochimico, la lignocellulosa è costituita da tre componenti principali: cellulosa, emicellulose e lignina [35]. La struttura macromolecolare della lignocellulosa si basa su un *core* di microfibrille di cellulosa circondato da strutture amorphe di cellulosa e emicellulose, a loro volta avvolte da polimeri di lignina. L'insolubilità in acqua [36], le forti interazioni interne al *core* cristallino di cellulosa [37] e la complessità della struttura tridimensionale dovuta al *coating* da parte delle strutture amorphe di cellulosa ed emicellulose [38] ostacolano l'accesso degli enzimi idrolitici alle catene di cellulosa [39], rendendo l'idrolisi di tale polimero lo *step* limitante della velocità dell'intero processo di digestione anaerobica di matrici lignocellulosiche.

Per aumentare l'efficienza di conversione in biogas di tali substrati si rende quindi necessario l'impiego di costosi ed in genere energivori metodi di pre-trattamento condotti per via fisica, chimica, enzimatica o tramite una combinazione di questi metodi [40]. D'altra parte la capacità di degradare la cellulosa è diffusa in molte specie di microrganismi presenti soprattutto nei suoli e nell'intestino degli animali, e le loro attività metaboliche sono responsabili di uno dei maggiori flussi di materia nel ciclo del carbonio nella biosfera [41]. L'utilizzo di microrganismi cellulolitici rappresenta dunque un'ulteriore e promettente strategia per ottimizzare l'utilizzazione e la valorizzazione di substrati lignocellulosici mediante digestione anaerobica.

L'abilità di digerire la cellulosa, in genere attribuita agli organismi del dominio *Eucarya* appartenenti al regno dei funghi, è anche ampiamente diffusa tra diversi generi del dominio *Bacteria* [41].

2.2.1 Idrolisi fungina in aerobiosi e produzione di idrogeno da scarti ligninici

L'attività sperimentale riguardante l'idrolisi della lignina è svolta in collaborazione con l'Università della Tuscia, è stata focalizzata sull'utilizzo di funghi "white-rot", in condizioni aerobiche, per favorire la digestione di materiale di scarto dell'industria del legno (trucioli e segatura di abete) rendendo i substrati

idonei per la successiva fermentazione batterica finalizzata alla produzione di idrogeno. L'attività è stata effettuata utilizzando 4 ceppi fungini selezionati in base a preliminari test di idrolisi e produzione di idrogeno (*Trametes trogii*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus pulmonarius*, *Panus tigrinus*). All'università sono state allestite le prove di idrolisi in beute Erlenmeyer da 250 ml utilizzando due differenti terreni di coltura contenenti:

- 80 ml di acqua deionizzata, estratto di malto (7,5 g/l) e 1 g di segatura di abete (MEL). Il tutto è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 30 min.
- 40 ml di acqua deionizzata, 40 ml di acqua di lavaggio delle olive e 1 g di segatura di abete (ALL). Il tutto è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 30 min. L'acqua di lavaggio delle olive è stata utilizzata come induttore degli enzimi coinvolti nella degradazione della lignina.

Per ciascun fungo e per ogni terreno sono state allestite tre repliche. Le prime due sono state utilizzate per monitorare il processo di produzione di idrogeno, a cadenza settimanale e per le prime tre settimane, mediante il prelievo di aliquote di 20 ml, dopo omogeneizzazione con Ultra Turrax. Per la quinta settimana si è utilizzata esclusivamente la terza replica in quanto rappresentativa del tempo finale delle fermentazioni. La produzione di idrogeno è stata monitorata in batch da 120 ml a 37°C utilizzando l'inoculo F₂₁₀.

Come si può vedere dalla tabella 14, con tutti i ceppi utilizzati e con i due differenti terreni di coltura è stata rilevata una produzione di idrogeno con % di idrogeno nel biogas che raggiunge il valore del 28,5% con *Trametes trogii* MEL e del 22,7% con *Pleurotus pulmonarius* ALL, alla quinta settimana.

Inoltre l'assenza di un'andamento di produzione di idrogeno crescente con il procedere dell'attività idrolitica dei ceppi fungini suggerisce tempi di idrolisi, funzionali alla produzione di idrogeno, differenti per ciascun ceppo fungino testato. D'altra parte la biomassa fungina utilizza, per la propria crescita, i propri prodotti di idrolisi (proteine e carboidrati), sottraendoli quindi all'attività dei batteri idrogeno produttori. Tale evidenza sperimentale suggerisce l'utilizzo di mix fungine per potenziare e diversificare l'attività idrolitica su substrati ricchi di lignina.

Tab. 14 Parametri di processo relativi alla produzione di idrogeno dopo trattamento della lignina con ceppi fungini in presenza di estratto di malto (MEL) o di acqua di lavaggio delle olive (ALL)

Ceppi	% H ₂				ml H ₂ /l				ml H ₂ /g segatura			
	settimane				settimane				settimane			
	I	II	III	IV	I	II	III	V	I	II	III	V
<i>Trametes trogii</i> MEL	0,47	8,82	6,23	28,5	19,1	307	233	312	1,84	34,4	26,1	21,2
<i>Trametes versicolor</i> MEL	0,11	5,11	1,32	16,6	4,22	190	44,4	147	0,40	21,2	4,97	10,0
<i>Pleurotus pulmonarius</i> MEL	7,26	3,63	1,76	13,2	340	123	57,4	112	32,6	13,8	6,43	7,62
<i>Panus tigrinus</i> MEL	1,45	2,42	0,89	0,27	63,5	82,3	29,7	1,91	6,10	9,21	3,33	0,13
<i>Trametes trogii</i> ALL	1,13	4,79	1,98	0,30	46,8	175	67,8	2,15	4,49	19,6	7,60	0,15
<i>Trametes versicolor</i> ALL	0,01	3,13	1,72	0,11	0,24	109	59,8	0,79	0,02	12,2	6,69	0,05
<i>Pleurotus pulmonarius</i> ALL	0,00	0,00	1,51	22,7	0,00	0,00	51,8	257	0,00	0,00	5,80	17,5
<i>Panus tigrinus</i> ALL	0,33	2,58	1,11	22,1	13,1	88,8	36,4	214	1,26	9,94	4,08	14,5

2.2.2 Idrolisi batterica in anaerobiosi e produzione di idrogeno da scarti vegetali

Tra i microrganismi cellulolitici che operano in condizioni di anaerobiosi si annoverano batteri fermentanti (*Clostridium*, *Ruminococcus*, *Caldicellulosiruptor*) in grado di idrolizzare la cellulosa e metabolizzare i prodotti dell'idrolisi con concomitante produzione di idrogeno.

Attualmente un settore delle cosiddette biotecnologie bianche è rivolto allo studio delle produzioni bioenergetiche da biomasse di scarto; queste costituiscono al contempo materia prima da trasformare e fonte di pool microbici che operano il processo. In altri termini le reazioni che portano ai prodotti di interesse sono catalizzate da comunità microbiche complesse ma autoctone del substrato, che vengono selezionate dalla matrice di partenza durante il processo stesso. Il principale vantaggio che ne deriva, dal punto di vista operativo, è il venir meno della necessità di pretrattare il substrato per renderlo idoneo a inoculi alloctoni e di lavorare con pool microbici già preadattati a substrati complessi.

Obiettivo di quest'attività sperimentale è stata la selezione di un pool microbico cellulosolitico in grado di idrolizzare rifiuti vegetali in condizioni anaerobiche ed allo stesso tempo di produrre idrogeno dai prodotti del metabolismo. Come substrato sono stati scelti gli scarti dell'insalata (mensa dell'ENEA C.R. della Casaccia), partendo dal presupposto che questi scarti sono prodotti giornalmente dalle filiere agroalimentari quindi sono disponibili giornalmente ed inoltre, data la tipologia di alimento, hanno una diffusione che possiamo definire "ubiquitaria".

Selezione di un pool batterico dal rifiuto vegetale

La prima parte dell'attività è consistita nel testare la fattibilità di produzione di H₂ tramite autofermentazione mesofila di scarti vegetali della filiera agroalimentare.

Il substrato è stato caratterizzato secondo le metodiche descritte, i Solidi Totali e i Solidi Volatili sono risultati del 6,3% e del 5,83%, rispettivamente.

Le prove sono state effettuate in batch da 125 ml contenente ciascuno 10g di Insalata finemente tritata (diametro delle particelle < 2 cm) e 25 ml di liquido di coltura (Figura 9). Poichè il pH è un parametro critico per i processi microbici, sono state testate tre differenti soluzioni: acqua di rubinetto (tap water), tampone fosfato 0,1M e 0,2M. Per tutte e tre le tipologie di soluzioni sono state sperimentate due temperature di incubazione 28°C e 37°C. I batch, chiusi ermeticamente ed insufflati con azoto (2 min) per stabilire condizioni di anaerobiosi, sono stati incubati in un bagnetto termostato con agitazione 120 rpm senza l'aggiunta di inoculo o pretrattamento. Ad intervalli di tempo di 24 ore sono stati misurati il biogas, il pH del liquido di coltura e la composizione del biogas (GC).



Fig. 9 Allestimento dei test di autofermentazione da rifiuti vegetali (insalata)

I microrganismi presenti nel rifiuto vegetale, posti in condizioni di anaerobiosi, si sono dimostrati in grado di idrolizzare e produrre idrogeno per via autofermentativa in tutte le condizioni testate. Non è stata rilevata produzione di metano. Dai parametri di processo, riportati nella tabella 15 ed in figura 10, si osservano differenze attribuibili sia alla temperatura di incubazione, sia al liquido di coltura utilizzato.

Tab. 15 Parametri di processo relativi alla produzione di idrogeno da rifiuti vegetali (TW= acqua di rubinetto; TF= tampone fosfato).

Esperimento	Liquido di Coltura	Temperatura	H ₂ (%)		H ₂ (ml)		ml H ₂ /g VS		pH	
			media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st	iniziale	Finale
1	TW	28°C	0,23	0,19	0,24	0,20	0,41	0,34	6,55	4,47
2		37°C	0,18	0,29	0,17	0,19	0,29	0,32		
3	TF 0,1 M	28°C	13,6	4,18	16,75	5,84	28,7	10,0	6,60	5,30
4		37°C	24,1	5,44	53,0	33,6	90,9	58,9		
5	TF 0,2 M	28°C	22,0	3,51	33,9	8,36	48,3	11,9	6,82	6,38
6		37°C	28,9	5,36	57,4	13,0	98,4	22,2		

Ad eccezione delle prove effettuate con acqua di rubinetto, la temperatura di 37°C sembra favorire la produzione di idrogeno rispetto ai 28°C. Risulta evidente il ruolo giocato dal sistema tampone, il pH infatti è un parametro fondamentale per i processi fermentativi ed il suo opportuno controllo appare necessario per ottenere un processo idrolitico e fermentativo efficiente e stabile. Sebbene la resa più elevata, pari a 149,38 ml H₂/gVS sia stata ottenute nell’esperienza a 37°C con Tampone Fosfato 0,1M, questo valore è stato raggiunto solo in una delle tre repliche evidenziando una notevole variabilità sperimentale. Questo risultato è ben evidenziato nell’istogramma in figura 10 in cui sono riportate le deviazioni standard.

Al contrario, l’utilizzo del tampone 0,2 M, assicura una minor variabilità, rese medie superiori e una % di idrogeno nel biogas del 28%.

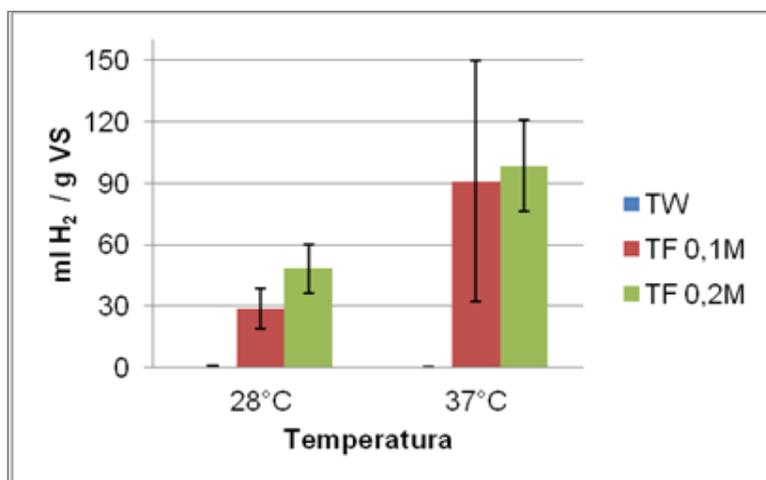


Fig. 10 Confronto tra le rese di produzione di idrogeno (ml H₂/g VS) nelle diverse condizioni sperimentali. (TW= acqua di rubinetto; TF= tampone fosfato).

Le rese ottenute nella presente attività sperimentale sono di gran lunga superiori a quelle ottenute in precedenti lavori [42]. Da un’indagine bibliografica risulta che tali rese sono le più alte ottenute da fermentazione di substrati reali (tabella 16) e che il controllo del pH nei processi fermentativi è fondamentale.

Tab. 16 Confronto dei dati ottenuti (massima resa e produzione volumetrica d'idrogeno) in questo con studio con quelli riportati in letteratura

Substrati	Condizioni operative	T (C°)	Controllo del pH	L H ₂ /Kg TS	Biomassa L H ₂ /L o Kg	Referenze
Liquami bovini	batch	60	No	22.1	0.39	[43]
Letame bovino non diluito	batch	60	No	5.05	0.74	[43]
Scarti alimentari	batch	35	No	40.0	1.33*	[44]
Scarti alimentari	batch	35	automatico	90.0	3*	[44]
Fanghi macellazione pollame	batch	37	no	8.83	n.d.	[45]
Scarti alimentari	batch	35	NaOH	4.37	n.d.	[46]
Fanghi di scolo	batch	37	no	0.25	0.00	[47]
Estratto sorgo dolce	continuo	35	NaOH-KH ₂ PO ₄	n.d.	10.0	[48]
Scarti alimentari	continuo	35	NaHCO ₃	n.d.	2.49	[49]
Scarti alimentari	semi-continuo	40	no	55.8	n.d.	[50]
Scotta	sequence batch	37	automatico	31.1	n.d.	[51]
Scarti alimentari	continuo	35	automatico	n.d.	4.80	[52]
Scarti insalata	batch	28	KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄	18.6	0.99	[42]
Scarti insalata e buccia patate	batch	37	KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄	17.0	1.98	[42]
Scarti insalata	batch	37	KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄	84,1	5,30	questo studio
Scarti insalata	batch	37	KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄	91,1	5,74	questo studio

n.d. non determinato

*valore calcolato

Dall'esperimento a 37°C con tampone 0,2M è stato selezionato il pool microbico del campione I_A che ha raggiunto la massima produzione di 53.4 ml di idrogeno con una resa pari a 91,7 ml H₂ /gVS. Tale pool è stato conservato in glicerolo al 30%, a -20°C, e utilizzato come inoculo negli esperimenti successivi.

Test di efficacia del pool microbico

L'effettiva efficacia dell'inoculo I_A selezionato è stata saggiata su substrati reali e sintetici. Per verificare l'effettiva capacità cellulolitica è stata testata la cellulosa e la carbossimetil cellulosa (CMC) la forma solubile della cellulosa, normalmente più biodisponibile per i microrganismi. Sono inoltre stati effettuati test di verifica su substrato reale: insalata fresca (TQ), e insalata sottoposta al processo di sterilizzazione (ST) per verificare il possibile instaurarsi di interazioni tra il pool microbico selezionato e la microflora presente nel rifiuto.

Le condizioni operative utilizzate sono state determinate in base a quelle ottimali definite dai precedenti esperimenti (37°C, tampone fosfato 0,2M, 120 rpm). Le prove batch sono state allestite secondo quanto descritto precedentemente a differenza del fatto che questa volta i batch sono stati inoculati al 10%.

L'inoculo I_A è stato centrifugato, il sovrantante eliminato ed i pellets risospesi nel liquido di coltura, in tal modo si preveniva l'inserimento di potenziali substrati e inibitori del processo fermentativo (acidi grassi). Per i substrati reali si è utilizzato il tampone fosfato 0,2M sterile (pH 6,70); per la cellulosa e la carbossimetil cellulosa è stato invece utilizzato un terreno di coltura sintetico (BFM, [10]) opportunamente modificato, contenente (g/l): Yeast extract 2; FeSO₄·7 H₂O 0,2; MgCl₂·6 H₂O 0,426, substrato 10 (Cellulosa o CMC) e con l'aggiunta per ogni batch di 250µl di Sali e 130µl di vitamine [4]. L'insalata per le prove sterili ed

i terreni di coltura sono stati autoclavati a 120°C per 20 min, mentre le vitamine ed i sali, sterilizzati a parte per filtrazione, sono stati aggiunti al momento dell'inoculo.

Le tecniche per misurare la quantità di biogas, le rese e la produzione di H₂ sono le stesse descritte in precedenza.

In generale, il pool selezionato ha dimostrato un'efficace attività idrolitica e di produzione di H₂ su tutti e quattro i substrati sperimentati (Tab.17).

Tab. 17 Parametri di processo relativi alla produzione di idrogeno nei test di verifica delle capacità idrolitiche e di produzione di idrogeno del pool microbico I_A

SUBSTRATO	H ₂ (%)		H ₂ (ml)		ml H ₂ / g VS		pH finale	
	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st
CELLULOSA	17,6	0,23	24,7	0,45	110	2,00	6,8	0
CMC	17,9	0,59	25,3	0,74	112	3,31	6,6	0
INSALATA TQ	34,2	1,56	73,3	11,7	98,6	15,7	6,3	0
INSALATA ST	33,8	0,79	67,5	3,22	90,9	4,34	6,63	0,06

La riproducibilità dei dati di resa di idrogeno (cfr tab 15 e 17) conferma l'efficacia del processo di selezione di un inoculo idrolitico e idrogeno produttore per auto fermentazione.

Riguardo ai test effettuati su terreni sintetici, le rese ottenute, pari a 110 e 112 ml H₂/g VS rispettivamente per la cellulosa e la CMC, mostrano una produzione di idrogeno pressoché equivalente, dimostrando che la coltura selezionata è in grado di utilizzare indifferentemente la cellulosa e la sua forma solubile (CMC). La massima produzione si raggiunge dopo 72 ore per l'insalata e l'insalata sterile e a 24 ore per la cellulosa e la carbossimetilcellulosa. E' quindi confermata l'effettiva capacità idrolitica del pool microbico su rifiuto vegetale (Fig. 11) e la sua abilità nell'utilizzare la cellulosa come substrato.



Fig.11 Esperimenti di idrolisi: substrato ad inizio sperimentazione (sx) e dopo il processo di idrolisi e fermentazione (dx)

Arricchimento di pool microbici cellulolitici

Al fine di stabilizzare il pool microbico I_A ci si è avvalsi della tecnica dell'arricchimento su substrato reale. Si è scelto di operare sia con insalata fresca (TQ) che sterile (ST) in modo da procedere all'arricchimento della coltura, sia in presenza che in assenza delle comunità microbiche presenti nel rifiuto al fine di valutare le eventuali interazioni del pool selezionato con la microflora autoctona. La procedura di arricchimento consiste in batch sequenziali in cui la comunità microbica viene trasferita al momento della massima produzione di idrogeno e quindi utilizzata come inoculo nel batch successivo. L'esperimento è stato condotto a 37°C, e con il tampone fosfato 0,2M e i substrati insalata ed insalata sterile. Le procedure analitiche sono le stesse sopra descritte. Ad intervalli di 72 ore, in cui si raggiunge la massima produzione di

H₂, un 'aliquota della replica con il valore più elevato di H₂ (ml) veniva prelevata e utilizzata come inoculo per la generazione successiva.

La procedura di arricchimento consta, ad oggi, di quattro generazioni ed è possibile confrontare i valori dei parametri di processo in tabella 18.

Tab. 18 Parametri di processo relativi alla produzione di idrogeno nella procedura di arricchimento dell'inoculo I_A

TQ		H ₂ (%)		H ₂ (ml)		ml H ₂ / g VS		pH finale	
Generazione	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st	
1	34,2	1,56	73,3	11,7	98,6	15,7	6,3	0	
2	16,9	0,84	20,7	4,00	27,9	5,39	6,2	0	
3	21,6	2,17	33,5	6,81	45,1	9,17	5,9	0	
4	9,57	9,05	14,9	13,9	20,0	18,7	5,7	0	
ST		H ₂ (%)		H ₂ (ml)		ml H ₂ / g VS		pH finale	
Generazione	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st	media	dev.st	
1	33,8	0,79	67,5	3,22	90,9	4,34	6,63	0,06	
2	11,2	8,16	12,6	8,70	17,0	11,7	6,07	0,12	
3	20,8	9,79	39,7	28,0	53,4	37,7	5,90	0,00	
4	26,9	0,21	38,4	0,29	51,7	0,39	5,50	0,00	

La produzione di idrogeno nelle diverse generazioni risulta avere un andamento estremamente variabile. Ad eccezione della prima generazione, in cui i valori di resa sono confrontabili con quelli ottenuti dal pool microbico di origine (91,7 ml H₂/gVS), le successive mostrano un abbassamento delle rese.

È interessante anche notare i risultati relativi alla seconda generazione. In questo esperimento le analisi di produzione di idrogeno sono state effettuate solo alle 72 ore, il tempo in cui si ottiene la massima produzione di idrogeno e non negli intervalli di tempo precedenti (24 e 48 ore). Come si può osservare le rese sono molto più basse, e ciò è probabilmente dovuto ad un'inibizione della produzione di idrogeno dovuta ad un aumento della pressione parziale di tale gas nello spazio di testa dei reattori.

Nelle generazioni successive, per l'insalata TQ, si osserva un incremento della produzione d'idrogeno alla terza generazione e un rilevante decremento alla quarta. Allo stesso modo, con il substrato sterilizzato si verifica un incremento alla terza generazione che però rimane costante alla quarta e sensibilmente più basso rispetto alla prima. È possibile fare tre ipotesi per i substrati alle due condizioni:

- l'effetto inibente della pressione parziale dell'H₂, alla seconda generazione, ha selezionato un inoculo di idrogeno produttori meno efficienti
- la maggiore pressione parziale dell'H₂, alla seconda generazione, ha selezionato una comunità di acetogeni, consumatori di idrogeno e CO₂
- il passaggio alle 72 ore, tempo di massima produzione, seleziona un inoculo in cui la comunità di microorganismi idrolitici è scarsamente presente. Effettivamente l'obiettivo di questo studio è di selezionare una comunità idrolitica e di produzione di idrogeno sintrofica. Tuttavia l'attività idrolitica, propedeutica alla produzione di idrogeno, è probabilmente espressa soprattutto all'inizio della fermentazione e quindi molto prima della massima produzione volumetrica.

È stato impostato un nuovo piano sperimentale, attualmente in corso, per verificare le ipotesi suddette.

2.3 Obiettivo A.2.1: Studio e sperimentazione di metodi biologici per la purificazione del biogas

Il lavoro sperimentale, volto a sviluppare questa attività di ricerca, ha avuto l'obiettivo di abbattere l'idrogeno solforato (H₂S) nel biogas tramite il processo di fotosintesi anossigenica operato dai solfobatteri [53; 54]. In questa attività viene utilizzato un approccio innovativo in quanto si utilizzano ai fini del processo lunghezze d'onda selezionate.

Nell'ambito di tale attività si è proceduto allo studio e alla caratterizzazione della curva di crescita della specie *Chlorobium limicola* su terreni specifici per solfobatteri anaerobi obbligati utilizzando un illuminatore dotato di LED monocromatici. Inoltre, si stanno sviluppando le metodiche per la coltivazione di *Marichromatium purpuratum* un solfobatterio appartenente al gruppo dei *purple* [55].

La maggiore criticità temporale di questa linea di ricerca è stata determinata dalla necessità di acquistare un Gas Cromatografo (GC) dedicato al rilevamento dell'idrogeno solforato. Lo strumento è stato ordinato e presto sarà installato nei nostri laboratori.

Per questo motivo è stato necessario mettere a punto sistemi di coltivazione in batch e una tecnica efficace per monitorare la capacità di rimozione dello ione solfuro dal mezzo di coltura

Tali prove sono preliminari alla messa in funzione sia del fotobioreattore a LED monocromatici realizzato su progetto ENEA UTRINN BIO sia all'allestimento del gas cromatografo per il monitoraggio in continuo dell'H₂S presente nel biogas.

Materiali e metodi

Due ceppi di *Chlorobium limicola*, DSM 245T e 248, sono stati riattivati a partire da campioni di colture liofilizzate della DSMZ (Leibniz Institute DSMZ- German Collection of microorganisms and Cell Cultures) in batch da circa 100ml. In tutte le fasi, riattivazione-reinocolo-coltivazione, sono state mantenute le condizioni di anaerobiosi necessarie per questo tipo di batteri.

Il terreno di coltura utilizzato, specifico per *green sulfur bacteria*, è il Pfennig II, preparato secondo il protocollo fornito da DSMZ. Inoltre, sono state effettuate prove aggiungendo al terreno di coltura estratto di lievito (1-5 g/l) per monitorare lo sviluppo della coltura ed il consumo di ione solfuro in tale condizione sperimentale.

I batch sono stati posti in un illuminatore dotato di LED monocromatici alle lunghezze d'onda riportate in tabella 12. Le misure di emissione sono state effettuate utilizzando lo spettrofotometro QE65000, Ocean Optics.

Tabella 1 Lunghezza d'onda e flusso fotonico dei LED installati nell'illuminatore. In verde sono riportati i valori adottati per i *green sulfur bacteria*, in porpora quelli usati per i *purple*

nm	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
400	32,904
720	20,000
800	0,077
900	0,067
1000	0,039

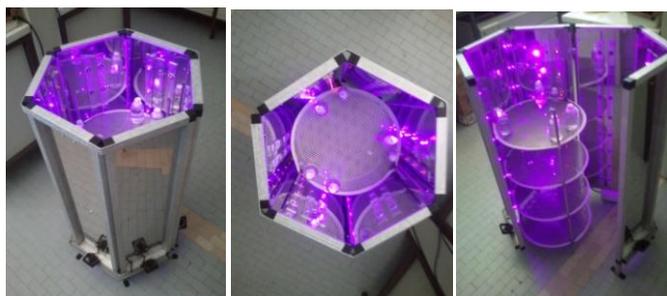


Fig. 12 Fotobioreattore con Illuminatore a LED

Lo sviluppo delle colture è stato monitorato con tecniche di microscopia in epifluorescenza con il microscopio AXIOSKOP 40 (Zeiss, Germany) dotato di lampada al mercurio (HBO 50/AC). Le immagini sono state ottenute con fotocamera digitale (Zeiss AxioCam MCR, Axio Cam MRm, Zeiss, Germany) e processate attraverso il software Axio Vision (Axio Cam MR, Zeiss, Germany).

Per la colorazione delle cellule è stato usato il colorante DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole) specifico per il DNA.

Per determinare la capacità di utilizzo dello zolfo è stato messo a punto un protocollo basato sull'utilizzo della cromatografia ionica con lo strumento Metrohm IC 761 dotato di colonna Metrosep A supp 4, rivelatore conduttimetrico (con precedente soppressione chimica), eluente Na_2CO_3 1.8mmol/litro / NaHCO_3 1.7 mmol/litro con flusso eluente: 1.2 ml/min.

Per la coltivazione di *Marichromatium purpuratum* (DSM 1711) è stato utilizzato il terreno specifico Pfennig I DSMZ.

Sono stati effettuati diversi tentativi di riattivazione dei ceppi batterici in quanto lo sviluppo delle colture di *C. limicola* inizialmente non ha dato buoni risultati probabilmente per la scarsa qualità del materiale liofilizzato pervenuto in laboratorio.

I ceppi batterici appena riattivati (Figura 13a) mostrano cellule isolate senza la tipica colorazione gialla dovuta alla formazione dello zolfo elementare (Figura 13b) che si rileva quando il processo fotosintetico è attivo.

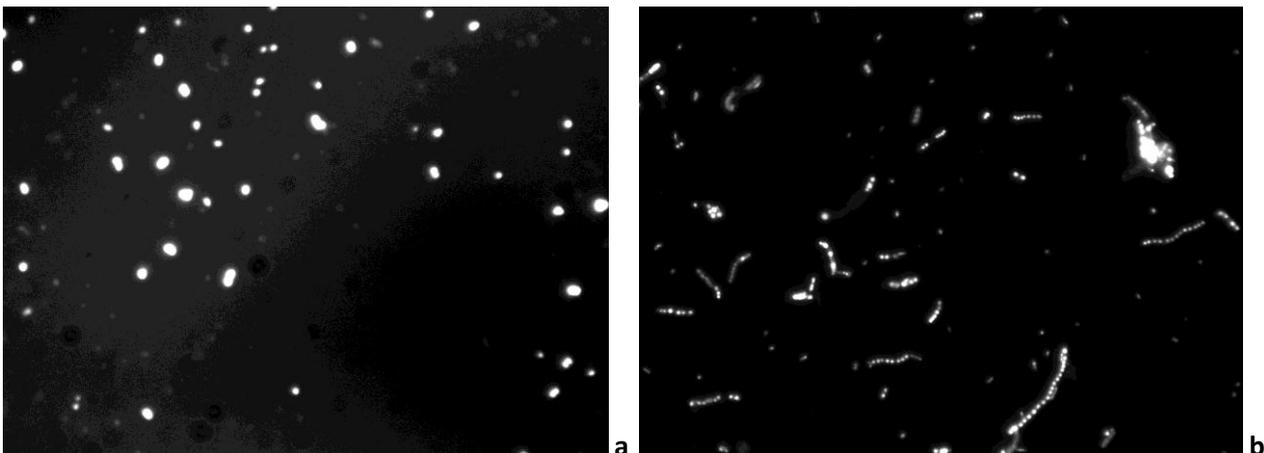


Figura 13 *C. limicola* osservato al microscopio ad epifluorescenza con colorazione DAPI e ingrandimento 100X. In a) le cellule della coltura appena inocolata dopo la riattivazione, in b) cellule attive con tipica granulazione.

Come mostrato in figura14, dopo una settimana dall'inoculo la coltura in *batch* mostra una colorazione verde diffusa che successivamente si affievolisce mostrando la presenza di flocculi, tipici degli aggregati delle cellule batteriche (Figura 14).



Fig. 14 Colture di *C. limicola* in *batch* da 100ml: a sinistra coltura di circa una settimana che mostra la tipica colorazione verde, a destra coltura di circa due settimane con presenza di flocculi.

Con l'obiettivo di aumentare i volumi di coltura sono stati anche allestiti batch da 500ml ottenendo buoni risultati (Fig. 15).



Fig. 15 Coltura di *C. limicola* in batch da 500ml.

Il consumo di solfuri, monitorato col metodo della cromatografia ionica, è illustrato in Figura 16. A partire dalla concentrazione di circa 80 ppm presente nel terreno di coltura, in circa un mese e mezzo si ottiene il consumo totale di ione solfuro.

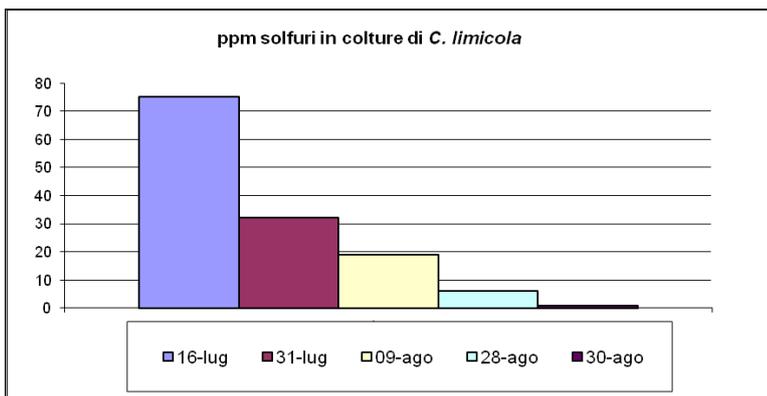


Fig. 16 Consumo di ioni solfuro del ceppo *C. limicola* allevato in batch

La coltivazione di *Marichromatium purpuratum* ha prodotto risultati migliori con l'arrivo di nuovi ceppi nel mese di settembre 2012 (Figura 17). Sono state ottenute colture con una rilevante densità cellulare e verrà presto operato lo *scaling up*.

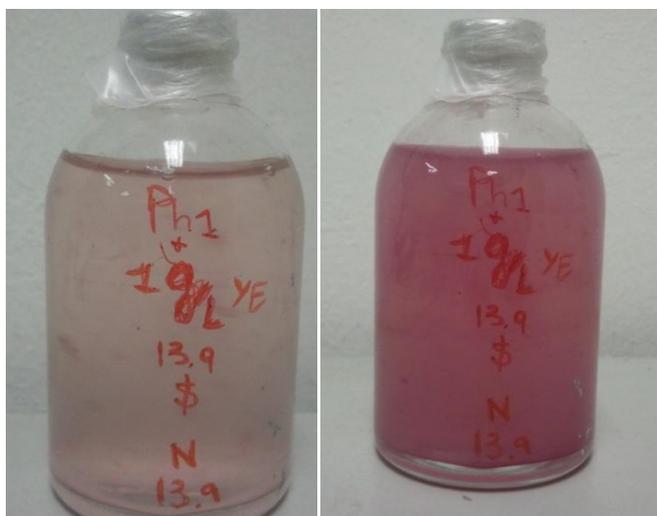


Fig. 17 Colture di *M. purpuratum* in *batch* da 100ml: a sinistra coltura appena inocolata, a destra coltura di circa due settimane che mostra la tipica colorazione dovuta all'aumento della densità cellulare.

In sintesi, la coltivazione in *batch* di *C. limicola* ha dato buoni risultati in termini di volumi di coltura realizzati. E' stata monitorata la capacità di rimozione dello ione solfuro dal mezzo di coltura con una concentrazione iniziale di 80ppm. Il passo successivo sarà quello di aumentare tale concentrazione di base per verificare la tolleranza di *C. limicola* all'idrogeno solforato [56].]. Per quanto riguarda la coltivazione di *Marichromatium purpuratum*, i risultati ottenuti consentono di avviare le prove per valutare la capacità di rimozione del solfuro così come si è proceduto per *C. limicola*.

Conclusioni

Le attività riguardanti lo sviluppo di sistemi di produzione del biogas sono state finalizzate al raggiungimento degli obiettivi di seguito riportati: ottimizzazione del processo di digestione anaerobica (obiettivo A2.3); studio di processi di digestione anaerobica innovativi in grado di utilizzare biomasse lignocellulosiche (obiettivo A2.4); studio e sperimentazione di metodi biologici per la purificazione del biogas (obiettivo A2.1).

I risultati di questo lavoro hanno fornito indicazioni utili per incrementare la produzione di metano sia a singolo che a doppio stadio. Inoltre è stato sviluppato uno strumento predittivo che consente di stimare il range all'interno del quale si possono miscelare vari substrati offrendo un notevole vantaggio dal punto di vista della gestione efficiente del processo.

Parallelamente, mediante tecniche di biologia molecolare, sono state individuate composizione e diversità microbica degli inoculi GM e F₂₁₀ utilizzati per la produzione di idrogeno. Sia GM, ottenuto da un fango di depurazione con un procedimento di arricchimenti successivi su glicerolo grezzo tal quale, sia F₂₁₀ selezionato da sedimenti marini per acclimatazione in reattore in continuo (CSTR) utilizzando il glucosio come substrato risultano contenere *Gammaproteobacteria*: più in particolare GM risulta dominato dalla comunità di *Gammaproteobacteria* (90% dei cloni isolati) costituita dai generi *Klebsiella* ed *Escherichia/Shigella*, e dalla comunità di *Betaproteobacteria* (10%) costituita dal genere *Cupriavidus*; F₂₁₀ è caratterizzato da una comunità di *Gammaproteobacteria* (55%) costituita dal genere *Enterobacter* e da una comunità di *Clostridia* (44%) costituita dal genere *Clostridium*.

Riguardo ai processi di digestione anaerobica di biomasse lignocellulosiche sono state svolte sperimentazioni mirate sia alla idrolisi della lignina che della cellulosa. L'attività sperimentale riguardante l'idrolisi della lignina, svolta in collaborazione con l'Università della Tuscia, è stata focalizzata sull'utilizzo di funghi "white-rot", in condizioni aerobiche. I risultati sperimentali suggeriscono l'utilizzo di mix fungine per potenziare e diversificare l'attività idrolitica su substrati ricchi di lignina. L'attività di idrolisi riguardante la cellulosa è stata focalizzata sulla selezione di comunità batteriche idrolitiche anaerobiche utilizzando un approccio ecologico: l'autofermentazione del rifiuto vegetale. Il principale risultato raggiunto è stata la selezione di un efficiente pool microbico capace di idrolizzare e produrre idrogeno da residui vegetali con rese molto elevate.

La linea di ricerca dedicata alla purificazione del biogas esplora un nuovo metodo biologico per l'abbattimento dell'idrogeno solforato (H₂S) nel biogas: la fotosintesi anossigenica. Nell'ambito di tale attività si è proceduto alla messa a punto di tecniche colturali di due ceppi di *Chlorobium limicola*, per monitorare la loro capacità di rimozione dello ione solfuro dal mezzo di coltura. A partire dalla concentrazione di circa 80 ppm di ione solfuro presente nel terreno di coltura in circa un mese e mezzo se ne ottiene il consumo totale. Nelle prime due settimane si assiste ad un abbattimento della sua concentrazione del 62,5%.

Riferimenti bibliografici

- [1] P. Weiland, "Biogas production: Current state and perspectives", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 4 (2010), pp. 849-860.
- [2] E. Comino, M. Rosso, V. Riggio, "Development of a pilot scale anaerobic digester for biogas production from cow manure and whey mix", *Bioresource Technology*, 100; (21) 2009, pp. 5072-5078.
- [3] APHA 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC, USA: American Public Health Association: 2005.
- [4] C.M. Pan, Y.T. Fan, Y. Xing, H.W. Hou, M.L. Zhang, "Statistical optimization of process parameters on bio-hydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2.", *Bioresour Technol*, 99 (2008), PP. 3146-54.
- [5] V.C. Kalia, S.R. Jain, A. Kumar, A.P. Joshi, "Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10 (2), (1994), pp. 224-227.
- [6] B.E. Logan, S.-E. Oh, I.S. Kim, S. Van Ginkel, "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers", *Environmental Science and Technology*, 36 (11), (2002), pp. 2530-2535.
- [7] AAVV "Valorizzazione bioenergetica degli scarti agrozootecnici". Ricerca di Sistema Elettrico Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA. Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente. Progetto: Studi sulla produzione elettrica locale da biomasse e scarti. Settembre 2011 Report RdS/2011/268.
- [8] N. Saitou, M. Nei, "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", *Molecular biology and evolution* 4 (4), (1987), pp. 406-425.
- [9] M. Kimura, "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences", *Journal of Molecular Evolution* 16(2), (1980), pp. 111-120.
- [10] A. Marone, G. Massini, C. Patriarca, A. Signorini, C. Varrone, G. Izzo, "Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities", *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), (2012), pp. 5612-5622.
- [11] B.P. Tracy, S.W. Jones, A.G. Fast, D.C. Indurthi, E.T. Papoutsakis, "Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications", *Current Opinion in Biotechnology*, 23, (2012), pp. 364-381.
- [12] S. Hunger, A.S. Gößner and H.L. Drake, "Trophic Links between the Acetogen *Clostridium glycolicum* KHa and the Fermentative Anaerobe *Bacteroides xylanolyticus* KHb, Isolated from Hawaiian Forest Soil", *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), (2011), pp. 6281-6285. ▽
- [14] C. Varrone, B. Giussani, G. Izzo, G. Massini, A. Marone, A. Signorini, A. Wang, "Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture", *International Journal of Hydrogen Energy*, (2012), in press.
- [15] C. Varrone, F. Flocchetti, S. Rosa, B. Giussani, G. Izzo, G. Massini, A. Marone, A. Signorini, A. Wang, "Enrichment of activity sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol". *International Journal of Hydrogen Energy*, (submitted).
- [16] Z.L. Xiu, B.H. Song, Z.T. Wang, L.H. Sun, E.M. Feng, A.P. Zeng, "Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* in one- and two-stage anaerobic cultures", *Biochemical Engineering Journal*, 19(3), (2004), pp. 189-197.
- [17] B.R. Oh, J.W. Seo, S.Y. Heo, W.K. Hong, L.H. Luo, M.H. Joe, D.H. Park, C.H. Kim, "Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain", *Bioresource Technology*, 102(4), (2011), pp. 3918-3922.
- [18] K.J. Wu, Y.H. Lin, Y.C. Lo, C.Y. Chen, W.M. Chen, J.S. Chang, "Converting glycerol into hydrogen, ethanol, and diols with a *Klebsiella* sp. HE1 strain via anaerobic fermentation", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 42(1), (2011), pp. 20-25.
- [19] F. Liu, B. Fang, "Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*", *Biotechnology Journal* 2(3), (2007), pp. 374-380.

- [20]T. Chookaew, S. O-Thong, P. Prasertsan, "Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant *Klebsiella pneumoniae* TR17", *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(18), (2012), pp. 13314–13322.
- [21]D.M. Rossi, J.B. da Costa, E.A. de Souza, M.C.R. Peralba, D. Samios, M.A. Ayub, "Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(8), (2011), pp. 4814–4819.
- [22]Y. Dharmadi, A. Murarka, R. Gonzalez, "Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering", *Biotechnology and Bioengineering* 94(5), (2006), pp. 821-829.
- [23]S. Shams Yazdani, R. Gonzalez, "Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products", *Metabolic Engineering* 10(6), (2008), pp. 340-351.
- [24]C. Miyake Nakayama, S. Masujima, H. Ikatsu, S.-I. Miyoshi, S. Shinoda, "Isolation and characterization of a new dichloromethane degrading bacterium, *Ralstonia metallidurans*, PD11", *Biocontrol Science* 9(4), (2004), pp. 89-93.
- [25]L. Diels, S. Van Roy, S. Taghavi, R. Van Houdt, "From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*", *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 96(2), (2009), pp. 247-258.
- [26]Valdez-Vazquez, H.M. Poggi-Varaldo, "Hydrogen production by fermentative consortia", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(5), (2009), pp. 1000–1013.
- [27]R.S. Prakasham, T. Sathish, P. Brahmaiah, Ch. Subba Rao, R. Sreenivas Rao, P.J. Hobbs, "Biohydrogen production from renewable agri-waste blend: Optimization using mixer design", *International Journal of Hydrogen Energy* 34 (15), (2009), pp. 6143-6148.
- [28]B. Demirel, P. Scherera, O. Yenigunb, T. Onay, "Production of Methane and Hydrogen from Biomass through Conventional and High-Rate Anaerobic Digestion Processes", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(2), (2010), pp. 116-146.
- [29]Z. Bagi, N. Ács, B. Bálint, L. Horváth, K. Dobó, K.R. Perei, G. Rákhely, K.L Kovács, "Biotechnological intensification of biogas production", *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(2), (2007), pp. 473-482.
- [30]H. Yokoyama, M. Waki, N. Moriya, T. Yasuda, Y. Tanaka, K. Haga, "Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry", *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(2), (2007), pp. 474-483.
- [31]Y. Xing, Z. Li, Y. Fan, H. Hou, "Biohydrogen production from dairy manures with acidification pretreatment by anaerobic fermentation", *Environmental Science and Pollution Research* 17 (2) , (2010), pp. 392-399.
- [32]J.A. Bassham, "Cellulose as a chemical and energy source. General considerations.", In Wilke C.R. (ed.) Wiley, New York, (1975), pp. 9-19.
- [33]N.W. Lutzen, M.H. Nielsen, K-M. Oxiboell, M. Schiilein, B.S. Olessen. "Cellulase and their application in the conversion of lignocelluloses to fermentable sugars.", *Philos. Trans. R. Soc. London*, 300 (1983), 283.
- [34]I.S. Goldstein, "Organic chemicals from biomass.", CRC Press, Boca Raton, (1981).
- [35]P.J. Colberg, "Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives." In Zehnder A.J.B. (ed.), "Biology of anaerobic microorganisms.", John Wiley & Sons, New York, (1988), pp. 333-372.
- [36]M.E. Himmel, M.F. Ruth, C.E. Wyman, "Cellulase for commodity products from cellulosic biomass.", *Curr. Opin. Biotechnol*, 10(4), (1999), pp. 358-64.
- [37]Y. Nishiyama, P. Langan, H. Chanzy, "Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction.", *J. Am. Chem. Soc.* 124(31), (2002), pp. 9074-9082.
- [38]S.Y. Ding, M.E. Himmel, "The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization.", *J. Agric. Food Chem.* 54(3), (2006), pp. 597-606.

- [39]M.E. Himmel, W.S. Adney, J.O. Baker, "Advanced Bioethanol Production Technologies: A Perspective.", In Saha B.C. and Woodward J. (eds.). Fuels and Chemicals from Biomass. Vol. 666 of American Chemical Society Symposium Series (ACS, Washington DC), (1997), pp. 2-45.
- [40]P.A.M. Claassen, J.B. van Lier, A.M. Lopez Contreras, E.W.J. van Niel, L. Sijtsma, A.J.M. Stams, S.S. de Vries, R.A. Weusthuis, "Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52(6) , (1999), pp. 741-755.
- [41]L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. van Zyl, I.S. Pretorius, "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.", Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66(3), (2002), pp. 506-577.
- [42]A. Marone, G. Izzo, G. Massini, C. Patriarca, S. Rosa, C. Varrone, A. Signorini, "Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production." Atti del 4th "World Hydrogen Technologies Convention" (WHTC-2011), 14-16 settembre 2011, (2011), Glasgow, Scotland.
- [43]H. Yokoyama, M. Waki, A. Ogino, H. Ohmori, Y. Tanaka, "Hydrogen Fermentation Properties of Undiluted Cow Dung.", J Bioscience Bioeng, 104 (2007), pp. 82-85.
- [44]S. Shimizu, A. Fujisawa, O. Mizuno, T. Kameda, T. Yoshioka, "Fermentative hydrogen production from food waste without inocula.", AIP Conference Proceedings, 987 (2008), pp. 171-174.
- [45]S. Sittijunda, A. Reunggsang, S. O-thong, "Biohydrogen production from dual digestion pretreatment of poultry slaughterhouse sludge by anaerobic self-fermentation.", Int J Hydrogen Energy, 35 (2010), pp. 13427-13434.
- [46]D.H. Kim, S.H. Kim, H.S. Shin, "Hydrogen fermentation of food waste without inoculums addition.", Enzyme and Microb Technol, 45 (2009), pp. 181-187.
- [47]B. Xiao, J. Liu, "Biological hydrogen production from sterilized sewage sludge by anaerobic self-fermentation.", J Hazard Mater, 168 (2009), pp. 163-167.
- [48]G. Antonopoulou, H.N. Gavala, L.V. Skiadas, K. Angelopoulos, S. Lyberato, "Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass.", Bioresour Technol, 99 (2008)a, pp. 99:110-11.
- [49]G. Antonopoulou, K. Stamatelatu, N. Venetsaneas, M. Kornaros, G. Lyberatos, "Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process.", Ind Eng Chem Res, 47 (2008)b, pp. 5227-5233.
- [50]X. Wang, Y. Zhao, "A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process.", Int J Hydrogen Energy, 34 (2009), pp. 245-254.
- [51]A. Ohnishi, Y. Bando, N. Fujimoto, M. Suzuki, "Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora.", Int J Hydrogen energy, 35 (2010), pp. 8544-8553.
- [52]K. Stamatelatu, G. Antonopoulou, A. Tremouli, G. Lyberatos, "Production of gaseous biofuels and electricity from cheese whey.", Ind Eng Chem Res, 50 (2011); pp. 639-644.
- [53]D. Cork, J. Mathers, A. Maka, A. Anna Srnak, "Control of Oxidative Sulfur Metabolism of Chlorobium limicola forma thiosulfatophilum", Applied And Environmental Microbiology, 4(2), (1985), pp. 269-272.
- [54]M.A. Syed, G. Soreanu, P. Falletta, M. Béland, "Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes - A review", Canadian Biosystems Engineering, 48 (2006), PP. 2.1-2.14.
- [55]J.F. Imhoff, "The Family Ectothiorhodospiraceae", Prokaryotes, 6 (2006), pP.874-886.
- [56]M.A. Syed, P.F. Henshaw, "Effect of tube size on performance of a fixed-film tubular bioreactor for conversion of hydrogen sulfide to elemental sulfur", Water Research, 37 (2003), pP. 1932-1938.