



## Ricerca di Sistema elettrico

# Valorizzazione bioenergetica di scarti agrozootecnici

*Aliboni A. , Cinquepalmi S., De Luca E., Felici C., Fiocchetti F.,  
Izzo G., Marone A., Massini G., Mazzurco Miritana V.,  
Mentuccia L., Patriarca C., Palumbo A., Rosa S., Sgulò V.,  
Signorini A., Varrone C.*

VALORIZZAZIONE BIOENERGETICA DI SCARTI AGROZOOTECNICI

A. Aliboni, S. Cinquepalmi, E. De Luca, C. Felici, F. Fiocchetti, G. Izzo, A. Marone, G. Massini, V. Mazzurco Miritana, L. Mentuccia, C. Patriarca, A. Palumbo, S. Rosa, V. Sgulò, A. Signorini, C. Varrone (ENEA)

Settembre 2013

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2012

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Sviluppo di sistemi per la produzione di energia elettrica da biomasse e l'upgrading dei biocombustibili

Obiettivo: Sviluppo di sistemi di produzione dell'energia elettrica e cogenerativi

Responsabile del Progetto: Vito Pignatelli, ENEA

## Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE.....	6
2 SPERIMENTAZIONE DELLA DIGESTIONE ANAEROBICA IN IMPIANTO PILOTA DOPPIO STADIO .....	7
2.1 L'IMPIANTO PILOTA .....	8
2.2 ANALISI DEL BIOGAS .....	9
2.3 IMPREVISTI E PROBLEMATICHE DI ESERCIZIO.....	10
2.4 CARATTERIZZAZIONE DEL SUBSTRATO .....	10
2.5 LA SPERIMENTAZIONE .....	11
2.6 STUDIO DI MISCELE DI SCARTI DI CODIGESTIONE.....	15
2.6.1 <i>Impianto bifase</i> .....	15
2.6.2 <i>Ottimizzazione statistica della miscelazione di detti substrati per la produzione di metano</i> .....	15
2.6.3 <i>Metodologie e risultati ottenuti</i> .....	23
2.7 CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DEL CONSORZIO MICROBICO GCL .....	26
2.7.1 <i>Attività pregressa ed avanzamento del lavoro</i> .....	26
2.7.2 <i>Procedura sperimentale</i> .....	27
2.7.3 <i>Metodi analitici</i> .....	28
2.7.4 <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)</i> .....	30
2.7.5 <i>Isolamento dei ceppi puri e caratterizzazione</i> .....	30
2.7.7 <i>Conta batterica</i> .....	31
2.7.8 <i>Risultati</i> .....	31
2.7.9 <i>Diluizione dell'inoculo: il minimo consorzio funzionale</i> .....	33
2.7.10 <i>Analisi molecolare della comunità microbica nelle prove di diluizione dell'inoculo</i> .....	36
2.7.11 <i>Ricostruzione dell'inoculo GCL</i> .....	36
2.7.12 <i>Conclusioni</i> .....	43
2.8 STUDIO DI PROCESSI DI DIGESTIONE ANAEROBICA INNOVATIVI DA BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE .....	45
2.8.1 <i>Idrolisi fungina in aerobiosi e produzione di idrogeno da scarti lignocellulosici e chitinici</i> .....	45
2.8.2 <i>Isolamento e coltivazione di funghi anaerobi da rumine bovino</i> .....	48
2.8.3 <i>Metodologie e risultati ottenuti</i> .....	48
2.8.4 <i>Idrolisi batterica</i> .....	54
2.8.5 <i>Metodi e Risultati</i> .....	55
2.9 STUDIO E SPERIMENTAZIONE DI METODI BIOLOGICI PER LA PURIFICAZIONE DEL BIOGAS.....	63
2.9.1 <i>Metodologie e risultati ottenuti</i> .....	63
2.9.2 <i>Analisi della capacità di abbattimento dell'H<sub>2</sub>S</i> .....	65
2.9.3 <i>Conclusioni</i> .....	69
3 CONCLUSIONI.....	70
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	72

## Sommario

Le attività di ricerca presentate in questo lavoro hanno indagato ed approfondito lo studio del processo di Digestione Anaerobica (DA) con un approccio interdisciplinare. Tutte le linee di ricerca intraprese hanno puntato al miglioramento, all'ottimizzazione e all'innovazione della DA, tenendo anche in considerazione che il contesto socio-economico attuale deve valorizzare la pianificazione energetica e la ciclizzazione delle biomasse di scarto.

Le attività del laboratorio UTRINN-BIO sono state finalizzate all'intera filiera della DA: dalla scelta dei substrati, attraverso lo studio ed il miglioramento delle varie fasi del processo di cui è composta (idrolisi, fermentazione, acetogenesi, metanogenesi), alla purificazione del biogas e alla valorizzazione dei sottoprodotti liquidi, solidi e gassosi.

Una parte delle attività è stata finalizzata all'approfondimento dei risultati già ottenuti nelle precedenti annualità della Ricerca di Sistema Elettrico e riguarda l'uso della statistica per l'ottimizzazione del processo di produzione di idrogeno e metano da scarti agro-zootecnici, lo studio della cooperazione metabolica tra comunità batteriche nella fase di acidogenesi per la produzione di idrogeno ed etanolo dal glicerolo grezzo, l'idrolisi batterica anaerobia e quella fungina aerobia di biomasse lignocellulosiche e chitinarie nonché lo studio sull'abbattimento biologico dell' $H_2S$  prodotto nel processo di produzione di biogas.

Sono state poi introdotte quattro nuove linee di ricerca riguardanti: la costruzione di un impianto pilota bistadio per lo studio del processo di produzione di metano a singolo e doppio stadio dalla sola scotta, refluo dell'attività lattiero-casearia; l'utilizzo di funghi anaerobi per l'idrolisi delle biomasse lignocellulosiche; lo sviluppo della tecnica FISH per l'analisi delle comunità batteriche nei due stadi del processo di digestione anaerobica; l'abbattimento biologico in continuo dell' $H_2S$  dal biogas dell'impianto pilota.

I risultati ottenuti possono così essere riassunti:

- su base statistica si può affermare che l'ottimizzazione del primo stadio ad idrogeno, effettuata tramite un disegno sperimentale finalizzato alla opportuna miscelazione di scarti agro-zootecnici, è anche ottimizzazione del processo di produzione di metano nel secondo stadio.
- La produzione di metano da sola scotta è un processo fattibile ai fini della produzione energetica e della valorizzazione dei reflui delle aziende lattiero casearie.
- La produzione di idrogeno e metano dalla scotta apre interessanti prospettive per la produzione del biocarburante "idrometano".
- La procedura dell'arricchimento da un fango attivo per selezionare un inoculo efficiente per la produzione di idrogeno ed etanolo da glicerolo grezzo si è rilevata una metodologia valida per produrre un inoculo *specializzato*, che costituisce di *per se'* il minimo consorzio funzionale. Le prove di fermentazione condotte con le singole comunità isolate dall'inoculo GCL hanno avuto lo scopo di chiarire l'entità dei meccanismi di cooperazione e di stimare i limiti e le potenzialità di impiegare, per una fermentazione anerobica ottimale, un consorzio microbico piuttosto che le singole popolazioni.
- L'autofermentazione di biomasse cellulosiche si conferma un processo valido per le produzioni di idrogeno e si è dimostrata funzionale alla selezione di batteri cellulolitici utili per il potenziamento della fase di idrolisi della DA.
- Il pretrattamento aerobico di biomasse lignocellulosiche con una mix di funghi *white rot* non mostra grande efficacia
- L'abbattimento dell' $H_2S$  con l'utilizzo di un illuminatore a LED monocromatici è un processo fattibile ed a basso costo energetico.

Inoltre, sono state sviluppate delle tecniche analitiche e microbiologiche che permettono di espandere la capacità di indagine finalizzate al miglioramento delle tecnologie per la Digestione Anaerobica.

In particolare, sono stati messi a punto i seguenti protocolli:

1. isolamento e sviluppo di funghi anaerobi per potenziare l'idrolisi delle biomasse lignocellulosiche;
2. tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization – Microscopia in Fluorescenza) per lo studio dei cambiamenti in composizione, struttura e funzione delle comunità batteriche attive nella DA;
3. determinazione dei solfuri disciolti mediante analisi gas-cromatografiche.
4. A livello impiantistico si sta studiando e ottimizzando il funzionamento di:
  - a) un impianto pilota bistadio per reflui liquidi: 8 litri per il 1° stadio I; 60 litri per il 2° stadio;
  - b) un reattore per l'abbattimento dell' H<sub>2</sub>S in continuo (3L).

## 1 Introduzione

Le attività del nostro laboratorio sono finalizzate all'ottimizzazione dell'intera filiera della Digestione Anaerobica (DA) attraverso lo studio ed il miglioramento delle varie fasi del processo che vanno dalle indagini sugli scarti, miscele e eventuali pretrattamenti, idrolisi, fermentazione, acetogenesi, metanogenesi, purificazione del biogas e valorizzazione dei sottoprodotti liquidi e solidi. L'approccio che seguiamo, è quello della "Eco-biotechnology", che si prefigge di lavorare con processi che prevedono l'uso di colture microbiche miste (più pratiche da gestire a livello industriale), applicando i principi dell'ecologia microbica, e combinando così la metodologia delle biotecnologie ambientali con i *target* delle biotecnologie industriali (Johnson et al., 2009). Questa impostazione ispira tutte le attività descritte. Pertanto, nel paragrafo 2.1 si descrive la sperimentazione condotta con la tecnologia innovativa dell'impianto bistadio (o bifase) dove la fermentazione acidogenica è separata dalla metanogenesi, nei paragrafi 2.3 e 2.4 le indagini in microscopia con tecniche immunofluorescenti e molecolari che servono a correlare i parametri di funzionamento degli impianti all'ecologia microbica che ne guida i processi, nel paragrafo 2.5 gli esperimenti di idrolisi batterica e fungina che hanno l'obiettivo di trovare un metodo di pretrattamento industriale utile a far rilasciare maggiori quantità di energia dai substrati e nel paragrafo 2.6 lo sviluppo di una nuova tecnica biologica per trasformare il biogas in biometano. Infine va aggiunto, anche se non è parte dell'Accordo di Programma 2012, che il nostro laboratorio lavora intensamente anche sulla valorizzazione dei sottoprodotti liquidi e solidi ed ha depositato un brevetto di un nuovo processo di abbattimento dell'azoto il 10 Agosto 2013.

## 2 Sperimentazione della digestione anaerobica in impianto pilota doppio stadio

L'attività di ricerca ha avuto il duplice obiettivo di effettuare lo *scaling up* del processo di produzione di idrogeno e metano dalla scotta e di verificarne la sostenibilità in continuo. La scelta di utilizzare come substrato la scotta è derivata da una parte dalle conoscenze acquisite nel campo delle bioraffinerie e dall'altro dall'incontro con i gestori delle aziende lattiero-casearie.

La consapevolezza del declino di una economia basata sulle risorse non rinnovabili, rende ormai urgente pensare a cicli produttivi sostenibili sia ecologicamente che energeticamente, concetto racchiuso nel recente termine di "bioraffineria".

Secondo la definizione adottata dall'Agenzia Internazionale dell'Energia (IEA Bioenergy, task 42, 2008) con questo termine si intende la trasformazione sostenibile di biomasse in uno spettro di prodotti per il mercato e l'energia.

Le Bioraffinerie sono state inizialmente suddivise in:

- *energy-driven* (obiettivo principale: produzione di biocarburanti/energia).
- *product-driven* (obiettivo principale: produzione di alimenti/mangimi/chimica/materiali).

Nello sviluppo successivo del concetto di bioraffineria il prodotto finale di un processo non viene considerato uno scarto, bensì fonte o punto di partenza per un successivo processo che porterà alla trasformazione in ulteriori prodotti a più alto valore aggiunto, in una produzione integrata di biocarburanti, bioenergia, alimenti, mangimi, biomateriali (Figura 1)

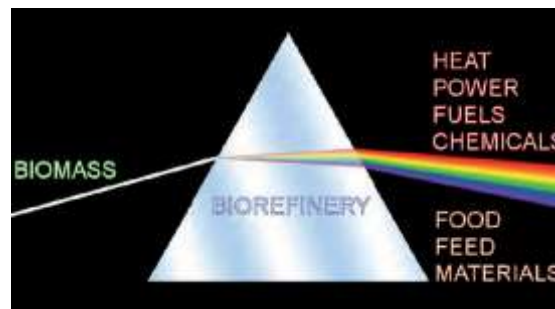


Figura 1 Concetto di bioraffineria

In questo contesto le aziende lattiero casearie, come tutte le attività economiche di vecchia concezione, possono essere considerate delle bioraffinerie *product-driven*. L'utilizzo del residuo della lavorazione del latte (siero di latte e scotta) per la produzione di bioenergia consentirebbe la trasformazione delle aziende in bioraffinerie *energy* e *product driven*. E' inoltre importante sottolineare che i caseifici devono ormai sostenere un significativo impegno economico per lo smaltimento dei reflui. La possibilità di produrre biogas per tali aziende rappresenterebbe un notevole risparmio associato, inoltre, alla possibilità di utilizzare l'energia elettrica e il calore prodotti all'interno dell'azienda stessa.

## 2.1 L'impianto pilota

L'impianto utilizzato per questa attività di ricerca, è stato ideato e costruito all'interno del centro della Casaccia facendo uso per la massima parte di materiale già disponibile ed in disuso (Figura 2).



Figura 2. Impianto bifase

Un carrello di acciaio 1200x600x900 è stato adattato per ospitare in maniera compatta tutti i componenti necessari per l'impianto. L'impianto consta di:

- Un reattore (R1) cilindrico flangiato in plexiglass 520  $\Phi$ 140 (8 litri), detto 1° stadio e destinato alla produzione di idrogeno dotato di: otto uscite, sei superiori, e due inferiori, termoregolazione con termocoppia di processo e termocoppia di sicurezza, pH-metro, misuratore di pressione a zero centrale, agitatore meccanico a foro passante, coibente.
- Un reattore (R2) tronco conico in acciaio inox di 50 litri, detto 2° stadio, destinato alla produzione di metano, dotato di 6 uscite superiori e di 2 uscite inferiori, termoregolazione con termocoppia di processo e termocoppia di sicurezza, pH-metro, misuratore di pressione a zero centrale, coibente, livello-stato, colonna esterna indicatore di livello, elettrovalvola di scarico.
- Un serbatoio (F1) in PE (25 litri) refrigerato e coibentato per lo stoccaggio dell'alimentazione.
- Un termo-criostato per la refrigerazione attraverso serpentina immersa in F1 dell'alimentazione.
- Pompa peristaltica controllata ad inverter per l'agitazione del primo stadio.
- Pompa peristaltica controllata ad inverter per l'agitazione del secondo stadio.
- Essiccatori a gel di silice per la disidratazione dei gas prodotti.
- Pompa per la correzione dei pH nei reattori.
- Due flussimetri digitali per il controllo e la misura dei gas prodotti.
- Gas cromatografo in linea per il monitoraggio in continuo dei prodotti.
- Pompe per la movimentazione da F1 a R1 e da R1 a R2.



## 2.2 Analisi del biogas

Per le analisi dei seguenti gas: H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, ed anche, se presenti, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> e CO, si è utilizzato un micro GC della Varian (GC4900).

Rispetto ai comuni GC da banco, questo strumento presenta le seguenti caratteristiche:

- Non presenta un sistema di vaporizzazione dei campioni iniettati, per cui può analizzare solo campioni allo stato gassoso.
- Non consente rampe di temperature, ma solo relativamente di flussi, per cui non consente l'analisi contemporanea di gas con caratteristiche troppo diverse fra di loro.
- Presenta due colonne (vedi dopo la descrizione) relativamente corte (10 m): questo, unito alla buona risoluzione separativa delle suddette colonne, consente tempi di eluizione, e quindi di misurazione, abbastanza brevi; un'analisi per quantificare i suddetti gas può durare circa due minuti. Questo consente di seguire l'andamento di reazioni che evolvono questi gas con cinetiche nell'ordine di grandezza dei minuti.
- Il GC è equipaggiato con un sistema di aspirazione dei gas prodotti che consente l'analisi in continuo delle reazioni.

Visto il principio di funzionamento, questa apparecchiatura è particolarmente adatta per lo studio in tempo reale di reazioni che producono composti gassosi.

Una volta aspirato, il campione gassoso viene egualmente suddiviso ed iniettato in due colonne capillari alla fine delle quali è posizionato un rivelatore TCD (uno per colonna).

La prima colonna è una MS 5A dove la fase stazionaria è costituita da setacci molecolari (molecular sieve, MS, silicati di alluminio e sodio, che possono contenere anche ioni calcio). In questo modo è possibile separare i gas permanenti a basso peso molecolare, come, nel caso specifico, idrogeno, ossigeno, azoto e metano.

La seconda colonna è una poraplot U, la fase stazionaria è basata su di un polimero poroso (divinil benzene). In genere è utilizzata per la separazione di volatili polari, questa colonna non separa quasi per niente idrogeno, ossigeno ed azoto fra di loro, ma risolve benissimo la CO<sub>2</sub> dagli altri gas presenti, e, nel nostro caso, è usato per questo scopo.

Il rivelatore a termoconduttività (Thermo Conductivity Detector (TCD)), è un rivelatore sensibile alla concentrazione dell'analita, universale e non distruttivo. Il suo funzionamento dipende dalla differente conducibilità termica di varie specie gassose. E' formato da due filamenti, uno attraversato da *carrier* puro, l'altro dal gas in uscita dalla colonna (*carrier* più campione). I filamenti sono parte di un ponte di Wheatstone (circuito elettrico bilanciato). Quando il campione attraversa il filamento si ha una differente conduzione di calore dal filamento stesso. La temperatura del filamento varia, variando quindi anche la resistenza. Questo sbilanciamento elettrico è amplificato e mandato al software. In definitiva, il segnale fornito dal rivelatore è direttamente proporzionale alla concentrazione degli analiti (il rapporto segnale/concentrazione si determina con opportuni standard gassosi a composizione nota). Come detto, il TCD è un rivelatore universale, ma la sua sensibilità, che dipende dal gas *carrier* e dal gas da rilevare, è relativamente bassa. In genere, è difficile misurare bene sopra lo 0,1%. Per gli scopi del presente lavoro, viste le concentrazioni gassose da monitorare, il TCD è il detector adatto.

Come *carrier gas* si usa l'argon, questo è un buon compromesso considerando l'efficienza di separazione richiesta, il detector usato e le specie da separare.

### 2.3 Imprevisti e problematiche di esercizio

L'impianto fin dal suo primo avvio ha subito modifiche continue per far fronte alle difficoltà che *in itinere* si sono rivelate. Brevemente vengono riportate cronologicamente le più importanti e le soluzioni adottate.

#### **Otturazione tubi del circuito di agitazione del secondo stadio**

L'avvio del impianto avviene a partire dalla carica del secondo stadio con una miscela di liquame, acqua, scotta ed inoculi; il liquame contiene una parte di detrito vegetale non digerito, costituito per lo più da fibre vegetali che se pur di dimensioni inferiori ai lumi delle tubazioni, per ragioni idrodinamiche in alcuni punti del circuito si ammassano e bloccano il circuito di agitazione.

Soluzione: filtraggio dei liquami prima del caricamento.

#### **Incertezza delle quantità di digestato allo scarico del secondo stadio**

Inizialmente il flusso dello scarico doveva essere controllato tramite pompa peristaltica a tre teste coassiali che avrebbero dovuto garantire flussi identici tra F1 e R1 tra R1 e R2 e tra R2 e lo scarico.

Dopo numerosi tentativi di registro e regolazione non si è potuto ottenere la eguaglianza dei flussi. Ciò probabilmente per via delle differenze di pressioni insistenti ( $\Delta h$  e perdite di carico) nei tratti di circuito di competenza delle singole teste.

Prima soluzione proposta: scarico per troppo pieno con guardia idraulica sifonata (in anaerobiosi) per il tratto R2 e scarico (19-03- 2013).

Lo scarico era dipendente e sensibile alla pressione interna all' R2 e anche registrando l'altezza dello scarico per compensare detta pressione, il flusso in uscita risultava ancora instabile.

Seconda soluzione: Scarico con elettrovalvola comandata da livello-stato (15-05-2013).

Soluzione efficace, ma dipendente dall'orifizio dell'elettrovalvola sensibile quindi all'accumulo di aggregati detritici. Soluzione finale: interposizione di recipiente di decantazione (14-06-2013).

#### **Misura del pH in situ inattendibile**

La sonda del pH-metro è soggetta ad incrostazioni e crescite biologiche localizzate.

Si è cercato di posizionarla sotto il getto del rientro dell'agitazione a ricircolo ma le misurazioni sono risultate inattendibili. Il controllo del pH veniva eseguito con misurazioni giornaliere sugli effluenti di entrambi gli stadi. La regolazione veniva effettuata con l'aggiunta di  $\text{NaHCO}_3$  nell'alimentazione per il reattore R2. Per il reattore R1 si utilizzava il tampone fosfato 0,1 M.

### 2.4 Caratterizzazione del substrato

Il sottoprodotto risultante dalla lavorazione della ricotta, "ricotta cheese whey" (RCW) o "scotta", è la frazione liquida rimanente dopo la produzione di ricotta ottenuta per trattamento termico (85-90 °C per circa 25 minuti) del siero con aggiunta di siero di latte acido, latte fresco e/o panna, la frazione lipidica del latte e una soluzione acida di sali. Dopo questo processo l'effluente, la scotta, ha delle caratteristiche fisico-chimiche molto diverse dal siero di latte. In particolare, la scotta è caratterizzata da un contenuto proteico molto inferiore e un contenuto di acidi organici più elevato e possiede ancora un carico organico molto elevato (BOD: 50 g/l; COD: 80 g/l), tale da necessitarne ulteriori impieghi e/o trasformazioni al fine di diminuire i costi industriali legati al suo trasporto e smaltimento. Si stima che la produzione italiana ammonti a circa 1 milioni di tonnellate l'anno (Sansonetti et al., 2009).

In tabella 1 vengono riportate le principali caratteristiche chimico-fisiche della scotta, fornita dall'azienda Formaggi Boccea s.r.l Roma. La determinazione dei solidi totali (TS), volatili (VS) e del COD dei substrati è stata effettuata secondo APHA, 2005. Il contenuto in proteine è stato determinato secondo la metodica proposta da Bradford (1976) e quello in lipidi secondo il metodo Rose-Gottlieb (GU 407, 1992).

**Tabella 1 Range dei principali parametri chimico-fisici dei substrati utilizzati**

pH		5,41-6,37
Densità a 15 °C	g/ml	1,020-1,026
TS	% w/w	5,2-6,7
VS	% w/w	4,5-5,8
COD	g O <sub>2</sub> /l	78-90
Lattosio	g/l	40-53
Proteine	g/l	7-9
Lipidi	g/l	0,53-0,76

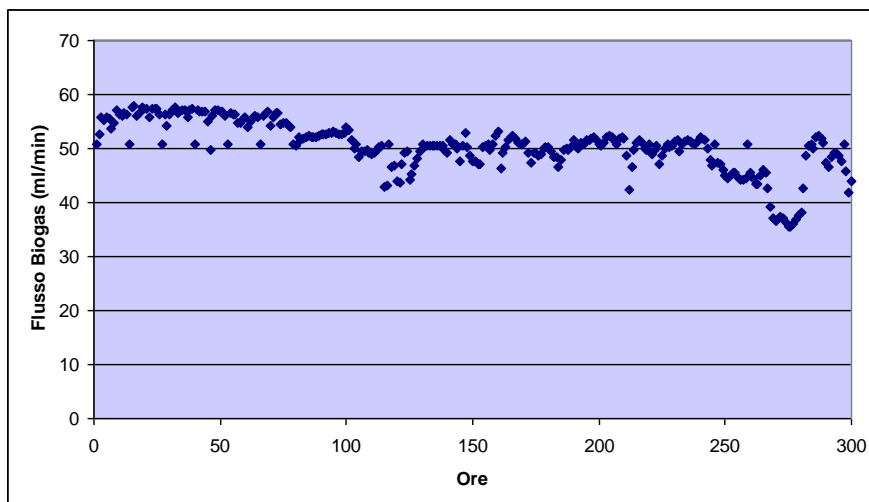
## 2.5 La sperimentazione

Una prima parte dell'attività è stata effettuata per valutare la potenziale produzione di solo metano in un processo in continuo da scotta, un residuo ad alte concentrazioni di lattosio (40-54 g/l), debolmente acido (pH = 4,8-5,6) e quindi non idoneo per i microorganismi produttori di metano. La sperimentazione è stata effettuata a concentrazioni crescenti di lattosio.

Il reattore a metano veniva avviato secondo le indicazioni fornite dalle sperimentazioni effettuate nello scorso anno (Aliboni et al. 2012). In sintesi, ad una miscela di scotta diluita (5g/l lattosio) e di inoculo di metano produttori (liquame) veniva aggiunto un inoculo selezionato di idrogeno produttori (F<sub>210</sub>) costituito da microorganismi appartenenti agli ordini *Enterobacteriales* e *Clostridiales* (Aliboni et al. 2012). Entrambi gli inoculi erano aggiunti in proporzione del 20% del volume totale di lavoro del reattore a metano (50 l).

I risultati hanno mostrato la fattibilità del processo con i valori più elevati di produzione di metano dalla scotta tal quale. I dati sono stati raccolti durante una sperimentazione durata 12 giorni con un tempo di ritenzione (HRT) di 16,7 giorni. I dati di flusso riportati in ml/min sono la media di valori registrati in continuo ogni 10 minuti (Figura 3). I dati di composizione volumetrica del biogas sono registrazioni effettuate in continuo ogni due ore (Figura 4). Sono stati ottenuti 0,78 NL CH<sub>4</sub>/L giorno, flussi medi di biogas di 50,5±4,8 ml/min e un contenuto di metano del 52±2%. I dati di flessione nella produzione di biogas, osservati in figura 2 sono dovuti allo scarico effettuato con la regolazione del troppo pieno.

Il controllo del pH veniva eseguito con misurazioni giornaliere sull' effluente. La regolazione veniva effettuata con l'aggiunta di NaHCO<sub>3</sub> nell'alimentazione (5-10g/l).



**Figura 3. Flusso di biogas (ml/min) da scotta t.q. (dati dal 6-18 giugno 2013)**

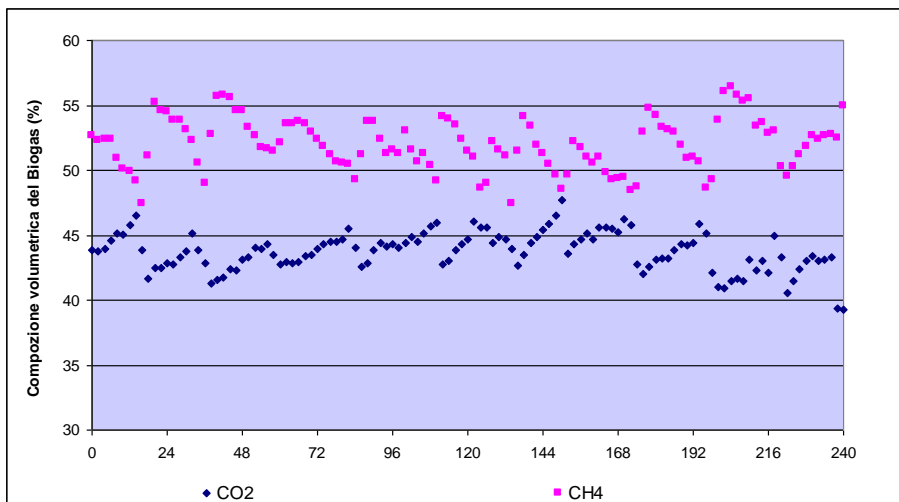


Figura 4. Composizione volumetrica del biogas (%) da scotta t.q. (dati dal 6-18 giugno 2013)

In una seconda parte dell'attività di ricerca è stata sperimentata la produzione di idrogeno e metano, in un processo in continuo. A fronte dei risultati ottenuti per la produzione di metano a singolo stadio con scotta t.q., si è avviata la sperimentazione nelle stesse condizioni sperimentali (scotta t.q., HRT-H<sub>2</sub>=1 giorno, HRT CH<sub>4</sub>=16,7 giorni). Anche per il reattore a idrogeno il controllo del pH veniva eseguito con misurazioni giornaliere sull' effluente. La regolazione veniva effettuata a monte con l'aggiunta del tampone fosfato 0,1M alla scotta. Tuttavia, durante la sperimentazione si è dovuto intervenire con l'aggiunta di NaOH 1N. La sperimentazione è durata circa 2 giorni.

Sono stati ottenuti 0,12 NI H<sub>2</sub>/l giorno, flussi medi di biogas di 2,22±1,10 ml/min e un contenuto di idrogeno medio del 15±7,5%. La misurazione della composizione del biogas del I stadio veniva effettuata giornalmente in quanto la differenza di flusso tra il I e il II stadio non consentiva la sua rilevazione in continuo nel gas cromatografo posto a valle della convergenza dei rispettivi flussi.

Per la fase a metano sono state ottenute produzioni di 0,62 NI CH<sub>4</sub>/l giorno, flussi medi di biogas di 40±4 ml/min e un contenuto di metano del 55±2% (Fig 5-6). Il pH del reattore a metano variava tra 6,4-6,8.

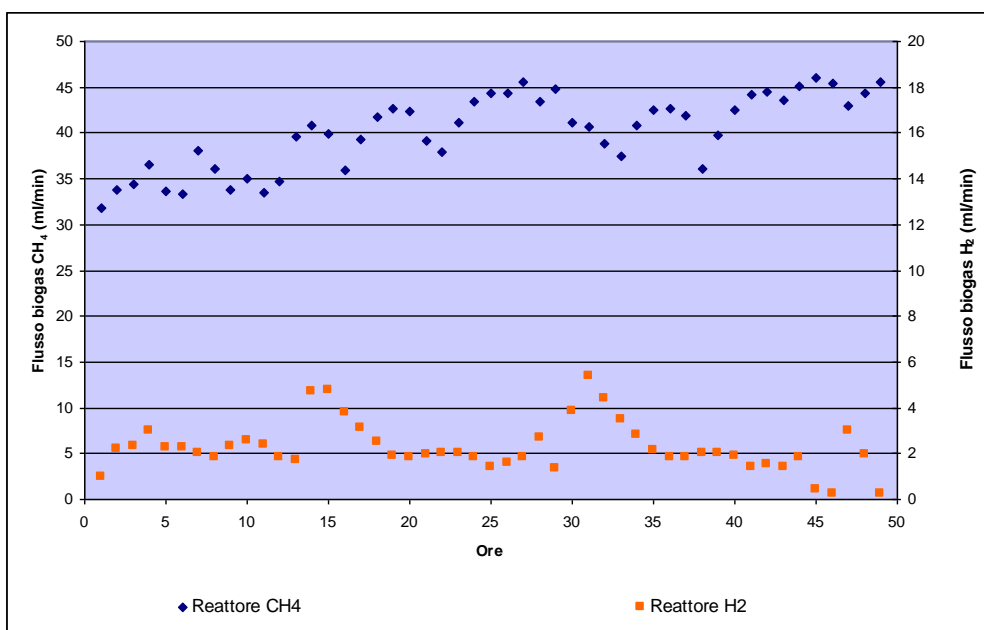
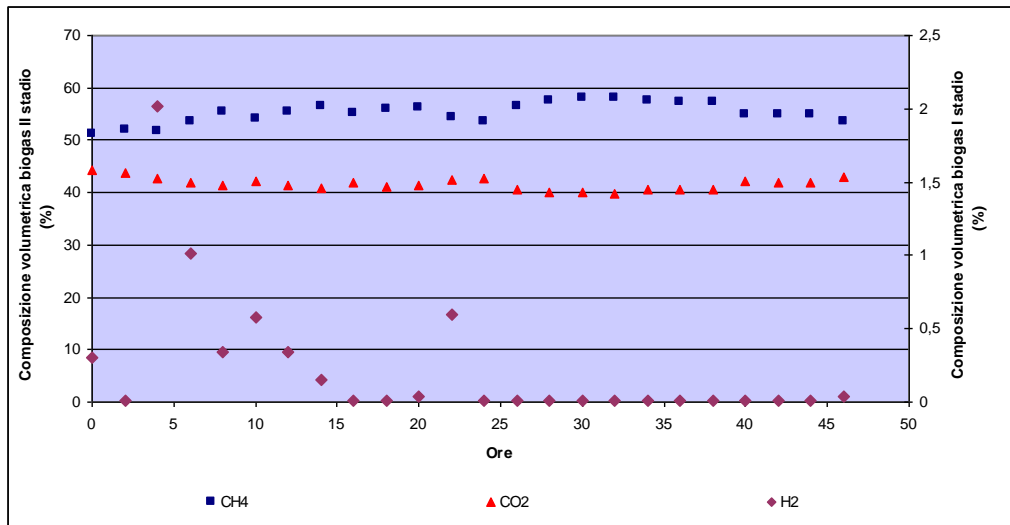


Figura 5. Flusso di biogas (ml/min) da scotta t.q. nel reattore I e II (dati dal 26-28 giugno 2013)



**Figura 6. Composizione volumetrica del biogas (%) da scotta t.q. alla confluenza dei flussi del reattore i e II**

Come si può osservare dal grafico che descrive l'andamento della produzione di idrogeno al 1° stadio, il processo è molto instabile, con istantanei aumenti del flusso di biogas fino a valori di 4-5 ml/min. Tali innalzamenti venivano osservati quando il pH veniva riportato in torno a 4,5-5 con l'aggiunta di NaOH. La sperimentazione si è interrotta per un abbassamento del pH a un valore di 3,8.

La sperimentazione è stata avviata altre due volte ma l'impossibilità di controllare il pH in automatico ha reso impossibile prolungare il processo per più di due giorni.

Si è quindi proseguito con la produzione di idrogeno e metano a concentrazioni crescenti di lattosio e con tempi di ritenzione idraulica di 1 e 15 giorni per il I e II stadio, rispettivamente.

La sperimentazione è partita con la scotta ad una concentrazione di lattosio di 10 g/l.

In Figura 7 e 8 sono riportati gli andamenti dei flussi e la composizione volumetrica della produzione di idrogeno e metano alla concentrazione di 10g/l di lattosio. La produzione è proseguita per 9 giorni, anche se si può osservare una flessione rilevante nella produzione di biogas nel I stadio al sesto giorno, dovuti alla fuoriuscita del sensore della temperatura dal liquido. I dati si sono voluti comunque mostrare per evidenziare come un evento, come una diminuzione di flusso avvenuta dall'alimentazione al I stadio, comprometta la sperimentazione stessa.

Sono stati ottenuti per il I stadio 0,40 NI di H<sub>2</sub>/l giorno, flussi medi di biogas di 2,28±1,54 ml/min e un contenuto di idrogeno medio del 41,6%. Il pH della fase ad idrogeno oscillava tra 4,3-4,5. Per la fase a metano sono state ottenute produzioni di 0,24 NI CH<sub>4</sub>/l giorno, flussi medi di biogas di 12,7±2,7 ml/min e un contenuto di metano del 67,8%. La composizione volumetrica media del biogas (%) alla convergenza dei due flussi era di 5,5±4,6 per l'H<sub>2</sub> e di 59±5,5 per il CH<sub>4</sub>. Inoltre si è osservato che il pH acido (4,3-4,5) dell'effluente dello stadio I non alterava quello della fase a metano, che si manteneva stabile intorno ad un valore di 6,9-7,1 senza richiedere l'aggiunta di soluzioni tampone.

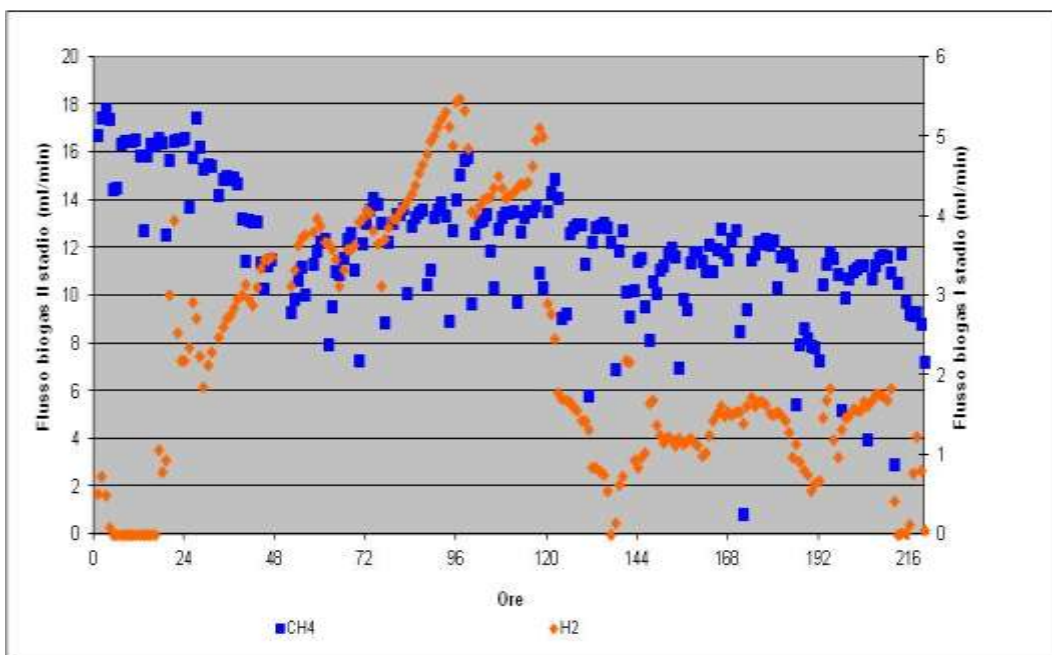


Figura 7. Flusso di biogas (ml/min) da scotta (10g/l lattosio) nel reattore I e II

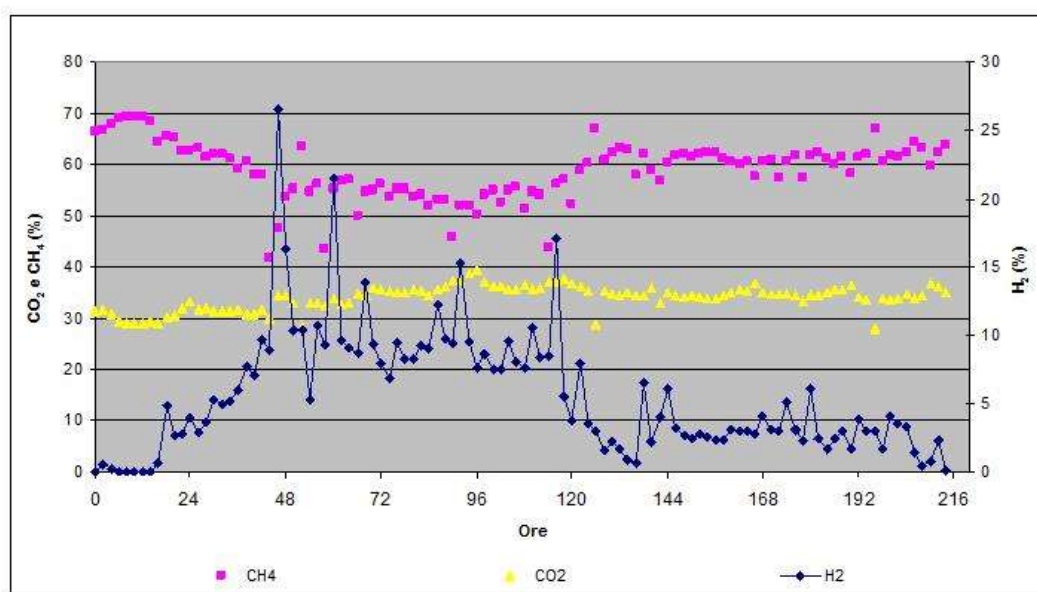


Figura 8. Composizione volumetrica del biogas (%) da scotta (10g/l lattosio) alla confluenza dei flussi del reattore i e II

Da questi primi e preliminari risultati emergono delle indicazioni interessanti:

- La produzione di metano sia a singolo stadio, è un processo fattibile ai fini della produzione energetica e della valorizzazione dei reflui delle aziende lattiero casearie.
- La separazione della fase idrolitica/acidogenica, finalizzata alla produzione di idrogeno, da quella metanogenica apre delle buone prospettive sulla produzione del biocarburante idrometano.
- I risultati della produzione di idrogeno e metano dalla scotta aprono delle buone prospettive sulla produzione di idrometano.

La sperimentazione è tutt'ora in corso ed ha come obiettivi:

- la stabilizzazione della fase di produzione di idrogeno e metano tramite l'acquisto di un sistema di controllo automatico del pH
- l'arricchimento della% di metano (biometano) nel biogas tramite gorgogliamento del biogas all'uscita del reattore a idrogeno (contenente una miscela di H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) nella fase liquida del II stadio.
- La sperimentazione dell'impianto a doppio stadio con inversione dei processi in quanto la scotta è un refluo che contiene elevate concentrazioni di acidi, in particolare, citrico e lattico che sicuramente diminuiscono l'efficienza di produzione di idrogeno incidendo sul valore di pH.
- Testare in batch la produzione di idrogeno e metano in termofilia.

## 2.6 Studio di miscele di scarti di codigestione

### 2.6.1 Impianto bifase

La finalità dell'impianto bifase è stato quello della "Realizzazione di un impianto per la digestione anaerobica atto ad aumentare l'efficienza della degradazione di scarti agro-zootecnici (liquame, letame, glicerolo e scotta) per la conversione in biogas, mediante un processo a doppio stadio: un primo stadio per la fermentazione ad idrogeno; un secondo stadio, alimentato con l'effluente organico del primo, per la metanogenesi".

L'uso di un impianto a doppio stadio dovrebbe permettere infatti di aumentare l'efficienza del processo, dato che nel primo reattore la fermentazione ad idrogeno consente la rapida liberazione di acidi organici e alcoli con tempi di ritenzione di 24-48 ore, che immessi nel secondo stadio incrementerebbero la produzione di metano.

Le attività progettuali sviluppate, su scala di laboratorio, hanno riguardato quindi l'ottimizzazione della tipologia di processo prima descritta, la sua modellazione e la realizzazione, nell'ambito di un progetto MipAAF (SOS-ZOOT scheda Marea) di un impianto su scala pilota per la produzione di idrogeno e metano da reflui agro zootecnici in codigestione. L'impianto pilota è stato già completato ed è disponibile per le previste campagne sperimentali. In questo contesto lo studio ha riguardato i seguenti due aspetti:

- ottimizzazione statistica della miscelazione di detti substrati per la produzione di metano;
- elaborazione dati e sviluppo di un modello statistico multivariato inerente il processo di produzione di idrogeno da letame, in sostituzione del liquame, in codigestione con reflui caseari (scotta) e scarti della produzione di biodiesel (glicerolo).

### 2.6.2 Ottimizzazione statistica della miscelazione di detti substrati per la produzione di metano

Uno degli obiettivi prefissati nella precedente (Aliboni A. et al. 2012) era stato quello di effettuare un'ottimizzazione statistica della composizione dei substrati selezionati (liquame, scotta, glicerolo) per la produzione di idrogeno. A tal fine era stato utilizzato il modello statistico *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.

I risultati mostravano come la massima produzione di idrogeno si otteneva miscelando il 66% di scotta con 33% di liquame (max. sperimentale), con un massimo teorico ottenuto con il 70% di scotta ed il 30% di liquame.

La superficie di risposta ottimale (ottenuta usando il modello del *Mixture Design*) mostrava inoltre la possibilità di miscelare i substrati in modo diverso, a seconda delle rispettive disponibilità, pur mantenendo la massima produzione entro un range ottimale, sufficientemente ampio (Tabella 2).

Come si può osservare, il maggior contributo alla produzione di H<sub>2</sub> veniva indubbiamente dalla scotta. Infatti, la percentuale massima che consentiva di rimanere all'interno della superficie di risposta ottimale era pari al 92%, con 8% di liquame. Per quanto riguarda quest'ultimo, la composizione ottimale può raggiungere al massimo il 54%, insieme con il 46% di scotta. Il contributo del glicerolo, invece, era modesto, con una percentuale massima pari al 28%, insieme al 16% di liquame e 56% di scotta.

**Tabella 2. Range ottimali dei 3 substrati ai fini della produzione di H<sub>2</sub>**

	% min	% max
LIQUAME	8	54
SCOTTA	46	92
GLICEROLO	0	28

In tabella 3 sono riportati i valori di fine fermentazione dei principali metaboliti prodotti durante il processo di produzione di idrogeno nelle diverse condizioni testate. Come mostrato, in tutte le condizioni sperimentali si rilevava 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 sembrava 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 rilevava in concentrazioni piuttosto elevate mentre l'acido lattico si riscontrava solo in piccole quantità. Come atteso, l'1,3 propandiolo (ed in parte anche il 2,3 butandiolo), metabolita associato al pathway metabolico della degradazione del glicerolo, si riscontrava unicamente nelle prove contenenti tale substrato.

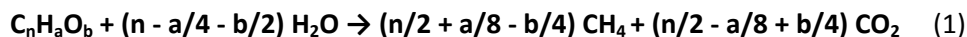
**Tabella 3. Metaboliti prodotti (espressi in ppm) a fine fermentazione nelle diverse condizioni sperimentali. 1,3 PD = 1,3 propandiolo; 2,3 BD = 2,3 butandiolo. La D.S. era ≤ 20%**

	Liquame (%VS)	Scotta (%VS)	Glicerolo (%VS)	succinico	lattico	formico	acetico	propionico	butirrico	1,PD	2,3BD	etanolo
Complete	33,3	33,3	33,3	154	0	371	658	514	2140	1437	0	0
Edge 01	66,7	33,3	0	183	1,73	455	1153	2182	2025	0	0	109
Edge 02	33,3	66,7	0	100	47,9	582	882	2841	2043	0	1504	506
Edge 03	66,7	0	33,3	4,56	0	213	469	401	2190	3034	0	162
Edge 04	0	66,7	33,3	216	101	78,1	637	2,56	1756	0	2998	87,7
Edge 05	33,3	0	66,7	70,8	0	137	482	126	1572	3744	0	0
Edge 06	0	33,3	66,7	64,7	37,9	51,5	696	9,01	1348	72,9	1324	30,9
Vertice 01	100,0	0	0	0	5,12	78,1	1121	1200	161	0	0	158
Vertice 02	0	100,0	0	623	803	308	720	168	1403	0	3974	0
Vertice 03	0	0	100,0	0	133	67,9	471	11,6	1479	2204	2046	19,3

Come precedentemente affermato, uno degli obiettivi dell'attività di ricerca di questo laboratorio è l'ottimizzazione di un processo a doppio stadio, accoppiando la *dark fermentation* alla digestione anaerobica, per la conversione degli scarti in H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. Si è, quindi, voluto verificare la potenzialità di produzione di CH<sub>4</sub> a partire dai prodotti di fermentazione ottenuti (Tabella 3) dagli esperimenti effettuati per l'ottimizzazione statistica della produzione di idrogeno da liquame, scotta e glicerolo e di cui sopra, è riportata una breve sintesi.



A tale scopo si è applicata l'equazione di *Buswell* (Buswell e Mueller, 1952) per calcolare la produzione teorica di metano dai metaboliti prodotti:



E' così possibile ottenere la seguente conversione molare, riportata in Tabella 4.

**Tabella 4. Produzione potenziale di metano (moli) a partire da diversi metaboliti**

Metaboliti	CH <sub>4</sub>
Etanolo	1,5
Butirrico	2,5
Propionico	1,75
Acetico	1
Formico	0,25
1,3 Propandiolo	2
2,3 Butandiolo	1,375
Succinico	1,75
Lattico	1,5

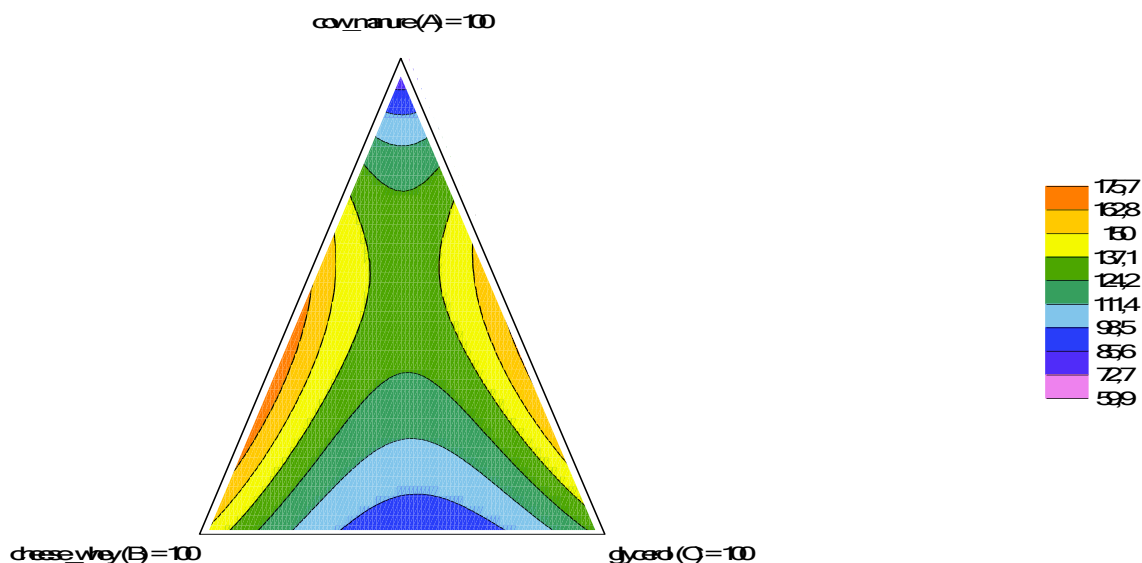
Applicando quindi la conversione per ciascun metabolita, così come riportato in Tabella 5, si otterrà la produzione potenziale di metano (Tabella 5).

**Tabella 5. Produzione potenziale di metano a partire dai metaboliti ottenuti alla fine del processo di produzione di idrogeno**

mmol	CH <sub>4</sub> da succinico	CH <sub>4</sub> da lattico	CH <sub>4</sub> da formico	CH <sub>4</sub> da acetico	CH <sub>4</sub> da propionico	CH <sub>4</sub> da butirrico	CH <sub>4</sub> da 1,3 PD	CH <sub>4</sub> da 2,3 BD	CH <sub>4</sub> da etanolo	Total CH <sub>4</sub>
<b>Complete</b>	2,28	0,00	2,01	10,96	12,14	60,73	37,77	0,00	0,00	<b>125,89</b>
<b>Edge 01</b>	2,71	0,03	2,47	19,20	51,55	57,46	0,00	0,00	3,55	<b>136,97</b>
<b>Edge 02</b>	1,48	0,80	3,16	14,69	67,11	57,97	0,00	22,95	16,47	<b>184,64</b>
<b>Edge 03</b>	0,07	0,00	1,16	7,81	9,47	62,15	79,75	0,00	5,27	<b>165,67</b>
<b>Edge 04</b>	3,20	1,68	0,42	10,61	0,06	49,83	0,00	45,74	2,86	<b>114,40</b>
<b>Edge 05</b>	1,05	0,00	0,74	8,03	2,98	44,61	98,41	0,00	0,00	<b>155,81</b>
<b>Edge 06</b>	0,96	0,63	0,28	11,59	0,21	38,25	1,92	20,20	1,01	<b>75,05</b>
<b>Vertice 01</b>	0,00	0,09	0,42	18,67	28,35	4,57	0,00	0,00	5,14	<b>57,24</b>
<b>Vertice 02</b>	9,23	13,37	1,67	11,99	3,97	39,81	0,00	60,63	0,00	<b>140,68</b>
<b>Vertice 03</b>	0,00	2,21	0,37	7,84	0,27	41,97	57,93	31,22	0,63	<b>142,45</b>

Utilizzando questi dati è stato quindi definito un nuovo modello Mixture Design per l'ottimizzazione statistica della produzione potenziale di CH<sub>4</sub>.

Come è possibile osservare in Figura 9, la superficie di risposta mostra che il massimo (pari a 175,7 mmol CH<sub>4</sub>) è ottenuto con il 74% di scotta e 26% di liquame, in accordo con quanto osservato con l'ottimizzazione della produzione di H<sub>2</sub>. Questo risultato era, in un certo senso, atteso, in quanto la migliore produzione di H<sub>2</sub> è ragionevolmente accompagnata da una più efficiente degradazione del substrato, che a sua volta porterà ad un maggior accumulo di metaboliti disponibili per la metanogenesi. Tuttavia il Mixture Design mostra anche un nuovo aspetto, ovvero il fatto che il glicerolo può dare un importante contributo alla produzione di CH<sub>4</sub>, mentre è del tutto marginale nella *dark fermentation* (per produrre H<sub>2</sub>).



**Figura 9. Superficie di risposta del Mixture Design per la produzione potenziale di CH<sub>4</sub> (mmol).  
A = liquame; B = scotta; C = glicerolo**

La superficie di risposta mostra, infatti, come sia possibile ottenere 167,5 mmol di CH<sub>4</sub> utilizzando il 60% di glicerolo ed il 40% di liquame (escludendo quindi del tutto la scotta). Questo risultato, d'altra parte, è in accordo con numerosi lavori pubblicati su riviste internazionali, che dimostrano l'efficacia dell'uso di glicerolo come co-substrato nella metanogenesi, con incrementi nelle rese che arrivano fino al 400% [1-4] o addirittura all'800% se il substrato viene sonicato [5]. Questa situazione risulta piuttosto vantaggiosa, in quanto consente di lavorare in condizioni ottimali di produzione di H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, consumando tutti e 3 i substrati, mentre qualora non fosse disponibile il glicerolo (cosa molto probabile, presso un'azienda agricola), il disegno sperimentale mostra che è comunque possibile operare in condizioni ottimali e degradare maggiormente scotta e liquame. Nel caso in cui, ipoteticamente, si decidesse invece di non operare con un impianto a doppio stadio, bensì di far avvenire entrambi i processi (inoculando sia batteri metanigeni che H<sub>2</sub> produttori) all'interno di uno stesso reattore (per ridurre i costi), allora non vi è dubbio che la soluzione 70% di scotta con 30% di liquame porterebbe ai migliori risultati.

Al di là dei risultati, è necessario chiaramente anche interrogarsi circa la bontà del modello ottenuto. In Tabella 6 sono riportati i valori teorici di produzione potenziale di metano, calcolati dai dati sperimentali dei metaboliti prodotti nella produzione di idrogeno, insieme a quelli predetti dal modello statistico. Come si può osservare vi è una buona corrispondenza tra i valori teorico-sperimentali e quelli predetti. Ciò viene confermato da un coefficiente di variabilità medio (che misura la corrispondenza tra il valore predetto e quello sperimentale) pari a 101,12%±10,39, il che dimostra come il modello sia in grado di descrivere correttamente il processo reale.

**Tabella 6. Tabella di confronto tra i dati teorico-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 CH4 (mmol)								
Diagnostics	Random Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage(hi)	Student Residual	Cook Distance	Std Order
Complete	1	125,8900	124,0725	1,8175	0,2500	0,1212	0,0007	1
Edge01	2	136,9700	145,6129	-8,6429	0,5476	-0,7680	0,1020	2
Edge02	3	184,6400	175,6671	8,9429	0,5476	0,7680	0,1020	3
Edge03	4	165,6700	148,8386	16,8314	0,5476	1,4455	0,3613	4
Edge04	5	114,4000	97,7157	16,6843	0,5476	1,4328	0,3550	5
Edge05	6	155,8100	172,6414	-16,8314	0,5476	-1,4455	0,3613	6
Edge06	7	75,0500	91,7343	-16,6843	0,5476	-1,4328	0,3550	7
Vertex01	8	57,2400	59,8695	-2,6295	0,9048	-0,4922	0,3287	8
Vertex02	9	140,6800	149,2224	-8,5424	0,9048	-1,5989	0,4693	9
Vertex03	10	142,4500	131,2781	11,1719	0,9048	2,0910	5,9339	10
cp01	11	137,3500	124,0725	13,2775	0,2500	0,8855	0,0373	11
cp02	12	113,6200	124,0725	-10,4525	0,2500	-0,6971	0,0231	12
cp03	13	119,4300	124,0725	-4,6425	0,2500	-0,3096	0,0046	13

Inoltre, ciò viene anche confermato dall'analisi della varianza, la quale mostra un  $R^2$  pari a 0,87 (il che significa che il modello è in grado di descrivere l'87% della variabilità totale del sistema, e questo può essere considerato un ottimo risultato per un modello biologico) ed un valore di p altamente significativo (p-value = 0,016). Inoltre la bontà del modello è anche confermata da un lack of fit nettamente > 0,05 (Tabella 7). Tutto ciò conferma la validità del modello.

**Tabella 7. Analisi della varianza ANOVA**

ANOVA Table - CH4 (mmol)					
ANOVA	SS	DF	MS	F-ratio	p-value
<b>Summary</b>					
Model	12417,8500	6,0000	2069,6420	6,9050	0,0166
Error	1798,3750	6,0000	299,7292		
Corr. total	14216,2200	12,0000			
<b>Variables</b>					
Linear Mixture	439,8812	2,0000	219,9406	0,7338	0,5187
cow_manure*chee	3242,2780	1,0000	3242,2780	10,8174	0,0166
cow_manure*glyc	4350,2090	1,0000	4350,2090	14,5138	0,0089
cheese_whey*glyc	2123,0970	1,0000	2123,0970	7,0834	0,0375
cow_manure*chee	1054,8090	1,0000	1054,8090	3,5192	0,1098
<b>Model check</b>					
Mean	214325,3000	1,0000	214325,3000		
First Order (Linear	439,8812	2,0000	219,9406	0,1597	0,8546
Second Order (Qu	10923,1600	3,0000	3641,0530	8,9330	0,0086
Special Cubic	1054,8090	1,0000	1054,8090	3,5192	0,1098
Full Cubic					
Total	228541,5000	13,0000	17580,1200		
<b>Lack of Fit</b>					
Lack of fit	1492,3770	3,0000	497,4589	4,8771	0,1129
Pure Error	305,9985	3,0000	101,9995		
Error	1798,3750	6,0000	299,7292		
<b>Quality</b>					
Method used	design				
R-square	0,8735				
Adjusted R-square	0,7470				
R-square predictio	-1,0674				
S	17,3127				
Mean	128,4000				
C.V. in %	13,4834				
PRESS	29390,4200				

In conclusione si può dire che il modello Mixture Design dimostra di essere uno strumento operativo molto utile, che può essere applicato efficacemente all'intero processo, permettendo di individuare la migliore composizione dei substrati di scarto, in modo tale da massimizzare la produzione dei biogas target (e così anche l'efficienza di conversione del processo a doppio stadio).

E' quindi possibile ottenere un modello matematico predittivo che consente di inferire i risultati (produzione di H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) per qualsiasi altra composizione della mix di substrati, mentre chiaramente sarebbe stato impossibile effettuare esperimenti per tutte le possibili combinazioni esistenti.

### Elaborazione dati e sviluppo di un modello statistico multivariato inerente il processo di produzione di idrogeno da letame, in sostituzione del liquame, in codigestione con reflui caseari e scarti della produzione di biodiesel (glicerolo)

All'interno dello studio precedente erano stati effettuati degli esperimenti di produzione di idrogeno dalla codigestione di letame, scotta e glicerolo. Tale piano sperimentale era stato, tuttavia, effettuato senza l'utilizzo di un Disegno Sperimentale.

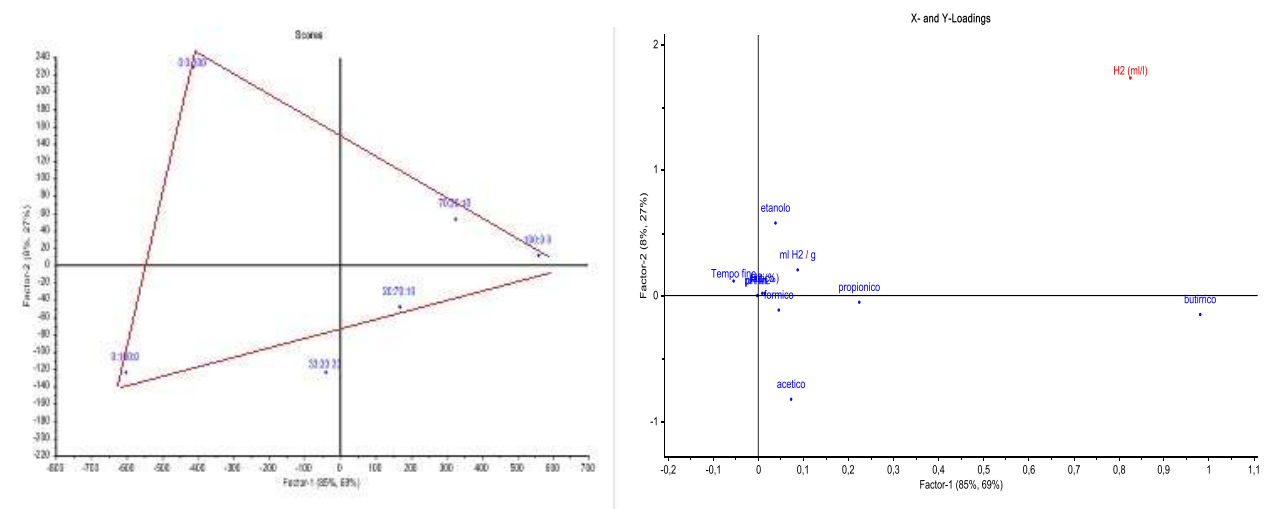
Il ridotto numero di esperimenti prodotti non consentiva di utilizzare i risultati per lo sviluppo del Mixture Design. Si è quindi proceduto all'utilizzo di un modello statistico multivariato che consente di operare anche con un ridotto numero di esperimenti. Si è scelta quindi una regressione PLS (Partial Least Square), che consente di trovare le regressioni multilineari, proiettando la variabile predetta (nel caso in questione la produzione di H<sub>2</sub>) e le variabili osservate, in un nuovo spazio multivariato. In Tabella 8 sono riportati gli esperimenti con i risultati principali ottenuti.

**Tabella 8. Produzione di H<sub>2</sub> sostituendo il liquame con il letame. (Sco=scotta; Let=letame; Gli=glicerolo)**

Substrati	Substrati (%)	Tempo fine produzione (h)	H <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> (ml/l)	ml H <sub>2</sub> / g VS	pH iniziale	pH finale
Sco/Let/Gli	33:33:33	72	34,7	818	102	6,3	5,5
Sco/Let/Gli	70:20:10	72	40,7	1499	170	5,6	4,7
Sco/Let/Gli	20:70:10	72	36,7	924	116	6,5	5,5
Sco/Let/Gli	100:0:0	72	39,2	1447	164,4	6,5	4,7
Sco/Let/Gli	0:100:0	114	17,8	301	37,7	6,8	6,1
Sco/Let/Gli	0:0:100	138	32,4	1037	129,6	8	5,6

Come si può notare, la massima produzione di H<sub>2</sub> era stata ottenuta anche in questo caso con il 70% di scotta (in co-digestione con un 20% di letame e 10% di glicerolo). Tale risultato era in accordo con quanto osservato tramite il modello Mixture Design completo, utilizzando il liquame al posto del letame. Ciò suggerirebbe che i due tipi di substrati possono essere interscambiati senza che si verificano variazioni significative nella produzione di H<sub>2</sub>. Inoltre, anche in questo caso, la scotta si confermava il substrato più adatto, con risultati prossimi al massimo osservato, anche nell'utilizzo di scotta al 100%. Una differenza interessante, invece, riguarda il contributo del glicerolo, che permette di ottenere produzioni elevate se utilizzato come unico substrato.

In Figura 10 è riportato il PLS realizzato utilizzando come predittore il fattore H<sub>2</sub> (ml).

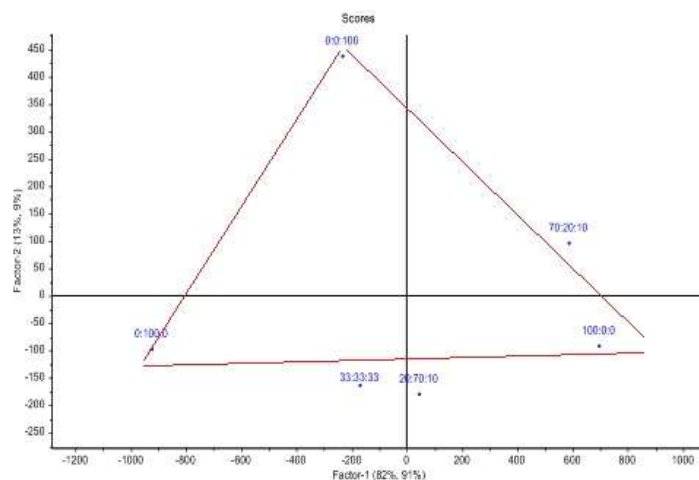


**Figura 10. Regressione multivariata per la produzione di H<sub>2</sub> da letame, scotta e glicerolo**

Come si può osservare, la massima produzione di H<sub>2</sub> sembra essere strettamente correlata con la produzione di acido butirrico, e va nella direzione del maggior utilizzo di scotta nel mix di substrati (in particolare verso l'uso del 70% di scotta, 20% di letame e 10% di glicerolo).

Pur non avendo effettuato tutti gli esperimenti necessari per sviluppare il modello Mixture Design completo, il PLS riesce comunque a modellare piuttosto correttamente la miscelazione dei 3 substrati, raffigurandoli come un triangolo (di miscelazione dei substrati) con ai vertici i rispettivi substrati puri (100% di scotta, 100% di letame e 100% di glicerolo). Ciò è vero soprattutto agli estremi dei range (i vertici), mentre l'esiguo numero di esperimenti non consente di ottenere una stima precisa per i valori intermedi.

Il PLS si è dimostrato comunque uno strumento informativo e snello, che può essere utilmente impiegato in studi od esperimenti preliminari (ad esempio per valutare l'uso di un substrato piuttosto che di un altro, o per valutare l'uso di un determinato range), prima di andare ad effettuare un modello statistico completo, in cui si valutano tutte le possibili combinazioni dei substrati. Ciò è confermato anche dalla Figura 11, in cui viene riportato lo scoreplot del PLS realizzato utilizzando come predittore la resa (ml H<sub>2</sub> / g VS) al posto della produzione di H<sub>2</sub>. In questo caso rimane evidente la struttura triangolare con i vertici ben distinti, mentre rimangono più confuse le condizioni intermedie.



**Figura 11. Scoreplot della regressione multivariata per la resa di H<sub>2</sub> (ml H<sub>2</sub>/g VS) da letame, scotta e glicerolo, che mostra la struttura a triangolo, con i vertici corrispondenti ai substrati puri (100% di scotta, 100% di letame e 100% di glicerolo)**

## Messa a punto della tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) allo studio delle comunità microbiche nella Digestione Anaerobica

Questa linea di ricerca è stata avviata per approfondire le conoscenze sulle dinamiche delle comunità microbiche in relazione ai parametri operativi degli impianti di Digestione Anaerobica (DA). Attualmente infatti si conosce poco su come i differenti taxa di microorganismi coinvolti nel processo di DA interagiscono tra loro e come tali interazioni influenzino l'efficienza del processo: di particolare interesse sono le interazioni obbligate, dette sintrofiche, cioè quelle che conferendo un vantaggio alle parti coinvolte, consentono ai microorganismi di sopravvivere in comunità complesse ed in ambienti estremi anche da un punto di vista termodinamico.

I microorganismi direttamente coinvolti nella produzione di metano appartengono al gruppo degli archea metanigeni all'interno del dominio degli *Archea*. Sono tra i primi organismi comparsi sul pianeta: sono infatti estremofili, cioè in grado di vivere in ambienti molto severi rispetto alle comuni condizioni di vita in fatto di temperatura, pressione, composizione dell'atmosfera. Producono metano partendo da una serie molto ristretta di substrati quali  $H_2/CO_2$ , formato, acetato e alcuni composti metilici. Agli albori della vita sulla terra molto probabilmente l' $H_2$  a loro necessario veniva ottenuto attraverso una "route geochimica", nelle zone delle sorgenti idrotermali suboceaniche mediante il processo di serpentinizzazione. È importante mettere in luce che in termini evolutivi solo successivamente la metanogenesi, attualmente considerata la parte conclusiva dell'intero processo di DA operata da microorganismi, si è agganciata alle attività metaboliche di altri gruppi di microorganismi appartenenti però all'altro dominio evolutivo dei procarioti, quello dei Batteri propriamente detti (Sousa et al., 2013).

Compiendo il passaggio dall'utilizzo di substrati di origine geochimica a quelli generati per via biochimica la metanogenesi si è resa indipendente dalle sorgenti idrotermali e l'intero processo di DA si è evoluto come noi oggi lo conosciamo, operato cioè da una complessa squadra di microorganismi in cui le attività metaboliche degli uni precorrono quelle di altri rendendo percorribili vie metaboliche termodinamicamente sfavorevoli (Kato et al., 2010).

Proprio per superare passaggi metabolici energeticamente avversi, tra gruppi di organismi appartenenti ai domini delle due linee evolutive così differenti - *Archea* e *Batteri* - si sono andate evolvendo interazioni altamente specifiche di cooperazione e, andando oltre, di mutualismo, che determinano la velocità e l'efficienza dell'intero processo di DA.

In questo contesto si è lavorato alla messa a punto della tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization – Microscopia in Fluorescenza), che consente di condurre indagini filogenetiche sulla composizione e struttura delle comunità microbiche sia in termini qualitativi che quantitativi, senza ricorrere a tecniche colturali, particolarmente difficoltose soprattutto per i batteri metanigeni. Infatti utilizzando specifiche sonde oligonucleotidiche a rRNA, marcate con fluorocromi e composte da sequenze di acido nucleico complementari per specifici taxa batterici, è possibile visualizzare selettivamente in microscopia i singoli microorganismi e trarre informazioni sulle dinamiche delle comunità microbiche in risposta ai parametri sperimentali. La FISH costituisce una metodologia particolarmente efficace dal momento che la quantità di rRNA riflette le varie fasi di sviluppo dei microorganismi e le nostre prime prove hanno dimostrato la possibilità di applicare la tecnica per rintracciare all'interno dei reattori taxa di batteri di particolare interesse negli studi di DA.

### 2.6.3 Metodologie e risultati ottenuti

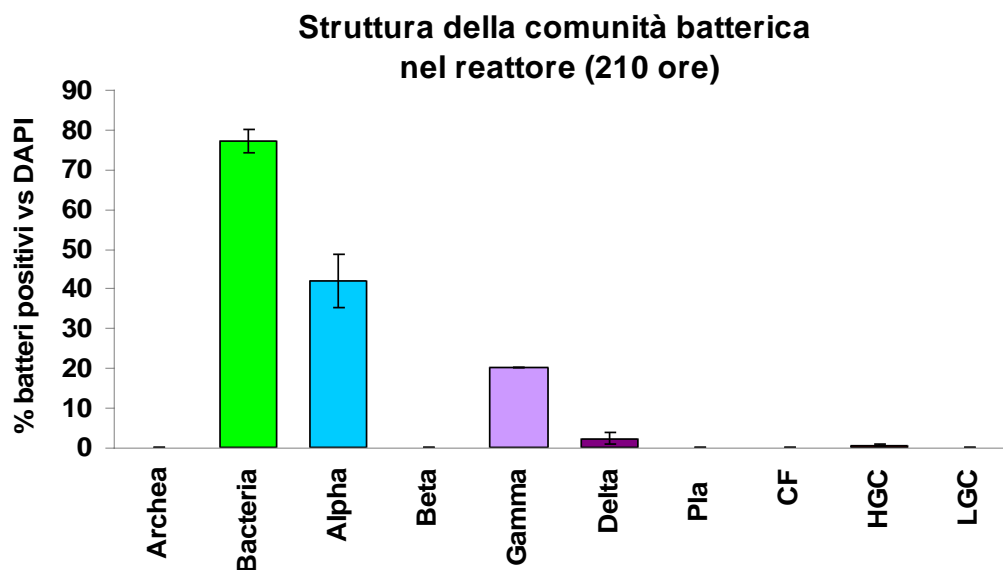
Rispetto a quanto già disponibile in bibliografia (Amann, 1995; Pernthaler et al, 2001; Barra Caracciolo et al, 2005) la tecnica è stata sviluppata adeguandola a matrici molto eterogenee: le prove sono state infatti condotte su campioni di digestato dell'impianto pilota bifase, precedentemente descritto, composto da un primo reattore che produce H<sub>2</sub> dalla scotta ed in cui la comunità microbica opera idrolisi e acidogenesi, ed un secondo reattore, alimentato dagli effluenti del primo, che produce metano, ed in cui coesistono tutte le fasi della DA – idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi.

I principali aspetti della tecnica che sono stati messi a punto hanno riguardato:

- Purificazione dei campioni: la componente microbica è stata separata dai materiali in sospensione e concentrata mediante centrifugazione in gradiente di densità Optiprep™ effettuando due passaggi successivi; ciò si è reso necessario soprattutto per il secondo reattore, inizialmente inoculato con liquame bufalino;
- Diluizioni ottimali dei campioni al fine di non avere falsi negativi;
- Prove di permeabilizzazione della membrana con lisozima per verificare l'effettiva marcatura delle cellule batteriche.

Per avviare il primo reattore è stato utilizzato l'inoculo F<sub>210</sub>, una mix microbica mesofila selezionata nei laboratori ENEA da un processo di produzione di idrogeno dal glucosio svolta in un reattore in continuo (210 ore), utilizzando come inoculo sedimenti marini.

La composizione dell'F<sub>210</sub>, inoculo utilizzato per la produzione di idrogeno-produttori era stato precedentemente analizzato mediante tecnica FISH in collaborazione con il CNR –IRSA di Montelibretti.



**Figura 12. Analisi filogenetica della comunità batterica dell'inoculo F210 selezionato nel reattore in continuo. Le barre verticali rappresentano gli errori standard. Alpha = *Alpha-Proteobacteria*; Beta = *Beta-Proteobacteria*; Gamma = *Gamma-Proteobacteria*; Delta = *Delta-Proteobacteria*; PLA = *Planctomycetes*; CF = *Cytophaga-Flavobacter*; HGC = Gram + con alto contenuto di G+C (*Actinobacteria*); LGC = Gram + con basso contenuto di G+C (*Firmicutes*)**

Come si può osservare nella Figura 12, in F210 predominano i batteri del gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* e dei *Gamma-Proteobacteria*, che raggiungono rispettivamente, il 42% e il 20%. Entrambi i gruppi includono batteri in grado di produrre idrogeno. Inoltre il 50% dei *Gamma-Proteobacteria* risulta appartenere alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprendente batteri che possiedono diverse caratteristiche favorevoli

alla produzione di idrogeno (Figura 13). Inoltre essi sono batteri anaerobi facoltativi e la loro presenza nei reattori è garanzia di anaerobiosi poiché sono in grado di consumare rapidamente ossigeno eventualmente presente, ripristinando le condizioni di iniziali.

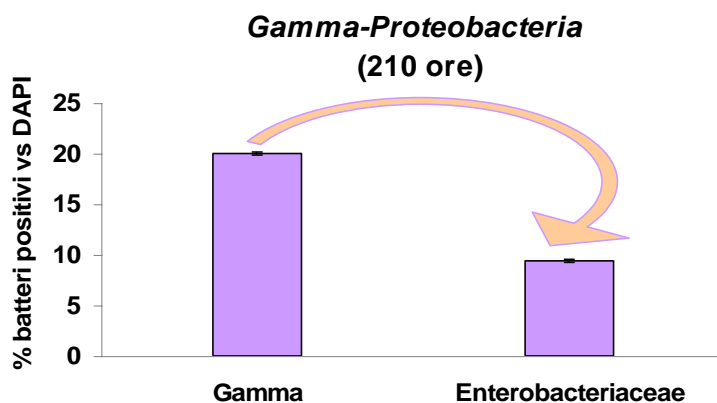


Figura 13. Percentuale dei *Gamma-Proteobacteria* (colonna di sinistra) e frazione riconducibile alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (circa il 50% dei *Gamma-Proteobacteria*), colonna di destra

Le sonde utilizzate per le indagini di validazione della FISH nei due reattori sono riportate nella tabella sottostante (Tabella 9)

Tabella 9. Sonde utilizzate con i relativi taxa identificati, le sequenze nucleotidiche, i siti target sull'rRNA corrispondente e la stringenza (in termini di% di formammide necessaria per l'ibridazione)

Sonda	Taxa identificati	Sequenza (5'-3')	Posizione rRNA	% Formammide
ARCH 915	Archea	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S (915 – 934)	20
EUB 338	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S (338-355)	20
EUB 338 II	Bacteria	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S (338-355)	20
EUB 338 III	Bacteria	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S (338-355)	20
ALF 1b	$\alpha$ -Proteobacteria	CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S (19-35)	20
GAM4 2a	$\gamma$ -Proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTTT	23S (1027-1043)	35
EBAC1790	Enterobacteriaceae	CGTGTTGCACAGTGCTG	23S (1790-1807)	40

Le stime ottenute con le sonde di ibridizzazione sono riferite alla abbondanza batterica totale effettuata tramite il metodo della conta diretta in epifluorescenza (DAPI) mentre la vitalità delle comunità batteriche all'interno dei reattori è stata costantemente monitorata mediante la tecnica di colorazione Live/Dead utilizzando due coloranti, SYTO9 - colorazione verde - e Ioduro di Propidio - colorazione rossa – (Figura 14 - 15) (Live/Dead® Bacterial Viability Kit, L7012, BaCLight™ Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA); il primo colora sia le cellule con pareti cellulari intatte che compromesse, il secondo colora solo le cellule con membrana danneggiata, soppiantando completamente la colorazione SYTO9 . I coefficienti di variabilità nelle misure quantitative della FISH finora ottenute sono compresi tra il 15 e il 22%.



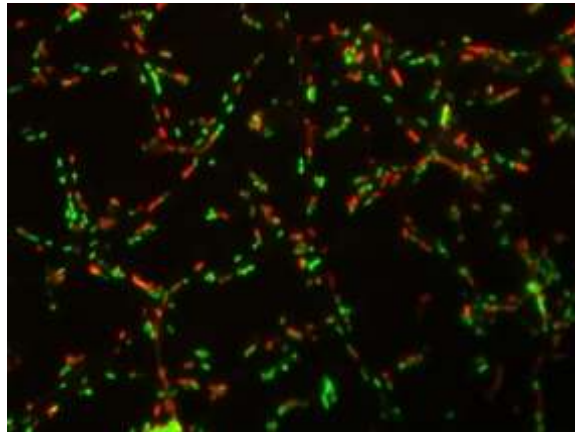


Figura 14. Vitalità batterica: immagine di batteri al microscopio dei batteri del reattore a Idrogeno: in rosso i batteri con la membrana cellulare compromessa (Obiettivo Zeiss ad immersione 100x)

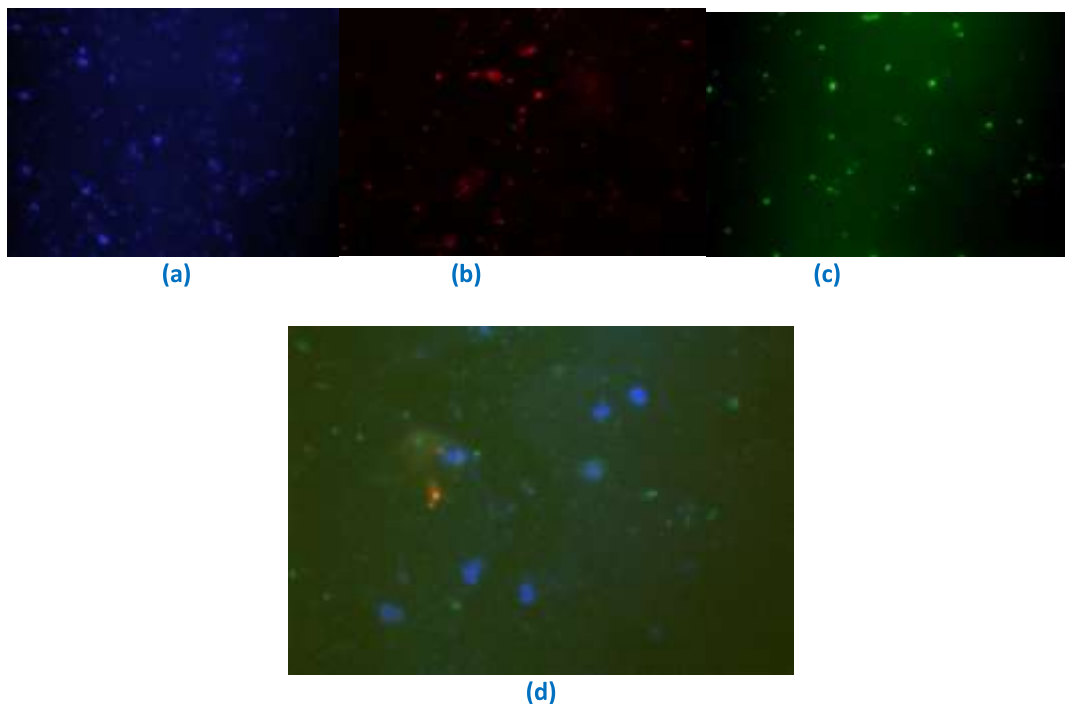


Figura 15. Immagini in microscopia relative alla comunità microbica del reattore a metano per la conta totale delle cellule batteriche marcate con a) DAPI; b) *Archea* (sonda Arch 915 marcato con Indocarbocianina – CY3); c) *Eubacteria* (sonde EUB 338, I,II,III marcate con Fluoresceina FLUO); d) esempio di sovrapposizione delle immagini ottenute per uno stesso campo del microscopio in cui sono evidenziati in blu gli *Archea*, in verde gli *Eubacteria* e in rosso gli *Alpha-Proteobacteria* (sonda ALF1b). Le colorazioni sono assegnate mediante programma AxioVisio Zeiss

In tabella 10 sono riportati i risultati della tecnica FISH. I valori percentuali delle diverse componenti microbiche analizzate nelle comunità, rispettivamente dell'inoculo  $F_{210}$  e dei digestati del primo e del secondo reattore, sono riferiti a tre repliche (in parentesi la deviazione standard).

**Tabella 10 Percentuale di batteri positivi per ogni sonda utilizzata rispetto al numero totale di cellule rilevate con la colorazione DAPI nell' inoculo F210 e nel reattore produttore di H<sub>2</sub> e nel reattore produttore di CH<sub>4</sub>**

	Archea	Eubatteri	Alpha-proteobatteri	Gamma-proteobatteri	Enterobacteriaceae
<b>F210</b>	-	77,0±4,6	42,0±5,1	20,0±2,3	10,0±4,0
<b>Reattore a H<sub>2</sub></b>	-	69,4±4,0	33,3±4,2	18,1±1,5	2,5±0,7
<b>Reattore a CH<sub>4</sub></b>	9,9±1,5	49,7±3,4	9,0±3,9	1,4±0,7	2,8±0,1

## 2.7 Caratterizzazione funzionale del consorzio microbico GCL

Nei nostri laboratori è stato messo a punto un processo (microbico) che consente di trasformare il glicerolo grezzo in altri vettori energetici, quali il bioetanolo e il bioidrogeno, la cui produzione gioca un ruolo di rilievo tra le fonti energetiche alternative e “pulite” del futuro. Tra le possibili riconversioni di questi due prodotti, sicuramente quello di interesse per questo progetto riguarda il loro utilizzo come precursori del metano in un impianto bifasico. La buona efficienza di conversione nei due sottoprodotti (0,80±0,01 moli H<sub>2</sub>/moli glicerolo e 0,83±0,02 moli di EtOH/moli di glicerolo) è stata ottenuta grazie alla selezione di un inoculo microbico a partire da un fango attivo e attraverso una procedura di arricchimento stringente e diretta sul substrato e senza l’aggiunta di altre fonti di carbonio. Da tale procedura di arricchimento ecobiotecnologica (la selezione ‘naturale’ dell’inoculo, piuttosto che l’ingegnerizzazione genetica e/o metabolica) è risultato un inoculo specializzato nella fermentazione del glicerolo grezzo, con una comunità microbica che coopera metabolicamente a tale fine.

### 2.7.1 Attività pregressa ed avanzamento del lavoro

Nelle attività svolte durante lo scorso anno (Aliboni et al., 2012), è stata identificata la composizione della comunità microbica dell’inoculo GCL tramite la libreria genetica del *marker* molecolare 16S rDNA (Varrone et al., 2013). Questa comunità (Tabella 11) è risultata essere caratterizzata da un gruppo dominante e polimorfico di enterobatteri idrogeno produttori (*Klebsiella* ed *Escherichia*) e non (*Shigella*) ed una popolazione meno rappresentativa e filogeneticamente più distante, appartenente al genere *Cupriavidus*. Da un punto di vista funzionale, le comunità *Klebsiella* ed *Escherichia* svolgono un ruolo diretto nella produzione di idrogeno, *Cupriavidus*, un batterio molto versatile, può svolgere un ruolo “antagonista” (consuma l’idrogeno e/o i metaboliti prodotti nella fermentazione) o “sintrofico” (degrada le impurità presenti nel glicerolo grezzo), mentre per *Shigella*, non si ipotizza alcun ruolo, oltre a quello di sopravvivere nel consorzio microbico.

Per approfondire e chiarire il ruolo delle diverse comunità individuate nell’inoculo GCL, nel corso delle attività svolte sono state effettuate ulteriori indagini seguendo due approcci sperimentali:

1. la diluizione progressiva dell’inoculo GCL, fino alla massima diluizione che ancora conservava la sua “funzionalità”, e, parallelamente, la caratterizzazione molecolare della comunità microbica per individuare l’unità biologica di base in grado di mantenere invariata la funzione *target*, ossia la capacità di produrre idrogeno ed etanolo;
2. la “ricostruzione” dell’inoculo GCL, riunendo insieme le diverse comunità, precedentemente isolate, e valutando i parametri di fermentazione al variare della composizione dell’inoculo “ricostruito” rispetto all’inoculo GCL tal quale. Poiché all’interno di un consorzio microbico tra i ceppi presenti si vengono a creare dei meccanismi di cooperazione e/o competizione, le prove di fermentazione condotte con i ceppi puri hanno avuto lo scopo di chiarire l’entità di tali meccanismi e di stimare i limiti e le

potenzialità di impiegare, per una fermentazione anaerobica ottimale, un consorzio microbico piuttosto che i singoli ceppi.

**Tabella 11. Unità tassonomiche (OTUs) individuate nell'inoculo GC: similarità con le sequenze presenti nel database NCBI**

No. di cloni	abbondanza (%)	Closest relative	accession no.	similarità (%)	genere
10	11,11	Klebsiella sp. ANctri2	HQ286642	99-100	<i>Klebsiella</i>
3	3,33	Uncultured Klebsiella sp. clone F5feb.43	GQ416012	99	
3	3,33	Uncultured Klebsiella sp. clone SL08	HQ264068	99	
5	5,56	klebsiella pneumoniae KCTC2242	CP002910	99	
17	18,89	Uncultured bacterium clone 16slp87-10f02.w2k	GQ158955	99-100	
1	1,11	klebsiella sp.A18-1 strain A18-1	AB244431	100	
1	1,11	Klebsiella pneumoniae strain SF5	JF489150	99	
4	4,44	Uncultured Klebsiella sp. Clone F5feb.60	GQ416029	99-100	
2	2,22	Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044	AP006725	99	
2	2,22	Uncultured bacterium clone ncd1468d11c1	JF118845	99	
1	1,11	Enterobacteriaceae bacterium GBK1	FJ958193	99	
1	1,11	Klebsiella sp. VITPGP5AA	HM462444	100	
2	2,22	Uncultured bacterium clone 16slp87-10d05.p1k	GQ158941	99	
5	5,56	Escherichia coli O7:K1 str. CE10	CP003034	99	<i>Escherichia/ Shigella</i>
9	10,00	Escherichia coli UMNK88	CP002729	99	
2	2,22	Escherichia coli O111:H	AP010960	99-100	
6	6,67	Escherichia coli W	CP002185	99-100	
1	1,11	Escherichia coli UM146	CP002167	99	
6	6,67	Shigella sonnei strain FBD025	EU009199	99	
9	10,00	Cupriavidus metallidurans NBRC-101272	AB681431	99-100	<i>Cupriavidus</i>

## 2.7.2 Procedura sperimentale

### Attivazione dell'inoculo GCL

L'inoculo GCL è stato riattivato in terreno minimo (Varrone et al., 2013) in reattori *batch* da 125 ml con un volume di lavoro di 50 ml e 10% di inoculo, e incubato a 37 °C per 24 ore. Al termine delle 24 ore è stata 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

Dopo il raffreddamento, l'inoculo pre-attivato è stato aggiunto al mezzo di coltura all'interno delle *serum bottles*. I contenitori chiusi ermeticamente sono stati insufflati con azoto per 3 minuti mediante siringa sterile con filtro con membrana da 0,22 µm. Gli esperimenti sono stati condotti a 37 °C in bagno termostato con agitazione continua (120 rpm), ad un pH iniziale pari a 7.

Ad intervalli di tempo di 24 ore sono stati misurati il pH del liquido di coltura ed i prodotti della fermentazione, sia liquidi (mediante HPLC, High Performance Liquid Chromatography) che gassosi (mediante GC, Gas Chromatography).

### 2.7.3 Metodi analitici

#### Analisi dei metaboliti

I prodotti metabolici della fermentazione e della digestione anaerobica (acidi grassi volatili, acido lattico, alcoli) sono stati analizzati mediante HPLC ThermoSpectrasystem P4000, equipaggiato con rilevatore UV ( $\lambda = 210$  nm) e Indice di Rifrazione. I campioni liquidi sono stati diluiti 1:10 in  $H_2SO_4$  5 mN, centrifugati a 10000 rpm per 10 minuti e filtrati (filtri con porosità 0.22  $\mu m$ ) prima dell'iniezione in HPLC.

#### Analisi del biogas

La percentuale di  $H_2$  e  $CO_2$  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 rilevatore erano rispettivamente di 120°C, 120°C e 200°C. La produzione cumulativa di  $H_2$  è stata calcolata utilizzando l'equazione di bilancio di massa (Logan et al., 2002):

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

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  $V_{G,i-1}$  = volumi del biogas totale prodotto;

$C_{H,i}$  e  $C_{H,i-1}$  = le frazioni di  $H_2$  agli intervalli di tempo in corso e quello immediatamente precedente, rispettivamente;

$V_H$  = volume totale dello spazio testa nel reattore.

L'andamento temporale della produzione cumulativa di  $H_2$  è stata calcolata con l'equazione di Gompertz modificata :

$$H = H_{max} \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_{max, H_2} e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

$H$  = idrogeno cumulativo (ml)

$H_{max}$  = massima quantità di idrogeno cumulativo (ml)

$R_{max}$  = tasso massimo di produzione di idrogeno (ml/ora)

$t$  = tempo di fermentazione (ora)

$\lambda$  = fase di latenza (ora)

#### Analisi molecolari dell'inoculo GCL nelle prove di fermentazione

##### Estrazione del DNA e PCR

L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da 1,5 ml di sospensione batterica prelevati nel corso del processo di fermentazione. I *pellets* ottenuti dopo centrifugazione delle soluzioni batteriche a 6000 g per 10 min, sono stati conservati a -20 °C fino al momento dell'utilizzo. Prima di estrarre e purificare il DNA, sono stati effettuati due lavaggi dei *pellets* con 1 ml di soluzione salina.

L'estrazione del DNA totale è stata condotta utilizzando il kit commerciale GeneMATRIX™ Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx) e seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Il DNA genomico è stato utilizzato per amplificare due regioni ipervariabili del gene 16S rRNA : la regione V1-V3 (circa 500 bp) e V6-V9 (circa 420 bp), che successivamente sono state analizzate mediante DGGE.

- Frammenti V1-V3 : sono stati utilizzati i primers universali 27f-GC (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 518r (ATTACCGCGGCTGCTGG). Per ogni reazione (100 µl) sono stati amplificati 15 ng di DNA in una mix contenente la Ampli Taq Gold Master Mix (1x) e 0,2 µM di ogni *primers*, ed è stato utilizzato il seguente programma di amplificazione :
  - attivazione Taq: 95 °C - 10 min
  - poi 30 cicli:
    - denaturazione: 95 °C - 30 s
    - annealing: 54 °C - 30 s
    - estensione: 72 °C - 30 s
  - 1 ciclo:
    - estensione finale : 72 °C -10 min
  
- Frammenti V6-V9 : E' stato utilizzato un protocollo di nested-PCR . Nella prima PCR è stato amplificato l'intero gene 16S rRNA, utilizzando i primers 27f e 1389r (ACGGGCGGTGTGTACAAG). Per ogni reazione (50 µl) sono stati amplificati 20 ng di DNA in una mix contenente la Ampli Taq Gold Master Mix (1x) e 0,2 µM di ogni primers, ed è stato utilizzato il seguente programma di touchdown :
  - 1 ciclo: 95 °C - 10 min
  - poi 20 cicli:
    - 95 °C - 40 s
    - 65 °C - 40 s, con diminuzione di 0,5 °C ogni ciclo
    - 72 °C - 90 s
  - poi 8 cicli:
    - 95 °C -40 s
    - 55 °C - 40 s
    - 72 °C - 90 s
  - 1 ciclo: 72 °C per 10 min
  
- I prodotti di questa prima amplificazione sono stati utilizzati come stampo per una successiva PCR in cui è stata amplificata la regione V6-V9, utilizzando i *primers* universali 968f-GC (ACGGGGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1389r. Per ogni reazione (100 µl) sono stati amplificati 2 µl di DNA in una mix contenente la Ampli Taq Gold Master Mix (1x) e 0,2 µM di ogni *primers*, ed è stato utilizzato il seguente programma di amplificazione:
  - 1 ciclo : 95 °C -10 min
  - poi 30 cicli
  - 95 °C - 30 s
  - 53 °C - 30 s.
  - 72 °C -30 s
  - 1 ciclo : 72 °C -10 min

Al termine delle reazioni di PCR, i frammenti V1-V3 e V6-V9 sono stati precipitati con 5M NaCl (10 µl) e 2,5 vol. di etanolo.

#### 2.7.4 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

La DGGE è una tecnica che si basa sull'elettroforesi di frammenti di DNA, precedentemente amplificati mediante PCR, su un gel di poliacrilammide contenente un gradiente crescente di agenti denaturanti (urea e formammide). La separazione dei frammenti di DNA lungo il gradiente denaturante avviene in base alle loro sequenze, e quindi alle loro proprietà di denaturazione, che possono risultare diverse anche per frammenti della stessa lunghezza.

I frammenti V1-V3 e V6-V9 ottenuti dalle reazioni di PCR sono stati analizzati mediante DGGE con il sistema D Code™ Universal Mutation Detection System della BIO-RAD (Hercules, CA, USA).

Inizialmente, per ogni serie di frammenti, è stato utilizzato un range di denaturazione compreso tra 20% e 80% (100% : 7 M urea e 40% formamide) che ha permesso di determinare il range ottimale per la migliore risoluzione delle bande V1-V3 e V6-V9. Per entrambi i frammenti il range ottimale è risultato compreso nell'intervallo 40% - 65%.

I campioni sono stati caricati su un gel di acrilamide/Bis-acrilamide (37,5 : 1) al 6% (p/v) con il gradiente denaturante lineare 40%-65% composto da urea e formammide. La corsa elettroforetica è stata condotta in buffer TAE 1 X (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA) per circa 17 ore a 60 °C passando da un voltaggio di 60 V, mantenuto per i primi dieci minuti, a 70 V per le successive ore.

Al termine della corsa il gel è stato colorato in una soluzione di SYBR green I 0,5X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per 1 ora, poi decolorato in acqua distillata e fotografato.

#### 2.7.5 Isolamento dei ceppi puri e caratterizzazione

L'isolamento dei ceppi microbici che costituiscono l'inoculo GCL è stato effettuato mediante allestimento di diluizioni seriali in base 10. Diluizioni dell'inoculo iniziale ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ) sono state piastrate sul terreno minimo addizionato con agar al 15% (p/v). Le piastre sono state incubate *overnight* a 37 °C e le colonie che presentavano caratteristiche morfologiche distinguibili e definite sono state prelevate, e passate su una nuova piastra per 3 volte. Il DNA di ciascun isolato batterico è stato ottenuto unendo 2-3 colonie mediante il kit GeneMATRIX™ Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx). L'amplificazione del gene che codifica per il 16S rRNA è stata condotta utilizzando i *primers* universali per eubatteri 27f e 1389r. Per ogni reazione (100 µl) sono stati amplificati 15 ng di DNA in una mix con 1,25 U di Perpetual Taq PCR Master Mix (EURx, Gdansk, Polonia), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM di ciascun dNTPs, 0,1 µM di ciascun *primer*.

L'amplificazione è stata condotta con lo stesso programma di *touchdown* utilizzato per i frammenti V6-V9.

I frammenti ottenuti dalla PCR sono stati purificati mediante il GeneMATRIX PCR / DNA Clean-Up Purification Kit (EURx) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. Dopo la purificazione il DNA amplificato è stato sequenziato presso il Laboratorio Genechron (C.R. ENEA Casaccia, Roma con il sequenziatore automatico ABI 3730 DNA *analyzer*. Le sequenze grezze dei due filamenti sono state analizzate ed allineate mediante il Chromas Pro versione 1.5 (Technelysium Pty Ltd) e le sequenze consenso ottenute sono state confrontate con quelle depositate in GenBank mediante l'algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Una ulteriore identificazione delle sequenze ottenute è stata effettuata utilizzando il *tool* RDP-classifier del *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

### 2.7.7 Conta batterica

Per la conta diretta delle cellule, immediatamente dopo il prelievo, 100  $\mu\text{L}$  di campione sono stati fissati con formaldeide e ad 1 ml di campione fissato sono stati aggiunti 200  $\mu\text{L}$  di colorante 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). Il DAPI si lega unicamente alla doppia elica di DNA ed è fluorescente in luce ultravioletta (615 nm).

Dopo l'incubazione il campione è stato filtrato, su filtri in policarbonato di porosità 0,2  $\mu\text{m}$  e diametro 25 mm (Millipore). Il filtro è stato montato su un vetrino portaoggetti, precedentemente pulito sul quale è stata aggiunta una goccia di olio da immersione per microscopia (Zeiss-Immersion Oil TM 518F). Un'altra goccia è stata interposta tra il filtro ed il coprioggetto in modo tale da creare due zone con indice di rifrazione omogeneo. La densità cellulare è stata stimata con un microscopio ad epifluorescenza (Axioshop 40, Zeiss, Germania), dotato di una lampada al mercurio (HBO 50W/AC), obiettivo Zeiss ad immersione 100X, per osservare e contare le cellule colorate. Per ogni campione sono state analizzate 3 repliche e per ognuna è stata calcolata la media e la deviazione standard.

### 2.7.8 Risultati

#### Attività dell'inoculo GCL

La *performance* del processo svolto dall'inoculo GCL è riepilogata nelle figure 16-17. La quantità di glicerolo grezzo iniziale (15 g/l) viene consumata velocemente nelle prime 24 ore producendo idrogeno con una resa elevata ( $0,8 \pm 0,01$  moli  $\text{H}_2$ /moli glicerolo). I principali prodotti metabolici ottenuti nel corso del processo sono stati l'1,3-PDO e l'etanolo, così come atteso considerando la composizione microbica dell'inoculo costituito principalmente dalle due comunità di idrogeno produttori *Klebsiella* ed *Escherichia* (Varrone et al., 2013). Nonostante la resa di 1,3-PDO sia stata alta, questo non ha pregiudicato la produzione di idrogeno ed etanolo, essendo l'1,3-PDO presente comunque in quantità non inibenti. Le produzioni misurate per gli altri metaboliti ottenuti nel processo di fermentazione del glicerolo sono risultate basse, andando pertanto a costituire un vantaggio per la produzione di  $\text{H}_2$  ed etanolo.

Per quanto riguarda la produzione di idrogeno (Figura 17), si è osservato un aumento della quantità di biogas nelle prime 24 ore fino al raggiungimento di un picco di produzione che rimane costante durante le ore successive. Il breve tempo di latenza (13 ore), necessario alle cellule per accrescersi e avviare il processo di produzione del gas, ha confermato l'alta efficienza di conversione del glicerolo grezzo da parte dell'inoculo GCL.

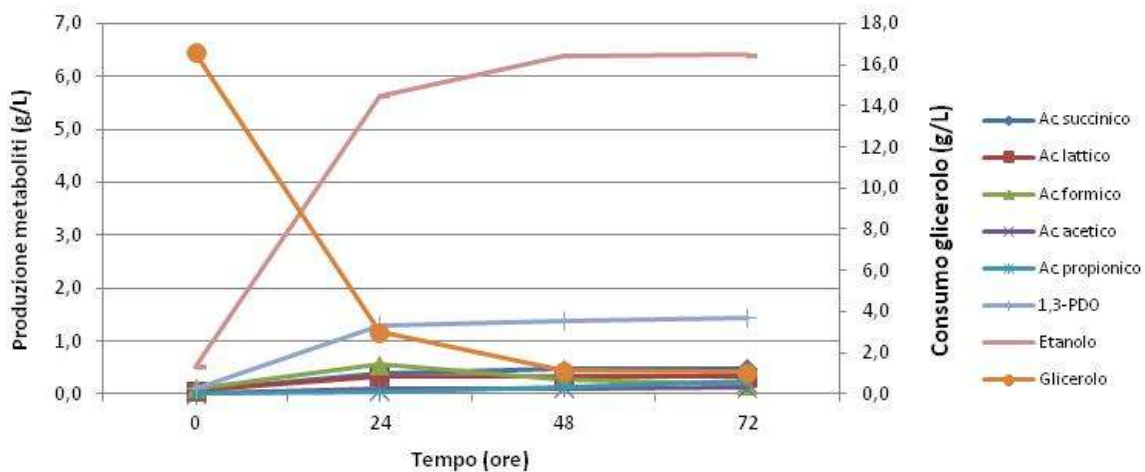


Figura 16. Fermentazione del glicerolo con l'inoculo GCL: consumo del substrato e produzione dei principali metaboliti nel corso del processo. Le concentrazioni sono espresse in g/l

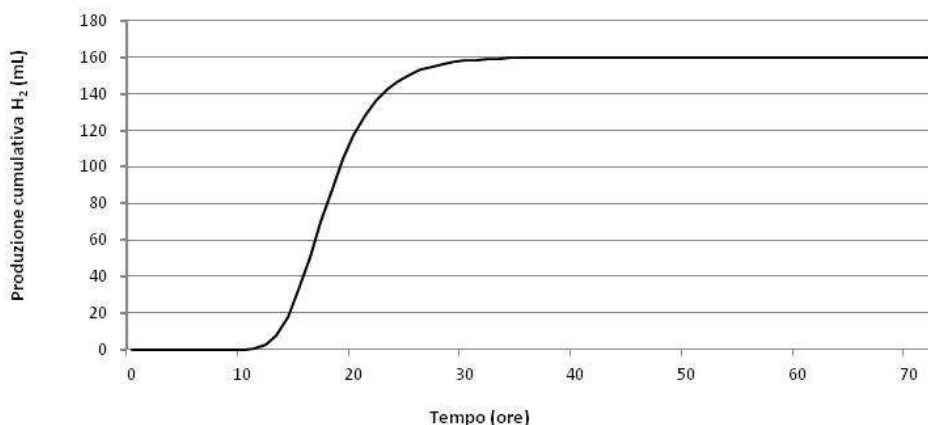


Figura 17. Curva di produzione cumulativa dell'idrogeno ottenuta con l'equazione di Gompertz modificata

Dal confronto delle figure 16 e 17 si può osservare come l'aumento della produzione di H<sub>2</sub> proceda parallelamente alla degradazione del glicerolo.

Relativamente alle comunità batteriche identificate all'interno dell'inoculo GCL, precedenti studi dimostrano che sia *Klebsiella* (Xiu et al. 2004) che *E.coli* (Murarka et al. 2008) sono in grado di produrre H<sub>2</sub> ed altri co-prodotti, ma, nella gran parte di questi studi, sono stati utilizzati ceppi puri, spesso metabolicamente ingegnerizzati per aumentare le produzioni finali di H<sub>2</sub> ed etanolo mentre l'impiego della coltura mista caratteristica dell'inoculo GCL permette di arrivare a risultati diversi.

**Caratterizzazione funzionale dell'inoculo GCL. Costruzione del fingerprint dell'inoculo GCL**

Per monitorare le variazioni nella composizione dell'inoculo GCL nel corso delle prove sperimentali si è reso necessario ricostruire il *fingerprint* rappresentativo dell'inoculo GCL tal quale. Il DNA dei cloni rappresentativi di ogni specie individuata mediante il clonaggio (Tabella 10) è stato amplificato con i *primers* universali che hanno prodotto i frammenti V1-V3 e V6-V9 e che sono stati analizzati tramite DGGE (gradiente 40%-65%) in modo da confrontare la mobilità elettroforetica di ciascun clone rispetto al profilo dell'inoculo GCL tal quale, e di individuare quelli più rappresentativi di ciascuna OTU per la costruzione di una mix rappresentativa dell'inoculo.

Confrontando i profili delle bande dei singoli cloni (Figura 18) con quelle presenti nel campione GCL, si è proceduto all'eliminazione delle bande ridondanti selezionando solamente quelle che si dispongono alla stessa altezza delle bande presenti nel profilo elettroforetico del campione GCL di riferimento.

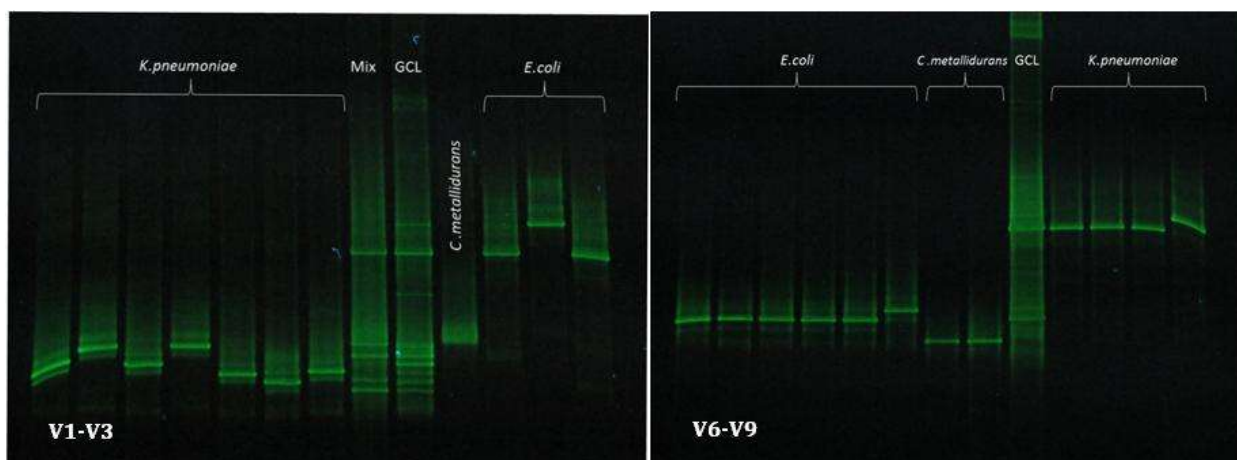


Figura 18. Profili DGGE dei frammenti V1-V3 e V6-V9 di cloni rappresentativi dell'inoculo GCL confrontati con GCL tal quale



I cloni selezionati sono stati uniti in una mix rappresentativa dell'inoculo GCL e della sua diversità (Fig. 19).

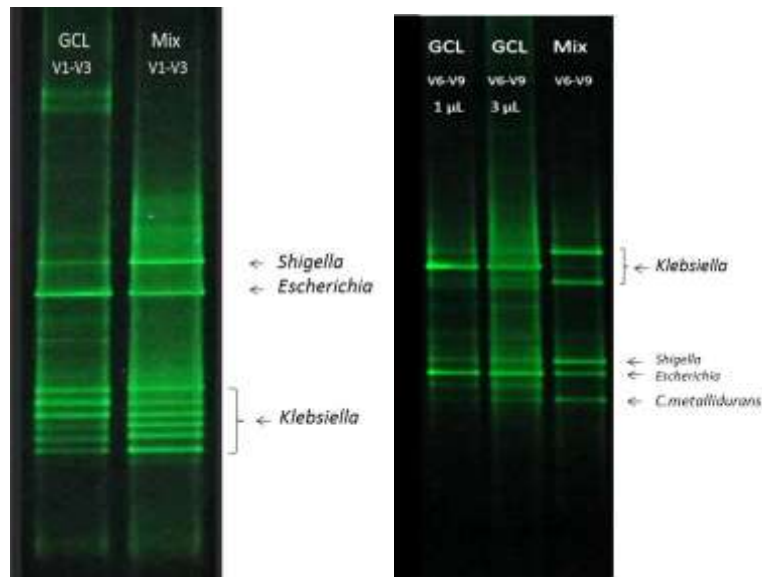


Figura 19. Profili DGGE (gradiente 40%-65%) delle mix rappresentative dell'inoculo GCL ottenute con i frammenti V1-V3 e V6-V9

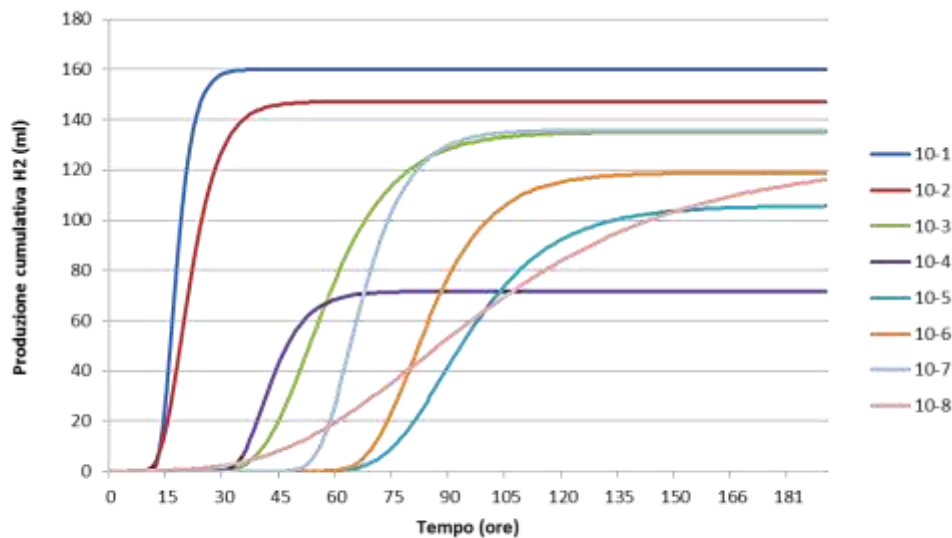
La scelta di utilizzare le due regioni ipervariabili del gene 16S rDNA si è dimostrata utile in quanto solo dalla sovrapposizione dei *fingerprint* di ognuna è stato possibile identificare l'intero profilo dell'inoculo GCL. L'amplificazione della regione V1-V3 ha permesso di discriminare con maggiore sensibilità il polimorfismo della comunità *Klebsiella*, mentre l'amplificazione delle regioni V6-V9 ha permesso di individuare le due comunità *Shigella* e *Cupriavidus*.

### 2.7.9 Diluizione dell'inoculo: il minimo consorzio funzionale

#### Analisi dei metaboliti e della produzione di biogas

Allo scopo di individuare l'unità funzionale di base in grado di mantenere invariata la funzione target, ossia la capacità di produrre idrogeno ed etanolo dalla degradazione del glicerolo, è stato utilizzato l'approccio delle diluizioni seriali. Secondo tale approccio, la coltura microbica mista è diluita in serie, e per ciascun campione diluito è testata la sua funzione target in fermentazioni in *batch*. Il campione diluito che mantiene invariata la capacità di produrre idrogeno ed etanolo è definito come il consorzio funzionale minimo della coltura mista di partenza.

Il consorzio di partenza è stato diluito da  $10^{-1}$  fino a  $10^{-8}$  con un fattore 10, e in ogni diluizione è stata testata la produzione dei metaboliti gassosi e solubili nel corso delle fermentazioni in *batch*. I risultati riportati in figura 20 relativi alla produzione di idrogeno, hanno mostrato che alla diminuzione della concentrazione dell'inoculo, le colture continuano a conservare la capacità di degradare il glicerolo e convertirlo in idrogeno, una delle nostre funzione target.



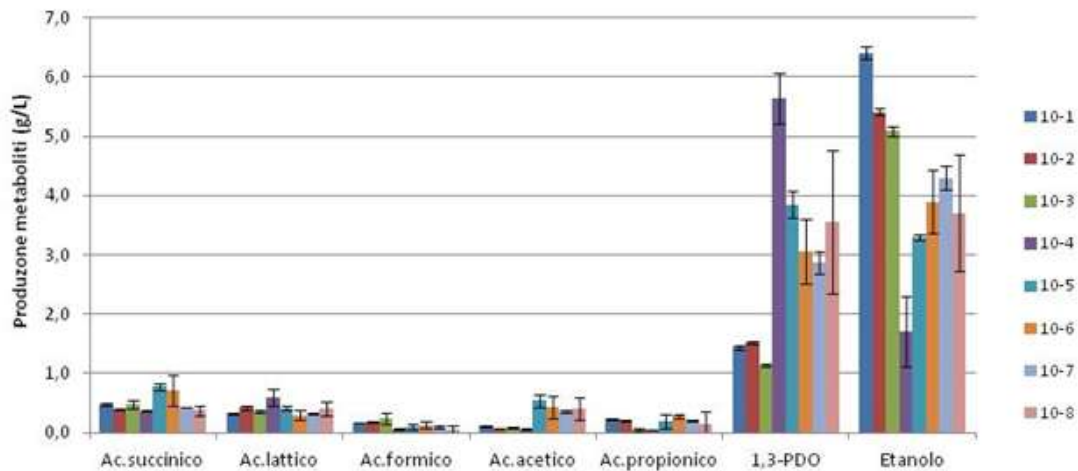
Inoculo	Pmax	Rmax	$\lambda$	R <sup>2</sup>
10 <sup>-1</sup>	160.1168	19.24	13.34635587	0.999961299
10 <sup>-2</sup>	147.1829	9.95	13.53405825	0.999717758
10 <sup>-3</sup>	135.0604	3.979184	40.19852877	0.999821176
10 <sup>-4</sup>	71.59142	4.253961	34.31870384	1
10 <sup>-5</sup>	105.6724	2.483007	72.91949785	0.99999812
10 <sup>-6</sup>	118.7466	3.84396	68.7530517	0.999998523
10 <sup>-7</sup>	135.8193	5.917016	55.26150291	0.99999228
10 <sup>-8</sup>	123.4222	1.180831	44.84615086	0.983514325

Figura 20. Curve cumulative della produzione di H<sub>2</sub> nelle prove sperimentali di diluizione dell’inoculo

In tabella sono confrontati i valori dei parametri dell’equazione modificata di Gompertz dei vari esperimenti: Pmax= produzione potenziale massima (mL), Rmax= tasso massimo di produzione (mL/ora,  $\lambda$ = fase lag (ore), R<sup>2</sup>= coefficiente di correlazione tra dati sperimentali e teorici.

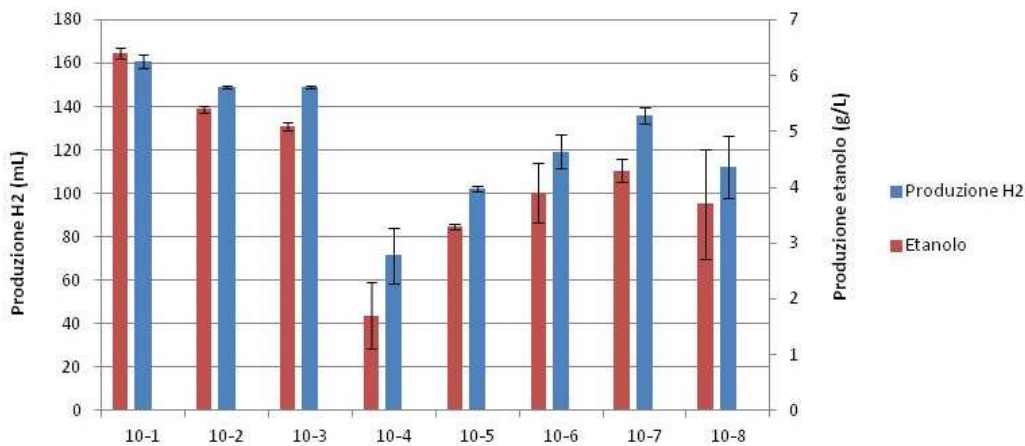
La diluizione 10<sup>-1</sup>, ad esempio, che corrisponde alla concentrazione iniziale dell’inoculo GCL usato nelle prove di fermentazione (Figura 20) conferma esattamente la quantità massima di idrogeno prodotta: 160,12 ml con R<sup>2</sup>= 0,99. L’eccezione rilevante a questo andamento generale è rappresentato dalle diluizioni 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-4</sup>. Nel primo caso si è osservato un comportamento molto simile al campione con diluizione 10<sup>-3</sup>, sia per quanto riguarda la fase lag che la produzione cumulativa di idrogeno finale. Una possibile spiegazione per questo dato può essere attribuita ad un errore sperimentale dal momento che l’andamento della produzione dell’idrogeno della diluizione 10<sup>-3</sup> rientra perfettamente nel dato atteso. Anche la produzione di idrogeno dalla diluizione 10<sup>-4</sup> si discosta dal comportamento atteso, e risulta la più bassa in assoluto, e può essere messa in relazione ad uno shift del metabolismo microbico a favore di una maggiore produzione di 1,3-PDO e conseguente riduzione della quantità di biogas prodotto ed etanolo, trattandosi queste di vie metaboliche competitive.

Per quanto riguarda la produzione dei metaboliti solubili, non si osserva alcun cambiamento riguardo la capacità degli inoculi diluiti di portare avanti il processo di fermentazione (Figura 21). Non solo i diversi inoculi riescono a degradare il glicerolo nonostante la ridotta concentrazione cellulare di partenza, ma anche i percorsi metabolici e di conseguenza i metaboliti secondari sintetizzati sono gli stessi. Come già accennato, un discorso a parte merita l’inoculo con rapporto di diluizione di 10<sup>-4</sup>. In questo campione alla fine della fermentazione, si osserva una quantità di 1,3-PDO superiore a quella misurata nelle altre prove. Una così alta produzione di 1,3-PDO comporta una minore produzione di idrogeno e di etanolo, trattandosi queste di vie metaboliche competitive.



**Figura 21. Confronto delle produzioni dei metaboliti secondari alla fine della fermentazione del glicerolo da parte dei vari inoculi utilizzati nelle stesse condizioni operative**

Inoltre, come mostrato nella figura 22, sia la quantità che la resa di produzione di idrogeno ed etanolo diminuiscono con il progredire delle diluizioni. L'inoculo  $10^{-1}$  ha una produzione di idrogeno e di etanolo pari a  $160,9 \pm 2,82$  ml con una resa molare di  $0,8 \pm 0,01$  moli  $H_2$ /moli glicerolo, e di  $6,4 \pm 0,1$  g/l con una resa pari a  $0,83 \pm 0,02$  moli EtOH/moli glicerolo, rispettivamente. Tali produzioni subiscono un calo nelle diluizioni successive, che procede parallelamente all'aumento delle diluizioni quando i patterns metabolici restano inalterati, e diventa più evidente quando la diluizione determina uno *shift* metabolico.

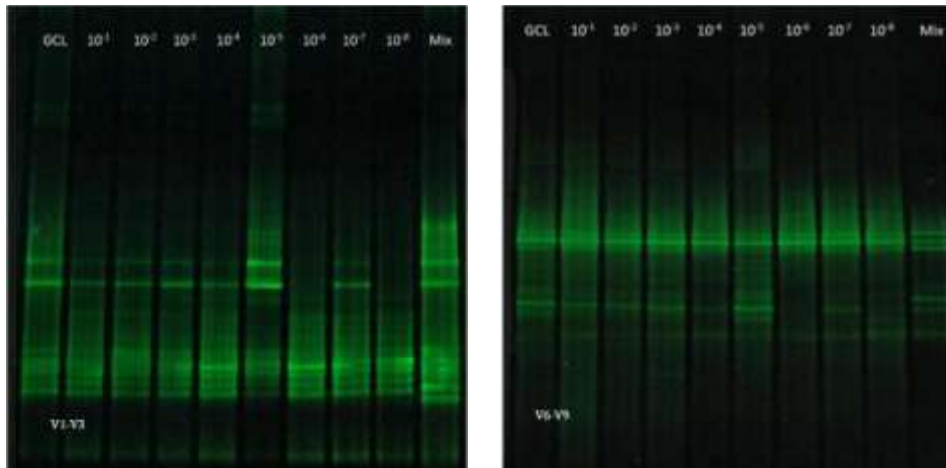


Inoculo	Produzione H2 (mL)	Resa H2 (moli $H_2$ /moli glicerolo)	EtOH (g/L)	Resa EtOH (moli EtOH/moli glicerolo)
$10^{-1}$	$160,9 \pm 2,82$	$0,8 \pm 0,01$	$6,4 \pm 0,1$	$0,83 \pm 0,02$
$10^{-2}$	$149,2 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,02$	$5,4 \pm 0,06$	$0,7 \pm 0,02$
$10^{-3}$	$135,1 \pm 0,65$	$0,7 \pm 0,02$	$5,09 \pm 0,08$	$0,7 \pm 0,04$
$10^{-4}$	$71,6 \pm 12,79$	$0,3 \pm 0,05$	$1,7 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,07$
$10^{-5}$	$102,2 \pm 1,40$	$0,5 \pm 0,07$	$3,3 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,05$
$10^{-6}$	$119,2 \pm 7,78$	$0,6 \pm 0,07$	$3,9 \pm 0,53$	$0,5 \pm 0,10$
$10^{-7}$	$135,8 \pm 3,58$	$0,6 \pm 0,02$	$4,3 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,03$
$10^{-8}$	$112 \pm 14,42$	$0,5 \pm 0,05$	$3,7 \pm 0,98$	$0,5 \pm 0,12$

**Figura 22. Confronto della produzione di idrogeno ed etanolo nelle prove di diluizione dell'inoculo. Le concentrazioni sono espresse in g/l**

### 2.7.10 Analisi molecolare della comunità microbica nelle prove di diluizione dell'inoculo

Al termine de processo di fermentazione *in batch*, è stata eseguita un'analisi DGGE delle comunità presenti nei vari campioni diluiti per verificare se alla stabilità del processo fermentativo riscontrata a livello di produzione di idrogeno ed etanolo fosse corrisposta una stabilità delle comunità microbiche. I *fingerprints* ottenuti dalle analisi DGGE con i frammenti V1-V3 e V6-V9 del 16S rDNA sono mostrati in figura 23.



**Figura 23. Analisi DGGE (gradiente 40%-65%) gradiente dei campioni diluiti (10<sup>1</sup>-10<sup>8</sup>). Prima lane: inoculo GCL tal quale. Ultima lane: mix rappresentativa costituita dai frammenti V1-V3 (a sinistra) e V6-V9 (a destra)**

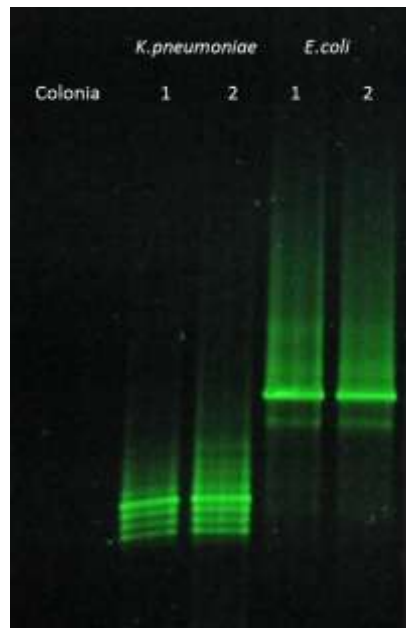
Le comunità *Klebsiella*, *Escherichia* e *Cupriavidus* sono rilevabili all'interno dell'inoculo GCL (prima lane dei gel) e delle sue diluizioni, mentre la comunità *Shigella* sparisce. *Klebsiella* ed *Escherichia* confermano le proprietà polimorfiche delle loro comunità, anche se con il progredire delle diluizioni, subiscono cambiamenti nelle proporzioni delle diverse specie che formano le comunità. La presenza delle due comunità di idrogeno-produttori è in accordo con i dati ottenuti dai test di fermentazione, sia per quanto riguarda la produzione di idrogeno, che dei metaboliti associati.

Solo la comunità rappresentata da *Shigella* scompare nel corso delle diluizioni a conferma di suo ruolo "passivo" nel processo di fermentazione del glicerolo grezzo.

### 2.7.11 Ricostruzione dell'inoculo GCL

#### Isolamento delle comunità microbiche presenti nell'inoculo

Per valutare il ruolo svolto dalle singole comunità microbiche nel processo di fermentazione, si è proceduto al loro isolamento tramite la selezione su terreno agarizzato, come descritto nei metodi. L'amplificazione dell'intero gene ribosomiale 16S delle colonie isolate e il successivo sequenziamento, hanno prodotto sequenze non univoche. Per questo motivo i frammenti V1-V3 ottenuti dall'amplificazione del DNA delle colonie isolate sono stati controllati tramite DGGE. Come mostrato in figura 24, il *fingerprint* delle singole colonie ha riprodotto fedelmente quello delle due comunità di idrogeno-produttori *Klebsiella* ed *Escherichia*, rilevate nell'inoculo GCL e nelle sue diluizioni. Questo risultato conferma che la caratteristica di queste comunità risiede nel loro polimorfismo mantenuto dallo stretto mutualismo tra i diversi ceppi che costituiscono sia la comunità *Klebsiella* che la comunità *Escherichia*.

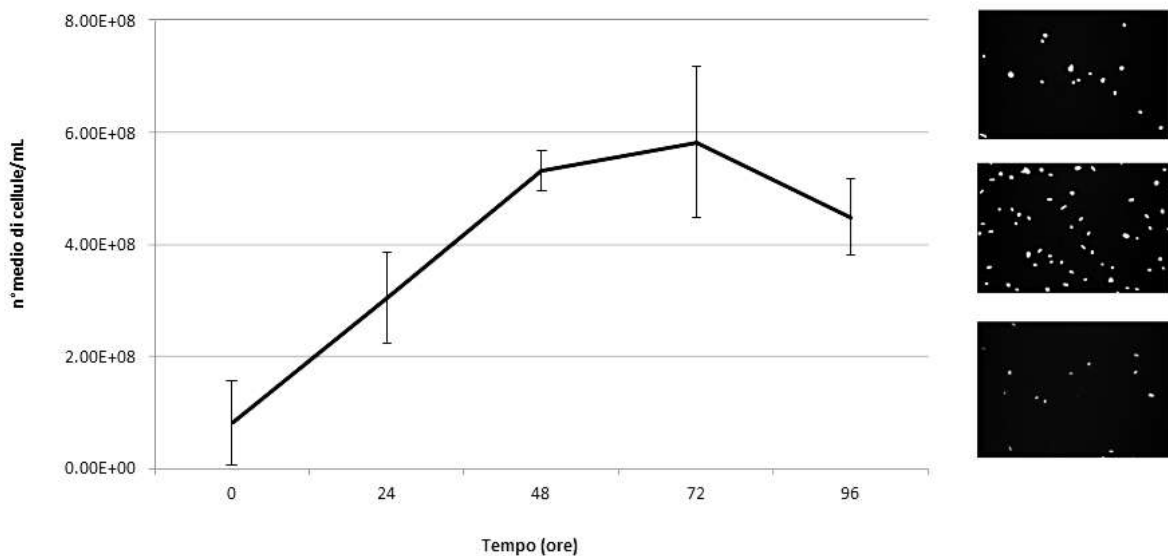


**Figura 24. Analisi DGGE (gradiente 40%-65%) del frammento V1-V3: a sinistra polimorfismo di due colonie della comunità *Klebsiella*, a destra della comunità *Escherichia***

L'isolamento di *C. metallidurans*, invece, non è andata a buon fine. Probabilmente, le condizioni sperimentali utilizzate per l'isolamento, non sono risultate idonee per questa popolazione microbica svantaggiata anche dal fatto di costituire solo il 10% dell'intera comunità dell'inoculo GCL.

#### **Fermentazione del glicerolo grezzo con la comunità *Escherichia***

Nel corso delle prove di fermentazione del glicerolo grezzo è stata misurata la velocità di crescita della popolazione *Escherichia* attraverso la conta diretta al microscopio, ad intervalli regolari di 24 ore (Figura 25). Il grafico mostra che il numero di cellule aumenta in modo regolare fino ad una quantità massima intorno alle 72 ore, per poi, successivamente, decrescere.



**Figura 25. Curva di crescita della comunità *Escherichia* nel corso del processo di fermentazione**

Parallelamente è stato misurato il volume di biogas prodotto e la conseguente concentrazione dei metaboliti (Figura 26).

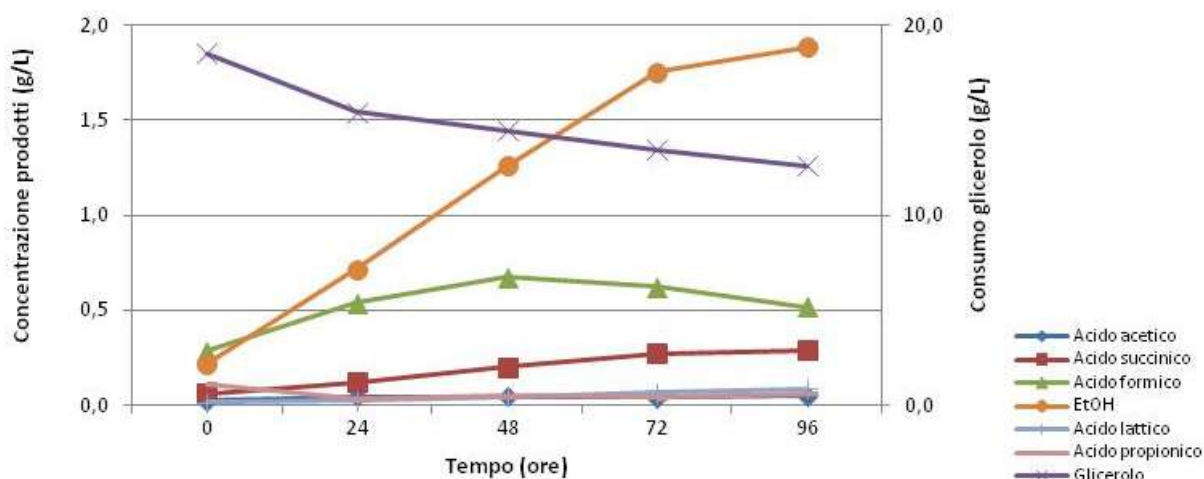


Figura 26. Fermentazione del glicerolo in *Escherichia*: consumo del substrato e produzione dei principali metaboliti (g/l) nel corso della fermentazione

E' possibile notare che il glicerolo grezzo è degradato con una bassa efficienza e molto lentamente, la comunità *Escherichia* infatti consuma solamente  $6,69 \pm 3,2$  g/l di substrato nel corso dell'intero processo. Per quel che riguarda i metaboliti, il principale prodotto nella conversione del glicerolo è stato l'etanolo con una concentrazione finale di  $1,88 \pm 0,03$  g/l, associato ad un discreto accumulo dell'acido formico entro le 48 ore ( $0,68 \pm 0,07$  g/l). La quantità di formico nelle ore successive tende a diminuire fino ad una concentrazione di  $0,52 \pm 0,04$  g/l. Come atteso e come confermato dalla letteratura (Clomburg e Gonzalez, 2011), l'1,3-PDO non compare tra i metaboliti di fermentazione come ulteriore conferma della purezza della colonia isolata.

La produzione di H<sub>2</sub> (Figura 27) è risultata essere caratterizzata da una fase lag molto lunga rispetto a quella osservata per l'inoculo GCL, con un picco di produzione intorno alle 60 ore fino al raggiungimento del plateau di massima produzione a partire dalle 150 ore.

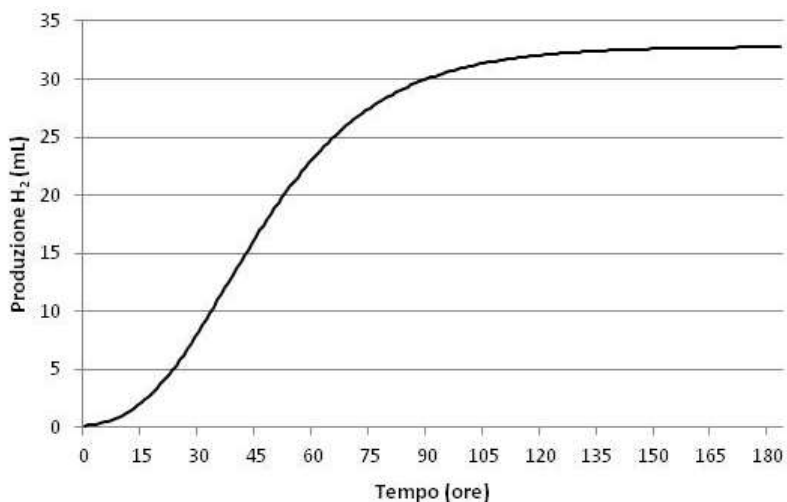


Figura 27. Curva di produzione cumulativa dell'idrogeno ottenuta con l'equazione di Gompertz modificata

### Fermentazione del glicerolo grezzo con la comunità *Klebsiella*

In figura 28 è mostrata la curva di crescita della comunità *Klebsiella*, misurata ad intervalli di 24 ore nel corso degli esperimenti di fermentazione.

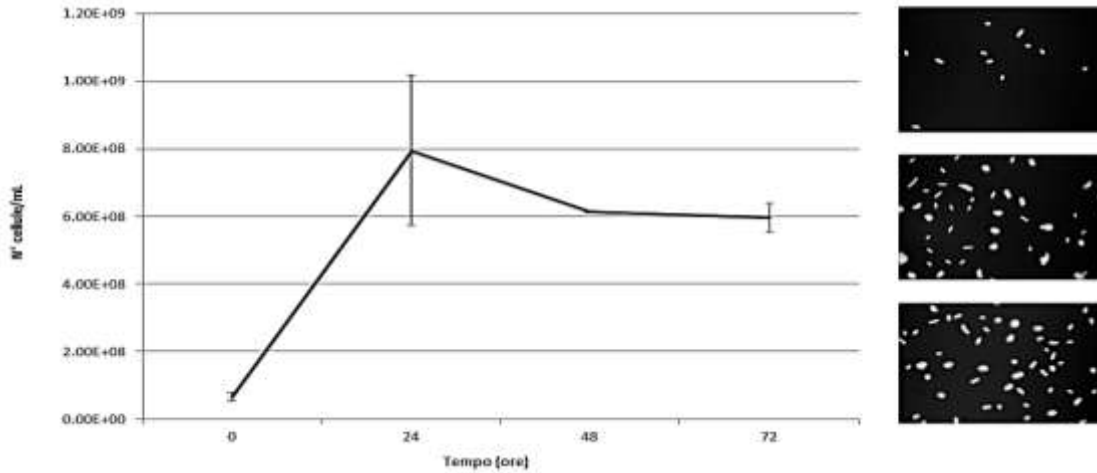


Figura 28. Curva di crescita della comunità *Klebsiella* nel corso del processo di fermentazione

Differentemente da quanto è accaduto nelle prove sperimentali con la comunità *Escherichia*, durante il processo di fermentazione da parte della comunità *Klebsiella* si assiste ad un rapido aumento del numero di cellule entro le prime 24 ore. La concentrazione delle cellule decresce poi nelle 24 ore successive e si mantiene costante fino alle 72 ore, quando il processo fermentativo si può considerare completato.

Per quanto riguarda le caratteristiche di quest'ultimo nell'arco delle prime 24 ore si osserva un rapido e notevole consumo del substrato (Figura 29) che tende a diminuire lentamente nelle ore successive (consumo medio  $13,8 \pm 0,26$  g/l). Alla fine della fermentazione, il glicerolo residuo non fermentato nel mezzo di coltura è pari a  $2,65 \pm 1,36$  g/l. In Figura 29 sono riportati i valori medi dei principali composti di fermentazione ottenuti durante le 72 ore nelle diverse repliche.

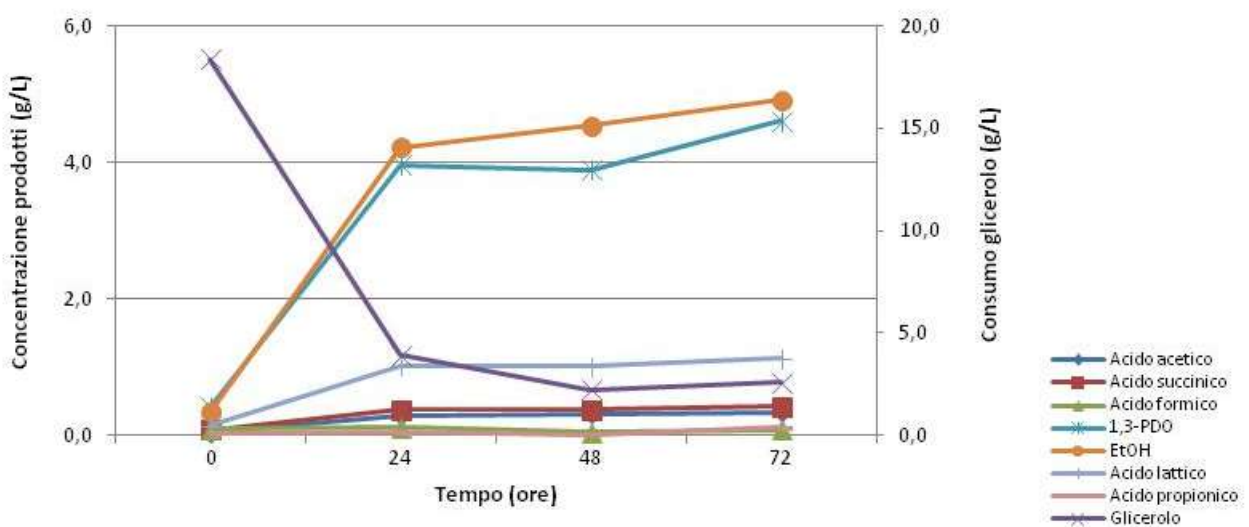


Figura 29. Fermentazione del glicerolo in *Klebsiella*: consumo del substrato e produzione dei principali metaboliti nel corso della fermentazione

I due prodotti principali del metabolismo fermentativo del glicerolo nella comunità *Klebsiella* sono stati l'etanolo e l'1,3-PDO con una resa molare di  $0,66 \pm 0,11$  moli di etanolo/mole di glicerolo e di  $0,35 \pm 0,11$  moli di 1,3-PDO/mole di glicerolo, rispettivamente. L'acido formico ha mostrato un leggero aumento durante le prime 24 ore ( $0,11 \pm 0,01$  g/l), per poi diminuire nel corso delle successive ( $0,07 \pm 0,003$  g/l).

La produzione di idrogeno raggiunge un picco intorno alle 24 ore con un valore massimo di 108,7 ml di gas prodotto (Figura 30), e parallelamente a della biomassa (Figura 28) al consumo del formico (Figura 29). Differentemente da quanto osservato con la comunità *Escherichia*, utilizzando la comunità *Klebsiella* non solo si ottiene una produzione finale maggiore ma anche la fase lag è molto ridotta. La resa molare dell'idrogeno è pari a  $0,5 \pm 0,09$  moli  $H_2$ /moli di glicerolo.

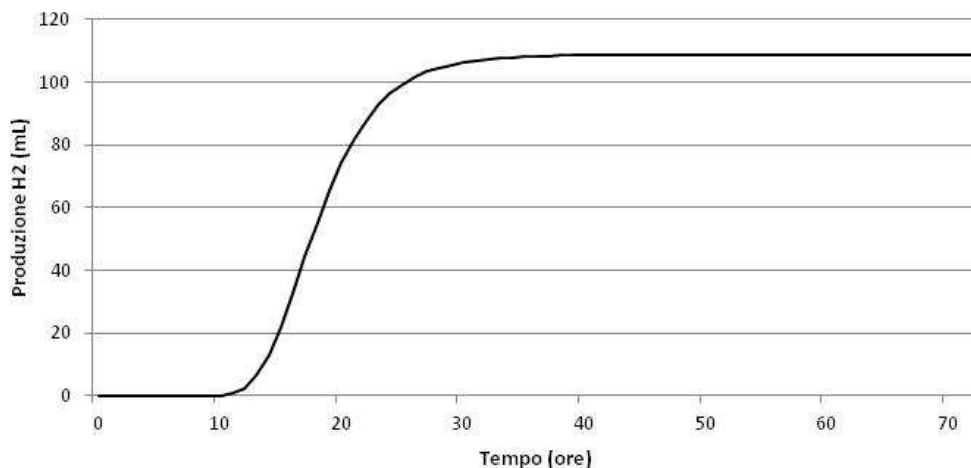


Figura 30. Curva di produzione cumulativa dell'idrogeno ottenuta con l'equazione di Gompertz modificata

**Fermentazione del glicerolo grezzo con la comunità *Escherichia + Klebsiella*.**

Le due comunità microbiche isolate sono state riunite, rispettando le proporzioni rilevate all'interno dell'inoculo GCL tal quale (*Klebsiella*: 60%; *Escherichia*: 30%), per verificare la performance dell'inoculo così ricostruito.

Il grafico in figura 31 mostra la crescita nel tempo dell'inoculo ricostruito. La diversa morfologia e dimensione delle cellule batteriche (le cellule di *Klebsiella* sono facilmente individuabili per la propensione a formare aggregati e per le maggiori dimensioni) ha consentito la conta delle due comunità.

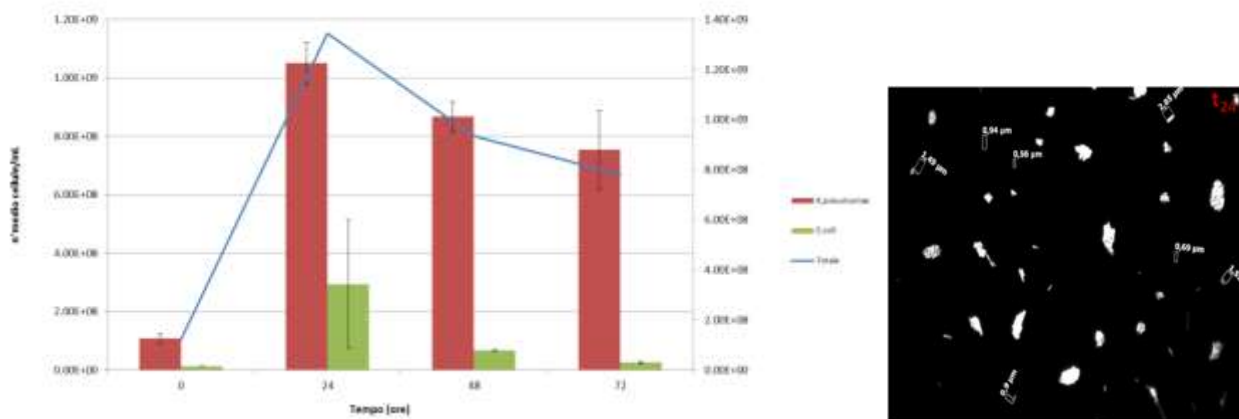
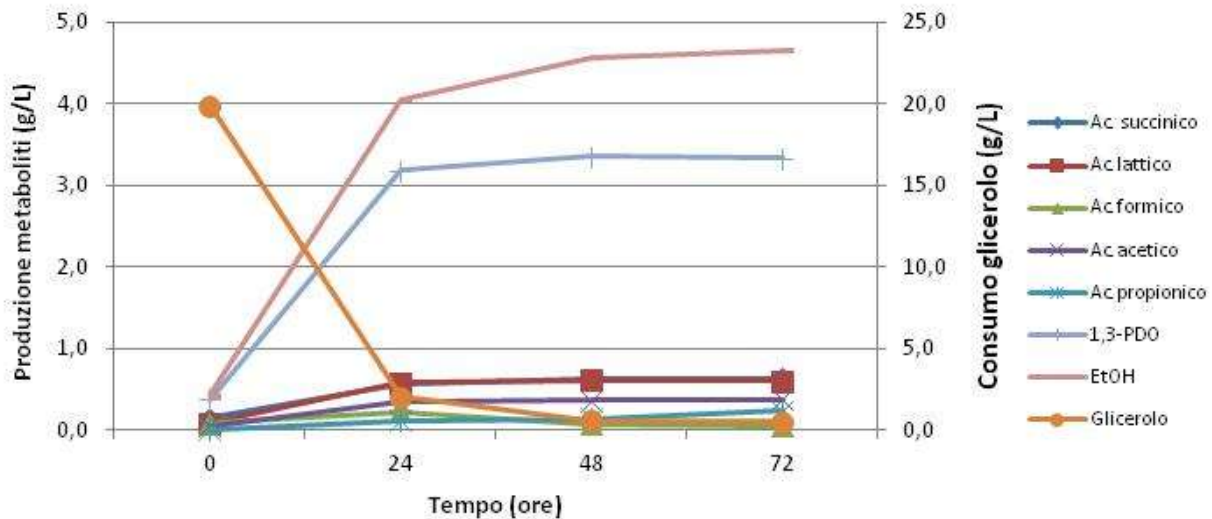


Figura 31. Conta diretta al microscopio della densità cellulare delle comunità *Klebsiella + Escherichia* nel corso della fermentazione e andamento della crescita cellulare totale nel tempo. Foto dell'inoculo con colorazione DAPI alle 24 ore.



Come riportato nella Figura 31 la comunità *Klebsiella* cresce velocemente nelle prime 24 ore mentre la densità cellulare della comunità *Escherichia* rimane bassa, a conferma del vantaggio metabolico della prima in conseguenza dell'alta affinità per il glicerolo grezzo.



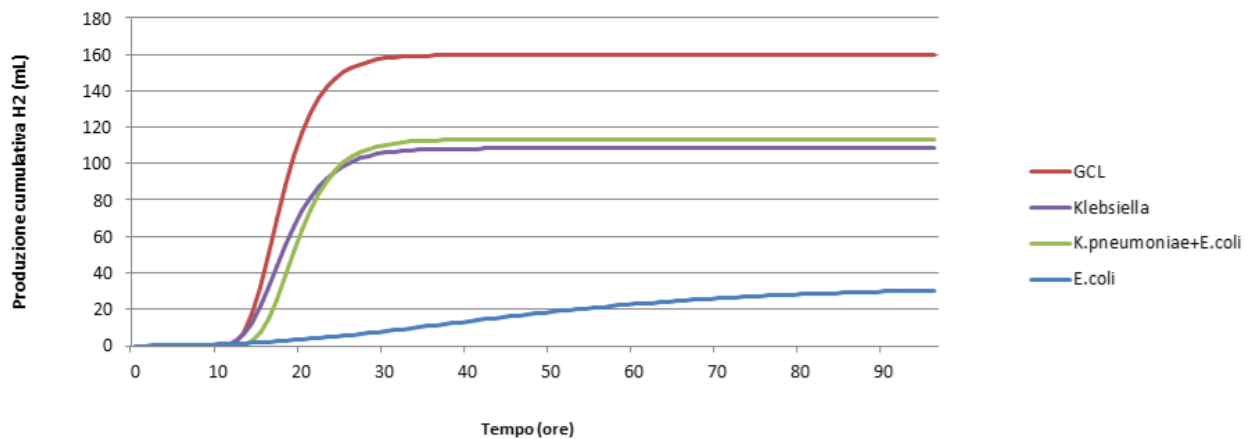
**Figura 32. Fermentazione del glicerolo con l'inoculo *Klebsiella* + *Escherichia*: consumo del substrato e produzione dei principali metaboliti nel corso della fermentazione**

In figura 32 sono riportate la produzione dei vari metaboliti solubili e il consumo del substrato nel corso della fermentazione. I principali prodotti ottenuti sono anche in questi esperimenti l'etanolo e l'1,3-PDO con una concentrazione finale di  $4,65 \pm 0,15$  g/L e  $3,33 \pm 0,11$  g/L, rispettivamente. Il glicerolo viene consumato quasi totalmente entro le 72 ore ( $0,57 \pm 0,25$  g/l di glicerolo residuo), con la quantità maggiore consumata nelle prime 24 ore così come è stato osservato nel corso delle prove con la singola comunità *Klebsiella*.

La produzione cumulativa di idrogeno è di 113,6 ml, mentre la resa è pari a  $0,42 \pm 0,01$  moli di  $H_2$ /moli di glicerolo (Figura 33).

Il confronto tra le produzioni dei metaboliti solubili e gassosi durante la degradazione del glicerolo può definire i singoli ruoli delle diverse comunità facenti parte del consorzio ed i relativi contributi che questi danno al processo fermentativo quando si trovano insieme (Figura 33-34). I dati osservati (Figura 34) evidenziano un vantaggio della comunità *Klebsiella* rispetto alla comunità *Escherichia*, che in coltura pura nell'arco di 24 ore riesce a portare a termine il processo di degradazione del substrato con la massima produzione di idrogeno e accrescimento di biomassa. Le due comunità di idrogeno-produttori producono etanolo con un'efficienza e una cinetica completamente diverse. Il confronto tra le rese di produzione di etanolo ottenute inoculando la comunità *Klebsiella* ( $0,66 \pm 0,11$  moli di etanolo/moli di glicerolo) sono state più basse rispetto a quelle dell'inoculo GCL ( $0,83 \pm 0,02$  moli di etanolo/moli di glicerolo).

Discorso opposto riguarda le rese dell'1,3-PDO, con valori più alti per l'inoculo con la comunità *Klebsiella* ( $0,35 \pm 0,11$  moli di 1,3-PDO/moli di glicerolo) rispetto all'inoculo GCL ( $0,11 \pm 0,002$  moli di 1,3-PDO/moli glicerolo). Relativamente alla comunità *Escherichia*, osserviamo l'assenza dell'1,3-PDO dalla produzione metabolica. Tale ceppo infatti è in grado di produrre l'1,2-PDO invece che l'1,3-PDO nel percorso riduttivo, così da bilanciare l'eccesso di equivalenti riducenti forniti dalla conversione del glicerolo in biomassa cellulare. Il dato interessante da sottolineare riguarda la produzione dell'1,3-PDO nelle prove svolte con l'inoculo *Klebsiella+Escherichia* che risulta minore rispetto a quella dell'inoculo *Klebsiella* ( $3,33 \pm 0,11$  g/L e  $4,61 \pm 0,75$  g/L, rispettivamente) e, ad una minore produzione di 1,3-PDO, è sempre associata una maggiore produzione di idrogeno (Zeng et al, 1996). In ultimo, le concentrazioni degli altri metaboliti non hanno molta importanza al fine della produzione combinata di etanolo ed idrogeno.



Inoculo	Pmax	Rmax	$\lambda$	R <sup>2</sup>
GCL	160.1168	19.24	13.34636	0.999961
<i>K.pneumoniae</i>	108.702	11.46619	13.13444	0.999164
<i>E.coli</i>	32.7972	0.552949	15.21348	0.998556
<i>K.pneumoniae+E.coli</i>	113.5875	13.20774	15.06254	0.999916

Figura 33. Curve cumulative della produzione di idrogeno nelle prove sperimentali di ricostruzione dell'inoculo. In tabella sono confrontati i valori dei parametri dell'equazione modificata di Gompertz dei vari esperimenti: Pmax= produzione potenziale massima (ml), Rmax= tasso massimo di produzione (ml/ora,  $\lambda$ = fase lag (ore), R2= coefficiente di correlazione tra dati sperimentali e teorici

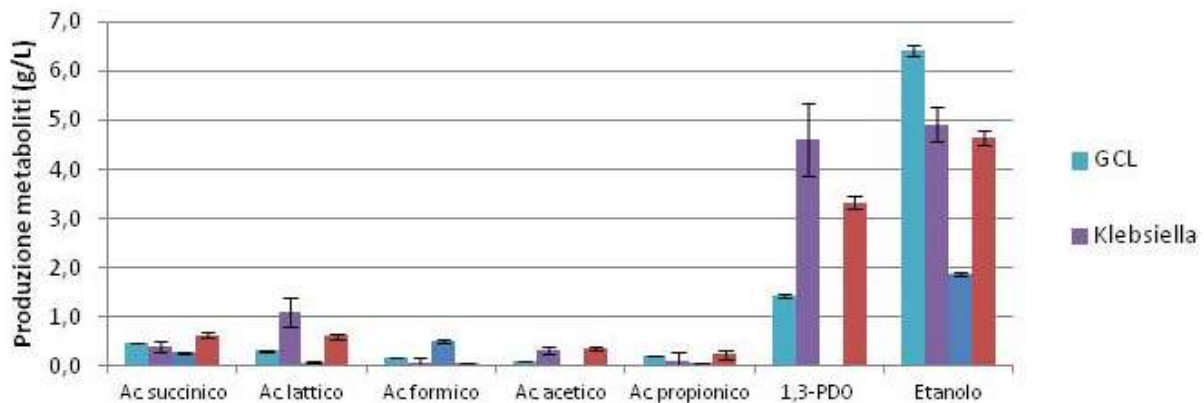


Figura 34. Confronto delle produzioni dei metaboliti secondari alla fine della fermentazione del glicerolo da parte dei vari inoculi utilizzati nelle stesse condizioni operative. Le concentrazioni sono espresse in g/l

La produzione potenziale di idrogeno (Pmax, ml), il tasso di produzione massimo (Rmax, mL/ora) e la fase lag ( $\lambda$ ), calcolati fittando i dati sperimentali di produzione cumulativa di H<sub>2</sub> con l'equazione di Gompertz modificata, sono mostrati in Figura 19. Il confronto tra i valori dei tre parametri mostrato in tabella permette di chiarire meglio le differenze tra le comunità inoculate nelle varie prove. Il parametro  $\lambda$  è di 13,35 ore per l'inoculo GCL, mentre i valori dei parametri Pmax ed Rmax sono rispettivamente 160,1 ml e 19,24 mL/ora. Una così breve fase di latenza da parte dell'inoculo arricchito è confrontabile con quella calcolata per la comunità *Klebsiella* ( $\lambda$ = 13,13) mentre si discosta leggermente da quella osservata inoculando la sola comunità *Escherichia* ( $\lambda$ = 15,2). Sebbene non sembri esserci molta differenza riguardo al tempo necessario all'inoculo di partenza ad avviare il processo di fermentazione e quindi la produzione di biogas, il valore del parametro di produzione potenziale di idrogeno nei tre inoculi è differente. Nelle prove

condotte utilizzando come inoculo la comunità *Klebsiella* la produzione massima di idrogeno è stata di 108,7 ml, mentre quella della comunità *Escherichia* è stata di 32,8 ml. La produzione massima dell'inoculo *Klebsiella+Escherichia* (113,6 ml) non si discosta dalla produzione della comunità *Klebsiella*. Inoltre i risultati sperimentali di produzione di idrogeno dell'inoculo ricostruito non mostrano sostanziali differenze rispetto alle prove sperimentali fatte con inoculando la comunità *Klebsiella*, a dimostrazione del ruolo principale che i ceppi di questo genere hanno all'interno del consorzio microbico rispetto ad *E.coli*.

#### Analisi molecolare dell' inoculo *Klebsiella + Escherichia*

Il confronto dei profili di DGGE relativi alle regioni V1-V3 e V6-V9, ottenuto dai campioni prelevati negli esperimenti di ricostruzione al tempo iniziale (t0) e al tempo finale (tf) è mostrato in figura 35, al fine di valutare la stabilità delle comunità singole e dell'inoculo ricostruito. Dalla sovrapposizione dei profili delle singole comunità si ottiene il profilo dell'inoculo ricostruito che, a sua volta, si sovrappone esattamente a quello dell'inoculo GCL. In entrambi i profili DGGE è possibile distinguere chiaramente le due comunità di idrogeno-produttori *Escherichia* e *Klebsiella*. Come già osservato nell'analisi DGGE eseguita in seguito all'isolamento delle singole comunità a partire dalle colonie su piastra (Figura 24), il polimorfismo all'interno delle comunità si mantiene nel corso del processo. Questo discorso è valido sia nel corso delle prove sperimentali condotte utilizzando le singole comunità che nelle prove con l'inoculo *Klebsiella+Escherichia*.

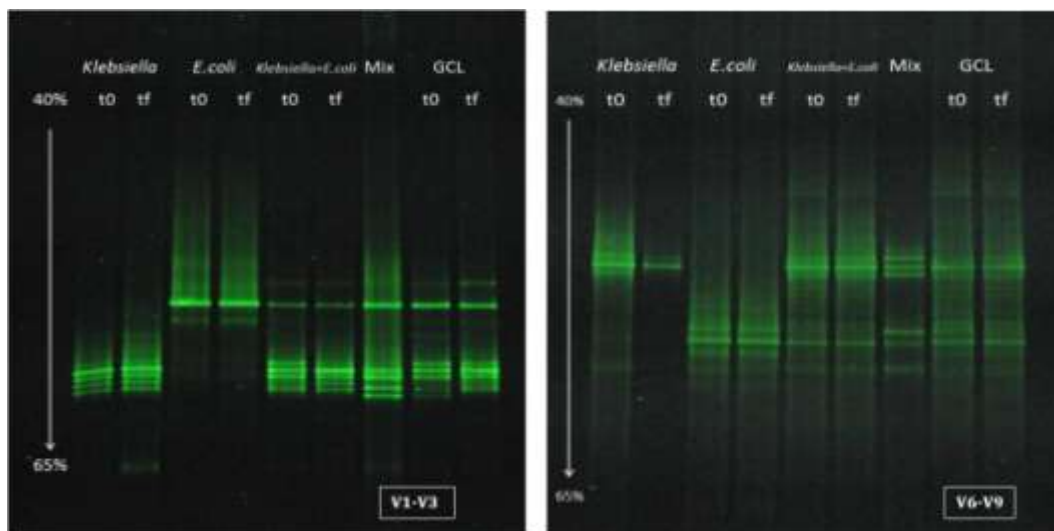


Figura 35. Analisi DGGE (gradiente 40%-65%) dei frammenti V1-V3 e V6-V9 nelle prove di ricostruzione dell'inoculo al tempo iniziale (t0) e finale (tf).

#### 2.7.12 Conclusioni

La diversità e l'elevato polimorfismo delle comunità *Klebsiella* ed *Escherichia*, che rappresentano la componente di idrogeno-produttori dell'inoculo GCL, sono stati confermati dal *fingerprint* molecolare ottenuto tramite la DGGE.

Le prove sperimentali svolte allo scopo di identificare la composizione minima della comunità microbica capace di conservare la funzione *target* (produzione di etanolo ed idrogeno) hanno indicato che le comunità *Klebsiella*, *Escherichia* e *Cupriavidus* si conservano nella composizione dell'inoculo, costituendo insieme il minimo consorzio funzionale. *Shigella*, invece, sparisce, risultato che conferma il suo ruolo 'passivo' nel processo di fermentazione. Le comunità *Klebsiella* ed *Escherichia* conservano il loro polimorfismo nel corso delle diluizioni e subiscono delle fluttuazioni nella composizione intraspecifica. La presenza di *C. metallidurans* è, invece, rimasta costante in tutte le prove di diluizione lasciando presupporre

un ruolo attivo di questo ceppo all'interno del consorzio. Purtroppo la difficoltà incontrata nell'isolamento non ci ha permesso di verificare effettivamente il contributo di questo ceppo al processo totale e non è possibile, al momento, trarre ulteriori conclusioni.

Nonostante la capacità di portare avanti il processo di fermentazione sia rimasta invariata, nel corso delle diluizioni la quantità massima di idrogeno misurata è andata via via diminuendo, e si è allungata la fase di latenza. Dal momento che nelle diluizioni seriali la concentrazione di cellule nell'inoculo è man mano minore, la comunità microbica necessita di più tempo per avviare il processo e utilizza il glicerolo grezzo per aumentare la biomassa, a scapito della produzione di idrogeno.

Il ruolo attivo svolto dalle comunità *Klebsiella* ed *Escherichia* nella produzione di idrogeno non è certo sorprendente, ma piuttosto, atteso. La caratteristica fondamentale risiede nel polimorfismo delle due comunità mantenuto dallo stretto mutualismo tra i diversi ceppi che costituiscono le singole comunità. Questa stretta relazione rende ogni comunità indivisibile nelle singole unità, come confermato dagli esperimenti di isolamento su terreno agarizzato.

Le prove svolte con le singole comunità hanno tutte evidenziato una riduzione di efficienza del processo, e, quindi, di una minore produzione sia dell'idrogeno che dell'etanolo. Le prove in *batch* con la comunità *Escherichia* hanno riportato le rese più basse, oltre una fase di latenza più lunga, ed hanno evidenziato un processo fermentativo con l'accumulo di acido formico, che può giustificare le più basse rese ottenute. Al contrario, l'elevata affinità della comunità *Klebsiella* per il glicerolo grezzo e il conseguente vantaggio metabolico, ha creato uno *shift* verso la produzione dell'1,3-PDO, metabolita svantaggioso per la produzione di idrogeno. Solo quando riunita con la comunità *Escherichia* si osserva una diminuzione nella produzione dell'1,3-PDO. Sebbene la differenza non sia notevole, è probabile che la presenza della comunità *Escherichia* nell'inoculo, riduca, con la sua lenta cinetica, la quantità di glicerolo disponibile per *Klebsiella*. Questa ipotesi è confermata dalle prove di fermentazione con l'inoculo GCL tal quale, che mostrano come ad una produzione dell'1,3-PDO notevolmente ridotta, corrisponda un parallelo aumento delle quantità di etanolo e di idrogeno.

Le prove sperimentali condotte utilizzando l'inoculo "ricostruito" non si sono discostate molto da quelle effettuate inoculando la sola comunità *Klebsiella*, confermando quanto tale comunità sia un ottimo produttore di biogas e mostri alta affinità per il substrato, anche sulla base di quanto osservato per i metaboliti solubili.

Infine, dal confronto di tutte le prove sperimentali effettuate in questa linea d'attività emerge che l'inoculo GCL tal quale ha mostrato le rese più alte sia in termini di produzione di idrogeno che di etanolo, confermando ancora una volta l'efficacia dell'arricchimento e dell'ottimizzazione dei parametri del processo di fermentazione.

Si può pertanto affermare che l'inoculo GCL non sia altro che il consorzio minimo funzionale, mantenendosi inalterato nel corso delle prove di diluizione e mostrando le massime produzioni nelle prove di ricostruzione dell'inoculo.

## 2.8 Studio di processi di digestione anaerobica innovativi da biomasse lignocellulosiche

### 2.8.1 Idrolisi fungina in aerobiosi e produzione di idrogeno da scarti lignocellulosici e chitini

Per questa linea di ricerca è proseguita l'attività avviata lo scorso anno in collaborazione con l'Università della Tuscia focalizzata sull'attacco di materiali ligninici e cellulose con funghi aerobici "white rot" per potenziare l'idrolisi e rendere i substrati più favorevoli al successivo attacco in anaerobiosi con l'inoculo microbico F<sub>210</sub> produttore di idrogeno. Inoltre quest'anno sono state allestite sperimentazioni nelle quali è stata utilizzata la chitina quale substrato di partenza. A tal fine è stato utilizzato il ceppo fungino *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003 che aveva dimostrato in precedenza di possedere capacità chitinolitiche. La chitina costituisce infatti un altro scarto problematico dell'industria agroalimentare, soprattutto nell'industria del trattamento dei prodotti ittici.

Le attività sono state articolate in diverse serie sperimentali: per ognuna di queste l'attacco fungino veniva svolto presso l'Università della Tuscia mentre i test per la produzione di idrogeno sono stati svolti presso il CR ENEA Casaccia. Qui i campioni venivano inoculati con F<sub>210</sub> riattivato per il quale venivano monitorati la densità microbica e la vitalità delle cellule mediante tecniche di microscopia in epifluorescenza (DAPI, Live/Dead).

#### Prima prova: pretrattamento con singoli ceppi fungini

I ceppi fungini utilizzati sono stati quelli selezionati nella precedente attività: *Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Pleurotus pulmonarius* e *Panus tigrinus* (Report RdS/2012/290) I substrati utilizzati per questa prova erano segatura di pioppo e paglia di grano. Rispetto alle precedenti sperimentazioni è stata introdotta la segatura di pioppo in sostituzione della segatura di abete, supponendo che per le caratteristiche della sua struttura lignea e per la minore concentrazione di resine si potesse aumentare l'idrogeno prodotto per fermentazione rispetto ai risultati ottenuti con abete.

I ceppi sono stati testati singolarmente sui differenti substrati e le produzioni di idrogeno sono state avviate ad intervalli di una settimana dall'avvio dell'attacco fungino (aliquote di 20 ml campione venivano prelevate a cadenza settimanale), instaurando condizioni di anaerobiosi nei *batch* da 120 ml.

Nella prima e seconda settimana i risultati sono stati scarsi: nella prima, solo il pioppo attaccato da *Panus tigrinus* ha prodotto idrogeno con 116 ml/l di ml di biogas in 24 h di cui il 2,3% di idrogeno. Gli altri campioni pur avendo prodotto biogas non contenevano idrogeno; nella seconda settimana solo raramente le produzioni di idrogeno superano l'1%. Nella terza settimana, la migliore delle quattro, le più alte produzioni sono quelle riscontrate rispettivamente per paglia e pioppo attaccati con *Trametes trogii* che nelle 48 ore hanno prodotto rispettivamente 74 e 70 ml/l di biogas con una percentuale di idrogeno che però non supera l'1,5%. Nella IV settimana la produzione di biogas si è arrestata nelle prime 24 ore: i migliori risultati sono stati ottenuti per pioppo trattato con *Trametes trogii* e per paglia trattata con *Pleurotus pulmonarius* con produzioni nelle 24 ore rispettivamente di 72 ml/l di biogas con l'1,5% di H<sub>2</sub> e di 34 ml/l ma con percentuale di idrogeno era inferiore a 1. La produzione di biogas contenente idrogeno rilevabile mediante *water displacement* si concludeva infatti nelle prime 24 ore.

#### Seconda prova: a) pretrattamento con mix di ceppi fungini

I risultati riportati nella relazione del precedente accordo di programma (Aliboni et al, 2012) suggerivano l'utilizzo di mix fungine piuttosto che di singoli ceppi per potenziare e diversificare l'attività idrolitica su substrati ricchi di lignina e/o cellulosa.

A tal fine tre differenti substrati, segatura di pioppo, segatura di abete, paglia di grano, sono stati sottoposti all'attacco fungino con una mix composta da *Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Pleurotus pulmonarius* e *Panus tigrinus*. Solo la II settimana dall'attacco fungino ha dato risultati di un certo rilievo (Tabella 12) ma comunque inferiori rispetto ai precedenti risultati ottenuti con il pretrattamento dei substrati con ceppi fungini singoli. Nella seconda e quarta settimana la produzione di idrogeno (ml) era  $\leq 0,9$ .

**Tabella 12. Produzione di idrogeno alla 2<sup>a</sup> settimana dall'attacco fungino**

2 <sup>a</sup> settimana	H <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> (ml/l)
ABETE e Mix	7,2	390
Paglia e Mix	4,7	245
Pioppo e Mix	3,1	160

**Seconda prova: b) disegno fattoriale utilizzando chitina ed estratto di lievito a differenti concentrazioni e *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003**

E' stato allestito un esperimento sulla base di un Disegno Fattoriale pianificato presso l'Università di Viterbo "La Tuscia": 12 test sono stati allestiti (batch da 120 ml) come riportato in tabella 13 utilizzando chitina ed estratto di lievito a differenti concentrazioni mentre per l'attacco fungino è stato utilizzato *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003.

E' stato deciso di monitorare le produzioni a partire dalla seconda settimana di attacco fungino, perché da precedenti sperimentazioni era stato rilevato che durante la prima settimana non si registrano livelli di produzione di H<sub>2</sub> significativi.

**Tabella 13. Disegno fattoriale per la RSM: terreni a diversa concentrazione di chitina grezza ed estratto di lievito**

Esperimento	Prova	CHITINA (g/L)	YE (g/L)
1	N1	5	0,1
2	N2	30	0,1
3	N3	5	5
4	N4	30	5
5	N5	5	1,73333
6	N6	30	3,36667
7	N7	13,3333	0,1
8	N8	21,6667	5
9	N9	17,5	2,5
10	N10	17,5	2,5
11	N11	17,5	2,5
12	N12	17,5	2,5

Sebbene le quantità di biogas prodotte fossero sempre molto scarse e si esaurissero nelle prima 24-48 ore in tutti i test, nel corso della II e III settimana è stato osservato un lieve ma quasi costante incremento della% di idrogeno nello spazio di testa dei batch. Per questo motivo la IV settimana è stata protratta per 21 giorni (504 ore). Tutte le prove hanno mostrato un incremento nella produzione di idrogeno. In Figura 36 sono riportati tre prove indicative. E' ipotizzabile che la comunità F210 sia dotata di capacità chitinolitiche ma che queste vadano potenziate mediante arricchimento su substrato specifico. Per questo motivo, al termine dell'esperimento di produzione di H<sub>2</sub> aliquote dei terreni di coltura di ciascuna prova sono state congelate (in glicerolo 30%) in modo tale da poter essere nuovamente rivitalizzate ed eventualmente utilizzate per proseguire la fase di arricchimento.

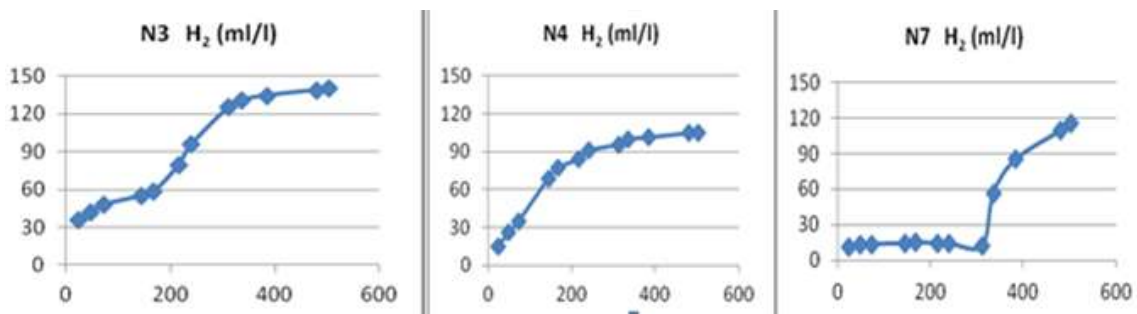


Figura 36. Produzione di H<sub>2</sub> da chitina dopo pretrattamento fungino con *Lecanicillium muscarium*

D'altra parte la quantità di idrogeno prodotta per tutti i test è risultata veramente scarsa.

Dopo 21 giorni dall'aggiunta di F<sub>210</sub> i campioni sono stati inoculati con il digestato del II reattore dell'impianto pilota ENEA Utrinn-Bio. Tutti hanno evoluto metano e, sebbene l'esperimento sia ancora in corso, i risultati a 13 giorni (312 h) dall'inoculo sono di seguito riportati (Tabella14).

Tabella 14. Produzione di H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> dal substrato chitina dopo attacco fungino di *Lecanicillium muscarium*

Prova	CHITINA (g/L)	YE (g/L)	% H <sub>2</sub> 504 ore	ml/l H <sub>2</sub> 504 ore	% CH <sub>4</sub> a 312 ore*	ml/l CH <sub>4</sub> a 312 ore*
N1	5	0,1	1,2	55	13	735
N2	30	0,1	1,9	95	13,2	695
N3	5	5	3,0	145	11,4	640
N4	30	5	3,2	105	30,4	2600
N5	5	1,73333	0,9	40	22,5	1465
N6	30	3,36667	2,1	100	20,4	1290
N7	13,3333	0,1	2,7	130	13,3	700
N8	21,6667	5	2,2	110	38,13	3935
N9**	17,5	2,5	-	-	-	-
N10	17,5	2,5	2,6	125	19,97	1190
N11	17,5	2,5	1,9	90	11,38	590
N12	17,5	2,5	2,5	120	13,32	725

\*Esperimento attualmente in corso; \*\* i risultati per la prova N9 non sono disponibili

Un ultimo esperimento è stato allestito utilizzando batch di maggiori dimensioni, cioè 320 ml, utilizzando i substrati che avevano risposto meglio alla produzione di H<sub>2</sub>: segatura di abete, paglia e chitina. Le condizioni sperimentali rimanevano invariate rispetto ai test 1 e 2. Per i primi due substrati, le colture sono state trattate con la mix fungina sopra descritta mentre la chitina è stata trattata con *Lecanicillium muscarium*. In tutti i casi l'attacco fungino ha avuto una durata di 2 settimane al termine delle quali sono stati inoculati con F210.

## 2.8.2 Isolamento e coltivazione di funghi anaerobi da rumine bovino

I funghi anaerobi costituiscono un settore di ricerca nuovo a livello internazionale, ed hanno attratto la nostra attenzione perché dotati di enzimi fibrolitici, principalmente xylanasi e cellulasi, con attività specifica più elevata di quella rilevata per i funghi aerobici oltre ad avere un ciclo vitale più rapido. Questa linea di ricerca è stata dedicata a verificare la possibilità di utilizzare i funghi anaerobi nell'idrolisi dei materiali lignocellulosici. I funghi anaerobi proliferano nel rumine, organo posseduto da alcuni erbivori, dove insieme a batteri, protozoi e funghi costituiscono un ecosistema complesso. La loro esistenza è nota solo dal 1975 e attualmente sono raggruppati nella classe dei Chytridiomycetes; sono tutti anaerobi obbligati ed hanno un ciclo vitale complesso, composto da una fase con zoospore mobili (possono avere 1 o più flagelli, a seconda della specie) alternato ad una fase costituita da un tallo con uno o più sporangi. In colture ottimali, che ricalcano cioè le condizioni del rumine, il loro ciclo vitale può essere completato in 24-32 ore sebbene si possano osservare cicli completi anche in 8 ore (Goeffrey et al., 1998).

Se queste due peculiarità li rendono attraenti per la fase di idrolisi, di contro, le tecniche di lavoro sono ancora poco note e la letteratura in merito è molto scarsa. Inoltre proprio perché costituiscono un tema nuovo di ricerca, non è stato possibile reperire funghi anaerobi presso le ceppoteche commerciali europee. Ci si è rivolti allora a ricercatori di altri Paesi e, nell'ambito di una collaborazione internazionale è stato invitato il prof. Ugur Comlekcioglu della Kahramanmaraş Sutcu Imam University (Turchia) esperto in materia, che ha illustrato le tecniche da lui adottate ed ha fornito due ceppi fungini di *Neocallimastix* sp. ed *Orpinomyces* sp.

Le attività finora svolte sono state mirate alla definizione del protocollo di isolamento sia da striscio di organo sia da reflui zootecnici, al mantenimento dei ceppi fungini preservandoli dalla contaminazione batterica (principalmente *Archea*) e alla messa a punto delle tecniche di microscopia per la visualizzazione e la raccolta delle immagini, nonché ad indagini preliminari sulla loro efficienza idrolitica. Le parti più salienti delle tecniche vengono riportate per esteso in quanto innovative.

## 2.8.3 Metodologie e risultati ottenuti

### Isolamento da organo

Nella prima fase dell'attività di ricerca si è proceduto all'isolamento di Funghi Ruminali (RF) da organo. Una porzione di rumine, prelevata da un bovino alimentato con fieno, è stata immediatamente chiusa per ridurre al minimo l'esposizione all'aria, al fine di preservare l'ambiente anaerobico dell'organo. Il campione è stato trasportato dal mattatoio in laboratorio mantenendolo a 39 °C ed è stato aperto all'interno della cappa anaerobica (sotto atmosfera riducente e temperatura 39 °C).

Si è proceduto alla semina in piastra (Figura 37):

- spatolando il liquido ruminale tal quale sul terreno di coltura;
- strisciando direttamente porzioni di rumine e depositandone porzioni di esso;
- strisciando gli insilati presenti all'interno dell'organo al momento del prelievo.

Le piastre sono state lasciate ad incubare all'interno della cappa (per garantire l'anaerobiosi) a 39 °C, la temperatura ottimale di crescita .





Figura 37. Semina su piastra del liquido ruminale e di porzione di organo di rumine bovino

Il terreno utilizzato per la messa in coltura in questa prima fase è quello riportato da Miller e Wolin (1973) e da noi modificato sulla base di prove preliminari :

Tabella 15 Terreno utilizzato per la messa in coltura di funghi ruminali

BM	(in 100 ml)	
Soluzione di Sali I	4 ml	
Soluzione di Sali II	4 ml	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (80 g/l)	5 ml	
Glucosio	0,5g*	
Estratto di lievito	0,2g	
Peptone*	0,5g	
Resazurina (1 g/l)	0,1ml	
Cisteina-HCl	50mg	
Soluzione di acidi grassi	0,1ml	
Antibiotici	0,1 g/L (ciascuno)	
Agar **	1,5 g	
(H <sub>2</sub> O distillata)	(100ml)	

Soluzione Sali I (%P/V)	Soluzione Sali II (%P/V)	Soluzione acidi grassi
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,6	NaCl 1,2	Acetico 2 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,6	Butirrico 10,6 ml
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,6	Isovalerico 2 ml
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,245	Propionico 4 ml
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,159	

\*vedere il testo

\*\*Modificati rispetto al protocollo di riferimento

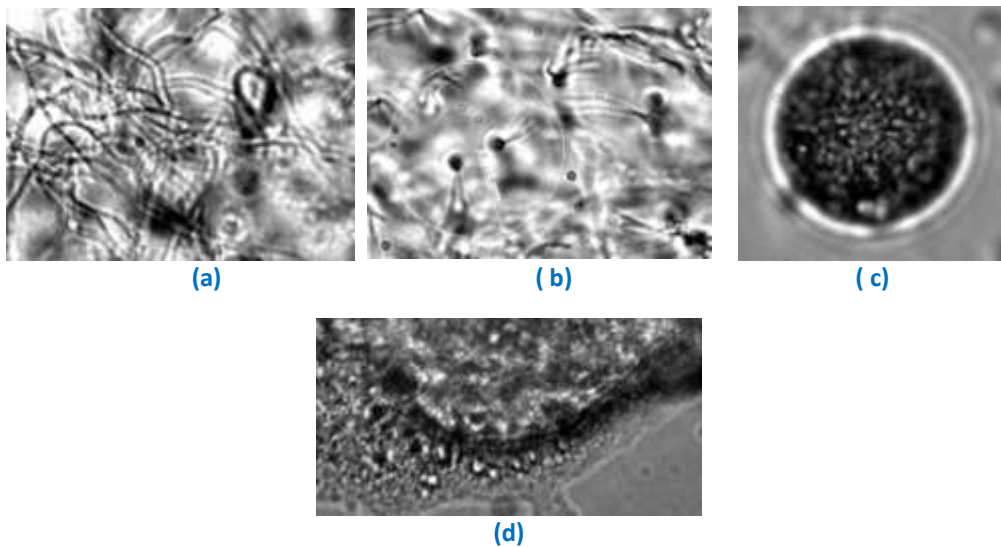
Sono stati aggiunti al terreno i seguenti antibiotici per ridurre la carica batterica: Cloramfenicolo (0,1 g/l), Kanamicina (0,1 g/l); Ampicillina (0,1 g/l). Infatti, come anche riportato nella letteratura disponibile, il maggior problema nella coltivazione e nella selezione di funghi anaerobi, è dato dall'eventuale proliferare di batteri, che nella fase iniziale di coltura ed in condizioni ottimali per la loro crescita, possono avere il sopravvento. In questo senso le maggiori difficoltà si sono dimostrate essere quelle relative allo sviluppo di Archea, che per le caratteristiche della loro membrana cellulare, sono insensibili agli antibiotici concepiti per aggredire la membrana cellulare dei Batteri propriamente detti.

Il terreno è stato preparato a meno di: Cisteina-HCl, glucosio, Kanamicina ed Ampicillina (termolabili). Dopo bollitura, si è aggiunta cisteina-HCL per rimuovere l'ossigeno disciolto mentre glucosio, e gli antibiotici Kanamicina ed Ampicillina (precedentemente sterilizzati per filtrazione), sono stati aggiunti dopo sterilizzazione in autoclave (121 °C per 20 min) in ambiente anaerobico. La resazurina viene impiegata per

rilevare la presenza di ossigeno: il suo viraggio verso il rosso indica che si sono perdute le condizioni di anerbiosi.

A 48 ore dalla semina in piastra si è riscontrata presenza di colonie fungine bianche, incluse nel terreno, nella zona sottostante le porzioni di organo. Al contrario, non si è riscontrata crescita sui terreni seminati mediante spatolamento di liquido ruminale o in quelli in cui erano stati depositati gli insilati.

Dall'osservazione al microscopio luce diretta (ingrandimento 5x) sono state rilevate strutture riconducibili ai funghi ruminali (Figura 38).



**Figura 38. Funghi ruminali: a) miceli; b) zoospore poliflagellate; c) e-d ) zoosporangi. Immagine al microscopio ottico in luce diretta (5x)**

### Riattivazione ceppi puri

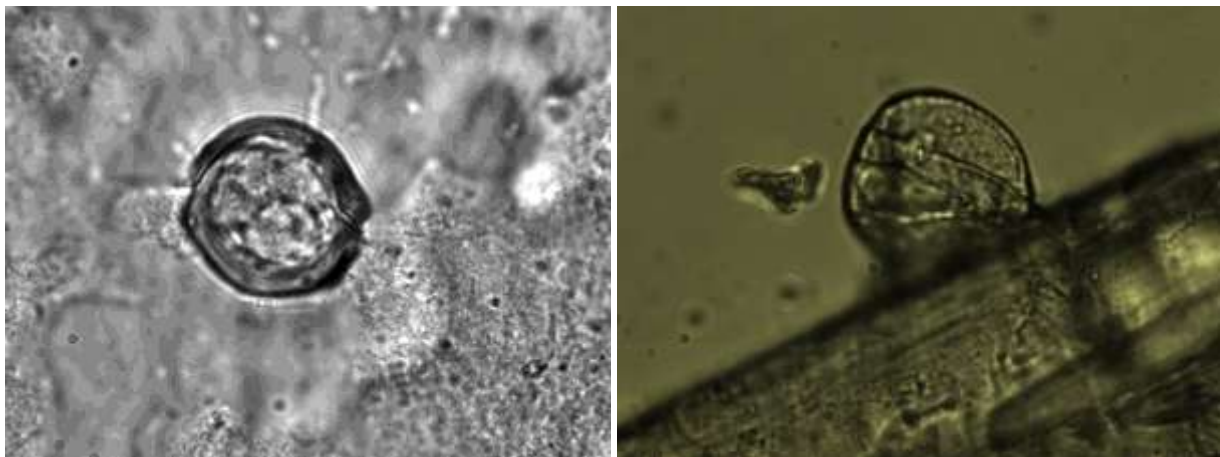
Con il Prof. Ugur Comlekcioglu (Università Kahramanmaraş Sütçü İmam, Turchia) sono state applicate metodiche di messa in coltura di RF in *roll-tubes* di Hungate, sia in terreni liquido che solido. Il Prof. Comlekcioglu ha fornito il protocollo in uso presso il suo laboratorio per la preparazione del terreno di isolamento e ha mostrato i passaggi relativi alla messa in coltura e mantenimento di due ceppi puri di RF provenienti dalla collezione dell'Università Kahramanmaraş Sütçü İmam, *Neocallimastix sp.* ed *Orpinomyces sp.*, alternando colture su terreni solidi con paglia incorporata nel mezzo, per favorire la germinazione delle zoospore e il differenziamento delle sporocisti, a colture liquide, a cui viene aggiunto glucosio, per favorire la produzione di zoospore, mentre le colture su terreni agarizzati raggiungono il culmine della vitalità dopo 6 - 8 giorni.

I ceppi di *Neocallimastix sp.* ed *Orpinomyces sp.*, trasportati dalla Turchia in ghiaccio secco e stoccati insieme alla paglia, sono stati posti in termostato a 39 °C per essere riattivati. Per ripassare le colture nei nuovi terreni (in tubi di Hungate) si è sempre lavorato in prossimità della fiamma, sia per creare un cono di sterilità che per mantenere una temperatura di 39 °C durante le operazioni di trasferimento, mantenendo un flusso costante di CO<sub>2</sub> (Figura 39). I ceppi ripassati sono stati incubati a 39 °C per 48 ore.



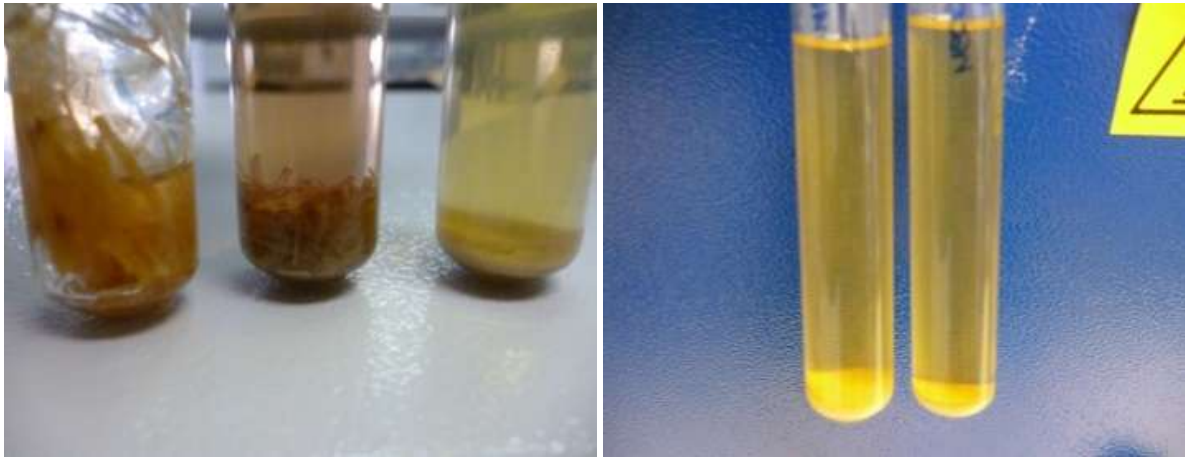
**Figura 39. Passaggi relativi all'attivazione di due ceppi fungini ruminali in flusso di CO<sub>2</sub> e alle due colture pure**

Dopo 48 ore di incubazione si sono potute già osservare al microscopio le zoospore prodotte dai funghi ruminali (Figura 40).



**Figura 40. Immagini al microscopio ottenute da colture di *Neocallimastix*: a sinistra zoospora; a destra germinazione della zoospora su stelo di paglia (Obiettivo Zeiss, 5x)**

La vitalità dei funghi ruminali veniva accertata a livello macroscopico agitando delicatamente il tubo in colture liquide contenenti paglia: l'attività dei funghi ruminali compatta la paglia a formare un unico pellet. A livello microscopico con luce diretta (5X) gli sporangi vitali sono bene riconoscibili perché riflettono con una brillantezza caratteristica. Come visibile nelle immagini sottostanti, già dopo 8 giorni dall'inoculo la paglia utilizzata come substrato di crescita per i RF viene degradata fino ad essere irriconoscibile, assumendo un aspetto pulviscolare (Figura 41).



**Figura 41. Immagini relative alla degradazione della paglia in tubi Hungate: nella foto a sinistra la paglia nel tempo iniziale, intermedio, e finale delle prove; nella foto a destra ciò che resta della paglia inizialmente fornita ai due ceppi fungini**

### **Isolamento da letame**

Sebbene i funghi anaerobi siano molto sensibili a qualsiasi variazione ambientale (vivono infatti all'interno del rumine dove le condizioni ambientali sono costanti in termini di pH, temperatura, anaerobiosi), si suppone l'esistenza di spore fungine o di altre forme resistenti che non sono state ancora individuate (Comlekcioglu, comunicazione personale) ma che di fatto consentono il passaggio dei RF agli animali di pochi giorni e rendono possibile isolare ceppi fungini dal letame.

Anche in questo caso tutti i passaggi relativi all'isolamento e purificazione dei funghi devono essere condotti in ambiente anaerobico, generato dalla CO<sub>2</sub>, e vicino alla fiamma. L'anaerobiosi deve essere mantenuta dalla CO<sub>2</sub> perché il terreno utilizzato è composto in modo da avere un pH intorno a 7, considerando l'acido carbonico che si forma nel mezzo di coltura.

Non occorrono speciali strumentazioni ma occorrono tecniche particolari ed ogni passaggio deve essere svolto con particolare attenzione e abilità manuale per evitare contaminazioni batteriche, inquinamento da ossigeno e alterazione delle condizioni ambientali necessarie ai funghi. Viene riportata la metodica frutto del lavoro di messa a punto.

### **Isolamento**

E' fondamentale verificare che l'animale da cui ottenere il letame abbia avuto una dieta a base di paglia e/o fieno. Inoltre deve avere più di 5 mesi. Il letame deve essere conservato a - 20 °C fino al momento dell'uso.

- porre un sacchetto di plastica sotto flusso di CO<sub>2</sub> e inserire una cucchiata di letame (50 ml circa);
- sempre sotto flusso, inserire circa 50 ml di terreno mantenuto a 39 °C comprendente però anche una soluzione di antibiotici (Tabella 16) al fine di ridurre la crescita dei batteri (principalmente eubatteri). Per evitare inquinamenti da O<sub>2</sub> è preferibile utilizzare una pompa peristaltica.
- A 39 °C e sempre fluendo, CO<sub>2</sub> maneggiare il sacchetto per omogenizzare la soluzione tipo Stomacker.
- Prelevare 5 ml della soluzione e aggiungerla in un batch (100 ml circa) sotto flusso costante, contenente 45 ml di terreno come il precedente. Agitare e da qui procedere a 4-5 diluizioni seriali inserendo appena possibile i batch a 39 °C.

**Tabella 16. Mix di antibiotici utilizzati per l'isolamento di funghi anaerobi da letame**

Eritromicina*	10 g/l
Ampicillina	5 g/l
Cloramfenicolo	5 g/l
Streptomina	7 g/l

\*aggiunto in alcune prove

### Purificazione

Dall'ultima(e) diluizioni seriali passare nei tubi di coltura (Tubi Hungate) con agar preparati come segue:

1. mettere 100 mg di paglia sminuzzati in un tubo, sotto flusso di CO<sub>2</sub> aggiungere 2 ml di terreno con agar a circa 45 °C; chiudere e rapidamente
2. Aggiungere 0,5 ml di soluzione dall'ultima diluizione, rotolare in acqua fredda o ghiaccio per far solidificare l'agar foderando le pareti del tube;
3. Dopo circa 6 giorni si sviluppano le colonie nel mezzo agar; prendere con attenzione singole colonie e passarle in mezzo liquido;
4. Per 2 giorni far crescere nel mezzo liquido;
5. Ripassare nuovamente nei role tube;
6. Procedere così alternativamente per circa 3 passaggi;
7. Quando il mezzo liquido si presenta molto limpido vuol dire che non ci sono più batteri e si può togliere la soluzione di antibiotici.

### Crescita

- Solo quando i ceppi sono purificati e privi di batteri si può passare a terreno liquido contenente glucosio (o cellobiosio) dove nell'arco di per 8-12 si forma una moltitudine di spore;
- si ripassa su terreno liquido con paglia, si fanno crescere e poi si può procedere allo stoccaggio.

### Conservazione

Una volta isolati e purificati i ceppi devono essere conservati in azoto liquido, in glicerolo al 15% v/v sotto flusso permanente di CO<sub>2</sub>.

- Mettere in una vials di plastica una quantità di medium liquido;
- aggiungere rapidamente glicerolo (flussato con CO<sub>2</sub>);
- trasferire il pellet fungino, costituito da paglia di grano, micelio e spore, prelevandolo dal tubo di coltura, anch'esso sotto flusso di CO<sub>2</sub>, utilizzando un ansa di metallo piegata a 90 °C.
- Portare la vials di plastica a -20 °C e appena raggiunto il congelamento trasferire nell'azoto liquido per lo stoccaggio permanente.

### Riattivazione

Nel momento che si vogliono rivitalizzare i ceppi bisogna essere molto rapidi:

- Mettere i tubi per le colture liquide a scaldare a 39 °C
- portare a temperatura ambiente le vials provenienti dal congelatore contenenti il pellet
- mettere sotto flusso di CO<sub>2</sub> sia la vials che il tubo di Hungate fresco flussando all'interno di ognuno con aghi ricurvi
- nell'arco di 1 o 2 secondi trasferire il pellet fungino nel tubo, richiudere in fretta e mettere a incubare a 39 °C per 2 giorni circa.

### Verifica dello sviluppo del fungo

Lo sviluppo fungino, viene verificato come segue sia per le colture riattivate sia per quelle isolate e purificate:

- in caso di buona crescita nel tubo si forma un *pellet* sferico piuttosto compatto, che non si disintegra se il tubo viene leggermente agitato. Viceversa le paglie si disperdono nel mezzo;

- il volume nel tubo in cui il fungo si sviluppa bene sembra aumentare rispetto al controllo: ciò è dovuto sia al gas prodotto dal fungo immerso nel liquido in forma di microbollicine sia dalle paglie che, aggredite dal fungo, divengono più soffici e spugnose;
- mediante microscopio luce diretta (5x) , ponendo orizzontalmente tutto il tubo Hungate si individuano miceli e zoosporangi;
- gli sporangi vecchi melatonizzano e diventano scuri e opachi mentre la brillantezza è segno di buona vitalità;
- è importante verificare che, oltre alla formazione del *pellet*, il terreno si mantenga limpido indicando assenza di inquinamento batterico.
- Eventuale inquinamento della coltura da parte di metanigeni viene controllato analizzando ad un gas cromatografo, il biogas dello spazio di test dei tubi di coltura.

#### 2.8.4 Idrolisi batterica

La frazione solida del digestato prodotto da impianti a biogas tradizionali, con 40 giorni di tempo di ritenzione ed alimentati al 100% con vegetali (insilati o scarti di lavorazione), è composta in percentuale di quasi il 100% da polisaccaridi (lignina, cellulosa ed emicellulosa). Poca differenza, circa il 70% della composizione, si trova nei digestati con alimentazione mista liquami – vegetali. Questo dimostra che gran parte del potenziale energetico della biomassa non è utilizzato e quindi una scarsa efficienza del trattamento.

Considerato che in Europa si producono annualmente circa 300 Milioni di tonnellate di digestati, si comprende quanto sia importante trovare metodi efficaci per un pretrattamento idrolitico delle biomasse o per una migliore utilizzazione degli stessi sottoprodotti. Per tali motivi il nostro laboratorio è impegnato da alcuni anni nello studio della capacità idrolitica di batteri e funghi. I funghi sono quelli che, seppur lentamente, hanno maggiori capacità di attacco sulla lignina (vedi Cap. 2.5.1).

I batteri invece possiedono scarse capacità di degradazione per la lignina, ma ottime capacità idrolitiche su cellulosa ed emicellulosa e la loro attività è estremamente importante, in quanto avviene in anaerobiosi stretta o facoltativa, che sono le condizioni in cui operano le comunità microbiche negli impianti a biogas.

Su tale premessa è proseguita la sperimentazione già avviata lo scorso anno (Aliboni et al. 2012) nella ricerca e studio delle comunità microbiche naturalmente presenti nei rifiuti vegetali con indagini relative a verificare la possibilità di produrre bioidrogeno per autofermentazione da scarti di insalata e scarti di insalata più bucce di patata.

Le precedenti sperimentazioni erano state svolte su campioni di scarti di insalata (I) e di insalata +bucce di patate (IP) in due condizioni mesofile di temperatura (28 °C e 37 °C). Gli esperimenti erano stati eseguiti senza pre-trattamento e senza aggiunta di inoculo; era stato inoltre testato l'effetto del controllo del pH sul processo fermentativo utilizzando soluzioni tampone - tampone fosfato 0,1-0,2 M - ottenendo risultati molto promettenti. Era stata poi verificata l'efficacia cellulolitica del pool microbico selezionato utilizzando terreni sintetici in cui le uniche fonti di carbonio erano costituite da Cellulosa e Carbossi Metil Cellulosa.

La sperimentazione di questo anno è stata rivolta all'incremento delle rese di idrogeno (ml H<sub>2</sub>/g Solidi Volatili) sperimentando:

- a) il trattamento termico del substrato per favorire l'idrolisi e selezionare i microrganismi idrogeno produttori;
- b) la variazione della concentrazione del carico organico
- c) utilizzando campioni di scarti di insalata ottenuti in periodi stagionali differenti.

Inoltre si è proceduto a isolare e a identificare i ceppi cellulolitici della comunità microbica selezionata dal processo di autofermentazione di scarti di insalata.

## 2.8.5 Metodi e Risultati

### Prove di idrolisi di rifiuto vegetale mediante trattamento termico

In questa serie di esperimenti sono stati utilizzati i substrati I e IP sottoposti ad un trattamento termico e sono state confrontate le rese di produzione di H<sub>2</sub> e i valori di pH con quelli ottenuti con i substrati non trattati (Tabella 17).

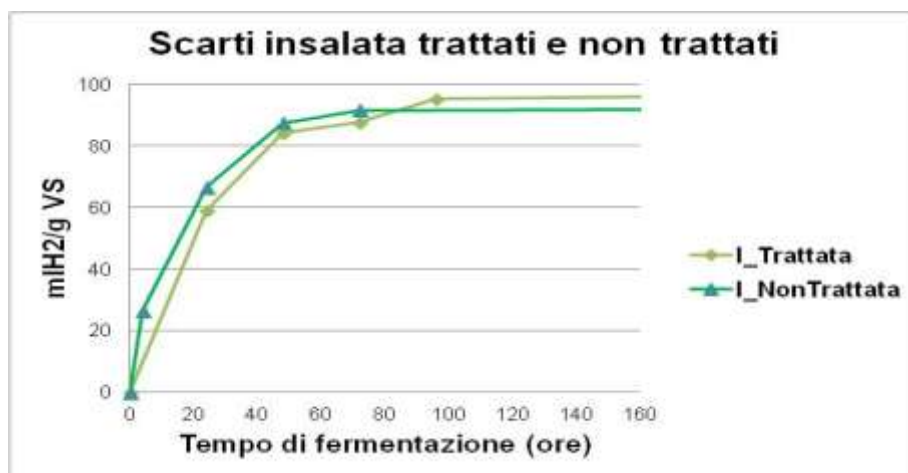
I campioni sperimentali (batch 125 ml), sono trattati a temperatura di 121 °C per 20 minuti e successivamente incubati in un bagnetto termostato, con agitazione a 120 rpm. Le condizioni operative utilizzate sono state determinate dai risultati delle prove di autofermentazione senza pretrattamento descritte in precedenza: temperatura 37 °C e Tampone Fosfato (TF) 0,2 M.

**Tabella 17. Prove su scarti di insalata e insalata con patate trattate e non trattate termicamente: resa (ml H<sub>2</sub>/g VS) e pH**

	Trattamento	Tempo di fermentazione (ore)	mlH <sub>2</sub> /g VS	pH
I	SI	168	91,85	5
	NO	164	91,66	6,27
IP	SI	168	46,96	4,7
	NO	164	51,27	6

Si può osservare che le rese non sono influenzate dal trattamento termico, a differenza del pH che, nei batch trattati, si abbassa a 4,7 e 5. Inoltre il trattamento non ha influenzato il tempo di fermentazione: in entrambe le condizioni le fermentazioni terminano intorno alle 100 ore di produzione (Figura 42). Le prove con I, comunque, forniscono rese doppie rispetto a quelle ottenute con IP (Tab. 15).

La possibilità di escludere il trattamento termico, economicamente dispendioso, incoraggia ulteriormente le produzioni di bioidrogeno da scarti vegetali.



**Figura 42. Curve di produzione (mlH<sub>2</sub>/g VS) di H<sub>2</sub> da scarti di insalata trattati e non trattati termicamente**

Per le prove con il substrato IP si può osservare che la fase di acclimatazione aumenta e la resa si dimezza, e questo andamento può essere giustificato dall'abbassamento del pH verso valori acidi (4.7) (Figura 43)

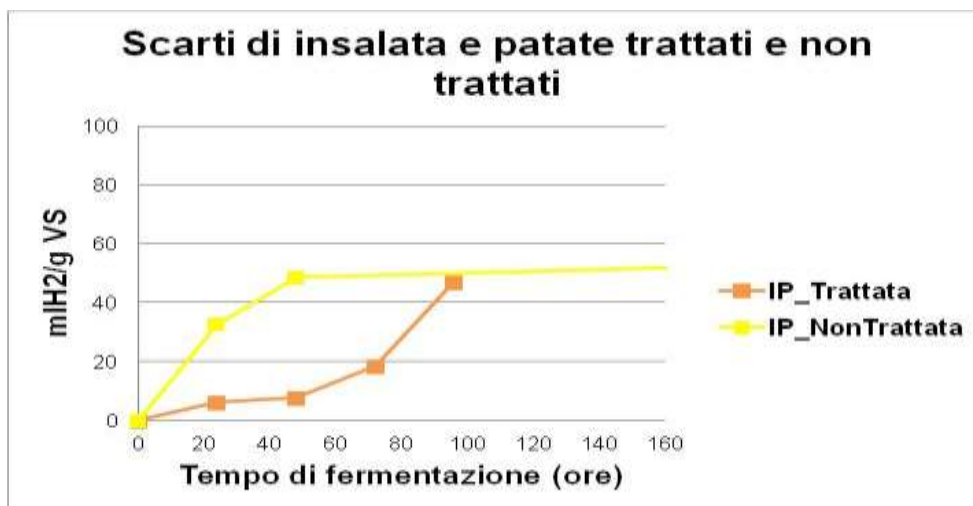


Figura 43. Curve di produzione (ml H<sub>2</sub>/g VS) di H<sub>2</sub> da scarti di insalata con patate trattati e non trattati termicamente

Dall'analisi dei prodotti di fermentazione risulta che il totale dei prodotti metabolici trattate, è circa la metà rispetto alle prove svolte con i substrati non trattati (Figura 44). Si può notare, in particolare, che I e IP trattati al calore producono la stessa quantità di prodotti metabolici (ca. 70 mmol).

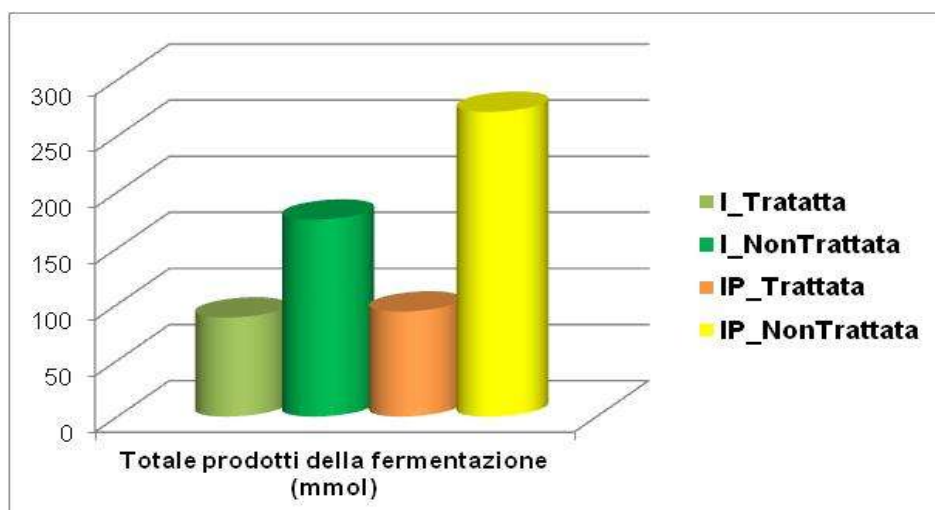


Figura 44. Quantità totale di acidi grassi ed etanolo da fermentazione di scarti insalata e insalata con patate, con e senza trattamento

Il tipo di fermentazione è sempre acido-mista. La distribuzione dei prodotti di fermentazione varia nelle differenti condizioni di processo. Nelle prove senza il trattamento, l'etanolo è il prodotto metabolico più abbondante, (50% dei metaboliti totali in I e il 33% in IP). (Figura 46-47).

Con il procedere della fermentazione, per entrambi i tipi di substrato I e IP, si osserva la riduzione dell'acido lattico e parallelamente l'aumento della produzione di acido butirrico e idrogeno (Figura 45-46).



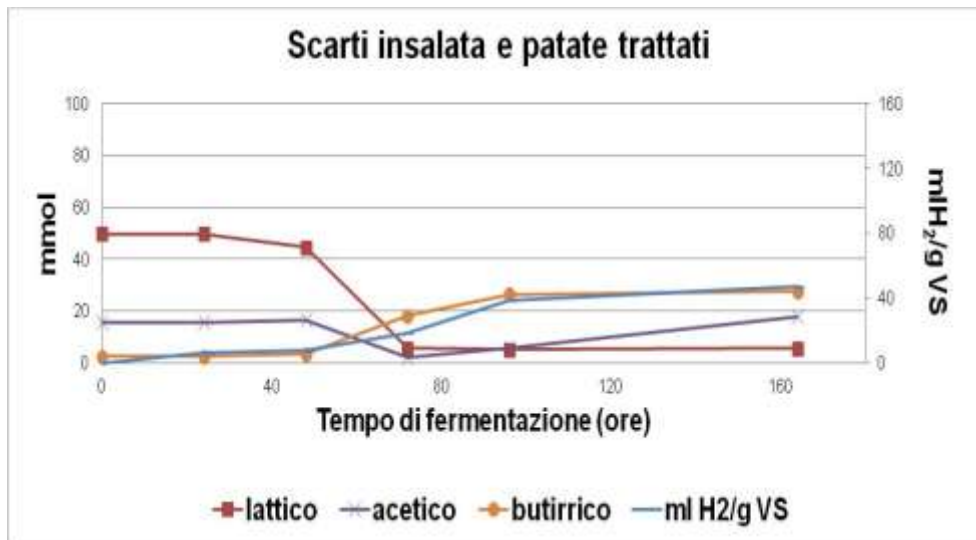


Figura 45. Produzione dei principali metaboliti nel corso della fermentazione in IP trattato

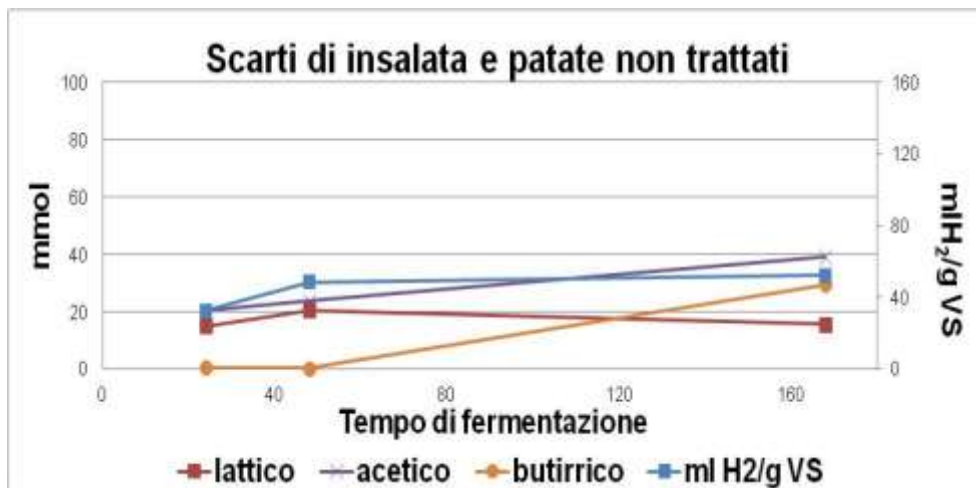


Figura 46. Produzione dei principali metaboliti nel corso della fermentazione in IP non trattato

#### Effetti della variazione del carico organico del rifiuto vegetale sulla produzione di idrogeno

In tutte le prove sperimentali riportate finora, è stata usata una concentrazione di substrato di 30 g VS/l (VS ca 8%). Per verificare se, come più volte riportato in letteratura, ad una diminuzione del carico organico corrispondesse una maggiore efficienza nella produzione di idrogeno, sono state effettuate prove con 30-20-10 g VS/litro di substrato l.

Il confronto tra le rese di produzione ha evidenziato che la resa maggiore si ottiene comunque con 30 g VS/l (49 ml H<sub>2</sub>/g VS), quantità maggiore del 20% rispetto alla prova organico con 20 g VS/litro e del 40% rispetto alla prova a carico organico 10 g VS/litro (Figura 47).



Figura 47 Prove a differente carico organico di scarti di insalata. Attenzione in legenda 30gVS/l; 20gVS/l e 10gVS/l

Per quanto riguarda la produzione dei metaboliti rilevata a fine fermentazione si può osservare che:

- 1) la fermentazione è, per tutte le tre le prove, di tipo acido mista;
- 2) la composizione percentuale dei prodotti della fermentazione è differente per le tre condizioni di carico organico (Figura 48).

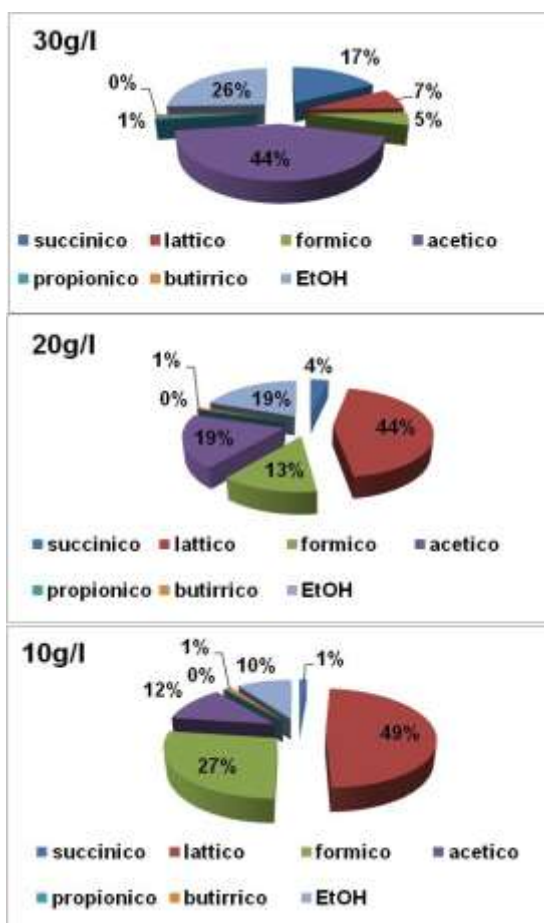


Figura 48. Prove su scarti di insalata a differente carico organico: composizione in percentuale acidi volatili ed etanolo

La prova con carico organico 20 g VS/l presenta una più eterogenea composizione in acidi rispetto alle altre prove; contiene infatti un totale di 117 mmol di prodotti metabolici contro gli 82mmol della prova a 30 g VS/l e 65 mmol della prova a 10 g VS/l. Alla maggiore quantità di metaboliti prodotta dal carico organico 20 g VS/l non corrisponde una resa di idrogeno maggiore. Gli acidi lattico e formico aumentano al diminuire del carico organico sostituiti dall'acido acetico, dall'etanolo e dall'acido succinico che invece diminuiscono al diminuire del carico organico.

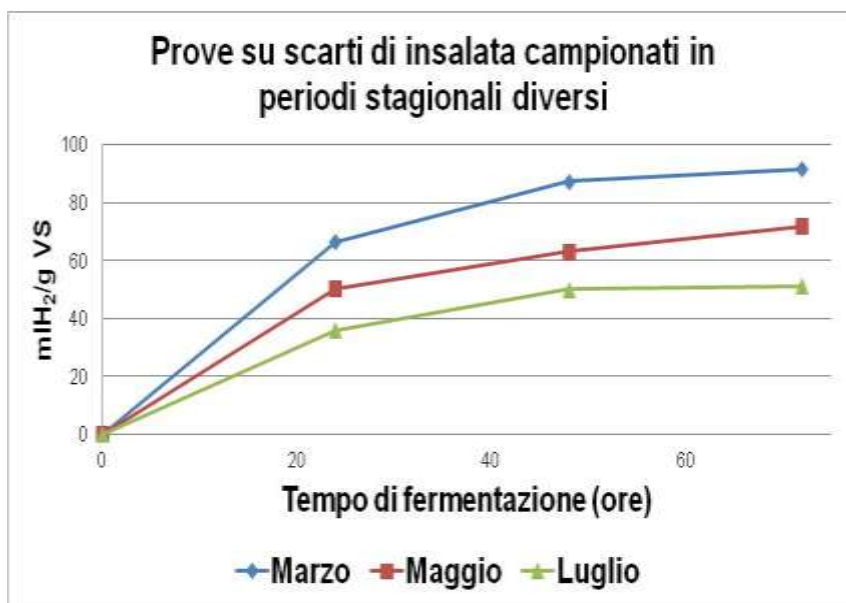
#### Confronto tra stesso substrato campionato in un periodo stagionale diverso

Sono stati utilizzati scarti di insalata campionati in periodi stagionali diversi, inverno (9-3-2012), primavera (7-5-2012) ed estate (16-7-2012). Le condizioni operative utilizzate sono state determinate dai risultati delle prove di autofermentazione senza pretrattamento descritte in precedenza: temperatura 37 °C e TF 0,2 M. In Tabella 18 sono presentati i dati riguardanti la caratterizzazione dei tre tipi di substrato.

**Tabella 18. Caratterizzazione di differenti campioni di insalata**

Substrato	Data	TS %		VS %		COD (g O <sub>2</sub> /g TS)	
		media	semidiff. valore max e min	media	semidiff. valore max e min	media	semidiff. valore max e min
I	09_03_2012	<b>6,3</b>	0,26	<b>5,83</b>	0,3	<b>1,48</b>	0,02
	07_05_2012	<b>8,97</b>	0,34	<b>7,43</b>	0,35	<b>1,23</b>	0,1
	18_07_2012	<b>6,41</b>	0,1	<b>5,42</b>	0,14	<b>1,21</b>	0,03
P	09_03_2012	<b>17,32</b>	0,52	<b>16,25</b>	0,86	<b>1,55</b>	0,08
	07_05_2012	<b>19,2</b>	0,64	<b>18,34</b>	1,08	<b>1,2</b>	0,06

Dai risultati ottenuti si nota che l'attività di produzione di idrogeno delle tre comunità microbiche è effettivamente differente, mentre il pH è simile. Le rese maggiori (91,56 ml H<sub>2</sub>/g VS) sono state ottenute con l'insalata del periodo invernale (marzo) (Figura 49).



**Figura 49. Rese di produzione di H<sub>2</sub> degli scarti di insalata campionati in periodi stagionali differenti**

I tre diversi substrati producono gli stessi metaboliti (etanolo, acido acetico, acido propionico, acido formico e acido butirrico), anche se con concentrazioni diverse (Figura 50).

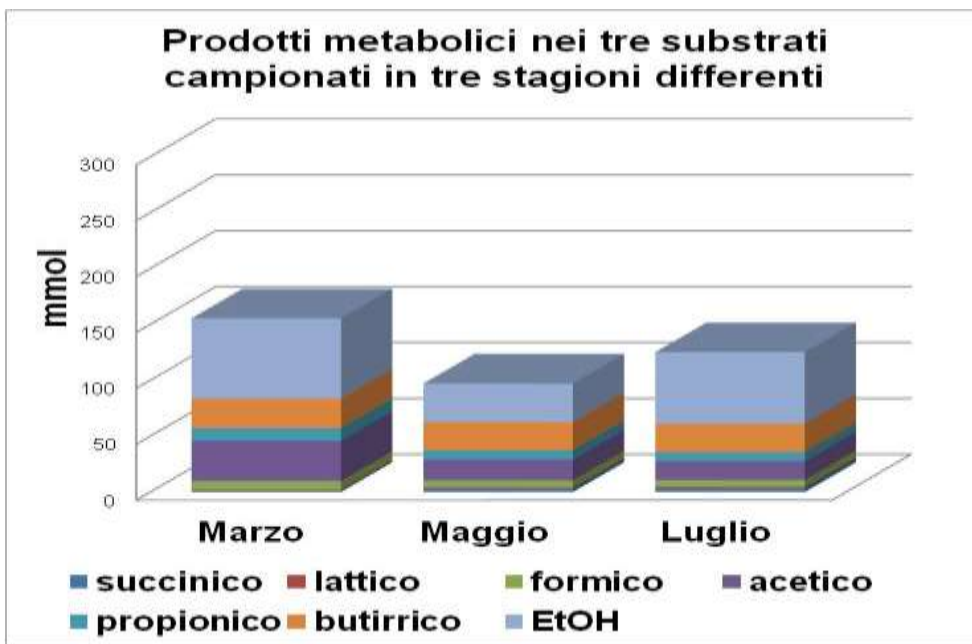


Figura 50. Composizione di acidi volatili ed etanolo in scarti di insalata campionata in periodi stagionali diversi

L’insalata prodotta a marzo produce la maggiore quantità (150mmol) di prodotti metabolici rispetto all’insalata di maggio e di luglio, a cui corrisponde la maggior produzione di idrogeno. I prodotti metabolici principalmente presenti sono l’etanolo, l’acido butirrico e l’acido acetico, che da soli costituiscono l’80% del totale a fine fermentazione. Il tipo di fermentazione è, per tutte e tre le prove, di tipo acido mista.

#### Isolamento dei ceppi batterici cellulosolitici

Sono state preparate le piastre per l’isolamento con il terreno specifico CA agarizzato (Ren et al, 2010), e successivamente, è stato trasferito un inoculo “Ic” selezionato da un esperimento di auto fermentazione di insalata a 37°C in TF 0,2M che aveva raggiunto una resa di idrogeno di 133,69 ml H<sub>2</sub>/g. Le piastre sono state incubate in stufa in giare anaerobiche ad una temperatura di 37 °C per circa 48 ore. Singole colonie sono state prelevate e trasferite su piastre fresche. Per assicurare la purezza degli isolati così ottenuti, la procedura è stata ripetuta 6 volte per ogni colonia. Le colonie selezionate sono state descritte in base alle loro caratteristiche morfologiche (Tabella 19). Tutti i ceppi batterici isolati sono stati sottoposti a test per verificare la capacità idrolitica con il metodo colorimetrico specifico per la cellulosa, il Congo red, che colora di rosso ed evidenzia l’attività cellulosolitica, lasciando un’area più chiara, laddove è presente.

Nove colonie, tra le dieci isolate, hanno risposto positivamente al test di idrolisi evidenziando quindi attività cellulosolitica attraverso la formazione di aloni di chiarificazione, mediante colorazione Congo red.

**Tabella 19 Descrizione morfologica e risposta al test di idrolisi delle colonie isolate**

Colonia	Forma	Confini	Elevazione	Superficie	Colore	Densità	Idrolisi - Congo red	Identificato
1	filamentosa	filamentosa	sollevata	rugosa	bianco sporco	densa	evidente	si
2	filamentosa	filamentosa	sollevata	rugosa	bianco sporco	densa	evidente	no
3	puntiformi	regolari	piatta	piccola	bianco	poco densa	leggera	si
4	puntiformi	regolari	piatta	piccola	bianco	poco densa	leggera	si
5	puntiformi	regolari	piatta	piccola	bianco	poco densa	leggera	si
6	circolare	regolari	piatta	piccola	bianco	densa	no	si
7	circolare	regolari	piatta	media	bianco	densa	leggera	si
8	circolare	regolari	piatta	media	bianco	densa	evidente	si
9	filamentosa	irregolare	sollevata	rugosa	bianco sporco	molto densa	evidente	si
10	puntiformi	regolari	piatta	piccola	bianco	poco densa	leggera	si

### Identificazione dei ceppi batterici

L'estrazione del DNA totale di ciascun isolato batterico è stata condotta utilizzando il kit commerciale GeneMatrix™ Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Polonia) e seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice. Il DNA purificato è stato conservato a -20 °C fino al successivo utilizzo.

L'amplificazione del gene che codifica per il 16S rRNA è stata condotta utilizzando i primers universali per eubatteri 27f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1389r (ACGGGCGGTGTGTACAAG). La reazione di PCR è stata eseguita in un volume finale di 100 µl contenente la AmpliTaqGold 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ad una concentrazione 1 X, ciascun primer ad una concentrazione 0.1 µM e 30 ng di DNA stampo.

L'amplificazione è stata condotta usando il seguente programma:

- 1 ciclo : 95 °C per 10 min
- 25 cicli:
  - 95 °C per 30 s
  - 55 °C per 30 s
  - 72 °C per 1 min e 40 s
- 1 ciclo : 72 °C per 10 min

Il frammento ottenuto dalla PCR è stato purificato mediante il GeneMatrix PCR / DNA Clean-Up Purification Kit (EURx) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

Dopo la purificazione il DNA amplificato è stato sequenziato in entrambe le direzioni utilizzando i primers 27f e 1389r. Il sequenziamento è stato effettuato con il sequenziatore automatico ABI 3730 DNA analyzer, presso il Laboratorio Genechron (C.R. ENEA Casaccia, Roma).

Le sequenze grezze dei due filamenti sono state editate ed allineate mediante il software Chromas Pro versione 15 (Technelysium Pty Ltd) e le diverse applicazioni del software Molecular Evolutionary Genetics Analysis package, versione 5 (Tamura et al., 2011). Le sequenze consenso ottenute sono state confrontate con quelle depositate in GenBank mediante l'algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponibile sul sito dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Una ulteriore identificazione delle sequenze ottenute è stata effettuata utilizzando il tool RDP-classifier del Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

Le sequenze di geni del DNA ribosomale 16S degli isolati ottenuti, sono state determinate e sono state confrontate con quelle depositate in NCBI GenBank. Il confronto con le sequenze presenti nella banca dati

ha permesso di stabilire che tutti gli isolati sono batteri anaerobi facoltativi, Gram positivi, appartenenti al phylum *Firmicutes* e classe *Bacilli* (Tabella 20).

**Tabella 20. Classificazione tassonomica delle specie isolate**

Dominio: <i>PROKARYOTA</i>	Regno: <i>BACTERIA</i>	Phylum: <i>FIRMICUTES</i>	Classi: <i>BACILLI</i>	Ordine: <i>BACILLALES</i>	Famiglia: <i>STAPHYLOCOCCACEAE</i>	Genere: <i>STAPHYLOCOCCUS</i>
					Famiglia: <i>BACILLACEAE</i>	Genere: <i>BACILLUS</i>
				Ordine: <i>LACTOBACILLALES</i>	Famiglia: <i>ENTEROCOCCACEAE</i>	Genere: <i>ENTEROCOCCUS</i>
					Famiglia: <i>LACTOBACILLACEAE</i>	Genere: <i>LACTOBACILLUS</i>

Delle dieci colonie isolate, nove sono state identificate e riconosciute e tutte mostrano un'identità del 99-100% con ceppi conosciuti, mentre la colonia 2 ha prodotto sequenze non leggibili.

Sette colonie sono risultate appartenenti all'ordine dei *Lactobacillales*, di cui sei al genere *Enterococcus*, con sequenza simile al 100% alle sequenze delle specie *Enterococcus durans*, *E. faecium* e *E. faecalis*, ed una al genere *Lactobacillus* con identità del 100% simile con la specie *L. plantarum* (Tabella 21).

Due colonie risultano appartenenti all'ordine dei *Bacillales*, di cui una al genere *Staphylococcus* con una sequenza simile al 100% alla sequenza della specie *S. capitis* ed una al genere *Bacillus* con una sequenza con identità del 100% simile alla specie *B. subtilis*. Alcuni autori confermano le capacità cellulolitiche delle famiglie di *Lactobacillaceae*, *Bacillaceae* e *Staphylococcaceae*. (Pourramezan et al., 2012; Anand A.A.P. et al., 2012). Questi batteri sono chemiorganotrofi, anaerobi facoltativi, in grado di crescere in condizioni di microaerofilia su terreni di coltura contenenti una concentrazione di sali minerali e di utilizzare una vasta gamma di fonti di carbonio (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) dimostrando una elevata versatilità metabolica. Il vantaggio di usare questi ceppi risiede proprio nella loro capacità di crescere sia in ambienti anaerobici che aerobici, evitando, quindi, di dover operare in condizioni di anossia totali.

**Tabella 21. Sequenza banca del gene, numero accessione e similarità in percentuale.**

Ceppo	Numero Accessione	Descrizione	Coefficiente di similarità (%)
1	gi 377823839 JQ346075.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain YA4BZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
2		non identificato	
3	gi 335999386 JF903802.1	<i>Enterococcus durans</i> strain R02-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
4	gi 344323468 JN560932.1	<i>Enterococcus faecalis</i> strain 45689 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
5	gi 335999386 JF903802.1	<i>Enterococcus durans</i> strain 076 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
6	gi 379062632 JQ067695.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain JZ1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
7	gi 379062632 JQ067695.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain JZ1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
8	gi 379062632 JQ067695.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain JZ1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
9	gi 397746957 JX113249.1	<i>Staphylococcus capitis</i> strain +Y36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
10	gi 449331980 KC166237.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain B23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%

I risultati ottenuti dall'isolamento su piastra selettiva, hanno permesso di ottenere ceppi batterici potenzialmente utilizzabili nella trasformazione di materiale cellulosico.

## 2.9 Studio e sperimentazione di metodi biologici per la purificazione del biogas

Questa linea di ricerca ha l'obiettivo di indagare la possibilità di abbattere l'idrogeno solforato ( $H_2S$ ) nel biogas tramite il processo di fotosintesi anossigenica operato dal solfobatterio *Chlorobium limicola*. È stato monitorato il trend di abbattimento dell' $H_2S$  in colture in *batch* poste in un illuminatore dotato di LED monocromatici a diverse lunghezze d'onda. Sono stati messi a punto due protocolli di analisi: il primo volto alla valutazione dello sviluppo delle colture estrapolando una relazione tra la densità cellulare e il contenuto in batterioclorofilla c; il secondo per evidenziare il trend di abbattimento dell' $H_2S$  analizzando i solfuri disciolti mediante gas cromatografia. Le metodologie analitiche applicate sono risultate funzionali ed efficaci nell'evidenziare come l'abbattimento dello ione solfuro sia direttamente correlato all'aumento della densità cellulare. Questo lavoro preliminare è propedeutico alla realizzazione di una campagna di misure volte ad indagare l'effetto delle singole lunghezze d'onda fornite dai LED e la messa a punto di un reattore alimentato in continuo da biogas a diverse concentrazioni  $H_2S$ .

### 2.9.1 Metodologie e risultati ottenuti

#### Colture cellulari di *Chlorobium limicola*

Le colture cellulari di *C. limicola* sono state realizzate in *batch* (15-100 ml) ai quali è stato fornito  $H_2S$  direttamente in forma gassosa. È stato utilizzato il ceppo *C. limicola* DSM 245T coltivato nel terreno di coltura Pfennig II, No.29 DSMZ ([http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium29.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium29.pdf)) preparato secondo il protocollo fornito da DSMZ senza però aggiungere solfuro di sodio solfuro nonaidrato come fonte di solfuro, aggiungendo invece  $H_2S$  in forma gassosa (Figura 51). Considerata l'elevata solubilità,  $H_2S$  passa rapidamente in soluzione rendendosi biodisponibile per lo sviluppo delle colture batteriche sotto forma di ioni solfuro.

I *batch* sono stati posti in un illuminatore, a sorgenti luminose controllate, dotato di LED monocromatici a diverse lunghezze d'onda (Aliboni et al. 2012) dove la temperatura di crescita viene mantenuta a 32 °C.

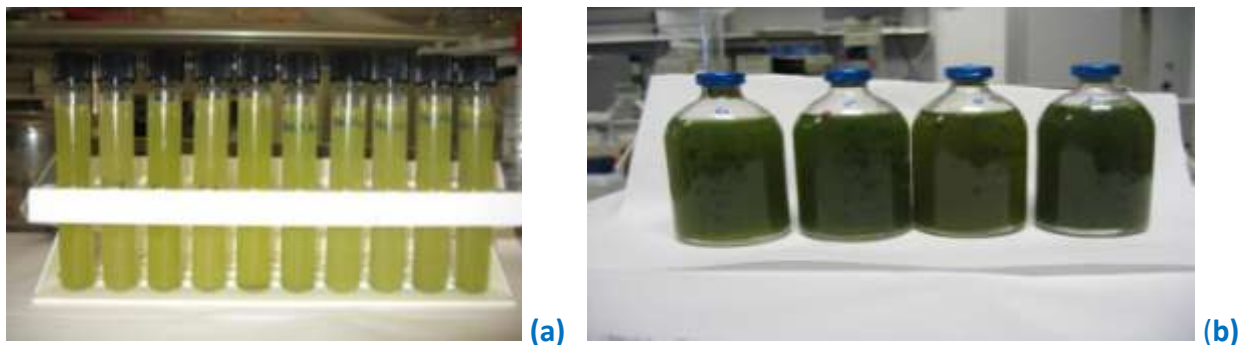
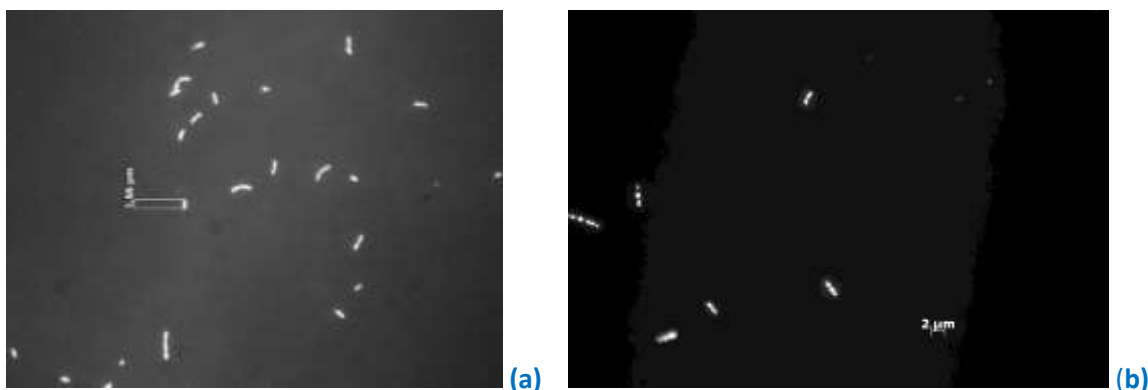


Figura 51. Batch da 15 ml (a) e da 100 ml (b) utilizzati per la coltura anaerobica di *C. limicola*

#### Determinazione della densità cellulare attraverso l'analisi della batterioclorofilla C

La valutazione dello sviluppo delle colture di *C. limicola* è stata effettuata correlando il contenuto di batterioclorofilla c (Bchl c), caratteristica di questo batterio, alla densità cellulare, determinata attraverso l'osservazione in microscopia ad epifluorescenza. Le conte cellulari sono state effettuate utilizzando il colorante Syber Green (Life Technologies Corporation) che meglio evidenzia la forma della singola cellula rispetto al DAPI (Invitrogen), già usato in precedenza (Figura 52). Entrambi i coloranti sono specifici per gli acidi nucleici, ma mentre il primo riesce a evidenziare il contorno di ogni singola cellula colorando in maniera uniforme tutta la regione citoplasmatica, il secondo evidenzia zone più intensamente colorate all'interno delle cellule senza evidenziarne il contorno rendendo difficile la conta delle cellule.



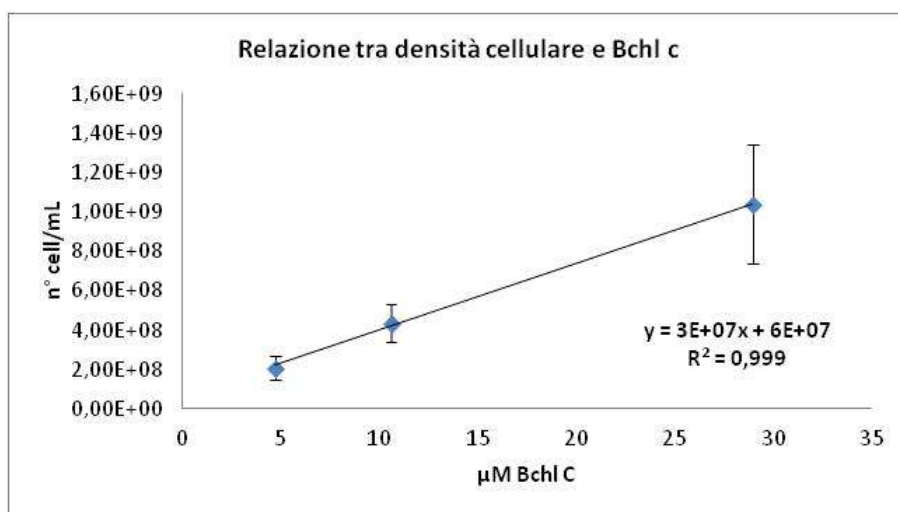
**Figura 52. Osservazione delle cellule di *C. limicola* in microscopia ad epifluorescenza. a) colorazione con Syber green: le cellule, di forma bastoncellare, appaiono ben visibili e facilmente contabili. b) colorazione con DAPI: si evidenziano regioni di DNA batterico più addensate, mentre il contorno di ogni singola cellula non è ben evidenziato**

E' stato messo a punto un protocollo per l'estrazione della Bchl c e la successiva analisi per via spettrofotometrica con lo strumento Thermo Scientific Evolution 201. L'estrazione della Bchl c viene eseguita dopo aver centrifugato 1 ml di coltura per 20 min, 16000 g, -4 °C, eliminando il sopranatante e aggiungendo al pellet 1 ml di metanolo, si centrifuga nuovamente e si diluisce in maniera tale che i campioni, esposti ad una lunghezza d'onda di 667 nm (Namsaraev 2009), rientrino nel range di misura dell'adsorbanza 0,2 – 0,8 Å. La concentrazione della Bchl C si ottiene applicando la legge di Lambert –Beer:

$$A = \varepsilon * c * l \quad (1)$$

dove **A** è la misura di assorbanza, **c** è la concentrazione del composto da analizzare (M), **l** (cm) è il cammino ottico della cella di misura ed  $\varepsilon$  è il coefficiente di estinzione molare che a una determinata lunghezza d'onda e a temperatura fissa è una costante caratteristica di un dato composto.

La stretta correlazione tra la concentrazione della Bchl c e la densità cellulare è confermata dalla retta di calibrazione ottenuta (coefficiente  $R^2 = 0,99$ ) (Figura 53).



**Figura 53. Retta di calibrazione tra la densità cellulare e il contenuto in batterioclorofilla c**



La figura 54 mostra la curva di crescita di *C. limicola* associata al consumo di ioni solfuro. L'esperimento è stato eseguito inoculando 7 *batch* da 15 ml (Tubi Hungate) al 10% fornendo a ciascuno circa 1 ml di gas puro. La densità cellulare aumenta proporzionalmente al consumo del solfuro e rimane piuttosto stabile quando si raggiunge l'abbattimento totale del solfuro.

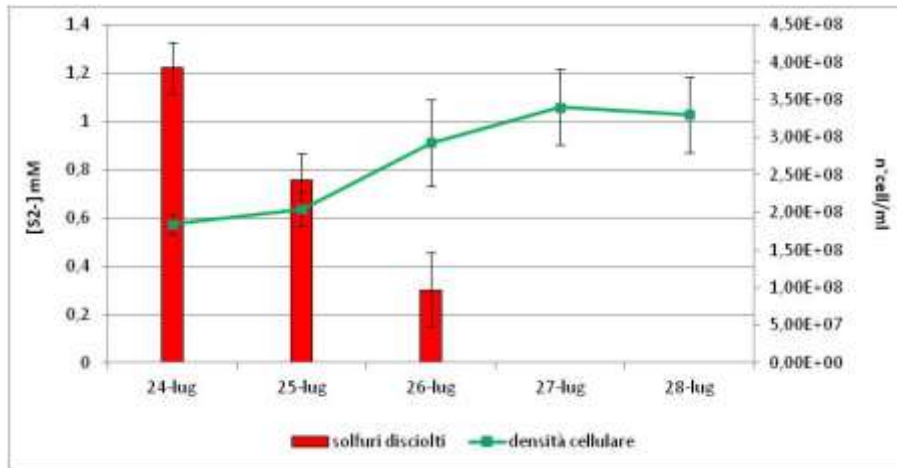


Figura 54. Curva di crescita di *C. limicola* in relazione al consumo di ioni solfuro

## 2.9.2 Analisi della capacità di abbattimento dell'H<sub>2</sub>S

Per monitorare la capacità di abbattimento dell'H<sub>2</sub>S è stato necessario misurarne la concentrazione sia nella fase liquida sia nello spazio di testa dei *batch* ai quali è stato fornito puro.

Per l'analisi dei solfuri disciolti è comunemente utilizzato il metodo colorimetrico di Cline (Cline 1969) basato sulla formazione del blu di metilene e la successiva misura della sua assorbanza alla lunghezza d'onda di 670 nm, ma sono allo studio nuovi metodi in quanto questo appena descritto si basa sull'utilizzo di reagenti pericolosi.

A tale scopo, nei laboratori ENEA-UTRINN BIO del CRE Casaccia è stato messo a punto un protocollo per l'analisi dei solfuri disciolti mediante gas cromatografia. È stato utilizzato un gas cromatografo GC dotato di detector fotometrico di fiamma selettivo per i composti contenenti uno o più atomi di zolfo (Trace GC Ultra Gas Chromatograph - Detector FPD Trace, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) dotato della colonna Supel-Q (30 m x 0,53 µm ID) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) specifica per l'analisi dei composti solforati. I risultati ottenuti con questa metodologia sono stati comparati con quelli ottenuti mediante il metodo di Cline e i dati sono risultati comparabili entro l'incertezza sperimentale. È stato quindi possibile escludere il metodo di Cline, che usa reagenti pericolosi, dalla routine sperimentale, a favore del metodo gas-cromatografico (De Luca et al. 2013).

Il protocollo si basa sull'acidificazione del campione acquoso in atmosfera anaerobica contenente il solfuro come HS<sup>-</sup> o S<sup>2-</sup> e il successivo campionamento e analisi dell'idrogeno solforato che si libera. In una *vial* con tappo a vite e setto in silicone-PTFE da 1,5 ml, si aggiunge prima una quantità fissa di una soluzione di acido solfammonico 0,3 M, in forte eccesso rispetto al solfuro, poi una aliquota di campione (20 µl). In queste condizioni l'H<sub>2</sub>S si libera come gas nello spazio di testa e può venire campionato per la misura gas-cromatografica. È stato possibile determinare, mediante campionamenti di H<sub>2</sub>S generati da soluzioni di solfuro di sodio standard, che c'è correlazione lineare tra la concentrazione del solfuro in soluzione e il segnale gas cromatografico dell'H<sub>2</sub>S a parità di tutte le altre condizioni sperimentali. Il picco di H<sub>2</sub>S è stato caratterizzato mediante analisi di standard puri del gas. La determinazione del solfuro in soluzione può essere quindi eseguita mediante analisi gas-cromatografica dell'H<sub>2</sub>S, retta di calibrazione in Figura 55.

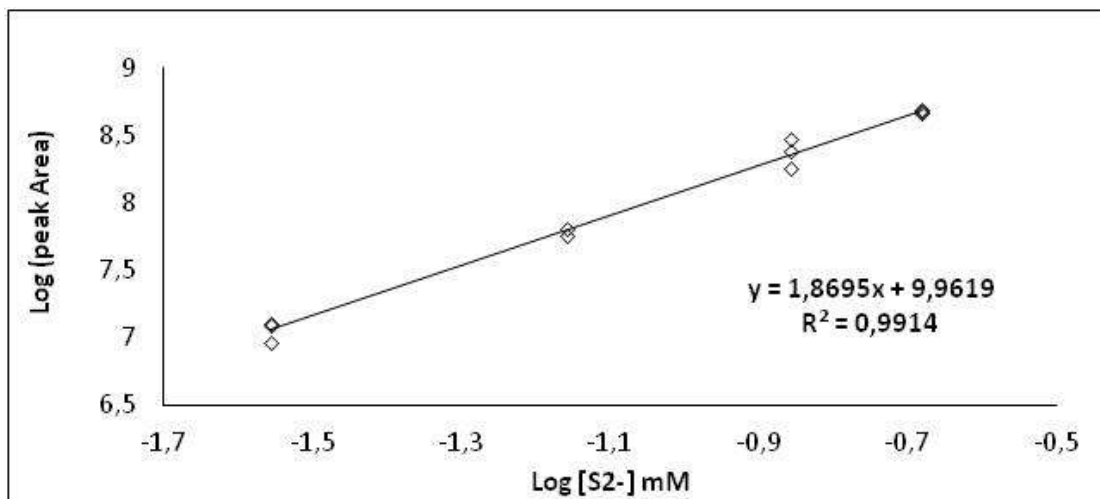


Figura 55. Retta di calibrazione ottenuta mediante analisi dello spazio di testa successivamente all'acidificazione di 4 standard di sodio solfuro nonaidrato

Utilizzando il metodo messo a punto, si è proceduto a verificare che nelle condizioni sperimentali delle colture batteriche in *batch* c'è una relazione tra la quantità di solfuro in soluzione e l'idrogeno solforato nello spazio di testa. I dati raccolti sono riportati nella Figura 56. E' stato monitorato il consumo da parte di colture appena inoculate (inoculo 10%) alle quali sono stati aggiunti circa 5ml di H<sub>2</sub>S puro. La Figura 56 mostra come la *trend* sia costante in tutte le prove e che l'abbattimento totale si è ottenuto in minor tempo nelle colture che partivano da una concentrazione più bassa di H<sub>2</sub>S.

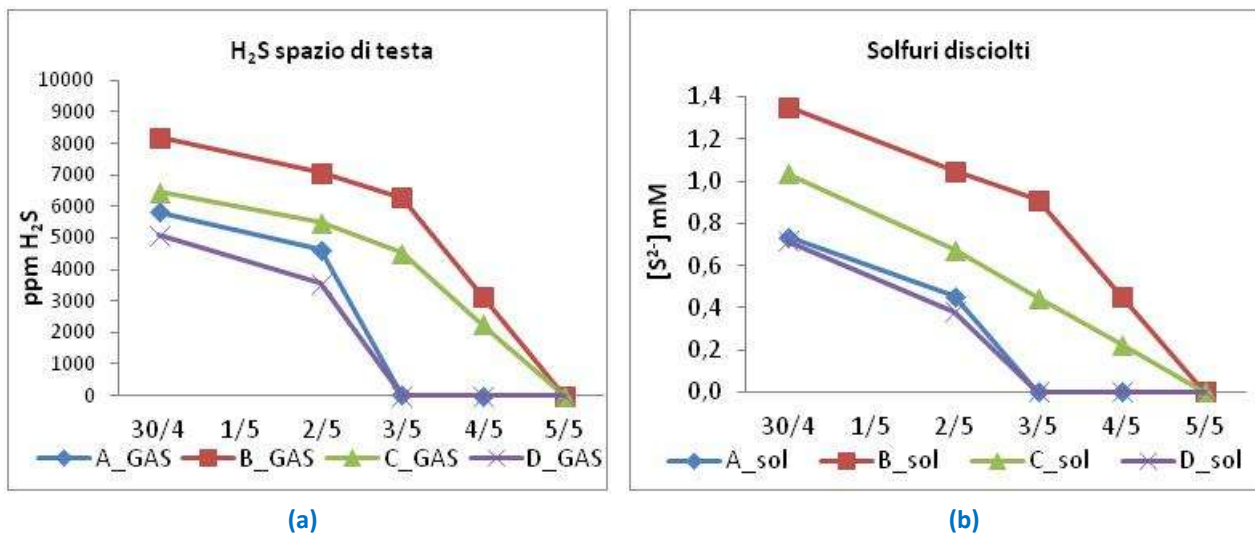


Figura 56. Monitoraggio del trend di abbattimento dell'H<sub>2</sub>S in 4 batch: a) concentrazione dell'H<sub>2</sub>S nello spazio di testa, b) solfuri disciolti nella coltura

I dati ottenuti sono stati utilizzati per estrapolare la relazione tra la concentrazione dell' H<sub>2</sub>S nella fase liquida e in quella gassosa dei *batch* (Figura 57) che conferma una stretta correlazione tra i due valori.

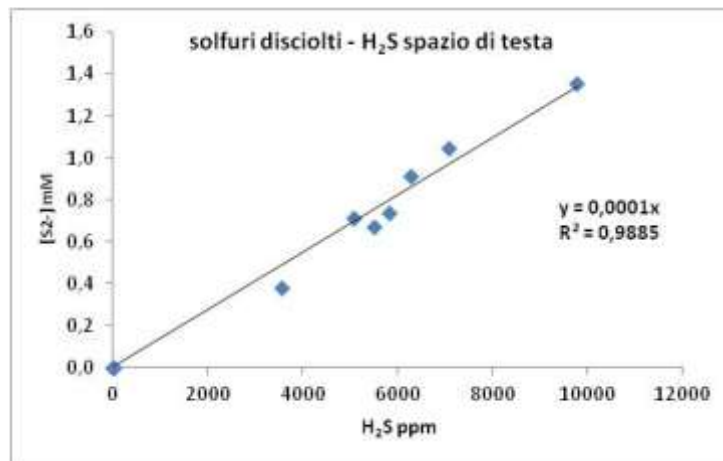


Figura 57. Relazione tra la concentrazione dell'H<sub>2</sub>S nello spazio di testa e il solfuri disciolti nel mezzo di coltura dei batch

Sono state effettuate ulteriori prove per verificare la capacità di abbattimento dell'H<sub>2</sub>S di colture ben sviluppate con una densità cellulare di circa  $1 \cdot 10^9$  cell/ml in *batch* da 100 ml. A tali colture è stato fornito H<sub>2</sub>S puro (circa 5 ml), ne è stato monitorato il consumo ogni 24 ore ed è stato aggiunto nuovamente quando si è osservato il totale abbattimento (coltura in *fed batch*). La figura 58 mostra come in tutti i casi già dopo 24 ore dall'aggiunta il contenuto di H<sub>2</sub>S è fortemente ridotto (<0,006 mM nella fase liquida, <57 ppm nello spazio di testa) mentre l'abbattimento totale si ottiene in due giorni (Tabella 22-23).

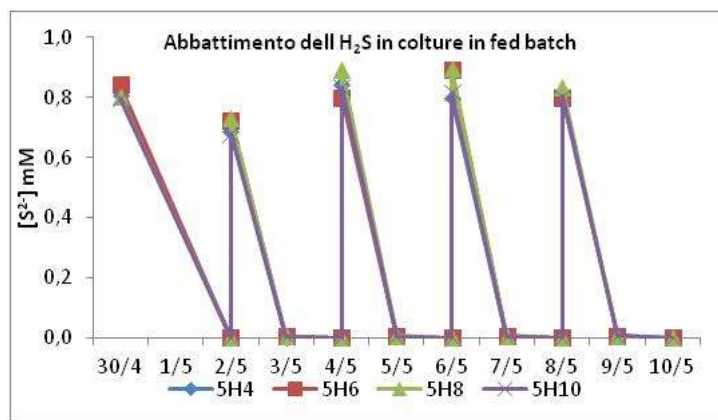


Figura 58. Trend di abbattimento dell'H<sub>2</sub>S da parte di colture *fed batch*

Tabella 22. Concentrazione di ioni solfuro (mM) nella fase liquida di colture *fed batch*. In giallo è evidenziata la concentrazione di solfuro in seguito all'aggiunta di 5 ml di H<sub>2</sub>S in forma gassosa

	30/4	2/5	2/5	3/5	4/5	4/5	5/5	6/5	6/5	7/5	8/5	8/5	9/5	10/5
5H4	0,810	0,000	0,688	0,003	0,000	0,842	0,004	0,000	0,800	0,004	0,000	-	-	-
5H6	0,842	0,000	0,725	0,003	0,000	0,800	0,005	0,000	0,892	0,005	0,000	0,801	0,006	0,000
5H8	0,802	0,000	0,730	0,004	0,000	0,892	0,006	0,000	0,896	0,004	0,000	0,834	0,004	0,000
5H10	0,799	0,000	0,680	0,004	0,000	0,834	0,005	0,000	0,816	0,004	0,000	0,804	0,005	0,000

**Tabella 23. Concentrazione di H<sub>2</sub>S (ppm) nello spazio di testa di colture fed batch. In giallo è evidenziata la concentrazione di solfuro in seguito all'aggiunta di 5 mL di H<sub>2</sub>S in forma gassosa.**

	30/4	2/5	2/5	3/5	4/5	4/5	5/5	6/5	6/5	7/5	8/5	8/5	9/5	10/5
5H4	8100	0	6875	28	0	8420	44	0	8002	41	0			
5H6	8420	0	7250	32	0	8002	52	0	8923	55	0	8009	57	0
5H8	8023	0	7524	40	0	8923	60	0	8957	37	0	8335	37	0
5H10	7988	0	7340	35	0	8335	48	0	8162	41	0	8039	55	0

Attualmente, nel laboratorio UTRINN-BIO, è allo studio la capacità di abbattimento di un bioreattore di circa 3 litri alimentato in continuo da biogas proveniente dall'impianto pilota a doppio stadio precedentemente descritto (Figura 59). E' stata effettuata una prova preliminare che, pur fornendo risultati incoraggianti, non è ancora sufficiente a descrivere adeguatamente tale soluzione impiantistica.



**Figura 59. Bioreattore da 3 litri**

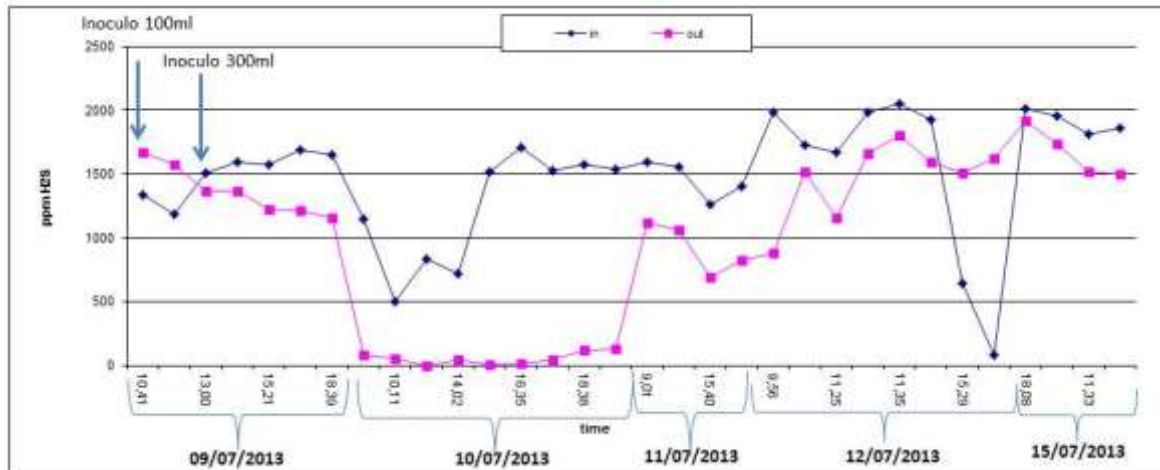
I risultati ottenuti sono descritti in figura 60, dove sono riportate le concentrazioni di H<sub>2</sub>S rilevate in entrata ed in uscita dal bioreattore contenente la coltura di *Chlorobium limicola*. Il bioreattore è stato inoculato inizialmente con 100ml di coltura, successivamente sono stati aggiunti ulteriori 300 ml di inoculo. Come sorgente di illuminazione sono state utilizzate due lampade a incandescenza da 40 W. Il bioreattore ha cominciato ad abbattere l'H<sub>2</sub>S successivamente all'aggiunta del secondo inoculo, che evidentemente ha "rinforzato" la coltura.

Il flusso di biogas in entrata si è mantenuto intorno a 30-40 ml/min. L'abbattimento dell'H<sub>2</sub>S raggiunge dei livelli molto elevati, fino a rilevare nel secondo giorno di esercizio il consumo totale dell'H<sub>2</sub>S fornito. Per verificare che si è trattato di un reale uptake, e non della solubilizzazione dell'H<sub>2</sub>S, sono stati effettuati dei prelievi della fase liquida rilevando concentrazioni di solfuri disciolti pari a zero. Successivamente, si osserva una riduzione dell'abbattimento, che si attesta intorno ai 500 ppm per poi calare ancora.

Quanto osservato potrebbe essere dovuto a:

1. inibizione della coltura;
2. densità della coltura elevata, le cellule impediscono il passaggio della luce provocando oscuramento;
3. scarsa biodisponibilità dell'H<sub>2</sub>S.

La variabilità della concentrazione dell' $H_2S$  e della portata del biogas fornito, oltre a influire sulla capacità di abbattimento del bioreattore, non consente di descrivere adeguatamente il sistema. Pertanto, sono in corso ulteriori prove utilizzando una miscela di biogas (65% $CH_4$ , 35%  $CO_2$ , 1500ppm  $H_2S$ ) a flusso controllato per studiare il comportamento del bioreattore in condizioni riproducibili.



**Figura 60. Trend di abbattimento dell' $H_2S$  in un bioreattore alimentato in continuo da biogas proveniente dal reattore II dell'impianto pilota bistadio**

### 2.9.3 Conclusioni

Le metodologie analitiche applicate sono risultate funzionali ed efficaci nell'evidenziare come l'abbattimento dello ione solfuro sia direttamente correlato all'aumento della densità cellulare. In colture appena inoculate, il consumo totale dell' $H_2S$  si ottiene dopo 4-5 giorni a seconda della concentrazione di partenza (circa 0,1 g/l). Le colture ad elevata densità cellulare ( $1 \cdot 10^9$  cell/ml) mostrano una maggiore capacità di abbattimento raggiungendo in 2 giorni il consumo totale di  $H_2S$  fornito. Per descrivere una cinetica del consumo di  $H_2S$ , le misure andrebbero effettuate con maggiore frequenza. Infatti, negli ultimi esperimenti eseguiti con colture dense in condizioni di coltura *fed batch*, l'abbattimento totale potrebbe essere stato già raggiunto tra le 24 e le 48 ore di sperimentazione.

I dati ottenuti sono in accordo con quanto osservato in studi di altri autori (Ball et al. 2007) evidenziando però una notevole riduzione nei tempi di abbattimento dell' $H_2S$  in colture maggiormente sviluppate. Inoltre, l'utilizzo di led a lunghezza d'onda selezionata rappresenta una scelta vantaggiosa rispetto all'impiego di sorgenti luminose a incandescenza con consumi energetici più elevati.

La ricerca si propone di continuare ad indagare:

- l'effetto delle singole lunghezze d'onda fornite dai LED;
- la correlazione tra la potenza radiante specifica e la fotosintesi batterica;
- la capacità di abbattimento dell' $H_2S$  in un reattore alimentato in continuo da biogas sintetico;
- l'inserimento di un modulo per la purificazione del biogas direttamente in un impianto di digestione anaerobica sottoposto a illuminazione a LED.

### 3 Conclusioni

Il lavoro ha indagato diversi aspetti chiave della Digestione Anaerobica attraverso un approccio multidisciplinare fondato sull'interazione delle diverse competenze tecnico scientifiche esistenti all'interno del Laboratorio UTRINN-BIO: l'ecologia microbica che fornisce le basi per la comprensione dei meccanismi di interazione all'interno delle comunità microbiche e tra queste e l'ambiente, la biologia molecolare che identifica i taxa coinvolti nei processi, la microbiologia che studia le caratteristiche fisiologiche dei batteri impiegati a fini biotecnologici, la chimica analitica che consente di verificare le ipotesi formulate fornendo dati quantitativi e la statistica che permette di realizzare dei modelli applicabili nei diversi contesti.

I risultati ottenuti dalla sperimentazione per la produzione di solo metano dalla scotta tal quale nell'impianto pilota bistadio hanno mostrato la fattibilità del processo e con tempi di ritenzione idraulica di 16,7 giorni. Sono stati ottenuti 0,78 NI CH<sub>4</sub>/l giorno, flussi medi di biogas di 50,5±4,8 ml/min e un contenuto di metano del 52±2%.

I risultati preliminari della sperimentazione in cui la fase idrolitica/acidogenica, finalizzata alla produzione di idrogeno, è stata separata da quella metanogenica apre delle buone prospettive sulla produzione del biocarburante idrometano. La composizione volumetrica media del biogas (%) alla convergenza dei due flussi era di 5,5±4,6 per l'H<sub>2</sub> e di 59±5,5 per il CH<sub>4</sub>. Inoltre la sperimentazione sull'impianto pilota bistadio ha sviluppato conoscenze tecnologiche adottabili nella costruzione e l'esercizio degli impianti di produzione di biogas. L'insieme dei risultati relativi al potenziamento del processo d'idrolisi di biomasse lignocellulosiche confermano l'importanza della separazione delle fasi di produzione di idrogeno e di metano nella digestione anaerobica, inserendo la fase di idrolisi anaerobica nel primo stadio.

I risultati ottenuti mediante l'ottimizzazione statistica della produzione potenziale di CH<sub>4</sub>, a partire dai metaboliti del primo stadio (ovvero la produzione di H<sub>2</sub> tramite dark fermentation), mostrano una ottima concordanza con le condizioni ottimali per la massima produzione di idrogeno.

L'identificazione delle comunità microbiche coinvolte nei processi di fermentazione anaerobica di substrati complessi rappresenta una prima e fondamentale caratterizzazione per descrivere le interazioni tra i diversi gruppi e comprendere le rispettive funzioni all'interno del consorzio. Lo studio più approfondito sul ruolo delle diverse comunità individuate nell'inoculo GCL, ci permette di affermare che la procedura di arricchimento (eco-biotecnologica) utilizzata per selezionare un inoculo efficiente alla produzione di idrogeno ed etanolo da un substrato complesso come il glicerolo grezzo (presenza di metanolo, saponi, polveri ed altre impurità) è una metodologia valida per produrre un inoculo specializzato. Questo risultato evidenzia anche che, per ottimizzare il processo di produzione di idrogeno, è necessario selezionare un inoculo idoneo al substrato e che tale inoculo può essere ottenuto indirizzando la modalità di selezione scegliendo quella ritenuta più opportuna (es.: arricchimento, acclimatazione, autofermentazione).

L'esatta corrispondenza tra il profilo dell'inoculo GCL, caratterizzato tramite il clonaggio del 16S rDNA, e la mix ricostruita e analizzata tramite DGGE è un ottimo risultato a conferma della validità delle metodiche molecolari utilizzate. Pertanto, nel proseguimento delle attività saranno approfondite le metodiche molecolari per lo studio dell'espressione di geni funzionali direttamente coinvolti nel processo di DA.

Viene confermata l'importanza e la necessità dell'uso della tecnica FISH per il monitoraggio e la caratterizzazione delle comunità microbiche nelle varie fasi della digestione anaerobica.

Nell'ambito dell'attività di ricerca sui metodi biologici per la purificazione del biogas è stata valutata la capacità di abbattimento dell'H<sub>2</sub>S da parte del solfobatterio *Chlorobium limicola*. Il protocollo messo a punto per la determinazione dei solfuri disciolti mediante analisi gas-cromatografiche ha fornito misure precise e attendibili ed ha consentito di monitorare la fase liquida e quella gassosa dei batch con uno stesso strumento riducendo notevolmente i tempi di analisi. Le colture fed batch alle quali è stato somministrato H<sub>2</sub>S puro mostrano come già dopo 24 ore se ne ottiene un forte abbattimento mentre dopo 48 ore la concentrazione è pari a zero. La crescita delle colture nell'illuminatore a LED, di progettazione Utrinn-Bio, avviene con risultati confrontabili con quelli ottenuti mediante l'uso di sorgenti luminose con consumi energetici più elevati.

Sono state effettuate delle prove preliminari per valutare il funzionamento in continuo di un bioreattore alimentato da biogas proveniente dall' impianto bistadio. Nei primi due giorni di esercizio si è osservato il completo abbattimento dell' $H_2S$  in entrata, nei giorni successivi l'efficienza si è ridotta. Pertanto, sono in corso ulteriori prove per individuare le cause e i sistemi per ovviare a questo mal funzionamento.

## Riferimenti bibliografici

1. 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. VALORIZZAZIONE BIOENERGETICA DI SCARTI AGROZOOTECNICI Report RdS/2012/304.
2. APHA 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC, USA: American Public Health Association: 2005.
3. Amann R.I., In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Akkermans AD, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds) Molecular microbial ecology manual (1995). Kluwer, London, pp 3.3.6/1–3.3.6/15.
4. Anand A. A. P., Balaji C., Kandula S., Isolation and Characterization of Cellulose-Degrading and Xylanolytic Bacteria from the Short-Nosed Fruit Bat *Cynopterus sphinx*, *Acta Chiropterologica* 14(1) (2012), pp. 233-239.
5. Astals S., Ariso M., Galí A., Mata-Alvarez J., Co-digestion of pig manure and glycerin: Experimental and modelling study. *Journal of Environmental Management*, 92 (2011), 1091-1096.
6. Astals S., Nolla-Ardèvol V., Mata-Alvarez J. Anaerobic co-digestion of pig manure and crude glycerol at mesophilic conditions: Biogas and digestate. *Bioresource Technology*, 110 (2012), 63–70.
7. Ball A. S., Nedwell D.B., Perkins R.G., Oxidation of hydrogen sulphide in sour gas by *Chlorobium limicola*. *Enzyme and microbial technology*, 41(2007), 702-705.
8. Barra Caracciolo A., Grenni P., Cupo C., Rossetti S., In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads. *FEMS Microbiology Letters*, 253 (2005), 55–58.
9. M.M. Bradford, A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, 1976.
10. Buswell, A. M. & Mueller, H. F. 1952. Mechanism of Methane Fermentation. *Ind Eng Chem*, 44(3), 550-552.
11. Castrillón L., Fernández-Nava Y., Ormaechea P., Marañón E. Methane production from cattle manure supplemented with crude glycerin from the biodiesel industry in CSTR and IBR. *Bioresource Technology*, 127 (2013), 312–317.
12. Castrillón L, Fernández-Nava Y, Ormaechea P, Marañón E. Optimization of biogas production from cattle manure by pre-treatment with ultrasound and co-digestion with crude glycerin. *Bioresource Technology*, 102 (2011), 7845–7849.
13. Cline, J. D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14.454-458.
14. Clomburg JM, Gonzalez R. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 1,2-propanediol from glycerol. *Biotechnology and Bioengineering*, 108 (4) (2011), 867-79.
15. De Luca E., Felici C., Aliboni A., Signorini A., Cinquepalmi S., Izzo G. Monitoring of H<sub>2</sub>S removal by green sulfur bacteria in a bioreactor using GC-FPD. *Atti del XXIV Congresso della Divisione Chimica Analitica della Società Chimica Italiana, Sestri Levante (GE), 15 - 19 Settembre 2013*, p. 218 (<http://www.analitica2013.unige.it>).
16. Geoffrey L.R., Gordon G. L. R. & Philips M. W. The role of anaerobic fungi in ruminants. *Nutrition Research Review*, 11 (1998), 133-168.
17. Gazzetta Ufficiale n. L 407 del 31/12/1992 pag. 0029 – 0046.
18. Kato S. and Watanabe K. Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia. *Microbes and Environments* 25 (3) (2010) , pp. 145-151.
19. Logan BE, Oh SE, Kim IS, Van Ginkel S. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environmental Science and Technology*, 36 (11)(2002), 2530-5.
20. Mariani A.P. & Podestà A. *Biochimica e biotecnologia del ruminante* (1996). Piccin Ed Padova
21. Miller T. L. e Wolin M.J., A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology*, ( 1974), 985-987.



22. Murarka A., Dharmadi Y., Yazdani S.S., Gonzalez R. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Applied and Environmental Microbiology*, 100 (2008), 2546-50.
23. Namsaraev Z. B., Application of Extinction Coefficients for Quantification of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. *Microbiology*, 78(2009), 6, 794–797.
24. Pearce P.D. and Bauchop T., Glycosidases of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* grown on cellulosic substrates. *Applied and Environmental Microbiology* (1985), 1265-1269.
25. Pernthaler J.F., Glockner O., Schonhuer W., Ammann R., Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology* 30 (2001), 207-26.
26. Pourramezan Z., Ghezlbash G. R., Romani B., Ziaei S., Hedayatkhah A., Screening and identification of newly isolated cellulose-degrading bacteria from the gut of xylophagous termite *Microcerotermes diversus*, *Microbiology*, 81 (6) (2012), 736-742.
27. Ren, N.-Q., Xu, J.-F., Gao, L.-F., Xin, L., Qiu, J., Su, D.-X, Fermentative bio-hydrogen production from cellulose by cow dung compost enriched cultures, *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (7) (2010), 2742-2746.
28. Robra S, Serpada-Cruz R, de Oliveira AM, Almeida-Neto JA, Santos JV., Generation of biogas using crude glycerin from biodiesel production as a supplement to cattle slurry. *Biomass and Bioenergy*, 34(2010), 1330-1335.
29. Sansonetti S., Curcio S., Calabrò V., Iorio G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass & Bioenergy* Vol. 33 Pagg. 1687-1692 33:1687-1682.
30. Sousa F.L., Thiergart, T., Landan, G., Nelson-Sathi, S., Pereira, I.A.C., Allen, J.F., Lane, N., Martin, W.F. 2013 Early bioenergetic evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1622).
31. Tamura K., Peterson D., Peterson, N., Stecher G., Nei M., Kumar S., MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Molecular Biology and Evolution* 28 (10) (2011), 2731-2739.
32. Varrone C., Rosa S., Fiocchetti F., Giussani B., Izzo G., Massini G., Marone A., Signorini A., Wang A. Enrichment of activity sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38 (2013), 1319-1331.
33. Xiu ZL, Song BH, Wang TT, Sun LH, Feng EM, Zeng AP. Optimization of dissimilation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* in one and two-stage anaerobic cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 19 (2004), 189-97.
34. Zeng A.-P, Menzel K., Deckwer W-D. Kinetic, dynamic and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture. Part II: Analysis of metabolic rates and pathways under oscillation and steady-state conditions". *Biotechnology and Bioengineering* 52 (1996), 561-71.
35. Zheng-Bo Yue, When Wei Li, Han-Qing Yu, Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Biotechnology* 128 (2013), 738-744.