UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

SCUOLA POLITECNICA E DELLE SCIENZE DI BASE

Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile e Ambientale



Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria per l'Ambiente ed il Territorio (Classe delle Lauree magistrali in Ingegneria per l'Ambiente ed il Territorio, Classe LM-35)

Tesi di Laurea

"Indagini sperimentali volte alla produzione di idrogeno e bioplastiche attraverso il processo di foto-fermentazione al variare della matrice organica e della fonte di azoto"

Relatore:

Prof. Ing. Francesco Pirozzi

Correlatore:

Ing. Vincenzo Luongo

Candidata:

Mariangela La Mura Matr. M67000310

INDAGINI SPERIMENTALI VOLTE ALLA PRODUZIONE DI IDROGENO E BIOPLASTICHE ATTRAVERSO IL PROCESSO DI FOTO-FERMENTAZIONE AL VARIARE DELLA MATRICE ORGANICA E DELLA FONTE DI AZOTO

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1. PRODUZIONE DI IDROGENO TRAMITE PROCESSI BIOLOGICI

- 1.1. Biofotolisi diretta ed indiretta
- 1.2. Dark-fermentation
- 1.3. Photo- fermentation

2. PRINCIPI DI PHOTO-FERMENTATION

- 2.1. Caratteristiche metaboliche dei batteri PNS
- 2.2. Caratteristiche dei substrati utilizzati
 - 2.2.1. Volatile Fatty Acids
 - 2.2.2. Reflui indistriali
 - 2.2.3. Effluente di dark-fermentation

3. FOTOBIOREATTORI: STATO DELL'ARTE

- 3.1. Fonti luminose
- 3.2. Parametri di efficienza
- 3.3. Migliorie atte ad intensificare la produzione di H₂

4. ACCUMULO DI PHB

- 4.1. Pathway metabolici alternativi
- 4.2. Poly-β-idrossibutirrato
- 4.3. Interesse applicativo dei poly-idrossialcanoati

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

- 1. CARATTERISTICHE DEI REATTORI FOTO-FERMENTATIVI
- 2. CONDIZIONI AMBIENTALI

3. METODOLOGIE DI MISURA

- 3.1. Sistema di misura del gas
- 3.2. Analisi qualitativa del gas mediante cromatografia
- 3.3. Prelievo dei campioni liquidi
- 3.4. Preparazione campioni per l'analisi qualitativa all'HPLC
- 3.5. Analisi HPLC degli acidi grassi volatili
- 3.6. Analisi HPLC dell'etanolo
- 3.7. Misura della crescita della biomassa
- 3.8. Misura pH
- 3.9. Misura PHB

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

1. RIATTIVAZIONE DELLA BIOMASSA

- 2. PERFEZIONAMENTO DELLE PERFORMANCE DELLA BIOMASSA SELEZIONATA
 - 2.1. Prove S1 ed S2
 - 2.2. Prove E1, E2, E4, E5

3. PROVE DEFINITIVE

- 3.1. Utilizzo di differenti matrici azotate
 - 3.1.1. Nitrati: S3 ed S4
 - 3.1.2. Azoto ammoniacale: S5 ed S6
 - 3.1.3. Azoto organico: S7 ed S8
- 3.2. Prove atte ad intensificare la produzione di H₂

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

" πάθει μάθος"

Eschilo

CAPITOLO 1

1. PRODUZIONE DI IDROGENO TRAMITE PROCESSI BIOLOGICI

Il soddisfacimento del fabbisogno energetico mondiale è, attualmente, subordinato alla disponibilità di combustibili fossili, i quali vengono universalmente accettati come fonti energetiche non rinnovabili. Come è noto, le fonti energetiche non rinnovabili sono destinate all'esaurimento in quanto il così detto "tasso di sfruttamento" supera il "tasso di rinnovamento naturale" delle stesse. All'utilizzo dei combustibili fossili è, inoltre, imputata la maggior responsabilità riguardo al cambiamento climatico globale a causa del rilascio in atmosfera di numerosi inquinanti (gassosi e particolati) derivanti dai processi di combustione; tra questi, nello specifico, vale la pena citare i gruppi NO_x , CO_x e PM10, i quali non solo sono dannosi per l'ambiente ma risultano anche deleteri per la salute umana.

Per far fronte al rapido esaurimento delle riserve di combustibili fossili ed ai problemi ambientali e sanitari che derivano dal loro utilizzo, la comunità scientifica e tecnologica ha dirottato la ricerca verso nuovi tipi di combustibili sottolineando l'importanza di tre caratteristiche fondamentali: rinnovabilità, sostenibilità, ecofriendly. L'idrogeno risponde in maniera adeguata a tutti i requisiti richiesti e, per tale motivo, l'interesse registrato negli ultimi anni nei riguardi di questo elemento come fonte energetica secondaria è risultato sempre maggiore, essendo facilmente fruibile per la generazione di energia tramite celle a combustibile. L'idrogeno è l'elemento più abbondante dell'universo nonché il più leggero. In condizioni normali di temperatura e pressione ($T = 25^{\circ}C e P = 1atm$) dal contatto di due atomi di idrogeno è possibile generare idrogeno molecolare (H₂), un gas incolore, inodore, insolubile in acqua, estremamente leggero e molto reattivo, caratterizzato da un PCI pari a 241.83 kJ/mol. Inoltre, paragonato alla maggioranza dei combustibili conosciuti, esso presenta il valore più elevato di energia specifica (122 kJ/g) e l'ulteriore vantaggio che deriva dalla sua combustione che produce soltanto acqua. Infatti, nel corso delle reazioni di ossidazione in cui è coinvolto, l' idrogeno molecolare reagisce con l'ossigeno dell'aria formando acqua e liberando energia sotto forma di calore, tramite la reazione $2H_2+O_2 \rightarrow 2H_2O$. A differenza dei combustibili fossili, dunque, la reazione non produce alcun inquinante e di conseguenza non contribuisce a squilibri atmosferici come effetto serra, piogge acide e buco nell'ozono. La difficoltà principale che si riscontra nell'impiego di idrogeno molecolare come vettore energetico è che la forma chimica H₂ è presente in natura in quantità minime e la sua produzione a partire da combustibili fossili o dall'acqua è, in generale, economicamente svantaggiosa. La necessità di abbattere per quanto possibile i costi di produzione dell'idrogeno molecolare, ha veicolato la ricerca verso nuove frontiere in grado di garantire la sostenibilità economica di questo combustibile, essendo quest'ultima affiancata alla sostenibilità ambientale intrinseca del gas $H_{2,}$ *conditio sine qua non* per garantire la competitività sul mercato mondiale.

Ad oggi, circa il 96% dell'idrogeno prodotto deriva da processi termochimici ed elettrochimici:

- *steam reforming* e *thermal cracking* del gas naturale (48%);
- ossidazione parziale non catalitica di idrocarburi (30%);
- gassificazione del carbone (18%);
- elettrolisi dell'acqua (4%).

Tali processi sono altamente energivori e poco vantaggiosi sia in termini economici sia in termini di impatto ambientale. Anche l'elettrolisi dell'H₂O, nonostante superi la questione riguardo la rinnovabilità della fonte primaria per la produzione di H₂ (è la tecnologia più pulita), necessita di un'elevatissima quantità di energia per poter scindere la molecola di acqua in idrogeno molecolare ed ossigeno. L'evidente conflitto tra la sostenibilità del vettore energetico H₂ (combustibile pulito e rinnovabile che non contribuisce all'effetto serra) e gli oneri relativi alla sua produzione, può essere superata grazie all'implementazione di processi produttivi di tipo biologico messi a punto per specifiche biomasse di scarto, alternativa più sostenibile rispetto ai metodi tradizionali. La produzione biologica di idrogeno si basa sulla conversione di acqua e/o substrati organici in idrogeno molecolare grazie all'intervento di organismi che metabolicamente sono in grado di catalizzare specifiche reazioni di ossido-riduzione. La capacità di produrre idrogeno degli organismi che intervengono nel corso di questi processi, è controllata dalla presenza di specifici enzimi (Ni et al., 2006). In particolare:

- nitrogenasi: catalizza la produzione di idrogeno molecolare come sottoprodotto dell'azotofissazione;
- *uptake* idrogenasi: catalizza l'ossidazione dell'idrogeno molecolare sintetizzato dalla nitrogensi secondo la reazione H₂ → 2e⁻ + 2H⁺;
- idrogenasi classica (o reversibile): può catalizzare sia l'ossidazione sia la sintesi di idrogeno molecolare tramite la reazione reversibile H₂ ↔ 2e⁻ + 2H⁺.

La comunità scientifica nutre un interesse sempre più spiccato nei riguardi dei processi finalizzati alla produzione di bio-idrogeno; essi infatti si inseriscono nel panorama tecnologico d'avanguardia offrendo una potenziale produzione di H_2 da una vasta gamma di risorse rinnovabili e da materiali di rifiuto (Levin et al., 2004).

Le bio-tecnologie coinvolte nella generazione di idrogeno si suddividono principalmente in tre categorie.

1.1 Biofotolisi diretta ed indiretta dell'acqua

Gli attori principali di questo processo sono le alghe verdi e i cianobatteri, i quali sono organismi microscopici che si trovano in ambiente acquatico ed effettuano lo stesso tipo di fotosintesi delle piante. La biofotolisi diretta è catalizzata da alghe verdi (Figura 1.1) che operano in ambiente anaerobico e il processo mira alla produzione fotosintetica di H_2 a partire dalla molecola d'acqua, previa conversione della luce in energia chimica secondo la reazione:

$2H_2O + Light \ energy \rightarrow 2H_2 + O_2.$

In realtà ciò che avviene è molto più complesso: l'acqua viene scissa, grazie all'energia luminosa, in ossigeno e in un forte riducente (ferrodoxina), normalmente coinvolto nel processo di conversione della CO_2 in carbonio organico; in alcune condizioni, invece, tale agente viene utilizzato per ridurre gli enzimi che catalizzano la formazione di idrogeno molecolare. Gli enzimi coinvolti sono normalmente assenti nelle piante verdi, per cui avviene esclusivamente la riduzione di CO_2 in carboidrati.



Figura 1.1: Microalghe Verdi

In alcune microalghe, al contrario, grazie alla presenza dell'enzima idrogenasi, possono verificarsi entrambi i fenomeni, seppur in competizione tra loro: l'energia luminosa assorbita dal fotosistema II (PSII) genera elettroni che vengono trasferiti alla ferrodoxina grazie all'utilizzo dell'energia luminosa assorbita dal fotosistema I (PSI). L' idrogenasi combina gli elettroni donati dalla ferrodoxina con ioni H⁺ (prodotto della fotosintesi delle alghe) per formare e rilasciare idrogeno molecolare. Si riporta uno schema semplificato del processo di biofotolisi diretta:

$H_2O \rightarrow PSII \rightarrow PSI \rightarrow Ferrodoxina \rightarrow Idrogenasi \rightarrow H_2$

Le alghe verdi necessitano di un certo periodo (che va da alcuni minuti a qualche ora) di incubazione anaerobica in assenza di luce per la sintesi e l'attivazione dell'enzima idrogenasi fautore del rilascio di H_2 (Levin et al., 2004). La biofotolisi diretta è un processo molto

attraente ma allo stesso tempo affetto da una forte limitazione: lo sviluppo di ossigeno durante la reazione. L'idrogenasi può risultare completamente inibita a causa della presenza di ossigeno per cui il processo tende ad auto-inibirsi. Per questo motivo la produzione di idrogeno molecolare e il rilascio di ossigeno devono essere separati o fisicamente o temporalmente avvalendosi della progettazione di due distinte fasi in cui scindere il processo. Ciò va ad incrementare notevolmente sia i costi di realizzazione dei bioreattori sia la difficoltà di gestione del sistema.

Il processo di biofotolisi indiretta, d'altro canto, avviene ad opera di cianobatteri eterocistici (Figura 1.2), forme filamentose con due diversi tipi di cellule: vegetative (in grado di effettuare il consueto iter fotosintetico) e specializzate (eterocisti, contenenti l'enzima nitrogenasi ed in grado di allontanare ossigeno per favorire la fissazione di azoto molecolare). Se l'ambiente in cui la reazione si compie registra un deficit di N_2 , la nitrogenasi è in grado di rilasciare modesti quantitativi di H_2 . Le reazioni catalizzate dai cianobatteri per la produzione di H_2 sono riportate di seguito:

$$\begin{split} & 12H_2O + 6CO_2 + Light\; energy \to C_6H_{12}O_6 + 6O_2, \\ & C_6H_{12}O_6 + 12H_2O + Light\; energy \to 12H_2 + 6CO_2. \end{split}$$

Oltre all'enzima nitrogenasi, fautore della produzione di idrogeno, i cianobatteri dispongono anche dell'*uptake* idrogenasi, responsabile del consumo dell'idrogeno prodotto. Per superare questo inconveniente, la ricerca scientifica si sta specializzando nella manipolazione genetica delle specie batteriche coinvolte con lo scopo di reprimere l'attività dell'*uptake* idrogenasi e quindi incrementare la quantità netta di H₂ generato.



Figura 1. 2: Cianobatteri eterocistici

Gli svantaggi principali dei processi di biofotolisi sono:

- basso tasso di produzione di idrogeno;
- sensibilità nei riguardi della formazione di ossigeno;
- richiesta di energia luminosa.

In generale la biofotolisi diretta è più vantaggiosa rispetto a quella indiretta, infatti i cianobatteri si avvalgono di un enzima (nitrogenasi) più energivoro e più sensibile alla composizione chimica del terreno di coltura (Lee et al., 2012).

1.2 Dark-fermentation

Il processo di dark fermentation si basa sull'azione di batteri anaerobi obbligati o facoltativi i quali, in assenza di luce, sono in grado di catalizzare la scissione di substrati organici complessi in prodotti via via più semplici tramite reazioni che si svolgono in serie o in parallelo. I prodotti finali di queste reazioni sono biogas, acidi organici e nuova biomassa. Le reazioni fermentative possono realizzarsi in diverse condizioni di temperatura: mesofilia (25-40°C), termofilia (40-65°C), termofilia estrema (65-80°C) ed iper-termofilia (>80°C). A differenza dei processi di biofotolisi, la dark fermentation non produce idrogeno molecolare puro ma un biogas costituito principalmente da H₂ e CO₂ con piccole quantità di metano e tracce di H₂S; ciò comporta la realizzazione di una fase successiva di separazione con lo scopo di ottenere una corrente gassosa costituita esclusivamente da idrogeno. Per l'applicabilità in scala reale dei processi fermentativi il substrato utilizzato deve essere biodegradabile, disponibile in elevate quantità e dall'elevato contenuto di carboidrati (Holladay et al., 2009); i substrati maggiormante adottabili sono costituiti da zuccheri semplici (glucosio e lattosio), i quali però non sono immediatamente disponibili in elevate quantità ed hanno un costo non del tutto trascurabile. Si ripota la razione di fermentazione del glucosio che dà luogo ad acido acetico ed idrogeno molecolare:

$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2.$

Teoricamente, quando l'acido acetico è l'unico prodotto, possono essere generate al massimo 4 moli di idrogeno per mole di glucosio. In realtà, è sempre possibile attestare la presenza di differenti prodotti della fermentazione biologica, in genere acidi organici ed alcoli, che conducono a rendimenti decisamente più bassi che al più determinano una produzione di 2.5-3.2 moli di idrogeno per mole di glucosio. Un esempio tipico è rappresentato dall'acido butirrico, generato prevalentemente secondo la reazione seguente:

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$$

e per cui si ottengono 2 moli di idrogeno molecolare per mole di glucosio. L'efficienza diminuisce ancora quando tra i prodotti della fermentazione sono presenti anche acido propionico, acido lattico ed alcoli.

Per queste reazioni l'energia libera di Gibbs è negativa, ciò indica che la reazione procede spontaneamente verso la formazione dei prodotti senza alcuna richiesta di energia dall'esterno (Wang et al., 2009), la reazione è termodinamicamente favorita. Un fattore discriminante per il rendimento della dark-fermentation è la pressione parziale che l'idrogeno assume nello spazio di testa del reattore; in particolare all'aumentare della pressione parziale di H_2 diminuisce il rendimento in termini di produzione di idrogeno. Questo problema può essere risolto rimuovendo l'idrogeno dallo spazio di testa delle unità di reazione immediatamente dopo la sua generazione. La rimozione repentina del biogas dallo spazio di testa del reattore è auspicabile per un ulteriore motivo che riguarda la concentrazione di anidride carbonica. Una parte dei batteri acetogeni, infatti, nel momento in cui il carbonio organico diventa un fattore limitante, *shiftano* il proprio metabolismo da eterotrofo ad autotrofo ed utilizzano CO₂, piruvato e NADH per sintetizzare formato e succinato. Questo percorso metabolico è in competizione con le reazioni di generazione di H₂ poiché l'attività dell'idrogenasi è strettamente correlata alla disponibilità di NADH.

Un inconveniente di più complessa gestione, inoltre, è quello relativo alla presenza di acidi organici nell'effluente. La produzione di questi acidi implica non solo un successivo trattamento del refluo, ma anche l'evidenza che la risorsa organica addotta ad un generico reattore di dark fermentation, non sia stata efficientemente valorizzata.

1.3 Photo-fermentation

La foto-fermentazione è un processo che si basa sulla capacità dei batteri fotosintetici rossi non sulfurei (Figura 1.3) di convertire in idrogeno molecolare gli acidi grassi volatili (VFAs) ed altri substrati organici.



Figura 1.3: Rhodobacter capsulatus (PNSB)

I batteri PNS sono dotati di entrambi gli enzimi fautori della produzione di idrogeno: idrogenasi e nitrogenasi. Tra i due, quello maggiormente coinvolto nella produzione di idrogeno è la nitrogenasi, la cui efficienza è massimizzata in ambienti in cui l'ossigeno e l'azoto molecolare risultano limitanti. Viene di seguito riportata la reazione che conduce alla produzione foto-fermentativa di idrogeno a partire dalla molecola di acido acetico.

$CH_3COOH + 2H_2O + Light \ energy \rightarrow 4H_2 + 2CO_2$

Dal punto di vista stechiometrico possono essere prodotte 4 moli di H₂ per ogni mole di acido acetico degradato. In questo caso l'energia libera di Gibbs assume segno positivo, infatti, la reazione non è spontanea ma richiede una fonte esterna per poter avvenire. L'input energetico del processo è costituito dalla luce (solare o artificiale). I limiti che maggiormente condizionano questo tipo di processo sono da un lato di natura economica (complessità strutturale dei foto-bioreattori e necessità di una fonte energetica esterna), dall'altro legati al rendimento, in quanto si ha una bassa efficienza di conversione della luce. La fotofermentazione, in effetti, è un campo di ricerca ancora oggi poco esplorato che, però, lascia presagire una ulteriore scossa dello sciame sismico che, negli ultimi decenni, sta deteriorando le preesistenti fondamenta socio-economiche basate sul sovra sfruttamento delle risorse e sull'inquinamento smodato.

La tabella seguente riassume le caratteristiche principali dei processi biologici finalizzati alla produzione di idrogeno precedentemente trattati (Das et al.,2008), (Das et al.,2001), (Hallenbeck et al.,2002), (Levin et al.,2004).

PROCESSO	ORGANISM I	RATE H ₂ mmol/ (L*h)	VANTAGGI	SVANTAGGI
Biofotolisi diretta	Microalghe	0.07	Produzione di H ₂ da acqua e luce solare	Auto-inibizione
			Elevata efficienza di conversione della luce	Richiesta di luce ad elevate intensità
Biofotolisi indiretta	Cianobatteri	0.355	Produzione di H ₂ da acqua e luce solare	Richiesta di luce ad elevate intensità
			Presenza dell'enzima nitrogenasi	Richiesta elevata di ATP
				Presenza dell'enzima uptake idrogenasi
Dark- fermentation	Batteri mesofili	21	Produzione di H ₂ in assenza di luce	CO ₂ e tracce di CH ₄ e H ₂ S nel biogas
	Batteri termofili	8.2	Utilizzo di materiali di scarto come substrato	Post-trattamento dell'effluente
	Batteri iper- termofili	8.4	Presenza di sottoprodotti dal valore commerciale	Utilizzazione non completa del substrato
Photo- fermentation	Purple non sulphur bacteria	0.16	Utilizzo di materiali di scarto e DFE come substrato	Richiesta di energia luminosa per la produzione di H ₂
			Completa utilizzazione del substrato	Bassa efficienza di conversione della luce
			Ampio range di λ	Presenza di uptake idrogenasi

Tabella 1.1: Caratteristiche dei processi di produzione di bio- ${\rm H}_2$

Lo svantaggio, comune a tutti i processi biologici elencati, di natura economica relativo all'utilizzo di substrati selezionati, può essere superato nel caso dei processi di dark e photofermentation attraverso l'utilizzo di materiali o biomasse di scarto, oppure, nel caso di processi dipendenti dalla luce, grazie allo sfruttamento dell'energia solare.

Lo sviluppo di queste tecnologie innovative è del tutto conforme alle più recenti politiche ambientali che, fortunatamente, si stanno insinuando sempre di più nelle arterie della società.

2. PRINCIPI DI PHOTOFERMENTATION

I batteri fotosintetici PNS (purple-non sulphur bacteria) sono, in generale, batteri fototrofici anaerobi facoltativi che presentano specifici pigmenti e sono in grado di effettuare una fotosintesi anossigenica. I PNSB si trovano, in natura, i tutti gli ambienti acquatici caratterizzati da basse concentrazioni di ossigeno, dalla disponibilità di luce e sostanza organica disciolta e nei sedimenti. In realtà, la famiglia batterica purple-non sulphur è composta da una moltitudine di gruppi che si differenziano tra loro per peculiarità morfologiche e metaboliche. Numerosi studi (McEwan, 1994) hanno evidenziato la versatilità e la capacità di adattamento dei batteri in questione, in particolare Rhodobacter sphaeroides. Infatti, questi ultimi, da un lato sono in grado di sfruttare corridoi metabolici differenti (fotoautotrofia, foto-eterotrofia e chemio-eterotrofia) adattandosi in tempi piuttosto rapidi alle condizioni ambientali in cui si vengono a trovare, dall'altro riescono ad utilizzare una cospicua varietà di substrati tra cui glucosio, alcoli, glicerolo, composti aromatici, acidi a catena corta e acidi grassi volatili. Grazie all'elevata efficienza di conversione del substrato ed alla varietà di composti organici che sono in grado di utilizzare, i PNSB si inseriscono in questo contesto come possibili candidati per la produzione massiva di idrogeno. La capacità di rilascio di idrogeno come prodotto di risulta del metabolismo di questi batteri si osserva in condizioni strettamente anaerobiche ed eterotrofiche ed in presenza di luce (solare o artificiale). Inoltre, tra i substrati citati, quelli che sono stati più ampiamente documentati in quanto particolarmente affini ai PNSB sono i VFAs (acetato, butirrato, lattato, malato, propionato etc).

2.1 Caratteristiche metaboliche dei batteri PNS

Dal punto di vista puramente biologico, la produzione di idrogeno per via foto-fermentativa grazie all'azione dei batteri PNS, è stata trattata copiosamente negli ultimi decenni e sono stati

messi in evidenza i meccanismi che intervengono durante questa trasformazione. L'attore principale che regola il tasso di generazione di H_2 è l'enzima nitrogenasi. La nitrogenasi è presente nei batteri azotofissatori; in presenza di azoto molecolare (suo fisiologico substrato) ed in condizioni strettamente anaerobiche, svolge il compito di fissare la molecola N_2 in azoto ammoniacale tramite il processo di fissazione biologica. Questo meccanismo è notevolmente energivoro (vengono richieste 16 moli di ATP per scindere il triplo legame della molecola N_2) e molto poco conveniente in termini di produzione di idrogeno; infatti, il rapporto molare tra idrogeno prodotto ed N_2 fissato in ammonio è 1:1:

 $N_2 + 8H^+ + 8H^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i.$

Molto più conveniente per la produzione di idrogeno molecolare, ma praticamente identica in termini di consumo di ATP, è la reazione che si determina nel momento in cui l'azoto molecolare, nell'ambiente in cui la reazione si compie, è un fattore limitante. In questo caso, infatti, la nitrogenasi perde la sua capacità di fissare azoto molecolare e catalizza la seguente reazione:

 $8H^+ + 8H^- + 16ATP \rightarrow 4H_2 + 16ADP + 16P_i$

producendo idrogeno molecolare da ioni H^+ , in condizioni di anaerobiosi. La resa fotofermentativa dei batteri PNS è, dunque, in primo luogo massimizzata in ambienti in cui l'ossigeno e l'azoto sono limitanti.

Un'altra caratteristica comune dei batteri fotosintetici è la sintesi di un ulteriore enzima: l'idrogenasi. Tale enzima agisce in disaccordo con l'obiettivo di produzione di idrogeno, essendo esso responsabile del suo consumo. L'idrogenasi, in realtà, è in grado anche di produrre idrogeno ma numerosi studi (Gogotov et al.,1986) hanno quantificato che l'attività di produzione di H₂ è nettamente inferiore (meno del 10%) all'attività di consumo dell'H₂ stesso. In seguito a queste considerazioni, all'idrogenasi è generalmente conferito l'epiteto di "antagonista metabolico" dell'enzima nitrogenasi (Koku et al.,2002).

L'ingente quantità di energia richiesta per la crescita della biomassa (anabolismo) e per la produzione di idrogeno (catabolismo) viene garantita grazie alla presenza dell'apparato fotosintetico, il quale assorbe l'energia luminosa e la converte in energia chimica di legame (ATP), poi utilizzata dalla nitrogenasi per la produzione di H₂. La sintesi dell'apparato fotosintetico è inibita dalla presenza di ossigeno, in quanto esso reprime la formazione delle batterioclorofille, molecole in grado di assorbire selettivamente la luce. Nei batteri PNS, l'assenza del fotosistema II risolve automaticamente l'inconveniente dell'inibizione indotta dalla produzione di ossigeno. Per favorire la produzione di idrogeno, è necessario mantenere un flusso energetico superiore a quello strettamente richiesto dalla biomassa per la loro

crescita in modo da saturare l'enzima nitrogenasi. L'assenza di ossigeno è condizione necessaria ma non sufficiente per la corretta evoluzione del processo; infatti un ruolo centrale viene coperto anche dalla disponibilità di luce e dalla sua intensità. È stato messo in evidenza che l'intensità luminosa utile per ottenere la massima attività della nitrogenasi deve eccedere quella strettamente richiesta dalla biomassa per la propria crescita (Sasikala et al.,1995), ma non deve raggiungere intensità troppo elevate (oltre 40k lux) in quanto si verificherebbero fenomeni di foto-inibizione.

Si riporta uno schema riassuntivo (Figura 1.4) del processo di produzione di idrogeno che evolve all'interno del citoplasma dei batteri PNS (Koku et al.,2002).



Figura 1.4: Schema complessivo del processo biologico di produzione di H₂

Il substrato organico, una volta penetrato all'interno del citoplasma batterico, può essere coinvolto in due percorsi alternativi: da un lato viene utilizzato per la proliferazione batterica dando anche luogo alla formazione di alcuni prodotti di biosintesi (PHB); dall'altro viene alimentato nel ciclo TCA, all'interno del quale subisce una reazione di ossidazione i cui prodotti sono CO_2 ed elettroni. Contemporaneamente l'apparato fotosintetico intercetta la luce convertendola in ATP. L'ATP viene poi incanalata all'interno del complesso enzimatico nitrogenasi insieme a protoni (generati in parte dal ciclo TCA ed in parte dall'ATPasi) ed elettroni. Il trasferimento di elettroni dal ciclo TCA alla nitrogenasi è coadiuvato da una serie di reazioni di ossido-riduzione di due "vettori" di elettroni, NAD e ferrodoxina. Infine, la nitrogenasi riduce gli ioni H⁺ ad idrogeno molecolare. L'idrogenasi, di contro, tende a consumare H₂ producendo ATP, protoni ed elettroni. Per stimare la produzione netta di H₂

bisogna, quindi, decurtare la quantità di idrogeno consumata dall'idrogenasi rispetto al quantitativo complessivo. La massima produzione di idrogeno può essere perseguita nel momento in cui si verificano le seguenti condizioni:

- massima attività della nitrogenasi e minima attività dell'idrogenasi;
- utilizzo di substrati che si incanalano preferenzialmente verso il *pathway* del ciclo TCA;
- saturazione della domanda di ATP da parte della nitrogenasi e quindi elevata efficienza di conversione dell'energia luminosa in ATP;
- età dell'inoculo batterico.

È opportuno esplicitare meglio l'ultimo punto. Nell'intervallo temporale che comprende la fase esponenziale di crescita dei microrganismi si determinano le condizioni più favorevoli per la produzione di idrogeno; d'altro canto quando si inizia ad osservare una fase stazionaria, si verifica un declino dell'attività della ferrodoxina e quindi viene in qualche modo frenata l'attività della nitrogenasi. In questo lasso temporale, il metabolismo batterico segue preferenzialmente il percorso che porta all'accumulo di prodotti di biosintesi (PHB). Si deduce, dunque, che elevati tempi di detenzione portano ad un rapido decremento del tasso di produzione di H_2 , favorendo il *pathway* alternativo che può sfociare nell'accumulo di PHB.

2.2 Caratteristiche dei substrati utilizzati

2.2.1 Volatile Fatty Acids

I batteri PNS, in presenza di luce, sono in grado di convertire una grande varietà di substrati in idrogeno molecolare. Il tasso di crescita dei microrganismi, l'efficienza di conversione del substrato ed il tasso di produzione di H₂, variano in maniera significativa a seconda del tipo di substrato considerato. I substrati che meglio si prestano alla produzione di bio-idrogeno sono gli acidi grassi volatili di cui si riportano le razioni di trasformazione in cui sono coinvolti e la quantità di idrogeno che teoricamente si produce dalla loro completa foto-conversione:

$$CH_{3}COOH + 2H_{2}O + Light \ energy \rightarrow 4H_{2} + 2CO_{2} \qquad \Delta G^{\circ} = +104 \ kJ$$

$$CH_{3}CH_{2}CH_{2}COOH + 6H_{2}O + Light \ energy \rightarrow 10H_{2} + 4CO_{2}$$

$$CH_{3}CH(OH)COOH + 3H_{2}O + Light \ energy \rightarrow 6H_{2} + 3CO_{2}$$

$$HO_{2}CCH(OH)CH_{2}COOH + 3H_{2}O + Light \ energy \rightarrow 6H_{2} + 4CO_{2}$$

Le reazioni sono relative ai VFAs che principalmente vengono riportati nella letteratura riguardante la photo-fermentation; rispettivamente acido acetico, acido butirrico, acido lattico ed acido malico. Dalla stechiometria, si deduce che tra i VFAs, quelli che massimizzano la produzione foto-fermentativa di H₂ sono l'acido malico e l'acido lattico; acetico e butirrico, invece, vanno a favorire il *pathway* metabolico che porta all'accumulo di poli-idrossialcanoati all'interno della cellula batterica rispetto a quello che sfocia nella produzione di H₂. Un importante considerazione va fatta riguardo il rapporto C/N all'interno del terreno di coltura. Questo risulta essere un regolatore metabolico discriminante nei riguardi della produzione foto-fermentativa di H₂ catalizzata dai batteri PNS. Un elevato rapporto C/N va a favorire la produzione dell'idrogeno molecolare; in particolare Androga et al., (2011) ha condotto diversi esperimenti variando di volta in volta il valore del rapporto tra carbonio e azoto all'interno del terreno di coltura (per il quale la fonte di carbonio era costituita da acido malico e quella di azoto da acido glutammico). Tale studio è giunto alla definizione di un rapporto C/N ottimale pari a 25. Per valori più elevati si registra una crescita più spinta della biomassa (e quindi dei solidi sospesi totali) che va a inibire la produzione di H2 a causa della difficoltà di penetrazione della luce (self-shading).

2.2.2 Reflui industriali

I batteri fotosintetici sono in grado di utilizzare come substrato diverse tipologie di materia organica, tale evidenza ha gettato le basi per l'utilizzo di un processo di foto-fermentazione mirato al conseguimento di un duplice obiettivo: la produzione di bio-idrogeno, vettore energetico pulito e rinnovabile, e la bioremediation di acque di scarico ricche di materiale organica.

Sebbene i batteri PNS preferiscano acidi organici come fonte di carbonio, alcuni studi hanno mostrato come sia possibile la produzione di idrogeno molecolare per via fotosintetica utilizzando reflui di origine industriale con elevato contenuto di sostanza organica. I limiti operativi che maggiormente ostacolano il corretto iter foto-depurativo di effluenti provenienti da lavorazioni industriali sono i seguenti:

- torbidità del refluo da trattare: la luce difficilmente riesce a penetrare in quanto ostacolata dalle elevate concentrazioni di solidi sospesi totali;
- elevate concentrazioni di ammonio: l'enzima nitrogenasi, fulcro della produzione di idrogeno, viene inibito;
- elevato valore del COD e possibile presenza di composti tossici: necessità di pretrattamenti.

Ghosh et al., in una meticolosa review pubblicata nel 2016, esaminano i rendimenti della produzione di idrogeno ottenuti dalle di acque di scarico risultanti dai processi produttivi di diverse industrie agroalimentari e specificano i pretrattamenti da realizzare per massimizzare le prestazioni dei foto-bioreattori. Si riporta una tabella riassuntiva di alcuni pregnanti casi studio condotti nell'ultimo decennio da diversi gruppi di ricerca.

INFLUENTE	SPECIE	PRETRATTAMENTO	YIELDS H ₂	RATE H ₂ mL H ₂ /(L*h)
Brewery wastewater	R.sphaeroides	Filtrazione, autoclavaggio	0.22 L H ₂ /L WW	2.75
Soy sauce wastewater	Consorzio di PNSB	Autoclavaggio, diluizione, pH neutro	2.67 L H ₂ /L	NA
Sugar beet molasses	R.sphaeroides	Filtrazione, diluizione	$1.01 \text{ L H}_2/\text{ L coltur}$	e 2.02
Dairy wastewater	R.sphaeroides	Filtrazione, autoclavaggio, diluizione	8.6 L H ₂ /L WW	66
Tofu wastewater	R.sphaeroides	Autoclavaggio	1.9 mL H ₂ /LWW	15.83
Palm oil mill effluent	R.palustris	Centrifugazione, filtrazione, autoclavaggio	NA	10

Tabella 1.2: Produzione foto-fermentativa di H2 a partire da reflui industriali

I reflui provenienti da industrie volte alla produzione di bevande alcoliche, ad esempio, sono ricchi di composti organici come zuccheri, aminoacidi, proteine, alcoli etc. i quali possono rivelarsi particolarmente adatti alla foto-conversione in idrogeno molecolare. Nonostante ciò, il rendimento in termini di H₂ prodotto è relativamente basso a causa dell'elevato contenuto di azoto rispetto a quello di carbonio. Valori troppo bassi del rapporto C/N incidono negativamente sullo Y_{H_2} (resa in termini di H₂ prodotto).Diversa è la situazione dei reflui provenienti da industrie atte alla lavorazione del latte e del latte di soia; l'elevato contenuto di acidi organici e la presenza di composti inorganici come ferro e molibdeno (cofattori chiave per la sintesi dell'enzima nitrogenasi), incrementano notevolmente sia lo *yield* sia la *rate* di idrogeno molecolare.

Tuttavia, l'uso diretto delle acque reflue provenienti dai processi produttivi dell'industria agroalimentare, risulta praticamente impossibile a causa della contemporanea presenza di alcuni composti inibenti che vanno ad interdire il metabolismo dei batteri foto-fermentativi. Per tale motivo è necessario sottoporre il refluo ad alcuni pretrattamenti prima di inviarlo ai foto-bioreattori. In primo luogo è necessario agire sulla concentrazione dello ione ammonio all'interno del bulk liquido, infatti, in molti casi, tale ione oltrepassa un certo valore soglia oltre il quale l'attività dell'enzima nitrogenasi viene repressa (Yokoi et al.,1998). L'ammonio è quasi sempre presente in elevate concentrazioni all'interno dei reflui industriali citati in quanto è il principale sottoprodotto delle reazioni di degradazione spontanea dei composti

azotati, i quali costituiscono una rilevante percentuale delle acque di scarico industriali di matrice alimentare. Il valore di concentrazione soglia dell'ammonio oltre il quale il *pathway* metabolico che sfocia nella produzione di idrogeno dei batteri PNS viene inibito è 2 mM. Per favorire l'attività dell'enzima nitrogenasi e quindi la produzione di idrogeno molecolare, è necessario mantenere (nelle acque di scarico a cui si vuole applicare un trattamento di foto-fermentazione) concentrazioni dello ione ammonio che non superino il valore soglia riportato in letteratura; questo è possibile solo se si prevede un adeguato pretrattamento al liquame (ad esempio una opportuna diluizione). In verità, i traguardi raggiunti dalle scienze e dalla biotecnologia consentono di manipolare geneticamente i batteri coinvolti per selezionare positivamente le specie che tollerano ammonio con lo scopo di produrre idrogeno anche da reflui con elevate concentrazioni di NH₄⁺, per questi ultimi, infatti, predisporre un pretrattamento diventa economicamente non sostenibile.

Un ulteriore problema che, in generale, affligge tutti i processi biologici nel momento in cui si vogliono trattare reflui industriali, è la presenza di composti tossici all'interno del refluo stesso. I composti tossici influiscono negativamente sulla cinetica biologica. Nel caso della foto-fermentazione applicata a reflui provenienti dall'industria agroalimentare, i composti tossici che più frequentemente si ritrovano all'interno delle acque sono i poli-fenoli. Prima di avviare un processo di fermentazione alla luce è quindi necessario ridurre drasticamente il contenuto di fenoli nel refluo da trattare; ciò è possibile avvalendosi di processi di adsorbimento.

alle caratteristiche chimiche dell'influente Oltre di foto-fermentazione, bisogna necessariamente considerare alcune caratteristiche fisiche che spesso rappresentano il fattore discriminante tra il corretto ed il mancato funzionamento del processo. Comunemente i reflui di origine industriale sono caratterizzati da una colorazione scura (le diverse gradazioni sono esclusivamente dovute alla tipologia di processo produttivo) e questo va ad ostacolare la penetrazione della luce inibendo la produzione foto-fermentativa di H₂. Ovviamente è possibile considerare l'efficienza di conversione dell'energia luminosa in ingresso uno dei parametri chiave nello studio nei processi fotofermentativi, in quanto la quantità di idrogeno molecolare in uscita ne è funzione diretta. Per evitare quindi la messa a punto di un processo di foto-fermentazione molto poco performante, l'influente deve essere sottoposto a pretrattamenti in grado di chiarificare la tipica colorazione scura dei reflui da trattare.

Si ritiene opportuno citare una recente review del 2017 (Zhang et al.) in cui si riporta la produzione di bio-idrogeno tramite processi foto-fermentativi utilizzando come substrato gli scarti di coltivazione derivanti dai processi di lavorazione di granturco, frumento e riso. Ogni

anno, nel mondo, vengono stoccate elevate quantità di scarti di coltivazione, poi utilizzati come risorse per la produzione energetica, avvalendosi di un processo di bioremediation. Prima di essere inviato ad un trattamento biologico di foto-fermentazione, è necessario sottoporre il refluo in questione ad una serie di pretrattamenti per rendere le sue caratteristiche chimico-fisiche congruenti con le esigenze processuali. In particolare si prevedono pretrattamenti piuttosto spinti a causa della complessa struttura chimica della matrice reticolata di cellulosa, emicellulosa e lignina che va ad incrementare la natura recalcitrante del substrato. Non pretrattare adeguatamente il refluo influente si traduce nel fallimento del processo di fermentazione alla luce. Al contrario, predisponendo un adeguato trattamento preliminare dei reflui industriali citati, non solo si raggiungono maggiori rendimenti nell'ambito della produzione di idrogeno, ma si registra anche una significativa riduzione del COD dell'acqua di scarico.

La produzione di idrogeno per via foto-fermentativa utilizzando come substrato rifiuti ed acque di scarico provenienti da processi industriali di origine agro-alimentare, accoppiata alla bioremediation degli stessi substrati, rappresenta un traguardo tangibile nell'inarrestabile staffetta che tende alla *green economy*.

2.2.3 Dark fermentation effluent

Nel campo del trattamento delle acque, i prodotti finali derivanti dalle trasformazioni metaboliche dai batteri PNS, in particolare idrogeno molecolare e bio-polimeri, possono risultare di grande interesse nel momento in cui si utilizza come *feedstock* l'effluente di un altro processo mirato alla produzione di bio-idrogeno: la dark–fermentation. L'idea di accoppiare questi due processi, è stata plasmata in seguito ad alcune evidenze:

- il processo di dark-fermentation non risulta, molto performante in termini di produzione di idrogeno;
- nell'effluente del processo di dark fermentation sono presenti prodotti di reazione (acidi organici) che devono essere eliminati con ulteriori trattamenti per garantire gli standard qualitativi dettati dalla normativa;
- i batteri fotofermentativi risultano particolarmente adatti alla degradazione degli acidi organici presenti all'interno dell'effluente di dark fermentation;
- l'integrazione di dark e photo-fermentation incrementa notevolmente il rendimento sia in termini di bioremediation sia in termini di produzione di idrogeno;
- la quantità di idrogeno generato dai due processi in serie diventa apprezzabile dal punto di vista commerciale.

Nei paragrafi precedenti, sono stati vagliati i vantaggi e gli svantaggi di una serie di processi con un comune obiettivo: la produzione di bio-idrogeno. In particolare ci si è riferiti a due processi, dark e photo-fermentation che, attualmente, rappresentano i due fuochi attorno ai quali orbita la ricerca scientifica.

Il processo di dark-fermentation offre il vantaggio di produrre idrogeno molecolare partendo da composti organici di scarto senza richiedere una fonte energetica esterna (senza considerare il riscaldamento necessario alle attività microbiche le quali presentano una certa resa almeno in condizioni di mesofilia) in quanto la reazione di degradazione della sostanza organica da parte dei batteri fermentativi, in condizioni anaerobiche, è termodinamicamente favorita. Il forte limite applicativo di questo processo è da imputare all'accumulo di sottoprodotti nell'effluente, in particolare alcoli e acidi organici volatili (in primis acido acetico, acido butirrico e propionico). Questi prodotti delle reazioni biochimiche da un lato vanno a rallentare il tasso di produzione di idrogeno in quanto oltre una certa concentrazione inibiscono la crescita batterica, dall'altro minano alla buona resa del processo poiché il substrato non viene completamente utilizzato e l'effluente richiede ulteriori trattamenti depurativi prima dello sversamento nel corpo idrico recettore. La photo-fermentation, invece, si basa sull'azione metabolica di alcuni batteri foto-eterotrofi in grado di produrre H₂. utilizzando preferenzialmente acidi organici come substrato di partenza ed in condizioni anaerobiche. Queste evidenze sperimentali rendono il processo di fermentazione alla luce il naturale proseguimento del processo di fermentazione al buio, consentendo rendimenti maggiori rispetto a quelli ottenibili in un unico stadio che in ogni caso sono ancora lontani da quello teorico di 12 mol H₂/mol di glucosio. L'applicazione sequenziale di dark e photofermentation propone, tuttavia, alcuni significativi vantaggi. L'effluente di dark-fermentation è composto da una quantità sufficiente di acidi organici, utilizzati poi come donatori di elettroni dai batteri fotosintetici, i quali sono metabolicamente in grado di convertirli in idrogeno molecolare ed anidride carbonica. Si riporta una rappresentazione schematica dell'integrazione di dark e photo-fermentation (Rai et al., 2016).



Figura 1.5: Integrazione dei processi di dark e photo-fermentation (Rai et al.,2016)

Risulta opportuno rimarcare che il metabolismo di batteri fermentativi sembri il proseguimento naturale del processo di fermentazione al buio; l'applicazione sequenziale dei due processi conduce ad un incremento spinto del rendimento complessivo della fermentazione anaerobica sia riguardo l'efficienza di conversione del substrato iniziale sia riguardo i livelli di produzione di idrogeno molecolare.

L'applicazione combinata dei processi di dark e photo-fermentation è solitamente condotta in sistemi separati per raggiungere, in entrambi i casi, l'optimum delle condizioni operative. Si riporta uno schema semplificativo del processo in due stadi; sono raffigurati i due reattori all'interno dei quali avvengono le reazioni biochimiche catalizzate da diversi tipi di microrganismi.



Figura 1. 6: Processo a doppio stadio (Rai et al.,2016)

Gli acidi organici, generati dall'azione metabolica dei batteri anaerobi facoltativi che operano in dark fermentation, rappresentano il substrato ideale per i batteri foto-fermentativi che, grazie ai meccanismi descritti precedentemente, sono in grado di produrre idrogeno a seguito di reazioni di ossido-riduzione. Si evidenzia che il massimo rendimento teorico di idrogeno prodotto dai due sistemi in serie è di 12 mol H_2 /mol $C_6 H_{12}O_6$. I vantaggi indiscutibili del processo a due stadi sono:

- ottenimento di una quantità di idrogeno economicamente vantaggiosa;
- raggiungimento di efficienze depurative elevate;
- applicabilità nel campo del trattamento di acque di scarico provenienti da numerosi processi produttivi.

Riguardo quest'ultimo punto vengono riportati alcuni casi studio che pongono l'attenzione sul rendimento del processo a doppio stadio (produzione di H_2) ottenuto trattando reflui provenienti da industrie agroalimentari. Gli esperimenti considerati sono stati condotti su piccola scala ed in condizioni controllate di temperatura, pH ed intensità luminosa.

FONTE DI CARBONIO	BATTERI DARK-PHOTO FERMENTATIVI	PRODUZIONE H ₂
Amido	C. butyricum + R.sphaeroides	3.6 mol H ₂ /mol glucosio
Glucosio	E. cloacae+ R. sphaeroides	7.02 mol H ₂ /mol glucosio
Glucosio	Clostridium sacch.+R.sphaeroides	6.85 mol H ₂ /mol glucosio
Amido di patate	Coltura mista+ R. capsulatus	5.6 mol H ₂ /mol glucosio
Buccia di patate	C.saccharolyticus+R.capsulatus	5.81 mol H ₂ /mol glucosio
Siero del latte	Coltura mista+ R.palustris	10 mol H ₂ /mol lattosio

Tabella 1.3: Yields di H₂ in dark+photo-fermentation

Questi risultati mostrano la fattibilità economica del processo a doppio stadio e, in alcuni dei casi citati, si arriva ad efficienze depurative del 90% in termini di rimozione di COD.

D'altro canto, nel momento in cui si vuole investigare la competitività economica del processo di produzione di idrogeno per via foto-fermentativa partendo dall'effluente di darkfermentation in scala industriale, non si possono trascurare gli eccessivi costi derivanti dalla continua illuminazione artificiale necessaria per il buon esito del processo. L'unica strada perseguibile per il superamento di questa limitazione è l'implementazione di fotobioreattori illuminati direttamente dalla luce solare. Si può istantaneamente comprendere la difficoltà a cui si fa fronte nel momento in cui si opera in condizioni outdoor; in primis il risparmio economico che deriva da tale configurazione lo si paga in termini di controllo della temperatura e dell'intensità luminosa. Infatti, bisogna considerare non solo l'alternarsi del giorno e della notte ed il susseguirsi delle stagioni, ma anche l'aleatorietà meteorologica giornaliera (ad esempio la presenza di nuvole può drasticamente ridurre l'intensità della radiazione solare al suolo). Uno studio di questo tipo è stato condotto, nel 2012, dalla compagine scientifica Özkan et al. la quale ha valutato la foto-produzione di bio-idrogeno utilizzando come substrato l'effluente di un processo di dark-fermentation in condizioni di termofilia volto al trattamento di un refluo contenete scarti di lavorazione della barbabietola da zucchero. L'effluente della fase di dark-fermentation è stato sottoposto ad una serie di pretrattamenti prima di essere inviato al successivo step fotofermentativo:

- centrifugazione: la presenza di particelle sospese e colloidali incrementa la torbidità del bulk liquido e quindi interferisce con la penetrazione della luce favorendo il verificarsi di fenomeni di *self-shading*;
- diluizione: elevate concentrazioni di acetato inibiscono il metabolismo foto-batterico;
- aggiunta di micronutrienti: in particolare si dispone di un supplemento di ferro e molibdeno essendo tali elementi cofattori della nitrogenasi;
- regolazione del pH: viene introdotto un buffer fosfato all'interno del terreno di coltura;
- sterilizzazione: l'inoculo batterico proviene da una coltura pura di *Rhodobacter* capsulatus.

Gli esperimenti sono stati effettuati in un lasso temporale pari a 15 giorni nella capitale della Turchia, si è dunque considerata la radiazione globale giornaliera relativa alle coordinate geografiche di Ankara. A causa delle fluttuazioni di parametri discriminanti come la temperatura dell'aria, l'intensità luminosa e la lunghezza d'onda della radiazione, si è riscontrata una *lag phase* della crescita della biomassa più lunga rispetto a studi *indoor* effettuati dagli stessi autori. Riguardo la produzione molare di idrogeno, lo studio vanta un rendimento superiore al 77%, valore nettamente superiore se confrontato con le sperimentazioni effettuate in condizioni *indoor* (48%). Anche questo caso studio, inoltre,

sottolinea i vantaggi di un processo a doppio stadio (dark e photo-fermentation) mostrando la quasi totale conversione del substrato di partenza e l'incremento della produzione totale di idrogeno che ne deriva.

Gli aspetti che talvolta rendono economicamente svantaggioso il processo articolato in due *steps* successivi, sono da ricondurre al fatto che la separazione spaziale delle fermentazioni al buio ed alla luce richiede un maggior costo sia di investimento sia di gestione, in quanto i reattori sono due e richiedono condizioni operative differenti. Inoltre, in numerosi casi applicativi, è necessario effettuare alcuni pretrattamenti all'effluente di dark-fermentation prima di inviarlo alla fase successiva incrementando ancora di più i costi e la difficoltà di gestione.

V. Montiel Corona, insieme al suo team scientifico (2015), ha condotto una serie di esperimenti per analizzare comparativamente alcune delle componenti biotiche ed abiotiche che influiscono sul processo di foto-fermentazione applicato ad un effluente reale di dark-fermentation derivante da scarti vegetali. L'attenzione degli autori è stata focalizzata su alcuni elementi cardine:

- tipologia dell'inoculo: coltura pura (Rhodobacter capsulatus), coltura mista.
- metodologia di flussaggio (Argon, riduzione pressione);
- utilizzo di bicarbonato per incrementare la produzione di H₂;
- condizioni *outdoor* ed *indoor*.

Si riporta un grafico riassuntivo che mostra la produzione di idrogeno (mL/L) al variare dei diversi fattori considerati:



Figura 1.7: Effetto di differenti singoli fattori sulla produzione di H₂

È stato dimostrato che un inoculo batterico proveniente da una coltura mista arricchita di batteri foto-fermentativi (coltura mista), offre risultati simili (in termini di produzione di

idrogeno) rispetto ad una coltura pura di Rhodobacter capsulatus. Questo risultato è molto rilevante per la messa a punto di foto-bioreattori su scala reale; infatti mantenere condizioni sterili e controllate, adeguate allo svolgimento delle attività metaboliche di inoculi batterici puri risulta molto complicato nella pratica e va ad influire negativamente sulla corretta gestione dell'impianto. È tanto più complicato mantenere condizioni sterili quando il substrato di partenza è l'effluente di un processo come la dark-fermentation, essendo quest'ultimo ricco di specie batteriche differenti, focolaio di contaminazione per i fotofermentativi. L'utilizzo di una coltura pura ed il mantenimento di tutte le sue caratteristiche è, di fatto, possibile solo in scala di laboratorio ed in condizioni sterili e controllate. Altri autori (Luongo et al., 2017), hanno improntato la propria attività di ricerca su questo aspetto di grande valore ingegneristico. I risultati ottenuti da questo studio sono ancora più espliciti: l'inoculo proveniente da una coltura mista di PSNB produce quantità di idrogeno più elevate rispetto ad una coltura pura di Rhodobacter sphaeroides. Questi risultati possono essere spiegati tramite la teoria della selezione naturale all'interno di aggregazioni microbiche miste. In una coltura pura, grazie alle condizioni sterili e controllate, i batteri hanno egualmente a disposizione substrato, luce, nutrienti e micronutrienti; quando uno di questi fattori diventa limitante, gli organismi shftano il proprio metabolismo verso un pathway alternativo alla produzione di idrogeno: l'accumulo di una riserva di carbonio (PHB). Tale accumulo costituisce un "margine di sicurezza" per la vita del batterio e viene successivamente consumato nel momento in cui si verificheranno condizioni limite per la sopravvivenza del batterio stesso. Nella coltura mista, di contro, a causa dei fenomeni di competizione che si instaurano tra le varie specie batteriche, vengono, nel tempo, selezionati positivamente i batteri più idonei alla sopravvivenza i quali, probabilmente, sono in grado di sfruttare metabolicamente substrati, nutrienti e luce, anche in condizioni di stress favorendo una produzione di idrogeno più elevata anziché l'accumulo di PHB. A favore di questa tesi, si riportano i risultati ottenuti dallo studio (Luongo et al., 2017) riguardo l'accumulo di PHB per le due differenti colture considerate. Nel caso di coltura pura R. sphaeroides la concentrazione di PHB all'interno del volume di controllo ha raggiunto un valore massimo di $882(\pm 99)$ mg PHB/L, mentre, per una coltura mista, il massimo valore registrato è stato di $185(\pm 25)$ mg PHB/L, evidentemente più basso.

Un'altra problematica da affrontare, riguarda la necessità di flussare lo spazio di testa del reattore con gas inerti, derivante da due esigenze differenti: da un lato si vogliono mantenere condizioni anaerobiche, dall'altro è opportuno tenere bassa la pressione parziale dell'idrogeno per evitare che quest'ultimo, solubilizzando, venga ri-ossidato dai batteri, essendo essi

provvisti dell'enzima idrogenasi. Molti autori si sono soffermati su questo aspetto (Li et al., 2011) evidenziando che, a differenza del flussaggio continuo con un gas inerte, l'evacuazione parziale dello spazio di testa del rettore, incrementa il Δ tra la pressione della fase gassosa e di quella liquida, riducendo la solubilità di idrogeno e biossido di carbonio nel terrendo di coltura. Le conseguenze benefiche risultano due: maggiore rilascio di gas dal terreno di coltura e spostamento dell'equilibrio della reazione verso i prodotti. Lo studio Montiel Corona et al., 2015, suggerisce che ridurre la pressione nello spazio di testa del reattore può essere una buona alternativa al flussaggio con Argon sia in termini di risparmio economico, sia in termini di produzione di idrogeno. Un ulteriore aspetto su cui si sofferma l'attenzione degli autori è l'incremento della produttività del sistema a seguito dell'aggiunta di bicarbonato. I batteri PNS necessitano di un accettore di elettroni quando il substrato (ad esempio acido butirrico e propionico) è più ridotto delle componenti cellulari. Il bicarbonato ben si presta a questa esigenza favorendo l'efficienza di conversione del substrato.

3. FOTO-BIOREATTORI: STATO DELL'ARTE

La produzione di bio-idrogeno tramite foto-fermentazione proietta la ricerca scientifica a scenari futuri perfettamente in accordo con le più recenti politiche ambientali, infatti, tale processo è in grado di generare energia comportando un impatto ambientale del tutto trascurabile ed utilizzando materiali di scarto come *feedstock*. Nonostante i progressi ottenuti nell'ultima decade, vi è ancora uno squilibro tra la quantità di energia fornita al sistema come input rispetto all'output energetico sotto forma di H₂. Per questo motivo, la sfida accettata dalla comunità scientifica consiste nell'ottimizzazione del design dei foto-bioreattori e dei parametri che regolano il processo di photo-fermentation.

I foto-bioreattori volti alla produzione di idrogeno devono, in primis, essere in grado di mantenere all'interno del sistema condizioni di anaerobiosi per il corretto svolgimento delle reazioni metaboliche dei batteri PNS. Essendo, inoltre, il processo dipendente da una fonte energetica luminosa esterna, devono essere trasparenti alla radiazione incidente e presentare una superficie specifica quanto più elevata possibile, prestando sempre attenzione alla stabilità strutturale ed al corretto funzionamento idrodinamico. Tutti i batteri, inoltre, devono avere la stessa possibilità di essere investiti dalla radiazione, per cui è necessario predisporre un adeguato meccanismo di miscelazione. Per garantire una certa efficienza nel funzionamento dei reattori è necessario prevedere un adeguato sistema di prelievo del gas prodotto. Tuttavia, l'ottimizzazione prestazionale dei foto-bioreattori è intimamente correlata alla scelta della fonte luminosa da utilizzare, della sua intensità e della sua distribuzione all'interno del volume di controllo. I reattori all'interno dei quali evolvono le reazioni foto-

biologiche devono essere progettati nella loro struttura e nel funzionamento idraulico e meccanico in modo tale da rispondere a due esigenze:

- contenimento della coltura microbica;
- stoccaggio dell'idrogeno rilasciato.

Per quanto detto, le caratteristiche fisiche che necessariamente deve presentare un fotobioreattore all'interno del quale evolve un processo di foto-fermentazione, sono:

- permeabilità alla radiazione luminosa;
- impermeabilità nei confronti dell' idrogeno;
- durabilità;
- ermeticità.

È inoltre desiderabile contenere il costo di investimento e di gestione di un generico reattore ad un livello tale da essere competitivo sul mercato.

Le principali configurazioni geometriche studiate per implementare i foto-bioreattori su scala reale sono essenzialmente due:

- foto-bioreattori tubolari;
- foto-bioreattori a lamina piana.

I primi consistono in tubi trasparenti con elevata superficie specifica che possono essere sia orizzontali sia con inclinazione di 10-30° orientati a sud, sia verticali. Il sistema di miscelazione è meccanico ed il gas viene raccolto in una sezione specifica del reattore. I reattori a lamina piana, di contro, sono "scatole" trasparenti e rettangolari dallo spessore limitato (1-5 cm) che possono essere sia verticali sia inclinati. Definire univocamente vantaggi e svantaggi dell'una o dell'altra tipologia risulta prematuro a causa delle rarissime applicazioni su scala reale. In generale i foto-bioreattori a lamina piana presentano una elevata superficie esposta alla radiazione luminosa e, grazie alla loro semplicità costruttiva, sono particolarmente idonei all *scale-up*. I materiali di costruzione dei pannelli che costituiscono tali reattori sono abbastanza economici in quanto non devono essere sottoposti a lavorazioni spinte per definirne la forma. Gli eventuali inconvenienti riscontrabili da questi sistemi sono:

- richiesta di più unità reattoristiche a causa dei problemi strutturali a cui possono andare incontro;
- difficoltà nel controllo della temperatura (può variare passando da una porzione di superficie del pannello ad un'altra);

• sporcamento e fouling.

I reattori tubolari risultano più vantaggiosi in termini di compattezza del sistema, offrendo un certo agio nel trasporto e nella messa in opera. Gli esperimenti in scala di laboratorio condotti su reattori tubolari hanno mostrato interessati potenzialità del sistema in termini di produttività di idrogeno per unità di superficie illuminata (Adessi et al. 2012) arrivando a valori di *Hydrogen Production Rate* di 5.89 L/(m² d). La sperimentazione citata si avvale di un reattore tubolare di 50 L (lunghezza 2 m, diametro interno 4.85 cm) inoculato con una coltura pura di *R. palustris* operante in condizioni *outdoor*. Il collo di bottiglia si riscontra nel momento in cui si vuole implementare il sistema su scala reale. Infatti, l'incremento del diametro del tubo va a ridurre drasticamente la superficie specifica illuminata del reattore e causa un effetto-ombra nella parte bassa del tubo ostacolando l'intercettazione della radiazione luminosa da parte dei pigmenti dei batteri. Per la risoluzione di questo problema è necessario predisporre un appropriato sistema di miscelazione, con lo scopo di distribuire uniformemente i microrganismi e la luce. In linea di massima, i principali limiti sono:

- impegno planimetrico non trascurabile;
- difficolta nel controllo della temperatura.

I foto-bioreattori sono, ad oggi, una tecnologia di nicchia che necessita di studi più approfonditi per la definizione dell'optimum costruttivo, operativo ed economico. I *goals* futuri sono indirizzati preferenzialmente al perfezionamento del sistema di irradiazione della luce, elemento chiave per avvicinarsi alla definitiva fattibilità economica incrementando le prestazioni del processo. L'assist, in questo caso, viene fornito dall'utilizzo della radiazione solare come input energetico del sistema. Questa condizione operativa, *outdoor*, è ancora in fase di miglioramento in quanto riscontra non pochi problemi, tra cui:

- bassa efficienza di conversione della luce (1%);
- possibile foto-inibizione (intensità troppo elevata della radiazione a mezzogiorno);
- incostante disponibilità di luce a causa di aleatorietà meteorologiche.

3.1 Fonti luminose

Come già detto, l'irradiazione della coltura microbica rappresenta un elemento chiave del processo di foto-produzione di bio-idrogeno. Questa evidenza scientifica ha concentrato

l'attenzione dei ricercatori su due questioni significative: i sistemi di distribuzione della luce e le fonti energetiche luminose adottabili.

Si riporta lo spettro di assorbimento tipico dei batteri PNS (Figura 1.8).



Figura 1.8: Spettro di assorbimento dei batteri PNS (Adessi et al.2014)

I batteri PNS sono dotati di pigmenti in grado di assorbire selettivamente la radiazione incidente: da un lato i carotenoidi (*, nella precedente Figura) assorbono principalmente la radiazione con lunghezza d'onda tra 450 e 500 nm, dall'altro le batterioclorofille (**) assorbono radiazioni di 590 nm nel visibile e tra 800 e 880 nm nel vicino infrarosso. Fornire alle cellule batteriche radiazioni in grado si essere intercettate ed assorbite dai loro pigmenti è *la conditio sine qua non* per la sintesi di ATP e la generazione di H₂. Le fonti di energia luminosa adoperabili possono essere sia artificiali sia naturali. Per le fonti di luce artificiali, si usano solitamente lampade al tungsteno in quanto il loro spettro di emissione è congruente con lo spettro di assorbimento dei batteri. Questa tipologia di lampade emette anche nel vicino infrarosso, zona in cui si osserva il massimo assorbimento da parte delle batterioclorofille.

La difficoltà che in assoluto frena l'utilizzo di queste lampade su scala reale, è il costo eccessivo che influisce negativamente sull'analisi costi-benefici del sistema. La soluzione più conveniente per la realizzazione di foto-bioreattori su scala reale, quella che rende il processo di foto-fermentazione effettivamente sostenibile, è l'utilizzo della radiazione che naturalmente incide sul nostro pianeta: la radiazione solare. Si riporta lo spettro di emissione del sole nella figura seguente:





Il sole libera energia sotto forma di onde elettromagnetiche e presenta un comportamento simile a quello di un corpo nero che si trova alla temperatura di 5500 K. Il sole emette buona parte delle radiazioni nel campo del visibile (400-800 nm) ed una piccola parte nel vicino infrarosso; si può dimostrare che il sole emette il 99% della propria radiazione nel campo di lunghezze d'onda che va da 0 a 3µm. Tale spettro di emissione è coerente con lo spettro di assorbimento dei batteri foto-fermentativi. L'intuibile svantaggio che deriva dall'utilizzo della radiazione solare come input energetico dei processi di foto-fermentazione, sta nella variabilità intrinseca dell'intensità luminosa del sole, la quale può comportare sia una variabilità nell'Hydrogen Production Rate del sistema, sia fenomeni di foto-inibizione. L'idea di numerosi autori è stata quella di accoppiare le due antitetiche fonti luminose con lo scopo di mitigare le problematiche derivanti dal singolo utilizzo dell'una o dell'altra. Chen et al., partendo dalla questione riguardo variabilità giornaliera della radiazione solare, hanno considerato, in uno studio sperimentale del 2008, un sistema che rifornisse di luce artificiale il reattore nel momento in cui quella naturale non fosse disponibile o fosse scarsamente disponibile. Per ovviare, invece, al problema della foto-inibizione causata da elevate intensità luminose, è sufficiente munire il reattore di uno schermo atto a ridurre l'intensità della radiazione che lo attraversa.

3.2 Parametri di efficienza

I parametri di efficienza di cui normalmente si tiene conto per valutare le prestazioni di fotobioreattori sono:

- efficienza di conversione della luce (Light Conversion Efficiency LCE);
- efficienza di conversione del substrato (Substrate Conversion SC);

• efficienza energetica netta (Net Energy Rate - NER).

L'efficienza di conversione della luce in un processo di produzione di idrogeno per via fotofermentativa è definita come l'energia stoccata in termini di idrogeno prodotto per unità di energia luminosa assorbita e varia da microrganismo a microrganismo.

$$LCE(\%) = \frac{Energia \ libera \ della \ totalità \ di \ idrogeno \ prodotto}{Energia \ luminosa \ totale \ incidente \ sulla \ coltura} \times 100$$

Miyake e Kawamura hanno riportato una formula utilizzata sovente dalla grande maggioranza degli autori.

$$\eta (\%) = \frac{33.61 \times \rho_{H_2} \times V_{H_2}}{I \times A \times t} \times 100$$

dove n rappresenta l'efficienza di conversione della luce, 33.61 Wh/g è l'energia specifica dell'idrogeno, ρ_{H_2} è la densità dell'idrogeno (g/L), V_{H_2} è il volume dell'idrogeno prodotto (L), I è l'intensità luminosa (W/m²), A è l'area esposta alla radiazione (m²) e t è la durata del processo (h). Il massimo teorico dell'efficienza fotochimica dei batteri PNS è del 10%. Nella pratica sperimentale, in condizioni controllate indoor ed avvalendosi di una coltura pura Rhodobacter spheroides, è stata raggiunta una efficienza di conversione della luce del 6%. In condizioni outdoor l'efficienza massima raggiunta non ha superato l'1.5%. Per incrementare l'efficienza di conversione della luce e, allo stesso tempo, il tasso di produzione di idrogeno, si è pensato di modificare geneticamente i batteri fotosintetici eliminando i pigmenti meno performanti per la produzione di H₂; in questo modo si va contemporaneamente a ridurre il denominatore della precedente relazione e ad incrementare il numeratore di LCE. I pigmenti sono molecole capaci di assorbire selettivamente (ad una determinata lunghezza d'onda) la radiazione luminosa; studi scientifici hanno dimostrato che alla lunghezza d'onda di 860 nm sono richiesti 11 fotoni per generare una molecola di H₂ (Miyake et al., 1998), di contro alla lunghezza d'onda di 522 nm sono richiesti tra i 14-15.8 fotoni per generare la stessa molecola di H₂ (Akkerman et al., 2002). Questi dati evidenziano un fatto non trascurabile: non tutte le lunghezze d'onda offrono la stessa efficienza per la produzione di idrogeno e quindi non tutti i pigmenti sono egualmente performanti. Con la manipolazione genetica, dunque, si tende ad eliminare quei pigmenti che intercettano le lunghezze d'onda che, a parità di energia fornita al sistema, non conducono alla produzione di idrogeno.

L'efficienza di conversione del substrato è il rapporto percentuale tra la quantità di idrogeno ottenuta dalla foto-conversione del *feedstock* e la quantità di idrogeno deducibile dalla stechiometria in maniera del tutto teorica.

$$SC(\%) = \frac{mol H_2 ottenute}{mol H_2 teoriche} \times 100$$

L'efficienza energetica netta di un sistema è definita come il rapporto tra l'energia totale prodotta (in termini di idrogeno) e l'energia richiesta dall'impianto (miscelazione, pompaggio, elettricità ecc).

$$NER = \frac{\sum Energia \ prodotta}{\sum input \ energetico}$$

L'obiettivo attuale della ricerca è quello di ottenere un NER > 1 apportando una serie di migliorie all'intero sistema, in primis aumentando l'efficienza di conversione della luce.

3.3 Migliorie atte ad intensificare la produzione di H₂

Per migliorare le *performances* dei sistemi volti alla produzione di bio-idrogeno, è possibile apportare una serie di migliorie che possono essere sia intrinseche del processo foto-fermentativo sia legate alle componenti abiotiche (pH, temperatura, ecc). I batteri fotosintetici PNS sono capaci di convertire in idrogeno molecolare gli elettroni e i protoni generati dalle reazioni di ossido-riduzione che coinvolgono i composti organici e l'acqua, grazie all'enzima nitrogenasi ed utilizzando come fonte energetica la luce. I molteplici pathway metabolici intraprendibili dai batteri a seconda delle diverse condizioni al contorno, sono stati resi noti solo nel 2004 anno in cui è stata pubblicata (Larimer et al.) la prima sequenza genomica di un batterio rosso non sulfureo, *Rhodopseudomonas palustris* ceppo CGA009. La conoscenza di tale sequenza ha condotto la ricerca verso nuovi approcci operativi che consistono nella manipolazione genetica delle specie batteriche coinvolte nel processo di produzione di bio-idrogeno proprio per incrementare il rendimento di termini di H₂ generato. Le possibili migliorie apportabili al sistema tramite la manipolazione genetica dei batteri foto-fermentativi sono:

- riduzione dell'attività dell'enzima *uptake* idrogenasi responsabile del consumo di H₂;
- repressione della sintesi di PHB: l'energia disponibile viene investita esclusivamente nella produzione di idrogeno e non nel percorso metabolico competitivo che porta all'accumulo di PHB;
- alterazione dell'apparato fotosintetico: estensione del campo di lunghezze d'onda più efficienti in grado di essere assorbite dai pigmenti ed estensione della soglia di fotoinibizione grazie all'utilizzo di una minore quantità di pigmenti.
- ottenimento di un maggiore livello di tolleranza nei confronti dell'ossigeno e di altre condizioni abiotiche avverse.

4. ACCUMULO DI PHB

4.1 Pathway metabolico alternativo

I batteri PNS, oltre a produrre idrogeno molecolare attraverso i meccanismi descritti precedentemente, sono anche in grado di stoccare, all'interno del proprio citoplasma, polyidrossibutirrato (PHB) sotto forma di granuli intracellulari; questo composto viene accumulato come riserva di carbonio da metabolizzare nel momento in cui si presentano condizioni di stress fisiologico. La produzione combinata di idrogeno molecolare e PHB potrebbe diventare una pietra miliare nell'ambito delle tecnologie ecosostenibili in grado di sfruttare energeticamente fonti rinnovabili o materiali di rifiuto a scopo industriale. Khatipov (1998), in uno studio molto dettagliato, ha mostrato, insieme al suo team scientifico, come nella specie *Rhodobacter sphaeroides* al variare delle combinazioni di diversi substrati azotati e carboniosi, variassero i percorsi metabolici seguiti: le due alternative chimiche del metabolismo batterico su cui si è focalizzata l'attenzione degli autori sono da un lato il rilascio di idrogeno, dall'altro l'accumulo di PHB. L'accumulo di PHB e la produzione di idrogeno molecolare sono pathway competitivi (nei confronti della distribuzione di energia e di elettroni) che hanno lo scopo di consumare il potere riducente in eccesso, per cui si verificano quando la crescita della biomassa non è stazionaria. Gli esperimenti sono stati condotti su una coltura pura di Rhodobacter sphaeroides tenuta in condizioni sterili ed anaerobiche a 5000 lux con un pH iniziale di 6.8. Diversi acidi organici (lattato, piruvato, acetato) e glucosio sono stati utilizzati come fonti di carbonio; per quanto riguarda la fonte di azoto, le prove di laboratorio sono state condotte sia in condizioni di disponibilità di azoto (o in forma di ammonio ovvero in forma di glutammato), sia in condizioni in cui l'azoto è limitante nel terreno di coltura. I risultati forniti evidenziano come per una coltura pura di Rhodobacter sphaeroides RV la presenza di ammonio nel terreno di coltura incentiva l'accumulo di PHB (in condizioni di nutrient starvation) a scapito della produzione di idrogeno molecolare che risulta, invece, inibita già per basse concentrazioni di NH₄⁺. Questo aspetto della ricerca lascia scorgere un imponente interesse applicativo nel panorama del trattamento delle acque reflue. Nel caso di crescita sull'ammonio, la fonte di carbonio che meglio si presta all'accumulo di PHB è l'acetato (40% del peso secco della cellula), mentre gli altri substrati considerati nello studio comportano un accumulo piuttosto basso (tra il 5 e il 10%). In generale, considerando tutte fonti di azoto vagliate dagli autori, l'acetato è il substrato più vantaggioso in termini di accumulo di PHB. L'utilizzo di glutammato come unica fonte di azoto nel terreno di coltura riduce drasticamente l'accumulo del biopolimero all'interno della cellula batterica ma va ad intensificare la produzione di idrogeno molecolare. Si riporta una tabella riassuntiva dei risultati ottenuti da tale studio:

FONTE DI AZOTO	FONTE DI CARBONIO	DRY CELL WEIGHT g/l	CONTENUTO PHB (% DRY CELL WEIGHT)
	Acetato	2.5	40%
$\mathbf{NH_4}^+$	Lattato	3	< 5%
	Piruvato	2.5	< 5%
	Glucosio	1.5	$\leq 10\%$
	Acetato	1.5	30%
N FREE MEDIUM	Lattato	1.8	10%
	Piruvato	2	$\leq 10\%$
	Glucosio	2	5%
	Acetato	1.5	20%
GLUTAMMATO	Lattato	3	5%
	Piruvato	3	5%

Tabella 1 4: accumulo di PHB con diverse combinazioni di fonti di azoto e carbonio

La lettura dei dati sperimentali dello studio citato, evidenzia un fatto rilevante: immagazzinare una riserva di carbonio in forma di bio-polimeri ed evolvere bio-idrogeno sono *pathways* in competizione, quindi, per ottimizzare entrambi gli effetti benefici derivanti dal metabolismo batterico è necessario realizzare un processo a doppio stadio in cui si prescrivono condizioni di *nutrient starvation* nel secondo step. Uno studio di questo tipo è stato condotto dall'équipe italiana M. Vincenzini et al. (1997), che in un esperimento a doppio stadio in regime idrodinamico batch ha monitorato il metabolismo di una coltura pura di *R. palustris* inizialmente in un medium in cui l'azoto fosse limitante (primo step); dopo 96 ore è avvenuto il trasferimento in un ambiente di reazione privo di fosfati. Questa suddivisione del processo ha comportato una elevata crescita della biomassa ed una predominante produzione di idrogeno nella prima fase con conseguente bassa quantità di PHB in termini di percentuale del peso secco della cellula (minore del 3%); nel secondo step, invece, la crescita della biomassa è risultata più lenta (fase stazionaria) e la produzione di idrogeno è calata rovinosamente favorendo l'accumulo di PHB. I risultati ottenuti dallo studio citato evidenziano come un

processo così costituito possa essere effettivamente adatto al trattamento di acque reflue caratterizzate da un rapporto N/P non ottimale.

4.2 Poly- β - idrossibutirrato

I poly-β-idrossibutirrato, comunemente indicati con l'acronimo PHB, sono dei biopolimeri stereoregolari sintetizzati da una grande varietà di ceppi batterici come accumulo di carbonio o di energia. I PHB appartengono alla classe dei poliesteri noti come Poly3-idrossialcanoati (PHA), che costituiscono una potenziale alternativa biodegradabile alle termoplastiche derivanti dal petrolio. Questi sono in grado di sostituire i polimeri di origine petrolchimica in quanto presentano caratteristiche simili a quelle delle plastiche convenzionali (come polipropilene) senza avere effetti collaterali nei riguardi dell'ambiente; infatti possono essere degradati abbastanza velocemente (3-9 mesi) da microrganismi in grado di secernere l'enzima PHA depolimerasi e trasformati in acqua ed anidride carbonica. Tra i PHA, il biopolimero PHB è senza dubbio il più studiato; si tratta di un omopolimero, composto, quindi, soltanto da monomeri di 3-idrossibutirrato (3HB). Questo materiale presenta da un lato un elevato grado di cristallinità, dall'altro una limitata lavorabilità (in quanto si degrada ad una temperatura leggermente superiore rispetto a quella del punto di fusione) e scarse caratteristiche meccaniche essendo relativamente rigido e fragile. Questi inconvenienti possono essere superati interrompendo la matrice di PHB e incorporando ulteriori monomeri, come 3idrossivalerato (3HV) o 4-idrossibutirrato (4HB) oppure 5-idrossivalerato (5HV). Ciò si traduce in copolimeri con proprietà simili a quelle dei materiali più avanzati, promuovendo quindi l'utilizzo di questo materiale biodegradabile e rendendone possibile l'impiego per un'ampia gamma di applicazioni.

4.3 Interesse commerciale dei poly-idrossialcanoati.

In generale i vantaggi indiscutibili che hanno incentivato la ricerca nei confronti dei PHA sono riportati di seguito:

- termoplasticità: sono costituiti da catene monomeriche lineari o poco ramificate per cui aumentando la temperatura raggiungono uno stato viscoso facilmente modellabile; possono essere quindi lavorati con varie tipologie di attrezzature per ottenere forme diverse;
- biodegradabilità: caratteristica tipica dei composti polimerici di origine biologica che vengono inizialmente sintetizzati dai batteri e poi nuovamente degradati grazie
all'azione di particolari enzimi; questa caratteristica rende l'utilizzo di questi composti compatibile con le nuove esigenze di controllo della qualità ambientale;

- biocompatibilità: sono state evidenziate in alcuni studi applicazioni in campo medico per la fabbricazione di protesi o dispositivi chirurgici (Koller et al., 2009);
- chiusura del bilancio del carbonio: i processi di combustione degli idrocarburi coinvolti nella produzione delle materie plastiche convenzionali creano uno squilibrio all'interno del ciclo del carbonio, in quanto viene prodotta molta più anidride carbonica rispetto a quella che viene utilizzata implicando grossi problemi ambientali come l'effetto serra. L'impiego di PHA comporta, nel loro campo di applicazione, una condizione di equilibrio del ciclo del carbonio; inoltre i biopolimeri provengono da fonti rinnovabili e non dipendono dalla disponibilità di combustibili fossili;
- fragilità ed elasticità: sono entrambe proprietà importanti dei materiali; la tendenza a
 rompersi facilmente e la facilità di deformarsi sotto l'azione di una forza applicata e di
 riacquistare la sua forma originale al venir meno dell'azione imposta, sono proprietà di
 grande interesse ai fini industriali.

L'interesse crescente nei riguardi dell'estrazione dei PHB dalla cellula batterica è da ascrivere alle problematiche di matrice ambientale derivanti dall'utilizzo delle plastiche convenzionali. La plastica, in pochi decenni, grazie alle sue caratteristiche meccaniche, chimiche, alla versatilità, al basso impegno energetico per la lavorazione ed al modesto valore economico, ha soppiantato quasi del tutto materiali come vetro, carta, legno e metallo in qualsiasi tipo di applicazione domestica o industriale. Lo svantaggio principale relativo all'utilizzo smodato di materiali plastici è l'inquinamento che ne deriva. Una prima forma di inquinamento è da ricercare nella sua origine; infatti la plastica è una sostanza organica che si ottiene dalla lavorazione di materie prime di varia origine presenti in natura. La maggior parte delle plastiche è ricavata prevalentemente dagli idrocarburi, come il carbone, ma soprattutto dal petrolio. Attraverso un processo chiamato "*cracking*" si ottiene la rottura delle lunghe catene delle molecole di idrocarburi, per poter creare gli elementi di base della plastica che sono i monomeri. Nel processo successivo di polimerizzazione i monomeri vengono riaccorpati per formare di nuovo delle lunghe catene che hanno, ognuna, differenti caratteristiche di base a seconda dei monomeri utilizzati.

La policondensazione è un altro processo usato per creare la plastica, dove si ottengono i polimeri sottraendo le molecole di "scarto" che si formano durante la reazione dei monomeri. È dunque evidente che l'iter di generazione della plastica è affetto da un grave problema di inquinamento dovuto in primo luogo all'estrazione, trasporto e stoccaggio degli idrocarburi; in seguito il processo di lavorazione del petrolio e della trasformazione in plastica comporta l'emissione di gas nocivi per la salute e per l'ambiente; a questi si aggiungono i residui della produzione, di stoccaggio e smaltimento. L'ultima, ma non trascurabile, fase di inquinamento indotto dalla plastica si riscontra quando essa ha terminato la sua vita utile; infatti la maggior parte delle plastiche non è biodegradabile (se non in centinaia di anni) per cui viene accumulata nell'ambiente provocando un impatto negativo non indifferente. In questo contesto i traguardi tecnologici ed economici che si stanno raggiungendo nei riguardi dell'utilizzo di bio-plastiche (PHA) mirano ad inserire un ulteriore tassello nell'intricato mosaico dello sviluppo sostenibile.

CAPITOLO 2 : MATERIALI E METODI

Il presente lavoro di tesi è stato condotto avvalendosi di sperimentazioni in scala di laboratorio atte a quantificare sia la produzione di idrogeno sia l'accumulo di PHB ottenibili dalla foto-conversione di un substrato sintetico rappresentativo di un effluente di dark-fermentation, tramite una coltura mista di batteri rossi non sulfurei. Le prove sono state condotte in doppio in reattori con regime idrodinamico batch ed in condizioni indoor. Sono stati monitorati, ogni 2 giorni, per i singoli reattori, il quantitativo di gas prodotto, il pH, la concentrazione di acidi grassi volatili all'interno del medium, la crescita della biomassa batterica, la concentrazione di PHB.

1. CARATTERISTICHE DEI REATTORI FOTO-FERMENTATIVI

I foto-bioreattori utilizzati nel corso degli esperimenti sono, essenzialmente, bottiglie in vetro borosilicato trasparente Simax (Repubblica Ceca) del volume complessivo di 500 ml. Tuttavia, il volume utile ai fini sperimentali è pari a circa 400 ml ed è costituito da:

- terreno di coltura sintetico;
- inoculo batterico.

La chiusura ermetica dei rettori, necessaria al mantenimento delle condizioni anaerobiche, è stata realizzata mediante l'utilizzo di tappi a vite. Ogni tappo è stato preventivamente forato con lo scopo di realizzare una via di comunicazione tra l'ambiente interno del reattore e quello esterno, in modo da poter effettuare i prelievi liquidi e gassosi per le dovute analisi. In particolare, sono stati realizzati due fori con l'ausilio di un trapano con punta da 3 mm. Successivamente sono stati inseriti, all'interno di ogni foro, due deflussori (tubicini trasparenti di plastica deformabile) dal diametro leggermente superiore a 3 mm. Su ciascun tubicino è stata posta una valvola apri/chiudi. I due tubicini sono stati utilizzati l'uno per il prelievo del biogas e l'altro per il prelievo dei campioni liquidi. Per sigillare gli spazi vuoti eventualmente presenti tra connettori e fori, è stata utilizzata la 100% colla della Pattex sia sul lato interna del tappo sia su quello esterno. La colla in questione ha garantito una tenuta eccellente per tutta la durata della sperimentazione (Figura 2.1).



Figura 2.1: da sinistra: tappo a vite, tappo a vite perforato e deflussori, tappo sigillato

Ciascun reattore è stato posizionato su uno stirrer (agitatore) magnetico con il quale è possibile garantire, mediante l'utilizzo di un'ancoretta metallica inserita nel reattore, l'agitazione continua della miscela inoculo/substrato/terreno di coltura. La velocità di agitazione è stata mantenuta a 250 giri al minuto per tutta la durata delle sperimentazioni. In Figura 2.2 è rappresentata la postazione dei reattori.



Figura 2.2: postazione dei bio-reattori

Si riporta una tabella con le caratteristiche fisiche principali dei reattori.

0 cm^3
1.44 cm^3
5
netica

Le condizioni anaerobiche all'interno di ogni singolo reattore sono state indotte tramite flussaggio con Argon per 20 minuti.

2. CONDIZIONI AMBIENTALI

I reattori sono stati mantenuti a temperatura ambiente riscontrando variazioni sia giornaliere, sia dovute all'alternarsi del giorno e della notte. Le sperimentazioni infatti sono state effettuate tra metà Settembre e Marzo. Nei mesi invernali la temperatura media riscontrata durante il giorno è stata pressoché costante (25°C) grazie al condizionamento termico del laboratorio. Durante la notte, invece, la temperatura è calata, talvolta, drasticamente. Tuttavia, lo spazio di alloggiamento dei reattori, non ha risentito eccessivamente di queste escursioni termiche grazie al modesto calore prodotto dalle lampade previste per fornire energia luminosa. Vista la forte richiesta di energia luminosa da parte dei batteri foto-fermentativi, sono state posizionate, tra i reattori, 10 lampade al mercurio da 22 watt, disposte su 5 file. L'illuminazione è stata mantenuta costante a 4000 lux per tutta la durata delle prove provvedendo alla sostituzione delle lampade al termine della loro vita utile.

3. METODOLOGIE DI MISURA

3.1 Sistema di misura del gas

La misura del gas prodotto, è stata effettuata avvalendosi di un metodo volumetrico, il quale consiste nell'assumere che il volume di gas prodotto, raccolto in un cilindro di misura e completamente riempito di un liquido, sia pari al volume di liquido che abbandona il cilindro stesso.



Figura 2.3: Sistema di misura del gas

Il principio di funzionamento di questo sistema di misura del gas è abbastanza semplice: il gas presente nel bioreattore all'apertura del regolatore viene convogliato mediante un deflussore all'interno di un cilindro contenente una soluzione con HCl (0.1 molare); ciò impedisce che la CO₂ prodotta dal processo foto-fermentativo possa solubilizzarsi, garantendo quindi che la composizione del biogas non venga alterata. Il gas si accumula nella parte alta del cilindro, prendendo il posto del liquido che così viene spinto in un altro cilindro in plastica graduato. Il volume di liquido che viene letto è pari a quello del biogas prodotto.

Il processo di espulsione del liquido si esaurisce al raggiungimento delle condizioni di equilibrio tra la pressione interna al reattore e quella atmosferica esterna.

Sull'estremità superiore del sistema di misura vi è un tappo, sul quale si sono stati realizzati due fori per permettere l'inserimento di due tubicini di plastica; uno viene collegato al bioreattore, l'altro costituisce il mezzo attraverso il quale è possibile prelevare il gas prodotto, che utilizzando una siringa da 20 ml munita di deflussore e valvola apri/chiudi, consente la raccolta del biogas. Il tappo dell'estremità inferiore del cilindro, invece, presenta un unico foro in cui viene alloggiato un tubo di plastica con valvola di non ritorno finale, attraverso la quale può passare il liquido durante la misurazione del biogas. Anche in questo caso su entrambi i tappi è stata applicata della colla per garantire l'ermeticità del cilindro onde evitare l'ingresso dell'aria e quindi la compromissione della misura.

Il campione di gas prelevato viene sottoposto ad analisi gas-cromatografica per valutarne la composizione in termini di H_2 , O_2 , N_2 , CH_4 e CO_2 .

3.2 Analisi del gas mediante cromatografia

La cromatografia è una tecnica che permette la separazione di vari componenti costituenti una miscela. Questo risultato si ottiene sfruttando l'attitudine che ogni molecola o ione della miscela possiede del distribuirsi tra due diverse fasi: una fase stazionaria e una fase mobile. Una specie chimica depositata sulla fase stazionaria e immessa nella corrente di fase mobile si distribuisce dinamicamente tra le due fasi, in misura proporzionale alla diversa affinità che possiede per esse. La fase stazionaria può essere costituita da un solido o un liquido opportunamente supportato. Allo stesso modo, la fase mobile é costituita da un fluido che si muove sopra la fase stazionaria e che può essere un liquido o un gas.

La classificazione fondamentale dei metodi cromatografici si basa proprio sulla natura della fase mobile: se si tratta di un liquido si parlerà di cromatografia liquida, se si tratta di un gas si parla di cromatografia gassosa o gas-cromatografia.

La Gascromatografia (GC) è la tecnica utilizzata per la determinazione della composizione del gas durante la sperimentazione effettuata.



Fig. 2.4: Schema funzionale di un gascromatografo

Un sistema gascromatografico schematicamente consta di:

- una bombola di carrier gas, munita di riduttori di pressione;
- un gascromatografo propriamente detto, con un ulteriore regolatore di flusso, un sistema di introduzione del campione, una o più colonne ed uno o più detector;

• un'interfaccia che collega il gascromatografo a un software per la gestione, l'elaborazione e l'immagazzinamento dei dati.

Per l'esecuzione delle analisi è stato utilizzato il gascromatografo STAR 3400 della Varian, riportato in Figura 2.5, equipaggiato con colonne impaccate. In tal caso, la fase stazionaria viene impaccata all'interno di un tubo metallico avvolto a spirale e di lunghezza variabile fino a 10 metri. Il carrier, in questo caso argon, attraversa la colonna portando gli analiti immessi nel sistema attraverso la fase stazionaria impaccata nella colonna stessa. Le analisi vengono condotte in regime di programmazione di temperatura, da effettuarsi mediante riscaldamento dell'aria all'interno della camera in cui è contenuta la colonna, al fine di velocizzare la fuoriuscita dei componenti nella parte finale del cromatogramma.

Il cuore del gascromatografo è rappresentato dalla colonna. Il gas cromatografo utilizzato, riportato in figura, è dotato di una colonna Shin Carbon ST (Restek Corporation), la quale permette l'analisi della composizione del gas tramite un setaccio molecolare, soluzione ideale per separare gas e composti altamente volatili.



Figura 2.5: Gas-cromatografo

L'output dell'analisi cromatografica è il cromatogramma il quale è caratterizzato dalla successione dei vari picchi, in quanto ogni sostanza in uscita dalla colonna genera un segnale che viene registrato sotto forma di 'picco'.

Il cromatogramma si presenta come in Figura 2.6, sulle ordinate é riportata la risposta del rivelatore e sulle ascisse i tempi di detenzione delle varie sostanze.



Figura 2.6: esempio di cromatogramma

Ogni picco è caratterizzato da:

- altezza del picco. È la distanza fra il massimo del picco e la sua base, misurata perpendicolarmente all'asse dei tempi.
- ampiezza del picco. È il segmento delimitato sulla base del picco dai punti di intersezione delle tangenti tracciate nei punti di flesso di ambedue i lati.
- tempo di ritenzione. È il tempo impiegato tra l'iniezione del campione e la registrazione del massimo del picco. Esso dipende dalla natura della sostanza, dalla colonna e dalle condizioni operative, per cui il riconoscimento delle componenti gassose avviene mediante il confronto del tempo di ritenzione dei vari picchi con il tempo di ritenzione delle sostanze standard di riferimento;
- area del picco. È la superficie delimitata dal contorno del picco e la linea di base. Essa dipende dalla quantità di sostanza in uscita e dalle caratteristiche del rilevatore, ed è perciò fondamentale per le analisi quantitative, in quanto la concentrazione delle sostanze rilevate avviene sulla base del confronto delle aree dei picchi con la curva di taratura delle sostanze standard.

3.3 Prelievo campioni liquidi

È stata effettuata l'estrazione di campioni per la misura dei VFA, a giorni alterni. Per il prelievo della miscela dal reattore si utilizzano le comuni siringhe monouso da 10 ml (Figura 2.7) ed alcuni elementi in gomma che permettono di collegare la siringa ad uno dei due deflussori che fuoriescono dal tappo. Immediatamente prima della fase di prelievo, il reattore è stato agitato, non troppo bruscamente, in modo che la biomassa si distribuisse più uniformemente nel terreno di coltura. Quindi è stata collegata la siringa al tubicino, ribaltata la bottiglia e aperto il regolatore. La quantità liquida prelevata è stata di circa 4 ml. I campioni sono stati conservati in provette monouso (Eppendorf) in polipropilene da 2 ml, opportunamente sigillate con parafilm e conservati in freezer.

Le siringhe e gli elementi in gomma sono stati lavati di volta in volta con acqua distillata dopo l'utilizzo.



Figura 2.7: Prelievo del liquido

3.4 Preparazione campioni HPLC

Prima di essere analizzati mediante cromatografia liquida, i campioni devono subire una serie di "pretrattamenti" per evitare che la colonna dello strumento (High Pressure Liquid Cromatography) si intasi a causa delle particelle presenti nel campione. La preparazione del campione da sottoporre a cromatografia si articola nelle seguenti fasi:

- centrifugazione;
- diluizione;
- filtrazione con filtro da 0.45 µm;
- filtrazione con filtro da 0.2 µm;
- trasferimento nelle vials.

Una volta prelevati i campioni liquidi dai reattori e opportunamente inseriti nelle Eppendorf, a mezzo di una centrifuga Mikro 22R della Hettich per 5 minuti a 14000 rpm è stata svolta la fase di centrifugazione dei campioni. La centrifuga utilizzata è riportata in Figura 2.8.



Figura 2.8: A) Centrifuga; B) campioni da centrifugare; C) campioni centrifugati

In questo modo la biomassa viene separata dal substrato e resta accumulata sul fondo e la parte liquida del campione può essere analizzata, effettuando le opportune diluizioni, al fine di garantire il rispetto dei *range* di concentrazioni delle curve di taratura (10-500 mg/L).

Nella prima fase della sperimentazione, i campioni sono stati diluiti 1:2 in quanto le concentrazioni iniziali dei differenti composti organici risultavano superiori al range di funzionamento dell'apparato sperimentale preposto all'analisi; successivamente non è stata effettuata alcuna diluizione.

Dopo tale trattamento il surnatante deve essere nuovamente trasferito in una Eppendorf pulita tramite siringa da 1mL ed opportunamente filtrato. La filtrazione è la fase più importante in questo pretrattamento e si articola in due *steps* successivi. Nel primo step si utilizzano filtri da 0.45 micron, nel secondo da 0.2 micron. I filtri utilizzati sono riportati in Figura 2.9.



Figura 2.9: filtri da 0.45 e 0.2 micron

Il campione così ottenuto, viene trasferito nelle *vials* (Figura 2.10) e successivamente è stato inserito nel campionatore dell'HPLC per essere iniettato ed analizzato.



Figura 2.10: vials

3.5 Analisi HPLC di VFAs

Per la determinazione degli acidi grassi volatili, rappresentati dalla formula generale R-COOH (dove R rappresenta un atomo di idrogeno, nel caso dell'acido formico, oppure un gruppo alchilico del tipo $CH_3(CH_2)_n$.), si è utilizzata la cromatografia in fase liquida a pressione elevata (High Pressure Liquid Cromatography, HPLC).

I principi di base di tale tecnica sono analoghi a quelli della gascromatografia precedentemente descritti. Si tratta di una tecnica cromatografica che consente la separazione di due o più composti presenti in un solvente sfruttando la diversa attitudine tra una fase stazionaria, posta in colonna, ed una fase mobile liquida che scorre al suo interno. Maggiore è l'affinità della sostanza con la fase stazionaria e maggiore è il tempo che impiega la sostanza a percorrere la colonna. Il prodotto finale, elaborato dal software Chromeleon, è un cromatogramma che permette di relazionare le aree dei picchi alle concentrazioni dei diversi componenti delle miscele analizzate.

Anche in questo caso, in perfetta analogia alla GC, i parametri del cromatogramma sono:

- tempo di ritenzione t_R: è il tempo necessario perché una certa sostanza attraversi la colonna e sia rilevata. Dipende dal grado di affinità che la sostanza stessa ha nei riguardi della fase stazionaria (espressa come si è detto dai coefficienti di adsorbimento, di ripartizione, di distribuzione in genere);
- l'area del picco. L'identificazione dei picchi delle sostanze contenute nelle miscele si effettua, con i necessari adeguamenti, con gli stessi metodi impiegati nella GC.

In Figura 2.11 viene mostrata l'apparecchiatura HPLC volta alla quantificazione dei VFAs. Tale strumento è costituito da 3 parti principali: involucro contenete colonna impaccata, lampada, auto-campionatore.



Figura 2.11: HPLC per VFAs. Da sinistra: auto-campionatore, colonna impaccata,lampada

3.6 Analisi HPLC dell' etanolo

Per alcune prove è stato utilizzato come substrato iniziale etanolo. La quantificazione del consumo di etanolo all'interno dei reattori è stata effettuata utilizzando un altro HPLC, il cui funzionamento è completamente analogo a quello descritto in precedenza. La differenza sta nella tipologia di colonna utilizzata. In questo caso, infatti, la colonna utilizzata è una Aminex CX-87H (Bio-Rad) per acidi organici e alcoli. In Figura 2.12 è riportata la postazione dell'HPLC utilizzato per a misura dell'etanolo.



Figura 2.12: HPLC per VFAs. Da sinistra: auto-campionatore, colonna impaccata, detector.

3.7 Misura della crescita della biomassa

La misura della crescita della biomassa è stata effettuata considerando la variazione nel tempo della concentrazione di solidi sospesi totali (TSS, Total Suspended Solids).

Con il termine Solidi Sospesi Totali si intendono tutte quelle sostanze non disciolte, presenti nel campione da esaminare, che vengono trattenute durante un processo di filtrazione a vuoto. Sono stati misurati i TSS relativi ai campioni prelevati nel momento in cui si sono state riscontrate condizioni di stazionarietà nella crescita batterica, in modo da poter rilevare la concentrazione finale di biomassa e descrivere l'andamento della crescita batterica.

Le apparecchiature utilizzate per la determinazione dei TSS sono:

- apparecchio per la filtrazione sottovuoto;
- filtri con porosità 0.45 μm;
- tara di vetro per filtri;
- essiccatore;

- bilancia analitica;
- stufa munita di termostato capace di mantenere la temperatura costante.

La procedura prevista dal manuale "Standard Methods", prevede il lavaggio dei filtri preliminarmente alla filtrazione del campione. Tuttavia, essendo stati utilizzati filtri sigillati, si è ritenuta superflua questa fase. I passaggi preliminari alla filtrazione a vuoto sono stati i seguenti:

- pesa tara;
- pesa tara + filtro.

Successivamente è stata eseguita la filtrazione a vuoto del campione (10 mL) utilizzando l'apparecchiatura riportata in Figura 2.13.



Figura 2.13: Sistema di filtrazione e filtri da 0.45 μm prima e dopo la filtrazione a vuoto

In seguito, il complesso filtro + tara è stato direttamente collocato in forno per qualche ora alla temperatura di 105°C in modo da eliminare l'umidità eventualmente presente. I contenitori estratti sono stati collocati nell'essiccatore (Figura 2.14), fino al raggiungimento del loro peso costante, determinato, infine, utilizzando la bilancia analitica.



Figura 2.14: Filtri in uscita dal forno

La misura della crescita della biomassa è stata effettuata relazionando la misura effettuata dei TSS con la misura dell'assorbanza tramite spettrofotometria. La misura dell'assorbanza è stata effettuata con cuvette da 4 mL, riempite con 2 mL di campione opportunamente diluito, agitate e introdotte in uno spettrofotometro (Photolab Spektral, WTW). Questo strumento (Figura 2.15) misura la quantità di luce o di energia radiante che viene diffusa dalla soluzione presente nella provetta, ottenendo così una misura del grado di torbidità del campione esaminato. Il cammino ottico del raggio emesso dallo strumento percorre la provetta contenete il campione per leggere, infine, il valore della radiazione residua a valle dell'attraversamento di quest'ultima. Lo strumento è tarato, prima di effettuare le analisi, alla specifica lunghezza d'onda del campo visibile o ultravioletto ottimale, ovvero quello per cui non siano presenti assorbimenti molecolari nel campione in esame (nel caso specifico si è scelta una lunghezza d'onda di 660 nm). La relazione che esiste tra assorbanza e solidi sospesi totali è stata ricavata effettuando opportune diluizioni al campione finale (relativo alla fase di crescita stazionaria



Figura 2.15: Spettrofotometria

dei batteri). Per ogni campione diluito sono stati misurati i TSS ed la Optical Density(660), in modo da ottenere due rette di calibrazione di cui tali parametri rappresentano l'ordinata e l'ascissa rispettivamente. La retta in rosso è rappresentativa di bassi valori di concentrazione della biomassa, quella in blu dei valori alti.



Figura 2.16: Rette di calibrazione per la quantificazione della crescita della biomassa

3.8 Misura del pH

All'atto del prelievo di campioni dai reattori, è stato di volta in volta misurato il valore del pH, per verificare che si mantenesse entro un range pari a 6.5-7.5, ottimale per l'attività dei batteri PNS.

Il pH è la misura del livello di acidità o di alcalinità di una determinata soluzione. Il suo valore si determina mediante indicatori o con strumenti di misurazione digitale. Secondo la definizione chimica, esso rappresenta il logaritmo negativo in base dieci della concentrazione di ioni idrogeno:

$$pH = -\log[H_3O^+]$$

La percezione dell'acidità o della basicità di una sostanza dipende quindi dalla quantità di protoni (H⁺) che questa sostanza possiede. In altre parole, un'elevata concentrazione di protoni sta ad indicare un pH molto acido mentre, al contrario, una soluzione dal pH alcalino presenta una bassissima concentrazione di protoni.

Durante la sperimentazione, è stato utilizzato un pH-metro con elettrodo di misura ed elettrodo di riferimento dotato di sistema di rilevazione della temperatura. La misura del pH è influenzata dalla temperatura, in quanto questa modifica gli equilibri ionici in soluzione che sono in relazione con tale parametro. È per tale ragione che il pH-metro è dotato di una sonda della temperatura, in maniera tale da riferire sempre il pH alla temperatura alla quale è stato misurato.

La calibrazione dello strumento è stata effettuata prima di ogni set di misurazioni attraverso soluzioni tampone standard dal fissato valore di pH (4.01 e 7.00).



Figura 2.17: Iter di misurazione del pH

3.9 Misura dei PHB

L'analisi del PHB (poly-idrossi-butirrato) è stata effettuata attraverso una procedura descritta nel 2004 dal gruppo di ricerca guidato da Oehmen.

La procedura si articola in più fasi; la corretta quantificazione della concentrazione di PHB all'interno della cellula batterica non può prescindere dal corretto svolgimento di ognuna delle fasi descritte in seguito.

Fase 1: liofilizzazione nel campione.

La liofilizzazione è processo tecnologico che permette l'eliminazione dell'acqua da una sostanza organica con il minimo deterioramento possibile della struttura e dei componenti della sostanza stessa. Tale processo consiste nella disidratazione per sublimazione di prodotti previamente congelati in particolari condizioni di temperatura (< 0°C) e pressione (vuoto). I materiali utilizzati in questa fase preliminare sono stati:

- cuvette ;
- pipetta P1000;
- carta argentata.

Si utilizza una pipetta P1000 per prelevare 1 mL del campione che si vuole analizzare e lo si trasferisce in una cuvetta realizzata ad hoc per l'inserimento dei campioni all'interno del liofilizzatore. Tale cuvetta contenete il campione da liofilizzare (Figura 2.18), viene coperta con un ritaglio di carta di alluminio sul quale verranno realizzati con un ago tanti piccoli fori attraverso i quali uscirà l'acqua sublimata dal campione (Figura 2.19).



Figura 2.18: Preparazione dei campioni da liofilizzare



Figura 2.19: Copertura cuvette

Le cuvette così preparate vengono, poi, inserite all'interno del liofilizzatore CHRIST (Figura 2.20).



Figura 2.20: Liofilizzatore CHRIST

Il ciclo di liofilizzazione è suddiviso in 4 steps principali:

• congelamento: il campione viene congelato. In questo step la pressione è atmosferica e la temperatura del campione, monitorata grazie ad una sonda inserita all'interno di un campione TEST, scende fino a determinare il congelamento del campione. In questa fase si abbassa anche la temperatura del condensatore che arriva a -80°C circa;

- riscaldamento: la pompa a vuoto viene riscaldata. Questa fase è l'unica che ha una durata predefinita (20 min);
- asciugatura principale: è la fase principale del ciclo. La pompa viene azionata e crea il vuoto nella camera di liofilizzazione; il ghiaccio all'interno della cuvetta sublima grazie alle condizioni particolari di pressione e temperatura indotte nella camera. L'acqua sublimata si "attacca" al condensatore e ghiaccia attorno ad esso a causa della temperatura a cui si trova (circa 80°C). L'asciugatura principale dura fin quando tutta l'acqua è stata rimossa dai campioni. Tale durata varia soprattutto a seconda della quantità di campione da liofilizzare;
- asciugatura finale: affina la performance del ciclo di liofilizzazione. Tale fase deve durare al massimo 2 ore; la pressione, in questo caso, scende ancora di più arrivando a valori di 0.05 mbar.

Al termine di un ciclo di liofilizzazione il campione appare fioccoso e totalmente privo di acqua (Figura 2.21).



Figura 2.21: Campioni liofilizzati

Dopo aver liofilizzato i campioni, si procede alla disgregazione delle cellule batteriche ed alla reazione di metanolisi acida dell'estere condotta a 100°C per 2 ore. Il polimero viene scisso in tanti monomeri che verranno successivamente analizzati al GC-massa. Il solvente utilizzato per l'estrazione del PHB è stato il cloroformio.

Si riporta la procedura di estrazione del PHB:

- aggiunta al campione di 2 mL di cloroformio e 2 mL di metanolo acido la cui preparazione è descritta in Tabella 1;
- agitazione delle cuvette opportunamente chiuse per favorire il contatto tra i vari componenti della miscela;
- digestione per 2 ore a 100°C;
- raffreddamento delle cuvette in uscita dal digestore per 20 min;
- aggiunta di 1 ml di acqua ultrapura alla miscela per favorire la separazione delle due fasi (Figura 2.22);
- agitazione per 2 minuti tramite voltex;





Figura 2.22: Campioni prima (sopra) e dopo (sotto) la separazione delle due fasi

Preparazione metanolo acido con standard interno				
REAGENTE	QUANTITÀ PER LITRO			
Acido solforico al 96%	31.25 mL			
Metanolo	968.75 mL			
Acido benzoico (IST)	100 mg			

Tabella 2.1: Soluzione di metanolo acido

Dopo l'agitazione è necessario lasciar riposare per 30 minuti la miscela per garantire la separazione completa delle 2 fasi. La fase più leggera è costituita da acqua e metanolo acido, la fase con il peso specifico maggiore è costituita dalla fase organica.

La fase organica, contenente il prodotto di reazione, viene prelevata "bucando" il film liquido superiore con una pipetta Pasteur, per essere poi trasferita in una cuvetta contenete un sale anidro (sodio solfato anidro) per eliminare l'eventuale acqua presente nella fase organica. Il tutto viene poi agitato tramite voltex (Figura 2.23).



Figura 2.23: Da sinistra: prelievo fase organica, sodio solfato anidro, agitazione

Il campione viene poi prelevato dalla cuvetta con la pipetta Pasteur e viene trasferito nelle apposite *vials* con chiusura ermetica.

Si ottiene così il campione da analizzare al GC-MS, che rileva l'estere metilico dell'acido β idrossibutirrico.

Di tale campione, vengono prelevati 2 μL con una siringa da 10 μL da iniettare al GC-MS.

Calibrazione GC-MS

Prima di eseguire l'analisi quantitativa dei PHB contenuti all'interno dei vari campioni, è stato necessario calibrare il macchinario previa preparazione degli standard.

Gli standard preparati per la calibrazione sono stati 10, 50, 100, 250, 500, 1000. Per gli standard sono state preparate due diluizioni solide: 800x e 40x. La diluizione viene effettuata usando poly-idrossibutirrato commerciale (Sigma-Aldrich,Germania) ed un sale (magnesio solfato eptaidrato) inerte. La ricetta è riportata di seguito (Tabella 2.2)

Standard	Diluizione solida	Quantità (mg)
10	1600x	16
50	800x	40
100	800x	80
250	40x	10
500	40x	20
1000	40x	40

Tabella 2.2: Preparazione standard

La retta di calibrazione ottenuta è riportata in Figura 2.24.



Figura 2.24: Retta di calibrazione GC-MS

Tutte le analisi quantitative dei PHB sono state effettuate utilizzando il gascromatografo Agilent Technologies 6850 Network GC System associato ad un rilevatore selettivo di massa (Agilent Technologies 5973 Network) (Figura 2.25), seguendo l'impostazione del metodo EPA-8270D (US Environmental Protection Agency 2012b).



Figura 2.25: GC-MS

La separazione è stata raggiunta usando una colonna capillare Phenomenex Zebron ZB-SemiVolatiles avente lunghezza di 30 m, diametro interno di 0.25 mm e spessore del film di $0.25 \mu m$.

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è quello di quantificare la produzione di idrogeno e l'accumulo di PHB durante un processo di foto-fermentazione volto al trattamento di un effluente sintetico di dark- fermentation. L'inoculo utilizzato durante le sperimentazioni è stato prelevato da reattori contenenti una coltura mista di batteri rossi non sulfurei. Sono stati inoltre confrontati gli effetti derivanti dall'utilizzo di differenti fonti di azoto e di carbonio, utilizzando di volta in volta un terreno di coltura sintetico ad hoc.

La sperimentazione sono state condotte da metà settembre 2016 a fine marzo 2017; è possibile individuare diverse fasi in cui è stato suddiviso il lavoro svolto. In una fase preliminare si è provveduto alla riattivazione della biomassa batterica acquisita da reattori tenuti in laboratorio ed utilizzati in precedenti studi; successivamente la biomassa è stata testata in differenti condizioni di esercizio al fine di valutarne la resa in termini di quantitativo di idrogeno prodotto ed accumulo di PHB. In totale sono stati condotti 24 esperimenti in regime batch, ognuno dei quali ha avuto una durata dipendente dalla velocità di consumo del substrato, diversa a seconda delle condizioni sperimentali adottate. Nel seguente capitolo saranno descritte dettagliatamente le fasi della sperimentazione, il modo in cui sono state articolate ed i risultati a cui hanno portato.

1. FASE DI RIATTIVAZIONE DELLA BIOMASSA

Il primo mese di sperimentazione è stato devoluto completamente alla riattivazione della biomassa batterica.

La biomassa foto-trofica utilizzata, è stata prelevata da reattori tenuti in laboratorio in condizioni non sterili e sotto illuminazione artificiale. In particolare, i reattori da cui è stato prelevato l'inoculo iniziale sono stati 4, indicati per semplicità con le prime 4 lettere dell'alfabeto: A, B, C, D. Le caratteristiche fisiche di tali reattori, come si può osservare dall'immagine, sono differenti a due a due; i reattori A e C presentano una colorazione più vicina al rosso ed una densità del bulk liquido abbastanza elevata. Di contro, i reattori B e D mostrano un colore tendente al marrone ed il liquido è meno denso. Ognuna delle biomasse presenti nei 4 reattori in fase endogena, è stata testata, in doppio, in reattori da 500 ml contenenti acqua ultra pura, un substrato sintetico tale da conferire alla miscela un valore di COD pari a circa 3000 mg L⁻¹ e micronutrienti, per un totale di 8 prove. I reattori sono stati poi sottoposti ad un flussaggio di 20 minuti con Argon per garantire le condizioni anaerobiche. Di tali prove è stata monitorata esclusivamente la produzione quantitativa e

qualitativa dei gas ed il cambiamento di colore della miscela. Dopo 15 giorni di incubazione alcuni reattori hanno raggiunto una colorazione variabile tra il rosa e l'arancione chiaro (Figura 3.2), ed hanno iniziato a produrre piccole quantità di idrogeno. Vari test sono stati poi effettuati variando differenti condizioni (COD, quantità di azoto), ma i risultati ottenuti da queste prove non hanno mostrato alcun miglioramento delle performance del consorzio batterico in esame.



Figura 3.2: Test volti alla riattivazione della biomassa foto-trofica

Dopo circa 20 giorni di incubazione, uno dei due reattori inoculati con la biomassa B, ha mostrato una più spiccata propensione alla produzione di idrogeno ed una colorazione molto simile al rosso porpora. Per tale motivo, sono stati prelevati 5 mL di biomassa da questo reattore e sono stati inoculati in un ulteriore reattore (con caratteristiche identiche a quello di provenienza dell'inculo) per selezionare la biomassa ritenuta più performante. La biomassa inoculata ha mostrato, in pochi giorni, una certa capacità di adattamento che ha favorito non solo la produzione di idrogeno ma anche il raggiungimento di una colorazione molto vicina al rosso. Probabilmente, però, la scarsa densità della miscela rilevata all'interno di questo reattore ed il basso tenore dei TSS è stata conseguenza diretta del fatto che non è stato utilizzato un terreno di coltura ad hoc con tutti i micronutrienti necessari alla proliferazione batterica. La biomassa presente all'interno del reattore ha mostrato una modesta e costante produzione di gas con elevate concentrazioni di idrogeno, ma il contenuto di TSS si è mantenuto basso nonostante il colore rosso abbastanza evidente. A partire da questo reattore,

si è scelto di inoculare nuovamente la biomassa, attivando prove con un terreno di coltura adeguato alla crescita batterica già testato in precedenti studi.

Si riporta uno schema riassuntivo di questo primo step che consiste nella selezione della biomassa batterica più performante.



Figura 3.3: riattivazione della biomassa

2. FASE DI PERFEZIONAMENTO DELLE PERFORMANCE DELLA BIOMASSA SELEZIONATA

Il secondo step della sperimentazione è stato condotto inoculando 5 ml di biomassa attivata in reattori analoghi ai precedenti, sia in termini di volume sia di superficie specifica, ma con un terreno di coltura adeguato, atto a favorire la proliferazione microbica. Questa fase è stata concepita come molla tra la fase preliminare di riattivazione ed il raggiungimento delle condizioni ottimali del processo. Dalla prova F1, selezionata positivamente nella fase di riattivazione, sono nati due paralleli differenti attività sperimentali, incentrate sull'utilizzo di fonti di carbonio e di fonti azotate differenti. Da un lato si è voluto investigare il comportamento metabolico dei batteri foto-fermentativi utilizzando come substrato un mix di VFAs (acido acetico, acido butirrico, acido propionico), dall'altro, è stato sottoposto all'azione batterica etanolo. VFAs ed etanolo sono i principali componenti di un effluente di

dark-fermentation, da qui nasce il grande interesse applicativo del processo di fotofermentazione.

In questa seconda fase della sperimentazione, sono state condotte 6 prove, due con substrato il mix di VFAs e 4 con etanolo. Si riporta in una tabella il terreno di coltura utilizzato nei reattori, evidenziando, nella prima riga, il differente substrato utilizzato nell'ambito delle due attività sperimentali.

VFAs	ЕТОН		
Butirrato di sodio, 1.36 g Acetato di sodio triidrato, 1.073 g Acido propionico, 455 μL	Etanolo, 1.8 mL		
NaC ₅ NO ₄ H ₈ , Glutammato di sodio, 0.4 g/L			
MgSO ₄ .7H ₂ O, Solfato di magnesio eptaidrato, 200 mg/L			
Estratto di lievito, 300 mg/L			
$C_6H_5FeO_7$, Ferric citrate, 24.5 mg/L			
NaCl, Cloruro di sodio, 0.4 g/L			
K ₂ HPO ₄ , Fosfatomonoacido di dipotassio, 0.6 g/L			
KH ₂ PO ₄ , Fosfatobiacido di potassio, 3 g/L			
NaHCO ₃ , Bicarbonato di sodio, 0.7 g/L			
CaCl ₂ .2H ₂ O, Cloruro di calcio diidrato, 75 mg/L			

Tabella 1: terreno di coltura utilizzato (Bianchi et al., 2010)

A questo terreno di coltura sono stati aggiunti 10 mL/L di micronutrienti, in particolare è stata preparata una soluzione costituita da: ZnCl₂, 70 mg/L; MnCl₂ 4H₂O, 100 mg/L; H₃BO₃, 60 mg/L; CoCl₂ 6H₂O, 200 mg/L; CuCl₂ 2H₂O, 20 mg/L; NiCl₂ 6H₂O, 20 mg/L; NaMoO₄ 2H₂O, 40 mg/L; HCl (25%), 1 mL/L.

Le quantità dei diversi substrati sono state calcolate in modo da non variare l'input di COD nei reattori; nello specifico la quantità di etanolo da immettere nei reattori è stata valutata sommando le aliquote di COD equivalenti agli acidi somministrati nei reattori di confronto. I risultati ottenuti da queste prove non sono del tutto soddisfacenti in termini di produzione di idrogeno in quanto è stato necessario un maggiore adeguamento della biomassa alle nuove condizioni a cui è stata sottoposta. Rispetto alla situazione precedente, però, la biomassa ha mostrato una crescita molto più repentina; infatti, la *lag phase* osservata è stata appena di qualche giorno. Si riportano, nel seguito, i risultati più significativi ottenuti nel corso di questa fase cuscinetto.

2.1 Prove S1 ed S2

I reattori S1 ed S2 sono stati preparati avvalendosi di un terreno di coltura contenete un substrato sintetico costituito da un mix di VFAs rappresentativo di un effluente reale di dark-fermentation (Tabella 1). I due reattori rappresentano una singola prova, effettuata in doppio, la quale ha avuto una durata di 64 giorni. I bio-reattori S1 e S2 sono stati monitorati dal 12/12/2016 al 13/02/2017. Si riporta una tabella riassuntiva dei principali output dell'esperimento su cui si discuterà di seguito.

	S1	S2
Inizio prova	12/12/2016	
Fine prova	13/02/2017	
Substrato	VFAs	
Yields H ₂ (mL/L)	301.4	638.11
TSS (g/L)	1.07	0.97
PHB (mg/L)	465	378

Tabella 2: Caratteristiche S1 ed S2

Si riportano, inoltre, i risultati ottenuti.





Figura 3.4: Yields H₂

Dal grafico si può notare che i due reattori hanno presentato un comportamento abbastanza differente in termini di produzione di idrogeno. Il reattore S1, infatti, non ha prodotto idrogeno fino al giorno 47, per cui ha investito interamente il substrato e l'ATP ricavato dall'energia luminosa, nello sviluppo di reazioni anaboliche. Il reattore S2, di contro, ha iniziato a produrre idrogeno dopo 29 giorni e si è rivelato più efficiente in termini di Y_{H2} , tuttavia la pendenza della curva di produzione di idrogeno è minore in S2 rispetto ad S1, il che indica che il tasso di produzione di idrogeno (pendenza della curva) è piuttosto costante per la prova S1; al contrario, nella prova S2, si riscontrano periodi in cui la pendenza è minore e periodi in cui è maggiore.





Come si può notare dai grafici sopra raffigurati, la curva di crescita della biomassa segue un andamento piuttosto simile in entrambi i reattori; una fase iniziale di *lag* in cui la biomassa in questione si acclimata, una fase di crescita esponenziale, fino al trentesimo giorno ed una fase finale di stazionarietà. I valori di TSS a cui si arriva al massimo nelle due bottiglie sono leggermente diversi tra loro. Come già accennato in precedenza, nel reattore S1 si sono sviluppate maggiormente razioni anaboliche, infatti è stato raggiunto un valore di TSS più elevato rispetto a quello di S2; esattamente il contrario accade per la resa in termini di produzione di idrogeno.





Figura 3.6: PHB (mg/L)

I grafici relativi all'accumulo di PHB mostrano una certa alternanza tra periodi in cui i biopolimeri sono stati accumulati dalla cellula batterica e periodi in cui sono stati consumati come fonte di carbonio alternativa in condizioni di stress fisiologico. L'accumulo di PHB è iniziato per entrambi i reattori durante la fase esponenziale di crescita della biomassa in maniera piuttosto blanda. Pe il reattore S1 l'accumulo ed il consumo del biopolimero, è stato abbastanza stabile, mostrando un andamento piuttosto regolare. Il reattore S2, invece, mostra un andamento molto più frastagliato. È possibile evidenziare alcuni punti di interesse per la prova S2: in corrispondenza del periodo temporale che va dal giorno 29 al giorno 36, sono state osservate tre situazioni correlabili tra loro:

- inizio della fase stazionaria di crescita della biomassa;
- inizio produzione di idrogeno con una rate elevata;
- consumo di PHB.

Nei primi 30 giorni, all'interno del reattore, si sono sviluppate principalmente reazioni anaboliche; il substrato è stato in parte convertito in nuova biomassa ed in parte accumulato in forma di PHB. Il rilascio di cataboliti (in primo luogo idrogeno) è iniziato dal giorno 29 in poi. Probabilmente, l'evoluzione di H₂ è stata possibile sia grazie al consumo di PHB sia grazie al consumo della restante parte di substrato non investita nella proliferazione batterica. Il consumo della riserva di PHB può essere legato, come accennato, a condizioni di stress fisiologico della biomassa, soprattutto a causa di fenomeni di *self-shading* dovuti alla concentrazione piuttosto elevata di solidi sospesi totali.

2.2 Prove E1, E2, E4, E5

La seconda attività sperimentale su cui è stata improntata la sperimentazione, riguarda l'utilizzo di etanolo come fonte di carbonio per i microrganismi. In questa fase preliminare alla attivazione di prove definitive, sono state effettuate due prove in doppio E1-E2 ed E4-E5. Nei primi due reattori è stato testato un terreno di coltura con una quantità maggiore di micronutrienti rispetto ai 10 mL/L utilizzati in precedenti studi (Bianchi et al., 2010); in particolare si è pensato di rifornire maggiormente il medium di elementi cardine per la sintesi ed il funzionamento dell'enzima nitrogenasi (in primis ferro e molibdeno) ciò non ha portato a risultati soddisfacenti. La produzione di idrogeno è risultata inibita dalle elevate concentrazioni di metalli in tracce, tutto il substrato consumato è stato investito nella proliferazione batterica (TSS > 1.5 g/L), ma non sono disponibili dati riguardo l'accumulo di PHB. Le prove E4-E5, realizzate con il terreno di coltura descritto in Tabella 1, hanno fornito ottimi risultati in termini di produzione di idrogeno (unico output monitorato). Le prove sono state attivate il 21/12/16 e terminate il 1/03/17. La durata totale dell'esperimento è stata di 70 giorni. Si riporta una tabella riassuntiva (Tabella 3) con le caratteristiche principali dei reattori in questione.

	E4	E5
Inizio prova	21/12/2016	
Fine prova	1/03/2017	
Substrato	ETOH	
Yields H ₂ (mL/L)	1125	1604
TSS (g/L)	0.77	0.88
PHB (mg/L)	N.D.	N.D.

Tabella 3:caratteritiche reattori E4 ed E5

Si riportano, inoltre, i risultati relativi al monitoraggio del biogas ottenuti.



Figura 3.7: Yields H₂

I reattori E4 ed E5 hanno mostrato caratteristiche confrontabili tra loro, come si può notare dal grafico relativo alla produzione di gas; entrambi i reattori hanno presentato una produzione nulla nei primi 8 giorni. In entrambi i reattori, il tasso di produzione di idrogeno si è rivelato, nella fase iniziale, piuttosto elevato fino al giorno 26. Successivamente la pendenza della curva di produzione è diminuita, ciò si traduce in un decremento della *rate* di produzione di H_2 che si è mantenuta all'incirca costante fino al termine delle prove. Per quanto riguarda la quantità di idrogeno prodotta, il reattore E5 si è mostrato più performante raggiungendo valori di 1.6 L H_2/L (è stato prodotto il 30% di idrogeno in più rispetto ad E4). La produzione di idrogeno si è arrestata al giorno 60 per il reattore E4, mentre per E5 è continuata fino al giorno 70.



Figura 3.8: TSS

Anche riguardo la crescita della biomassa, i due reattori hanno mostrato un comportamento molto simile tra loro. La *lag-phase* è durata appena due giorni e dal secondo giorno è iniziata la fase esponenziale, la quale si è esaurita nell'arco di 20 giorni. Dopo tale fase è stata registrata una fase di crescita stazionaria durata fino al giorno di fine prova.


Figura 3.9: Consumo del substrato

L'analisi qualitativa del consumo di substrato, ha condotto a risultati non del tutto aspettati. In entrambi i reattori, la concentrazione di etanolo è diminuita drasticamente nell'arco di 40 giorni. Per il reattore E4, l'etanolo consumato nei primi 6 giorni è stato devoluto completamente alla crescita della biomassa in quanto non viene prodotto idrogeno e non si riscontra la presenza di sottoprodotti di reazione. Dal giorno 6 in poi sono state osservate, all'interno del medium, accumuli di VFAs, in particolare di acido acetico, acido propionico ed acido formico. Si è ipotizzato che, dal giorno 6, l'etanolo consumato sia stato completamente trasformato in acido acetico in quanto è stata riscontrata una corrispondenza tra la pendenza della retta di consumo di etanolo e quella di formazione di acido acetico. A favore di questa tesi, è possibile osservare che la formazione dell'acido acetico è concentrata maggiormente tra i giorni 6 ed 8; dal giorno 8 in poi si osservano, in modo alternato, incrementi e consumi dell'acido acetico, in più, è dal giorno 8 che inizia la produzione di idrogeno. In maniera più blanda, si osserva la formazione di altri sottoprodotti di reazione che sono principalmente acido propionico ed acido formico. L'etanolo, in questo reattore, si esaurisce completamente al giorno 50 e, in corrispondenza di tale data, non si registrano più incrementi della concentrazione dei sottoprodotti ma esclusivamente il loro consumo. Il consumo dei VFAs che si sono formati nel corso della reazione non è totale, nonostante la produzione di idrogeno

si sia arrestata. Quello che si osserva è un leggero incremento della concentrazione di TSS; probabilmente, i batteri presenti nel medium, inibiti dalla scarsa penetrazione della luce all'interno del reattore (di fatto sono stati osservati fenomeni di sporcamento sulla superficie) hanno iniziato a convertire lentamente il substrato in nuova biomassa. Un'altra ipotesi che può essere avanzata, è che i batteri foto-fermentativi siano stati completamente inibiti dall'assenza di luce, favorendo lo sviluppo di altre famiglie batteriche meno performanti. La situazione che si presenta per il reattore E5 è quasi del tutto analoga in termini qualitativi, ma vale la pena sottolineare che, in corrispondenza del giorno 40 la concentrazione di acido formico inizia a prevalere su quella dell'acetico. In realtà è stato osservato che le concentrazioni di acetico e formico sono quasi sempre in disaccordo tra loro. Non sono ancora del tutto chiari gli effetti derivanti da questa evidenza sperimentale. Nel caso del reattore E5, inoltre, il substrato è stato quasi totalmente utilizzato, questo si riflette in un quantitativo di idrogeno prodotto maggiore rispetto ad E4.

Volendo effettuare un confronto con i reattori S1 e S2, inoculati con a medesima biomassa ma contenenti un diverso substrato (VFAs), si nota che sia la crescita della biomassa, sia la produzione di idrogeno hanno avuto un tempo minore di avvio in E4 ed E5. Ciò può essere spiegato considerando il fatto che nel rattore da cui è stato prelevato l'inoculo (F1), il substrato era etanolo per cui, evidentemente, la biomassa si era specializzata maggiormente nella conversione di questo tipo di substrato, risultando più veloce.

3. PROVE DEFINITIVE

Le prove definitive sono state concepite con lo scopo di rendere ancora più performante la biomassa selezionata per le due differenti attività di ricerca. Sono stati inoculati, in nuovi reattori, 5 ml di liquido prelevati dalle prove che hanno mostrato risultati più soddisfacenti. In particolare, in questo step si è voluto testare la coltura mista in differenti condizioni fissando il substrato mix di VFAs essendo quest'ultimo particolarmente rappresentativo di un effluente di dark-fermentation. A tal proposito, sono state testate differenti fonti di azoto all'interno del terreno di coltura, amplificando ancora di più l'interesse scientifico della ricerca e l'applicabilità del processo nel campo di trattamento delle acque. A parità di concentrazione di azoto (0.04 g N/L) sono stati forniti al sistema tre diverse forme di N: acido glutammico, azoto ammoniacale e nitrato, tramite i composti e le quantità indicate in Tabella 4.

Tabella 4: fonti di azoto			
Composto Quantità			
Acido glutammico	$0.4~g~C_5H_9NO_4/L$		
Cloruro di ammonio	0.15 g NH ₄ Cl/L		
Nitrato di potassio	0.3 g KNO ₃ /L		

Tali prove hanno avuto risvolti molto interessanti ed hanno permesso l'affinamento delle conoscenze relative al metabolismo dei batteri PNS ed alla possibile applicabilità del processo in situazioni reali di trattamento di reflui industriali. La discussione dei risultati ottenuti in questa fase verrà effettuata seguendo lo stesso schema utilizzato in precedenza.

3.1 Utilizzo di differenti matrici azotate

Il *topic* relativo all'utilizzo di VFAs come substrato per il processo in esame (fotofermentazione), è stato ulteriormente scisso in più rami di ricerca. Sono state testate tre fonti di azoto differenti per valutarne gli effetti sul metabolismo batterico. Per ogni fonte di azoto vagliata è stata eseguita una prova in doppio come mostrato in Figura 3.10.



Figura 3.10: Test con differenti fonti di azoto

Tutte le prove sono state inoculate con la biomassa contenuta nel reattore S2, in quanto si è mostrata più performante. Per ogni prova in doppio verranno mostrati e commentati gli *output* della sperimentazione.

3.1.1 Prove con azoto in forma di nitrato: S3 e S4

La fonte di azoto utilizzata in questi reattori è nitrato, inserito all'interno del terreno di coltura tramite il composto KNO₃. Le prove sono state attivate il 23/1/2017 ed ultimate il 27/3/2017 per un totale di 63 giorni di sperimentazione.

Si riportano, in Tabella 5, le caratteristiche principali dei reattori S3 ed S4.

	S 3	S4
Inizio prova	23/1/2017	
Fine prova	27/03/2017	
Substrato	VFAs	
Fonte N	KNO ₃	
Yields H ₂ (mL/L)	133.26	1198
TSS (g/L)	0.84	0.76
PHB (mg/L)	166	150

Tabella 5: Caratteristiche reattori S3 e S4

Si riportano, inoltre, i grafici ottenuti:



Figura 3.11: Yields H₂

In termini di produzione di idrogeno, i due reattori hanno mostrato comportamenti abbastanza differenti tra loro. Il reattore S3 ha iniziato a produrre biogas a partire dal giorno 25 con una *rate* piuttosto elevata. La pendenza della curva che descrive la produzione di H₂ è ancora più elevata dal giorno 30 al giorno 32, raggiungendo il valore massimo mL/L di H₂. Da questo punto in poi, non si registra alcun incremento nella cumulata di H₂. Dal grafico si nota un altro punto di interesse in corrispondenza del giorno 37, in cui si registra un rilascio di azoto molecolare. Tale evidenza lascia scorgere una ulteriore potenzialità dei batteri foto-fermentativi, ossia quella di trasformare i nitrati in azoto molecolare tramite il ben noto processo di denitrificazione. Il comportamento del reattore S4 si è rivelato abbastanza differente in quanto la produzione di idrogeno è iniziata al giorno 21 ed è stata costante nel tempo fino a fine prova. Lo *yield* di H₂ raggiunto è molto più elevato rispetto al reattore S3, al contrario, la *rate* è stata molto più elevata con produzione impulsiva di idrogeno.



Figura 3.11: TSS e PHB

Si riportano (Figura 3.11) i grafici relativi alla crescita della biomassa batterica ed all'accumulo di PHB.

In termini di crescita della biomassa i due reattori hanno raggiunto un valore massimo abbastanza simile. La differenza sta nei diversi tempi di acclimatazione; nel reattore S3 è stata osservata una *lag phase* di 18 giorni, seguita da una fase di crescita esponenziale che si esaurisce nel giro di pochi giorni e poi si stabilizza. Infine la biomassa tende di nuovo a crescere dal giorno 25 al giorno 42, raggiungendo una fase di crescita stazionaria. Il reattore S4, invece, presenta una *lag phase* minore (11 giorni) ed una fase di crescita esponenziale che si protrae fino al giorno 32. Segue una fase stazionaria. L'accumulo di PHB, per entrambi i reattori, è iniziato durante la fase esponenziale di crescita della biomassa e la massima concentrazione raggiunta risulta confrontabile tra i due esperimenti. Per il reattore S3, al giorno 39 si registra un consumo di PHB da parte della biomassa devoluto probabilmente a reazioni di sintesi. Una situazione simile si riscontra nel reattore S4.





Figura 3.12: Consumo substrato

Dall'analisi dei campioni liquidi all'HPLC è possibile ricavare dati che rendono, probabilmente, più chiaro il quadro metabolico dei batteri foto-fermentativi nel momento in cui sono sottoposti a concentrazioni di nitrati non trascurabili. Il grafico relativo al consumo

di VFAs nel reattore S3 presenta alcuni punti chiave da cui è possibile dedurre alcune considerazioni. In primo luogo si può assumere che l'acido propionico, il quale viene consumato completamente entro il giorno 25, viene utilizzato metabolicamente dai batteri per effettuare reazioni di sintesi, in quanto, durante la sua degradazione, non è possibile osservare né produzione di idrogeno né accumulo di PHB. La curva di degradazione dell'acido acetico, d'altro canto, può essere suddivisa in tre parti. Inizialmente non è stata osservata alcuna variazione nelle concentrazioni di acido acetico, dal giorno 18 al giorno 23 la curva presenta una pendenza piuttosto bassa che lascia ipotizzare un lento consumo da parte della biomassa che investe totalmente questo substrato in crescita batterica in quanto, anche in questo caso, non si osservano ancora rilasci in termini di idrogeno o accumulo di PHB. Il giorno chiave è il 25esimo giorno; infatti, vi è la concomitanza di quattro eventi:

- rilascio di azoto molecolare ed idrogeno;
- proseguimento della crescita esponenziale della biomassa inibita;
- accumulo di PHB;
- veloce degradazione dell'acido acetico.

Nel corso della fase esponenziale di crescita della biomassa, in particolare al giorno 30, viene osservata una netta produzione di idrogeno con *rate* molto elevata. Tale evento è concordante con il repentino consumo di acido butirrico fin ora intonso. La degradazione dell'acido butirrico ha indotto reazioni anaboliche ma, principalmente, reazioni cataboliche (H₂). Un ulteriore punto chiave può essere identificato al giorno 37; infatti, vi è un nuovo rilascio di azoto molecolare (denitrificazione), con contestuale proseguimento dell'iter degradativo dell'acido butirrico e l'accumulo di PHB. Il *pathway* batterico in questa fase è stato, probabilmente, *shiftato* verso l'accumulo di PHB, anziché la produzione di H₂, a causa della condizione di stress indotta da fenomeni di *self-shading* derivanti dalla elevata concentrazione di TSS all'interno del medium.

In termini di consumo di VFAs, il reattore S4 ha mostrato un comportamento diverso in quanto essi vengono degradati in maniera più lenta e costante in accordo con la produzione di idrogeno. Anche in questo caso, dopo il periodo di acclimatazione della biomassa in cui nessun acido viene consumato, si evidenzia come l'acido propionico sia interamente devoluto alla crescita della biomassa batterica. Il consumo di acido acetico, ancora una volta, è scomponibile in tre curve con diversa pendenza: si osserva un primo tratto con pendenza nulla, un secondo tratto più acclive ed un terzo con pendenza più bassa. La situazione è in disaccordo con ciò che è stato osservato per il reattore precedente (escludendo il primo tratto).

Il consumo repentino di acido acetico che si osserva dal giorno 18 al giorno 32 porta principalmente alla formazione di nuova biomassa e di alcuni prodotti di sintesi (PHB). Dal giorno 32 in poi, oltre al consumo di acetico ormai blando, viene evidenziato un decremento piuttosto veloce della concentrazione di acido butirrico; il metabolismo batterico, ancora una volta, viene preferenzialmente incanalato verso il *pathway* che sfocia nell'accumulo di PHB. La *rate* di idrogeno più elevata si osserva tra il giorno 39 al giorno 49; in questo periodo vengono sia consumati acidi con *rate* piuttosto bassa, sia PHB. Probabilmente, la maggiore pendenza della curva riscontrata è diretta conseguenza del fatto che al giorno 39 è stata registrata una espulsione impulsiva di azoto molecolare.

È stato inoltre misurato il valore del pH il quale è variato in un intervallo che va da 6.62 a 7.77 per S3 e da 7.05 a 7.28 per S4.

3.1.2 Prove con azoto in forma di ammonio: S5 ed S6

La fonte di azoto utilizzata in questi reattori è ammonio, inserito all'interno del terreno di coltura tramite il composto NH₄Cl. Le prove sono state attivate il 23/1/2017 ed ultimate il 20/3/2017 per un totale di 56 giorni di sperimentazione.

Si riportano, in Tabella 6, le caratteristiche principali dei reattori S5 ed S6.

	S 5	S6
Inizio prova	23/1/2017	
Fine prova	20/03/2017	
Substrato	VFAs	
Fonte N	NH ₄ Cl	
Yields H ₂ (mL/L)	1054	1198
TSS (g/L)	0.82	0.82
PHB (mg/L)	272	317

Tabella 6: Caratteristiche reattori S5 ed S6

Si riportano i risultati ottenuti.



Figura 3.12: Yields H₂

Le evidenze riscontrabili dalla lettura dei grafici dei reattori contenenti azoto ammoniacale sono, in primo luogo, da individuare nel fatto che l'attivazione del consorzio batterico in termini di produzione di idrogeno, avviene al giorno 11 e 7 per i due reattori rispettivamente. La *rate*, nei due casi, risulta confrontabile, anche se nel caso del reattore S6 sembra leggermente più elevata e la produzione è terminata più velocemente.





Figura 3.13: TSS

La curva di crescita della biomassa presenta una lag-phase di circa 2 giorni in entrambi casi. Segue una fase di crescita esponenziale abbastanza lenta ed infine una fase stazionaria. Si può affermare, dunque, che nel caso in esame e nelle condizioni adottate durante la sperimentazione la biomassa foto-eterotrofa non soffre eccessivamente della presenza di azoto ammoniacale. La specializzazione della biomassa nei confronti della nuova fonte di azoto testata è molto più rapida rispetto al tempo di adattamento della medesima biomassa in presenza di nitrati. Si vuole sottolineare che, tra le due prove fin ora vagliate, l'unica variabile è la fonte di azoto somministrata alla biomassa, le altre condizioni sono le medesime. Riguardo l'accumulo di PHB, i massimi valori raggiunti da entrambi i reattori sono molto alti rispetto a quelli evidenziati in Figura 3.11 relativi alle prove sui nitrati. I risultati ottenuti da queste prove sono in conflitto con alcuni studi sperimentali: infatti nello studio s Yokoi et al.(1998) si definisce completamente inibente per la produzione di idrogeno una concentrazione di NH_4^+ pari a 2mM. Le prove eseguite in questa fase, sono state condotte con una concentrazione di circa 3mM e ciò ha influito ben poco sulla produzione di idrogeno (a parte nella breve fase iniziale). Inoltre, lo yield ottenuto in entrambi casi è piuttosto elevato. Anche altri test effettuati dal team di ricerca Khatipov et al.(1998) hanno evidenziato una produzione di idrogeno nulla per una coltura pura di R. sphaeroides coltivata in presenza di azoto ammoniacale.





Figura 3.14: consumo substrato

Il consumo di substrato da parte della biomassa batterica è confrontabile nei due reattori. L'acido propionico, come nelle precedenti prove sui nitrati, viene investito esclusivamente nella crescita della biomassa batterica. È stato inoltre misurato il valore del pH il quale è variato in un intervallo che va da 6.94 a 7.14 per S5 e da 7.01 a 7.24 per S6.

I risultati ottenuti in questa fase di sperimentazione offrono uno spunto di grande interesse per l'integrazione del processo di foto-fermentazione nell'ambito del trattamento di acque di scarico. Le concentrazioni di ammonio investigate sono paragonabili a quelle generalmente in ingresso ad un impianto di trattamento di acque reflue urbane; la risposta ottenuta sia in termini di produzione di idrogeno, sia in termini di produzione di PHB lasciano intravedere una non trascurabile opportunità economica. Il *topic* in questione necessita di un ulteriore *labor limae* volto alla massimizzazione dei vantaggi economici derivanti dal processo, come ad esempio l'utilizzo di una fonte naturale di energia luminosa.

La fonte di azoto utilizzata in questi reattori è azoto organico, inserito all'interno del terreno di coltura tramite il composto $C_5H_9NO_4$. Le prove sono state attivate il 25/1/2017 ed ultimate il 10/3/2017 per un totale di 56 giorni di sperimentazione.

Si riportano, in Tabella 7, le caratteristiche principali dei reattori S7 e S8.

	S7	S8
Inizio prova	25/1/2017	
Fine prova	10/03/2017	
Substrato	VFAs	
Fonte N	Glutamic Acid	
Yields H ₂ (mL/L)	780	1520
TSS (g/L)	1.17	0.73
PHB (mg/L)	301	243

Tabella 7: caratteristiche reattori S7 ed S8

Si riportano i risultati ottenuti:





Figura 3.15: Yields H₂

L'utilizzo di una fonte di azoto in forma organica ha condotto ad un progresso nelle performance della biomassa selezionata dal reattore S2, in quanto anche in questa prova preliminare, la fonte di azoto utilizzata è stata acido glutammico. I due reattori hanno avuto comportamenti alquanto differenti: in S7 vi è stata una predominanza di reazioni anaboliche rispetto alle reazioni cataboliche, difatti lo *yield* di idrogeno raggiunto è abbastanza basso mentre il valore di TSS (rappresentativo della concentrazione di biomassa) all'interno del terreno di coltura è risultato molto elevato 1.17 g TSS/L. Diametralmente opposto è stato l'esito degli esperimenti condotti sul reattore S8; lo *yield* di idrogeno raggiunto si è rivelato molto elevato paragonato sia al reattore S7 in parallelo sia ai reattori testati con differenti fonti di azoto. In questo caso, dunque, il substrato è stato prevalentemente convertito in cataboliti piuttosto che in nuova biomassa. Differenze sostanziali si riscontrano anche nella *rate* di H₂; infatti, la pendenza della curva che descrive la cumulata di idrogeno nel caso del reattore S8 è molto più elevata.





La *lag-phase* nel caso in esame è stata appena di due giorni; per il reattore S8 la curva di crescita della biomassa appare abbastanza regolare ed in successione si hanno le seguenti fasi

di crescita: *lag-phase*, esponenziale, stazionaria. Nel caso di S7, invece, sono stati osservati punti in cui la crescita batterica esponenziale viene interrotta per poi essere ripresa nel momento in cui la causa della possibile inibizione scompare. Per completare il quadro metabolico e poter fare delle supposizioni è necessario argomentare i grafici seguenti relativi al consumo dei VFAs.





Figura 3.17: consumo del substrato

Il reattore S7 presenta 2 punti singolari in cui vi è l'interruzione della fase di crescita esponenziale della biomassa. In particolare, al giorno 14 l'acido acetico è quasi del tutto trasformato, mentre il butirrico presenta concentrazioni confrontabili con quelle iniziali; vi è l'interruzione della crescita esponenziale della biomassa, probabilmente inibita da condizioni ambientali (probabile abbassamento della temperatura) dopodiché la biomassa eterotrofa consuma velocemente acido butirrico ed intraprende nuovamente la crescita esponenziale. Ciò è vero fino al giorno 26; in corrispondenza di questo punto gli acidi sono quasi totalmente consumati e la biomassa tende alla stazionarietà. Fortunatamente, concentrazioni non del tutto

trascurabili di PHB sono state preventivamente accumulate all'interno della cellula batterica, il consumo di questi prodotti di sintesi da parte dei batteri stessi comporta il proseguimento della fase di crescita esponenziale. La stazionarietà viere raggiunta il giorno 30. È necessario rimarcare come, anche in questo caso, l'acido propionico sia stato investito esclusivamente per la proliferazione batterica. Il reattore S8 presenta un andamento simile delle concentrazioni di acido propionico e acetico, ma l'acido butirrico viene consumato molto più lentamente. In entrambi i casi analizzati si formano alcuni sotto-prodotti, tra cui acido isovalerico ed acido citrico. La *rate* più elevata di H₂ si registra tra i giorni 19-21, in cui, il consumo dell'acido butirrico risulta più evidente. Dal giorno 21 in poi le due *rate,* rispettivamente di produzione e consumo, sono più basse ma comunque confrontabili tra loro. Il valore del pH misurato oscilla tra 7.16 e 7.33 per il reattore S7 e 6.8 e 7.33 per il reattore S8.

I risultati ottenuti a seguito dell'utilizzo di differenti fonti di azoto (nitrati, azoto ammoniacale ed azoto organico) sono di grande interesse applicativo; infatti la biomassa, dopo un certo periodo di acclimatazione variabile a seconda della fonte di azoto utilizzato, è stata capace di specializzarsi e di rilasciare in alcuni casi quantitativi di idrogeno molto elevati mostrando una non indifferente versatilità. Anche la sintesi di PHB, in particolare nel caso di azoto ammoniacale, è stata piuttosto rilevante. Il grande interesse applicativo che nasce da queste evidenze sperimentali necessita di ulteriori approfondimenti a partire dalla modellazione matematica dei *pathway* metabolici intrapresi dai batteri nelle diverse condizioni sopra descritte e dei parametri che maggiormente influenzano in processo.

3.2 Prove atte ad intensificare la produzione di H_2

Il secondo filone di ricerca su cui è stata posta l'attenzione è teso al miglioramento delle performance della biomassa batterica, inoculando 5 ml di liquido provenienti dal reattore E5 in un nuovo reattore con le medesime caratteristiche sia in termini di fonte di azoto (azoto organico) sia in termini di fonte di carbonio (etanolo). Sono stati realizzati due reattori identici (E6 ed E7) come nelle precedenti prove. I risultati ottenuti in questa fase sono stati molto soddisfacenti solo per uno dei due reattori (E7). I reattori sono stati attivati il 16/1/2017 e smantellati il 20/03/2017 per un totale di 63 giorni di sperimentazione. Le caratteristiche dei reattori E6 ed E7 sono riportate in Tabella 8.

	E6	E7
Inizio prova	16/1/2017	
Fine prova	20/03/2017	
Substrato	ETOH	
Fonte N	Glutamic Acid	
Yields H ₂ (mL/L)	216	1743
TSS (g/L)	1.27	0.82
PHB (mg/L)	130	N.D.

Tabella 8: Caratteristiche E6 ed E7

Il reattore E6 ha mostrato una resa in termini di produzione di idrogeno trascurabile ed una concentrazione di TSS molto elevata. Per tale motivo si è pensato di valutare quantitativamente il *pathway* alternativo alla produzione di H₂, ossia l'accumulo di PHB. Anche in questo caso i risultati ottenuti sono stati deludenti; probabilmente la biomassa ha utilizzato tutto il substrato disponibile per la sintesi batterica arrivando ad elevate concentrazioni di TSS nel terreno di coltura; ciò ha ostacolato la penetrazione della luce portando all'auto-inibizione del metabolismo batterico. Il reattore E7 è stato, invece, molto più performante in termini di produzione di idrogeno, arrivando a rese elevatissime. I risultati relativi alla prova E7 vengono mostrati e commentati di seguito.



Figura 3.18: Yield H₂



Figura 3.19: TSS

Sia la produzione di idrogeno, sia la crescita della biomassa, hanno mostrato un andamento abbastanza regolare. La produzione di idrogeno è iniziata il giorno 4 con una *rate* piuttosto elevata fino al giorno 21, dopodiché la pendenza della curva è leggermente diminuita. La curva di crescita della biomassa mostra una *lag-phase* di circa 1 giorno e, successivamente, una fase esponenziale che si esaurisce al giorno 21. Durante la fase esponenziale di crescita si è, quindi, osservato un tasso di produzione di idrogeno più elevato. Tale risultato è in accordo con il fatto che, durante la fase esponenziale di crescita, i batteri sono più performanti in quanto non sono inibiti dalla difficoltà di penetrazione della luce e consumano più velocemente il substrato somministrato.

CONCLUSIONI

Le indagini sperimentali oggetto del presente elaborato di tesi hanno condotto a risultati di notevole interesse, soprattutto nei riguardi delle applicazioni ingegneristiche derivanti dalla comprensione, il più possibile esaustiva, delle cinetiche biologiche coinvolte nell'ambito del processo di fotofermentazione operato da colture miste di PNSB. La possibilità di avvalersi di colture miste rappresenta un passo determinante per l'applicazione in scala reale di tale tecnologia. Le colture miste sono, generalmente, meno influenzate dalla competizione o invasione di specie microbiche naturalmente presenti nei reflui in trattamento, abbattendo notevolmente i costi relativi alle condizioni asettiche necessarie nell'esercizio di bioreattori con colture pure. L'ottenimento di performance produttive del tutto comparabili queste ultime, almeno in relazione alla produzione di idrogeno, rende questo studio, nonché l'intero campo di ricerca, argomento di estremo interesse. Gli spunti per ricerche future sono sicuramente innumerevoli e, senza dubbio, richiederanno competenze di gruppi di ricerca eterogenei capaci di cogliere le differenti sfaccettature legate all'utilizzo dei PNSB.

In conclusione, nell'ambito di questo lavoro di tesi è stata evidenziata la versatilità di tale biotecnologia soprattutto dal punto di vista dell'ingegneria ambientale, alternando fonti di carbonio e fonti di azoto differenti ed estremamente comuni nei reflui di differente origine; il fine ultimo è stato la valutazione dell'efficienza e dell'elasticità del processo di produzione di idrogeno e PHB a partire da substrati sintetici simulanti gli effluenti della dark fermentation.

Particolarmente rilevanti sono stati i risultati ottenuti dai test effettuati con differenti fonti di azoto inorganico: la biomassa, dopo un determinato periodo di inibizione temporanea, è stata capace di specializzarsi nell'utilizzo sia di NO_3^- sia di NH_4^+ , raggiungendo rese in termini di idrogeno molecolare prodotto del tutto inaspettate, soprattutto rispetto a quanto riportato nella letteratura scientifica di settore. L'accumulo di PHB è risultato particolarmente apprezzabile in alcuni casi, ad esempio nel caso di coltivazione della coltura mista a mezzo di NH_4^+ quale fonte di azoto. È stata sottolineata l'importanza di poter combinare il processo di dark-fermentation e quello di fotofermentazione nell'ottica della bioraffineria; a tal proposito vale la pena sottolineare l'incremento delle rese di idrogeno prodotto per via biologica utilizzando in maniera sistemica processi di dark-fermentation e photo-fermentation in serie. Infine, la possibilità di produrre in maniera combinata, piuttosto che alternativa, molecole dall'elevato valore aggiunto quali i PHB, rende il processo del tutto *ecofriendly* e senza dubbio di profondo rilievo sia dal punto di vista della ricerca scientifica sia da quello più ampio economico sociale.

BIBLIOGRAFIA

Miyake J. The science of biohydrogen. In: Zaborsky OR, editor. Biohydrogen. London: Plenum Press, 1998.

Miyake M, Sekine M, Vasilieva LG, Nakada E, Wakayama T, Asada Y, Miyake J. Improvement of bacterial light-dependent hydrogen production by altering the photosynthetic pigment ratio. In: Zaborsky OR, editor. Biohydrogen. London: Plenum Press, 1998.

Eroglu I, Aslan K, GVundVuz U, YVucel M, TVurker L. Continuous hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides O.U. 001. In: Zaborsky OR, editor. Biohydrogen. London: Plenum Press, 1998.

Fascetti E, Todini O. Rhodobacter sphaeroides RV cultivation and hydrogen production in a one-and two-stage chemostat. Appl Microbiol Biotechnol 1995.

Das D, Veziroglu T. Advances in biological hydrogen production processes. Int J Hydrogen Energy 2008.

Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. Int J Hydrogen Energy 2001.

Wang J, Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. Int J Hydrogen Energy 2009.

Hallenbeck PC, Benemann JR. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. Int J Hydrogen Energy 2002.

Chen C-C, Chuang Y-S, Lin C-Y, Lay C-H, Sen B. Thermophilic dark fermentation of untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. Int J Hydrogen Energy 2012.

Eroglu E, Eroglu I, Gunduz U, Turker L, Yucel M. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. Int J Hydrogen Energy 2006.

Eroglu I, Aslan K, Gu U. Substrate consumption rates for hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides in a column photobioreactor. Prog Ind Microbiol 1999.

Lee C-M, Hung G-J, Yang C-F. Hydrogen production by Rhodopseudomonas palustris WP 3-5 in a serial photobioreactor fed with hydrogen fermentation effluent. Bioresour Technol 2011.

Androga DD, Özgür E, Eroglu I, Gündüz U, Yücel M. Amelioration of photofermentative hydrogen production from molasses dark fermenter effluent by zeolite-based removal of ammonium ion. Int J Hydrogen Energy 2012.

Bianchi L, Mannelli F, Viti C, Adessi A, De Philippis R. Hydrogen-producing purple nonsulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). Int J Hydrogen Energy 2010.

De Philippis R, Ena A, Guastini M, Sili C, Vincenzini M. Factors affecting poly-bhydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in purple non-sulfur bacteria. FEMS Microbiol Rev 1992.

Vincenzini M, Marchini A, Ena A, De Philippis R. H2 and poly-b-hydroxybutyrate, two alternative chemicals from purple non sulfur bacteria. Biotechnol Lett 1997.

Akkerman I, Janssen M, Rocha J, Wijffels RH. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. Int J Hydrogen Energy 2002.

Levin DB, Pitt L, Love M. Bio-hydrogen production: prospects and limitations to practical application. Int J Hydrogen Energy 2004.

Basak N, Das D. Photofermentative hydrogen production using purple non- sulfur bacteria Rhodobacter sphaeroides O.U.001in an annular photobioreactor: a case study. Int J Hydrogen Energy 2009.

Levin DB. Re: biohydrogen production: prospects and limitations to practical application e erratum. Int J Hydrogen Energy 2004.

Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. H₂ production from starch by mixed culture of Clostridium butyricum and Rhodobacter sp M-19. Biotechnol Lett 1998.

H. Koku, I. Eroglu, U. Gunduz, M. Yucel, L. Turker, Aspects of the metabolism of hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides, International Journal of Hydrogen Energy (2002).

J.D. Holladay, J. Hu, D.L. King, Y. Wang, An overview of hydrogen production technologies, Catalysis Today (2009).

Meng Ni, Dennis Y.C. Leung, Michael K.H. Leung, K. Sumathy, An overview of hydrogen production from biomass, Fuel Processing Technology (2006).

Vincenzo Luongo, Anish Ghimire, Luigi Frunzo, Massimiliano Fabbricino Giuseppe d'Antonio

Francesco Pirozzi, Giovanni Esposito, Photofermentative production of hydrogen and poly-bhydroxybutyrate from dark fermentation products, Bioresource Technology (2017).

Montiel-Corona, V., Revah, S., Morales, M., 2015. Hydrogen production by an enriched photoheterotrophic culture using dark fermentation effluent as substrate: effect of flushing method, bicarbonate addition, and outdoor– indoor conditions. Int. J. Hydrogen Energy .

Adessi, A., De Philippis, R., 2014. Photobioreactor design and illumination systems for H2 production with anoxygenic photosynthetic bacteria: a review. Int. J. Hydrogen Energy.

Emir Khatipov, Masato Miyake, Jun Miyake, Yasuo Asada, Accumulation of poly-Lhydroxybutyrate by Rhodobacter sphaeroides on various carbon and nitrogen substrates, FEMS Microbiology Letters (1998).

Pankaj K. Rai, S.P. Singh bIntegrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement, in t e r n a t i o n a l journal of hydrogen energy (2016).

Shiladitya Ghosh, Umme Kulsoom Dairkee, Ranjana Chowdhury, Pinaki Bhattachary, Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using Purple Non-sulfur Bacteria (PNSB) – A review, Energy Conversion and Management (2016).

Pornpa Suriyamongkol, Randall Weselake, Suresh Narine, Maurice Moloney, Saleh Shah, Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review, Biotechnology Advances (2007).

Adrian Oehmen, Beatrice Keller-Lehmann, Raymond J. Zeng, Zhiguo Yuan *, J^{*}urg Keller, Optimisation of poly-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems, Journal of Chromatography (2005).

Eilert Hustede, Alexander Steinbiichel, Hans G. Schlegel, Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur purple bacteria, Appl Microbiol Biotechnol (1993).

Ilgi Karapinar Kapdan, Fikret Kargi *Bio-hydrogen production from waste materials, Enzyme and Microbial Technology (2006).

Alessandra Adessi, Giuseppe Torzillo, Enrico Baccetti a, Roberto De Philippis, Sustained outdoor H2 production with Rhodopseudomonas palustris cultures in a 50 L tubular photobioreactor, i n t e rna t i onal j o u r n a l o f hydrogen energy (2012).

Hidayet Argun, Fikret Kargi, Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview, i n t e r n a t i o n a l j ournal o f hydrogen energy (20 11).

Endam Ozkan, Basar Uyar, Ebru Ozgur, Meral Yucel, Inci Eroglu, Ufuk Gunduz, Photofermentative hydrogen production using dark fermentation effluent of sugar beet thick juice

in outdoor conditions, i n t e rna t i onal j o u r n a l o f hydrogen energy (2012).