



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea  
magistrale  
in Biotecnologie per  
l'ambiente e lo sviluppo  
sostenibile

Tesi di Laurea

# **Monitoraggio della comunità microbiologica durante un processo di fermentazione anaerobica di scarti vitivinicoli**

**Relatore**

Dott. Bessem Chouaia

**Correlatori**

Prof.ssa Cristina Cavinato

Dott.ssa Alice Lanfranchi

**Laureando**

Kevin Cigana

Matricola 846324

**Anno Accademico**

2021/2022

## Abstract

La tesi ha come oggetto di analisi lo studio delle comunità microbiche durante la co-fermentazione anaerobica di fecce rosse di vinificazione e fanghi attivi disidratati inoculati con fanghi attivi aerobici ispessiti provenienti da un impianto di trattamento delle acque reflue.

Per monitorare la comunità in questione, sono stati utilizzati approcci a coltura indipendente che richiedono il prelievo regolare di campioni dal bioreattore, l'estrazione del DNA dai campioni e sequenziamento. Le comunità microbiche sono state caratterizzate mediante sequenziamento del gene 16S rRNA e i dati così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi di bioinformatica per stimarne la diversità microbica attraverso l'alfa e beta diversità, determinando in seguito i possibili fattori ambientali che possono influenzarla.

I risultati ottenuti dal test di fermentazione nelle condizioni (no inoculo, inoculo e inoculo pretrattato) hanno dimostrato che gli scarti vitivinicoli possono essere convertiti in composti ad alto valore aggiunto come gli AGV e H<sub>2</sub>, con una resa di AGV pari a  $0,61 \pm 0,01$ ;  $0,64 \pm 0,02$  e  $0,83 \pm 0,06$  gCOD<sub>agv</sub>/gCOD<sub>in</sub> nelle tre condizioni testate, e una resa di H<sub>2</sub> pari a 3,17 mL di H<sub>2</sub>/gCOD. L'inoculo pretrattato non ha prodotto biogas restituendo però una maggior resa in AGV. L'idrogeno si è presentato al 40% del volume di biogas nella condizione "no inoculo".

L'analisi bioinformatica ha rivelato che tutti i campioni presentavano un'elevata biodiversità interna distribuita uniformemente. Il parametro ambientale che diversifica tutti i campioni è risultato essere la data di campionamento, con un valore di probabilità pari a 0,001. La composizione tassonomica presenta come phylum dominante *Firmicutes* con una percentuale che varia dal 70 al 90% in tutte le condizioni dopo l'avvio del test di fermentazione. Di questo phylum, il genere più abbondante è stato *Clostridium sensu stricto 1* presente con una percentuale che varia dal 40 al 70%, sempre dopo l'avvio del test. Per tutta la fermentazione si è osservato un processo di allungamento della catena degli AGV probabilmente dovuto alla crescita delle specie che rappresentano il genere *Clostridium sensu stricto 1*. In tutte le condizioni l'andamento della fermentazione non ha subito grosse differenze tra comunità batteriche. Infine, si è osservato che l'utilizzo dell'inoculo pretrattato e non, presenta possibili relazioni di cooperazione microbica più efficienti nel processo di produzione degli AGV rispetto all'utilizzare i soli substrati, a discapito però della produzione di H<sub>2</sub>.

## Sommario

Abstract .....	2
Elenco degli acronimi.....	5
<b>1 - Introduzione</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Bioeconomia ed economia circolare</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 Caso di studio: valorizzazione degli scarti vitivinicoli.....	9
<b>1.2 Digestione anaerobica</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Fermentazione anaerobica .....	13
<b>1.3 I bioreattori</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4 Biotecnologie ambientali ed ecologia microbica</b> .....	<b>20</b>
1.4.1 Approcci di analisi della comunità.....	21
1.4.2 Tecnologie di analisi .....	22
1.4.2.1 Approcci dipendenti/indipendenti.....	22
1.4.2.2 Evoluzione delle tecnologie molecolari.....	25
1.4.2.3 Principali approcci molecolari .....	26
1.4.3 Tecnologie di sequenziamento .....	29
1.4.3.1 Sequenziamento Illumina .....	30
1.4.4 Tecnologie per lo studio del microbioma .....	33
1.4.4.1 Concetto di OTU .....	34
<b>1.5 Scopo della tesi</b> .....	<b>35</b>
<b>2 – Materiali e metodi</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1 Caratterizzazione dei substrati e dell'inoculo</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2 Test batch di fermentazione anaerobica</b> .....	<b>37</b>
2.2.1 Fermentatore batch “Nautilus” .....	39
2.2.2 Rese.....	40
2.2.3 Metodi analitici .....	41
<b>2.2 Analisi microbiologiche</b> .....	<b>45</b>
<b>2.3 Analisi bioinformatica</b> .....	<b>45</b>
2.3.1 Metriche di stima della qualità dei dati.....	45
2.3.2 Procedura di analisi attraverso Galaxy Europe .....	46
2.3.3 Analisi ecologica dei dati mediante R .....	49
2.3.3.1 Preparazione dei dati.....	49
2.3.3.2 Calcolo dell'alfa diversità .....	50
2.3.3.3 Calcolo della diversità tassonomica .....	51
2.3.3.4 Calcolo della beta diversità.....	51
2.3.3.5 Stima dei taxa caratteristici .....	52
<b>3 – Risultati e discussioni</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1 Caratterizzazione substrati e inoculo</b> .....	<b>54</b>
<b>3.2 Test di fermentazione</b> .....	<b>55</b>
3.2.1 Produzione di AGV. ....	55

3.2.2	Produzione di biogas .....	58
<b>3.3</b>	<b>Discussione test di fermentazione .....</b>	<b>59</b>
<b>3.4</b>	<b>Analisi bioinformatica .....</b>	<b>60</b>
3.4.1	Risultati di Galaxy Europe .....	61
3.4.2	Risultati dell'analisi ecologica mediante R.....	62
<b>3.5</b>	<b>Discussione analisi bioinformatica.....</b>	<b>70</b>
<b>4 - Conclusione</b>	<b>.....</b>	<b>72</b>
<b>5 - Bibliografia</b>	<b>.....</b>	<b>74</b>

## Elenco degli acronimi

AGV	Acidi grassi volatili
LCFA	Acidi grassi a catena lunga ( <i>Long Chain Fatty Acids</i> )
H <sub>2</sub>	Idrogeno
CO <sub>2</sub>	Biossido di carbonio
COD	Domanda chimica di ossigeno
pCOD	Domanda chimica di ossigeno nel particolato
sCOD	Domanda chimica di ossigeno solubile
tCOD	Domanda chimica dell'ossigeno totale
TS	Solidi totali
TVS	Solidi totali volatili
HPLC	Cromatografia liquida ad alte prestazioni ( <i>High-performance liquid chromatography</i> )
OL	Carico organico ( <i>organic loading</i> )
HDPE	Polietilene ad alta densità ( <i>High-density polyethylene</i> )
TQ	Tal quale
F/M	<i>Food/microorganisms</i>

# 1 - Introduzione

I progressi nelle biotecnologie industriali ci portano a valorizzare le materie prime sulla base della loro disponibilità e sull'uso efficiente delle risorse in quanto, i cambiamenti climatici, la perdita di biodiversità e l'aumento della popolazione umana stanno guidando la transizione dall'economia basata sui combustibili fossili alla bioeconomia (Kircher 2020).

Valorizzare la biomassa di scarto nel processo di digestione anaerobica è una strategia utilizzata ormai da tempo, sebbene il prodotto principale, cioè il metano è un gas dal basso valore economico (Lee, et al. 2014).

L'idrogeno e gli AGV sono invece prodotti con un più elevato valore economico derivanti dal processo fermentativo. L' $H_2$  è oramai diventato il combustibile biologico più importante perché l'unico prodotto di scarto derivante dalla sua combustione è l'acqua e quindi non genera gas serra nocivi per l'ambiente (Jain, et al. 2022). Gli AGV invece, sono ampiamente applicati nella produzione industriale e nella vita umana, come ad esempio, l'acido acetico che è un noto additivo alimentare (Shi, et al. 2021).

Studiare i microrganismi coinvolti in questi processi permette di capire quelle che sono le loro migliori esigenze, in termini di sostanze da metabolizzare e condizioni operative per favorire la produzione di prodotti di interesse. I microrganismi in condizioni anaerobiche sono molto sensibili a variazioni di pH e temperatura, e per una loro produzione elevata, è importante mantenere le condizioni di stabilità del sistema. Essi nella biomassa di scarto, si presentano come consorzi microbici, instaurando condizioni di cooperazione nel degradare un certo substrato, oppure condizioni di competizione. Comprendere questi meccanismi di interazione porterebbe ad un miglioramento dell'efficienza nella fermentazione.

Grazie alla biologia molecolare, attraverso tecniche di sequenziamento ad alto rendimento, è possibile avere una panoramica della struttura delle comunità microbiche presenti nei bioreattori. Per una visualizzazione completa e semplificata delle comunità microbiche e le loro interazioni, è necessario utilizzare approcci di analisi bioinformatiche, capaci di estrapolare svariate informazioni di carattere ecologico, aiutando i ricercatori a stabilire le condizioni di crescita ottimali, favorendo soprattutto la crescita di microrganismi destinati al proprio scopo.

Tutti questi studi mirano ad un consumo efficiente delle risorse, attraverso l'uso sostenibile dei microrganismi per la salvaguardia del pianeta. Nel settembre 2015 è stato approvato dall'Assemblea Generale dell'ONU il programma di azione per le persone, il pianeta e la prosperità: L'agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile, proposto da 193 paesi membri delle Nazioni Unite per dare a tutti la possibilità di vivere in un mondo sostenibile dal punto di vista ambientale, sociale, economico (Agenzia per la Coesione Territoriale 2023). Uno degli obiettivi dell'Agenda 2030, è proprio quello di ridurre lo spreco delle risorse limitando il consumo e favorire le produzioni sostenibili.

## 1.1 Bioeconomia ed economia circolare

La bioeconomia impiega le risorse biologiche ambientali come base per la produzione di risorse biologiche rinnovabili, considerando la trasformazione di tali risorse e dei flussi di rifiuti in prodotti ad alto valore aggiunto come alimenti, mangimi, bioprodotto, biomateriali, bioenergia (Commissione Europea 2012). Essa è fortemente legata all' economia circolare, cioè quell'economia che rafforza l'efficienza delle risorse dei processi e l'utilizzo di materiali riciclati per ridurre l'uso di carbonio fossile aggiuntivo (incorporato nel materiale o emesso durante i processi di produzione/estrazione).

La bioeconomia, invece, sostituisce il carbonio fossile con carbonio rinnovabile da biomasse provenienti da agricoltura, silvicoltura e ambiente marino, compresi sottoprodotti e rifiuti (Carus e Dammer 2018).

Molti elementi della bioeconomia vanno oltre gli obiettivi dell'economia circolare, come gli aspetti incentrati sulla funzionalità del prodotto o del servizio (nuovi elementi costitutivi chimici, nuovi percorsi di lavorazione, nuove funzionalità e proprietà dei prodotti). Si tratta dunque di approcci diversi ma complementari. (Figura 1).

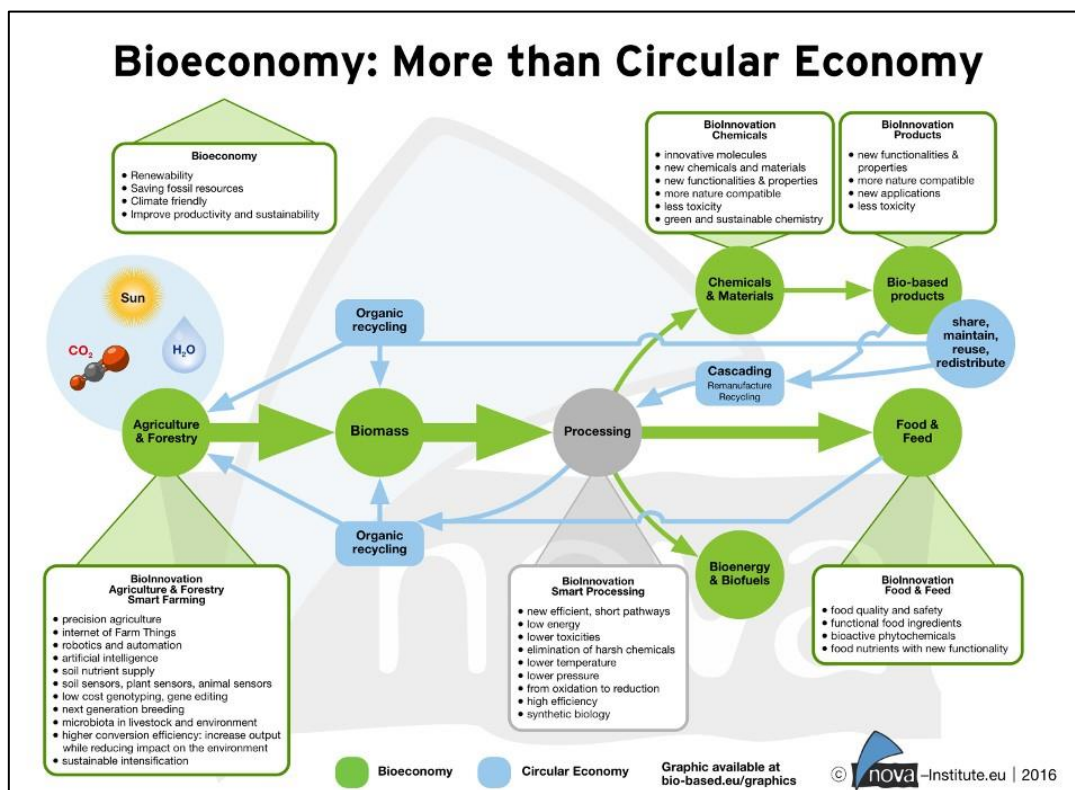


Figura 1. Bioeconomia (verde) ed economia circolare (azzurro) a confronto (Nova Institute 2016).

I microrganismi sono coinvolti nella produzione e nello sviluppo delle materie prime, nella loro conversione in prodotti e nel riciclaggio di sottoprodotti e rifiuti. I processi microbici svolgono quindi un ruolo centrale nella bioeconomia e con il cambiamento delle materie prime in corso. L'importanza economica dei microrganismi nella produzione industriale, aumenterà sempre di più, perché grazie alle loro proprietà, riescono ad essere efficienti senza compromettere l'ambiente (Dahiya, et al. 2022).



### 1.1.1 Caso di studio: valorizzazione degli scarti vitivinicoli

A livello nazionale, nell'anno 2022, il Veneto ha rappresentato la regione italiana con la più alta produzione di vino (circa 11,5 milioni di ettolitri) seguito dalla Puglia (circa 10,6 mln di hl), Emilia-Romagna (7,4 mln di hl) e Sicilia (4,3 mln di hl) (Veneto agricoltura 2022). Conseguentemente a questa elevata produzione si generano elevati quantitativi di rifiuti quali: rifiuti organici solidi, acque reflue, gas serra e rifiuti di imballaggio (Da Ros, et al. 2017).

Un'azienda vitivinicola deve oramai confrontarsi con la sostenibilità ambientale, introducendo misure atte a ridurre il quantitativo di CO<sub>2</sub> generata a livello produttivo, ridurre il consumo idrico, migliorare le pratiche agronomiche e tutelare la biodiversità del paesaggio e delle comunità in esso presenti.

La valorizzazione degli scarti vitivinicoli assume un ruolo importante per rendere il processo di vinificazione quanto più sostenibile possibile. Gli scarti vitivinicoli non sono altro che sottoprodotti di vinificazione, tra cui raspi, vinaccia, feccia di vino e fanghi attivi da depurazione delle acque reflue se presente l'impianto di trattamento interno all'azienda. Se non correttamente gestiti e/o smaltiti in modo improprio, causano un forte impatto ambientale derivante dalle loro caratteristiche inquinanti come: basso pH e alto contenuto di nutrienti, sostanze fenoliche e fitotossiche derivanti dai processi fermentativi (Gómez, et al. 2010).

Questi scarti presentano un elevato potenziale di generazione del biogas, grazie alla loro biodegradabilità data dal quantitativo di etanolo, zuccheri e acidi grassi presenti al loro interno (Jasko, et al. 2012); (Da Ros, et al. 2017). È possibile quindi valorizzare tali scarti attraverso l'uso di processi tradizionali come la digestione anaerobica per produrre biogas, oppure, grazie anche alla capacità di generare idrogeno, utilizzare un processo di fermentazione al buio o *dark fermentation*. La fermentazione al buio è un processo nel quale viene prodotto un biogas ricco di H<sub>2</sub>, insieme a una varietà di sottoprodotti (acidi organici e alcoli) utili ai fini alimentari, farmaceutici etc. (Niño-Navarro, et al. 2020).

Esistono svariati trattamenti chimici che gestiscono i rifiuti da cantina abbassando il loro carico organico e riducendo i composti inquinanti, ma in questo studio ci si focalizza sul trattamento biologico anaerobico.

La generazione dei rifiuti è tanto più impattante quanto più si perde energia e materia prima, ripercuotendosi sull'ambiente e sui costi della società relativi alla raccolta, gestione, trattamento, e smaltimento (Mondal e Debnath 2019). L'unione Europea ha promosso un piano d'azione sull'economia circolare nel quale invita le aziende a ridurre al minimo la produzione di rifiuti e/o trasformarli in energia (Commissione europea 2015).

## 1.2 Digestione anaerobica

La serie di processi che attuano i microrganismi per degradare i materiali biodegradabili in assenza di ossigeno, al fine di gestire i rifiuti e/o ricavarne energia, si chiama digestione anaerobica (Bhatia 2014). Viene effettuata in reattori chiusi, a temperatura controllata, dotati di sistemi per il controllo della pressione, in quanto all'interno si sviluppa da parte dei microrganismi il biogas: una miscela di biossido di carbonio (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>) che viene prodotto in continuo (Metcalf e Eddy 2004). I parametri che influenzano la tipologia di digestione anaerobica sono: il carico organico volumetrico dei solidi totali o volatili (basso, medio, alto) e la temperatura. Per i digestori a basso carico volumetrico è sufficiente operare a temperatura ambiente senza miscelazione (Lise, et al. 2008). Quelli a medio e alto carico invece, comprendono sistemi di miscelazione e una temperatura controllata in condizioni mesofile (20°C<T<50°C), con intervallo ottimale compreso tra 25 e 40°C o termofile (35°C<T<75°C), con intervallo ottimale compreso tra 55°C e 65°C. Ad ogni regime di temperatura corrisponde a una variazione sostanziale della comunità batterica, che può essere psicofila (10°C<T<30°C, con intervallo ottimale compreso tra 12 e 18°C), mesofila oppure termofila. (Metcalf e Eddy 2004).

Il processo di digestione anaerobica si può dividere in quattro fasi (Figura 2):

- 1) l'idrolisi è la prima fase, in cui il materiale organico viene degradato dai batteri idrolitici, che secernono enzimi extracellulari implicati nella trasformazione delle macromolecole complesse dalle quali è composto il substrato (proteine, lipidi, carboidrati) in composti a struttura più semplice. La cinetica di reazione è del primo ordine " $(-r) = kS$ " cioè la velocità di degradazione (-r) è legata tramite una costante (k) alla concentrazione di substrato (S), il valore della costante cambierà sulla base della tipologia di substrato. Per esempio, substrati semplici come i carboidrati hanno valori di k più elevati rispetto a substrati organici più complessi come lipidi e proteine (Eastman e Ferguson 1981); (Gujer e Zehnder 1983);
- 2) la seconda fase, l'acidogenesi, avviene ad opera dei microrganismi acidogenici, che durante il processo fermentativo producono AGV, alcoli, idrogeno e CO<sub>2</sub> (Roddy 2012);
- 3) l'acetogenesi viene condotta dai batteri acetogeni, che trasformano i metaboliti prodotti durante la fase di acidogenesi in idrogeno, CO<sub>2</sub>, acido formico ed acido acetico (CH<sub>3</sub>COOH) (Roddy 2012).

Nelle ultime due fasi, la velocità specifica di crescita dei microrganismi " $\mu$ " è descritta dal modello di Monod:

$$\mu = \mu_{MAX} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) \quad (\text{Eq.1})$$

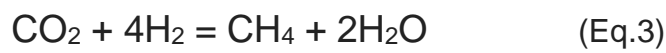
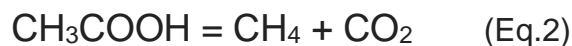
Dove " $\mu_{MAX}$ " indica la velocità specifica di crescita massima, "S" indica la concentrazione di substrato limitante e " $K_S$ " indica la costante di semisaturazione.

Sulla base del tipo di microrganismi presenti nel substrato, è possibile avere  $\mu_{MAX}$  differenti. I microrganismi fermentanti acidogenici presentano velocità specifiche di crescita alte, comprese tra circa 3 e 9 d<sup>-1</sup>. I microrganismi acetogenici, invece, hanno velocità specifiche di crescita diverse a seconda dei substrati metabolizzati: l'utilizzo di acidi grassi a catena corta (SCFA, *short chain fatty acids*), comporta  $\mu_{MAX}$  compresi tra 0,3 e 1,3 d<sup>-1</sup> mentre la degradazione degli acidi grassi a catena lunga (LCFA, *long chain fatty acids*), determina  $\mu_{MAX}$  pari a 0,1-0,5 d<sup>-1</sup> (Gujer e Zehnder 1983); (Pavlostathis e Giraldo-Gomez 1991); (Angelidaki, Ellegaard e Ahring 1999).

Avere velocità specifiche di crescita così basse è un vantaggio perché anche la metanogenesi (l'ultima fase) lavora con  $\mu_{MAX}$  basse (da 0,1 a 4 d<sup>-1</sup>), instaurando più facilmente una cooperazione tra batteri acetogeni e metanigeni per la produzione di metano.

- 4) metanogenesi: durante quest'ultima fase avviene la produzione di metano, il prodotto finale del processo di digestione anaerobica.

La metanogenesi viene condotta da gruppi di microrganismi differenti, che sono in grado di metabolizzare solo alcuni tipi di substrato seguendo la via metabolica acetoclastica (Eq.2) o la via metabolica idrogenotrofa (Eq.3) (Fenchel, King e Blackburn 2012).



Nella via metabolica acetoclastica si ha una disproporzione dell'acido acetico, che in parte si ossida e in parte si riduce. In media, circa il 70% del metano viene generato attraverso la via metabolica acetoclastica, mentre il restante 30% viene prodotto mediante la via idrogenotrofa (Jeris e McCarty 1965). I valori cinetici di  $\mu_{MAX}$  per la via acetoclastica sono compresi tra 0,1 e 0,4 d<sup>-1</sup> mentre per la via idrogenotrofa sono compresi tra 1 e 4 d<sup>-1</sup>, con una forte dipendenza della temperatura di esercizio. (Angelidaki, Ellegaard e Ahring 1999); (Pavlostathis e Giraldo-Gomez 1991); (Gujer e Zehnder 1983).

La digestione anaerobica, quindi, è un processo costituito da più fasi, collegate tra di loro in una catena trofica in cui i prodotti del metabolismo microbico fungono da substrato per i microrganismi responsabili della fase successiva. La produzione di biogas si basa su strette interazioni tra il dominio dei *Bacteria* e quello degli *Archaea*. I *Bacteria* conducono il processo fermentativo, mentre gli *Archaea* sono responsabili del processo metanogenetico. Generalmente, i batteri fermentanti appartengono ai phyla dei *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Synergistota*, *Cloacimonadota* e *Proteobacteria*. Gli *Archaea* metanigeni appartengono al phylum degli *Euryarchaeota* ed agli ordini dei *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanocellales* e *Methanopyrales* (Alalawy, et al. 2021) (Figura 3).

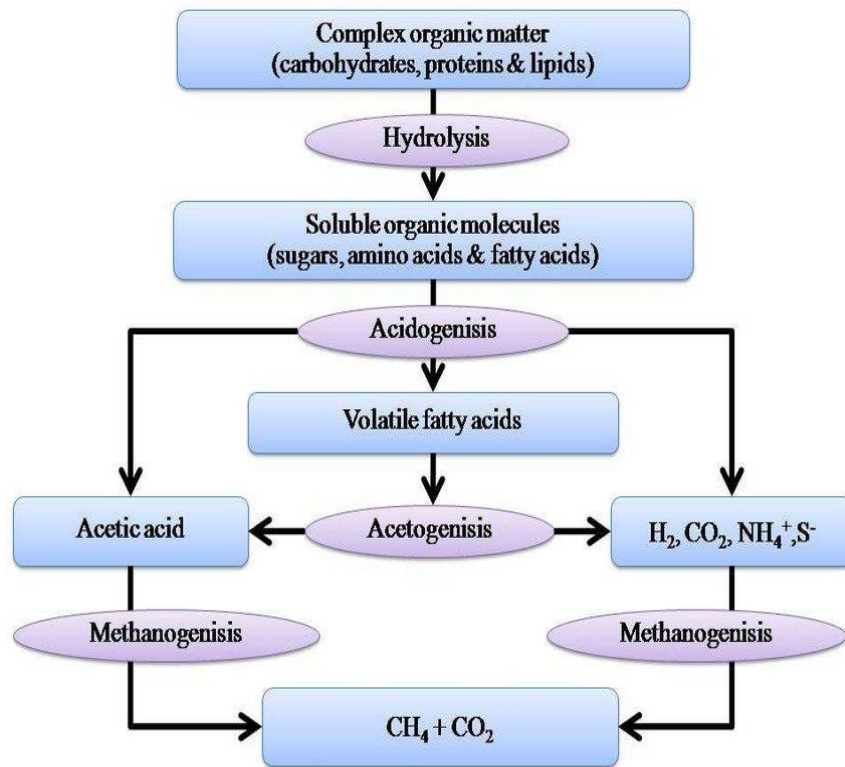


Figura 2. Fasi della digestione anaerobica (in viola) (Ramaraj e Dussadee 2015).

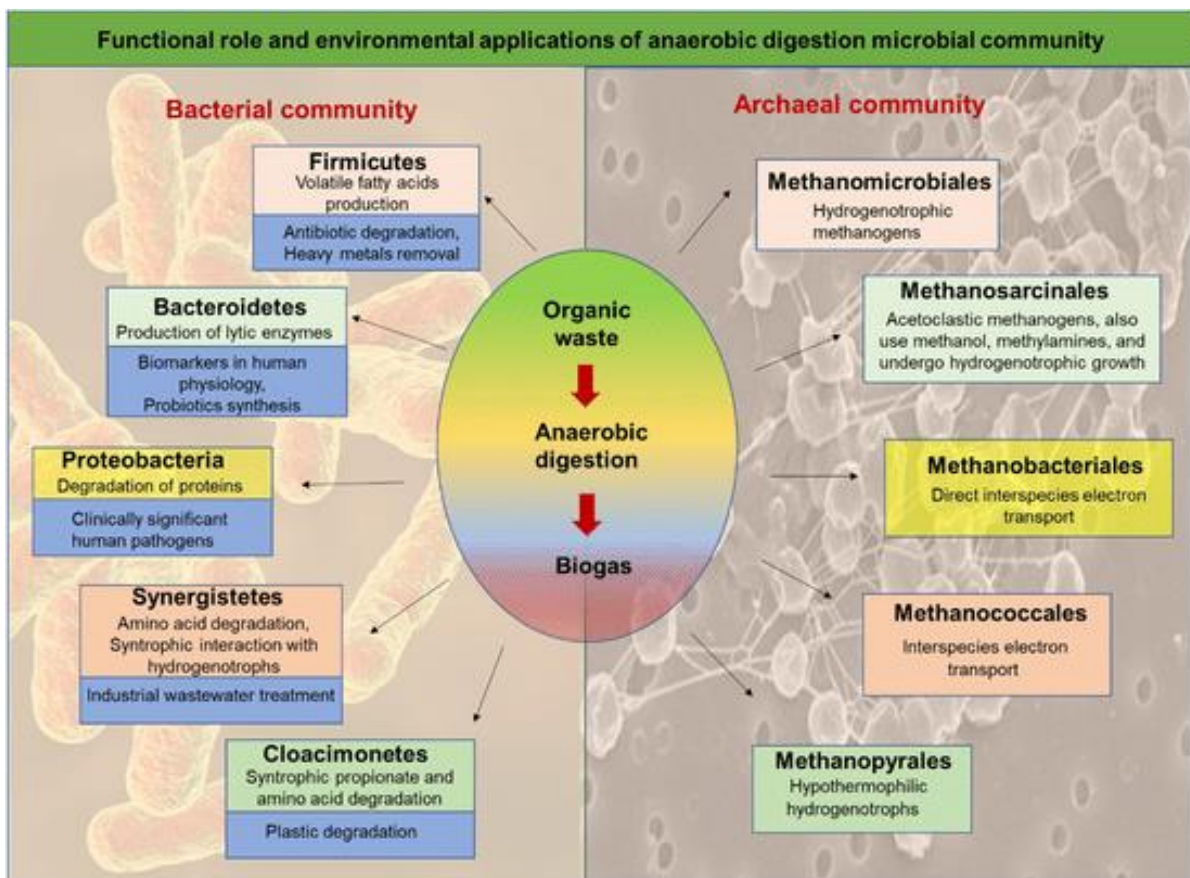


Figura 3. Microorganismi più comuni riscontrati nei fanghi da depurazione in un processo di digestione anaerobica con assegnato il loro ruolo e la loro applicazione (Alalawy, et al. 2021).

### 1.2.1 Fermentazione anaerobica

Il processo fermentativo consiste nelle prime tre fasi della digestione anaerobica (idrolisi, acidogenesi ed acetogenesi) e termina con la produzione di  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  e  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dall'ossidazione anaerobica degli SCFA o degli LCFA durante la fase acetogenetica. Nel processo fermentativo vengono distinti due diversi processi, con durata differente a seconda dei metaboliti di interesse: la fermentazione al buio (o *dark fermentation*) e la fermentazione acidogenica. La fermentazione al buio termina con la produzione di un biogas composto da circa il 60% di  $\text{H}_2$  e dal 40% di  $\text{CO}_2$  e degli AGV, tra i quali i più comuni sono gli acidi acetico e butirrico. La fermentazione acidogenica, invece, ha come obiettivo la produzione dei soli AGV; pertanto, il processo viene condotto fino alla fase acetogenetica, in cui l'idrogeno contenuto nel biogas viene convertito in acetato (Moscoviz, et al. 2018).

Entrambi i prodotti del processo fermentativo, l'idrogeno e gli AGV, trovano applicazione in vari settori industriali e nei trasporti, ma al momento sono ricavati principalmente da fonti fossili. Gli AGV sono composti monocarbossilati alifatici lineari a catena corta, costituiti da due (acido acetico) a sei (acido caproico) atomi di carbonio. Gli AGV hanno svariate applicazioni nell'industria chimica, tessile, farmaceutica, cosmetica e bioenergetica. In particolare, la loro struttura li rende molecole piattaforma (*building blocks*) molto versatili nell'industria chimica, in cui vengono utilizzati per produrre biocarburanti, come bioidrogeno e biodiesel, e biopolimeri come i poliidrossialcanoati (Merrylin, et al. 2020). Al momento, il 90% degli AGV è ricavato da fonti fossili, con un processo che ha costi significativamente inferiori rispetto alla produzione per via fermentativa e che tuttavia presenta impatti ambientali notevoli (Atasoy, et al. 2018).

L'altro principale prodotto del processo fermentativo, è l'idrogeno, ovvero una fonte di energia pulita e rinnovabile; pulita perché la sua combustione produce solo vapore acqueo con una più alta efficienza di combustione rispetto i combustibili tradizionali e rinnovabile perché prodotto dalla fermentazione della materia organica (Toledo-Alarcón, et al. 2019).

L'idrogeno viene prodotto da colture pure (singoli batteri) o colture miste (comunità microbiche), con una più alta resa di idrogeno fornita dalle colture pure (Yang e Wang 2019). Le colture miste però, grazie alla loro diversità microbica favoriscono l'idrolisi, la trasformazione del substrato e migliorano la stabilità del sistema, rendendo il processo fermentativo fattibile dal punto di vista economico.

Le rese non sono molto elevate a causa della possibile formazione di batteri che consumano l'idrogeno in competizione con quelli che lo producono (Qu, et al. 2022).

Per aumentare la resa dell'idrogeno in un processo fermentativo, è possibile attuare un pretrattamento dell'inoculo, con lo scopo di eliminare i batteri che consumano l'idrogeno e di favorire quelli che lo producono, che sono principalmente microrganismi sporigeni appartenenti al genere *Clostridium* (Xia e Ruying 2017). Il pretrattamento termico è il più classico dei pretrattamenti, e viene condotto in un intervallo di temperatura compreso tra 90 e 100°C per tempo di circa 15/60 minuti (Goud, Sarkar e Mohan 2014).

### 1.3 I bioreattori

Al fine di comprendere meglio la fermentazione anaerobica è importante conoscere i bioreattori, come sono fatti, come funzionano e in che modo essi trasformano un prodotto di scarto in uno o più sottoprodotti.

Un bioreattore, chiamato anche fermentatore, è un qualsiasi dispositivo o recipiente utilizzato per eseguire una o più reazioni biochimiche convertendo qualsiasi sostanza (ad esempio un substrato) in un prodotto (Chisti 2006). Il bioreattore è fondamentale in qualunque processo di produzione basato sulle biotecnologie, dalla produzione di biomassa o metaboliti, alla biotrasformazione di un composto in un altro. Le reazioni che si verificano al suo interno sono guidate da biocatalizzatori quali: enzimi, microrganismi, cellule di animali e piante. Il bioreattore è quindi lo strumento che fornisce l'ambiente ottimale alla crescita del biocatalizzatore (Chisti 2006). I biocatalizzatori, sono microrganismi (batteri e funghi filamentosi/lieviti) e vengono considerati come delle "fabbriche di cellule", perché grazie al loro elevato potenziale metabolico, stanno diventando sempre più centrali nello sviluppo di processi per la produzione di molecole da impiegare in ambito medico (terapia umana), nei processi di agricoltura sostenibile, nelle biotecnologie per l'ambiente (trattamento di acque reflue, trattamento di suoli contaminati, estrazione di metalli pesanti, etc.), oltre che nell'ambito della produzione industriale di tipo alimentare e produzione di agenti chimici, sempre più di maggior rilevanza nel settore della chimica organica (Glazer e Nikaido 2007).

**Tabella 1.** Confronto tra i costi di produzione della penicillina e dell'etanolo. (Cooney 1983).

<b>Categoria costi</b>	<b>Penicillina (%)</b>	<b>Etanolo (%)</b>
<b>Costo materia prima</b>	35	62
<b>Costo operativo</b>		26
<b>Servizi</b>	15	
<b>Manodopera</b>	4	
<b>Manutenzione impianti</b>	11	
<b>Costi generali</b>	8	
<b>Investimenti di capitale</b>	22*	12*

\* Include: inflazioni, tasse e assicurazioni.

Da un punto di vista economico, l'obiettivo di un bioreattore è semplicemente quello di minimizzare i costi di produzione, ciò include l'ottenimento di un'elevata resa del prodotto, un'elevata produttività e cosa più importante, un'elevata riproducibilità (Lidén 2002). La resa e la selettività della reazione sono determinate dal biocatalizzatore, ma la produttività è spesso determinata dalla tecnologia del processo. Poiché il bioreattore fornisce il collegamento tra la materia prima e i prodotti, risulta utile capire come la materia prima può incidere sui costi di produzione per diversi prodotti. A titolo d'esempio prendiamo in considerazione la penicillina e l'etanolo (Tabella 1). È evidente che il costo principale è per la materia prima e altri costi principali riguardano gli investimenti di capitale e i servizi riguardanti l'energia. Nel caso di impianti obsoleti, dove il capitale è ammortizzato, la voce riguardo la manutenzione degli impianti aumenterà con il tempo (Cooney 1983).



Per progettare un bioreattore, devono essere prese in considerazione una varietà di condizioni e parametri operativi che sono fondamentali per l'efficienza e la buona riuscita del processo che si vuole ottenere. Considerando la digestione anaerobica alcune delle condizioni progettuali e parametri operativi sono:

- Tempo di ritenzione idraulico (*Hydraulic Retention Time*, HRT): è il tempo medio di permanenza dei liquidi all'interno del digestore. Un breve HRT porta a una produzione spinta di AGV causando inibizione, ma consente una miglior efficienza del processo e una riduzione dei costi di esercizio (Shi, et al. 2017).
- Carico organico (*Organic Loading Rate*, OLR): è la quantità di sostanza organica alimentata, un sovraccarico in un digestore porta a una instabilità del sistema in quanto, la sostanza organica viene rapidamente idrolizzata e acidificata, portando all'accumulo di AGV che inibiscono la fase metanogenica (Franke-Whittle, et al. 2014).
- Solidi totali (*Total Solids*, TS): è la misura della sostanza secca di un fango dopo essiccamento a 105°C in forno. Se il contenuto di TS risulta elevato, i digestori possono essere progettati con volumi ridotti e possono operare a temperature minori (Yi, et al. 2014).
- Temperatura: i digestori anaerobici operano a temperature elevate, da mesofile (20-50°C) a termofile (oltre 50°C). In condizioni mesofile la digestione risulta più lenta e produce meno biogas, ma viene spesso preferita in quanto richiede un minor consumo di energia rispetto le condizioni termofile (Moseet, et al. 2015).
- pH: i batteri acidogeni preferiscono un pH più acido compreso tra 5,5-6,5 mentre i batteri metanigeni preferiscono un pH più basico tra 7,8-8,2. I metanigeni sono molto sensibili a pH bassi a causa dell'effetto inibitorio che gli acidi hanno sulla loro crescita (Bajpai 2017).
- Miscelazione: una miscelazione insufficiente porta alla non distribuzione uniforme dei substrati, alla riduzione della resa del biogas e alla incompleta stabilizzazione del processo, mentre una miscelazione eccessiva può danneggiare le pareti cellulari dei microrganismi oltre che aumentare il consumo energetico (Bajpai 2017).

Data la moltitudine di condizioni e parametri da considerare esistono svariate alternative progettuali. In genere, i bioreattori si possono suddividere in due grandi categorie:

- Bioreattori a coltura sospesa:  
utilizzano il metabolismo microbico in condizioni aerobiche, anaerobiche o anaerobiche/aerobiche sequenziali per servirsi di substrati e degradarli in residui. Gli esempi includono reattori "batch", "fed-batch", reattori a serbatoio agitato continuo (*Continuous Stirred-Tank Reactor*, CSTR) e reattori a flusso a pistone (*Plug-Flow Reactor*, PFR) (Metcalf e Eddy 2004).

- Bioreattori a biofilm:

i microrganismi aderiscono a una superficie interna al bioreattore, creano un biofilm che assorbe e scompone sostanze tossiche nell'acqua, sono molto usati in impianti di depurazione delle acque. I principali sono: i reattori a membrana (MBR), a letto fluido e a letto impaccato (Jaibiba, Naga Vignesh e & Hariharan 2020).

Considerando i bioreattori a coltura sospesa, che vengono spesso realizzati su scala pilota o di laboratorio per fronteggiare studi sul trattamento biologico dei rifiuti, essi sono: il reattore miscelato continuo (CSTR), il plug-flow (PFR), il batch (reattore discontinuo), e il fed-batch (reattore ibrido).

#### CSTR reattore a mescolamento continuo

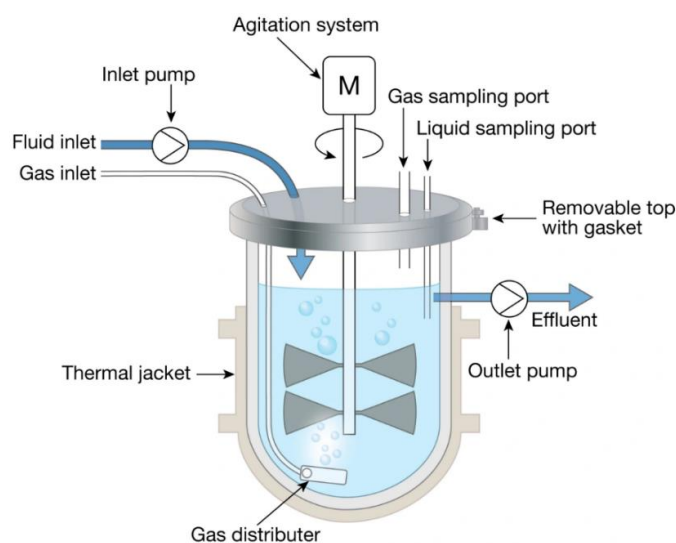
Il CSTR (Figura 4) è un reattore caratterizzato da un flusso del mezzo di crescita in ingresso pari al flusso del mezzo esausto e biomassa in uscita, permettendo quindi di operare a volume costante. È dotato di un sistema ad agitazione continua e costante che mantiene una composizione e una temperatura omogenea del mezzo di crescita. Questo implica che, quando il volume della coltura, il numero di cellule e la concentrazione di nutrienti o prodotti di scarto rimangono costanti, viene raggiunto lo stato di equilibrio dinamico. (Metcalf e Eddy 2004)

Il CSTR permette di controllare sia la velocità di crescita della biomassa, sia la resa cellulare di una coltura microbica, perciò, la quantità di substrato immesso è determinata da:

$$D = \frac{F}{V} \quad (\text{Eq.4}) \quad \mu = D = \frac{1}{HRT} \quad (\text{Eq.5})$$

Dove con: D= velocità di diluizione; F= velocità di flusso (volume per unità di tempo);

V= volume della coltura;  $\mu$ = velocità di crescita specifica; HRT= tempo di residenza idraulico



**Figura 4.** Esempio di bioreattore, CSTR (con alimentazione continua) oppure “batch” (con alimentazione discontinua) (Sonja Caldwell 2017).



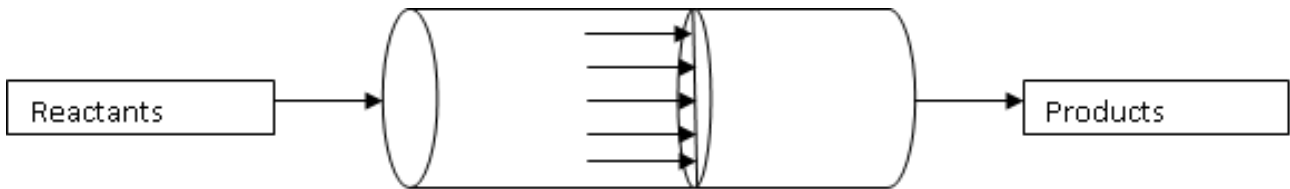
Bisogna prestare attenzione al flusso in ingresso del bioreattore, perché quando diventa troppo elevato e quindi supera la velocità di crescita specifica della biomassa, si incombene nel “wash out” del bioreattore, cioè i microrganismi escono dal bioreattore ancor prima di esplicare le loro funzioni. Variando la velocità di diluizione o la concentrazione del nutriente limitante, è possibile ottenere colture che crescono in modo esponenziale con una velocità e una densità cellulare ben definita (Madigan, et al. 2022).

**Tabella 2.** Breve confronto tra CSTR e PFR (Fogler 1992).

	Tipo di reattore	
	Reattore a flusso a pistone	Reattore miscelato continuo
<b>Caratteristiche</b>	-È disposto come un lungo reattore o molti reattori corti uniti -Nessuna variazione radiale nella velocità di reazione -La concentrazione cambia con la lunghezza lungo il reattore.	-Funzionamento a regime con flusso continuo di reagenti e prodotti -L'alimentazione assume una composizione uniforme in tutto il reattore con il flusso in uscita che ha la stessa composizione interna al serbatoio.
<b>Tipo di fase</b>	Principalmente usato in fase gassosa, raramente in fase liquida	Fase liquida; gas-liquida; solido-liquida
<b>Utilizzo</b>	-Su grande scala -Per reazioni rapide, omogenee, eterogenee, ed alte temperature -Produzione continua	-Quando è richiesta l'agitazione -Possibile configurazione in serie con diversi flussi di concentrazione.
<b>Vantaggi</b>	-Richiede volumetrie minori -Basso costo operativo (manodopera) -Operazione continua -Buon trasferimento di calore	-Operazione continua -Buon controllo della temperatura -Semplicità di costruzione -Basso costo operativo (manodopera) -Facile da pulire
<b>Svantaggi</b>	-Possono presentarsi gradienti termici indesiderati -Scarso controllo della temperatura -Operazioni di arresto e pulizia costose -Può presentarsi l'inibizione da substrato in ingresso	-Volumetrie maggiori

### PFR reattore a flusso a pistone

Il *Plug Flow Reactor* (PFR) è un serbatoio di forma cilindrica in cui si verificano reazioni chimiche tra un catalizzatore rivestito ai lati della parete del reattore e un reagente in ingresso. È utilizzato principalmente per la sua proprietà unica di non richiedere alcuna miscelazione interna, presentando comunque un ingresso e un'uscita continua di materiale come in un CSTR. Il principio di funzionamento riguarda l'ingresso dei nutrienti (reagenti) che passano in direzione assiale lungo il reattore cambiando di composizione nel tempo di percorrenza del cilindro. (Figura 5). Durante il percorso, i nutrienti sotto forma di fluido vengono miscelati in direzione radiale e non in direzione assiale a causa del coefficiente d'attrito della parete, risultandone un flusso altamente turbolento (Jaibiba, Naga Vignesh e & Hariharan 2020).



**Figura 5.** Schema indicativo di un PFR (Oba 2013).

### Batch reattore discontinuo

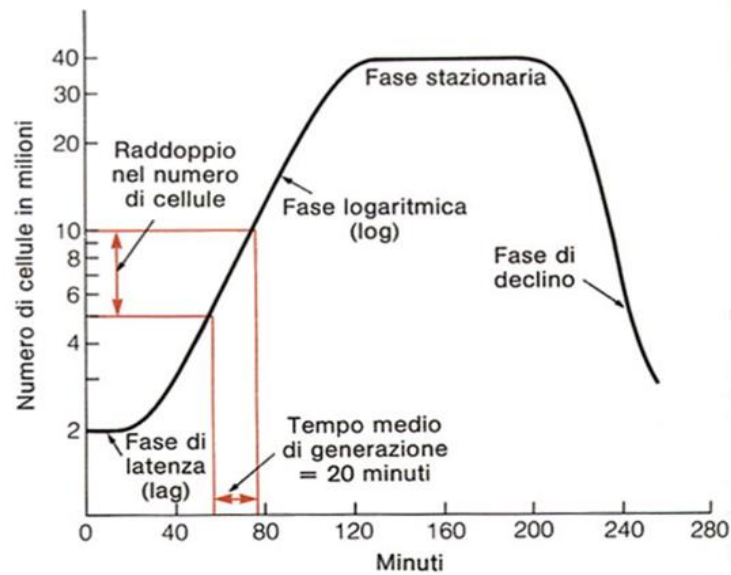
Il bioreattore “*batch*” (Figura 4) è un reattore chiuso, con alimentazione a fasi alternate di carico e scarico. La prima fase riguarda il caricamento del substrato di interesse con o senza l’inoculo di cellule o microrganismi. Nella seconda fase avviene lo scarico dopo che la coltura microbica è stata lasciata crescere all’interno del bioreattore fino all’ottenimento dei prodotti d’interesse. Tra le due fasi si innescano processi interni di biotrasformazione che portano alla formazione del bioprodotto, il quale viene poi estratto dal bioreattore e sottoposto ai successivi trattamenti di purificazione. Anch’esso presenta un sistema di agitazione continuo per uniformare le concentrazioni di substrato e biomassa all’interno del reattore (Madigan, et al. 2022).

All’interno del bioreattore “*batch*” la crescita dei microrganismi avviene secondo la curva di crescita batterica (Figura 6), caratterizzata da diverse fasi:

- una prima fase di latenza o “*lag phase*” in cui i microrganismi si adattano al substrato. Le cellule non si moltiplicano ma sono comunque metabolicamente attive, causa la necessità di riorganizzare la loro fisiologia e i loro metabolismo adattandolo al mezzo di crescita (Blaby, de Crécy-Lagard e Lyons 2011);
- una volta che le cellule iniziano a dividersi per scissione binaria, entrano in quella che viene chiamata fase logaritmica “*log*”, in questa fase la densità cellulare raddoppia ad intervalli regolari (Blaby, de Crécy-Lagard e Lyons 2011);
- quando i nutrienti nel mezzo si esauriscono, il tasso di crescita rallenta fino alla fase stazionaria e la divisione cellulare eguaglia il tasso di morte cellulare dovuto alla senescenza o all’accumulo di prodotti di scarto metabolici (etanolo, acido acetico, etc.) (Blaby, de Crécy-Lagard e Lyons 2011);
- infine, quando il tasso di morte cellulare supera il tasso di divisione cellulare si avrà la fase di declino.

È importante considerare che le cellule possono produrre i prodotti finali desiderati durante qualsiasi fase della crescita, a seconda di quando vengono attivati i percorsi biochimici che producono il prodotto. Alcuni prodotti possono essere prodotti in modo ottimale durante la fase logaritmica, mentre altri sono prodotti in modo ottimale durante la fase stazionaria (Metcalf e Eddy 2004).

Dunque, mentre in un sistema continuo si opera a livelli costanti di concentrazione di biomassa, in un sistema discontinuo si opera con un’elevata concentrazione di substrato iniziale e una bassa concentrazione di biomassa, che crescerà nel tempo.



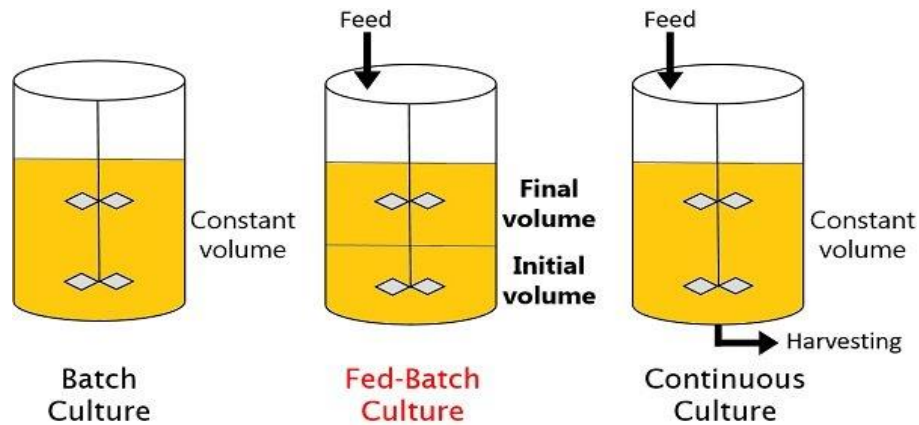
**Figura 6.** Curva di crescita batterica (Minniti 2020).

**Tabella 3.** Vantaggi e svantaggi del batch. (Blaby, de Crécy-Lagard e Lyons 2011).

Vantaggi	Svantaggi
Facile da eseguire e facile da gestire	Bassa produttività oraria
Basso costo del reattore	Scarso controllo della fisiologia della coltura
Basso rischio di contaminazioni	Difficile comprensione dei fenomeni biologici, troppi i parametri che cambiano insieme.
È possibile produrre metaboliti secondari	Tempi lunghi, causa lo svuotamento, la pulizia e la ricarica per il successivo ciclo di produzione.

### Fed-batch reattore ibrido

La modalità operativa più comune nell'industria dei bioprocessi è il *"fed-batch"* (Figura 7): un ibrido tra un sistema continuo e uno discontinuo, cioè viene prima fatto lavorare in modo discontinuo allo scopo di sviluppare biomassa e poi alimentato in modo continuo al fine di ottenere un prodotto in quantità maggiore, o per eliminare eventuali problemi connessi alla presenza di substrato in eccesso o di metaboliti indesiderati. È quindi molto utile per i bioprocessi che mirano ad un'elevata densità di biomassa o a un'elevata resa del prodotto quando il prodotto desiderato è correlato positivamente con la crescita microbica (Yang e Sha 2019).



**Figura 7.** Il “fed-batch” rispetto al “batch” e al CSTR non mantiene un volume costante durante il processo di produzione (Supriya 2020).

#### 1.4 Biotecnologie ambientali ed ecologia microbica

Tutti i microrganismi esistono come parte integrante di comunità complesse che interagiscono attraverso relazioni di cooperazione metabolica. Queste comunità microbiche sono in continua evoluzione e si possono considerare come assemblaggi accidentali o come unità funzionali metagenomiche (Tringe, et al. 2005). Essere in grado di identificare questi microrganismi, quantificarli nel loro habitat naturale e conoscere i metodi adeguati nel ricavare le informazioni di interesse, sono le basi degli studi sulla biodiversità. Allo stesso tempo per quantificare i processi metabolici occorre studiare l'attività metabolica (Madigan, et al. 2022).

L'aumento delle problematiche ambientali ha contribuito all'espansione dello studio delle biotecnologie ambientali non solo per il maggior controllo sull'inquinamento ambientale, ma soprattutto per prevenirlo, ridurre al minimo i rifiuti, produrre sostanze rispettose per l'ambiente, generare energia rinnovabile, produrre biomassa e molto altro ancora. La rapida industrializzazione, l'urbanizzazione e altri sviluppi hanno portato l'ambiente allo stremo e all'esaurimento delle risorse naturali. Grazie ai nuovi approcci e alle tecnologie emergenti che migliorano i processi biologici è possibile garantire una più ampia protezione ambientale (Gavrilescu 2010).

L'ecologia microbica studia le modalità con cui le popolazioni microbiche si raggruppano in comunità e come poi queste comunità interagiscono tra loro e con l'ambiente circostante (Madigan, et al. 2022). I recenti progressi dell'ecologia microbica hanno contribuito a una migliore comprensione dei microrganismi e delle loro attività. Inoltre, hanno fornito le basi per lo sviluppo dei processi biologici riguardanti le biotecnologie ambientali. Le comunità microbiche presenti in natura sono quindi utilizzate per il trattamento di acque reflue, per il biorisanamento, per le celle a combustibile e per le fermentazioni in bioreattori (Kouzuma e Watanabe 2014).

I bioreattori sono come degli habitat “naturali” nei quali i microrganismi conducono i loro processi metabolici, è importante considerare gli aspetti legati alla progettazione dei bioreattori per i loro fabbisogni naturali. È di uguale importanza riuscire a capire come le comunità di microorganismi all'interno di questi bioreattori interagiscono tra loro. Studiare le comunità presenti all'interno dei

bioreattori permette di conoscere i due principali ambiti dell'ecologia microbica, la biodiversità e l'attività microbica, così da poter ricavare le informazioni di interesse al fine di produrre prodotti sostenibili per l'ambiente.

#### 1.4.1 Approcci di analisi della comunità

Per affrontare quelle che sono le comunità microbiche e i suoi approcci di analisi è bene definire il concetto di biodiversità. Essa è definita come la varietà della vita e dei suoi processi, cioè include la varietà degli organismi viventi, le differenze genetiche tra loro, le comunità e gli ecosistemi in cui si trovano (Wilson e Peter 1988).

La scienza della biodiversità è emersa rapidamente includendo i sistemi di monitoraggio e valutazione che misurano il valore della biodiversità come il numero di specie presenti, di popolazioni, di habitat o la somma di tutte queste componenti all'interno di una determinata area. Queste misurazioni iniziano con l'identificazione degli organismi viventi in termini di ricchezza e uniformità. La ricchezza è il numero di specie per campione, cioè più specie sono presenti in un campione più ricco è il campione, mentre l'uniformità è una misura dell'abbondanza relativa delle diverse specie che compongono la ricchezza di un'area (Supriatna 2018).

Per definire e delimitare le comunità sulla base della scala spaziale alla quale vengono quantificate, R.H. Whittaker nel 1960 ha adottato dei metodi quali: (R. H. Whittaker 1960).

- l'alfa diversità riassume la struttura di una comunità ecologica rispetto alla sua diversità, in termini di ricchezza e uniformità all'interno di un habitat. Esistono molte metriche che comunemente vengono utilizzate per misurare l'alfa diversità e le più usate sono: l'indice di Simpson e l'indice di Shannon. L'indice di Simpson indica la probabilità che due individui presi casualmente appartengano alla stessa specie. L'indice di Shannon combina la ricchezza e l'uniformità in un unico valore (Supriatna 2018).

Dunque, l'alfa diversità viene utilizzata per un confronto tra due popolazioni o gruppi all'interno di una comunità. Le comunità sono però soggette a repentine perturbazioni quali il clima, la competizione, la dispersione casuale il disturbo antropico etc. Perciò l'alfa diversità corrisponde a un primo approccio che comunemente si attua dopo il sequenziamento di campioni ambientali (Willis 2019);

- la beta diversità è la variabilità nella composizione delle specie tra gli habitat nello spazio cioè, indica se la diversità è concentrata in pochi ambienti o diffusa in più ambienti (Cao, et al. 2021). Anche in questo caso, come per l'alfa diversità, esistono diverse metriche che ci aiutano a misurare la beta diversità e le più usate sono: la dissomiglianza di Bray-Curtis e la distanza di Jaccard. La dissomiglianza di Bray-Curtis confronta l'abbondanza degli individui tra due o più habitat e il numero di individui trovati al loro interno. Essa varia da 0 a 1, dove 0 significa che due habitat condividono lo stesso numero di individui, quando è 1 invece, significa che due habitat sono completamente diversi tra loro, e quindi si avrà la massima

dissomiglianza (Bray e Curtis 1957). Per quanto riguarda la distanza di Jaccard, anch'essa varia da 0 a 1, non tiene conto dell'abbondanza come la dissomiglianza di Bray-Curtis, ma si riferisce solo alla presenza degli individui tra due o più habitat (Jaccard 1900);

- la gamma diversità è la diversità totale di un paesaggio o di un'area geografica, ed è determinata dal prodotto delle alfa diversità di ogni comunità e della loro dissimilarità indicata come beta diversità (R. Whittaker 1972).

#### 1.4.2 Tecnologie di analisi

I primi processi di fermentazione microbica scoperti dall'uomo migliaia di anni fa, riguardano bioprocessi ben consolidati che operano su larga scala come la produzione di vino, birra, latte etc. seguiti poi dalla produzione di acido citrico, vari componenti chimici e la famosa penicillina, che segnò l'inizio della produzione industriale degli antibiotici (Buchholz e Collins 2013). In questi processi, le reazioni di trasformazione sono catalizzate da singoli organismi.

Nei bioreattori moderni, dove vengono processati ad esempio i biocarburanti, sono coinvolte invece comunità complesse di microorganismi che instaurano interazioni di cooperazione al fine di resistere di più allo stress come può accadere in natura. La cooperazione influisce significativamente sulle dinamiche evolutive delle comunità microbiche, le quali possono adottare strategie positive o negative nei bioprocessi. Secondo M. Cavaliere e i suoi colleghi, un'ambiente strutturato può facilitare la cooperazione, perciò, diventa fondamentale studiare l'eterogeneità delle comunità microbiche nei relativi substrati e/o inoculi di partenza (Cavaliere, et al. 2017).

Grazie ai recenti metodi e sviluppi tecnologici, è possibile comprendere anche il metabolismo dei microbi a livello molecolare, permettendo di creare prodotti più efficaci, destinati a un miglioramento sociale, ambientale ed economico. Considerando poi i principi della bioeconomia, risulta che i processi di biotrasformazione delle materie prime rinnovabili non contribuiscono all'accumulo in atmosfera di CO<sub>2</sub>, essendo la quantità di CO<sub>2</sub> rilasciata dalla loro trasformazione pari a quella assorbita dall'atmosfera nei processi di sintesi delle stesse. Dunque, l'utilizzo degli scarti alimentari o di qualsiasi altro materiale di scarto è diventato oramai l'obiettivo primario di qualsiasi bioprocesso. (Tabella 4).

##### 1.4.2.1 Approcci dipendenti/indipendenti

Per l'analisi dei microrganismi e delle comunità microbiche, si fa riferimento a due approcci basati sulla coltivazione:

1. Approcci coltura dipendente
2. Approcci coltura indipendente

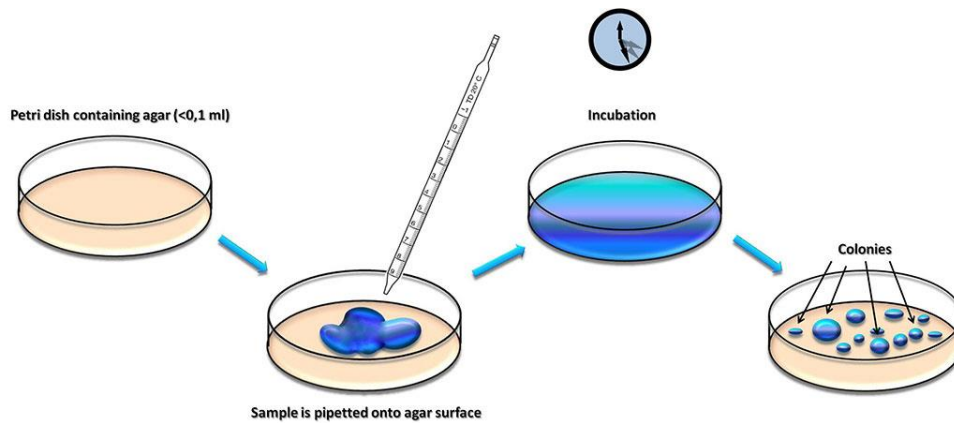
**Tabella 4.** Microrganismi d'eccellenza per la produzione di bioprodotti, attraverso bioprocessi di fermentazione anaerobica in bioreattori di media/larga scala.

Prodotto	Substrato	Microrganismi	Usi
<b>Bio-idrogeno</b> (Xianxian, Quan e Dehai 2022)	Glucosio, residui di fecola e di patate dolci	- <i>C.acquistare tricum</i> - <i>Enterobacter aerogenes</i>	-Bioenergia -Biocarburante.
	Saccarosio	- <i>Clostridium pasteurianum</i>	
	Pasta di amido	- <i>Clostridium butyricum</i>	
<b>Acido citrico</b> (Sauer, et al. 2008)	Glucosio	<i>Aspergillus niger</i>	-Additivo alimentare -Resine -Coloranti -Agenti antischiuma -Farmaceutica -Sciroppi alimentari.
<b>Acido acetico</b> (Sauer, et al. 2008)	Etanolo	<i>Acetobacter</i>	-Industria alimentare -Vino.
<b>Acido lattico</b> (Sauer, et al. 2008)	Lattosio	<i>Lactobacillus spp.</i>	-Industria lattiero-casearia -Conservante, esalta i sapori.
<b>Poliidrossialcanoati</b> (Madison e Huisman 1999).	Acetil-CoA Acetoacetil-CoA	- <i>Z. ramigera</i> - <i>R. eutropha</i>	-Bioplastiche -Imballaggi -Rivestimenti.
<b>Metano</b> (Vallini, Maria e Bianchin 1987)	Acetato, metanolo, ammine metilate, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	- <i>Methanotrix soehngeni</i> - <i>Methanosarcina barkeri</i> - <i>Methanococcus mazei</i> - <i>Methanosarcina ceppo TM-1</i>	-Bioenergia -Biocarburante

Gli approcci a coltura dipendente mirano a isolare singoli o gruppi specifici di microrganismi mediante tecniche di arricchimento. Queste tecniche si basano sulla creazione di terreni selettivi che consentono la crescita massiccia di un organismo precedentemente confinato da un campione naturale. È un approccio ancora valido negli studi di ecologia microbica e svolge un ruolo centrale nella ricerca di nuovi e non ancora descritti microrganismi (Willey, Sherwood e Woolverton 2008).

Per la preparazione di una coltura di arricchimento è necessario disporre di un inoculo appropriato che contenga l'organismo di interesse e il terreno di coltura seguito da particolari condizioni di incubazione che risultino da un lato selettive per il microrganismo (favorendo la crescita) e dall'altro, capaci di contrastare o inibire lo sviluppo di organismi indesiderati. (Figura 8). È fondamentale quindi riprodurre il più fedelmente possibile le condizioni ambientali di una particolare nicchia ecologica (Madigan, et al. 2022).





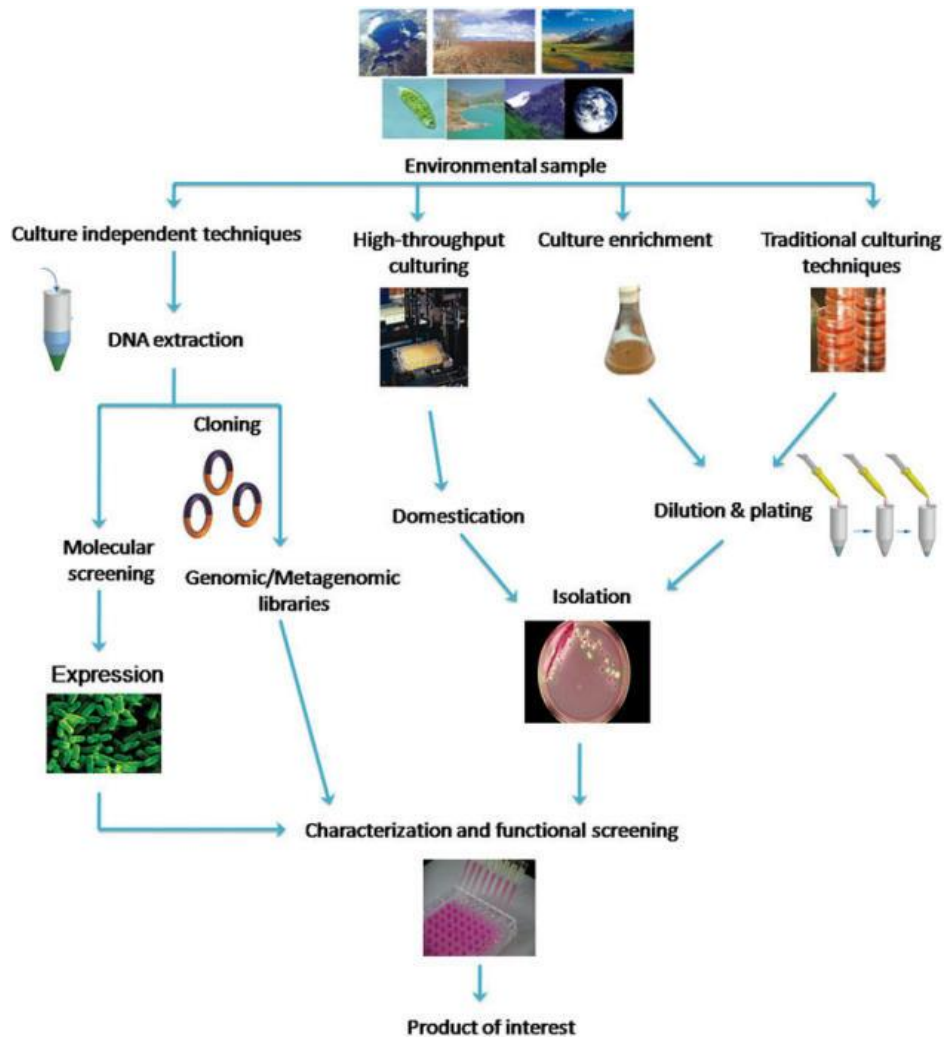
**Figura 8.** Schema sulla preparazione di una coltura di arricchimento attraverso l'uso di una scatola Petri e il terreno di coltura "agar" (Diadrasis 2023).

Il passo successivo, dopo aver ottenuto una coltura di arricchimento è generalmente quello di isolare il microrganismo di interesse in coltura pura/axenica andandolo poi a caratterizzare mediante saggi fisiologici e metabolici. Tuttavia, gli approcci di arricchimento o altre tecniche colturali non sempre funzionano in quanto spesso non si riesce a ricreare le condizioni ottimali di crescita in laboratorio, oppure sono presenti microrganismi che esistono come associazione di altre specie microbiche (come i cianobatteri e protisti), e nel caso in cui si riesca comunque a isolarli in colture pure, le loro caratteristiche morfologiche e fisiologiche possono cambiare a causa della mancanza dei fattori di crescita e vitamine che forniscono gli organismi commensali (Willey, Sherwood e Woolverton 2008). Nel tentativo di superare queste limitazioni sono stati sviluppati approcci a coltura indipendente, i quali prescindono dalla coltivabilità di un microrganismo. Si stima infatti che il 99% dei microrganismi osservabili in natura non siano coltivati utilizzando gli approcci a coltura dipendente (Amann, Ludwig e Schleifer 1995).

Gli approcci coltura indipendente possono quantificare i microrganismi presenti in un habitat per stimare l'abbondanza dell'intera comunità o, nello specifico, le abbondanze relative delle diverse specie presenti nella comunità (metodi di microscopia). Oppure, grazie all'avanzamento della tecnologia, è possibile sequenziare il DNA di un campione ambientale (metodi molecolari).

Queste informazioni permettono di comprendere la struttura della comunità microbica presente in varie matrici (acqua, suolo, rifiuti, etc.) senza ricorrere ad isolamenti preventivi. (Figura 9). Inoltre, possono fornire informazioni legate alle attività microbiche, come le relazioni simbiotiche esistenti tra i microrganismi e gli ospiti quali piante, animali o altre specie microbiche, oppure informazioni circa le sequenze, i geni e i genomi per misurare la diversità e le potenziali capacità metaboliche dei microrganismi (Madigan, et al. 2022).





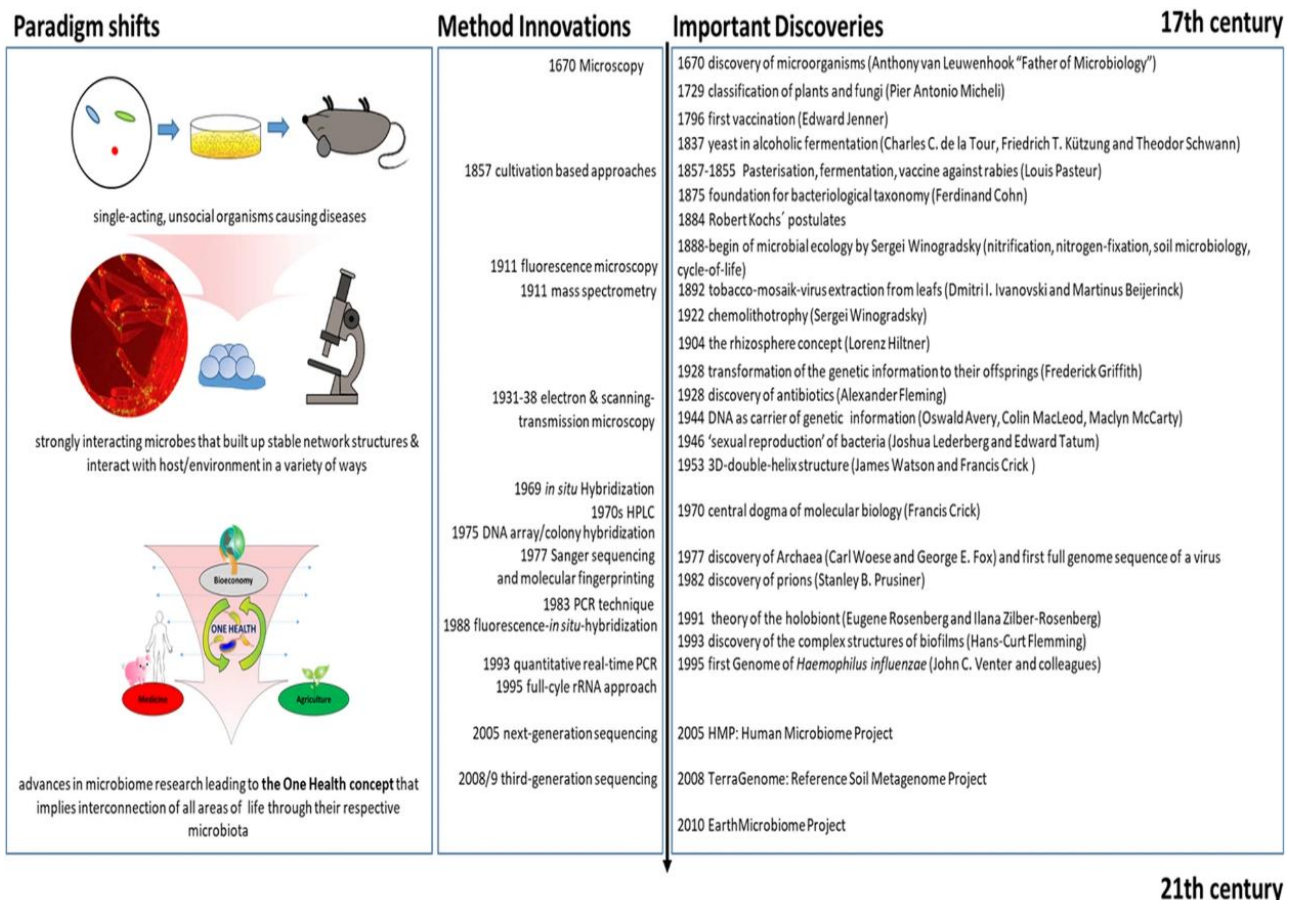
**Figura 9.** Principali differenze tra gli approcci a coltura dipendente e indipendente. Gli approcci indipendenti dalla coltura si basano sulla estrazione del DNA e sulla generazione di librerie genomiche o metagenomiche per esplorare la vasta diversità del microbioma non coltivabile e coltivabile (Akondi e Lakshmi 2013).

#### 1.4.2.2 Evoluzione delle tecnologie molecolari

A partire dagli anni 70 (Figura 10), i due approcci visti finora sono stati sviluppati in parallelo, con la prevalenza sempre più accentuata delle tecnologie molecolari che contribuiscono significativamente alla ricerca dei microrganismi che non sono coltivabili in laboratorio. Quando nel 1977 Woese e Fox scoprirono i tre domini della vita (cioè *Bacteria*, *Archaea* ed *Eukaryota*) utilizzando il sequenziamento del gene del RNA ribosomiale 16S stabilirono che alcuni geni rRNA risultano altamente conservati. Da allora, i microbiologi ambientali si sono sempre più interessati agli approcci molecolari per superare le difficoltà della coltivazione microbica e i limiti della microscopia. Nel 1985, Norman Pace e i suoi colleghi, trovarono un'elevata diversità microbica in campioni ambientali analizzando le sequenze di rRNA 5S e 16S senza alcuna coltura in vitro (Olsen, et al. 1986).

Successivamente, nei primi anni '90, si svilupparono le prime tecniche ambientali di finger-printing ad alto rendimento cioè l'analisi dei frammenti di DNA mediante elettroforesi su gel (DGGE, T-RFLP), che possono essere utili a determinare i membri dominanti di una comunità ma di conseguenza solo le poche specie più abbondanti possono essere rilevate (von Wintzingerode,

Göbel e Stackebrandt 1997). L'avvento poi delle tecnologie NGS (*Next-Generation-Sequencing*) nel 2005 ha infine avviato la ricerca su larga scala delle comunità batteriche (Jo, Oh e Park 2020).



**Figura 10.** Storia evolutiva delle ricerche sulla comunità microbica, si evidenzia il passaggio dal paradigma nei quali i microbi erano visti come organismi asociali che causano malattie, alla visione olistica dei microrganismi che interconnettono positivamente la bioeconomia con la salute umana e ambientale (Berg, et al. 2020).

### 1.4.2.3 Principali approcci molecolari

Prima di affrontare gli approcci molecolari è bene chiarire cos'è la PCR e il gene 16S rRNA, come funzionano e perché sono importanti:

- la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) non è altro che la replicazione del DNA in vitro, durante la quale i segmenti di DNA target vengono moltiplicati fino a miliardi di volte in un processo di amplificazione. Lo strumento che viene usato è chiamato termociclatore che, grazie a cicli termici ripetuti, rende possibile l'ottenimento di una grande quantità di DNA amplificato partendo da poche molecole di DNA target. La PCR richiede l'impiego della DNA polimerasi, l'enzima che in natura svolge il compito di copiare le molecole di DNA. Servono anche degli oligonucleotidi a DNA (*primer*) sintetizzati artificialmente che funzionano da innesco della reazione. C'è da sottolineare che nella PCR non si copia un'intera molecola di DNA ma solo alcuni segmenti di poche migliaia di paia di basi (la sequenza target) a partire da una molecola più grande (lo stampo). La PCR è quindi una tecnica molto usata per ottenere DNA

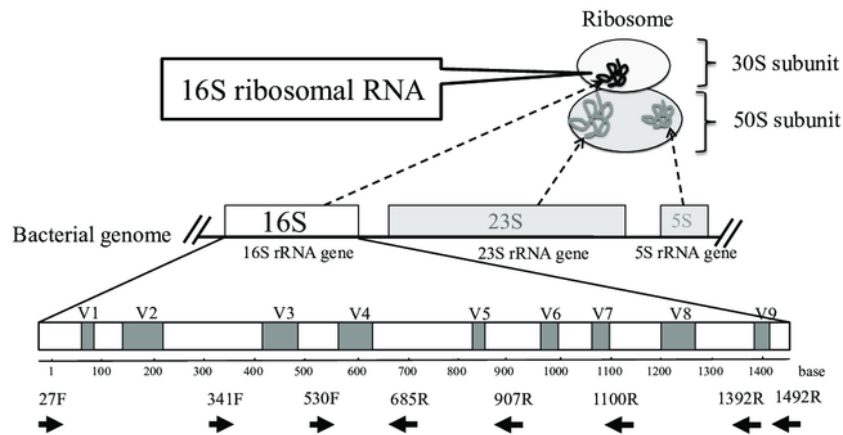
da utilizzare per gli esperimenti di clonaggio o sequenziamento che, grazie ai primer disponibili in commercio, riescono ad apparirsi in quelle regioni di gene che si pensa siano rimaste conservate in un'ampia varietà di microrganismi. Per esempio, il gene 16S rRNA contiene sufficiente informazione per l'analisi delle comunità microbiche e quindi si possono condurre studi di tipo filogenetico (Madigan, et al. 2022);

- il gene 16S si trova all'interno della struttura ribosomiale (Figura 11). Il ribosoma è un complesso di proteine e subunità di RNA che si trovano all'interno di tutte le cellule viventi e svolge un ruolo importante nella sintesi proteica biologica (la traduzione). È composto da due componenti principali: la subunità ribosomiale piccola (subunità 30S nelle cellule procariotiche) e la subunità grande (subunità 50S nelle cellule procariotiche). Ogni subunità contiene una o più molecole di RNA ribosomiale (rRNA) e una varietà di proteine ribosomiali. Il gene 16S rRNA codifica per una molecola di RNA ribosomiale della subunità ribosomiale 30S presente in tutte le cellule procariotiche, comprendendo i batteri e gli archaea mentre l'rRNA 23S e l'rRNA 5S sono le subunità dell'rRNA contenuto nella subunità ribosomiale 50S (Fukuda, et al. 2016). Woese e Fox nel 1977 hanno scoperto che i geni che codificano le componenti del ribosoma si conservano, cioè le loro strutture cambiano molto poco nel tempo a causa della loro importante funzione, la traduzione dell'mRNA (RNA messaggero) in proteine (Woese, Kandler e Wheelis 1990).

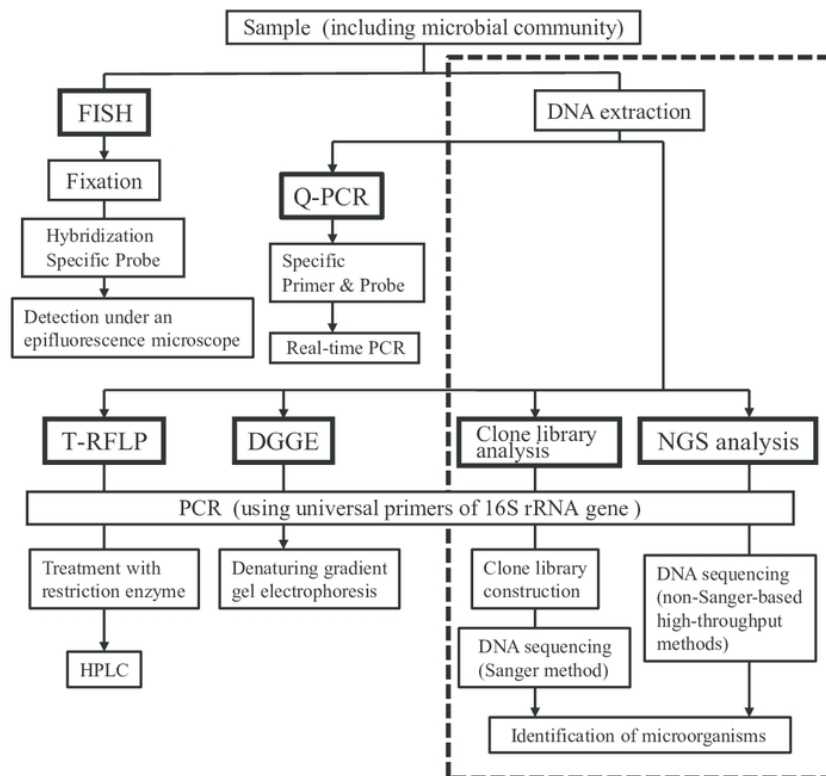
Dunque, il gene 16S rRNA è lo strumento più comunemente usato per l'identificazione dei batteri per quattro diversi motivi:

1. è un gene relativamente corto, presenta circa 1500 bp (paia di basi);
2. presenta dieci regioni nella sequenza del gene che sono comuni tra la maggior parte dei batteri (regione conservata) e sono separate in nove diverse regioni (regioni ipervariabili). I primer universali sono stabiliti nelle regioni conservate (D. Lane 1991);
3. le sequenze geniche registrate nelle banche dati pubbliche stanno aumentando notevolmente, poiché la sequenza genica è un'informazione importante per l'identificazione e la classificazione negli studi tassonomici sui batteri (Fukuda, et al. 2016);
4. il criterio che definisce una nuova specie batterica è una somiglianza inferiore al 97% nella sequenza del gene 16S rRNA rispetto alla specie batterica più vicina conosciuta (Lane, et al. 1985).

Negli approcci molecolari per la valutazione della diversità genetica e la struttura delle comunità microbiche viene estratto direttamente il DNA dai campioni ambientali e successivamente analizzato amplificando particolari sequenze usando la PCR identificando nella maggior parte dei casi il gene 16S rRNA. (Figura 12).



**Figura 11.** Rappresentazione grafica del gene 16S rRNA, nella sequenza genica di *Escherichia coli*: in bianco sono indicate le dieci regioni conservate e in grigio le nove regioni ipervariabili (V1-V9). Le frecce indicano la posizione dei primer universali sulla sequenza genica (Fukuda, et al. 2016).



**Figura 12.** Principali approcci molecolari (evidenziati in grassetto). La linea tratteggiata circonda i metodi basati sulle tecnologie di sequenziamento (Fukuda, et al. 2016).

In figura 12, con l'acronimo FISH, si intende la tecnica di ibridazione fluorescente in sito: è una metodologia che non richiede la PCR o l'estrazione del DNA e può essere applicata per monitorare la presenza di particolari gruppi di microorganismi in matrici complesse o per individuare la presenza di una determinata specie batterica. Come aspetto negativo, necessita di un elevato numero di sonde molecolari con marcatori fluorescenti che prevedono la conoscenza del gene da studiare (Amann, Ludwig e Schleifer 1995).

Mentre la qPCR cioè la PCR quantitativa è un metodo che necessita dell'estrazione del DNA, è una variante della PCR e viene utilizzata per stabilire la quantità di DNA target iniziale. Seguono i metodi

quali: il T-RFLP (polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione), la DGGE, (l'elettroforesi su gel a gradiente denaturante), il clonaggio che comunemente avviene in *Escherichia coli* attraverso i suoi plasmidi e le analisi NGS che anch'esse necessitano di una estrazione del DNA iniziale.

### 1.4.3 Tecnologie di sequenziamento

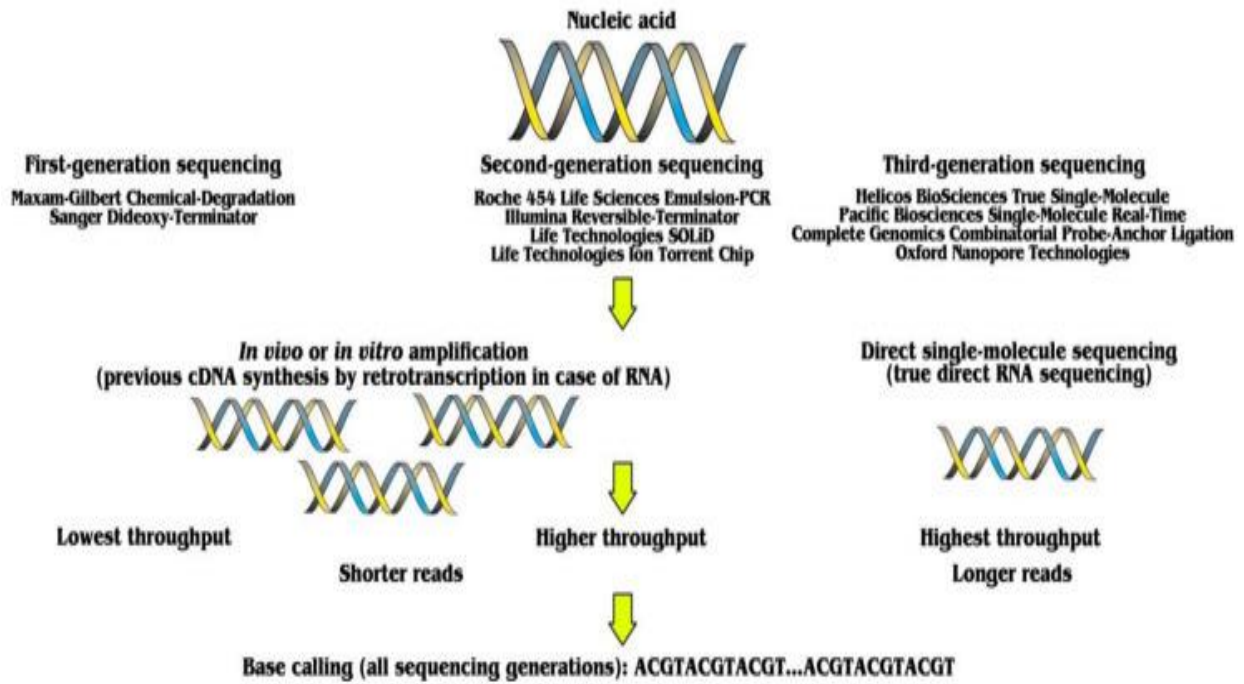
Il sequenziamento è un processo di analisi di una macromolecola quale il DNA o RNA che determina la sequenza precisa di subunità (i nucleotidi) che la compongono. La prima tecnica utilizzata per il sequenziamento del DNA è il "metodo dei dideossi" sviluppato dallo scienziato F. Sanger nel 1977. Questo metodo si basa sull'ottenimento di una sequenza creando una copia del DNA originale a singolo filamento, con un processo simile alla reazione a catena della polimerasi (PCR). Esso prevede che alla miscela necessaria per produrre la copia di DNA vengano aggiunti sia deossiribonucleotidi normali (dNTP) sia piccole quantità di dideossiribonucleotidi (ddNTPS) corrispondenti, uno per ciascuna delle quattro basi azotate. All'epoca Sanger vinse il premio Nobel per questo metodo ma, con il passare degli anni e l'approfondimento degli studi sul sequenziamento, gli scienziati hanno evidenziato alcuni limiti nel "metodo dei dideossi". Il maggior limite è che non era possibile sequenziare cromosomi interi o grandi molecole di DNA in quanto, il metodo di Sanger, determinava solo 800 nucleotidi per reazione, rendendo necessario il taglio delle molecole di DNA in frammenti molto piccoli (Madigan, et al. 2022).

Questo portò allo sviluppo di tecnologie in grado di sequenziare in modo massiccio molti campioni o sequenziare singole molecole di DNA così che, al giorno d'oggi è possibile sequenziare direttamente non solo il DNA senza precedenti fasi di amplificazione o marcatura, ma anche l'RNA senza previa retro-trascrizione (Dorado, et al. 2021).

Le tecnologie di sequenziamento sono classificate in tre generazioni: (Figura 13)

1. prima generazione;
2. seconda generazione;
3. terza generazione.

La prima generazione è stata rivoluzionaria, in quanto ha permesso ai ricercatori (Sanger e Gilbert) di sequenziare il DNA per la prima volta, l'approccio di Sanger è stato ottimizzato nel tempo, utilizzando marcature fluorescenti rispetto a quelle radioattive originali. Il sequenziamento di seconda generazione invece, ha permesso di sequenziare genomi interi in tempi e costi ragionevoli a discapito sempre della presenza di alcuni errori nella lettura delle sequenze a causa della DNA polimerasi (mutazioni). In ultima, il sequenziamento di terza generazione rappresenta una nuova svolta per la ricerca, in quanto il vantaggio di sequenziare direttamente le molecole di DNA senza amplificazione ne riduce drasticamente gli errori di lettura delle sequenze (Dorado, et al. 2021).



**Figura 13.** A differenza della prima generazione, la terza generazione genera sequenze più lunghe e quindi con più informazione genetica (Dorado, et al. 2021).

#### 1.4.3.1 Sequenziamento Illumina

Attualmente, per l'analisi dei dati delle comunità microbiche, si usano generalmente piattaforme di sequenziamento NGS di seconda generazione. Una tecnologia NGS di uso comune va a sfruttare il principio della "reverse-termination", questa metodologia è stata sviluppata nel 2007 da Solexa ed è stata acquisita poi da Illumina® Inc (Mardis 2013).

Il sequenziamento Illumina è composto da quattro fasi fondamentali:

1. preparazione della libreria;
2. generazione dei cluster;
3. sequenziamento;
4. analisi dei dati.

Nella prima fase di preparazione della libreria di sequenziamento, i campioni di DNA o cDNA (DNA complementare) vengono frammentati in segmenti lunghi circa un centinaio di basi in modo casuale e modificati aggiungendo degli adattatori alle loro estremità (Fig. 14, parte 1). Questi adattatori includono siti di legame del sequenziamento, degli "index" e delle regioni speculari ma invertite agli oligonucleotidi presenti nelle celle di flusso (Illumina.Inc 2016).

Nella seconda fase, il clustering è un processo in cui ogni frammento di DNA viene amplificato in condizioni isoterme in una cella a flusso che è un vetrino composto da delle corsie simili a canali dove in superficie si trovano due tipi di adattatori/oligonucleotidi. L'ibridazione è causata da un tipo di adattatore, il quale è speculare ma inverso alla regione dell'adattatore presente in uno dei filamenti di DNA (Fig. 14, parte 2). Una volta che il filamento di DNA si unisce all'oligonucleotide della cella a



flusso, la polimerasi crea un filamento speculare del filamento che viene ibridato. La molecola a doppio filamento generata viene poi denaturata e lo stampo originale viene lavato via. Il filamento rimasto si clona attraverso un'amplificazione a ponte e, nel fare quest'azione, il filamento si ripiega grazie a un adattatore che si ibrida con un altro speculare ma inverso. (Fig. 14, parte 3) (Illumina.Inc 2016).

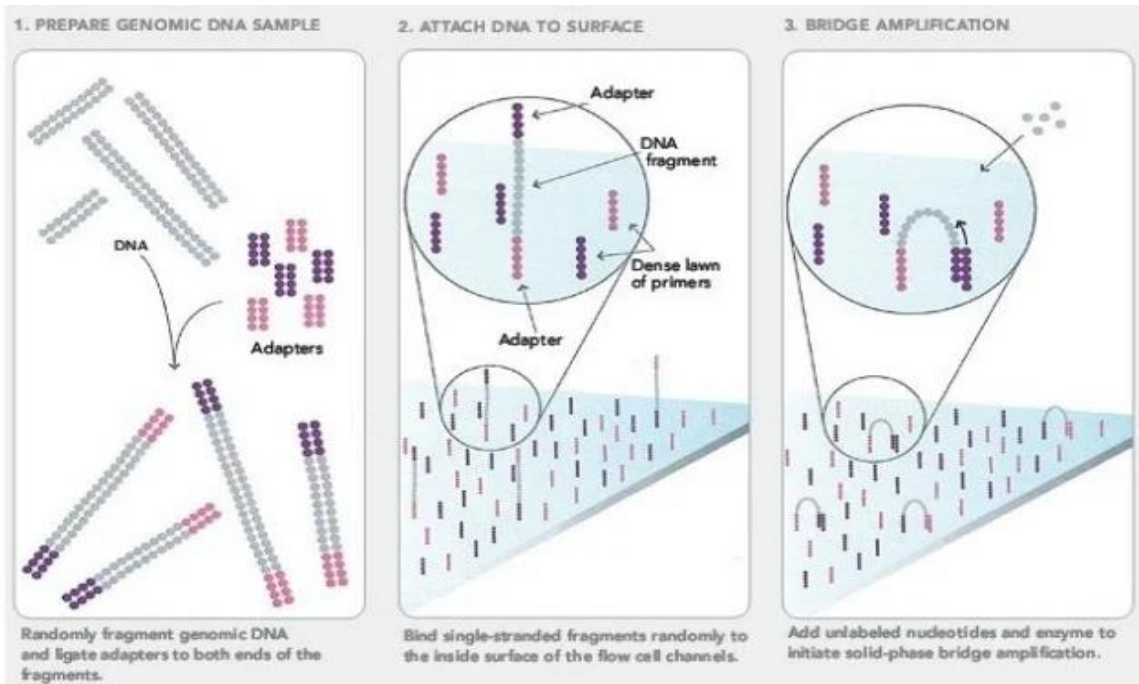


Figura 14. Prime tre fasi riguardanti un sequenziamento Illumina (Illumina.Inc 2010).

**BRIDGE AMPLIFICATION**

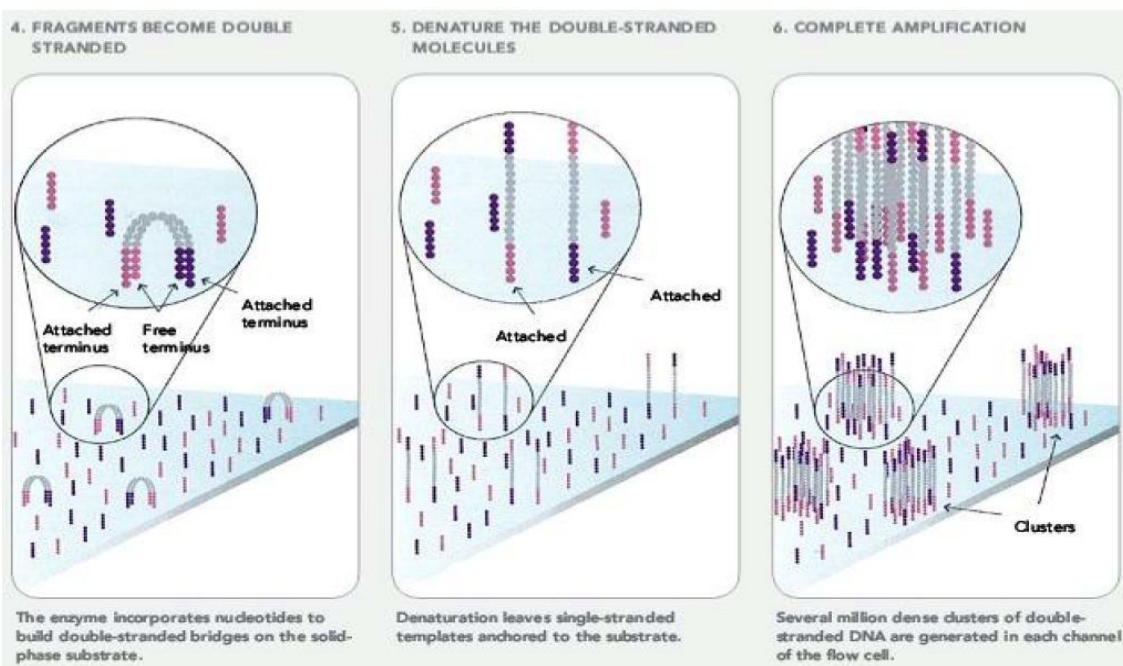


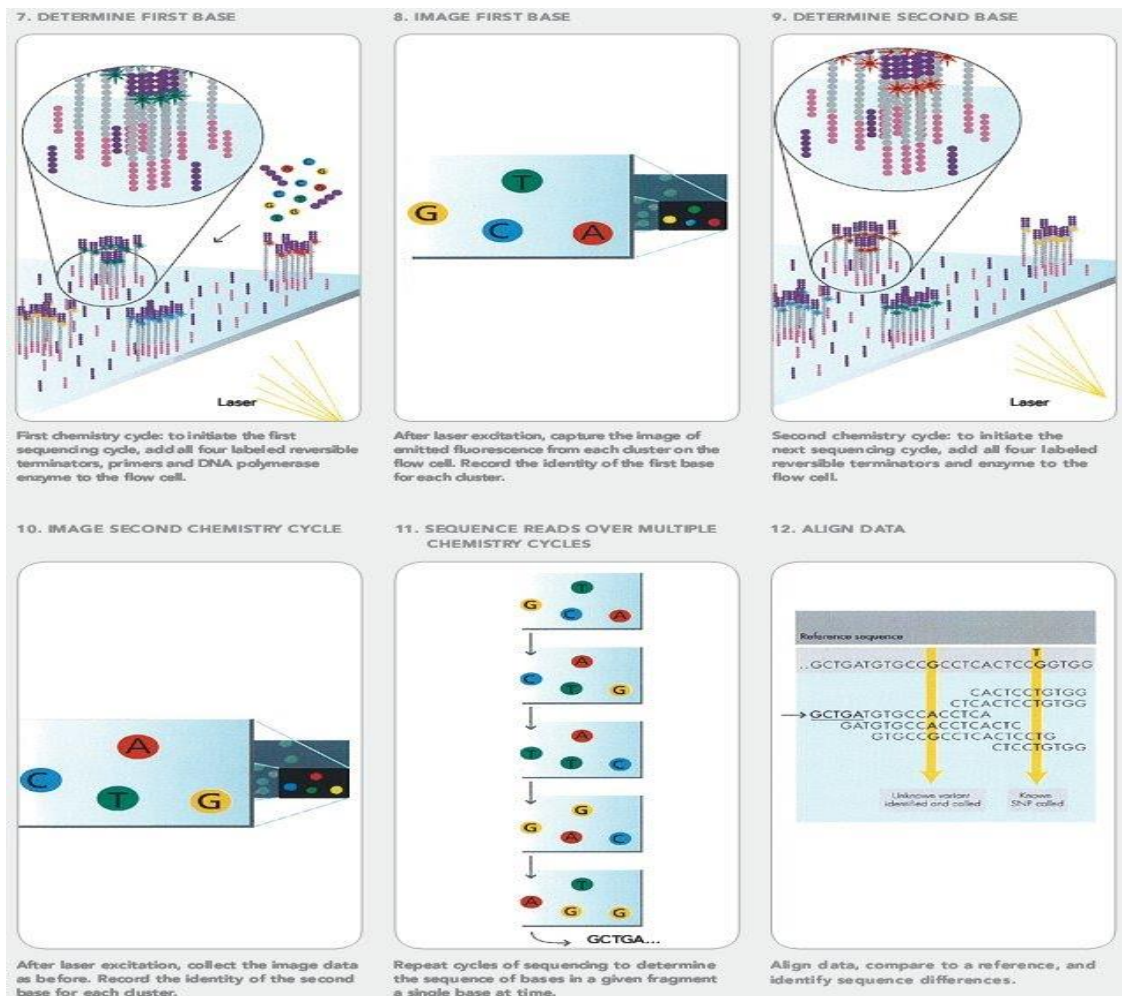
Figura 15. Amplificazione "a ponte" del sequenziamento Illumina (Illumina.Inc 2010).

La polimerasi nuovamente crea un nuovo filamento speculare generando un ponte a doppio filamento (Fig. 15, parte 4). Successivamente, viene ri-denaturato, formando due coppie a filamento singolo del frammento di DNA iniziale legate alla cella a flusso (Fig. 15, parte 5). Questo processo viene poi ripetuto molte volte in parallelo con molti altri cluster. Si ottengono così milioni di cluster clonati di tutti i frammenti di DNA. (Fig. 15, parte 6). Dopo l'amplificazione a ponte, i filamenti invertiti nella cella a flusso vengono tagliati e lavati via, lasciando solo i filamenti corretti bloccando le loro estremità 3' per prevenire una nuova ibridazione con altri oligonucleotidi (Illumina.Inc 2016).

La terza fase inizia con l'estensione del primo primer di sequenziamento per produrre la prima "reads" (lettura) e, a ogni ciclo i nucleotidi contrassegnati con un marcatore fluorescente, competono per attaccarsi ai filamenti di DNA. Solo un nucleotide viene incorporato in base alla sequenza di basi azotate presenti (Adenina con Timina e Citosina con Guanina) (Fig. 16, parte 7). A ogni nucleotide che si aggiunge, i cluster vengono eccitati da una sorgente luminosa (laser), producendo un caratteristico segnale fluorescente: questo particolare processo è chiamato "sequenziamento per sintesi" (Fig. 16, parte 8). Il numero di cicli determina la lunghezza di ogni "reads" mentre la lunghezza d'onda di emissione, insieme all'intensità del segnale, determina l'identificazione delle basi azotate. Una volta completata la lettura della prima "reads", viene lavata via e, un primer "index uno", viene ibridato su ogni filamento della cella a flusso, generando una seconda "reads" in modo simile alla prima. Completata la "reads" riferita "all'index uno", viene anche questa lavata via. Ne consegue che si sbloccano le estremità 3' dei filamenti stampo, in modo tale che si ripieghino a ponte come nella fase di amplificazione. "L'index due" sopraggiunge per ibridarsi come "l'index uno" mentre la polimerasi va a estendere il secondo filamento riformando un ponte a doppio filamento. Il DNA a doppio filamento viene linearizzato e bloccato all'estremità 3' per poi procedere con il taglio e il lavaggio del filamento originale lasciando il filamento invertito sulla cella a flusso. La seconda "reads" inizia con l'introduzione del primer di sequenziamento "index due" e si procede come sopra descritto. Il sequenziamento viene ripetuto fino a raggiungere la lunghezza desiderata della "reads". Alla fine, dopo tutti questi cicli ripetuti, si avranno centinaia di milioni di "reads" che rappresentano tutti i frammenti di DNA nella fase iniziale del processo. (Fig. 16, parte 9-10-11) (Illumina.Inc 2016).

La quarta e ultima fase inizia dalle sequenze raggruppate che vengono poi separate in base agli index introdotti durante la preparazione del campione, mentre le "reads" speculari ma invertite vengono accoppiate creando sequenze contigue (*contig*). I "contig" saranno poi allineati al genoma di riferimento per l'identificazione dell'origine del frammento di DNA. (Fig. 16, parte 12). Più "contig" sono presenti, più informazione genetica si è ottenuta e migliore sarà poi l'allineamento con il genoma. Questo riduce la possibilità di commettere i classici errori causati dalla polimerasi che viene di continuo danneggiata a causa dei ripetuti lavaggi con solventi chimici (Illumina.Inc 2016).





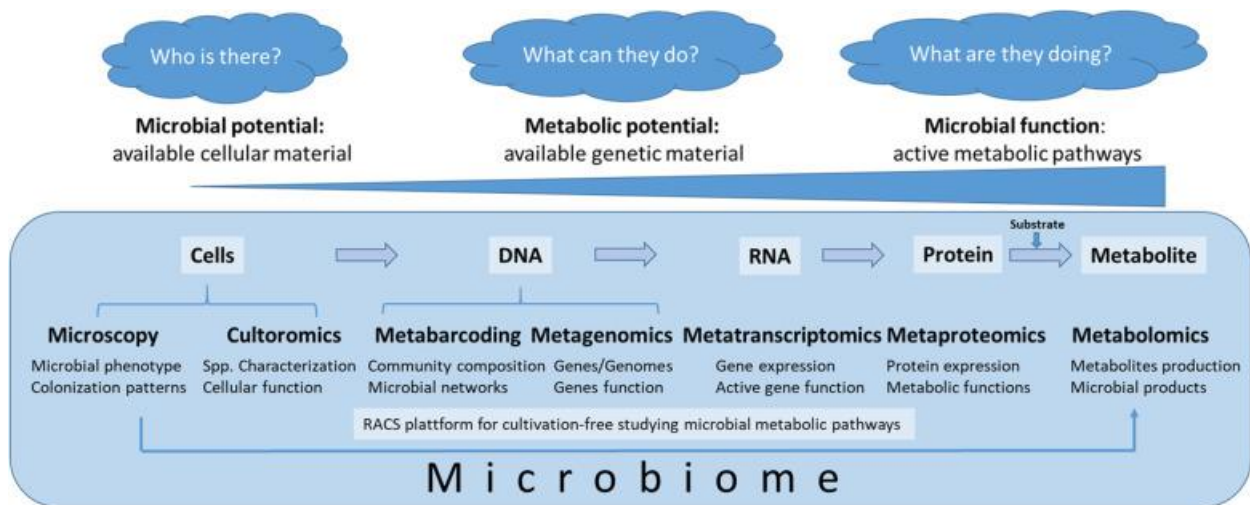
**Figura 16.** Fasi di sequenziamento caratteristiche per la tecnologia illumina con l'ultima fase relativa all'analisi dei dati (Illumina.Inc 2010).

#### 1.4.4 Tecnologie per lo studio del microbioma

Le tecnologie NGS hanno consentito di ottenere una grande quantità di dati di sequenziamento per la ricerca sul microbioma portando i processi di analisi bioinformatica a diventare essenziali per gli studi "Omici". L'attenzione degli studi si è spostata dal potenziale microbico (conoscere il microbiota disponibile in un determinato habitat) al potenziale metabolico (decifrare il materiale genetico disponibile) verso il funzionamento microbico come, ad esempio, la scoperta delle vie metaboliche attive. (Figura 17). Nel tempo sono stati poi sviluppati molti algoritmi computazionali e strumenti software (Tabella 5) per l'elaborazione dei dati di sequenziamento al fine di filtrare le sequenze errate, allineare le "reads", assemblare i "contig", dare una assegnazione tassonomica, calcolare la diversità della composizione microbica etc. (Hamady e Knight 2009).

I metodi di sequenziamento mirati all'analisi dei geni target (Tabella 5), sono i metodi più comunemente utilizzati e comprendono il sequenziamento del gene dell'RNA ribosomiale 16S ma poiché l'intero gene non può essere sequenziato utilizzando metodi ad alto rendimento (Illumina sequenzia "reads" di 250 bp, contro le 1500 bp del gene 16S rRNA), è necessario selezionare una regione più corta della sequenza. Si è scoperto che le regioni V2 e V4 (Figura 11) danno i tassi di

errore più bassi quando si assegna la tassonomia e sono adatte anche per il raggruppamento di comunità (Liu, et al. 2007).



**Figura 17.** Gli studi sul microbioma coprono diverse aree, a partire dal livello delle cellule microbiche intere, seguite dal DNA, RNA, proteine e metaboliti (Berg, et al. 2020).

#### 1.4.4.1 Concetto di OTU

Gli svantaggi dell'analisi del gene target (Tabella 5) portano i ricercatori all'adozione delle unità tassonomiche operative (OTU), una metodologia che raggruppa le sequenze amplificate del gene 16S rRNA in base alla somiglianza e confrontate poi con un database di riferimento per dedurre la tassonomia. Queste OTU fanno riferimento a delle assunzioni, ad esempio, le sequenze con il > 95% di identità rappresentano lo stesso genere, mentre le sequenze con il > 97% di identità rappresentano la stessa specie (Johnson, et al. 2019).

Le analisi basate sui taxa sono particolarmente utili per domandarsi quante specie diverse (o altre unità tassonomiche) possono essere presenti in un campione, per confrontare quali OTU sono condivise tra particolari sottoinsiemi di campioni o per costruire reti metaboliche che mettono in relazione tra loro specie e campioni (Hamady e Knight 2009).

Dunque, chiarire la diversità filogenetica dei microrganismi è solo il primo passo per comprendere la biodiversità. È fondamentale determinare la funzione di ciascun gene a livello proteico e/o metabolico oltre che a raccogliere dati di sequenziamento (Akondi e Lakshmi 2013).

A livello genomico, questi approcci funzionali hanno portato alla scoperta di numerosi nuovi enzimi, antibiotici e altre biomolecole con applicazioni terapeutiche e biotecnologiche (Langer, et al. 2006).

**Tabella 5.** Tecnologie per lo studio del microbioma (Galloway-Peña e Hanson 2020).

	<b>Piattaforma</b>	<b>Software comuni</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>
<b>Analisi del gene target</b>	NGS	QUIIME, Mothur, VEGAN, phyloseq, DADA2	Costi non eccessivi,	-Mancanza di informazioni funzionali chiare -Potenziali errori nella differenziazione dei taxa
<b>Metagenomica “shotgun”</b>	NGS	IDBA-UD, SPAdes, MEGAHIT, MetaPhlan2, MG-RAST, HUMAnN2	Cattura tutti i genomi microbici presenti in un campione	-Costoso -Analisi dei dati impegnativa
<b>Metabolomica</b>	LC/GC-MS*		Consente la profilazione dei metaboliti prodotti dal microbiota, semi-quantitativa	Origine del metabolita sconosciuta
<b>Metaproteomica</b>	LC/GC-MS*		Consente l'identificazione e la quantificazione delle proteine all'interno di un campione	Origine della proteina sconosciuta
<b>Metatrascrittomica</b>	NGS	SOAPdenovo	Consente la valutazione dell'espressione	L'espressione genetica può dipendere dalla traduzione e dalle modifiche post-traduzionali

\* LC= Cromatografia liquida; GC-MS= Gas cromatografia accoppiata a spettrofotometro di massa.

## 1.5 Scopo della tesi

Lo scopo della tesi è quello di capire e descrivere le dinamiche microbiche all'interno di un bioreattore “batch” durante un processo di fermentazione anaerobica di scarti vitivinicoli, utilizzando un approccio di metabarcoding e stimando quella che è la diversità microbica nel bioreattore e i vari fattori ambientali che possono influenzarla.

Nello specifico si è voluto valorizzare attraverso una co-fermentazione anaerobica, substrati come le fecce rosse, fango di vinificazione inoculati con un fango di depurazione delle acque urbane, per il recupero di energia e sostanze dall'alto valore aggiunto, come l'idrogeno e gli AGV. Inoltre, si è previsto un pretrattamento termico al fine di favorire i microrganismi sporigeni produttori di idrogeno valutandone l'efficacia.

Segue la caratterizzazione delle comunità microbiche nei bioreattori mediante il sequenziamento di una porzione del gene 16S rRNA effettuata da una ditta esterna, valutata poi attraverso analisi bioinformatiche che permettono di determinare la composizione e la struttura delle comunità microbiche.

## **2 – Materiali e metodi**

## 2.1 Caratterizzazione dei substrati e dell'inoculo

I substrati utilizzati per questo studio sono stati le fecce rosse di vinificazione e i fanghi attivi disidratati provenienti dall'impianto di depurazione di un'azienda vitivinicola situata in Veneto. L'inoculo consisteva nei fanghi attivi aerobici ispessiti provenienti da un impianto di trattamento delle acque reflue.

Le analisi di caratterizzazione dei substrati e dell'inoculo, sono state effettuate sia sulla frazione solida, sia sulla frazione liquida e sono dettagliate nel paragrafo 2.2.3.

La frazione solida è stata caratterizzata rispetto ai solidi totali (TS), ai solidi totali volatili (TVS), al COD presente nel particolato (pCOD), all'azoto totale Kjeldahl (TKN, *Total Kjeldahl Nitrogen*) e al fosforo. Per la frazione liquida invece, sono state effettuate analisi del pH, dell'sCOD e, dell'azoto ammoniacale  $\text{NH}_4^+$ .

## 2.2 Test batch di fermentazione anaerobica

I test di fermentazione anaerobica sono stati condotti co-fermentando i due substrati nella stessa proporzione dei flussi di scarto reali generati dall'azienda, ovvero con l'80% del COD fornito dalle fecce e il 20% dai fanghi attivi parzialmente disidratati (Da Ros, et al. 2017).

Le fermentazioni sono state condotte in mesofilia (37°C), con un carico organico pari a 23.6 gCOD/L in un volume di lavoro pari a 0.8 L, dotate di un sistema di misura in continuo del volume di biogas prodotto, descritto dettagliatamente nel paragrafo 2.2.1. Il pH è stato mantenuto a 5.5, valore ottimale per la produzione di idrogeno, aggiungendo il tampone MES a una concentrazione di 50mM.

Il test è stato condotto con l'obiettivo di valutare l'effetto dell'aggiunta di un inoculo, pretrattato e non, sulla produzione di AGV e  $\text{H}_2$ . Sono state testate tre condizioni, ciascuna in triplice copia: i substrati senza inoculo (N-I), i substrati con inoculo (I) e i substrati con inoculo pretrattato (I-P). Per verificare la produzione di idrogeno e AGV da parte del solo inoculo, è stato testato in triplice copia anche l'inoculo, pretrattato e non.

I test sono stati inoculati con un rapporto F/M pari a 20gCOD/gCOD (10 gVS/gVS) con fanghi attivi ispessiti provenienti da un impianto di depurazione delle acque reflue. In letteratura viene riportato che l'utilizzo di un inoculo costituito da fanghi aerobici anziché da digestato anaerobico consente di raggiungere rese maggiori di produzione dell'idrogeno (Toledo-Alarcón, et al. 2019). Tipicamente l'inoculo viene pretrattato per eliminare i batteri responsabili del consumo di idrogeno e di favorire quelli che lo producono, appartenenti perlopiù al genere *Clostridium*. Questi microrganismi hanno la capacità di formare spore in risposta a condizioni ambientali avverse, che tornano ad uno stato attivo di crescita non appena viene ristabilito un ambiente favorevole. Il pretrattamento più utilizzato per questo scopo è quello termico, che consiste nel portare l'inoculo a una temperatura compresa tra 90 e 100°C per 15-60 minuti (Bundhoo, Mohee e Hassan 2015). L'elevato calore permette di eliminare i batteri che non producono spore, favorendo i microrganismi produttori di idrogeno. Per queste

ragioni, nel presente lavoro di tesi è stato testato anche il pretrattamento dell'inoculo, portando il fango attivo a una temperatura di 100°C per 30 minuti.

L'andamento dei test di fermentazione è stato monitorato determinando il pH, gli AGV e la produzione di biogas. Il test è stato chiuso quando il sistema ha raggiunto una concentrazione di AGV approssimativamente stabile.

Ai fini dell'analisi microbiologica sono state ricavate 4 Falcon™ (provette coniche da centrifuga) da 15 mL relative ai substrati di partenza quali: la feccia rossa di vinificazione TQ, il fango attivo disidratato vitivinicolo TQ, l'inoculo TQ e l'inoculo pretrattato TQ.

L'andamento della fermentazione è stato monitorato attraverso l'analisi giornaliera del pH, (corretto eventualmente con l'aggiunta di NaOH/HCl 1M), e il campionamento giornaliero di 5 mL di campione per la determinazione del contenuto degli AGV, effettuato tre volte alla settimana (lunedì, mercoledì e venerdì). Inoltre, è stato eseguito il campionamento per la caratterizzazione della comunità microbiologica, prelevando 6 mL di campione. Questo campionamento è stato eseguito allo scopo di seguire il cambiamento della comunità microbica nel tempo, in relazione allo sviluppo degli acidi grassi volatili durante la fermentazione. Le Falcon™ destinate all'analisi della comunità microbica dopo il campionamento sono state sigillate con il Parafilm®.

Il campionamento dai bioreattori è stato fatto manualmente con siringhe da 10 mL e tubicini trasparenti, attraverso l'uso di una porta esterna collocata sul coperchio delle bottiglie. Tutti i materiali (Falcon™, tubicini e siringhe) utilizzati per il campionamento a inizio test sono stati etichettati con il nominativo del rispettivo bioreattore. Inoltre, per evitare la contaminazione incrociata dei bioreattori, dopo ogni campionamento i materiali sono stati risciacquati con acqua distillata e inseriti in autoclave per circa 20 minuti a 121°C sterilizzando il tutto.

Una volta concluse le operazioni di campionamento, i campioni sono stati congelati a -30°C per alcuni mesi: ciò ha permesso di effettuare ulteriori analisi qualora risultasse necessario definire meglio i risultati. Il test è stato fatto partire il giorno 06/06/22 e ha avuto termine dopo 25 giorni di monitoraggio il 01/07/22.

**Tabella 6.** Condizioni operative inizialmente presenti in tutti i bioreattori.

Media di tre repliche	Feccia rossa inserita (g)	Fango attivo disidratato inserito (g)	Inoculo inserito (g)	OL (gCOD/L)	F/M (gTVS/gTVS)
<b>No inoculo</b>	78,981	11,707	0	23,6	10
<b>Inoculo</b>	78,981	11,707	19,983		
<b>Inoculo pretrattato</b>	78,981	11,707	19,983		
<b>Controllo inoculo</b>	0	0	19,983		

### 2.2.1 Fermentatore batch “Nautilus”

Per valutare la conversione dei substrati a bioidrogeno è stato testato il potenziale di produzione di bioidrogeno (*Biological Hydrogen Potential*, BHP). Terminata la fase di produzione del bioidrogeno, qualora presente, il test di fermentazione è stato continuato monitorando la produzione di AGV fino al raggiungimento dello stato stazionario.

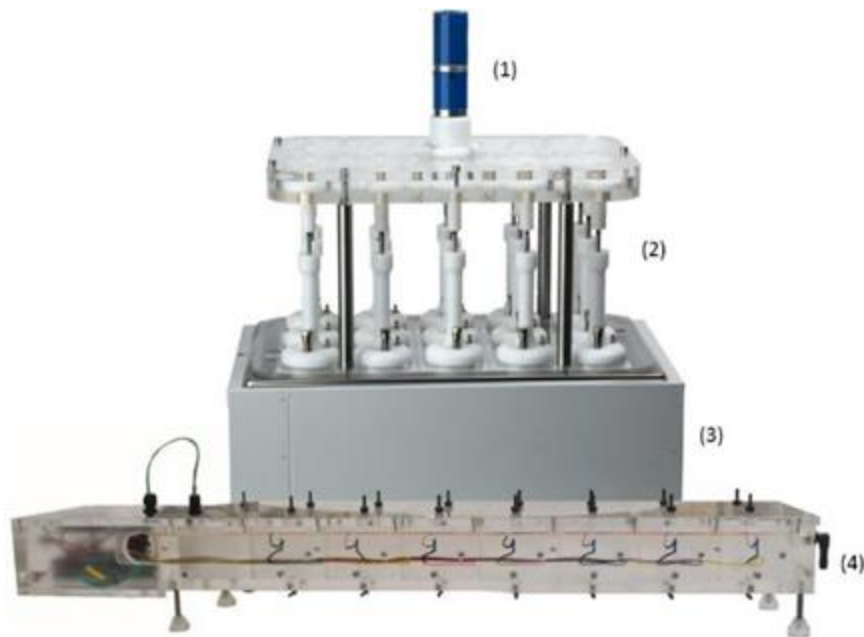
Il test confronta la resa di biogas tra un set di controllo e un set di campioni. È importante quindi ridurre al minimo le differenze operative (temperatura, miscelazione etc.) per garantire risultati coerenti. Il BMP “Nautilus” (Figura 18) è uno strumento standard composto da quattro parti fondamentali:

- il motore centrale viene utilizzato per miscelare ciascun reattore, (bottiglie di HDPE non trasparenti) garantendo una miscelazione omogenea;
- le bottiglie in HDPE sono 15 aventi capacità di 1 L ciascuna e sono dotate di un coperchio particolare, nella cui parte sottostante si trovano delle pale in acciaio inossidabile che ruotano e miscelano il contenuto una volta collegate al motore. Sopra al coperchio si trovano varie porte di accesso che permettono di campionare senza aprire direttamente la bottiglia. L’HDPE è una plastica rigida che non viene intaccata dai microrganismi e rimane stabile fino a 100°C;
- il bagno termostatico è un contenitore rettangolare nel quale vengono immerse le 15 bottiglie chiuse con un coperchio trasparente ermetico. All’interno la temperatura viene mantenuta costante in tutti i reattori e l’evaporazione viene mantenuta al minimo anche in condizioni termofile;
- il flussometro invece misura la generazione del biogas utilizzando un metodo basato sullo spostamento del gas in un liquido attraverso l’uso di una placca di 15 celle. Ogni cella avente capacità 0,2 L contiene un sistema a secchi che ruotano alternati quando il volume di gas



raggiunge i 7 mL. Il liquido è interconnesso in tutte le celle mantenendo così la stessa pressione in testa ai reattori ed è composto da una soluzione di acqua acidificata o distillata per la misurazione del biogas totale.

La raccolta dati avviene in tempo reale attraverso un data-logger Arduino: ciò fornisce la sensibilità necessaria per differenziare le diverse risposte dei microrganismi nell'inoculo alle diverse componenti del substrato. Ad esempio, componenti prontamente biodegradabili come gli zuccheri, determinano una rapida produzione di biogas con il suo conseguente esaurimento. Componenti più complessi come le proteine e grassi possono avere una bassa produzione di biogas iniziale ma rese finali più elevate (Anaero Technology 2023).



**Figura 18.** 1) Motore; 2) bottiglie HDPE; 3) bagnomaria; 4) flussometro (Wen, et al. 2019).

### 2.2.2 Rese

Alla fine del test di fermentazione, le rese di produzione degli AGV e dell'idrogeno sono state calcolate su base COD secondo le equazioni Eq.6 ed Eq.7.

$$Resa_{agv} = \frac{(gCOD_{agv}(t)/L) * V_r}{(tCOD_1 + tCOD_2)} = \frac{gCOD_{agv}}{gCOD_{in}} \quad (\text{Eq.6})$$

$$Resa_{H_2} = \frac{mL H_2}{(tCOD_1 + tCOD_2)} = \frac{mL H_2}{gCOD_{in}} \quad (\text{Eq.7})$$

Dove  $gCOD_{agv}(t)/L$  indica la concentrazione degli AGV nel campione prelevato al tempo  $t$ ;  $tCOD_1$  e  $tCOD_2$  indicano il  $tCOD$  della feccia e del fango inseriti nel reattore all'inizio del test (g);



Vr è il volume del brodo di fermentazione contenuto nel reattore al netto del volume prelevato durante i campionamenti, espresso in L. La resa in AGV viene espressa in gCOD<sub>Agv</sub>/gCOD<sub>In</sub>, dove gCOD<sub>In</sub>= grammi di tCOD dei substrati inseriti nella bottiglia all'inizio del test.

### 2.2.3 Metodi analitici

Di seguito sono riportate le varie analisi eseguite per la caratterizzazione dei substrati, dell'inoculo e dei campioni estratti dai bioreattori durante il monitoraggio. Tutte le analisi sono state condotte secondo i metodi (APAT 2003) e (APHA 2012).

*Solidi totali (TS) e Solidi totali volatili (TVS).*

I TS sono il residuo che permane in una capsula/crogiolo dopo l'evaporazione di un'aliquota di campione, precedentemente filtrato e poi essiccato in stufa a 105°C.

$$TS = \frac{P2-T}{P1-T} 1000 = \frac{gTS}{kgTQ} \quad (\text{Eq.8})$$

I TVS rappresentano il contenuto della sostanza organica contenuta in un campione, l'analisi prevede che il campione precedentemente essiccato in stufa, venga poi posto in forno a muffola a 550°C per 24 ore, al termine si pesano le ceneri e, sottraendo il valore dei TS con le ceneri, si ottiene il valore dei TVS.

$$TVS = \frac{(P2-T)-(P3-T)}{P1-T} 1000 = \frac{P2-P3}{P1-T} 1000 = \frac{gTVS}{kgTQ} \quad (\text{Eq.9})$$

Dove T = peso crogiolo; P1 = peso crogiolo + campione; P2 = peso crogiolo + campione essiccato; P3 = peso crogiolo + TS (ceneri).

*pH*

Il pH è stato determinato con un pHmetro HANNA HI5522 (Hanna Instruments, Inc.). Il suo valore è dato dalla concentrazione degli ioni idrogeno presenti in soluzione.

$$pH = -\log_{10}(H^+) \quad (\text{Eq.10})$$

L'accuratezza della misura è stata garantita mediante calibrazione settimanale a tre punti (pH 7, 4, 10) e pulizia della sonda con soluzione di pulizia per uso generale HI7061L, a base di HCl.

*Domanda chimica di ossigeno nel particolato (pCOD)*

Il pCOD è stato determinato mediante reazione con AgSO<sub>4</sub>, HgSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96% e successiva digestione acida in forno SpeedWave XPERT (Berghof Instruments) a 175°C.

### *Domanda chimica di ossigeno solubile (sCOD)*

L'sCOD è stato determinato attraverso l'uso dello spettrofotometro UV-VIS serie HE1901004 mediante il metodo colorimetrico, dove 2,5 ml di campione TQ diluito con acqua distillata è stato fatto reagire con 1,5 mL di soluzione ossidante e 3,5 mL di soluzione catalizzante. La soluzione ossidante è composta da 208 ml di bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1N, 167 mL di acido solforico ( $H_2SO_4$ ) al 96%, 33,3 g di solfato di mercurio ( $HgSO_4$ ) e acqua distillata per portare al volume di 1 L. La soluzione catalizzante, invece, è composta da 10 g di solfato di argento ( $AgSO_4$ ) e 1 L di  $H_2SO_4$  al 96%. La digestione acida è avvenuta nel forno a  $150^\circ C$  per 2 ore, determinando poi l'eccesso di bicromato attraverso una lettura dell'assorbanza a  $\lambda=600$  nm. La retta di calibrazione è stata eseguita seguendo la procedura sopra descritta, utilizzando una soluzione di potassio ftalato monobasico a concentrazione nota da 50 a 1000 mgCOD/L.

$$sCOD = \frac{ABS}{I} * FD = \frac{mgO_2}{L} \quad (Eq.11)$$

Dove con ABS si indica il valore dell'assorbanza del campione; I = l'intercetta della retta di calibrazione; FD = fattore di diluizione.

### *Azoto ammoniacale (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) mediante metodo potenziometrico.*

L'azoto ammoniacale è stato determinato attraverso l'uso di una sonda specifica per l'ammoniaca intercambiabile alla sonda del pHmetro HANNA HI5522 (Hanna Instruments, Inc.). L'elettrodo a membrana, a diffusione gassosa per ammoniaca, quando inserito all'interno del campione, cattura il gas disciolto presente che fa variare il valore del pH. La concentrazione del gas disciolto risulta poi proporzionale alla variazione del pH avvenuta.

Per calibrare la sonda sono state utilizzate cinque soluzioni a concentrazione nota, provenienti da una soluzione standard 0,1M di ammonio e ottenute mediante diluizione in serie.

$$N-NH_4^+ = 10^{\frac{-mV-q}{m}} * MM_{NH_4^+} * FD * 1000 = \frac{mg}{L TQ} \quad (Eq.12)$$

Dove con mV si indica il potenziale misurato; q = intercetta retta calibrazione; m = coefficiente angolare retta di calibrazione;  $MM_{NH_4^+}$  = peso molecolare ammonio; FD = fattore di diluizione.

### *Azoto totale (TKN) con metodo di Kjeldhal su secco.*

L'analisi ha previsto l'omogeneizzazione dei campioni, seccati poi in stufa a  $105^\circ C$  per 2 giorni. Dopo aver tritato il residuo si effettua una digestione acida del campione a  $370^\circ C$  con acido solforico ( $H_2SO_4$ ) concentrato, previa aggiunta di solfato di potassio ( $K_2SO_4$ ), ed ossido di mercurio ( $HgO$ ) come catalizzatore. Dopo la digestione occorre aggiungere una soluzione di NaOH al 35%. A seguito di una distillazione in corrente di vapore l'azoto ammoniacale totale viene poi trasferito in una

soluzione di acido borico  $H_3BO_3$  alla quale viene aggiunto il reattivo di Nessler per la sua determinazione. Dopo un breve tempo, viene misurata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 410nm.

La concentrazione di azoto totale viene determinata secondo l'equazione:

$$TKN = \frac{(m*ABS*FD*V)}{P} = \frac{g_N}{Kg_{ts}} \quad (Eq.13)$$

Dove con m si indica il coefficiente angolare della retta di calibrazione dell'azoto ammoniacale; ABS = assorbanza del campione; FD = fattore di diluizione; V = volume del matraccio in cui è avvenuta la digestione; P = peso campione secco.

#### *Fosforo totale su secco.*

Il principio del metodo è simile a quello dell'analisi del TKN, ovvero una digestione acida seguita da un'analisi colorimetrica. La digestione acida viene eseguita sul campione secco per mineralizzare tutto il fosforo organico del campione trasformandolo in ortofosfato ( $PO_4^{3-}$ ). L'ortofosfato è stato determinato mediante analisi spettrofotometrica utilizzando una soluzione di molibdato di ammonio, acido solforico e potassio antimonil tartrato (reagente misto).

Il procedimento analitico si basa sulla reazione degli ioni ortofosfato con il molibdato di ammonio e il potassio antimonil tartrato con formazione di un eteropoliacido che successivamente viene ridotto mediante acido ascorbico ( $C_6H_8O_6$ ) a blu di molibdeno, un composto colorato. L'assorbanza di tale complesso viene quindi determinata a una lunghezza d'onda di 882 nm.

Il fosforo totale viene sottoposto a una digestione acida mediante persolfato di potassio. In seguito, si determina l'ortofosfato mediante la sopracitata metodologia spettrofotometrica con reagente misto. La differenza tra il fosforo totale e la concentrazione di  $PO_4^{3-}$  (determinata senza digestione acida), rappresenta la quantità di fosforo organico contenuto nel campione.

Per il calcolo del fosforo totale, l'equazione è la seguente:

$$P_{tot} = \frac{(m*ABS*FD*V)}{P} = \frac{g_P}{Kg_{ts}} \quad (Eq.14)$$

Dove con m si indica il coefficiente angolare della retta di calibrazione del ortofosfato; ABS = assorbanza del campione; FD = fattore di diluizione; V = volume del matraccio in cui è avvenuta la digestione; P = peso campione secco.

#### *Acidi grassi volatili (AGV)*

Per determinare la concentrazione dei AGV nei campioni, è stato eseguito il metodo della cromatografia liquida ad alte prestazioni attraverso il cromatografo HPLC Agilent 1100 SERIES.

La cromatografia ha come scopo la separazione di una miscela nelle sue componenti, permettendo il riconoscimento quantitativo e qualitativo. La separazione è dovuta alle differenze di affinità dei vari componenti della miscela tra la fase fissa e quella mobile. Il segnale analitico dopo l'analisi in cromatografia si chiama cromatogramma ed è composto da una linea di base relativa al segnale della fase mobile in assenza del campione e dai picchi cromatografici dovuti agli analiti che escono dalla colonna contenente la fase fissa (Wenzel, et al. 2013).

Prima di analizzare i campioni all'HPLC, occorre preparare adeguatamente i campioni e creare la retta di calibrazione per la calibrazione dello strumento. La frazione liquida dei campioni è stata separata mediante centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti con centrifuga da banco termostata NEYA 16R (REMI Group). Successivamente, è stata filtrata a 0.2 um con filtri in acetato di cellulosa. La retta a calibrazione nota si crea utilizzando quattro vials a concentrazione nota più il bianco, per accertarsi l'assenza di composti indesiderati. Sono state eseguite le seguenti diluizioni: 1mM, 3mM, 5mM, 10mM e il bianco. Per le diluizioni è stata utilizzata l'acqua MilliQ® (Merck Millipore), un'acqua purificata e deionizzata. Lo standard utilizzato è il "Volatile Free Acid Mix CRM46975", una soluzione a concentrazione pari a 10 mM contenente tutti gli AGV dall'acido formico all'acido eptanoico. La concentrazione degli AGV è stata determinata secondo l'equazione:

$$Conc_{agv} = \frac{(AGV * X)}{1000} * FD = \frac{gCOD}{L} \quad (Eq.15)$$

Dove con AGV si indica la concentrazione fornita dal cromatografo in mMoli/L; X = grammi di O<sub>2</sub> necessari per ossidare chimicamente una mole di AGV, specifico per ogni AGV; FD = fattore di diluizione.

#### *Produzione specifica di biogas (SGP)*

L'SGP rappresenta il volume di biogas prodotto per Kg di sostanza organica alimentata ed è stato determinato su base COD mediante la formula:

$$SGP = \frac{\left(\frac{GP}{tCOD_1 + tCOD_2}\right)}{1000} = \frac{m^3}{Kg_{tCOD}} \quad (Eq.16)$$

Dove con GP si indica la produzione giornaliera di biogas (m<sup>3</sup>/d) e tCOD<sub>1</sub> e tCOD<sub>2</sub> sono la media del tCOD dei due substrati utilizzati.

#### *Determinazione della composizione del biogas*

La composizione del biogas è stata determinata mediante GC equipaggiato con una colonna HP-PLOT MOLESIEVE (30 m x 0,53 mm x 50 micron), utilizzando come gas carrier Argon e come detector un TCD (*Thermal Conductivity Detector*).

## 2.2 Analisi microbiologiche

A fine test è stata analizzata la composizione della comunità batterica su alcuni campioni selezionati sequenziando una porzione del gene 16S rRNA V3-V4 per batteri e *Archaea*, utile in quanto permette di assegnare la tassonomia dei microrganismi. Il sequenziamento è stato prodotto da una ditta esterna, la *BMR Genomics s.r.l* di Padova che ha utilizzato una tecnologia (*Next Generation Sequencing*, NGS) di seconda generazione: l'Illumina®. I dati prodotti dalla *BMR* sono stati analizzati mediante software bioinformatici allo scopo di scoprire la composizione tassonomica dei vari campioni, per poi calcolare gli indici di diversità e infine discutere il cambiamento delle comunità microbiche in base all'andamento della fermentazione anaerobica avventa nei bioreattori.

L'azienda di sequenziamento ha utilizzando i seguenti *primer*: (Takahashi, et al. 2014).

- Pro341F: 5'-CCTACGGGNBGCASCAG -3'
- Pro805R: Rev 5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC -3'

Il sequenziamento ha prodotto ampliconi di lunghezza variabile tra i 440 e 470 paia di basi.

Per poter riconoscere i campioni sulla base delle condizioni testate, sono stati aggiunti i “*barcodes*” durante la reazione di amplificazione (PCR) del gene 16S rRNA (V3-V4) da parte dell'azienda di sequenziamento. I “*barcodes*” sono come dei “*primer*” di circa otto paia di basi presenti all'inizio di ogni sequenza e, grazie a questi “*primer*” è possibile risalire al campione di provenienza.

Il risultato del sequenziamento si compone su dati grezzi compressi in file specifici in formato “*fastq*”, i quali poi sono stati sottoposti alla procedura di analisi bioinformatica.

## 2.3 Analisi bioinformatica

L'analisi bioinformatica è stata eseguita inizialmente attraverso una piattaforma web chiamata “Galaxy Europe” (Galaxy Europe 2023): al suo interno si trovano svariate risorse di calcolo utili per effettuare analisi di dati. Successivamente, è stato utilizzato un programma di statistica denominato “R” per un'ulteriore analisi ecologica dei dati.

### 2.3.1 Metriche di stima della qualità dei dati.

Dai dati grezzi in formato “*fastq*”, è d'obbligo stimarne la qualità, al fine di analizzare solo i dati che presentano un errore di sequenziamento minimo. Generalmente i dati di buona qualità sono riguardanti i primi 150 / 200 cicli di amplificazione della DNA polimerasi. Il formato “*fastq*” è un file misto che contiene delle sequenze e la loro qualità. Ogni sequenza viene riportata su quattro righe e inizia sempre con il simbolo “@” seguito da varie informazioni utili ai tecnici che hanno eseguito il sequenziamento. Dopo queste informazioni, inizia la sequenza di nucleotidi vera e propria separata da un simbolo “+” dalla qualità della sequenza (Figura 19).

Per “qualità” si intende un valore di probabilità legata al rischio di errore nel chiamare un nucleotide nella sua posizione specifica rispetto a un altro. La qualità risulta formata da simboli che



lunghezza delle sequenze presenti, seguita poi da vari grafici nei quali vengono rappresentate le sequenze in relazione alla qualità, al contenuto delle sequenze, alla loro lunghezza etc.

Successivamente, sono state rimosse tutte le sequenze di bassa qualità, utilizzando il programma dedicato “Qiime” (Caporaso, et al. 2010) nella sezione relativa alla metagenomica (Figura 22).

Il programma necessita di una fase intermedia, cioè quella di estrarre tutti i barcodes dalle sequenze: a questo scopo è stato utilizzato il comando “*Format fastq sequences and barcode data*” che crea un file dove ogni sequenza viene associata al suo “*barcode*” e alla sua qualità.

Le sequenze di bassa qualità sono state rimosse attraverso il comando “*Split fastq libraries*” e quelle di buona qualità sono state abbinate a un campione. Il comando esegue due fasi distinte, prima legge la sequenza sulla base del valore di qualità assegnato e, se viene ritenuta di alta qualità, gli assegna il suo campione di provenienza, in alternativa, la sequenza viene rimossa. Il comando genera alla fine tre file chiamati “*log*”, “*histograms*” e “*sequences*”.

Nel file “*log*” viene rappresentata una tabella con il numero di sequenze di qualità associate a ogni campione. Nel file “*histograms*” è rappresentata un’altra tabella con la distribuzione delle sequenze per lunghezza. Infine, nel file “*sequences*” in formato “*fasta*” vengono rappresentate solo le sequenze associate al loro campione di provenienza. I file “*fasta*” contengono solo le sequenze e iniziano con il simbolo “>” seguito dal nome della sequenza (Figura 21).

```
>M13R3_0 SRR10403423.6 1:N:0:ATGCGCAGACTGCATA orig_bc=ATGCGCAGACTGCATA new_bc=ATGCGCAGACTGCATA bc_diffs=0
TACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGACTATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCTTTGATACTGGTAGTCTCGAGTCCGGAAAGAGGT
>M13R3_1 SRR10403423.7 1:N:0:ATGCGCAGACTGCATA orig_bc=ATGCGCAGACTGCATA new_bc=ATGCGCAGACTGCATA bc_diffs=0
TACGTAGGGTGCAAGCGTTGTTCCGGATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCCGCTCGGATGTGAAAACCCAATGGCTTAACCTTGGGCCTGCATTTCGATACGGGCAAACATAGAGTGTGGTAGGGC
>M13R3_2 SRR10403423.8 1:N:0:ATGCGCAGACTGCATA orig_bc=ATGCGCAGACTGCATA new_bc=ATGCGCAGACTGCATA bc_diffs=0
TACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGGCAGGCGGTTATGCAAGACAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCATTAGTGACTGCATAGCTAGAGTGCAGGAGAGGGC
>M13R3_3 SRR10403423.9 1:N:0:ATGCGCAGACTGCATA orig_bc=ATGCGCAGACTGCATA new_bc=ATGCGCAGACTGCATA bc_diffs=0
TACGAGAGGTGCAAGCGTTATTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCATGGCAAGTCACTTGTGAAATCTCCGGGCTTAACCTCGGAACGGCCAAGTGATAGCTGCTGAGCTAGAGTGCAGAAGAGGA
>M13R3_4 SRR10403423.11 1:N:0:ATGCGCAGACTGCATA orig_bc=ATGCGCAGACTGCATA new_bc=ATGCGCAGACTGCATA bc_diffs=0
TACGAAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGTTTAAAGGGTGGCTAGGTTGGGCGATAAGTCAGCGGTGAAATCTCGAGCTCAACTGCAGAATTGCCGTTGATAGTCTCGCTCTTGGAGTACGCTTGAGCT
>M13R3_5 SRR10403423.13 1:N:0:ATGCGCAGACTGCATA orig_bc=ATGCGCAGACTGCATA new_bc=ATGCGCAGACTGCATA bc_diffs=0
TACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTCGTAAGTCGGGTGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTCGAGACTGCGATGCTTAGATATGGGAGAGGA
```

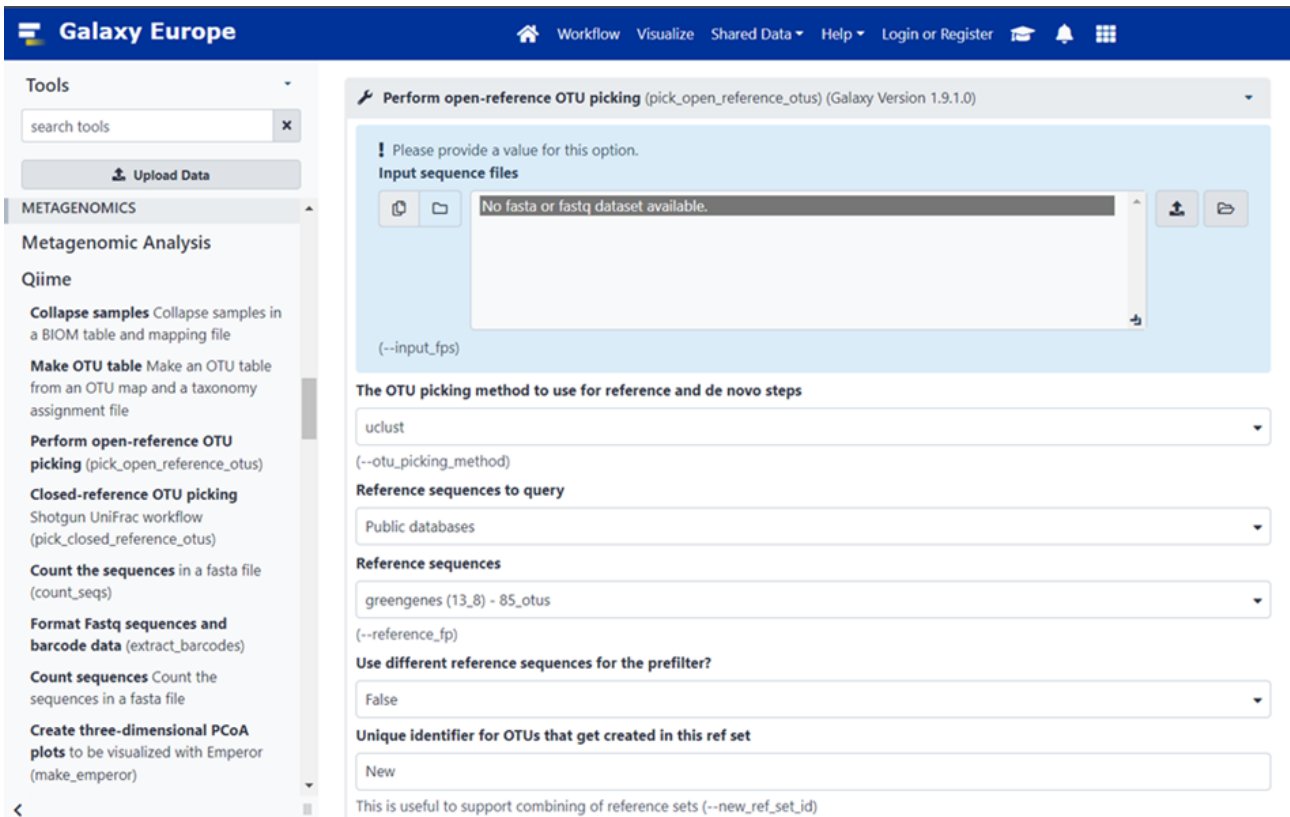
**Figura 21.** Esempio di sequenze nel formato “*fasta*”.

A seguire si è determinata la diversità microbica associata a ogni campione e, data la quantità di dati presenti, si semplifica il processo unendo tutte le sequenze con una similarità superiore o uguale al 97% in “*cluster*”, assegnando poi a ogni “*cluster*” uno specifico taxa. L’utilizzo delle sequenze con una soglia del 97% di identità va a rappresentare sequenze appartenenti alla stessa specie secondo quanto riportato da (Johnson, et al. 2019).

Per unire le sequenze simili in “*cluster*” trovando poi quelle che sono le OTU (*Operational taxonomic unit*), cioè i gruppi di sequenze riferite a uno stesso genere o famiglia di taxa, è stato eseguito il comando “*Perform open-reference OTU picking*” nel programma Qiime. Il comando analizza tutte le sequenze raggruppando quelle simili in OTU e le identifica confrontandole con un database di sequenze note del gene 16S rRNA chiamato “*Greengenes*” (versione 13.8). Il risultato finale si



compone in una tabella chiamata “*OTU table*” sulla quale è possibile condurre analisi sulla diversità, individuando i taxa e la loro abbondanza, paragonarli tra di loro o individuare i fattori che influenzano la diversità.



**Figura 22.** Nella sezione di metagenomica si trova la lista di comandi di Qiime. In dettaglio è rappresentato il comando “*Perform open-reference OTU picking*”.

Il comando “*Perform open-reference OTU picking*” (Figura 22) genera diversi file differenti tra loro:

- il primo file mostra una tabella dove viene rappresentata nella prima colonna, la lista di tutte le OTU trovate e, sulla successiva, l'identità di tutte le sequenze che fanno parte di quella OTU;
- il secondo file mostra quali sequenze il comando ha scelto per rappresentare le varie OTU;
- il terzo file rappresenta la tabella OTU nel formato “*biom*”;
- il quarto file riporta la tassonomia assegnata a ogni OTU;
- il quinto file riporta tutte le OTU per i quali non sono state assegnate una tassonomia;
- nel sesto e ultimo file viene rappresentato l'albero filogenetico di tutte le OTU in forma di testo che poi può essere convertito attraverso strumenti matematici in forma grafica.

Successivamente, è stata convertita la tabella OTU e la relativa tassonomia dal formato “*biom*” al formato “*tsv*” attraverso l'uso del comando “*Convert*”. Il formato “*tsv*” è un formato classico per rappresentare le tabelle e può essere letto dal programma R. Dopo aver creato la tabella, segue l'analisi ecologica dei dati.



### 2.3.3 Analisi ecologica dei dati mediante R

Una volta analizzati i dati nel sito *Galaxy Europe* è stato utilizzato il programma R con l'interfaccia "Rstudio" (versione 2022.12.0+353 "*Elsbeth Geranium*" per Windows) impiegato per calcoli statistici ma anche per analisi ecologiche.

#### 2.3.3.1 Preparazione dei dati

La preparazione dei dati consiste in un primo caricamento della tabella OTU contenente l'assegnazione tassonomica su R all'interno dell'oggetto chiamato "*OTU\_table*" attraverso il comando:

```
> OTU_table <- read.csv("OTU_table.csv", header = T, row.names = 1, sep = "\t")
```

Nella relativa tabella si possono osservare i campioni con le abbondanze delle OTU trovate e la composizione tassonomica che servirà in un secondo momento per rappresentare graficamente i taxa presenti di ogni campione. Inoltre, viene caricata una tabella contenente vari parametri misurati durante il monitoraggio, posta all'interno dell'oggetto "*mapping*":

```
> mapping <- read.csv("mapping.csv", header = T, row.names = 1, sep = "\t")
```

È indispensabile scaricare e attivare tutti i pacchetti di ecologia per effettuare le analisi ecologiche:

```
> install.packages("BiocManager")
> BiocManager::install("phyloseq")
> install.packages("vegan")
> install.packages("ggplot2")
> library(vegan)
> library(phyloseq)
> library(ggplot2)
```

Il pacchetto "*phyloseq*" versione 1.16.2 (McMurdie e Holmes 2013) è uno strumento per analizzare i dati di sequenziamento che sono già stati raggruppati in unità tassonomiche operative "OTU" mentre "*vegan*" versione 2.6-4 (Oksanen, et al. 2022) è un pacchetto che contiene tutte le analisi principali da effettuare sulle comunità microbiche. Infine, il pacchetto "*ggplot2*" versione 3.4.0 (Wickham 2016) fornisce rappresentazioni grafiche più dettagliate.

Per le analisi sulla diversità, occorre disporre di una tabella completamente numerica. Viene quindi eliminata la colonna relativa alla tassonomia (colonna n. 31), eseguendo il comando:

```
> OTU_tableNUM <- OTU_table[,1:30]
```

Per rappresentare in un'unica tabella tutti i risultati ottenuti di ogni campione e successivamente comparare i campioni tra di loro graficamente, viene creato l'oggetto "*PS*" utilizzando la funzione "*phyloseq*" ed eseguendo i comandi:

```

> OTU <- otu_table(OTU_tableNUM, taxa_are_rows = T)
> Taxonomy <- OTU_table$Taxonomy
> MTaxonomy <- as.matrix(Taxonomy)
> Taxsplit <- do.call(rbind(strsplit(MTaxonomy, ";")))
> row.names(Taxsplit) <- OTU_table$OTU.ID
> colnames(Taxsplit) <- c("Kingdom", "Phylum", "Class", "Order", "Family", "Genus")
> TAXA <- tax_table(Taxsplit)
> PS <- phyloseq(OTU, TAXA, sam_data(mapping))

```

### 2.3.3.2 Calcolo dell'alfa diversità

Prima di effettuare qualsiasi analisi sulla diversità, è solito eseguire un'analisi di rarefazione. L'analisi di rarefazione permette di affermare che tutti i campioni siano stati sufficientemente sequenziati per rappresentarne l'identità e lo si può rappresentare mediante una curva di rarefazione. La curva di rarefazione è un grafico dove il numero di specie è in relazione con il numero di campioni. Se la curva di rarefazione raggiunge il plateau, indica una ricchezza all'interno dei campioni e una diversità tale per cui i campioni possono essere considerati nelle analisi successive. (Sanders 1968).

```

> raref <- ggrare(physeq = PS, step = 50, se = F, plot = F), ggtitle("Rarefaction curves"), aes(color =
factor(campionamento)), facet_wrap(~bioreattore), scales = "free_y"
> raref

```

Accertato che le curve di rarefazione raggiungessero il plateau, è stata creata una tabella con vari indici di alfa diversità, tra cui gli indici di Shannon, Simpson e Pielou di tutti i campioni.

L'indice di Shannon combina la ricchezza e l'uniformità in un unico valore e viene calcolato attraverso la formula:

$$\text{Shannon} = -\sum_{i=1}^S p_i \log(p_i) \quad (\text{Eq.17})$$

Dove con "pi" si indica il rapporto tra il numero di individui della stessa specie e il numero totale di individui; S indica il numero di specie presenti.

L'indice di Simpson indica la probabilità che due individui presi casualmente appartengano alla stessa specie e viene calcolato con la formula:

$$\text{Simpson} = \sum \frac{ni(ni-1)}{N(N-1)} \quad (\text{Eq.18})$$

Dove con "ni" si indica il numero totale di individui appartenenti a tutte le specie; N indica il numero totale di individui di una determinata specie.

L'indice di Pielou va a determinare attraverso un intervallo da 0 a 1, se le specie presenti all'interno dei campioni sono distribuite uniformemente (valore = 1) oppure no (valore = 0). Si calcola dividendo il numero di Shannon con il logaritmo del numero di Simpson:

$$\text{Pielou} = \frac{\text{Shannon}}{\log(\text{Simpson})} \quad (\text{Eq.19})$$

All'interno del programma R, questi indici di alfa diversità vengono calcolati nel seguente modo:

```
> div_data <- cbind(estimate_richness(PS), sample_data(PS))
> rownames(div_data) <- sub('X', '\\1\\2', rownames(div_data))
> OTU_tab <- otu_table(PS)
> Shannon <- diversity(OTU_tab)
> Richness <- specnumber(OTU_tab)
> PielouEvenness <- Shannon/log(Richness)
> div_data <- add_column(div_data, Evenness = PielouEvenness, .after = "Fisher")
```

Per rappresentare graficamente in boxplot l'alfa diversità di tutti i campioni viene eseguito il comando:

```
> plot_richness(PS, x = "bioreattore", color = "campionamento", measures = c("Observed",
"Shannon", "Simpson")), geom_boxplot(aes(group = bioreattore))
```

### 2.3.3.3 Calcolo della diversità tassonomica

Il modo più efficace per descrivere la tassonomia è quello di rappresentare graficamente tutti i campioni attraverso un grafico a barre. I valori della tabella OTU sono stati trasformati da abbondanza assoluta a relativa, rappresentando graficamente la classificazione a livello di phylum con i comandi:

```
> PS.All <- transform_sample_counts(PS, function(OTU) OTU/sum(OTU))
> plot_bar(PS.All, facet_grid(~bioreattore, scales = "free_x", space = "free_x"),
geom_bar(aes(fill=Phylum), stat="identity", position="stack")
```

### 2.3.3.4 Calcolo della beta diversità

La distanza tra i vari campioni viene stimata usando l'indice di dissimilarità di Bray-Curtis (Bray e Curtis 1957). L'indice confronta l'abbondanza degli individui tra due o più habitat e il numero di individui trovati al loro interno. Per calcolarlo viene utilizzata la seguente formula:

$$\text{Bray-Curtis} = \frac{1 - (2 * C_{ij})}{(S_i + S_j)} \quad (\text{Eq.20})$$

Dove con "C<sub>ij</sub>" si indica la somma dei valori minimi delle specie presenti in ciascun sito; S<sub>i</sub> e S<sub>j</sub> indicano la somma delle specie che si trovano nel sito i e j rispettivamente.

Attraverso il pacchetto “*phyloseq*” è possibile eseguire l’eq.20 con il metodo NMDS (*non-metric multidimensional scaling*), riferito all’analisi PCoA (*Principal Component Analysis for dissimilarity*). La PCoA è una tecnica analoga alla PCA (*Principal Component Analysis*) ma, mentre la PCA necessita di una matrice contenente il numero di volte in cui ogni specie è stata osservata in ciascun ambiente, la PCoA necessita di una matrice delle distanze tra campioni in ciascun ambiente (Lozupone, et al. 2007). La matrice di dissimilarità viene eseguita attraverso il comando:

```
> nmds.bray <- ordinate(PS, method = "NMDS", distance = "bray", k = 3)
```

La matrice generata viene rappresentata poi graficamente con i comandi:

```
> pNMDS <- plot_ordination(PS, nmds.bray, color = "campionamento", shape = "bioreattore")
> pNMDS, geom_point(size = 2), geom_text(label = row.names(sample_data(ps)), nudge_x = 0.04,
nudge_y = -0.06, size = 2.5, check_overlap = T), ggtitle("Bray-Curtis")
```

Per scoprire quali sono i parametri che rendono simile o viceversa un gruppo di campioni rispetto a un altro viene eseguito un comando, il quale correla i parametri ambientali all’analisi della PCoA:

```
> en <- envfit(nmds.bray, mapping[,2:7], permutations = 999, na.rm = TRUE)
> en
```

Il comando “*envfit*” del pacchetto “*vegan*” riassume in una prima parte i parametri misurati testandoli singolarmente e, nella seconda parte, mostra la correlazione tra i vari parametri. Il risultato è un valore statistico compreso da 0 a 1, nel quale più un parametro è correlato, più è vicino allo zero. Se invece non influenza la distribuzione spaziale, risulta un valore vicino a 1.

### 2.3.3.5 Stima dei taxa caratteristici

Per l’ultima analisi occorre scaricare un nuovo pacchetto chiamato “*indicspecies*” versione 1.7.12 (De Caceres e Legendre 2009) eseguendo i comandi:

```
> install.packages("indicspecies")
> library(indicspecies)
> OUT_tab <- otu_table(PS)
> indvalM <- multipatt(OTU.tab, mapping$campionamento, control = how(nperm=999))
> summary(indvalM)
```

Il “*multipatt*” è una funzione genera gruppi e combinazioni di gruppi al fine di confrontarli tra loro in relazione ai ceppi batterici presenti nei campioni. Il risultato mostra una serie di gruppi nei quali al loro interno si trovano dei taxa caratteristici per ogni gruppo. In base al parametro che si indica (per esempio la data di campionamento), la funzione trova quei taxa indicativi che rendono caratteristico quel gruppo o combinazione di più gruppi.

## **3 – Risultati e discussioni**

### 3.1 Caratterizzazione substrati e inoculo

Da una prima analisi sulla caratterizzazione dei substrati basata sulla determinazione dei TS e TVS, i fanghi attivi parzialmente disidratati provenienti dalla cantina hanno un rapporto TVS/TS maggiore del 14% rispetto all'inoculo, costituito da fanghi attivi provenienti da un impianto di depurazione delle acque reflue urbane. Il fango vitivinicolo risulta composto da una percentuale maggiore di sostanze biodegradabili rispetto all'inoculo, probabilmente a causa della maggiore biodegradabilità delle acque reflue vitivinicole trattate, rispetto alle acque reflue urbane.

I valori medi dei TS e TVS del fango vitivinicolo e della feccia rossa sono coerenti con quanto riportato da Da Ros, et al. 2017. (Tabella 7).

Considerando il COD della feccia rossa, risulta essere maggiormente presente nella sua forma solubile (sCOD), pari all'85% del tCOD. Probabilmente, è dovuto al contenuto in etanolo delle fecce di vinificazione che, da letteratura, si attesta attorno a 180 gCOD/L (Kucek, et al. 2016). Nell'inoculo, costituito da fanghi attivi, il COD è presente principalmente nella frazione solida (pCOD), pari al 97% del tCOD. Questo è coerente con la composizione dei fanghi attivi che sono costituiti quasi totalmente dalla biomassa generata durante il processo di trattamento delle acque reflue. Il pCOD, invece, risulta essere simile nel fango vitivinicolo e nell'inoculo con valori tra 1000 e 1050 gO<sub>2</sub>/KgTS, mentre la feccia presenta metà del loro pCOD.

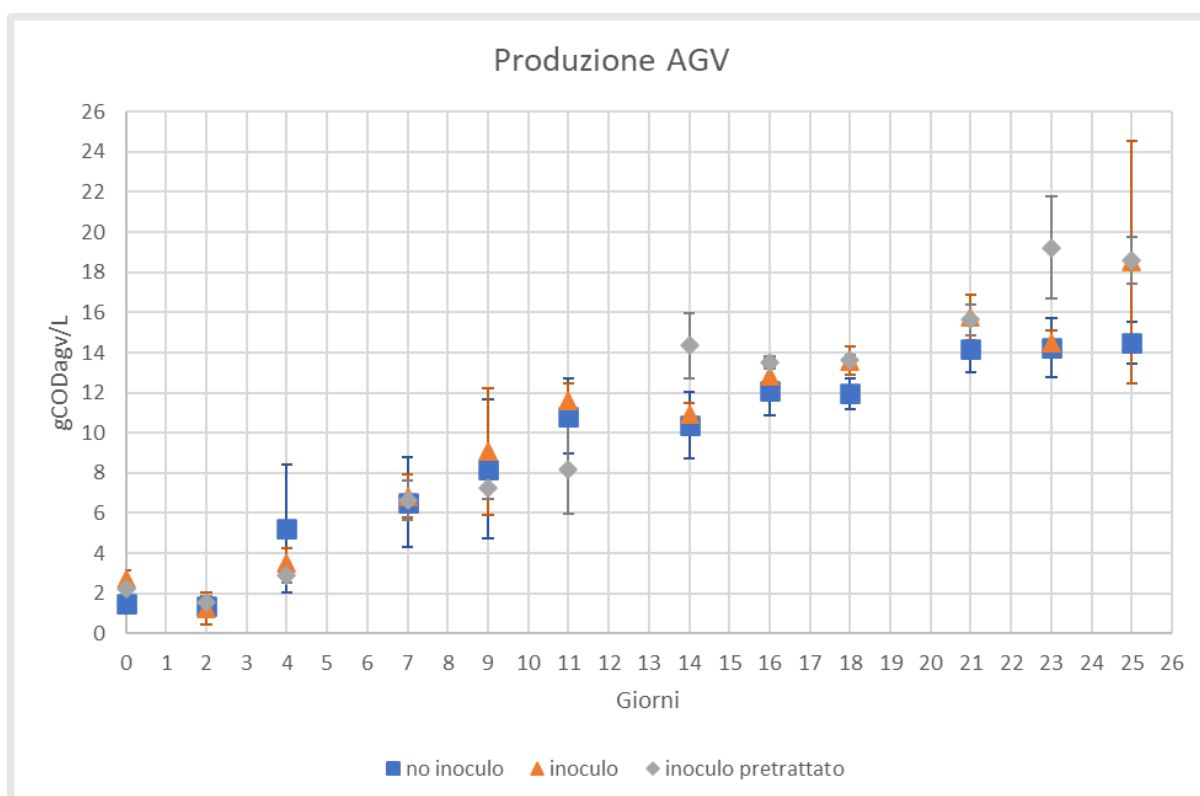
**Tabella 7.** Dati relativi alla caratterizzazione dei substrati più l'inoculo.

Parametro	Unità di misura	Feccia		Fango		Inoculo	
		Media	Dev.st	Media	Dev.st	Media	Dev.st
<b>pCOD</b>	gO <sub>2</sub> /kgTS	471,67	± 63,12	1044,07	± 101,10	1011,88	± 47,5
<b>sCOD</b>	gO <sub>2</sub> /L	198,66	±16,96	-	-	0,77	±0
<b>tCOD</b>	gO <sub>2</sub> /L	231,73	-	205,59	-	30,02	
<b>pH</b>		3,6	-	-	-	7,5	-
<b>N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	mg/L TQ	47,59	-	-	-	-	-
<b>TKN</b>	gN/kgTS	30,7	-	38,23	-	-	-
<b>P TOT</b>	gP/kgTS	5,108	±0,069	8,872	±0,107	-	-
<b>TS</b>	g/kg	70,1	±0	196,9	±0,2	28,9	±0
<b>TVS</b>		32,8	±0	176,6	±0,2	22,0	±0
<b>TVS/TS</b>		47%	±0%	90%	±0%	76%	±0%

## 3.2 Test di fermentazione

### 3.2.1 Produzione di AGV.

I valori degli AGV prodotti sono stati riportati in gCOD<sub>agv</sub>/L. Le tre condizioni hanno avuto un andamento medio crescente di produzione degli AGV durante la prima settimana molto simile. I substrati con inoculo pretrattato (I-P) dal settimo giorno in poi, hanno presentato alcune differenze rispetto alle altre condizioni, con una produzione di AGV più accentuata nel quattordicesimo e nel ventitreesimo giorno di monitoraggio. I substrati senza inoculo (N-I) e con inoculo (I) presentano un andamento pressoché identico variando solo in termini quantitativi fino al ventitreesimo giorno. Mentre la condizione “N-I” si stabilizza, la condizione “I” riprende la sua produzione di AGV (Figura 23). Il pH è stato mantenuto a circa 5.5 in tutte le condizioni correggendolo con NaOH qualora risultasse necessario.

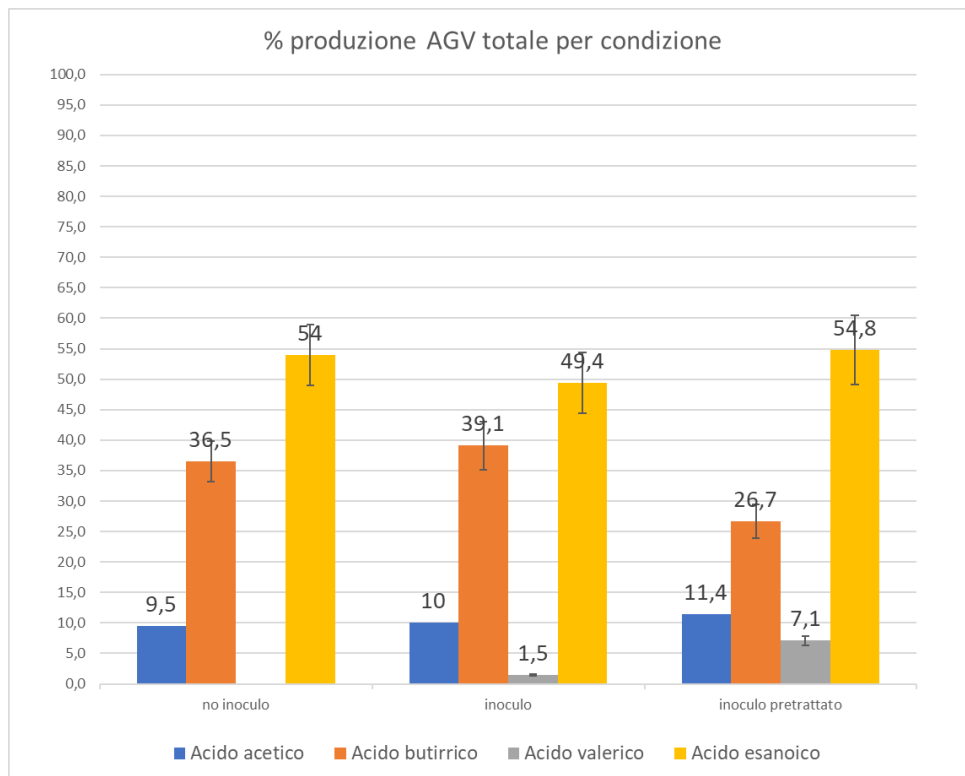


**Figura 23.** Andamento medio della produzione di AGV nelle tre condizioni testate.

La situazione di plateau verso la fine del test (giorno 21, 23, 25) è indice del raggiungimento della produzione massima di AGV. La condizione “I-P” ha raggiunto la stabilità gli ultimi giorni (23, 25). La deviazione standard osservata in tutte le repliche dal giorno 4 fino a fine test è dovuta a una più alta concentrazione di acido esanoico presente in una delle tre repliche. (Figura 23)

Alla fine del test (giorno 25), in tutte le condizioni gli AGV prodotti sono stati l'acido acetico, (9,5-11,4%) l'acido butirrico (26,7-39,1%) e l'acido esanoico (49,4-54,8%). L'acido valerico è stato riscontrato solo nelle condizioni “I” (1,5%) e “I-P” (7,1%) (Figura 24).





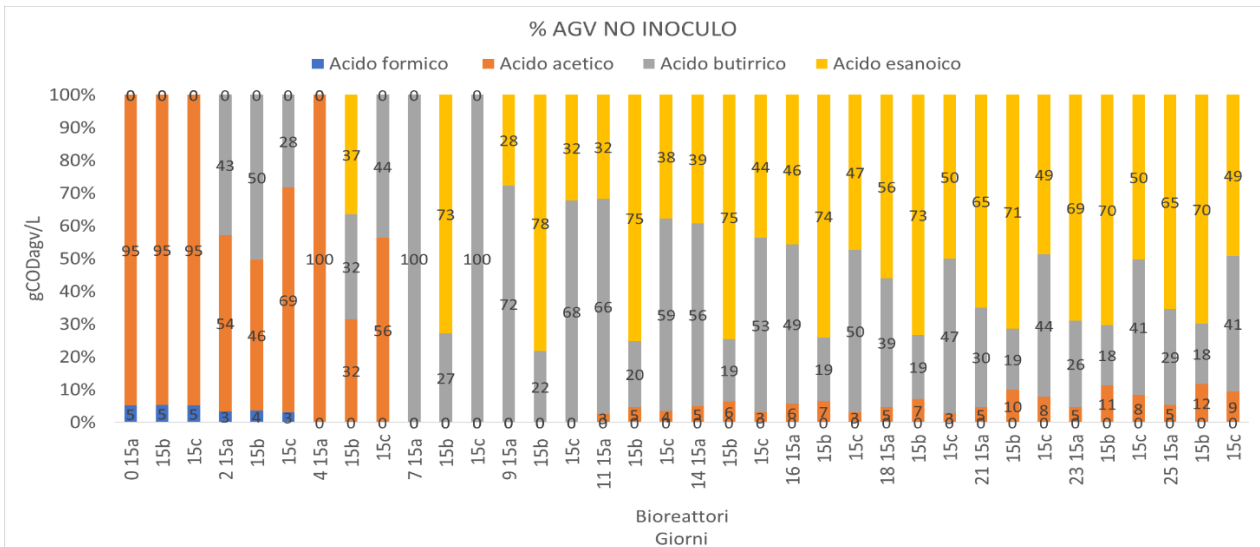
**Figura 24.** Percentuale totale di fine test degli AGV prodotti nelle tre condizioni testate.

Le percentuali relative alla produzione degli AGV in tutti i bioreattori sono rappresentate in figura 25, 26, e 27 di sotto riportate. È possibile osservare che l'andamento di fermentazione è risultato simile. Si individuano tre fasi ben distinte: la prima riguarda la produzione di acido acetico, la seconda la produzione di acido butirrico e la terza la produzione di acido esanoico.

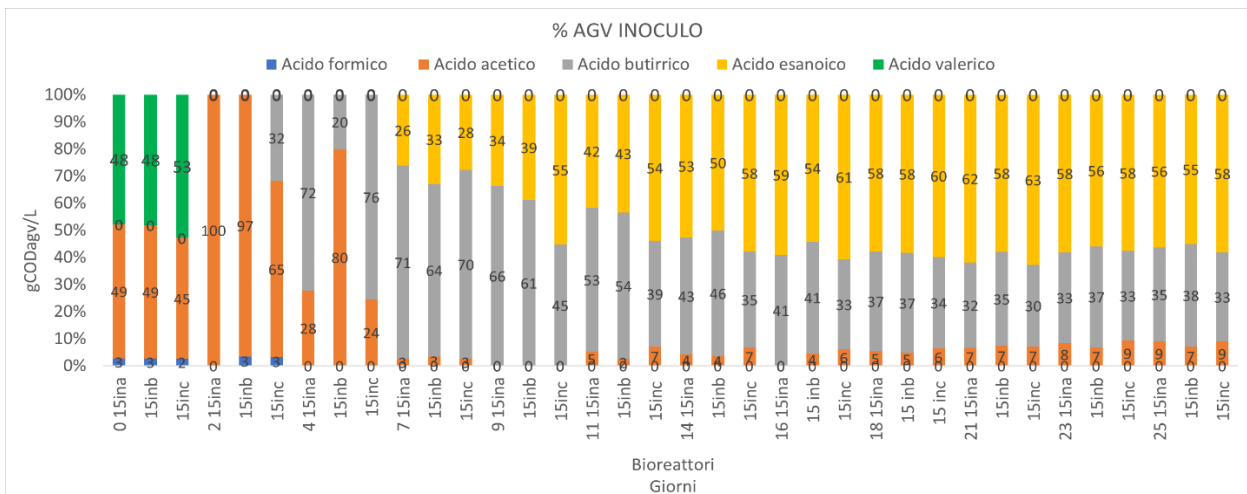
In tutte le condizioni, l'acido acetico ha predominato nei primi giorni con un calo di concentrazione a fine settimana. In seguito, è aumentata progressivamente la sua concentrazione fino a fine test. Anche l'acido butirrico è stato prodotto fin da subito in tutte le condizioni. Dopo una settimana, le sue concentrazioni sono rimaste costanti fino a fine test. L'acido valerico si presenta a concentrazioni basse nella condizione "I" e nella condizione "I-P". In quest'ultima, l'acido valerico, è stato prodotto a metà e a fine test.

L'acido esanoico, invece, in tutte le condizioni si presenta dopo una settimana dall'inizio del test. La sua concentrazione è aumentata con il passare del tempo raggiungendo concentrazioni elevate, risultando l'AGV più prodotto e presente da metà, fino alla fine del monitoraggio.

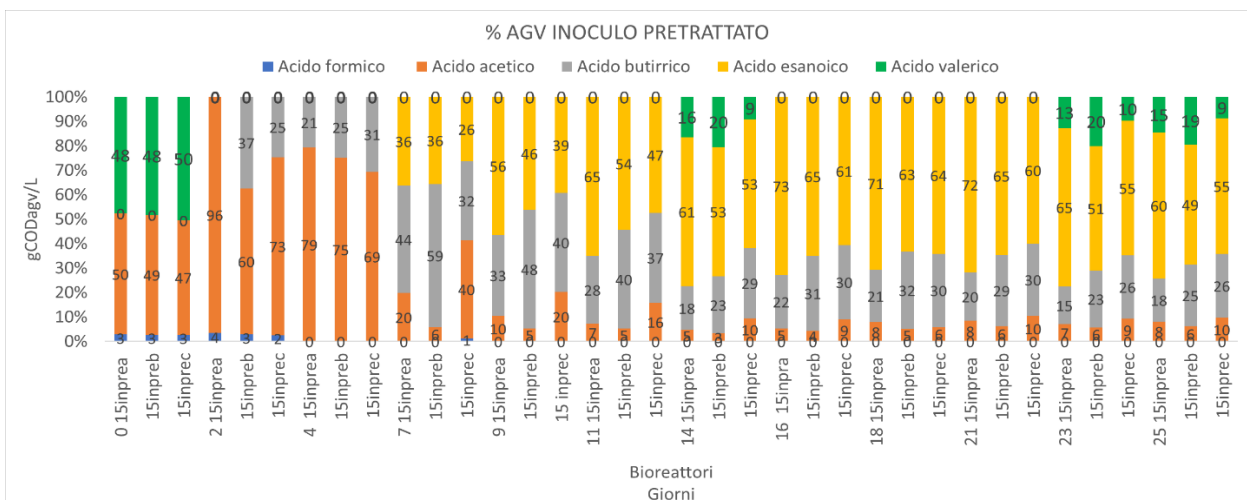
La media della concentrazione degli AGV e le rese sono state calcolate su base COD tenendo in considerazione i valori degli ultimi giorni (21, 23, 25) nei quali si è raggiunta una stabilità. Per la condizione "I-P" i relativi valori sono stati calcolati nei due giorni di stabilità (23, 25). La resa più alta è data dalla condizione "I-P", con  $0,83 \pm 0,06$  gCOD<sub>agv</sub>/gCOD<sub>in</sub> in segue la condizione "I" con  $0,64 \pm 0,02$  gCOD<sub>agv</sub>/gCOD<sub>in</sub>. Infine, la condizione "N-I" con  $0,61 \pm 0,01$  gCOD<sub>agv</sub>/gCOD<sub>in</sub> (Tabella 8). La presenza dell'inoculo è riuscita a massimizzare la resa degli AGV nel processo fermentativo grazie ai batteri che hanno migliorato il tasso di idrolisi (Xu, et al. 2012).



**Figura 25.** Profilo degli AGV prodotti nella condizione “N-”. Sono illustrati i dati di ogni replica, indicando la percentuale di ciascun AGV. L’asse delle x riporta il nome dei bioreattori (15 a, b, c) e il tempo espresso in giorni, indicato sulla replica 15 a.



**Figura 26.** Profilo degli AGV prodotti nella condizione “I”. Sono illustrati i dati di ogni replica, indicando la percentuale di ciascun AGV. L’asse delle x riporta il nome dei bioreattori (15 ina, inb, inc) e il tempo espresso in giorni, indicato sulla replica 15 ina.



**Figura 27.** Profilo degli AGV prodotti nella condizione “I-P”. Sono illustrati i dati di ogni replica, indicando la percentuale di ciascun AGV. L’asse delle x riporta il nome dei bioreattori (15 inprea, inpreb, inprec) e il tempo espresso in giorni, indicato sulla replica 15 inprea.

**Tabella 8.** Concentrazione degli AGV, rese e pH misurati alla fine dei test batch.

Parametro	Unità di misura	No inoculo		Inoculo		Inoculo pretrattato	
		Media	Dev.st	Media	Dev.st	Media	Dev.st
pH		5,43	±0,06	5,41	±0,05	5.40	±0,05
AGV	gCOD <sub>agv</sub> /L	14,3	±1,23	15,11	±0,70	19,63	±0,88
Acido formico		0	±0	0	±0	0	±0
Acido acetico		1,16	±0,44	1,20	±0,08	1,40	±0,24
Acido butirrico		4,18	±1,37	5,05	±0,20	4,11	±0,89
Acido valerico		0	±0	0	±0	3,03	±0,89
Acido esanoico		8,96	±2,26	8,85	±0,55	11,10	±1,79
Resa	gCOD <sub>agv</sub> /gCOD <sub>in</sub>	0,61	±0,01	0,64	±0,02	0,83	±0,06

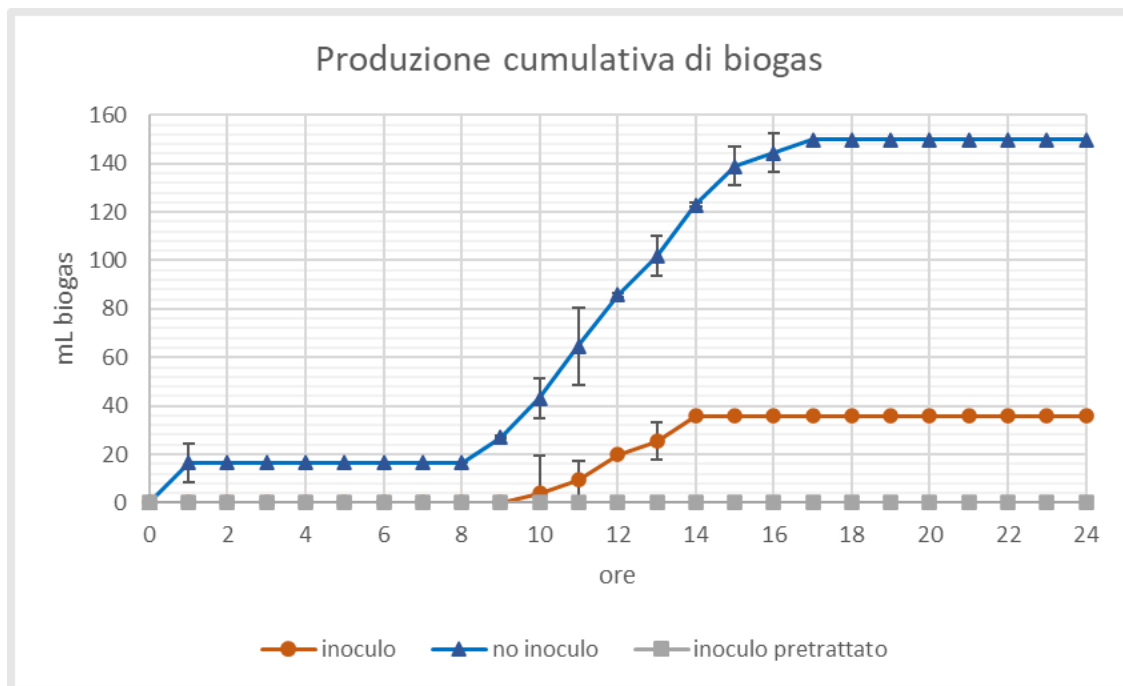
### 3.2.2 Produzione di biogas

La produzione di biogas è stata riscontrata nelle condizioni “N-I” e “I”, mentre la condizione “I-P” non ha prodotto biogas. Data la scarsa produzione di biogas in tutte le repliche nelle tre condizioni, non è stato possibile determinarne la sua composizione. A seguito di un test precedentemente effettuato in bottiglie di vetro con le medesime condizioni operative, è stata stimata una percentuale di H<sub>2</sub> del 40% per la condizione “N-I”. I risultati riguardanti il test sopra citato non sono presentati nell’ambito di questa tesi.

Come mostrato in figura 28, nella condizione “N-I” la produzione di biogas è iniziata dopo circa 8 ore, raggiungendo una produzione cumulativa pari a 150 ± 7,74 mL di biogas dopo 16 ore. La media considera solo due repliche, in quanto una (15b) non ha prodotto biogas. L’SGP è risultato essere di 7.9 mL di biogas/gtCOD (0,008 m<sup>3</sup>/kgtCOD). La resa dell’idrogeno è stata calcolata, ed è pari a 3,17 mL di H<sub>2</sub>/gCOD.

Nella condizione “I” la produzione di biogas è iniziata dopo 10 ore dall’inizio del test e, a 4 ore, si è fermata accumulando anche in questo caso in due repliche (15ina non ha prodotto) una media di 35,9 ± 0,44 mL di biogas. L’SGP è risultato essere di 1,9 mL di biogas/g tCOD (0,0019 m<sup>3</sup>/kgtCOD).

Nella condizione “I-P” non è stata registrata alcuna produzione di biogas.



**Figura 28.** Andamento medio della produzione di biogas relativo alle ore intercorse tra l'inizio del test e il giorno successivo nelle tre condizioni.

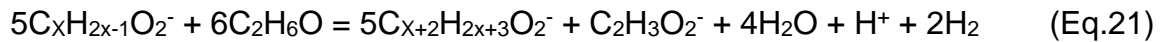
### 3.3 Discussione test di fermentazione

I test di fermentazione anaerobica condotti hanno mostrato che l'utilizzo dell'inoculo ha aumentato la resa in AGV, con  $0,83 \pm 0,06$  gCOD<sub>agv</sub>/gCOD<sub>in</sub> per la condizione "I-P",  $0,64 \pm 0,02$  gCOD<sub>agv</sub>/gCOD<sub>in</sub> per la condizione "I", e  $0,61 \pm 0,01$  gCOD<sub>agv</sub>/gCOD<sub>in</sub> per la condizione "N-I". Invece, non ha favorito la produzione di idrogeno, che è stata inferiore a quella osservata durante la co-fermentazione dei soli substrati. Il pretrattamento dell'inoculo ha favorito la produzione di AGV ma, al contrario di quanto atteso, non ha incrementato la produzione di idrogeno.

L'abbondante presenza di acido esanoico è un indicatore di un processo chiamato allungamento della catena (*chain elongation*, CE) che avviene attraverso una reazione denominata β-ossidazione inversa (Scarborough, et al. 2018).

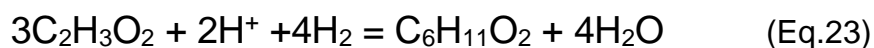
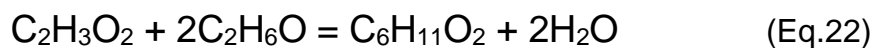
La β-ossidazione inversa richiede la presenza di composti riducenti e ricchi di energia come etanolo e lattato, per fornire energia, equivalenti riducenti ed acetil-CoA attraverso varie vie microbiche. (Spirito, et al. 2014). Nelle fecce rosse di vinificazione è presente una gran quantità di etanolo, che è un composto riducente ricco di energia, ritenuto il miglior donatore di elettroni per il processo CE (Wu, et al. 2019). Prima che i microrganismi attuino la β-ossidazione inversa, le sostanze carboniose come l'etanolo o l'acido lattico, vengono prima trasformate in acetil-CoA. L'acetil-CoA viene poi combinato con l'acido acetico prodotto durante l'idrolisi o ad altri SCFA, per instaurare il processo CE (Shi, et al. 2021). In questo caso, si è prodotta una quantità di acido acetico iniziale (contenente 2 molecole di carbonio), trasformato poi in acido butirrico (con 4 molecole di carbonio) nella prima reazione di β-ossidazione inversa e poi, a seguito di una seconda reazione, l'acido butirrico è stato allungato in acido esanoico (6 molecole di carbonio).

La reazione complessiva della  $\beta$ -ossidazione inversa è: (Roghair, et al. 2018)



I microrganismi operanti nel processo CE ossidando l'etanolo, utilizzano sei molecole di etanolo come donatore di elettroni e cinque molecole di acido acetico come accettore di elettroni. Le sei molecole di etanolo vengono convertite in acetil-CoA e, tra queste, cinque molecole di acetil-CoA vengono trasformate direttamente in molecole di butirril-CoA e una molecola di acetil-CoA viene trasformata in acido acetico. Quando si avranno cinque molecole di acido acetico e cinque molecole di butirril-CoA si genera l'acido butirrico come prodotto della prima reazione di  $\beta$ -ossidazione inversa (Shi, et al. 2021). Durante la reazione si genera inoltre, acqua e idrogeno. L'aumento della concentrazione degli acidi acetico, butirrico e esanoico risulta quindi coerente con l'aumento progressivo degli AGV.

La produzione di acido esanoico è un prodotto collaterale nelle fermentazioni acidogeniche di biomassa complessa, che presentano elevate concentrazioni di AGV, piccole quantità di etanolo e un'elevata pressione di idrogeno. Viene quindi indotta la produzione di acidi carbossilici con una catena più lunga come l'acido butirrico e l'acido esanoico. (Steinbusch, et al. 2010). Nelle fermentazioni con colture miste, non solo l'etanolo (Eq.22), ma anche  $H_2$  può essere utilizzato come donatore di elettroni (Eq.23), le reazioni di produzione dell'acido esanoico sono: (Steinbusch, et al. 2010)



È dunque possibile che inizialmente si è instaurato una eccessiva ossidazione dell'etanolo causata dalla bassa pressione parziale di  $H_2$  presente nei bioreattori, portando a un incremento di concentrazione degli AGV. Dopo aver ridotto il quantitativo di etanolo e aumentato la pressione parziale di  $H_2$ , l'idrogeno si è sostituito all'etanolo come donatore di elettroni per continuare il processo CE con la produzione di acido esanoico.

### 3.4 Analisi bioinformatica

A seguito dei risultati ottenuti, sono state fatte alcune considerazioni sui potenziali campioni da spedire alla ditta di sequenziamento per effettuare poi l'analisi bioinformatica. Sulla base dell'obiettivo dello studio, cioè quello di valutare come cambia la comunità microbiologica durante la fase fermentativa seguendo la produzione di AGV, l'allungamento della catena che si è verificato negli AGV e la produzione di biogas nelle prime 16h di test, sono stati scelti 30 campioni. Di cui:

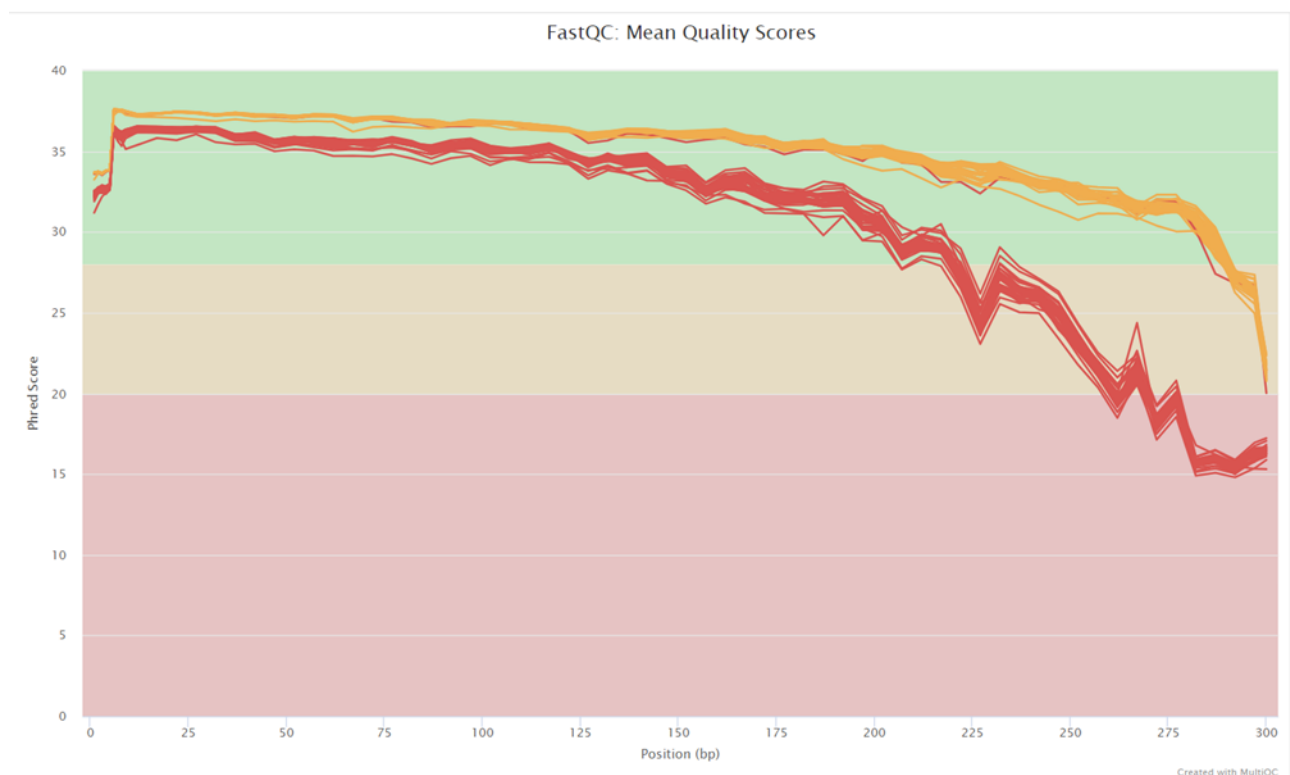
- 9 campioni del giorno di inizio test 06/06/22 (giorno 0);

- 9 campioni del giorno 07/06/22 che rappresentano la fine della produzione di biogas (giorno 1);
- 9 campioni del giorno di fine test 01/07/22 (giorno 25);
- 3 campioni relativi ai substrati e l'inoculo di inizio test cioè: la feccia rossa TQ, il fango vinicolo TQ e l'inoculo TQ.

All'azienda di sequenziamento sono stati consegnati 30 campioni. Dopo l'estrazione e il sequenziamento, sono stati ottenuti 60 file "fastq" con "reads paired-end", cioè per ogni campione sono stati generati molteplici frammenti, sequenziati poi su entrambe le estremità (R1 = forward/avanti e R2 = reverse/indietro), generando così il doppio dell'informazione genetica per ogni frammento.

### 3.4.1 Risultati di Galaxy Europe

I 60 file "fastq" sono stati caricati su Galaxy Europe per determinare la qualità delle sequenze utilizzando la funzione "FastQC". Per la rappresentazione aggregata di tutti questi file in un unico report, è stato utilizzato un programma chiamato "MultiQC". Il report ha generato come per la funzione "FastQC" dei grafici dove vengono rappresentate le sequenze in relazione alla loro qualità e al loro contenuto. Uno di questi (Figura 29) rappresenta la media della qualità di ogni sequenza e si osserva che i frammenti R1 "forward", mantengono un *phred-score* elevato fino alla 280<sup>a</sup> base letta, mentre per quanto riguarda i frammenti R2 "reverse" la qualità risulta buona fino alla 200<sup>a</sup> base. Sono quindi state rimosse attraverso Qiime le sequenze di bassa qualità.



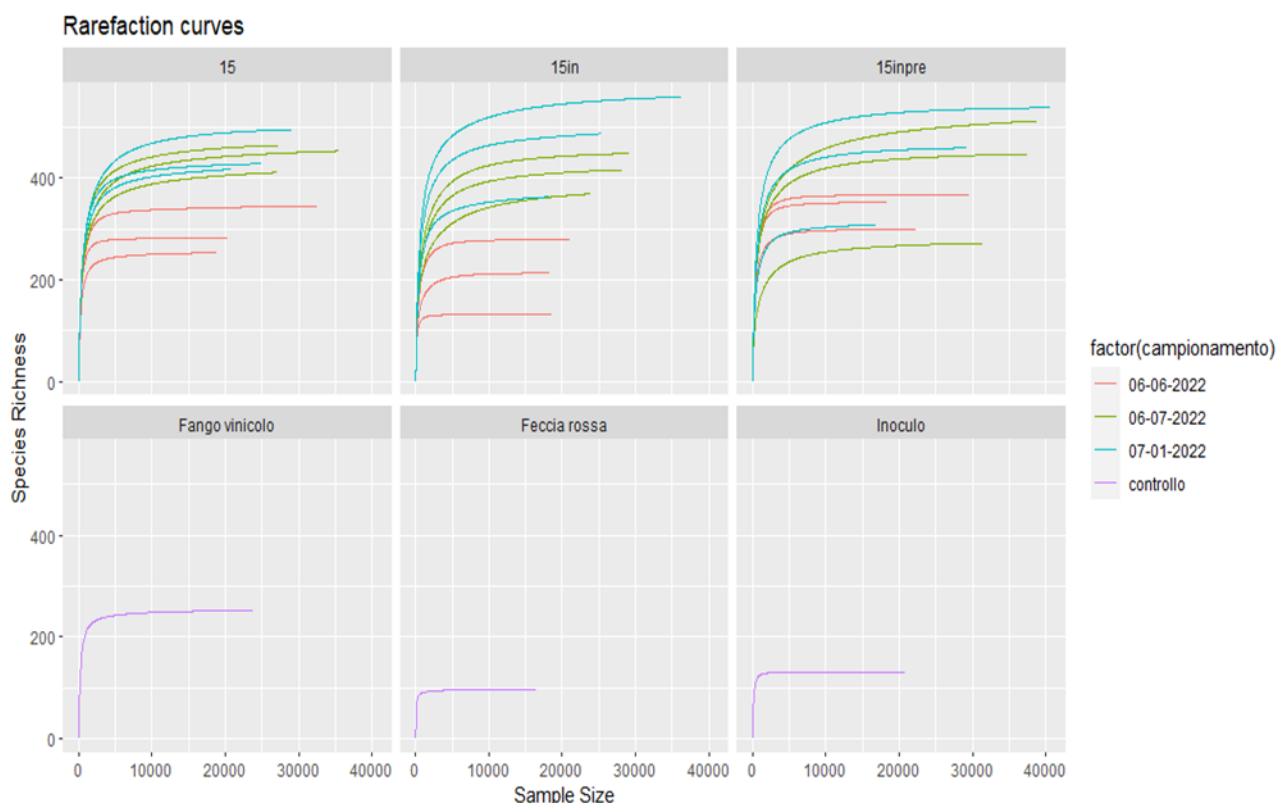
**Figura 29.** Media della qualità di ogni sequenza (arancione = R1 "forward", rosso = R2 "reverse").

### 3.4.2 Risultati dell'analisi ecologica mediante R

Le “reads” di ottima qualità sono state analizzate con Qiime al fine di generare una tabella delle OTU. Questa tabella è stata di seguito analizzata tramite R. L'analisi ecologica su R ha prodotto molteplici risultati su tutto quello che riguarda la struttura e il cambiamento delle comunità microbiche all'interno dei bioreattori esaminati durante la fase fermentativa. Le analisi classiche che forniscono un'idea su come si sono organizzate le comunità microbiche in relazione all'andamento della fermentazione anaerobica sono: l'analisi della diversità alfa, l'analisi della composizione tassonomica, l'analisi della diversità beta e l'analisi dei taxa caratteristici.

#### Alfa diversità

Per poter procedere con le analisi relative alla diversità interna dei campioni, si è verificato che il sequenziamento abbia prodotto un numero di “reads” tale da potere descrivere con fiducia la diversità associata ai vari campioni. L'analisi di rarefazione ha mostrato che tale obiettivo è stato raggiunto. Nel nostro caso il numero di “reads” per campione risulta tale da poter procedere con le varie analisi di diversità e perciò non c'è il bisogno di integrare i dati con altri campionamenti. (Figura 30). È seguita poi l'analisi dell'alfa diversità per ogni campione (Tabella 9).



**Figura 30.** Curve di rarefazione di ogni condizione (sopra) e dei campioni TQ (sotto, denominati in leggenda come controllo).

In tabella 9 sono mostrate le principali metriche per valutare l'alfa diversità di ciascun campione. Considerando nell'insieme le quattro colonne quali “Observed” che indica il numero delle OTU osservate dentro ogni campione (ricchezza) e gli indici di Shannon, Simpson ed “Evenness” (Pielou),



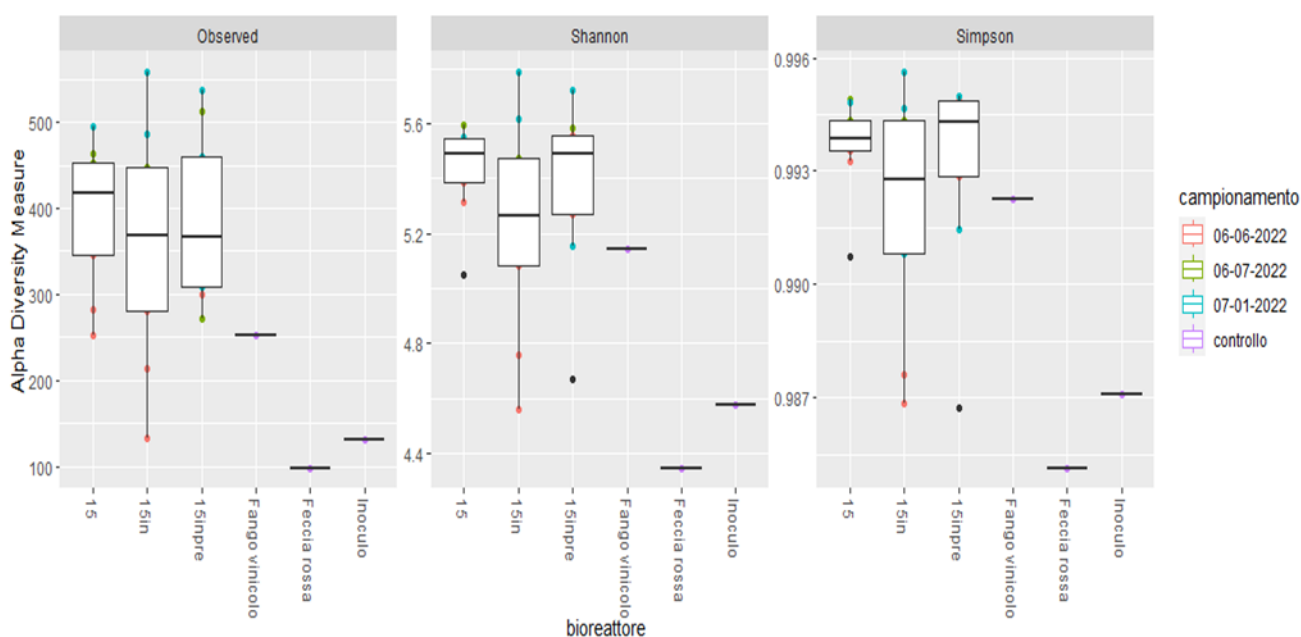
risulta che esiste un'elevata biodiversità, i campioni sono diversi e questa loro diversità interna è distribuita in modo uniforme tra tutti i campioni.

**Tabella 9.** Risultati dell'alfa diversità presente in tutti i campioni. I colori differenziano le tre condizioni stabilite e i campioni TQ.

Codice	bioreattore	Data	Observed	Shannon	Simpson	Evenness
1339405	15a	06/06/2022	345	5,38	0,99	0,92
1339406	15b		282	5,32	0,99	0,94
1339407	15c		253	5,05	0,99	0,91
1339408	15ina		280	5,08	0,99	0,9
1339409	15inb		132	4,56	0,99	0,93
1339410	15inc		213	4,76	0,99	0,89
1339411	15inprea		353	5,49	0,99	0,94
1339412	15inpreb		299	5,27	0,99	0,92
1339413	15inprec		366	5,56	0,99	0,94
1339414	15a		07/06/2022	464	5,6	0,99
1339415	15b	411		5,46	0,99	0,91
1339416	15c	453		5,49	0,99	0,9
1339417	15ina	448		5,48	0,99	0,9
1339418	15inb	369		5,22	0,99	0,88
1339419	15inc	416		5,32	0,99	0,88
1339420	15inprea	447		5,49	0,99	0,9
1339421	15inpreb	272		4,67	0,99	0,83
1339422	15inprec	512		5,58	0,99	0,9
1339423	15a	01/07/2022		428	5,52	0,99
1339424	15b		495	5,55	0,99	0,9
1339425	15c		417	5,55	0,99	0,92
1339426	15ina		487	5,62	0,99	0,91
1339427	15inb		363	5,26	0,99	0,89
1339428	15inc		559	5,79	1	0,92
1339429	15inprea		538	5,72	0,99	0,91
1339430	15inpreb		459	5,49	0,99	0,9
1339431	15inprec		308	5,15	0,99	0,9
1339432	Fango vinicolo		controllo	252	5,14	0,99
1339433	Feccia rossa	controllo	97	4,34	0,99	0,95
1339434	Inoculo	controllo	131	4,58	0,99	0,94

Rappresentando graficamente la tabella 9 in tre boxplot, dove in uno viene rappresentata l'abbondanza delle OTU e nei restanti due gli indici di Shannon e Simpson (Figura 31), si osserva che per quanto riguarda l'abbondanza delle OTU ("*Observed*"), essa dispone di boxplot con una mediana più elevata nella condizione "N-I" indicata con il numero "15", mentre nelle altre due condizioni la mediana è risultata quasi identica. L'abbondanza delle OTU riportata per i substrati (feccia rossa e fango vinicolo) e per l'inoculo è relativa all'analisi di un singolo campione. In queste tre matrici, il fango vinicolo presenta un'abbondanza delle OTU maggiore rispetto all'inoculo e alla feccia rossa, pari 250 specie contro le 140 e 100 specie presenti rispettivamente nell'inoculo e nella feccia rossa.

I boxplot relativi agli indici di alfa diversità, Shannon e Simpson, sono risultati molto simili tra loro. In particolare, la condizione “I” rappresentata come “15in” presenta una variabilità di microrganismi molto elevata rispetto alle altre due condizioni. Questa variabilità è data dall’aggiunta di inoculo che ha aumentato le specie presenti. Nella condizione “I-P” rappresentata in grafico come “15inpre”, viene osservata una minore diversità in termini di ricchezza e uniformità delle specie, a causa del pretrattamento che ha eliminato i microrganismi sensibili al calore. Considerando i substrati di partenza, il fango vinicolo ha mostrato valori maggiori per gli indici di Shannon (5,14) e Simpson (0,99) rispetto alla feccia rossa, che ha riportato un indice di Shannon pari a 4,34 e un indice di Simpson pari a 0,98 e, rispetto anche l’inoculo, con un indice di Shannon pari a 4,58 e un indice di Simpson pari a 0,98.

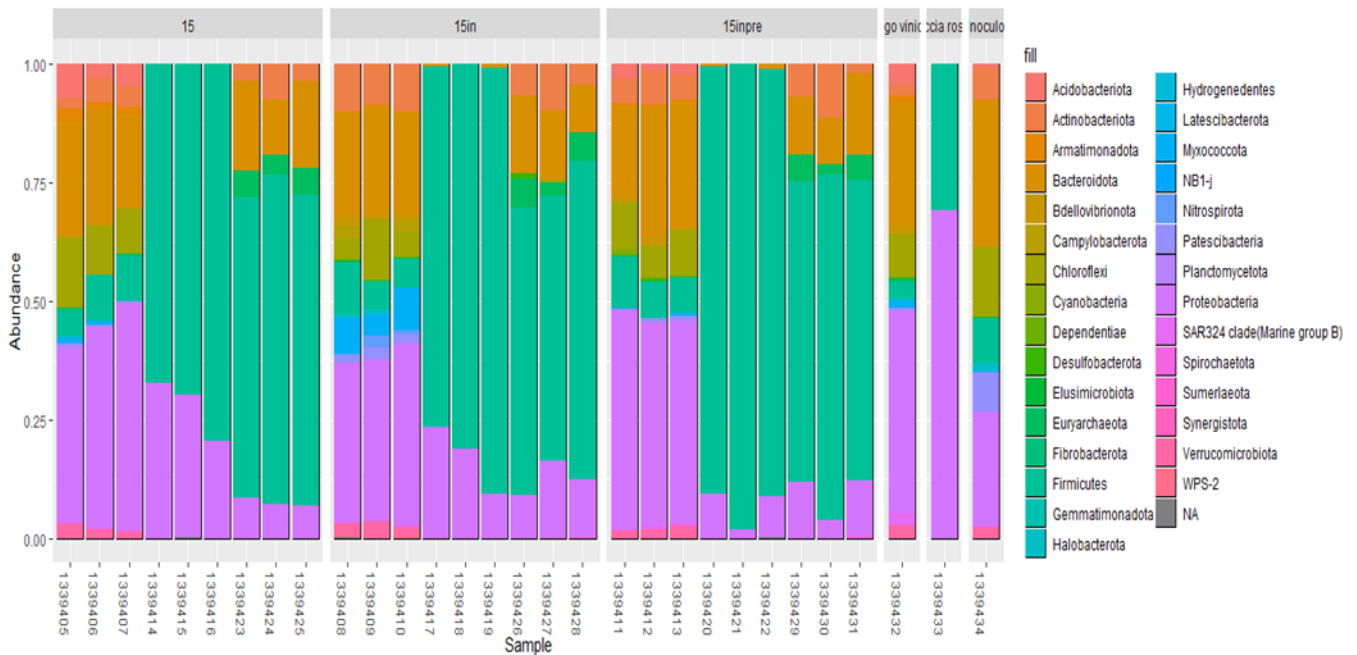


**Figura 31.** Boxplot dei valori di alfa diversità divisi per condizione e per campioni TQ (denominati in legenda come controllo).

### Composizione tassonomica

La composizione delle comunità batteriche presenti nelle tre condizioni e nei campioni TQ è stata rappresentata graficamente attraverso R. Il risultato è stato ottenuto dopo l’associazione delle OTU ai loro taxa di riferimento usando il database “*Greengenes*” nel sito Galaxy Europe. In totale sono stati identificati 30 phyla all’interno di tutti i campioni, dove il più presente dell’intero processo di fermentazione anaerobica, è il phylum dei *Firmicutes* (Figura 32). In tutte le condizioni testate, l’abbondanza dei *Firmicutes* a inizio test rappresentava il 10% della comunità microbica, raggiungendo il 70-90% dopo 16h ed il 65-70% a fine test, cioè dopo 25 giorni. Il phylum dei *Firmicutes*, quindi, è risultato predominante in tutte le condizioni testate, con una più forte presenza nella condizione “I-P”.

Anche l’abbondanza degli altri phyla è risultata simile nelle tre condizioni a eccezione del phylum *Myxococcota*, che ha costituito il 10% della comunità microbica a inizio test nella condizione “I”.



**Figura 32.** Abbondanza relativa della tassonomia a livello di phylum. Le condizioni “N-I”, “I”, e “I-P” sono state chiamate graficamente “15”, “15in”, “15inpre” rispettivamente. Seguono il fango vitivinicolo TQ, la feccia rossa TQ e l’inoculo TQ. In ascissa sono rappresentati i 30 campioni con il loro codice assegnato.

Nello specifico le percentuali dell’abbondanza relativa riscontrate nelle condizioni sono:

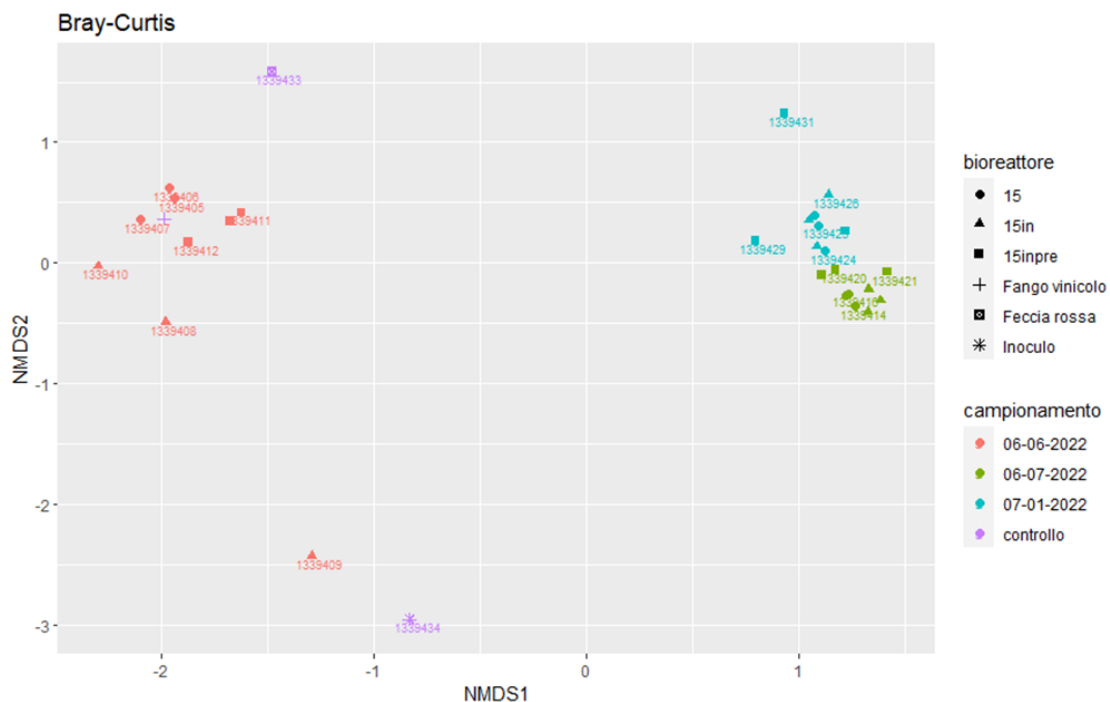
- per la condizione “N-I”, a inizio test (06/06/22) i campioni presentavano come phylum dominante i *Proteobacteria* (45%), seguito da *Bacteroidota* (20%), *Chloroflexi* (10%), *Firmicutes* (10%), *Acidobacteriota* (5%), *Actinobacteriota* (5%), *Verrucomicrobiota* (2%) e *Armatimonadota* (2%). Mentre il giorno successivo (07/06/22) il phylum dominante è stato *Firmicutes* (70%) seguito da *Proteobacteria* (30%). A fine test (01/07/22) come phylum dominante è rimasto *Firmicutes* (65%) seguito da *Bacteroidota* (15%), *Proteobacteria* (8%), *Euryarchaeota* (5%) e *Actinobacteriota* (5%);
- per la condizione “I”, a inizio test (06/06/22) i campioni presentavano come phylum dominante i *Proteobacteria* (35%), seguito da *Bacteroidota* (22%), *Myxococcota* (10%), *Actinobacteriota* (10%), *Firmicutes* (8%), *Chloroflexi* (8%), *Verrucomicrobiota* (2%), *Patescibacteria* (2%) e *Bdellovibrionota* (2%). Mentre il giorno successivo (07/06/22) il phylum dominante è stato *Firmicutes* (84%) seguito da *Proteobacteria* (15%). A fine test (01/07/22) come phylum dominante è rimasto *Firmicutes* (60%) seguito da *Bacteroidota* (15%), *Proteobacteria* (15%), *Actinobacteriota* (6%) e *Euryarchaeota* (3%);
- per la condizione “I-P” a inizio test (06/06/22) i campioni presentavano come phylum dominante i *Proteobacteria* (45%), seguito da *Bacteroidota* (25%), *Chloroflexi* (10%), *Firmicutes* (10%), *Actinobacteriota* (5%), *Acidobacteriota* (2%) e *Verrucomicrobiota* (2%). Mentre il giorno successivo (07/06/22) il phylum dominante è stato *Firmicutes* (90%) seguito da *Proteobacteria* (8%). A fine test (01/07/22) come phylum dominante è rimasto *Firmicutes*

(65%) seguito da *Bacteroidota* (15%), *Proteobacteria* (10%), *Actinobacteriota* (5%) e *Euryarchaeota* (4%);

- la comunità microbiologica dei substrati e dell'inoculo ha mostrato la composizione seguente: per il fango vitivinicolo il phylum dominante è stato *Proteobacteria* (42%) seguito da *Bacteroidota* (26%), *Chloroflexi* (10%), *Acidobacteriota* (5%), *Firmicutes* (3%), *Verrucomicrobiota* (3%), *Actinobacteriota* (2%), *SAR324 clade-Marine group B* (2%), *Bdellovibrionota* (2%), *Armatimonadota* (2%) e *Myxococcota* (2%). La feccia rossa ha come phylum dominante *Proteobacteria* (69%) seguito da *Firmicutes* (30%). Infine, per l'inoculo il phylum dominante è stato *Bacteroidota* (31%) seguito da *Proteobacteria* (24%), *Chloroflexi* (15%), *Firmicutes* (10%), *Patescibacteria* (8%), *Actinobacteriota* (7%), *Verrucomicrobiota* (2%), *Halobacterota* (1%) e *Acidobacteriota* (1%).

### Beta diversità

Dopo aver stimato la diversità interna ai campioni e definito l'abbondanza relativa di ogni campione, è seguito il confronto dei campioni tra di loro utilizzando l'indice di dissimilarità di Bray-Curtis. L'analisi PCoA relativa alla matrice di dissimilarità creata raffigura la presenza di due gruppi distinti nel piano cartesiano (Figura 33). Nel gruppo rosso sono indicati tutti i campioni relativi al giorno di inizio test, ed è presente nel gruppo anche il fango vinicolo ("+" in viola), la cui presenza spiega l'alta similarità a inizio test tra il fango vinicolo e i campioni. Il secondo gruppo è composto invece dai campioni del giorno 07/06/22 e i campioni 01/07/22 che si discostano completamente dai campioni di inizio test e tra di loro risultano avere una discreta similarità.



**Figura 33.** Analisi PCoA calcolata con la distanza di Bray-Curtis di tutti i campioni. Le condizioni "N-I", "I", e "I-P" sono state chiamate graficamente "15", "15in", "15inpre" rispettivamente.

Da una prima analisi sembra che la data di campionamento sia la variabile discriminante dell'intero processo anaerobico ma, per confermare con un valore statistico che effettivamente sia la data di campionamento il parametro che ha portato alla diversificazione dei due gruppi, è stata eseguita una analisi di correlazione tra il risultato della PCoA e i parametri ambientali misurati sul fermentato, nel corso del test (pH, AGV, BHP), integrando altri parametri quali, la data di campionamento e le tre condizioni presenti nei bioreattori. Dopo aver eseguito l'analisi "envfit" in R, che testa i parametri uno a uno su tutti i campioni, il risultato (Tabella 10) mostra che il pH e la concentrazione degli AGV ha contribuito poco alla diversificazione dei campioni, mentre il parametro che più ha contribuito è stata la data di campionamento. La data di campionamento è stata rappresentata da un valore di probabilità (*p.value* = 0.001) molto vicino allo zero, definendosi come una variabile discriminante e statisticamente significativa.

**Tabella 10.** Risultato dell'analisi "envfit" del pacchetto "vegan" su R. (\*\* = valore significativo; \* = valore poco significativo; \* = valore molto poco significativo).

Parametri	Vettori			
	NMDS1	NMDS2	r2	Pr(>r)
pH	-0.17635	-0.98433	0.2875	0.011 *
AGV tot in gCODagv/L	0.40973	0.91221	0.3049	0.013 *
BHP in ml biogas	0.53591	-0.84427	0.0999	0.191
FATTORI				
Centroidi				
15	0.1151	0.1600		
15in	0.1961	-0.3142		
15inpre	0.1660	0.2658		
06/06/22	-1.8582	-0.0555		
07/06/22	1.2755	-0.2274		
01/07/22	1.0598	0.3945		
Bontà dei dati				
Bioreattore			0.0264	0.869
Campionamento			0.8605	0.001 ***

### Taxa caratteristici

L'analisi dei ceppi caratteristici forma gruppi e li confronta per individuare i taxa che li rappresentano nello specifico. Di tutti i gruppi creati ne sono stati selezionati cinque: tre in base alla data di campionamento e due gruppi a sostegno di questi, sempre riferiti alla data di campionamento. L'analisi è stata svolta con un livello di significatività alfa dello 0.05 su un totale di 3400 specie presenti in tutti i campioni.

Il numero di specie caratteristiche trovate per ogni gruppo è stato:

- 1) 36 specie nel gruppo 06/06/22;
- 2) 189 specie nel gruppo 07/06/22;
- 3) 161 specie nel gruppo 01/07/22;
- 4) 116 specie nel gruppo 06/06/22 + controllo;
- 5) 149 specie nel gruppo 07/06/22 + 01/07/22.

**Tabella 11.** Ceppi caratteristici per ogni gruppo attribuiti al valore di probabilità massimo.

P.value	Gruppo	N.ceppi	Phylum	Famiglia	Genere
0,001	06/06/22	1	<i>Bacteroidota</i>	<i>Weeksellaceae</i>	<i>Chryseobacterium</i>
		6	<i>Bacteroidota</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Pedobacter</i>
	07/06/22	7	<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>
		1	<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>
		2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	-
		26	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
		24	<i>Bacteroidota</i>	-	-
	01/07/22	3	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>
		11	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>
		1	<i>Firmicutes</i>	<i>Erysipelatoclostridiaceae</i>	<i>UCG-004</i>
	06/06/22 + controllo	2	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacter</i>
		2	<i>Bacteroidia</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Pedobacter</i>
	07/06/22 + 01/07/22	83	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>
		21	<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>

In tabella 11 sono rappresentati solo i taxa caratteristici con un livello di probabilità molto alto. In alcuni casi, l'assegnazione tassonomica si è fermata a livello di famiglia oppure al livello di phylum. Di seguito viene descritto in breve i nove generi di microrganismi risultanti caratteristici nei bioreattori durante le tre date di campionamento.

Il *Chryseobacterium* è un genere di batteri gram-negativi. Le sue specie sono chemiorganotrofe a forma di bastoncino (Matu et al., 2019). Sono batteri aerobi che fermentano substrati come glucosio, fruttosio maltosio e mannitolo per produrre AGV (Zhao, et al. 2023).

Il *Pedobacter* è un genere di batteri gram-negativi. Come il *Chryseobacterium*, presenta specie aerobiche a forma di bastoncino. È spesso associato ai suoli ma individuato anche nell'acqua, negli alimenti, nel compost, nei fanghi attivi, nei ghiacciai e in altri ambienti estremi (Viana, et al. 2018).

L'*Enterobacteriaceae* è una famiglia di batteri gram-negativi anaerobici facoltativi, a forma di bastoncino. Fermentano il glucosio, riducono i nitrati in nitriti e sono ossidasi negativi, cioè dopo l'aggiunta di uno specifico reagente il loro colore non cambia (Rock e Donnenberg 2014).

*Citrobacter* è un genere di batteri coliformi che fa parte di questa famiglia e possono fermentare i carboidrati per produrre AGV (Yang, et al. 2016).

Il *Lactococcus* è un genere di batteri lattici gram-positivi anaerobici facoltativi, a forma di cocco (ovoidale). Sono noti per essere omo-fermentanti cioè producono dalla fermentazione del glucosio un singolo prodotto, l'acido lattico (Bintsis 2018).

Il *Clostridium* è un genere di batteri gram-positivi anaerobici obbligati, a forma di bastoncino in grado di formare endospore. Nello specifico, *Clostridium sensu stricto 1*, è un genere che produce idrogeno utilizzando substrati, quali: rifiuti alimentari, fanghi di depurazione, amido, cellulosa e glucosio (Yang e Wang 2021).

Il *Pseudoclavibacter* è un genere di batteri Gram-positivi aerobici stretti, chemiorganotrofi a forma di bastoncino (Whitman, et al. 2015).

Il *Methanobacterium* è un genere appartenente al phylum degli *Archaea*. Sono anaerobici stretti e producono metano come sottoprodotto metabolico. Sono diffusi nelle acque reflue, fanghi e nel rumine degli animali. Alcuni batteri di questo genere sono idrogenotrofi, cioè utilizzano CO<sub>2</sub> come fonte di carbonio e H<sub>2</sub> come fonte di energia (Sudhir, Shukla e T. Subba 2021).

Il *UCG-004* è un genere di batteri gram-positivi anaerobici stretti, della famiglia dei *Erysipelatoclostridiaceae* che colonizza generalmente microbiomi intestinali di animali. Fermentano glucosio, saccarosio e fruttosio (Han, et al. 2011); (Yutin e Galperin 2013).

*Acetobacter* è un genere di batteri gram-negativi aerobici facoltativi. Sono generalmente presenti nel mosto di vino e sulle fecce e, in presenza di ossigeno, trasformano l'etanolo in acido acetico mediante fermentazione acetica (Cleenwerck, et al. 2002).

Il gruppo 06/06/22 si è quindi distinto nell'aver al suo interno batteri appartenenti al phylum dei *Bacteroidota* con i generi *Chryseobacterium* e *Pedobacter*, batteri gram-negativi inclusi che crescono in presenza di ossigeno. La loro presenza si dimostra del tutto normale a inizio test perché necessitano di ossigeno per vivere e perché sono i primi microrganismi che degradano la biomassa complessa a base di carboidrati partecipando attivamente nella fase idrolitica (Larsbrink e McKee 2020).

Il gruppo 06/06/22 + controllo invece, ha indicato anche il genere *Acetobacter*, un classico colonizzatore di substrati acidi come le fecce di vinificazione. Questo spiega la presenza iniziale dell'acido acetico prodotto durante la prima settimana di inizio test e la sua diminuzione a causata dall'assenza di ossigeno che ha fermato la fermentazione acetica.

Per quanto riguarda il gruppo 07/06/22, dopo circa 16 ore dall'inizio del test, la struttura della comunità microbica cambia completamente. Si contraddistinguono due phyla: i *Proteobacteria* e i *Firmicutes* che sono batteri fermentanti anaerobici e anaerobici facoltativi, ottimi produttori di



idrogeno e AGV. È quindi avvenuta la fase acidogenica dove mentre i *Proteobacteria* hanno continuato a degradare proteine e i carboidrati, i *Firmicutes* producevano AGV, e in particolare si è prodotto l'acido butirrico. Molte specie appartenenti al phylum dei *Firmicutes* e del genere *Clostridium*, producono l'acido butirrico in quantità elevate, le più studiate sono: *C.butyricum*, *C.tyrobutyricum*, e *C.thermobutyricum*. Essi fermentano il glucosio, xilosio, lattosio, amido e glicerolo per la crescita cellulare e la produzione di acido butirrico (Liberato, et al. 2019).

Nel fine test rappresentato dal gruppo 01/07/22 i phyla caratteristici sono: i *Bacteroidota*, gli *Actinobacteriota*, i *Firmicutes* e gli *Euryarchaeota*. Questi phyla sono responsabili dell'aumento di concentrazione degli AGV avvenuto per tutto il monitoraggio, con il passare del tempo hanno aumentato gradualmente la produzione dell'acido acetico e quella dell'acido esanoico e hanno stabilizzato la produzione di acido butirrico. La presenza del genere *Pseudoclavibacter* indica che i bioreattori non si trovavano in condizioni puramente anaerobiche, mentre la presenza del genere *Methanobacterium* indica che si è instaurata la via metabolica idrogenotrofa a causa della presenza del H<sub>2</sub> probabilmente formato dal genere *Clostridium*.

### 3.5 Discussione analisi bioinformatica

Il phylum dei *Firmicutes* è risultato essere dominante in tutte le condizioni dal giorno in cui si è prodotto biogas fino alla fine del test. Il genere *Clostridium sensu stricto* 1 si è presentato con numerosi ceppi caratteristici nel gruppo 07/06/22 in tutte le condizioni e, le sue specie sono buone produttrici di idrogeno. È stata determinata la sua abbondanza relativa in percentuale per il giorno 07/06/22 ed è risultata del 60-70%. Questa sua dominanza è in accordo con l'idrogeno rilevato nel biogas della condizione no inoculo, pari circa al 40% del volume prodotto.

Anche a fine test il genere *Clostridium sensu stricto* 1 è risultato avere un'alta percentuale: la sua abbondanza relativa è stata del 40-50% a fine test. L'abbondante presenza di questo genere per tutto il test di fermentazione può essere legata alla reazione di allungamento della catena degli AGV, in particolare, alla produzione stabile di acido butirrico fin dalla prima settimana.

Una specie del genere dei *Clostridium* che può aver contribuito al processo di allungamento della catena degli AGV si chiama *C.kluyveri*, questa specie produce l'acido esanoico in presenza di substrati aventi etanolo e acetato. (Yang, et al. 2018).

*C.kluyveri* appartiene al genere *Clostridium sensu stricto* 12 (Zhang, et al. 2023) perciò, ne è stata determinata la sua presenza. L'abbondanza relativa di questo genere è stata tra 5-6% il giorno 06/06/22, l'1% il giorno 07/06/22, 4-5% il giorno 01/07/22 e una percentuale del 15% presente nel campione TQ "fango vitivinicolo". La presenza di *Clostridium sensu stricto* 12 è stata confermata anche se con percentuali basse rispetto ai *Firmicutes*. Se a rappresentare il genere *Clostridium sensu stricto* 12 è la sola specie *C.kluyveri*, allora avere una percentuale del 5% di un solo ceppo è rilevante. È quindi possibile che nella produzione di acido esanoico avvenuta nei bioreattori, il genere *Clostridium sensu stricto* 12 sia stato determinante.

Esistono altre specie capaci di produrre acido esanoico, tra cui per esempio il *Clostridium* sp. BS-1 (Cavalcante, et al. 2017), che è strettamente correlato al ceppo *C. sporosphaeroides*, del cluster IV (no-*Clostridium sensu stricto*) (Jeon, et al. 2010).

*Clostridium sensu stricto* 12 utilizza l'acido butirrico per produrre acido esanoico mentre *Clostridium sensu stricto* 1 fermenta direttamente materia organica complessa per produrre acido butirrico. (Yang, et al. 2018). Dunque, la produzione stabile di acido butirrico nei bioreattori probabilmente, è da attribuirsi alla diminuzione di etanolo nel tempo andando a stimolare la crescita di *Clostridium sensu stricto* 1.

Data l'elevata abbondanza di *Firmicutes* e sulla base delle considerazioni emerse, il processo di allungamento della catena degli AGV avvenuto in tutte le condizioni è da attribuirsi alla famiglia delle *Clostridiaceae*.

# 4 - Conclusione

Nel presente lavoro di tesi è stato valutato l'effetto dell'utilizzo di un inoculo, pretrattato e non, sulla fermentazione anaerobica degli scarti vitivinicoli, studiando la composizione della comunità microbiologica mediante il sequenziamento del gene 16S rRNA e l'analisi bioinformatica dei dati.

I test di fermentazione anaerobica hanno mostrato che gli scarti vitivinicoli possono essere convertiti in composti ad alto valore aggiunto, come gli AGV e l'idrogeno, con una resa di AGV pari a  $0,61 \pm 0,01$  gCODagv/gCODin, per la condizione senza inoculo,  $0,64 \pm 0,02$  gCODagv/gCODin per la condizione con inoculo e  $0,83 \pm 0,06$  gCODagv/gCODin per la condizione con inoculo pretrattato, e una resa di H<sub>2</sub> pari a 3,17 mL di H<sub>2</sub>/gCOD per la condizione senza inoculo. Per l'inoculo la resa di H<sub>2</sub> non è stata calcolata a causa della scarsa produzione di biogas mentre, per l'inoculo pretrattato, non è avvenuta alcuna produzione in nessuna delle tre repliche. Al contrario di quanto atteso, l'utilizzo dell'inoculo non ha aumentato le rese di produzione dell'idrogeno e la condizione con pretrattamento non ha prodotto biogas, restituendo però una resa maggiore in termini di AGV.

Del volume di biogas prodotto, il 40% è risultato essere H<sub>2</sub> generato probabilmente da microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Clostridiaceae*.

La struttura della comunità microbica all'interno dei bioreattori si è evoluta in breve tempo a causa delle condizioni anaerobiche imposte. I microrganismi anaerobici hanno dominato il processo ossidando le sostanze organiche presenti nei substrati a seguito del loro metabolismo. In tutte le condizioni, l'andamento della fermentazione delle comunità batteriche, non riporta sostanziali differenze. In termini quantitativi l'inoculo pretrattato e non, presenta una possibile cooperazione microbica più efficiente per quanto riguarda il processo CE rispetto a utilizzare i soli substrati, a discapito della produzione di H<sub>2</sub>.

Tutti i campioni sequenziati sono risultati ricchi in specie distribuite in modo uniforme. In riferimento ai substrati, il fango vitivinicolo dispone di una elevata diversità di specie al suo interno, mentre la feccia rossa meno, probabilmente a causa della sua forte acidità che limita la crescita di molti microrganismi. La feccia rossa pur non avendo un'elevata diversità, grazie all'etanolo presente al suo interno ha favorito il processo di allungamento della catena degli AGV.

Il parametro ambientale che più ha contribuito a diversificare tutti i campioni è risultato essere la data di campionamento, con un coefficiente di determinazione ( $r^2$ ) di 0.8605 e un valore di probabilità pari a 0,001 definendosi come la variabile discriminante statisticamente significativa.

La composizione tassonomica ha visto come phylum dominante *Firmicutes* presente a inizio test al 10%, aumentando dopo 16h di fermentazione al 70-90% e infine abbassandosi al 65-70% a fine test. Di questo phylum, il genere più abbondante è stato *Clostridium sensu stricto 1* rappresentato in tutte le condizioni dal 60-70% dopo il primo giorno di fermentazione e dal 40-50% a fine test. L'allungamento della catena degli AGV è da attribuirsi probabilmente alle specie presenti in questo genere. Si sono comunque confermati i phyla caratteristici della fermentazione anaerobica quali i *Proteobacteria*, i *Bacteroidota*, i *Firmicutes* e gli *Actinobacteriota*.

# 5 - Bibliografia

- Agenzia per la Coesione Territoriale. *agenziacoesione.gov.it*. 2023. <https://www.agenziacoesione.gov.it/comunicazione/agenda-2030-per-lo-sviluppo-sostenibile/>.
- Akondi, KB, e VV. Lakshmi. «Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting.» *OMICS*, 2013: 61-70.
- Alalawy, A. I., et al. «Explication of structural variations in the bacterial and archaeal community of anaerobic digestion sludges: An insight through metagenomics.» *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021.
- Amann, RI, W Ludwig, e KH. Schleifer. «Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.» *Microbiol Rev.*, 1995: 143-169.
- Anaero Technology. «anaerotech.com.» 2023. <https://www.anaerotech.com/downloads?pgid=kkh15ht7-4f3c9b7f-7aa5-48f1-8874-29407f405df9>.
- Angelidaki, I. I, L Ellegaard, e BK. Ahring. «A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas.» *Biotechnol Bioeng*, 1999.
- APAT. «IRSA.CNR.it.» 2003. [https://www.irsacnr.it/wp/wp-content/uploads/2022/04/Vol1\\_Seiz\\_1000\\_Indice\\_ParteGenerale.pdf](https://www.irsacnr.it/wp/wp-content/uploads/2022/04/Vol1_Seiz_1000_Indice_ParteGenerale.pdf).
- APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 2012.
- Atasoy, Merve, Isaac Owusu-Agyeman, Elzbieta Plaza, e Zeynep Cetecioglu. «Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges.» *Bioresource Technology*, 2018: 773-786.
- Bajpai, P. «Process Parameters Affecting Anaerobic Digestion. In: Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry.» In *Applied Sciences and Technology*, di SpringerBriefs. Singapore: Springer, 2017.
- Berg, G, et al. «Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges.» *Microbiome.*, 2020.
- Bhatia, S. C. «Advanced Renewable Energy Systems.» 426–472. Woodhead Publishing India PVT Limited, 2014.
- Bintsis, T. «Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics.» *AIMS Microbiol*, 2018.
- Blaby, I. K., V. de Crécy-Lagard, e T. J. Lyons. «Modes of Culture/Microbial.» In *Comprehensive Biotechnology*. Gainesville: Elsevier, 2011.
- Bray, J.R, e J. T. Curtis. «An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin.» *Ecological Monographs*, 1957: 325-349.
- Buchholz, K, e J. Collins. «The roots--a short history of industrial microbiology and biotechnology.» *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2013: 3747-3762.
- Bundhoo, M. Z., R. Mohee, e M. A. Hassan. «Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: a review.» *Journal of environmental management*, 2015: 20-48.
- Cao, K., et al. «Species packing and the latitudinal gradient in beta-diversity.» *Proceedings of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 2021.
- Caporaso, JG, et al. «QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.» *Nat Methods*, 2010.
- Carus, Michael, e Lara. Dammer. «The Circular Bioeconomy—Concepts, Opportunities, and Limitations.» *Industrial Biotechnology*, 2018.
- Cavalcante, W.A., R.C. Leitão, T.A. Gehring, L.T. Angenent, e S.T. Santaella. «Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review.» *Process Biochem*, 2017: 106–119.

- Cavaliere, M., S. Feng, O. Soyer, e J. I. Jimenez. «Cooperation in microbial communities and their biotechnological applications.» *Environmental Microbiology*, 2017: 1-30.
- Chisti, Y. «Bioreactor design.» In *Basic Biotechnology*, 181-200. Colin Ratledge and Bjorn Kristiansen, 2006.
- Cleenwerck, I, D Vandemeulebroecke, D Janssens, e J. Swings. «Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov.» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002: 1551-1558.
- Commissione europea . «eur-lex.europa.eu.» 2015. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52015DC0614>.
- Commissione Europea. «europafacile.net.» 2012. [https://www.europafacile.net/Formulari/POLITICHE/Bioeconomia/COM\(2012\)60.pdf](https://www.europafacile.net/Formulari/POLITICHE/Bioeconomia/COM(2012)60.pdf).
- Cooney, C L. «Bioreactors: design and operation.» *Science*, 1983.
- Da Ros, C., C. Cavinato, P. Pavan, e D. Bolzonella. «Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of winery wastewater sludge and wine lees: An integrated approach for sustainable wine production.» *Journal of environmental management*, 2017.
- Dahiya, Divakar, Hemant Sharma, Arun Kumar Rai, e Poonam Singh Nigam. «Application of biological systems and processes employing microbes and algae to Reduce, Recycle, Reuse (3Rs) for the sustainability of circular bioeconomy.» *AIMS Microbiology*, 2022: 83-102.
- De Caceres, M, e P. Legendre. «Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference.» In *Ecology*. 2009.
- Diadrasis. *viaductdiadrasis.net*. 2023. <http://www.viaduct-diadrasis.net/methods/13>.
- Dorado, G, S Gálvez, TE Rosales, VF Vásquez, e P. Hernández. «Analyzing Modern Biomolecules: The Revolution of Nucleic-Acid Sequencing - Review.» *Biomolecules*, 2021.
- Eastman, J.A, e J.F. Ferguson. «Solubilization of Particulate Organics Carbon during the Acid Phase of Anaerobic Digestion.» *Journal Water Pollution Control Federation*, 1981: 352-366.
- Fenchel, T, G.M King, e T.H. Blackburn. «Chapter 1 - Bacterial Metabolism.» In *Bacterial Biogeochemistry (Third Edition)*, di T Fenchel, G.M King e T.H. Blackburn, 1-34. Academic Press, 2012.
- Fogler, H. S. *Elements of Chemical Reaction Engineering*. London: Prentice-Hall, 1992.
- Franke-Whittle, I.H., A. Walter, C. Ebner, e H. Insam. «Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities.» *Waste Management*, 2014: 2080-2089.
- Fukuda, K, M Ogawa, H Taniguchi, e M. Saito. «Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene.» *J UOEH.*, 2016.
- Galaxy Europe. *usegalaxy.eu*. 2023. <https://usegalaxy.eu/>.
- Galloway-Peña, J, e B. Hanson. «Tools for Analysis of the Microbiome.» *Dig Dis Sci*, 2020.
- Gavrilescu, Maria. «Environmental Biotechnology: Achievements, Opportunities and Challenges.» 2010.
- Glazer, Alexander, e Hiroshi. Nikaido. *Microbial Biotechnology. Fundamentals of Applied Microbiology*. Cambridge University Press, 2007.
- Gómez, Antonio, Javier Zubizarreta, Marcos Rodrigues, César Dopazo, e Norberto Fueyo. «An estimation of the energy potential of agro-industrial residues in Spain.» *Resources, Conservation and Recycling*, 2010: 972-984.
- Goud, R. Kannaiah, Omprakash Sarkar, e S. Venkata Mohan. «Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp.» *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014: 7572-7586.



- Gujer, W, e A J B. Zehnder. «Conversion Processes in Anaerobic Digestion.» *Water Science and Technology*, 1983: 127–167.
- Hamady, M, e R. Knight. «Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges.» *Genome Res*, 2009.
- Han, I, Congeevaram Shankar, Ki Dong-Won, Oh Byoung-Taek, e Park. Joonhong. «Bacterial community analysis of swine manure treated.» *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011: 835–842.
- Illumina.Inc. 2016. <https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8&t=187s>.
- . 2010. [https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight\\_sequencing.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf).
- Jaccard, P. «Contributions au problème de l'immigration post-glaciaire de la flore alpine.» *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 1900: 87-130.
- Jaibiba, P., S. Naga Vignesh, e S. & Hariharan. «Chapter 10 - Working principle of typical bioreactors.» In *Bioreactors*, di Lakhveer Singh, Abu Yousuf e Durga Madhab Mahapatra, 145-173. Elsevier, 2020.
- Jain, R., N L. Panwar, S K. Jain, T. Gupta, C. Agarwal, e S S. Meena. «Bio-hydrogen production through dark fermentation: an overview.» *Biomass Conversion and Biorefinery.*, 2022.
- Jasko, Janis, Skriptsts, Eriks, Dubrovskis, e Vilis. «Biogas production of winemaking waste in anaerobic fermentation process.» *Engineering for Rural Development.*, 2012.
- Jeon, BS, . BC Kim, Y Um, e BI. Sang. «Production of hexanoic acid from D-galactitol by a newly isolated *Clostridium* sp. BS-1.» *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010.
- Jeris, J. S., e P. L. McCarty. «The Biochemistry of Methane Fermentation Using  $^{14}\text{C}$  Tracers.» *Journal (Water Pollution Control Federation)* , 1965: 178-192.
- Jo, J., J Oh, e C. Park. «Microbial community analysis using high-throughput sequencing technology: a beginner's guide for microbiologists.» *J Microbiol*, 2020: 176–192.
- Johnson, JS, et al. «Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis.» *Nat Commun.*, 2019.
- Kircher, Manfred. «Bioeconomy - present status and future needs of industrial value chains.» *N Biotechnol.*, 2020.
- Kouzuma, A, e K. Watanabe. «Microbial ecology pushes frontiers in biotechnology.» *Microbes Environ*, 2014.
- Kucek, Leo. A., Jiajie Xu, Mytien Nguyen, e Largus T. Angenent. «Waste conversion into n-caprylate and n-caproate: Resource recovery from wine lees using anaerobic reactor microbiomes and in-line extraction.» *Frontiers in Microbiology*, 2016.
- Lane, D.J. «16S/23S rRNA Sequencing. .» *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, 1991: 115-175.
- Lane, DJ, B Pace, GJ Olsen, DA Stahl, ML Sogin, e NR. Pace. «Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1985.
- Langer, M, et al. «Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity.» *Biotechnol J.*, 2006.
- Larsbrink, J, e LS. McKee. «Bacteroidetes bacteria in the soil: Glycan acquisition, enzyme secretion, and gliding motility.» *Adv Appl Microbiol*, 2020.
- Lee, Wee Shen, Adeline Seak May Chua, Hak Koon Yeoh, e Gek Cheng Ngoh. «A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids.» *Chemical Engineering Journal*, 2014: 83-99.
- Liberato, Vanessa, et al. «*Clostridium* sp. as Bio-Catalyst for Fuels and Chemicals Production in a Biorefinery Context.» *Catalysts*, 2019.
- Lidén, G. «Understanding the bioreactor.» *Bioprocess Biosyst Eng*, 2002: 273–279.

- Lise, Appels, Baeyens Jan, Degrève Jan, e Dewil Raf. «Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge.» *Progress in Energy and Combustion Science*, 2008: 755–781.
- Liu, Z, C Lozupone, M Hamady, FD Bushman, e Knight R. «Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis.» *Nucleic Acids Res*, 2007.
- Lozupone, CA, M Hamady, ST Kelley, e R. Knight. «Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities.» *Appl Environ Microbiol.*, 2007.
- Madigan, Michael T., Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, David A. Stahl, e W. Matthew Sattley. *Brock. Biologia dei microrganismi. Microbiologia generale, ambientale e industriale*. Mylab, 2022.
- Madison, L. L, e G. W. Huisman. «Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic.» *Microbiol Mol Biol Rev.*, 1999.
- Mardis, E. R. «Next-generation sequencing platforms.» *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*., 2013.
- McMurdie, PJ, e S. Holmes. «phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data.» *PLoS One*, 2013.
- Merrylin, J., R. Yukesh Kannah, J. Rajesh Banu, e Ick Tae Yeom. «Chapter 6 - Production of organic acids and enzymes/biocatalysts from food waste.» In *Food Waste to Valuable Resources*, 119-141. J. Rajesh Banu, Gopalakrishnan Kumar, M. Gunasekaran, S. Kavitha., 2020.
- Metcalf, e Eddy. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4th Edition*. New York: McGraw-Hill, 2004.
- Minniti, Marianna. *microbiologiaitalia.it*. 2020. <https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/microbiologia-alimentare/>.
- Mondal, Saikat, e Palit Debnath. «Effective Role of Microorganism in Waste Management and Environmental Sustainability.» In *Sustainable Agriculture, Forest and Environmental Management*, 487-516. Springer, 2019.
- Moscoviz, R., E. Trably, N. Bernet, e H. Carrère. «The environmental biorefinery: State-of-the-art on the production of hydrogen and value-added biomolecules in mixed-culture fermentation.» *Green Chemistry*, 2018: 3159–3179.
- Moset, Hernandez Veronica, Morten Poulsen, Radziah Wahid, Ole Højberg, e Henrik. Møller. «Mesophilic versus thermophilic anaerobic digestion of cattle manure: Methane productivity and microbial ecology.» *Microbial Biotechnology.*, 2015.
- Niño-Navarro, C., I. Chairez, P. Christen, M. Canul-Chan, e E.I. García-Peña. «Enhanced hydrogen production by a sequential dark and photo fermentation process: Effects of initial feedstock composition, dilution and microbial population.» *Renewable Energy*, 2020: 924-936.
- Nova Institute. *bioeconomy.fi*. 2016. <https://www.bioeconomy.fi/bioeconomy-more-than-circular-economy/>.
- Oba, Kelvin. «Kinetic Modelling and Reactor Design Methanol Synthesis.» 2013.
- Oksanen, J, F. G Blanchet, R Kindt, P Legendre, P. R Minchin, e R. B. O'Hara. «vegan: Community Ecology Package.» 2022.
- Olsen, G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, N. R. Pace, e D. A. Stahl. «Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach.» *Annual review of microbiology*, 1986: 337-365.
- Pavlostathis, S.G., e E. Giraldo-Gomez. «Kinetics of anaerobic treatment: A critical review.» *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.*, 1991: 411-490.
- Qu, X., H. Zeng, Y. Gao, T. Mo, e Y. Li. «Bio-hydrogen production by dark anaerobic fermentation of organic wastewater.» *Frontiers in Chemistry*, 2022.

- Ramaraj, Rameshprabu, e Natthawud. Dussadee. «Biological Purification Processes for Biogas Using Algae Cultures: A Review.» *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology.*, 2015: 20-32.
- Rock, C, e Michael. Donnenberg. «Human Pathogenic Enterobacteriaceae.» *Reference Module in Biomedical Sciences.*, 2014.
- Roddy, Dermot. «Biomass and Biofuels – Introduction.» 2012.
- Roghair, Mark, et al. «Controlling ethanol use in chain elongation by CO2 loading rate.» *Environmental Science & Technology*, 2018.
- Sanders, Howard. L. «Marine Benthic Diversity: A Comparative Study.» *The American Naturalist*, 1968: 243–282.
- Sauer, M, D Porro, D Mattanovich, e P. Branduardi. «Microbial production of organic acids: expanding the markets.» *Trends Biotechnol*, 2008.
- Scarborough, Matthew J., Christopher E. Lawson, Joshua J. Hamilton, Timothy J. Donohue, Daniel R. Noguera, e Korneel Rabaey. «Metatranscriptomic and Thermodynamic Insights into Medium-Chain Fatty Acid Production Using an Anaerobic Microbiome.» *mSystems*, 2018.
- Shi, Xingdong, Lan Wu, Wei Wei, e Bing-Jie Ni. «Insights into the microbiomes for medium-chain carboxylic acids production from biowastes through chain elongation.» *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2021: 3787-3812.
- Shi, X-S, et al. «Effect of hydraulic retention time on anaerobic digestion of wheat straw in the semicontinuous continuous stirred-tank reactors.» *Biomed Res Int*, 2017.
- Sonja Caldwell. *sonjacaldwell.com*. 2017. <https://sonjacaldwell.com/portfolio/bioreactor-diagram/>.
- Spirito, Catherine M, Hanno Richter, Korneel Rabaey, Alfons JM Stams, e LARGUS T. Angenent. «Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste.» *Current Opinion in Biotechnology*, 2014: 115–122.
- Steinbusch, Kirsten, H.V.M Hamelers, Caroline Plugge, e Cees. Buisman. «Biological formation of caproate and caprylate from acetate: Fuel and chemical production from low grade biomass.» *Energy & Environmental Science*, 2010.
- Sudhir, K, Atif. Khan Shukla, e Rao. T. Subba. «Chapter 22 - Microbial fouling in water treatment plants.» In *Microbial and Natural Macromolecules*, di Das Surajit e Dash Hirak Ranjan, 589-622. Academic Press, 2021.
- Supriatna, Jatna. «Biodiversity Indexes: Value and Evaluation Purposes.» *E3S Web of Conferences*, 2018.
- Supriya, N. *biologyreader.com*. 2020. [https://biologyreader.com/fed-batch-culture.html#google\\_vignette](https://biologyreader.com/fed-batch-culture.html#google_vignette).
- Takahashi, S, J Tomita, K Nishioka, T Hisada, e M. Nishijima. «Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing.» *PLoS One*, 2014.
- Toledo-Alarcón, Javiera, Léa Cabrol, David Jeison, Eric Trably, J-P Steyer, e Estela. Tapia-Venegas. «Impact of the microbial inoculum source on pre-treatment efficiency for fermentative H2 production from glycerol.» *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019.
- Tringe, G. S, et al. «Comparative metagenomics of microbial communities.» *Science*, 2005.
- Vallini, G., B. Maria, e M. L. Bianchin. «Metanogenesi: aspetti microbiologici e biochimici della degradazione anaerobica di substrati organici complessi.» 1987.
- Veneto agricoltura. «venetoagricoltura.org.» 2022. [https://www.venetoagricoltura.org/wp-content/uploads/2022/12/Report-2022.pdf?\\_ga=2.193733866.630749539.1675155851-1561370751.1675155851](https://www.venetoagricoltura.org/wp-content/uploads/2022/12/Report-2022.pdf?_ga=2.193733866.630749539.1675155851-1561370751.1675155851).

- Viana, AT, T Caetano, C Covas, T Santos, e S. Mendo. «Environmental superbugs: The case study of *Pedobacter* spp.» *Environ Pollut*, 2018.
- von Wintzingerode, F, UB Göbel, e E. Stackebrandt. «Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis.» *FEMS Microbiol Rev.*, 1997.
- Wen, Xiaoqi, Fernández Yadira Bajón, Blanco Edgar, e Rashmi. Deshpande. «Adapting BMP Test as a Method for Early Prediction of Toxicity and Inhibition in Anaerobic Digesters.» 2019.
- Wenzel, T.J, A Douglas, Donald M Skoog, F West, Holler James, e R. Crouch. Stanley. «Fundamentals of analytical chemistry.» *Anal Bioanal Chem*, 2013: 7903–7904.
- Whitman, William. B, et al. «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.» 2015.
- Whittaker, R. H. «Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California.» *Ecological Monographs*, 1960: 279-338.
- Whittaker, R.H. «Evolution and measurement of species diversity.» *Taxon*, 1972: 213-251.
- Wickham, H. *ggplot2*. Springer Cham, 2016.
- Willey, J. M., L. M Sherwood, e C. J. Woolverton. *Prescott, Harley and Klein's Microbiology*. New York: McGraw Hill, 2008.
- Willis, Amy D. «Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics.» *Frontiers in Microbiology*, 2019.
- Wilson, E.O., e F.M. Peter. «The Current State of Biological Diversity.» In *Biodiversity*, di E.O. Wilson, 3-18. Washington: National Academy Press, 1988.
- Woese, CR, O Kandler, e ML. Wheelis. «Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1990.
- Wu, Qinglian, et al. «Medium chain carboxylic acids production from waste biomass: Current advances and perspectives.» *Biotechnology Advances*, 2019.
- Xia, Y., e L Ruying. «Research progress on the effects of seed mud pretreatment and fermentation temperature on hydrogen production in dark fermentation.» *Chin. J. Bioeng*, 2017: 132–140.
- Xianxian, Xu, Zhou Quan, e Yu Dehai. «The future of hydrogen energy: Bio-hydrogen production technology.» *International Journal of Hydrogen Energy*, 2022: 33677-33698.
- Xu, SY, OP Karthikeyan, A Selvam, e JW. Wong. «Effect of inoculum to substrate ratio on the hydrolysis and acidification of food waste in leach bed reactor.» *Bioresour Technol.*, 2012.
- Yang, G, e J. Wang. «Biohydrogen production by co-fermentation of antibiotic fermentation residue and fallen leaves: Insights into the microbial community and functional genes.» *Bioresour Technol*, 2021.
- Yang, Guang, e Jianlong Wang. «Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production.» *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019: 25542-25550.
- Yang, Peixian, et al. «Upgrading lignocellulosic ethanol for caproate production via chain elongation fermentation.» *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018: 103–109.
- Yang, Ying, e Ma. Sha. Eppendorf Inc, 2019.
- Yang, Z, R Guo, X Xu, L Wang, e M. Dai. «Enhanced methane production via repeated batch bioaugmentation pattern of enriched microbial consortia.» *Bioresource Technology*, 2016: 471-477.
- Yi, J, B Dong, J Jin, e X. Dai. «Effect of Increasing Total Solids Contents on Anaerobic Digestion of Food Waste under Mesophilic Conditions: Performance and Microbial Characteristics Analysis.» *PLoS ONE*, 2014.
- Yutin, N, e MY. Galperin. «A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia.» *Environ Microbiol*, 2013.

Zhang, C, H Liu, P Wu, J Li, e J. Zhang. «Clostridium kluveri enhances caproate production by synergistically cooperating with acetogens in mixed microbial community of electro-fermentation system.» *Bioresource Technology*, 2023.

Zhao, J, XJ Yin, ZH Dong, SR Wang, JF Li, e T. Shao. «Dynamics in fermentation quality, bacterial community, and metabolic profile during silage fermentation of late-harvested elephant grass.» *Let Appl Microbiol*, 2023.