

1 Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

2
3
4 **DOTTORATO DI RICERCA IN**

5
6 **Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali**

7
8 **Ciclo XXX**

9
10 **Settore Concorsuale: 03/D1**

11
12 **Settore Scientifico Disciplinare: CHIM/11**

13
14
15 **PRODUZIONE DI BIOIDROGENO DA REFLUI DI CASEIFICIO**

16
17
18
19 **Presentata da:** **Ciro Vasmara**

20
21
22
23 **Coordinatore Dottorato**

Supervisore

24
25
26 **Prof. Luca VITTUARI**

Prof. Lorenzo BERTIN

27
28 **Co-supervisore**

29
30 **Dr. Rosa MARCHETTI**

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44 **Esame finale anno 2018**

48 **1.INTRODUZIONE**

49 1.1. IDROGENO: CARATTERISTICHE CHIMICO – FISICHE

50 1.2. CAMPI D'APPLICAZIONE

51 1.3. PRODUZIONE D'IDROGENO

52 1.3.1. FONTI NON RINNOVABILI

53 IDROGENO DA GAS NATURALE

54 IDROGENO DA CARBONE

55 1.3.2. FONTI RINNOVABILI

56 IDROGENO DA ACQUA

57 IDROGENO DA BIOMASSE

58 1.4. PRODUZIONE BIOLOGICA D'IDROGENO

59 1.4.1. PROCESSI "LIGHT-DEPENDING"

60 1.4.2. PROCESSI "NON-LIGHT-DEPENDING"

61 1.5. PRINCIPI DELLA DARK FERMENTATION

62 1.5.1. BIOCHIMICA DELLA DARK FERMENTATION

63 1.6. PARAMETRI CHE INFLUENZANO LA DARK FERMENTATION

64 INOCULO

65 SUBSTRATI

66 pH

67 TEMPERATURA

68 PRESSIONE PARZIALE D'IDROGENO

69 AZOTO E FOSFORO

70 IONI METALLICI

71 CONFIGURAZIONE DEL REATTORE

72 1.7. REFLUI DI CASEIFICIO

73 1.7.1. DISPONIBILITA' DEI REFLUI DI CASEIFICIO

74 1.7.2. ALTERNATIVE ALLO SMALTIMENTO

75 **2. OBIETTIVO DEL PROGETTO**76 **3. MATERIALI E METODI**

77 3.1. SUBSTRATI

78 3.2. PREPARAZIONE DELL'INOCULO

79 3.3. COMPOSIZIONE DEL BIOGAS

80 3.4. METODI D'ANALISI

81 3.5. ADATTAMENTO DEL MODELLO E ANALISI STATISTICHE

82 3.6. ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

83 3.7. PREPARAZIONE DELLA LIBRERIA E SEQUENZIAMENTO

84 3.8. ANALISI DEI DATI METATASSONOMICI

85 3.9. SUPPORTI PER L'IMMOBILIZZAZIONE DELLA BIOMASSA

86 **4. DISEGNI SPERIMENTALI**

87 4.1. ESPERIMENTO "A"

88 4.2. ESPERIMENTO "B"

89 4.3. ESPERIMENTO "C"

90	4.4. ESPERIMENTO “D”
91	4.5. ESPERIMENTO “E”
92	4.6. ESPERIMENTO “F”
93	5. RISULTATI
94	5.1. ESPERIMENTO “A” – PRODUZIONE DI H ₂ DA SCOTTA E PERMEATO
95	5.2. ESPERIMENTO “B” – CO-DIGESTIONE CON LIQUAME SUINO
96	5.3. ESPERIMENTO “C” – INFLUENZA DEL pH INIZIALE SULLA
97	PRODUZIONE DI H ₂ IN DF
98	5.3.1. LATTOSIO RESIDUO
99	5.3.2. METABOLITI FINALI
100	ETANOLO
101	ACIDI GRASSI VOLATILI
102	ACIDO LATTICO
103	5.4. ESPERIMENTO “D” – INFLUENZA DEL pH INIZIALE SULLA
104	COMUNITA’ MICROBICA IN DF
105	5.4.1. ALFA DIVERSITY
106	5.4.2. ABBONDANZA RELATIVA
107	FASE 1, FASE “LAG”
108	FASE 2, PRODUZIONE ESPONENZIALE DI H ₂
109	FASE 3, FASE STAZIONARIA
110	5.4.3. . RELAZIONE TRA LA COMPOSIZIONE DELLA COMUNITA’
111	MICROBICA E LA PRODUZIONE DI METABOLITI
112	5.5. ESPERIMENTO “E” – VALUTAZIONE DEI SUPPORTI PER
113	L’IMMOBILIZZAZIONE DI BIOMASSA MICROBICA
114	5.6. ESPERIMENTO “F” – CONFRONTO DI PRODUZIONE DI H ₂ DA
115	BIOMASSA ADESA E SOSPESA
116	5.6.1. PRODUZIONE DI H ₂
117	5.6.2. pH
118	5.6.3. CONSUMO DI LATTOSIO E PRODUZIONE DI METABOLITI
119	6. DISCUSSIONE
120	6.1. EFFETTO DEL pH SULLA PRODUZIONE DI H ₂
121	6.2. EFFETTO DEL pH SULLA COMUNITA’ MICROBICA IN DF
122	6.3. CONSUMO DI LATTOSIO
123	6.4. RELAZIONE TRA COMPOSIZIONE DELLA COMUNITA’ MICROBICA E
124	PRODUZIONE DEI METABOLITI
125	6.5. INOCULO
126	6.6. IMMOBILIZZAZIONE
127	6.7. CO-DIGESTIONE
128	7. CONCLUSIONI
129	RICONOSCIMENTI
130	BIBLIOGRAFIA
131	
132	

133 **ABSTRACT**

134 In questo studio è stata valutata la possibilità di produrre H₂ da reflui di caseificio. In
135 particolare, è stato utilizzato il permeato di scotta che è il residuo del recupero delle
136 sieroproteine, mediante ultrafiltrazione, della scotta che, a sua volta, è il residuo della
137 produzione della ricotta da siero di latte. Questo liquido è ancora ricco di lattosio (51 g
138 L⁻¹) da cui si può ricavare H₂ mediante la fermentazione al buio (*dark fermentation*, DF).
139 La DF è regolata da molti parametri e presenta ancora dei punti oscuri. L'attenzione è
140 stata rivolta, in particolare, all'effetto che il pH ha sulla produzione di H₂, dei metaboliti
141 prodotti (acidi grassi volatili, etanolo e acido lattico) e sulla popolazione microbica
142 coinvolta nella DF, mediante l'utilizzo della tecnica dell'high-throughput sequencing
143 (HTS), in un sistema non tamponato. La produzione di H₂ è stata nettamente influenzata
144 dal pH iniziale tanto che essa è stata molto più alta (+31%) nei reattori a pH alcalino (8 -
145 10) che nei reattori a pH < 6. Lo studio della comunità microbica ha indicato che la
146 manipolazione del pH iniziale ha influenzato i rapporti interspecifici delle popolazioni
147 presenti all'interno dei reattori. Il pH alcalino ha favorito la proliferazione di un genere
148 in particolare, il *Trichococcus*. Sebbene questo genere non produca direttamente H₂, la sua
149 proliferazione e, dunque, la sua attività metabolica nella fase immediatamente precedente
150 alla DF propriamente detta, ha creato le condizioni ideali per l'attività dei clostridi
151 (produttori di H₂) che hanno iniziato a produrre H₂ quando il pH era sceso a 5.4. I
152 clostridi sono stati più attivi nei reattori con pH iniziale alcalino, ovvero, dove *Trichococcus*
153 aveva maggiormente proliferato.

155 In this study, the H₂ production from dairy waste was evaluated. Scotta permeate was
156 used as substrate. Scotta permeate is the residue of the recovery of the whey proteins, by
157 means of ultrafiltration, from scotta which is the residue of the production of ricotta
158 from cheese whey. This liquid is still rich in lactose (51 g L⁻¹) and suitable for H₂
159 production in dark fermentation (DF). DF is regulated by many parameters and it has
160 still dark sides. The attention was focused, in particular, on the effect of pH on H₂
161 production, on metabolites production (volatile fatty acids, ethanol and lactic acid) and
162 on the microbial community involved in the DF, by means of high-throughput
163 sequencing (HTS), in an unbuffered system. The production of H₂ was strongly
164 influenced by the initial pH: it was much higher (+ 31%) in the reactors at alkaline pH (8
165 - 10) in comparison with the reactors at pH <6. The study of the microbial community
166 indicated that the manipulation of the initial pH influenced the interspecific relationships
167 of the populations resident in the reactors. The alkaline pH favored the proliferation of
168 one genus in particular, *Trichococcus*. Although this genus is not an hydrogen-producer, its
169 proliferation and, therefore, its metabolic activity in the phase immediately preceding the
170 DF, has created the optimal conditions for the activity of the clostridia (H₂ producers)
171 who have started to produce H₂ when the pH had dropped to 5.4. The clostridia were
172 more active in reactors with initial alkaline pH, that is, where *Trichococcus* were most
173 abundant.

174

175 **1. INTRODUZIONE**

176

177 *1.1. IDROGENO: CARATTERISTICHE CHIMICO – FISICHE*

178

179

180 L' idrogeno è l'elemento più abbondante nell'universo. Esso, infatti, costituisce il
181 70-80% di tutta la materia: costituisce le stelle ma anche l'acqua, molti composti
182 inorganici nonché tutti i composti organici.

183 In condizioni standard l'idrogeno si presenta sottoforma di gas biatomico (H_2)
184 inodore, incolore, insapore non velenoso e atossico, altamente infiammabile a
185 concentrazioni in aria che vanno dal 4 al 75% in volume. Il suo valore calorifico inferiore
186 (LHV) è di $120 \text{ MJ kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Il suo basso peso specifico (0.0899 kg m^3) permette ad esso
187 di sfuggire al campo gravitazionale della Terra, disperdendosi nello spazio. Ecco perché
188 l' H_2 rappresenta solo l'1% dei gas atmosferici terrestri. Parte dell'idrogeno, comunque,
189 rimane occluso nelle rocce, soprattutto di origine vulcanica, come il granito.

190 Nonostante l'alta volatilità, l' H_2 può ritrovarsi in diversi composti come l'acqua
191 (H_2O), i combustibili fossili, il gas naturale e in tutti i composti organici.

192

193 *1.2. CAMPI D'APPLICAZIONE*

194

195 L'idrogeno, attualmente, è ampiamente usato nell'industria petrolchimica. Esso,
196 infatti, è adoperato per la raffinazione dei combustibili fossili: nei processi di
197 idrodealchilazione e di desolforazione del petrolio e del gas naturale [1], nel processo di
198 hydrocracking per la produzione di carburanti per aeromobili [2] è, inoltre, usato per la
199 produzione di ammoniaca nel processo Haber-Bosch [3], di acido cloridrico e

200 nell'industria alimentare come agente idrogenante per aumentare il grado di saturazione
201 dei grassi e degli oli insaturi [4].

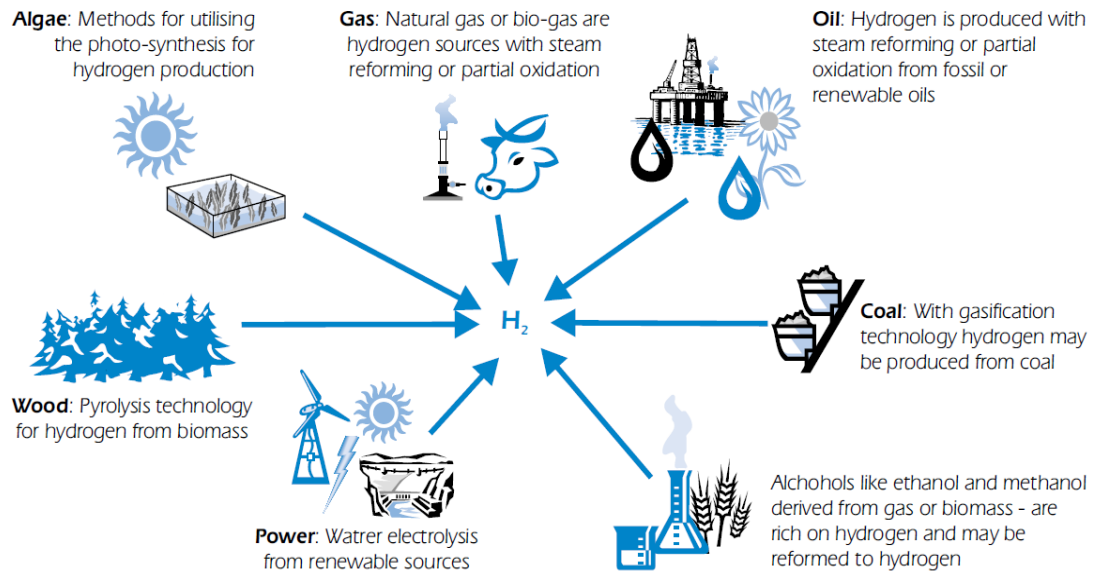
202 Recentemente si sta diffondendo l'idea di utilizzare, in un futuro molto prossimo,
203 l'H₂ come carrier energetico da utilizzare per la produzione di energia elettrica mediante
204 le fuel cell che permettono di ossidare l'H₂ direttamente con l'ossigeno atmosferico
205 producendo elettricità [5] oppure da usare per l'autotrazione come combustibile
206 utilizzabile direttamente nei motori a combustione interna. L'H₂, infatti, ha un LHV di
207 2.4 volte superiore al metano e la sua combustione produce solamente acqua e,
208 inevitabilmente, NO_x. Infine, un utilizzo futuro dell'idrogeno è nella fusione nucleare in
209 cui due nuclei di idrogeno (deuterio e trizio) vengono fusi per formare He con
210 conseguente rilascio di energia e un neutrone.

211

212 1.3. *PRODUZIONE D'IDROGENO*

213

214 Come detto in precedenza l'H₂ è in grado di sfuggire al campo gravitazionale della
215 Terra e, pertanto, è molto raro. Ciononostante esso si trova in molte sostanze molto
216 abbondanti sul nostro pianeta. L'H₂, quindi, può essere estratto dalle sostanze che lo
217 contengono (Fig. 1).



218

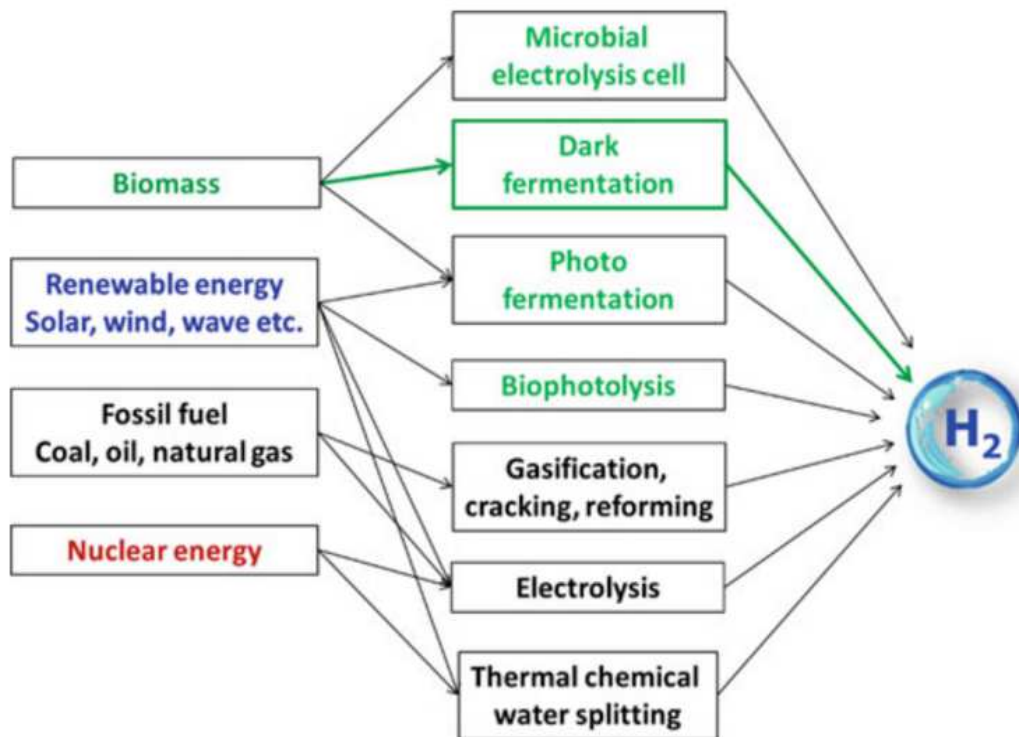
219 **Figura 1.** Fonti da cui è possibile estrarre l'idrogeno [6].

220

221 In base alla Fig. 1, le fonti da cui estrarre H_2 si possono dividere in non rinnovabili
 222 (gas naturale e carbone), e rinnovabili (biomasse ed acqua).

223 Una panoramica delle tecniche attualmente utilizzate per la produzione di H_2 è
 224 descritta nella Fig. 2.

225



226

227 **Figura 2.** Tecnologie attualmente disponibili per la produzione di idrogeno [7].

228

229 *1.3.1. FONTI NON RINNOVABILI*

230

231 L'idrogeno è un costituente di diverse materie di origine organica ma non
 232 rinnovabili e cioè il gas naturale e il carbone. Esistono diversi processi che permettono di
 233 estrarre l'H₂ da queste fonti. Processi diversi a seconda del materiale di partenza.

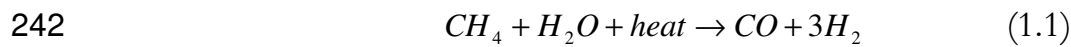
234

235 *IDROGENO DA GAS NATURALE*

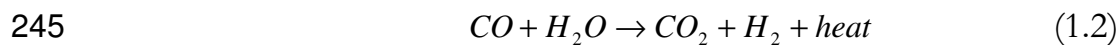
236

237 Attualmente l'H₂ può essere prodotto dal gas naturale attraverso tre processi
 238 chimici ben consolidati: steam reforming (steam methane reforming –SMR), partial
 239 oxidation (POX) Autothermal reforming (ATR) [6]. L'SMR consiste in una conversione

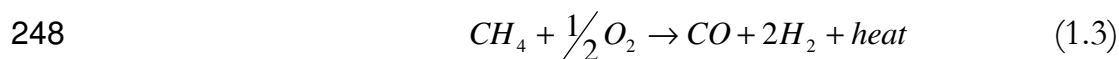
240 di CH₄ e vapore acqueo in H₂ e CO (1.1). Questa reazione avviene a temperature di 700-
241 850 °C e tra i 3 e i 25 bar di pressione.



243 Il monossido di carbonio può essere convertito a CO₂ e H₂ attraverso la scissione del
244 vapore acqueo (1.2):



246 Il POX prevede la produzione di H₂ attraverso la parziale combustione del CH₄ con
247 l'ossigeno. In questo modo si forma CO e H₂ (1.3):



249 Successivamente, la CO può essere convertita ad H₂ secondo la reazione (1.2).

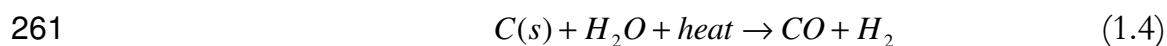
250 L'ATR è la combinazione tra l'SMR e il POX. La reazione è esotermica e la
251 produzione di H₂ avviene secondo la reazione (1.2).

252

253 *IDROGENO DA CARBONE*

254

255 L'H₂ può essere prodotto dal carbone attraverso vari sistemi di gassificazione
256 (e.g. letto fisso, fluido o trascinato). Onde evitare la formazione di prodotti sgraditi (e.g.
257 materiale carbonizzato, catrami e fenoli) sono richieste alte temperature d'esercizio. La
258 reazione tipica di gassificazione del carbone (1.4) rilascia CO + H₂. Ancora una volta,
259 poi, la CO può essere utilizzata, insieme al vapore acqueo, per formare H₂ tramite la
260 reazione (1.2).



262 Come descritto in precedenza, CO₂ è il principale gas esausto di tutti i sistemi che
263 permettono di produrre H₂ da fonti non rinnovabili. Al fine di evitare di emettere CO₂
264 inquinante nell'ambiente è necessario attuare dei sistemi di sequestro di tale gas. Essi
265 sono: post-combustione, pre-combustione e ossi-combustione [6].

266

267 *1.3.2. FONTI RINNOVABILI*

268

269 L'H₂ può essere ricavato anche da fonti rinnovabili (e.g. acqua e biomasse),
270 mediante diversi processi.

271

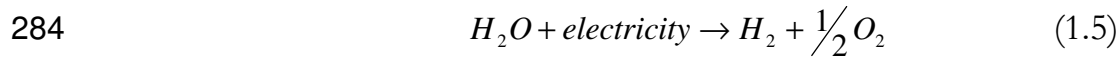
272 *IDROGENO DA ACQUA*

273

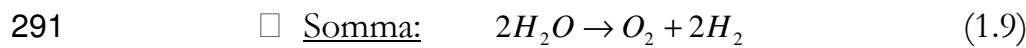
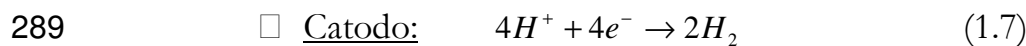
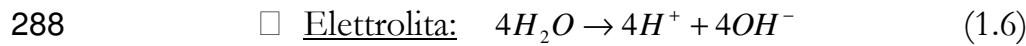
274 È possibile ricavare H₂ da acqua attraverso l'idrolisi. Esistono diversi processi di
275 idrolisi dell'acqua:

- 276 Elettrolisi diretta
- 277 Elettrolisi alcalina
- 278 Elettrolisi su membrana polimerica elettrolitica (PEM)
- 279 Elettrolisi ad alta temperatura
- 280 Foto elettrolisi
- 281 Scissione termochimica dell'acqua

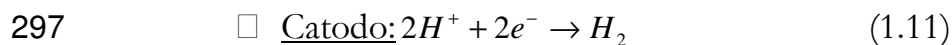
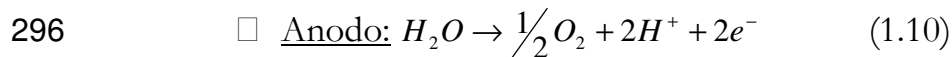
282 L'elettrolisi diretta dell'acqua permette la scissione dell'H₂O in H₂ e O mediante
283 applicazione di energia elettrica (1.5):



285 L' elettrolisi alcalina permette l'idrolisi dell'acqua per mezzo di una soluzione
286 acquosa di KOH che circola attraverso le celle elettrolitiche. La reazione è descritta di
287 seguito ed avviene con applicazione di energia elettrica:



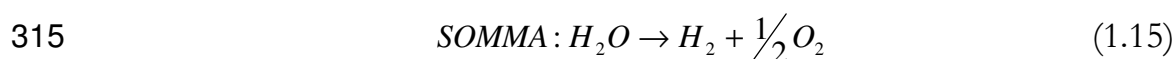
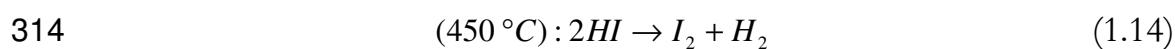
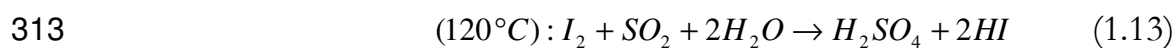
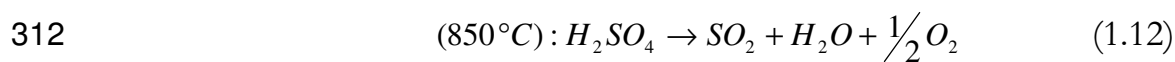
292 La PEM permette l'elettrolisi dell'acqua per mezzo di una membrana polimerica
293 acida che funge da elettrolita evitando l'uso di KOH e ciò rende il sistema più sicuro.
294 L'assenza di KOH, poi, permette di avere un design più compatto dovuto all'alta densità
295 dell'elettrolita. La reazione avviene come descritto sotto [6]:



298 L'elettrolisi ad alta temperatura è basata sulla tecnologia delle "high-temperature
299 fuel cells". Attualmente si utilizzano celle elettrolitiche a ossidi solidi ("solid oxide
300 electrolyser cells; SOEC) che operano tra 700 e 1000 °C. A queste temperature l'energia
301 elettrica necessaria per l'elettrolisi dell'acqua è inferiore rispetto a quella necessaria per
302 l'elettrolisi a 100 °C. Il grosso nodo è rappresentato dal grande quantitativo di calore
303 necessario al processo. Attualmente si sta investigando sulla possibilità di utilizzare
304 calore generato da fonte geotermica, solare o gas naturale.

305 La foto elettrolisi è un processo in cui una cella fotovoltaica è accoppiata ad una
306 cella elettrolitica, ovvero, la cella fotovoltaica è avvolta dall'elettrolita e, utilizzando
307 direttamente la radiazione solare, fornisce l'energia elettrica necessaria alla reazione di
308 elettrolisi dell'acqua.

309 La scissione termo chimica dell'acqua permette di convertire l'acqua in H₂ e O per
310 mezzo di reazioni termo chimiche. Un esempio di tale processo è descritto dalla reazione
311 seguente [6]:



316

317 *IDROGENO DA BIOMASSE*

318

319 Le biomasse sono quei materiali di origine organica costituiti da coltivazioni
320 dedicate, residui di coltivazioni e/o di animali, provenienti dall'agricoltura, dalla
321 silvicoltura e dalle industrie connesse. Esse, pertanto, sono materie prime rinnovabili. Il
322 processo mediante il quale si estrae H₂ da tali biomasse è sostanzialmente simile a quello
323 descritto precedentemente per la gassificazione del carbone (1.4). Le maggiori
324 problematiche di tale processo sono l'estrema variabilità nella composizione delle
325 biomasse e dall'umidità delle stesse che può rendere necessario uno step di essiccamento
326 prima della gassificazione.

327 Tutti i sistemi descritti finora hanno bisogno di una fonte primaria di energia. È
328 chiaro che tali processi potrebbero avere un minore impatto ambientale utilizzando fonti
329 energetiche rinnovabili come l'elettricità fotovoltaica, che viene prodotta per mezzo
330 dell'energia solare, oppure l'energia geotermica, l'energia idroelettrica e l'elettricità
331 prodotta dall'eolico, oppure l'energia elettrica prodotta sfruttando le onde del mare o le
332 maree.

333 Indipendentemente dalla fonte da cui viene estratto l'H₂, dal processo utilizzato e
334 dalla fonte d'energia primaria utilizzata, l'efficienza di produzione di H₂ viene calcolata
335 secondo l'equazione 1.17:

$$336 \quad \eta_{H_2} = LHV_{H_2} / E_{PS} \quad (1.17)$$

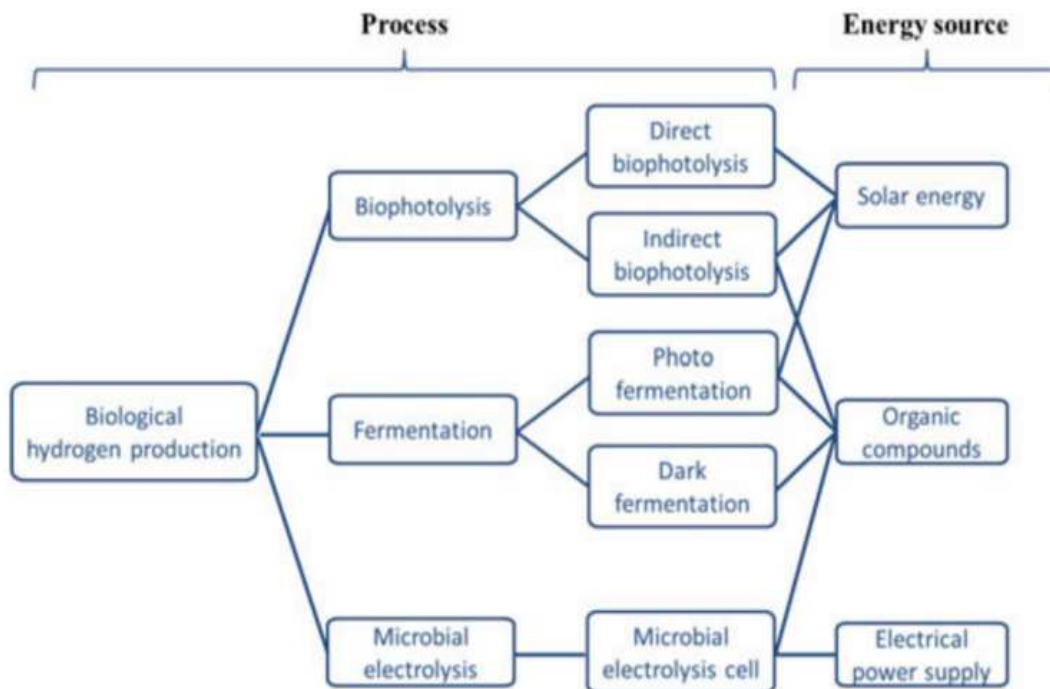
337 Dove η_{H_2} è l'efficienza termica finale dell'idrogeno, LHV è il potere calorifico inferiore
338 mentre E_{PS} è l'energia consumata per produrre 1 kg di H₂. È chiaro che minore è
339 l'energia consumata per produrre 1kg di H₂ maggiore sarà l'efficienza del processo.

340

341 1.4. *PRODUZIONE BIOLOGICA D'IDROGENO*

342

343 L'H₂ può essere prodotto anche tramite processi biologici oltre che termo chimici. I
344 processi biologici sfruttano le reazioni biochimiche che regolano il metabolismo di alcuni
345 microorganismi (alghe, batteri ed archea) che sono in grado di generare H₂ da materie
346 prime rinnovabili come l'acqua e i composti organici [8]. La produzione biologica di H₂
347 può essere divisa in due gruppi: "light-dependent" e "light-independent" (Fig. 3).



348

349 **Figura 3.** Processi attualmente disponibili per la produzione biologica di idrogeno [7].

350

351 1.4.1. PROCESSI "LIGHT-DEPENDING"

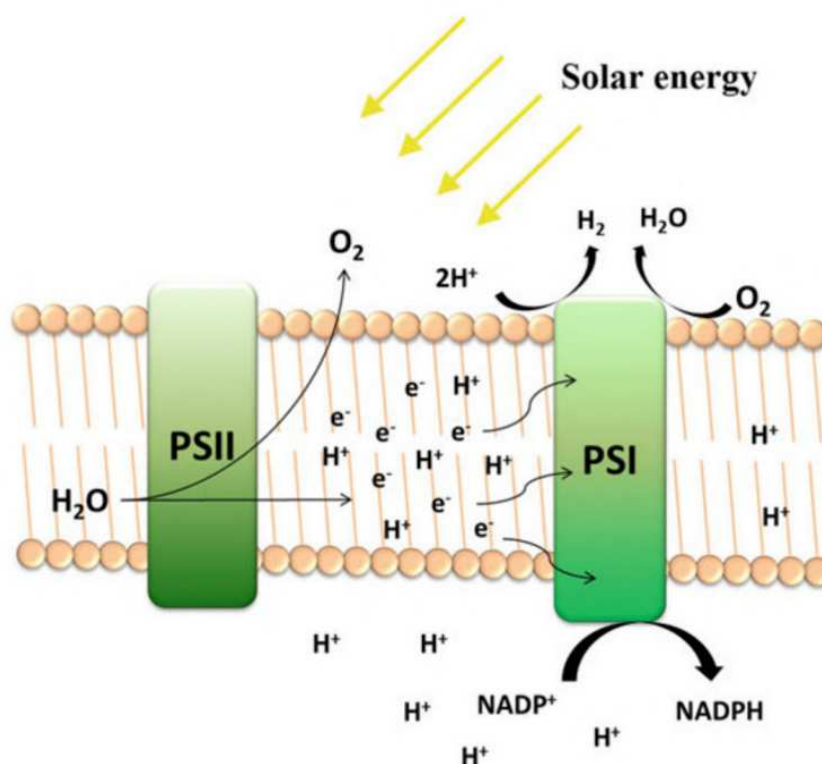
352

353 I processi "light-dependent" permettono di generare H₂ attraverso microorganismi
 354 in grado di utilizzare la radiazione solare come fonte d'energia per le loro attività
 355 metaboliche. I processi "light-dependent" sono:

- 356 Biofotolisi diretta
- 357 Biofotolisi indiretta
- 358 Fotofermentazione

359 La biofotolisi diretta è condotta dalle alghe verdi. Il processo è stato descritto, per la
 360 prima volta, da Gaffron e Rubin [9]: le alghe verdi sfruttano l'energia solare per estrarre
 361 gli elettroni direttamente dall'acqua, generando O₂ che si accumula sul lato ossidante del

362 “fotosistema II” (PSII) (Fig. 4) e l’H₂ che, invece, si accumula sul lato riducente del
 363 “fotosistema I” (PSI) (Fig. 4). Il processo avviene a carico dell’enzima idrogenasi alla
 364 luce e in condizioni anaerobiche. Poiché l’idrogenasi è sensibile all’O₂, la presenza di
 365 questo gas inibisce la produzione di H₂ e la biofotolisi diretta può essere mantenuta per
 366 lunghi periodi solo se si rimuove costantemente l’O₂ dal sistema [8]. Wykoff et al. [10]
 367 hanno dimostrato che una carenza di zolfo può drasticamente limitare l’accumulo di O₂
 368 su PSII.



369
 370 **Figura 4.** Meccanismo di generazione di idrogeno nelle alghe [7].
 371

372 I microorganismi maggiormente coinvolti nel processo di biofotolisi diretta sono:
 373 *Scenedesmus obliquus* [11], *Chlamydomonas reinhardtii* e *C. moewusii* [12]. Il fattore limitante di
 374 tale sistema è l’efficienza: in condizioni di bassa luminosità, infatti, l’efficienza
 375 dell’energia solare è quasi del 10%, mentre in condizioni di luminosità elevata, essa crolla

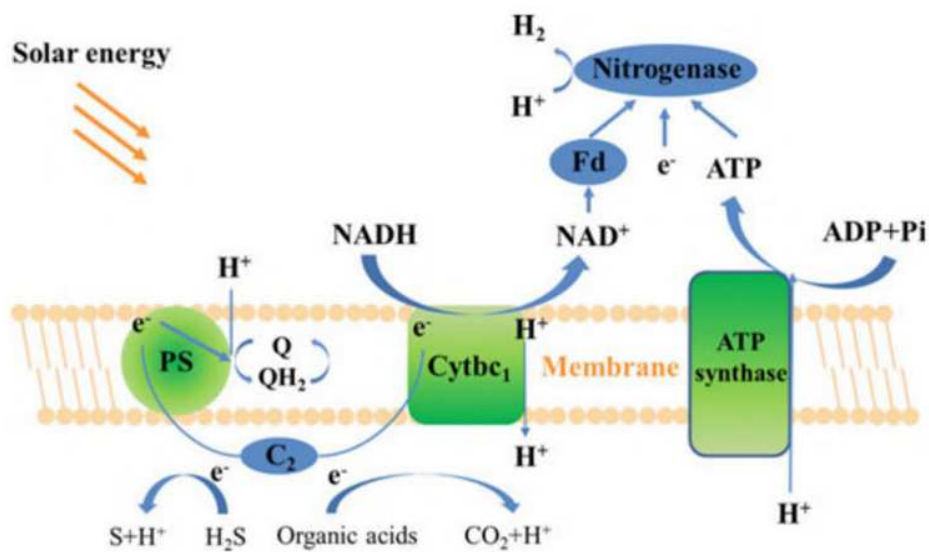
376 sotto l'1%. In queste condizioni, infatti, i pigmenti fotosintetici catturano il 90% dei
377 fotoni, ma essi vengono rilasciati come calore o fluorescenza poiché viene superato il
378 limite di trasferimento di elettroni tra PSII e PSI [13].

379 La biofotolisi indiretta, è condotta dai Cianobatteri. Essi posseggono 3 vie
380 metaboliche per generare H₂. La prima via è specifica dei cianobatteri azoto fissatori (*A.*
381 *variabilis*, *N. spongiaeforme* e *Westiellopsis prolifica*) [14], questa via metabolica è catalizzata
382 dall'enzima nitrogenasi [MoFe] ed è energeticamente inefficiente dal momento che
383 vengono richieste 2 molecole di ATP per ogni elettrone trasferito. Inoltre, parte dell'H₂
384 generato è consumato dall'enzima idrogenasi [NiFe] che partecipa al processo. La
385 seconda via metabolica è condotta utilizzando l'acqua come donatore di elettroni come
386 nelle alghe. Poiché i cianobatteri, però, non dipendono dalla ferredoxina come unico
387 donatore di elettroni, questo modo di generare H₂, risulta più efficace che nelle alghe. La
388 terza via metabolica richiede una fonte esterna di carbonio (e.g. carboidrati) che vengono
389 metabolizzati in presenza di luce, cosicché l'H₂ viene generato sia per mezzo
390 dell'idrogenasi che della nitrogenasi [7].

391 La biofotolisi può essere limitata solo dalla massima efficienza raggiungibile dalla
392 fotosintesi che, teoricamente, può convertire fino al 33% della luce assorbita in energia
393 chimica. Ma, poiché meno della metà dell'energia del sole si trova nella regione visibile,
394 che è foto sinteticamente attiva, e poiché ci sono perdite inevitabili, la massima efficienza
395 raggiunta dalla fotosintesi è generalmente attorno al 6%.

396 La fotofermentazione è stata descritta per la prima volta da Benemann et al.
397 [15]. Essa è la fermentazione di composti organici in presenza di luce con conseguente
398 produzione di H₂. Due gruppi di batteri sono capaci di effettuare la fotofermentazione: i

399 purpurei e i verdi. I batteri purpurei possono essere suddivisi in: solfobatteri purpurei
 400 (*Chromatium*) e batteri purpurei non solfurei (*Rhodobacter*). I batteri Verdi possono essere
 401 suddivisi in solfobatteri verdi (*Chlorobium*) e “gliding bacteria” (*Chloroflexus*). Questi
 402 batteri sono in grado di convertire l’energia luminosa in energia chimica via
 403 fotofosforilazione. Un esempio del meccanismo di fotofermentazione è mostrato in Fig.
 404 5.

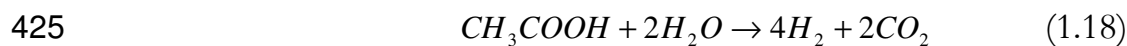


405
 406 **Figura 5.** Meccanismo di generazione di idrogeno in fotofermentazione [7].
 407

408 Il substrato organico è utilizzato come donatore di elettroni, dunque, la
 409 produzione di H₂ è determinata dal substrato che costituisce la riserva del un flusso di
 410 elettroni. Il substrato organico può essere sostituito con del solfuro inorganico che funge
 411 da donatore di elettroni, mentre i composti contenenti zolfo costituiscono la riserva per il
 412 flusso di elettroni, dopodiché l’NAD⁺ viene ridotto a NADH attraverso il flusso inverso
 413 di elettroni. Gli elettroni, a questo punto, vengono trasferiti alla nitrogenasi via
 414 ferredoxina con consumo di ATP e produzione di H₂. Questa via, dunque, è

415 energeticamente sfavorevole per i microbi poiché ogni mole di H₂ prodotta attraverso la
416 nitrogenasi richiede il consumo di 4 ATP [7].

417 I batteri purpurei non solfurei, invece, producono H₂ per fornire gli elettroni alla
418 fotosintesi. In questa via metabolica, la CO₂ viene fissata attraverso il ciclo di Calvin e
419 l'O₂ si forma come accettore finale di elettroni. La nitrogenasi, però, è inibita dall'O₂ e
420 quindi la formazione di H₂ è soppressa in presenza di O₂. In questo caso l'energia
421 luminosa è utilizzata per produrre solo ATP e gli elettroni sono ottenuti dall'ossidazione
422 del substrato organico. Tuttavia, in condizioni di carenza di azoto, la nitrogenasi catalizza
423 la formazione di idrogeno molecolare dai protoni anziché formare NH₃. La reazione è
424 riassunta sotto:



426 I solfobatteri verdi possono fissare l'N attraverso l'enzima nitrogenasi e l'H₂ è
427 generato, in condizioni limitate di N₂, attraverso una via metabolica simile a quella dei
428 batteri purpurei non solfurei.

429 I “gliding bacteria” verdi possono generare H₂ ma il loro metabolismo non è ancora
430 ben conosciuto [7].

431 La produzione di H₂ per via fotofermentativa sembra promettente in quanto
432 permette di produrre H₂ utilizzando la luce solare e i rifiuti organici. Questo processo,
433 infatti, può portare a un considerevole abbattimento della sostanza organica nelle acque
434 reflue. Il fattore limitante, però, è la bassa efficienza del processo così come il basso
435 tasso di produzione di H₂ [16].

436

437 *1.4.2. PROCESSI “NON-LIGHT-DEPENDING”*

438

439 L'idrogeno può essere prodotto anche per vie biologiche “non-light dependent”:

440 Elettrolisi microbica

441 Fermentazione al buio (*dark fermentation*)

442 L'elettrolisi microbica permette di produrre H₂ da matrici organiche utilizzando

443 microorganismi “elettrogenici” per produrre corrente elettrica in abbinamento con

444 l'ossidazione dei composti ridotti. I microorganismi “elettrogenici” producono un basso

445 potenziale redox all'anodo che può essere sfruttato per ottenere la riduzione dei protoni

446 al catodo utilizzando un piccolo generatore. Questo sistema viene chiamato cella

447 elettrolitica microbica (MEC). Essa richiede un anodo, un catodo, una membrana,

448 microorganismi elettrochimicamente attivi e un generatore: la materia organica viene

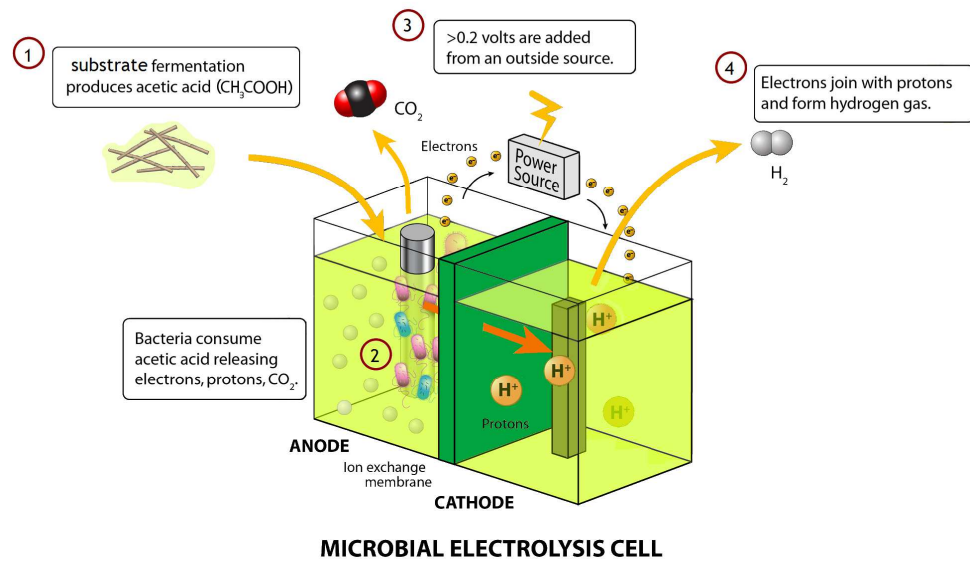
449 degradata dai microorganismi “elettrogenici” che si trovano sull'anodo, rilasciando

450 elettroni e protoni, il generatore guida gli elettroni verso il catodo attraverso un cavo

451 elettrico, mentre i protoni migrano verso il catodo per mezzo di una membrana a

452 scambio protonico (PEM). A questo punto gli elettroni e i protoni si combinano sul

453 catodo formando H₂ (Fig. 6) [7].



454

455 **Figura 6.** Funzionamento di una cella elettrolitica microbica.

456

457

458

459

460

461

462

463

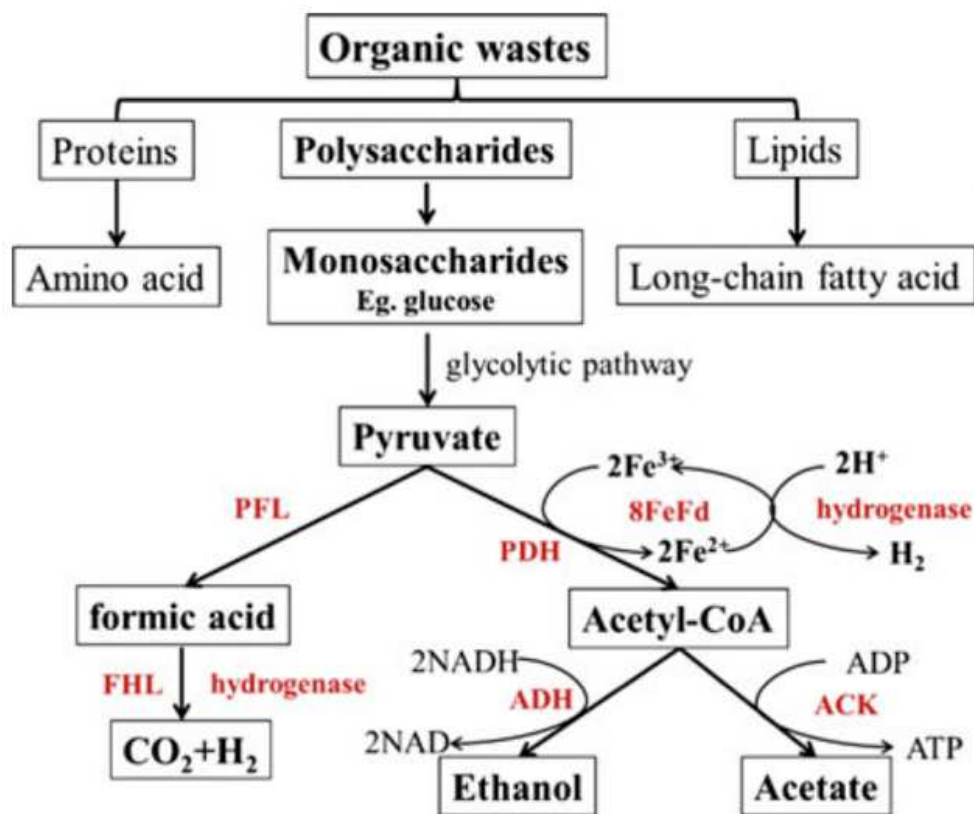
464

465

466

Esistono diverse specie microbiche elettrochimicamente attive. Esse appartengono a diversi generi quali: *b-Protobacteria sp. (Rhodospirillum rubrum)*, *g-Protobacteria sp. (Shewanella and Pseudomonas)*, *d-Protobacteria sp. (Aeromonas, Geobacter, Geopsychrobacter, Desulfuromonas, Desulfobulbus)*, *Firmicutes sp. (Clostridium)*, *Acidobacteria sp. (Geothrix)* etc. [17]. L'efficienza della produzione di H_2 nelle MEC è influenzata principalmente dall'efficienza della PEM (che è il fattore limitante) dalla conducibilità elettrica e dalla stabilità chimica dell'anodo e del catodo.

La *dark fermentation* (DF) è la conversione dei carboidrati in H_2 , CO_2 ed acidi organici operata da alcuni batteri in anaerobiosi. Le vie metaboliche seguite durante la DF sono riassunte in Fig. 7.



467

468 **Figura 7.** Vie metaboliche che permettono di generare H₂ in *dark fermentation* [7].

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

La DF, attualmente, costituisce il processo produttivo più consolidato per la produzione di bioidrogeno. Essa, infatti, permette di fermentare un'ampia gamma di substrati da cui, teoricamente, si può generare H₂ in reattori dal disegno semplice e facili da controllare che permettono di avere rese di H₂ più elevate se confrontate con quelle ottenute nei sistemi fotosintetici [18]. Molti generi di batteri sono in grado di generare H₂ in DF: *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Ruminococci* and *Clostridium* [19-22]. Alcuni di questi microorganismi possono lavorare in condizioni di termofilia (40-60 °C) dove la solubilità dell'H₂ è minore così da evitare un'inibizione nella produzione. In base al calcolo stechiometrico, la conversione del glucosio a H₂ dovrebbe essere di 12 mol H₂ mol⁻¹ di esoso [16]. La resa in H₂ ottenuta in DF, però, si aggira attorno a 4 mol H₂ mol⁻¹

480 esoso, ovvero il 33% di quella teorica. Questo è dovuto alla formazione di co-prodotti
 481 (acido acetico e butirrico, etanolo, etc.) che accompagnano la produzione di H₂ durante
 482 la DF.

483

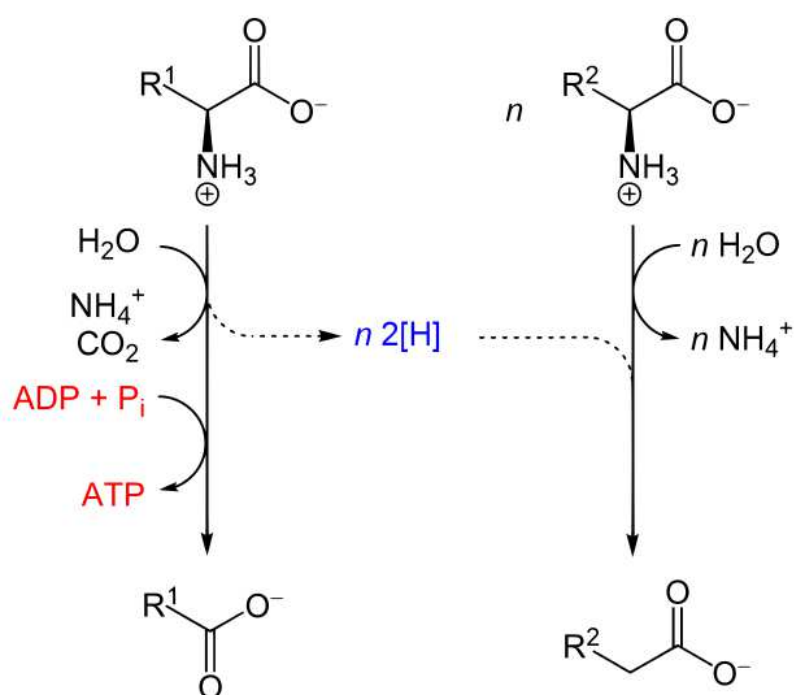
484 *1.5. PRINCIPI DELLA DARK FERMENTATION*

485

486 Come detto in precedenza la DF suscita interesse perché permette di produrre H₂
 487 da un'ampia gamma di substrati. In realtà, tra i vari substrati utilizzabili, la DF è stata
 488 condotta con successo solo su materiali ricchi di carboidrati. Le proteine, infatti,
 489 vengono idrolizzate ad aminoacidi e poi fermentati accoppiati secondo la reazione di
 490 Stickland: un aminoacido funge da accettore di elettrone per l'ossidazione dell'altro
 491 aminoacido [23]. Questa reazione, però, non genera H₂ (Fig. 8).

492

493



494

495 **Figura 8.** Schema della reazione di Stickland.

496

497 I grassi vengono scissi in glicerolo e acidi grassi a lunga catena (LCFA). Il glicerolo
498 può essere fermentato direttamente a H₂ [24, 25] gli LCFA, invece, vengono degradati ad
499 acetato e H₂ da batteri sintrofici [26]. Questa reazione richiede una pressione parziale di
500 H₂ molto bassa che può essere mantenuta utilizzando microorganismi metanogeni
501 oppure batteri solfo riduttori.

502 La dinamica della produzione di H₂ durante la DF può essere descritta utilizzando
503 l'equazione di Gompertz modificata (1.19) [27].

$$504 \quad H(t) = H_{\max} \exp\left\{-\exp\left[\frac{R_{\max} e}{H_{\max}}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad 1.19$$

505 Dove: $H(t)$ è l'ammontare totale di H₂ prodotto al tempo d'incubazione t , in
506 condizioni standard (STP) di temperatura (273 °K) e pressione (101.3 kPa). e è la
507 funzione esponenziale di 1. H_{\max} è la produzione massima di H₂ cumulata (resa in H₂).
508 R_{\max} (H₂ mol⁻¹ h⁻¹) è il tasso orario di accumulo di H₂ (produttività di H₂) e λ è la durata
509 della fase lag, cioè il tempo necessario all'adattamento della flora microbica prima della
510 fase di produzione esponenziale di H₂.

511

512 *1.5.1. BIOCHIMICA DELLA DARK FERMENTATION*

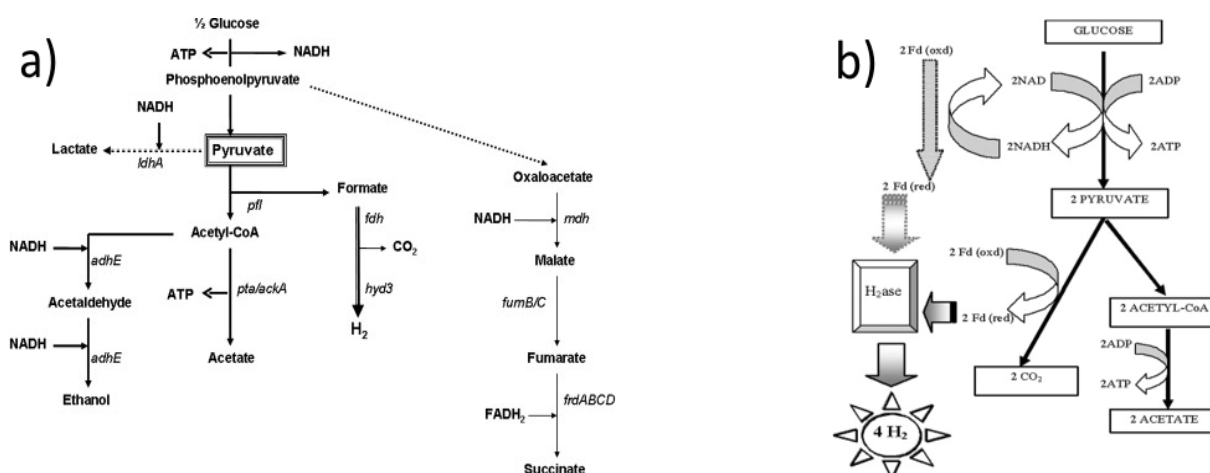
513

514 Come mostrato in Fig. 7, la DF segue la via glicolitica che porta alla formazione di
515 piruvato. Il piruvato, in effetti, è l'intermedio chiave della DF: può essere scisso in acido
516 formico o Acetil-CoA da due differenti enzimi coinvolti nella produzione di H₂. Tra i

517 batteri capaci di generare H₂, quelli che maggiormente si ritrovano nella DF sono
 518 appartenenti ai generi *Enterobacter* e *Clostridium* [7, 28-30].

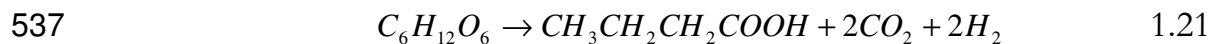
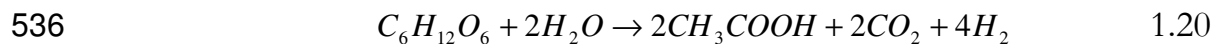
519 Le specie appartenenti agli *Enterobacter* convertono le molecole di piruvato in Acetil
 520 Co-A e formiato attraverso l'enzima formiato C-acetiltransferasi (Pfl) e poi, attraverso
 521 l'idrogenasi Hyd3, convertono il formiato a H₂ and CO₂ (Fig. 9). L'idrogenasi Hyd3 è
 522 peculiare delle specie di *Enterobacter*.

523 Le specie appartenenti al genere *Clostridium* trasformano le molecole di piruvato in
 524 Acetil Co-A e CO₂. La ferredossina ridotta viene prodotta dall'enzima piruvato sintasi
 525 (PFOR). La ferredossina ridotta può fornire gli elettroni direttamente alla idrogenasi
 526 [FeFe], un enzima tipico dei clostridi, che catalizza la formazione di H₂ coniugando gli
 527 H⁺ derivanti dall'ossidazione della ferredossina [30].

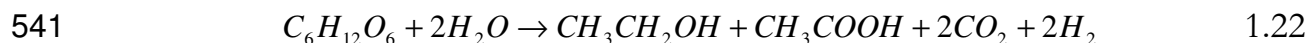


528
 529
 530 **Figura 9.** Vie metaboliche seguite da *Enterobacter* spp. (a) e *Clostridium* spp. (b) in DF [30].
 531
 532

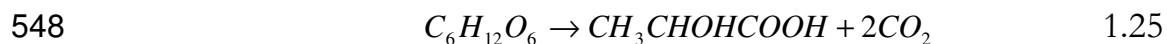
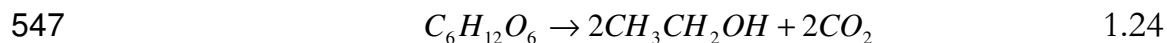
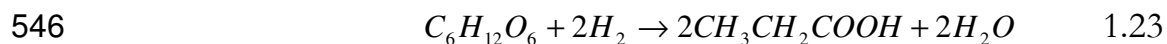
533 Durante la DF, la produzione di H₂ è accompagnata dalla produzione di co-
 534 prodotti. I co-prodotti più comuni sono acido acetico e butirrico [31]. Le reazioni
 535 biochimiche che portano alla produzione di questi acidi sono:



538 Entrambe le vie metaboliche generano H_2 , però, in alcuni casi può attivarsi una
539 terza via metabolica che porta alla formazione di acetato ed etanolo con conseguente
540 abbassamento della produzione di H_2 :



542 In DF, inoltre, possono attivarsi altre vie metaboliche che portano alla formazione
543 di acido propionico, etanolo oppure acido lattico. La formazione di propionato consuma
544 H_2 (1.23), mentre la produzione di etanolo ed acido lattico (1.24 e 1.25) non generano H_2
545 [32]:



549

550 *1.6. PARAMETRI CHE INFLUENZANO LA DARK FERMENTATION*

551

552 Come tutti i processi biologici, anche la DF è influenzata da diversi fattori. Il fattore
553 più importante è l'inoculo, poi ci sono diversi fattori ambientali capaci di influenzare la
554 DF sia direttamente che indirettamente.

555

556 *INOCULO*

557

558 I batteri capaci di generare H₂ sono ampiamente diffusi negli ambienti naturali.
559 Essi, infatti, possono vivere nel suolo, nelle deiezioni animali, nei fanghi dei trattamenti
560 di acque reflue etc. [33-35]. Tutti questi materiali possono essere usati come fonte
561 d'inoculo per la produzione di H₂ in DF. Purtroppo, però, in questi stessi materiali oltre
562 ai produttori di H₂ si ritrovano anche i consumatori di H₂, che possono essere soppressi
563 da alcuni pretrattamenti che, comunque, non intaccano la capacità produttiva dei batteri
564 idrogeno produttori. I pretrattamenti includono: shock termici, trattamenti acidi, basici,
565 aerazione, congelamento e scongelamento, trattamenti chimici; cloroformio, sodio 2-
566 bromo etansolfonato o acido 2-bromo etansolfonico o iodopropano [36]. Attraverso i
567 pretrattamenti è dunque possibile ottenere delle colture miste arricchite di idrogeno
568 produttori.

569 Gli idrogeno produttori sono, generalmente, batteri anaerobi stretti anche se alcuni
570 anaerobi facoltativi sono stati identificati come capaci di produrre H₂. Gli anaerobi
571 facoltativi producono ATP in presenza di O₂ attraverso la respirazione aerobica; in
572 assenza di O₂, però, essi sono capaci di passare alla fermentazione anaerobica. Le specie
573 di *Enterobacter* sono i più comuni batteri anaerobi facoltativi capaci di produrre H₂ [25].
574 *Escherichia coli*, potenzialmente, è in grado di generare H₂ da zuccheri semplici anche se
575 sono necessarie modifiche genetiche per incrementarne la produttività [37]. *Klebsella*
576 *oxytoca* si è rivelata in grado di produrre H₂ anche in presenza del 10% di O₂
577 nell'ambiente [38]. Oh et al. [39] hanno isolato *Citrobacter* sp. Y19 che può produrre H₂
578 sia da CO e H₂O che da glucosio.

579 I batteri anaerobi sono capaci di usare un'ampia gamma di carboidrati per produrre
580 H₂ con un tasso di produttività alto. I maggiori produttori di H₂ sono i clostridi (fam.

581 *Clostridiaceae*), altre specie minori appartengono alle famiglie *Streptococcaceae*, *Thermotogales* e
582 *Bacillus* [40-42]. All'interno di queste famiglie possono essere presenti ceppi mesofili e
583 termofili. I mesofili crescono in un range di temperature compreso tra 25 e 40 °C, i
584 ceppi termofili possono crescere a temperature più elevate (alcuni ceppi ipertermofili
585 anche fino a 80 °C) [25].

586 Poiché i batteri produttori di idrogeno appartengono a generi ben definiti, si è
587 pensato di utilizzare colture pure come inoculo da utilizzare in DF. *Clostridium* e
588 *Enterobacter* sono stati quelli più ampiamente utilizzati e studiati come inoculo per la DF.
589 Molti studi sono stati condotti con colture pure su glucosio come substrato ed in
590 modalità batch [29]. Ma è comunque auspicabile testare la produzione di H₂ da colture
591 pure su rifiuti organici che rendono il processo più industrializzabile al fine di ottenere lo
592 smaltimento di rifiuti accoppiato alla produzione di energia.

593 La produzione di H₂ da batteri anaerobi stretti (e.g. *Clostridium* sp.) è più alta rispetto
594 a quella ottenuta da anaerobi facoltativi (e.g. *Enterobacter* sp.) [43-44]. Tuttavia, una co-
595 cultura può rappresentare un'interessante soluzione [45-46]. Una co-cultura di *C.*
596 *butyricum* e *E. aerogens* può rendere l'ambiente più favorevole alla DF: *E. aerogens*, infatti
597 può consumare l'ossigeno disciolto nel substrato liquido, garantendo le condizioni
598 anaerobiche ottimali per la crescita di *C. butyricum*. Questa soluzione, di fatto,
599 permetterebbe di evitare l'utilizzo di agenti riducenti costosi come L-cisteina che
600 permettono di mantenere le condizioni di anaerobiosi necessarie per le colture pure.

601

602 *SUBSTRATI*

603

604 Il substrato utilizzato, ovviamente, è fondamentale per la produzione di H₂. Tutta la
605 materia organica, teoricamente, può essere utilizzata per generare H₂, ma le vie
606 metaboliche che i microorganismi scelgono di seguire in base al substrato dato possono
607 condurre alla produzione più o meno abbondante di H₂. I substrati più utilizzati per la
608 produzione di H₂ sono:

- 609 Materiali lignocellulosici
- 610 Reflui di caseificio
- 611 Melassi
- 612 Materiali amidacei
- 613 Scarti alimentari

614 I materiali lignocellulosici derivano dall'agricoltura e dall'industria del legno. Poiché
615 contengono cellulosa ed emicellulosa, essi costituiscono la maggiore fonte rinnovabile di
616 esosi e pentosi che possono essere utilizzati per la produzione biologica di H₂. La
617 cellulosa, però, deve essere degradata in zuccheri semplici prima di poter essere utilizzata
618 [47]. Taguchi et al. [48] hanno ottenuto 4.46 mmol H₂ mmol⁻¹ glucosio da idrolizzato di
619 cellulosa. Levin et al. [49] hanno riportato una produttività di 1.6 mol H₂ mol⁻¹ glucosio
620 da fibre di legno delignificato. Teoricamente, per ogni g di cellulosa, è possibile ottenere
621 567 mL H₂ [50] ma, all'aumentare della concentrazione di cellulosa diminuisce la resa in
622 H₂ [51]. La produzione di H₂, comunque, viene incrementata attraverso l'acidificazione
623 dei materiali lignocellulosici. La produttività può essere incrementata da 10 a 136 volte
624 rispetto ai materiali non trattati [52-54].

625 I reflui di caseificio sono ricchi in lattosio e, teoricamente, sono adatti per produrre
626 H₂. Diversi autori [55-66] hanno condotto esperimenti per verificare la possibilità di

627 produrre H_2 da reflui di caseificio. Questi studi riportano rese in H_2 vanno da 1.1 a 3.5
628 mol H_2 mol⁻¹ lattosio.

629 Le melasse sono i rifiuti degli zuccherifici. Sono una buona fonte di saccarosio che
630 può essere facilmente degradato anaerobicamente a glucosio che può essere fermentato a
631 H_2 . Ren et al. [67] riportano una produttività di 26.13 mol H_2 kg⁻¹ COD (domanda
632 chimica di ossigeno) rimosso usando un substrato basato su melasso.

633 I materiali amidacei sono i residui di molti processi produttivi dell'industria
634 alimentare. Siccome l'amido è un polimero di glucosio, è un'ottima fonte da cui
635 produrre H_2 in DF. Zhang et al. [68] hanno riportato una resa massima di 92 mL H_2 g⁻¹
636 di amido, utilizzando un substrato basato su amido. Van Ginkel et al. [69] hanno
637 ottenuto 2.1 L H_2 L⁻¹ di refluò della lavorazione delle patate addizionato di nutrienti. Gli
638 stessi autori, hanno ottenuto 0.9 L H_2 L⁻¹ di refluò di lavorazione delle mele addizionato
639 di nutrienti. Anche il riso è un materiale amidaceo e i residui della sua lavorazione
640 possono essere utilizzati per la produzione di H_2 . Fang et al. [70] hanno testato la
641 produzione di H_2 utilizzando un refluò della lavorazione del riso contenente una
642 concentrazione di 5.5 g L⁻¹ di carboidrati, ottenendo una resa di 346 mL H_2 g⁻¹
643 carboidrato.

644 Gli scarti alimentari domestici ed industriali sono materiali estremamente eterogenei
645 ed ampiamente diffusi che contengono grosse quantità di carboidrati utilizzabili per la
646 produzione di H_2 in DF. Kim et al. [71] hanno riportato una produzione massima di
647 122.9 mL H_2 g⁻¹ carboidrato-COD da scarti alimentari. Pan et al. [72] hanno riportato
648 una resa di 57 mL H_2 g⁻¹ solidi volatili (VS). Kim et al. [73] hanno ottenuto 1.9 mol H_2
649 mol⁻¹ esoso utilizzando gli scarti alimentari della caffetteria universitaria.

650

651 *pH*

652

653 Il pH è considerato come uno dei parametri chiave per la produzione di H₂ in DF,
654 poiché esso può influenzare direttamente l'attività dell'idrogenasi [74]. Diversi studi sono
655 stati condotti per trovare il pH ottimale per la produzione di H₂ biologico ed essi variano
656 tra 4.5 e 9. Questa disomogeneità nei valori riportati come ottimali può essere spiegata
657 con le differenze di substrato, fonte di inoculo, pretrattamenti applicati all'inoculo e le
658 condizioni operative adottate [25, 75-76]. Inoltre, i vari studi riportano i risultati dove
659 solo il pH iniziale era stato corretto e, durante la DF, non c'era stato nessun controllo
660 del pH [77]. Durante la DF, però, non viene prodotto solo H₂, ma anche acetato,
661 butirrato ed etanolo, la presenza dell'acido acetico e butirrico porta ad un calo del pH
662 che influenza le vie metaboliche [78]. A pH compreso tra 4.5-6.0, infatti, la produzione
663 di acetato e butirrato sembra essere favorita, mentre, si ritiene che a pH neutro o alcalino
664 siano promosse la produzione di etanolo ed acido propionico [28, 79-80]. Altri autori
665 suggeriscono che la produzione di etanolo (solventogenesi) rappresenti il segnale che i
666 *Clostridia* stanno passando dalla fase esponenziale di crescita, quando l'H₂ viene prodotto
667 in maniera abbondante insieme all'acido acetico e butirrico (acidogenesi), alla fase
668 stazionaria, cioè, quando l'H₂ non viene più prodotto. Tale passaggio è causato
669 dall'accumulo di acidi grassi volatili (VFA) durante la fase di crescita esponenziale [81].
670 La solventogenesi rappresenta un metodo di disintossicamento della biomassa batterica
671 dall'eccesso di VFA associato al basso pH del substrato [82]. Infatti, quando la
672 concentrazione di VFA è elevata, la forza ionica della soluzione aumenta: gli acidi

673 indissociati non polari penetrano la parete cellulare dei batteri e, a valori bassi di pH del
674 substrato, rilasciano protoni dentro la cellula batterica che ha un pH interno più elevato
675 [83], questo implica un incremento dell'energia richiesta per mantenere il pH
676 intracellulare neutro. Tale surplus di energia grava sul coenzima A e dei gruppi fosfato
677 [25].

678

679 *TEMPERATURA*

680

681 La temperatura è uno dei parametri operativi più importanti (insieme al pH) in DF.
682 La temperatura, infatti, influenza il tasso di idrolisi del substrato e quello di produzione
683 di H₂. È stato dimostrato che un aumento della temperatura, in uno specifico range, può
684 accelerare la produzione di H₂ che però crolla bruscamente appena fuori dal range di
685 temperatura ottimale [84]. I range di temperatura in cui può essere condotta la DF sono
686 in mesofilia (25-40 °C), termofilia (40-65 °C) o ipertermofilia (65-80 °C) [85]. In
687 condizioni di termofilia e ipertermofilia si presume di ottenere il massimo rendimento e
688 la massima produttività di H₂ a causa della maggiore attività delle reazioni biochimiche
689 così come suggerito dalle equazioni termochimiche [30]. Inoltre, la produzione di H₂ ad
690 alte temperature può essere un efficace soluzione per evitare la contaminazione di batteri
691 consumatori di H₂ [25]. Generalmente, la DF in termofilia ed ipertermofilia sembra
692 avere delle prestazioni superiori in termini di produzione di H₂, ed è largamente accettato
693 che più H₂ possa essere prodotto in termofilia piuttosto che in mesofilia. Tuttavia, i dati
694 reperibili in letteratura non supportano questa idea [86].

695 La scelta della temperatura operativa, infatti, influenza le specie batteriche coinvolte
696 nella DF e molti batteri mesofili hanno una migliore cinetica biochimica rispetto ai
697 batteri termofili a parità di substrato, inoltre, le alte temperature possono indurre la
698 denaturazione termica delle proteine e degli enzimi influenzando negativamente l'attività
699 microbica [87].

700

701 *PRESSIONE PARZIALE D'IDROGENO*

702

703 Come descritto in precedenza (cfr. par. 1.5.1.), durante la fermentazione
704 “clostridica”, l'idrogenasi è coinvolta nel processo di ossidazione-riduzione reversibile
705 della ferredoxina. Se la concentrazione di H_2 nella fase liquida è eccessiva l'ossidazione
706 della ferredoxina diviene meno favorevole rispetto alla sua riduzione e ciò riduce la
707 capacità produttiva di H_2 [32]. Così, la pressione parziale di H_2 (PH_2) in un reattore dove
708 avviene la DF può influenzare la produzione di H_2 : un'alta PH_2 è inibente, al contrario,
709 una bassa PH_2 può facilitare il rilascio di H_2 nello spazio di testa [88-89]. La riduzione
710 della PH_2 durante la DF può portare ad un incremento nella resa in H_2 . Diversi autori
711 [90-91] sono riusciti ad incrementare le rese in H_2 diffondendo N_2 oppure Ar,
712 rispettivamente, nel liquido. Un maggior rilascio di H_2 , comunque, può essere ottenuto
713 anche incrementando la velocità di agitazione [92].

714

715 *AZOTO E FOSFORO*

716

717 L'azoto è un fattore di crescita molto importante per i batteri poiché è il
718 componente degli acidi nucleici, delle proteine e degli enzimi. Allo stesso modo, anche i
719 fosfati sono un importante nutriente poiché servono come tamponi nelle reazioni
720 biochimiche. Dunque, un appropriato livello di azoto e fosforo sono necessari per
721 ottenere un'elevata proliferazione dei batteri idrogeno produttori [32]. L'azoto
722 ammoniacale è la fonte di azoto più largamente studiata, i dati disponibili in letteratura
723 però sono inconsistenti: Bisailon et al. [93], per esempio, riportano come ottimale una
724 concentrazione di 0.01 g N L^{-1} , Salerno et al. [94], invece, riportano una concentrazione
725 ottimale di 7 g N L^{-1} .

726 Il fosforo è necessario per la produzione di H_2 . È stato dimostrato che aumentando
727 la concentrazione di fosfati, in un appropriato range, si può aumentare la produzione di
728 H_2 , tuttavia, un eccesso della concentrazione di fosfati può ridurre drasticamente tale
729 produzione [93, 95].

730 Un appropriato C/N e C/P sono fondamentali per la produzione di H_2 in DF, ma
731 vari rapporti di C/N e C/P sono riportati come ottimali: Argun et al. [96] riportano un
732 rapporto C/N 200 e C/P 1000 come ottimale, al contrario, O-Thong et al. [97]
733 riportano come ottimale C/N 74 e C/P 559.

734

735 *IONI METALLICI*

736

737 Gli ioni metallici influiscono sulla crescita cellulare come cofattori di enzimi,
738 processi di trasporto e deidrogenasi. Un'alta concentrazione di ioni metallici, però, può
739 inibire l'attività batterica [98]. Lin e Lay [99] riportano che i nutrienti più importanti per i

740 batteri idrogeno produttori sono magnesio, sodio, zinco e ferro. Lo ione magnesio è un
741 importante cofattore che attiva quasi 10 enzimi (esochinasi, fosfofruttochinasi,
742 fosfogliceratochinasi etc.) che partecipano al processo di glicolisi durante le prime fasi di
743 DF [100]. Anche il Fe^{2+} è stato ampiamente studiato in DF poiché la sua presenza è
744 fondamentale per l'idrogenasi [25]. I dati disponibili in letteratura per la concentrazione
745 ottimale di Fe^{2+} sono inconsistenti: Liu e Shen [101] riportano che la concentrazione
746 ottimale è $10 \text{ mg Fe}^{2+} \text{ L}^{-1}$, ma Zhang et al. [102] riportano una concentrazione ottimale
747 di $589.5 \text{ mg Fe}^{2+} \text{ L}^{-1}$, O-Thong et al. [97], d'altra parte, riportano che la concentrazione
748 ottimale è $257 \text{ mg Fe}^{2+} \text{ L}^{-1}$, infine, Lee et al. [103] riportano una concentrazione ottimale
749 di $4000 \text{ mg FeCl}_2 \text{ L}^{-1}$.

750

751 *CONFIGURAZIONE DEL REATTORE*

752

753 La configurazione del reattore è riconosciuta come un altro importante parametro
754 per aumentare la resa e la produttività di H_2 . Vari studi hanno correlato la produzione di
755 H_2 con la quantità di popolazione microbica, così, differenti strategie sono state
756 elaborate per evitare il dilavamento della popolazione microbica dal reattore [104-106].
757 Queste strategie includono la granulazione del fango e la formazione di biofilm al fine di
758 aumentare la concentrazione batterica all'interno del reattore. Le configurazioni dei
759 reattori che sono stati: reattori agitati a flusso continuo (CSTR), reattori anaerobici a
760 letto fluidificato (AFBR), reattori anaerobici in batch sequenziali (ASBR), reattori a letto
761 fisso o impaccati, reattori UASB, reattori a letto filtrante, reattori a letto misto, reattori a
762 flusso a pistone e bireattori a membrana (MBR) [32].

763 Altri studi si sono focalizzati sulla fermentazione semi-secca (10-20 % di sostanza
764 secca) e secca (>20% sostanza secca) per la produzione di H₂, poiché l'interesse per la
765 produzione di H₂ da biomasse residue è in aumento [82, 107-109], è stata studiata anche
766 l'influenza della ritenzione della sostanza secca (SRT) e il tasso di carico organico (OLR)
767 sulla produzione di H₂. Ma, anche in questo caso, i dati in letteratura sono controversi.
768 Gavala et al. [110], per esempio, riportano che il tasso di produzione di H₂ in un reattore
769 UASB è più elevata che in un CSTR con un tempo di ritenzione basso, il CSTR, però, ha
770 sempre avuto una maggiore produzione di H₂ a tutti i tempi di ritenzione testati. Show et
771 al. [105] hanno confrontato le prestazioni di un CSTR e di un AFBR per la produzione
772 di H₂. Questi sistemi avevano differenti strategie di crescita batterica: CSTR a biomassa
773 sospesa, CSTR con fango granulare, AFBR con fango granulare e AFBR con biofilm. La
774 massima produzione di H₂ è stata ottenuta con CSTR a biomassa sospesa (1.92 mol H₂
775 mol⁻¹ glucosio), i sistemi granulari e il biofilm hanno raggiunto una produzione massima
776 di H₂ di 1.83 ±0.09 mol H₂ mol⁻¹ glucosio e 1.81 ±0.08 mol H₂ mol⁻¹ glucosio,
777 rispettivamente.

778 Tempi lunghi di SRT favoriscono la crescita di microorganismi idrogenotrofi, tempi
779 corti di SRT, d'altro canto, possono ridurre l'utilizzo del substrato con un conseguente
780 dilavamento della biomassa attiva [111]. L'ORL, invece, può influire sull'accumulo di
781 VFA e sui cambiamenti di pH che influenzano la composizione della biomassa attiva
782 con conseguente modifica delle vie metaboliche [77].

783

784 *1.7. REFLUI DI CASEIFICIO*

785

786 Come detto in precedenza (cfr. par. 1.5.), la fonte da cui più facilmente si ricava
787 idrogeno sono gli zuccheri. Pertanto, i reflui di caseificio, che sono ricchi in lattosio
788 sembrano essere adatti per la produzione di H₂ (cfr. par. 1.6.2.).

789 I reflui di caseificio sono ampiamente diffusi in quasi tutto il mondo, poiché essi
790 derivano dal processo di caseificazione del latte. Tutti formaggi propriamente detti
791 vengono prodotti aggiungendo il caglio al latte che porta alla caseificazione della caseina
792 che porta alla formazione di una massa pastosa detta “cagliata” e di una fase liquida detta
793 “siero di latte” (SL) [112]. La rottura della cagliata e la sua successiva lavorazione
794 portano alla produzione del formaggio, SL, invece, è il liquido di scarto. In Italia, quasi
795 sempre SL viene utilizzato per la produzione di ricotta, composta maggiormente dalla
796 caseina e dalle sieroproteine non coinvolte nella caseificazione. Il liquido di scarto di tale
797 produzione è detto scotta che, di fatto, è un SL parzialmente deproteinizzato. Poiché il
798 lattosio è poco coinvolto nella produzione di ricotta, la scotta ha praticamente lo stesso
799 quantitativo di lattosio che da solo costituisce almeno il 75% della sostanza secca.
800 Inoltre, sono presenti anche minerali (8-10% della sostanza secca), urea, acido citrico,
801 lattico ed urico, ed anche vitamine del gruppo B [113-116].

802

803 *1.7.1. DISPONIBILITA' DEI REFLUI DI CASEIFICIO*

804

805 Ogni anno nel mondo si stima che vengano prodotte circa 180-190 milioni di
806 tonnellate di SL; ma solo il 50% viene utilizzato dall'industria alimentare. In Europa,
807 annualmente, vengono prodotte 40 milioni di tonnellate di SL, il 68% delle quali viene
808 utilizzato maggiormente per l'alimentazione animale [117]. I reflui di caseificio hanno un

809 carico organico troppo elevato per essere smaltiti così come sono; il loro valore di COD
810 può arrivare fino a $80 \text{ g O}_2 \text{ L}^{-1}$ [118]. Attualmente il carico organico dei reflui di
811 caseificio viene abbattuto mediante processi biologici aerobi in vasche di ossidazione
812 prima di essere immessi nelle acque superficiali.

813

814 1.7.2. *ALTERNATIVE ALLO SMALTIMENTO*

815

816 Come detto in precedenza, solo il 50% del SL prodotto annualmente nel mondo
817 viene utilizzato dalle industrie alimentari e mangimistiche. Così, circa 95 milioni di
818 tonnellate di SL sono ancora disponibili per un'ulteriore valorizzazione prima dello
819 smaltimento. Sia SL che la scotta sono ancora ricchi di sieroproteine ad alto valore
820 biologico che potrebbero essere recuperate attraverso l'ultrafiltrazione con membrane
821 selettive [119]. Le varie frazioni proteiche ottenute possono poi essere utilizzate per
822 specifici utilizzi, il permeato che deriva dall'ultrafiltrazione è ancora ricco in lattosio e
823 questo permetterebbe di avere a disposizione, annualmente, 4523 tonnellate di lattosio
824 per una loro ulteriore valutazione. Gli scarti di caseificio, inoltre, potrebbero essere
825 utilizzati per la fertirrigazione [120], per la produzione di polidrossibutirrato [121]
826 oppure per la produzione di energia; poiché il lattosio è formato da 2 molecole di esoso,
827 teoricamente, da esso è possibile ottenere $8 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1}$ di lattosio [16] e questo lo
828 rende particolarmente appetibile per una sua valorizzazione energetica specialmente in
829 DF [65].

830

831 2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

832

833 L'attività di dottorato è stata svolta nell'ambito del progetto "Sostenibilità della
834 filiera agroalimentare" (SO.FI.A., CTN01_00230_450760.). Tale progetto finanziato dal
835 Ministero dell'istruzione, dell'università e della ricerca era inquadrato all'interno del
836 Cluster Tecnologico Agrifood Nazionale (CL.A.N.). Il progetto SO.FI.A. era articolato
837 in 5 Obiettivi Realizzativi (O.R.) e l'attività di dottorato è stata svolta all'interno
838 dell'O.R.4: Recupero di sottoprodotti e biomolecole dell'industria lattiero-casearia.
839 Precisamente l'attività svolta presso CREA-ZA, ha riguardato la valorizzazione degli
840 scarti di caseificio per la produzione biologica di H₂ e CH₄.

841 Come detto in precedenza, in Italia, dal SL si ricava la ricotta, il cui scarto è detto
842 scotta. La scotta, oltre ad essere ancora ricca in lattosio, contiene ancora delle
843 sieroproteine con un alto valore biologico. Un importante produttore italiano di latticini,
844 partner del progetto, era interessato al recupero delle siero proteine che, poiché hanno
845 un alto valore biologico, hanno un fiorente mercato. La scotta fornita da questo
846 produttore è stata ultrafiltrata nell'impianto di UF di ENEA (altro partner del progetto)
847 al Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi, Centro Ricerca Casaccia (Roma). Il refluo
848 liquido, ricco di lattosio, è stato valutato al fine di utilizzarlo per produrre H₂. L'obiettivo
849 specifico del è stato la valorizzazione energetica degli scarti di caseificio (scotta e
850 permeato), utilizzandoli per la produzione di H₂ in DF mediante l'utilizzo di consorzi
851 microbici non selezionati. Le attività svolte sono state focalizzate sulla valorizzazione del
852 permeato di scotta (più povero della scotta) per la produzione di H₂ e sull'ottimizzazione
853 dei parametri che maggiormente influenzano la DF in una condizione in cui ci siano
854 diverse popolazioni microbiche all'interno del reattore anaerobico. L'evoluzione delle

855 popolazioni microbiche, infatti, è stata studiata mediante l'utilizzo della tecnica dell'high
856 throughput sequencing (HTS) che, permette di ottenere un responso rapido ed un'alta
857 copertura nell'identificazione delle comunità microbiche con costi relativamente bassi
858 [122]. L'HTS è stata utilizzata recentemente per lo studio della microbiologia dei reattori
859 di digestione anaerobica dei reflui industriali [123-124] ed anche per descrivere le
860 comunità microbiche in reattori in cui veniva prodotto H₂ che avevano diverse
861 condizioni operative [125-126]. Più di recente, Etchebehere et al. [127] hanno utilizzato
862 tale tecnica per confrontare le popolazioni residenti in 20 reattori in cui veniva prodotto
863 H₂, in diversi laboratori del Sud America.

864 In questa tesi, l'attenzione è stata maggiormente focalizzata sul substrato e sul pH.

865

866 **3. MATERIALI E METODI**

867

868 *3.1. SUBSTRATI*

869

870 I substrati utilizzati durante il progetto di ricerca sono stati scotta, permeato di
871 scotta e liquame suino. La scotta è stata reperita in 4 caseifici diversi (G, H, R, S), la
872 scotta "G" è stata ultrafiltrata dall'ENEA (come riportato in precedenza) usando
873 membrane con cut-off 30 kDa. Sia le scotte che il permeato sono stati congelati a -28°C
874 immediatamente dopo la loro produzione e scongelati poco prima del loro utilizzo. Il
875 liquame suino è stato raccolto dalla vasca di stoccaggio della porcilaia sperimentale del
876 Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro Zootecnia e
877 acquacoltura, (CREA-ZA) sita a S. Cesario sul Panaro (MO), dopo omogeneizzazione

878 meccanica ed utilizzato fresco. Tutti i substrati sono stati utilizzati tal quali senza alcuna
879 aggiunta chimica o pretrattamenti, la loro composizione è riportata in Tab.1.

880 **Tabella 1.** Caratterizzazione dei substrati utilizzati nei vari esperimenti. Deviazione standard in parentesi (n=3), TS= solidi totali, FW= peso fresco, VS = solidi volatili.

ID	TS % FW	VS % FW	Total N % FW	Ammonium N % FW	pH	Alcalinity (mg CaCO₃ L⁻¹)	Total P % TS	Organic C % TS	COD (gO₂/L⁻¹)	C/N	Lactose g L⁻¹
Pig slurry	1.19 (0.3)	0.79 (0.25)	0.11 (0.01)	0.08 (0.01)	7.4 (0.3)	15329.33	0.02 (0.01)	30.52 (5.84)	9.53 (2.65)	3.12 (0.85)	0.00
Scotta "G"	5.87 (0.03)	5.07 (0.21)	0.07 (0.01)	0.01 (0.00)	5.7 (0.3)	751.25 (1.77)	0.03 (0.00)	37.59 (3.13)	54.50 (2.12)	31.28 (5.46)	50.3 (0.1)
Scotta "H"	6.42	5.19	0.06	0.01	5.91	519.00	0.04	33.18	52.00	36.66	46.3
Scotta "R"	6.78	5.77	0.09	0.01	6.20	656.00	0.05	41.99	58.00	31.53	51.2
Scotta "S"	6.62	5.93	0.10	0.01	6.12	658.00	0.04	44.48	60.00	29.33	49.7
Permeate	5.85 (0.09)	5.21 (0.14)	0.03 (0.00)	0.01 (0.00)	6.1 (0.1)	592.50 (47.30)	0.02 (0.00)	36.51 (1.67)	54.25 (1.50)	80.10 (6.85)	50.6 (0.4)

881

882

883 3.2. PREPARAZIONE DELL'INOCULO

884

885 L'inoculo è stato preparato utilizzando il liquame suino tal quale [128]. La frazione
886 liquida del liquame suino è stata prelevata all'uscita del separatore solido/liquido.

887 Duecento mL di liquame suino sono stati miscelati con 200 mL di terreno d'idratazione

888 sterilizzato (HM), contenente $348 \text{ mg L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $227 \text{ mg L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 500 mg L^{-1}

889 NH_4Cl , $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $250 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $2.25 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$, $300 \text{ mg L}^{-1} \text{ L-}$

890 cisteina, $300 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e 0.1% resazurina, in bottiglie da 500 mL con

891 un'atmosfera di $\text{N}_2\text{-CO}_2$ (80:20). I gas sono stati miscelati con un miscelatore KM 60-3

892 (Witt, Germania) e deossigenati tramite una colonna contenente pellets di Cu ridotti

893 (Glasgerätebau Ochs, Germania) e diffusi in ogni bottiglia con un distributore

894 d'alluminio di gas (Glasgerätebau Ochs, Germania) dopo essere stati filtrati con filtri per

895 gas autoclavabili in PTFE (Midisart® 2000, dimensione dei pori $0.2 \mu\text{m}$, Sartorius,

896 Germania).

897 La miscela liquame suino e HM è stata incubata a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ in condizioni di

898 anaerobiosi stretta e la composizione dello spazio di testa è stata analizzata man mano

899 che il gas si accumulava. L'inoculo è stato considerato pronto quando la produzione di

900 gas si è fermata, indicando il completo esaurimento delle sostanze nutritive inizialmente

901 presenti nel liquame suino. A questo punto la miscela è stata centrifugata e il pellet è

902 stato risospeso in 40 mL di HM in condizioni anaerobiche. L'inoculo è stato utilizzato

903 così, senza alcun pre-trattamento. La composizione degli inoculi utilizzati nelle varie

904 prove è riportata nella Tabella 2.

905 **Tabella 2.** Caratterizzazione degli inoculi utilizzati nei vari esperimenti. SD = deviazione standard (n=12), TS= solidi totali, FW= peso fresco, VS = solidi volatili.

ID	TS % FW	VS % FW	Total N % FW	Ammonium N % FW	pH	Alcalinity (mg CaCO₃ L⁻¹)	Total P % TS	Organic C % TS	Density
M3B0914	9.57	5.51	0.42	0.2	7.8	15400	0.2	30.42	1.07
M3B0415	8.42	5.00	0.42	0.2	7.8	15500	0.2	30.54	1.07
M3C0915	8.84	5.17	0.51	0.2	8.4	17202	0.25	30.80	1.07
M3B0216	9.42	5.21	0.47	0.2	8.1	16510	0.25	30.00	1.07
Mean	9.06	5.22	0.45	0.2	8	16153	0.23	30.44	1.07
SD	0.5	0.2	0.04	0.00	0.3	860	0.03	0.33	0.00

906 3.3. *COMPOSIZIONE DEL BIOGAS*

907

908 Le concentrazioni di H₂, CH₄ e CO₂ nel biogas sono state misurate con un
909 gascromatografo (GC) MicroGC Agilent 3000 (Agilent Technologies, U.S.A.),
910 equipaggiato con 2 colonne: Molsieve e Plot U; un detector TCD ed argon come gas
911 carrier.

912 Le misurazioni del biogas sono state fatte in accordo con quanto riportato in [129].
913 Il biogas è stato raccolto in siringhe di vetro da 100 mL (Poulten & Graf GmbH,
914 Germania), come descritto in [130]. In breve, le siringhe contenenti il biogas erano
915 equipaggiate con un tubo di lattice (diametro interno, 3 mm) per la connessione all'
916 entrata GC. I tubi erano chiusi con dei morsetti quando non utilizzate. Un'aliquota del
917 gas è stato spinto fuori prima di ogni iniezione per pulire la linea di iniezione.

918

919 3.4. *METODI D'ANALISI*

920

921 Solidi totali (TS), solidi volatili (VS), COD, alcalinità, N totale e ammoniacale e pH
922 sono stati determinati secondo quanto descritto in [131]. I solidi totali sono stati misurati
923 gravimetricamente come la differenza del peso del campione prima e dopo un
924 trattamento termico a 105 °C in stufa (G[®]-Therm 115, F.lli GALLI G.& P., Italia) fino a
925 peso costante. I solidi volatili sono stati calcolati come la differenza tra TS e le ceneri. Le
926 ceneri sono state determinate con l'incenerimento in una muffola (B180, Nabertherm,
927 Germania) a 550 °C per 10 ore. Il COD è stato determinato attraverso l'ossidazione del
928 dicromato usando un Tecator[®] Digester (Foss, Danimarca) come fonte di calore e un

929 condensatore a ricadere. L' N totale e ammoniacale sono stati determinati tramite
930 distillazione con un apparato Kjeldhal (Kjeltec™ 2300 Foss, Danimarca), rispettivamente
931 con o senza digestione acida con H₂SO₄ (Sigma-Aldrich, Germania) e Cu (Pellet
932 Kjeltabs™ CM AA50, Thompson Capper, UK) come catalizzatore. Il pH è stato
933 determinato con un pH-metro Crison Titromatic 1S equipaggiato con un elettrodo 5203
934 (Hach, USA).

935 Per le analisi dei metaboliti della fermentazione, 5 mL di campione di brodo di
936 fermentazione congelato sono stati scongelati e centrifugati a 4000 rpm per 15 minuti. Il
937 surnatante è stato usato per le analisi. Gli acidi grassi volatili sono stati determinati con
938 un gascromatografo Thermo Finnigan Trace GC Ultra (Thermo Finnigan LLC, U.S.A.),
939 equipaggiato con una colonna capillare Nukol™ (Supelco, U.S.A., cat. no. 24107), 30 m x
940 0.25 mm ID, 0.25 µm di spessore del film. Condizioni analitiche: detector FID, gas
941 carrier: He (S.I.A.D. S.p.A, Italia); flusso di gas: 0.8 mL min⁻¹ “split ratio”: 80/100, forno
942 a temperatura programmata: da 100 °C (per 1 min) a 193 °C con incremento di 8°C min⁻¹,
943 temperatura finale 193 °C per 2 min. I campioni sono stati preparati come descritto in
944 [132], con alcune modifiche. Mezzo mL del surnatante del campione è stato aggiunto a
945 0.25 mL di 4% H₃PO₄ e 0.25 mL di standard interno, per un volume finale di 1 mL. Un
946 microlitro di questa miscela sono stati iniettati direttamente nella camera di iniezione del
947 gascromatografo con una siringa Hamilton® (U.S.A.) da 10 µL. L'identificazione dei
948 picchi è stata fatta comparando i tempi di ritenzioni dei picchi sconosciuti con quelli di
949 una miscela standard di acidi grassi volatili commerciale (46975-U Supelco, U.S.A.).
950 L'acido 2-2 dimetilbutirrico (Sigma-Aldrich, Germania) è stato usato come standard
951 interno per quantificare la concentrazione di VFA come descritto in [133]. La

952 concentrazione totale di VFA (mg L^{-1}) è stata calcolata come la somma delle
953 concentrazioni degli acidi acetico, propionico, butirrico e iso-butirrico, valerico e iso-
954 valerico, caproico e iso-caproico.

955 La concentrazione di lattosio, etanolo e acido lattico è stata determinata
956 enzimaticamente con dei kit R-Biopharm (R-Biopharm AG, Germany). Il lattosio è stato
957 prima idrolizzato a glucosio e galattosio dalla galattosidasi; il galattosio è stato poi
958 ossidato, in condizioni alcaline, a galattonato dall' NAD in presenza di galattosio
959 deidrogenasi. L'etanolo è stato ossidato ad acetaldeide in condizioni alcaline dal NAD, in
960 presenza di alcol deidrogenasi, e l'acetaldeide è stata successivamente ossidata ad acido
961 acetico dal NAD in presenza di aldeide deidrogenasi. L'acido lattico è stato ossidato a
962 piruvato dal NAD, in presenza di lattato deidrogenasi. La quantità di NADH che si è
963 formata dal NAD in tutte le reazioni di ossidazione è stata sempre misurata con uno
964 spettrofotometro (V630, Jasco, U.S.A.) a 340 nm.

965

966 3.5. ADATTAMENTO DEL MODELLO E ANALISI STATISTICHE

967

968 I parametri delle curve della produzione cumulativa di H_2 sono stati valutati
969 attraverso un'equazione di Gompertz a 3 parametri modificata (1.19). Tutte le analisi
970 statistiche sono state effettuate usando le procedure del pacchetto SAS [134].
971 L'adattamento del modello Gompertz alle misurazioni è stato fatto usando PROC
972 NLIN e i valori dei parametri sono stati stimati secondo il metodo Gauss-Newton.
973 PROC LIN è stato usato per l'analisi della regressione dei valori di R_{max} ed H_{max} in
974 funzione del pH. PROC MIXED è stato usato per verificare la significatività degli effetti

975 dei trattamenti sui parametri della DF: λ , Rmax ed Hmax. Il confronto multiplo delle
976 medie è stato fatto utilizzando SAS LSMEANS. I fattori e gli effetti dell'interazione dei
977 fattori sono stati considerati significativi a $P < 0.05$. Tukey Honestly Significant
978 Difference (HSD) a $P = 0.05$ è stato utilizzato per confrontare i valori medi dei
979 trattamenti.

980 Per descrivere la distribuzione delle OTUs (unità tassonomiche operative) in funzione
981 del tempo di DF e del pH iniziale le analisi metagenomiche è stata applicata la Principal
982 Coordinate Analysis (PCoA) utilizzando la funzione di ordinata del pacchetto R
983 PHYLOSEQ [135] utilizzando il metodo della distanza UNIFRAC [136]. Per mezzo di
984 analisi statistiche è stata valutata l'influenza del pH, durante la DF, sull'abbondanza
985 relativa dei 5 generi più rappresentativi: *Bifidobacterium*, *Clostridium* sensu strictu,
986 *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Trichococcus*. Le analisi sono state applicate per valutare i fattori
987 e gli effetti delle interazioni tra fattori sull'abbondanza relativa delle OTUs (ABUND).
988 ABUND (in percentuale) è stata usata come variabile dipendente nel modello. Per
989 valutare le differenze temporali in funzione del pH, le misure orarie sono state
990 raggruppate in *Periodi*. Questo ha permesso di aumentare il numero di campioni di ogni
991 trattamento. I trattamenti confrontati erano: pH (4, 8 e 10) e *Periodo*. *Periodo 1* (fase lag
992 nella produzione di H₂) in cui sono state incluse le misure al tempo 0 e dopo 6 ore di
993 DF; *Periodo 2* (fase esponenziale in cui sono state incluse le misure a 16,24 e 48 ore;
994 *Periodo 3* (fase stazionaria) in cui sono state incluse le misure a 72 e 96 ore. PROC
995 MIXED è stato usato per verificare la significatività degli effetti dei trattamenti su
996 ABUND. Il test KENWARDROGER è stato utilizzato per calcolare i gradi

997 di libertà del denominatore. REPEATED è stato usato per gestire il trattamento *Periodo*.
998 I confronti multipli tra le medie sono stati effettuati usando SAS LSMEANS. I fattori e gli
999 effetti delle interazioni tra fattori sono stati considerati significativi a $P < 0.05$. Per
1000 confrontare i valori medi dei trattamenti è stato usato il test Tukey-Kramer per disegni
1001 non bilanciati.

1003 3.6. ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

1005 Cinque mL di ogni campioni sono stati centrifugati in una mini centrifuga ad alta
1006 velocità (Microspin 12, Biosan, Lettonia) a 12400 rcf (forza centrifuga relativa) per 1
1007 minuto, 2 mL di pellet di ogni campione sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA
1008 genomico. L'estrazione del DNA è stata fatto utilizzando PowerBiofilm[®] DNA Isolation
1009 Kit (Mo Bio laboratories, USA), seguendo le istruzioni del produttore. La preparazione
1010 della libreria, il sequenziamento del DNA e le analisi metatassonomiche sono state
1011 effettuate dal Research and Innovation Centre della Fondazione Edmund Mach (FEM)
1012 (S. Michele all'Adige, TN, Italia).

1014 3.7. PREPARAZIONE DELLA LIBRERIA E SEQUENZIAMENTO

1016 La preparazione della libreria ed il sequenziamento sono stati eseguiti come
1017 descritto in [137]. È stato usato il set di primer batterico specifico 515F (5'
1018 GTGYCAGCMGCCGCGGTAA 3') e 806R (5' GGACTACNVGGGTWTCTAAT 3')
1019 [138] con basi degenerate [139] e adattatori Illumina. Tutto il DNA genomico estratto è

1020 stato amplificato in PCR mirando ai frammenti ~250-bp del gene 16S rRNA della
1021 regione variabile V4. Venticinque μl di amplificato e 1 μM di ogni primer sono stati usati
1022 per l'amplificazione in PCR di ogni campione. Specificamente, 2.5 μl di DNA stampo
1023 (5ng/ μl) sono stati usati in combinazione con 2.5 μl di 2x KAPA HiFi HotStart
1024 ReadyMix, 5 μl di "forward" primer e 5 μl di "reverse" primer. L'amplificazione PCR è
1025 stata eseguita usando GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.)
1026 con i seguenti passaggi: melting step; 95 °C per 3 minuti (1 ciclo), annealing step; 95 °C
1027 per 30 secondi, 55 °C for 30 secondi, 72 °C for 30 secondi (25 cicli), extension step; 72
1028 °C per 5 minutes (1 ciclo).

1029 La qualità dei prodotti della PCR è stata verificata su gel d'agarosio (1.5%) e le
1030 impurità sono state rimosse usando Agencourt AMPure XP system (Beckman Coulter,
1031 U.S.A.) seguendo le istruzioni del produttore. Successivamente, il doppio indice e gli
1032 adattatori di sequenziamento Nextera XT Index Primer (Illumina) sono stati attaccati
1033 con 7 cicli di PCR (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, Illumina). Le
1034 librerie finali ottenute sono state purificate con Agencourt AMPure XP system ed
1035 analizzate su una piattaforma Typestation 2200 (Agilent Technologies, U.S.A.) e
1036 quantificate utilizzando il kit Quant-IT PicoGreen dsDNA (Thermo Fisher Scientific,
1037 U.S.A.) con un lettore di micropiastre Synergy2 (Biotek, U.S.A.). Tutte le librerie
1038 ottenute sono state raggruppate in modo equimolare in un'unica libreria di ampliconi ed
1039 analizzata con una piattaforma a Typestation 2200. Le librerie segnate sono state
1040 sequenziate con una piattaforma Illumina[®] MiSeq (PE300) (MiSeq Control Software
1041 2.5.0.5 and Real-Time Analysis software 1.18.54.0).

1042

1043 3.8. ANALISI DEI DATI METATASSONOMICI

1044

1045 L'analisi dei dati metatassonomici è il processo HTS utilizzato per caratterizzare
1046 l'intero microbiota di un ecosistema definito e creare il profilo metatassonomico della
1047 comunità microbica che mostra le relazioni esistenti tra tutte le sequenze ottenute.

1048 I dati grezzi ottenuti dal procedimento Illumina sono stati pre-processati con un
1049 sistema di software "pipeline" (MICCA v. 1.6.1) [140]. Le unità tassonomiche operative
1050 (OTUs) sono state assegnate raggruppando le sequenze con una somiglianza di almeno il
1051 97% di paia di basi e le loro sequenze rappresentative sono state classificate con RDP
1052 [141] versione 2.8.

1053 La stima dell' α diversity (la ricchezza all'interno del campione) è stata calcolata
1054 usando phyloseq R package [142], e confrontata con gli indici Chao 1 e Shannon.
1055 L'indice Chao 1 stima il numero assoluto di specie in un campione, basandosi sul
1056 numero di specie rare [143]. L'indice di Shannon quantifica l'entropia del sistema: in un
1057 sistema altamente eterogeneo (e campionato in maniera casuale); un individuo
1058 sconosciuto potrebbe appartenere a qualsiasi specie ed esiste una grande incertezza sulla
1059 predizione della sua identità. In un sistema meno eterogeneo, dominato da una o poche
1060 specie, è più semplice predire l'identità di un individuo sconosciuto poiché c'è meno
1061 incertezza nel sistema [144].

1062

1063 3.9. SUPPORTI PER L'IMMOBILIZZAZIONE DELLA BIOMASSA

1064

1065 I supporti scelti erano di origine inorganica (ceramica e zeoliti) e organica (biochar
1066 da deiezioni suine palabili e da cippato). I supporti in ceramica (Biomax, Askoll, Italia),
1067 sono stati scelti perché precedentemente descritti come il miglior supporto per l'adesione
1068 di biomassa di specie appartenenti al genere *Thermotoga* [145], le zeoliti (I.Z. Italiana
1069 Zeoliti srl, Italia) sono state scelte poiché esse sono state usate come supporto per
1070 l'adesione di microorganismi in diverse configurazioni di reattori di digestione
1071 anaerobica [146], i biochar sono stati scelti come supporti innovativi per l'adesione di
1072 biomassa microbica. Le dimensioni medie di ciascun supporto erano di 0.5-1 cm.

1073 I biochar sono stati prodotti come descritto in [147]. Brevemente 5 g di campioni
1074 secchi e setacciati di palabile suino o cippato sono stati trattati a 420 °C per 20 minuti in
1075 crogiuoli di porcellana coperti.

1076

1077 **4. DISEGNI SPERIMENTALI**

1078

1079 *4.1. ESPERIMENTO "A"*

1080

1081 In questo esperimento è stata valutata la produzione di H₂ da permeato in
1082 confronto con 4 scotte diverse (G., H., R., S.), al fine di capire se il permeato fosse un
1083 substrato adatto alla produzione di H₂. Le scotte sono state fornite da 4 caseifici
1084 differenti, il permeato è stato ottenuto dall'ultrafiltrazione della scotta "G". La DF è stata
1085 condotta in reattori da 100 mL (volume effettivo 118.5 mL), in condizioni batch non
1086 tamponato, in triplo per un totale di 15 reattori. La miscela di reazione era costituita da 5

1087 mL di inoculo (M3B0914) e 50 mL di substrato non sterile. Il pH iniziale era
1088 mediamente 6.3 ± 0.2 .

1089 Lo spazio di testa dei reattori è stato flussato con 100% N₂ durante tutte le fasi di
1090 preparazione prima dell'inoculo. I reattori sono stati chiusi con tappi di butile tenuti da
1091 sigilli in alluminio ed incubati a 35 °C per 4 giorni. Durante il periodo d'incubazione essi
1092 sono stati distribuiti in maniera casuale all'interno dell'incubatore. Il biogas è stato
1093 raccolto come descritto in precedenza (cfr. par. 3.3). I volumi di H₂ e CH₄ sono stati
1094 misurati una volta al giorno dopo l'incubazione. Il periodo d'incubazione è stato
1095 completato quando non vi era più alcuna produzione di biogas all'interno dei reattori.
1096 Nessuna produzione di H₂ e CH₄ è stata rilevata nei reattori in cui l'inoculo era stato
1097 sospeso in HM sterilizzato.

1098

1099 4.2. *ESPERIMENTO "B"*

1100

1101 In questo esperimento è stata valutata la produzione di H₂ da permeato e scotta in
1102 co-digestione o meno con liquame suino a diverse percentuali e a diversi livelli di pH
1103 iniziale, al fine di capire come la presenza di liquame suino potesse influenzare la
1104 produzione di H₂. Il permeato (PE) è stato ottenuto dall'ultrafiltrazione della scotta "G"
1105 (SC), il liquame suino (PS) è stato prelevato dalla vasca di raccolta della porcilaia
1106 sperimentale del CREA-ZA, sita a S. Cesario s/P. (MO), dopo omogeneizzazione
1107 meccanica.

1108 La DF è stata condotta in reattori da 100 mL (volume effettivo 118.5 mL), in

1109 condizioni batch non tamponato, in triplo per un totale di 135 reattori. La miscela di

1110 reazione era costituita da 5 mL di inoculo (M3B0415) e 50 mL di substrato non sterile. I
1111 trattamenti erano: SC o PE in co-digestione o meno con PS (0, 25, 50 e 75%) a 5 valori
1112 di pH iniziale (6.5, 7, 7.5, 8 e 8.5). Reattori contenenti 100% PS sono stati inclusi come
1113 controllo. Le correzioni di pH al livello desiderato sono stati fatte in ogni reattore prima
1114 dell'inoculo, con NaOH 32% (Chem-Lab, Belgio) o HCl 19%, (Sigma-Aldrich,
1115 Germania), utilizzando una siringa dotata di filtro sterile (dimensione dei pori 0.2 μm ,
1116 Minisart[®] RC 15, Sartorius, Germania). Dopo la correzione del pH, i reattori sono stati
1117 flussati con 100% N₂ e poi inoculati. I reattori sono stati chiusi con tappi di butile tenuti
1118 da sigilli in alluminio ed incubati a 35 °C per 14 giorni. Durante il periodo d'incubazione
1119 essi sono stati distribuiti in maniera casuale all'interno dell'incubatore. Dopo 7 giorni,
1120 quando la produzione di H₂ si era arrestata, il pH è stato controllato e corretto in ogni
1121 reattore al proprio valore iniziale. Le correzioni di pH sono state fatte in una camera
1122 anaerobica (Whitley DG250 Anaerobic Workstation, Don Whitley Scientific Limited,
1123 UK) come descritto in precedenza. Il biogas è stato raccolto come descritto in
1124 precedenza (cfr. par. 3.3). I volumi di H₂ e CH₄ sono stati misurati una volta al giorno
1125 dopo l'incubazione. Il periodo d'incubazione è stato completato quando non vi era più
1126 alcuna produzione di biogas all'interno dei reattori. Nessuna produzione di H₂ e CH₄ è
1127 stata rilevata nei reattori in cui l'inoculo era stato sospeso in HM sterilizzato. Al termine
1128 del periodo di fermentazione, il pH finale è stato misurato e sono stati analizzati i VFA.

1129

1130 *4.3. ESPERIMENTO "C"*

1131

1132 Il pH è stato descritto (cfr. par. 1.6). come un parametro fondamentale per la DF.
1133 In questo esperimento è stata valutata l'influenza che il pH iniziale ha avuto sulla
1134 produzione di H₂ in DF from PE.

1135 Sette valori di pH iniziale sono stati confrontati: 4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10. La DF è stata
1136 condotta in reattori da 500 mL (volume effettivo 588 mL), in condizioni batch non
1137 tamponato, in triplo per un totale di 21 reattori. La miscela di reazione era costituita da
1138 20 mL di inoculo (M3C0915) e 200 mL di PE non sterile. Le correzioni di pH al livello
1139 desiderato sono stati fatte in ogni reattore prima dell'inoculo, con NaOH 32% (Chem-
1140 Lab, Belgio) o HCl 19%, (Sigma-Aldrich, Germania), utilizzando una siringa dotata di
1141 filtro sterile (dimensione dei pori 0.2 µm, Minisart[®] RC 15, Sartorius, Germania). Dopo
1142 la correzione del pH, i reattori sono stati flussati con 100% N₂ e poi inoculati. I reattori
1143 sono stati chiusi con tappi di butile tenuti da sigilli in alluminio ed incubati a 35 °C per 4
1144 giorni. Durante il periodo d'incubazione essi sono stati distribuiti in maniera casuale
1145 all'interno dell'incubatore. Il biogas è stato raccolto come descritto in precedenza (cfr.
1146 par. 3.3). I volumi di H₂ e CH₄, il pH e le concentrazioni di lattosio, etanolo, VFA e
1147 acido lattico sono stati misurati durante le 96 ore. Il volume di gas e la sua composizione,
1148 così come il pH sono stati misurati dopo 6, 12, 16, 20, 24, 36, 42, 48, 72 e 96 ore di
1149 fermentazione. Il periodo d'incubazione è stato completato quando non vi era più alcuna
1150 produzione di biogas all'interno dei reattori. Nessuna produzione di H₂ e CH₄ è stata
1151 rilevata nei reattori in cui l'inoculo era stato sospeso in HM sterilizzato. Cinque mL, di
1152 brodo di fermentazione sono stati raccolti (da ogni reattore) in doppio in occasione di
1153 ogni misurazione e congelati a -28 °C immediatamente. Cinque mL sono stati utilizzati

1154 per le analisi dei metaboliti di fermentazione e la misura del pH. Gli altri 5 mL sono stati
1155 utilizzati per l'esperimento "D".

1156 Per le analisi dei metaboliti di fermentazione, i 5 mL di campione del brodo di
1157 fermentazione sono stati centrifugati a 4000 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato
1158 utilizzato per le analisi (cfr. par.3.4).

1159

1160

1161 4.4. ESPERIMENTO "D"

1162

1163 In questo esperimento è stata valutata l'influenza che il pH iniziale ha avuto sulla
1164 composizione della comunità microbica in DF utilizzando PE come substrato. Durante
1165 l'esperimento "C", ad ogni tempo di misurazione, sono stati raccolti 5 mL di brodo di
1166 fermentazione da ogni reattore da utilizzare per l'estrazione del DNA genomico (cfr. par.
1167 3.6), il sequenziamento (cfr. par. 3.7) e le analisi dei dati metatassonomici (cfr. par. 3.8).

1168 Per la caratterizzazione della comunità microbica sono stati scelti 3 valori di pH

1169 rappresentativi (4, 8 e 10) e 7 punti temporali (0, 6, 16, 24, 48, 72 e 96 ore dopo l'inizio

1170 della fermentazione) in doppio e congelati fino al loro utilizzo per le analisi. Due

1171 campioni da 5 mL di inoculo iniziale (M3C0915) e di PE sono stati inclusi nelle analisi.

1172 In totale sono stati analizzati 40 campioni.

1173

1174 4.5. ESPERIMENTO "E"

1175

1176 La ritenzione della biomassa all'interno del reattore è stata identificata come una
1177 possibile miglioria della reattoristica per la DF (cfr. par. 1.6). In questo esperimento sono
1178 stati selezionati diversi supporti per permettere l'adesione della biomassa microbica.
1179 Innanzitutto è stata valutata la capacità specifica di assorbimento dell'acqua di ciascun
1180 supporto. I supporti sono stati tenuti a 105 °C fino a peso costante così da togliere
1181 eventuale umidità residua. In un cilindro da 500 mL sono stati inseriti 50 mL di supporto
1182 secco e pesati. Nel cilindro sono stati versati 500 mL di acqua distillata. Il cilindro è stato
1183 scosso e percosso finché non si è apprezzata più risalita di bolle. Il cilindro è stato
1184 svuotato su setaccio 0.2 mm (precedentemente pesato vuoto) e l'acqua raccolta in due
1185 ciotole di vetro da 500 mL. Per imbibire meglio i materiali l'acqua di raccolta è stata
1186 versata 5 volte sul setaccio contenente i supporti. Sgocciolamento del setaccio, alla fine
1187 dello sgocciolamento il setaccio è stato messo su carta assorbente e scosso delicatamente
1188 finché non vi sono state più tracce di bagnato sulla carta assorbente. Il setaccio con
1189 materiale umido è stato pesato. La differenza di peso tra setaccio con materiale umido e
1190 setaccio secco vuoto è stata usata per ricavare l'acqua assorbita dal supporto. Il
1191 procedimento è stato ripetuto per ciascun supporto in triplo.

1192

1193 4.6. ESPERIMENTO "F"

1194

1195 In quest'esperimento è stata misurata la produzione di H₂ da PE utilizzando i
1196 materiali precedentemente descritti come supporti per l'adesione della biomassa. La
1197 produzione di H₂ è stata confrontata con quella ottenuta con biomassa sospesa.

1198 Questo esperimento è stato diviso in 3 fasi: acclimatamento, I ciclo di DF e II ciclo
1199 di DF, in reattori da 500 mL in modalità batch non tamponato a 35 °C a pH iniziale del
1200 PE = 8.7, in triplo per un totale di 15 reattori.

1201 Nella fase di acclimatamento, in ogni reattore da 500 mL (volume effettivo di 588
1202 mL), sono stati inseriti i supporti, lo spazio di testa flussato con 100% N₂ deossigenato e
1203 poi sterilizzati. Successivamente, 20 mL di inoculo (M3B0216) sono stati disciolti in 200
1204 mL di soluzione fisiologica sterile deossigenata. Questa miscela è stata versata in un
1205 reattore da 500 mL. La procedura è stata ripetuta per ciascun reattore. L'inoculo è stato
1206 lasciato acclimatarsi per 7 giorni a 35 °C, senza agitazione e al buio.

1207 Al termine della fase di acclimatamento i reattori sono stati svuotati del liquido e
1208 lavati per 2 volte con 50 mL di soluzione fisiologica sterile deossigenata. Questa
1209 operazione è stata fatta in camera anaerobica.

1210 Successivamente (I ciclo DF), i reattori sono stati riempiti con 200 mL di PE non
1211 sterile. Il pH iniziale di PE è stato portato a 8.7 con NaOH 32% (Chem-Lab, Belgio),
1212 utilizzando una siringa dotata di filtro sterile (dimensione dei pori 0.2 µm, Minisart® RC
1213 15, Sartorius, Germania). Dopo la correzione del pH, il PE è stato flussato con 100% N₂
1214 e versato in ciascun reattore. Contemporaneamente sono stati inoculati anche 3 reattori
1215 contenenti 200 mL di PE con 20 mL di inoculo (M3B0216), senza supporto (biomassa
1216 sospesa). I reattori sono stati chiusi con tappi di butile tenuti da sigilli in alluminio ed
1217 incubati a 35 °C per 4 giorni. Durante il periodo d'incubazione essi sono stati distribuiti
1218 in maniera casuale all'interno dell'incubatore. Il biogas è stato raccolto come descritto in
1219 precedenza (cfr. par. 3.3). Il volume di H₂ e CH₄, il pH e le concentrazioni di lattosio,
1220 VFA ed acido lattico sono stati misurati durante le 96 ore. Il volume di gas, la sua

1221 composizione e il pH sono stati misurati dopo 17, 20, 24, 28, 40, 48, 72 e 96 ore di
1222 fermentazione. Dopo 96 ore i reattori sono stati svuotati dal liquido e i supporti lavati
1223 con 50 mL di soluzione fisiologica sterile deossigenata per 2 volte. Questa operazione è
1224 stata fatta in camera anaerobica. Successivamente (II ciclo di DF), i reattori sono stati
1225 riempiti con 200 mL di PE non sterile fresco, con la tessa procedura descritta per primo
1226 ciclo. Nuovamente sono stati inoculati, *ex-novo*, 3 reattori con PE senza supporti
1227 (biomassa sospesa). I reattori sono stati chiusi con tappi di butile tenuti da sigilli in
1228 alluminio ed incubati a 35 °C per 4 giorni. Durante il periodo d'incubazione essi sono
1229 stati distribuiti in maniera casuale all'interno dell'incubatore.

1230 Durante il periodo di fermentazione non è stata registrata produzione di H₂ e CH₄
1231 nei reattori dove l'inoculo era stato sospeso in HM sterile. Ad ogni punto di misurazione
1232 sono stati prelevati 5 mL di brodo di fermentazione per la misurazione del pH e
1233 immediatamente congelati a -28 °C. Essi sono stati utilizzati per le analisi dei metaboliti
1234 di fermentazione. Una volta scongelati sono stati centrifugati a 4000 rpm per 15 minuti
1235 ed il surnatante utilizzato per le analisi come descritto in precedenza (cfr. par. 3.4)

1236

1237 5. RISULTATI

1238

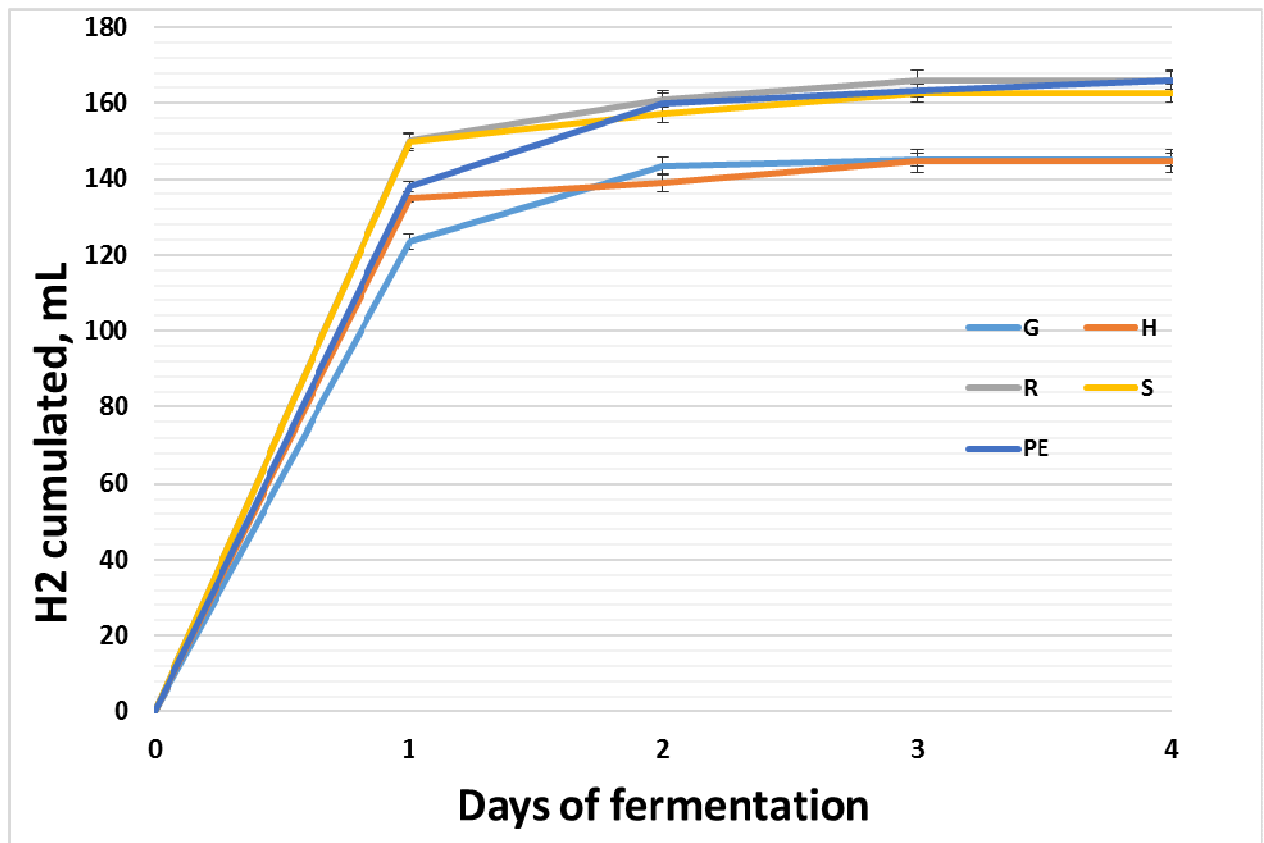
1239 5.1. ESPERIMENTO "A" – PRODUZIONE DI H₂ DA SCOTTA E

1240 PERMEATO

1241

1242 Le scotte fornite da diversi caseifici (G., H., R. e S.) hanno permesso di produrre
1243 quantità simili di H₂ (Fig. 10). La produzione media è stata pari a 155 ± 11 mL⁻¹ di H₂. Il

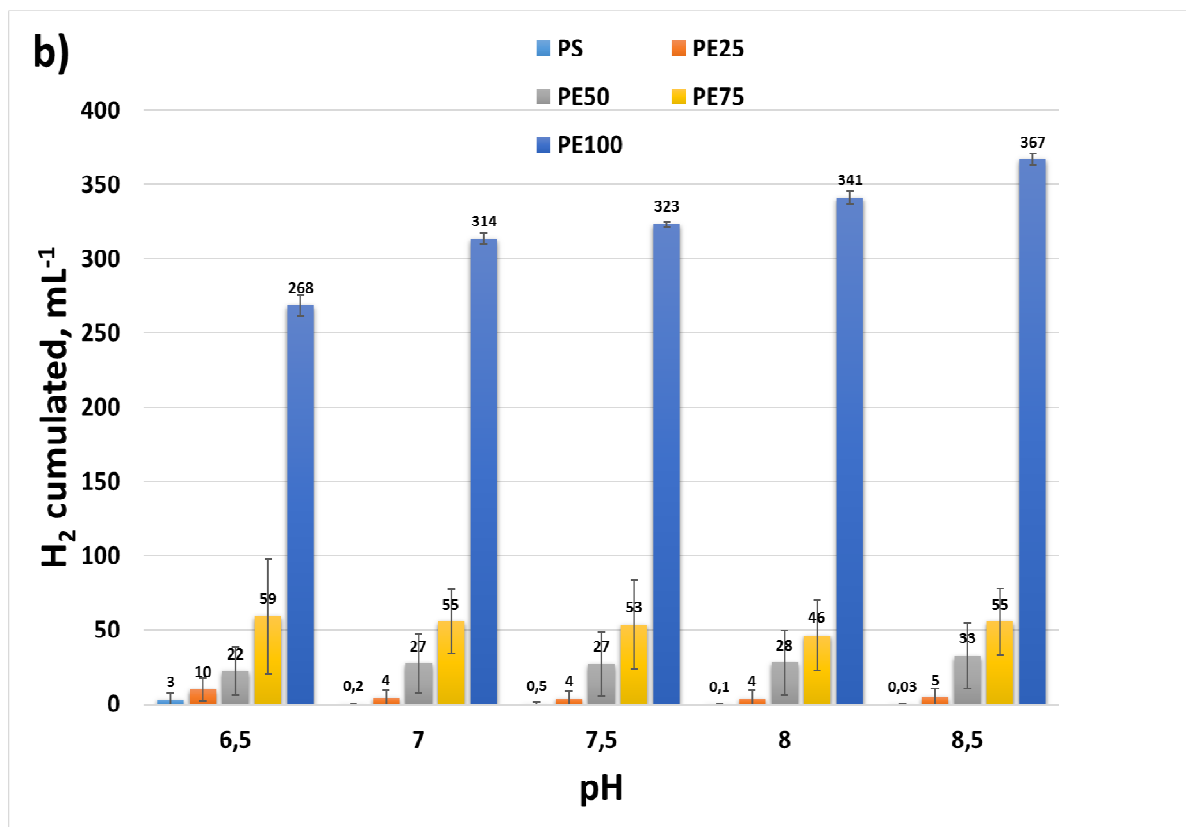
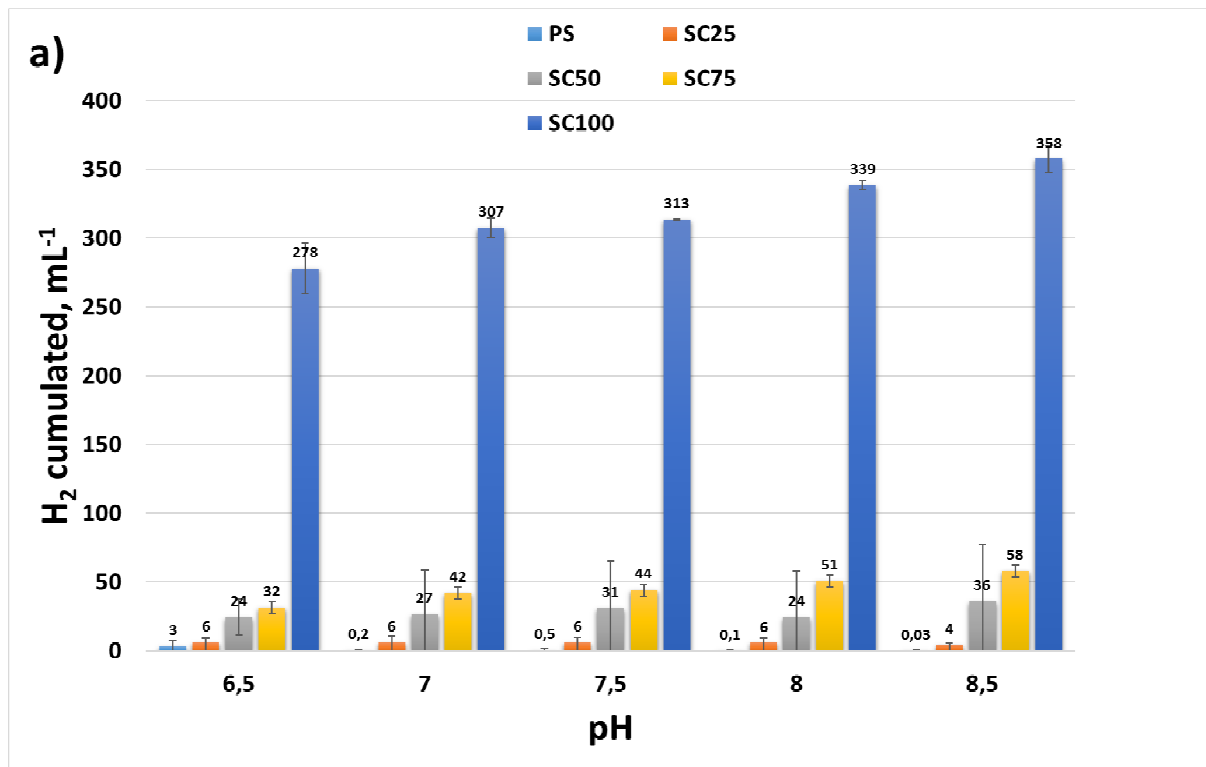
1244 PE ha prodotto $166 \pm 2 \text{ mL}^{-1}$ di H_2 risultando perfettamente in linea con la produzione
 1245 di H_2 ottenuta dalle scotte. Da notare come PE abbia avuto una produzione più
 1246 abbondante (+14%) della sua scotta d'origine (G, $145 \pm 2 \text{ mL}^{-1}$). Comunque, in tutti i
 1247 trattamenti, l'andamento della produzione di H_2 è stato molto regolare.
 1248



1249
 1250 **Figura 10.** Produzione di idrogeno da scotte provenienti da diversi caseifici (G, H, R, S) e da permeato (PE) di
 1251 ultrafiltrazione di scotta "G".
 1252

1253 5.2. ESPERIMENTO "B" – CO-DIGESTIONE CON LIQUAME SUINO

1254
 1255 Dal liquame suino, praticamente, non è stato possibile ricavare H_2 . La massima
 1256 produzione di H_2 , invece, è stata ottenuta quando scotta e permeato sono stati
 1257 fermentati in assenza di liquame suino e ad un pH iniziale di 8.5 (Fig. 11).



1258

1259

1260

1261

1262

Figura 11. Produzione di idrogeno da liquame suino (PS), scotta (SC, a), permeato (PE, b), in co-digestione o meno, in diverse percentuali (25, 50, 75) e diversi livelli di pH (6.5, 7, 7.5, 8, 8.5).

1263 Dalla Fig. 11, inoltre, si può notare come la presenza di liquame abbia avuto un
1264 effetto inibente sulla produzione di H₂. Confrontando la produzione di H₂ da SC100 e
1265 PE100 con quella in cui SC e PE erano in co-digestione con il liquame suino, infatti, si
1266 può notare una netta mancanza di proporzionalità nella produzione di H₂. Infatti, SC75,
1267 SC50 e SC25, non hanno prodotto il 25, 50 e 75% in meno di H₂ se confrontati con i
1268 rispettivi SC100, ma molto meno (86, 91 e 98% rispettivamente, in media) (Fig. 11a).
1269 Stesso discorso per il permeato. PE75, PE50 e PE25 non hanno prodotto il 25, 50 e
1270 75% in meno di H₂ se confrontati con i rispettivi PE100, ma molto meno (83, 91 e 98%
1271 rispettivamente, in media) (Fig. 11b).

1272 Anche la produzione di VFA è stata influenzata dalla presenza o meno di liquame
1273 suino (Tab. 3).

1274

1275
1276

Tabella 3. Concentrazione dei VFA nei brodi di fermentazione di scotta, permeato e liquame suino in monodigestione (SC100, PE100 e PS) o in co-digestione con liquame suino a diversi livelli (25, 50 e 75%). I valori sono le medie delle concentrazioni di VFA ai vari livelli di pH. SD = deviazione standard (n = 15, n = 3 per PS).

RECIPE	Acetic	Propionic	Isobutyric	Butyric	Isovaleric	Valeric	Isocaproic	Caproic	TOTAL VFA	C/N
	(mg L ⁻¹)									
SC25	2155	28847	212	2781	206	1377	21	0	35599	8
SD	349	7823	16	966	189	90	9	0	8750	
SC50	7318	10511	362	10285	365	4870	108	0	33819	15
SD	1163	1955	23	578	282	1103	23	0	1856	
SC75	8006	4199	356	12299	449	4950	146	0	30405	23
SD	1367	376	157	1889	436	497	43	0	2437	
SC100	9298	74	31	17095	103	76	6	48	26731	35
SD	1927	12	39	2269	46	77	4	51	3438	
PE25	2267	29361	108	1979	205	1626	0	0	35544	9
SD	298	8174	34	159	84	102	0	0	8312	
PE50	9657	10625	372	11861	283	3993	6	5	36802	18
SD	1469	368	53	521	324	249	7	8	1702	
PE75	8002	3961	279	8487	182	4640	13	10	25573	36
SD	761	644	50	714	250	431	6	3	787	
PE100	9799	72	12	17950	85	72	4	61	28054	86
SD	1836	4	6	1584	49	69	4	45	2667	
PS	789	282	53	80	97	40	0	0	1341	3
SD	157	197	47	37	54	37	0	0	118	

1277

1278 In co-digestione, la produzione di VFA totale è stata, in generale, più alta rispetto
1279 alla monodigestione (+20%, in media). Il profilo di produzione dei VFA è stato
1280 influenzato dalla ricetta: con il 75% di liquame in miscela l'acido grasso volatile più
1281 rappresentato era l'acido propionico (29 g L⁻¹, in media), seguito dall'acido butirrico (2.4
1282 g L⁻¹) e acetico (2.2 g L⁻¹) (Tab. 3). Al calare della percentuale di liquame suino, diminuiva
1283 drasticamente la produzione di acido propionico fino al livello minimo di 0.7 g L⁻¹
1284 misurato sia in SC100 che in PE100 (Tab. 3).

1285 Dalla Tabella 4, si può notare che, in tutti i reattori dove era stato prodotto H₂ in
1286 maniera massiccia (SC100 e PE100), dopo 7 giorni il pH era sceso rispettivamente a 3.3
1287 e 3.6, in media e, conseguentemente, la produzione di H₂ si era arrestata. Per completare
1288 la fermentazione del lattosio, dunque, si è reso necessario correggere il pH. Correggendo
1289 il pH ai valori iniziali, infatti, si è assistito alla ripresa della produzione di H₂ ($\Delta = 107$ e
1290 126 in media, rispettivamente per SC e PE), che si è definitivamente fermata a 14 giorni.
1291 La successiva correzione di pH, infatti, ha dato inizio alla metanogenesi ($\Delta = 0$ in tutti i
1292 reattori), segno inequivocabile del completo esaurimento del lattosio. Sebbene la
1293 correzione di pH si sia resa necessaria anche in tutti i reattori in co-digestione, una netta
1294 ripresa della produzione di H₂ è stata osservata solo nei reattori con SC e PE in
1295 monodigestione, nonostante ciò, negli altri reattori in co-digestione l'inizio della
1296 metanogenesi è avvenuta contemporaneamente ai reattori con SC e PE in
1297 monodigestione.

1298
1299

Tabella 4. Produzione di idrogeno e andamento del pH nei reattori con scotta e permeato in monodigestione (SC100, PE100 e PS) o in co-digestione con liquame suino a diversi livelli (25, 50 e 75%). I valori sono le medie delle produzioni di idrogeno ai vari livelli di pH. Deviazione standard in parentesi (n = 15) per PS).

RECIPE	H₂ after 7days cumulated, mL⁻¹	pH after 7 days	pH adjustment	H₂ after 14 days cumulated, mL⁻¹	Δ (mL⁻¹ H₂ cum. after 14 d vs after 7 days)	pH after 14 days	pH adjustment	H₂ after 14days cumulated, mL⁻¹	Δ (mL⁻¹ H₂ cum. After pH adj. vs after 14 days)
SC25	6 (0.9)	5.5 (0.2)	restored at each initial value	6 (0.9)	0	6.9 (0.2)	restored at each initial value	6 (0.0)	0
SC50	28 (5)	4.6 (0.1)	restored at each initial value	28 (5)	0	6.6 (0.2)	restored at each initial value	28 (0.0)	0
SC75	40 (14)	4 (0.2)	restored at each initial value	45 (10)	5	6.3 (0.1)	restored at each initial value	45 (0.0)	0
SC100	212 (29)	3.3 (0.0)	restored at each initial value	319 (31)	107	5.7 (0.1)	restored at each initial value	319 (0.0)	0
PE25	5 (2)	5.7 (0.2)	restored at each initial value	5 (2)	0	6.9 (0.4)	restored at each initial value	5 (0.0)	0
PE50	27 (4)	4.7 (0.1)	restored at each initial value	27 (4)	0	6.5 (0.2)	restored at each initial value	27 (0.0)	0
PE75	48 (4)	4 (0.2)	restored at each initial value	54 (5)	6	6.3 (0.1)	restored at each initial value	54 (0.0)	0
PE100	197 (23)	3.6 (0.0)	restored at each initial value	323 (37)	126	4.9 (0.2)	restored at each initial value	323 (0.0)	0

1300

1301 5.3. ESPERIMENTO “C” – INFLUENZA DEL pH INIZIALE SULLA
1302 PRODUZIONE DI H₂ IN DF

1303
1304 I risultati del precedente esperimento hanno mostrato l'importanza del pH nel
1305 processo di DF. In questo esperimento sono state valutate:

- 1306 L'influenza del pH iniziale sulla produzione di H₂
- 1307 L'influenza del pH iniziale sulla produzione di metaboliti
- 1308 L'evoluzione temporale del pH
- 1309 La produzione di H₂ e metaboliti in relazione all'andamento temporale del
1310 pH

1311 I risultati di tale esperimento sono stati pubblicati in [148].

1312 La durata della fase lag è stata di 15.7 h, in media (DS= 1.62 h), e non è stata
1313 influenzata dal pH iniziale in maniera significativa. (Tab. 5).

1314
1315
1316
1317
1318

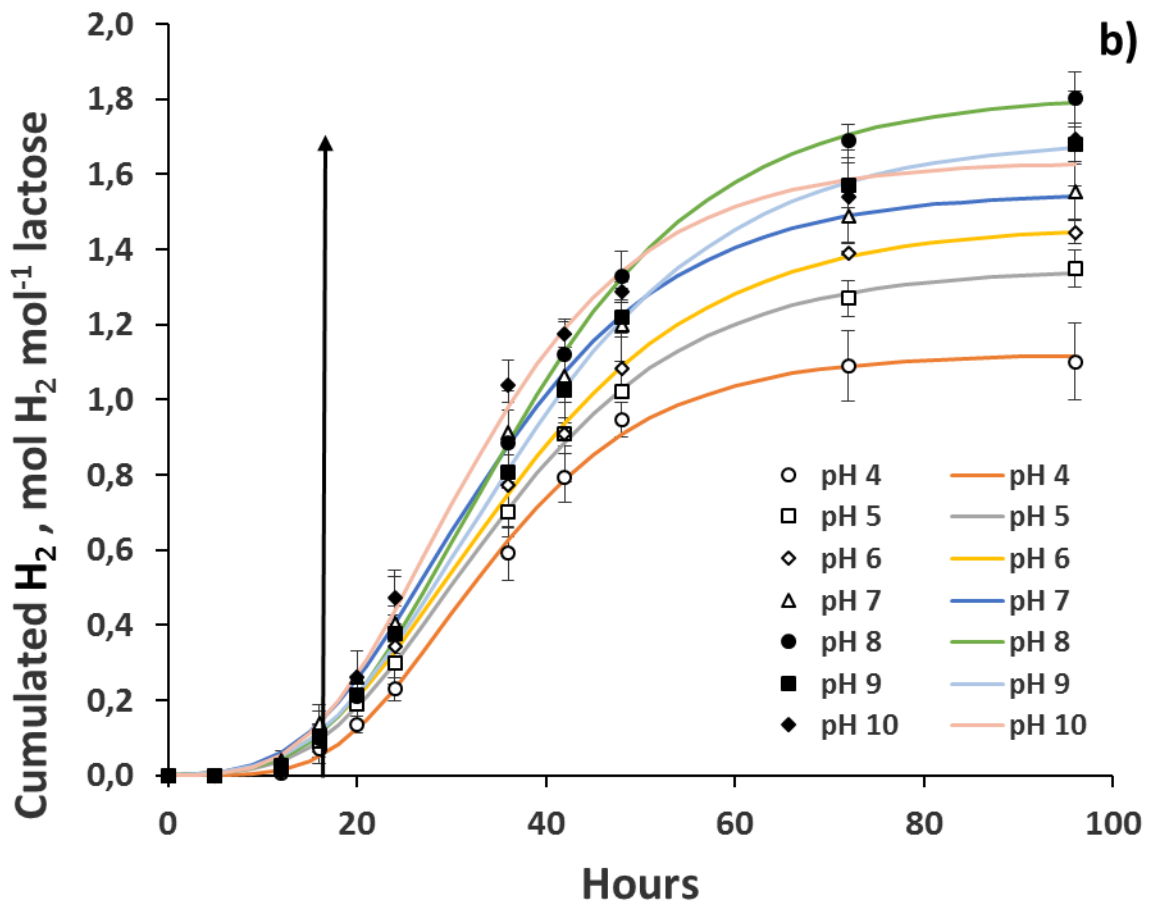
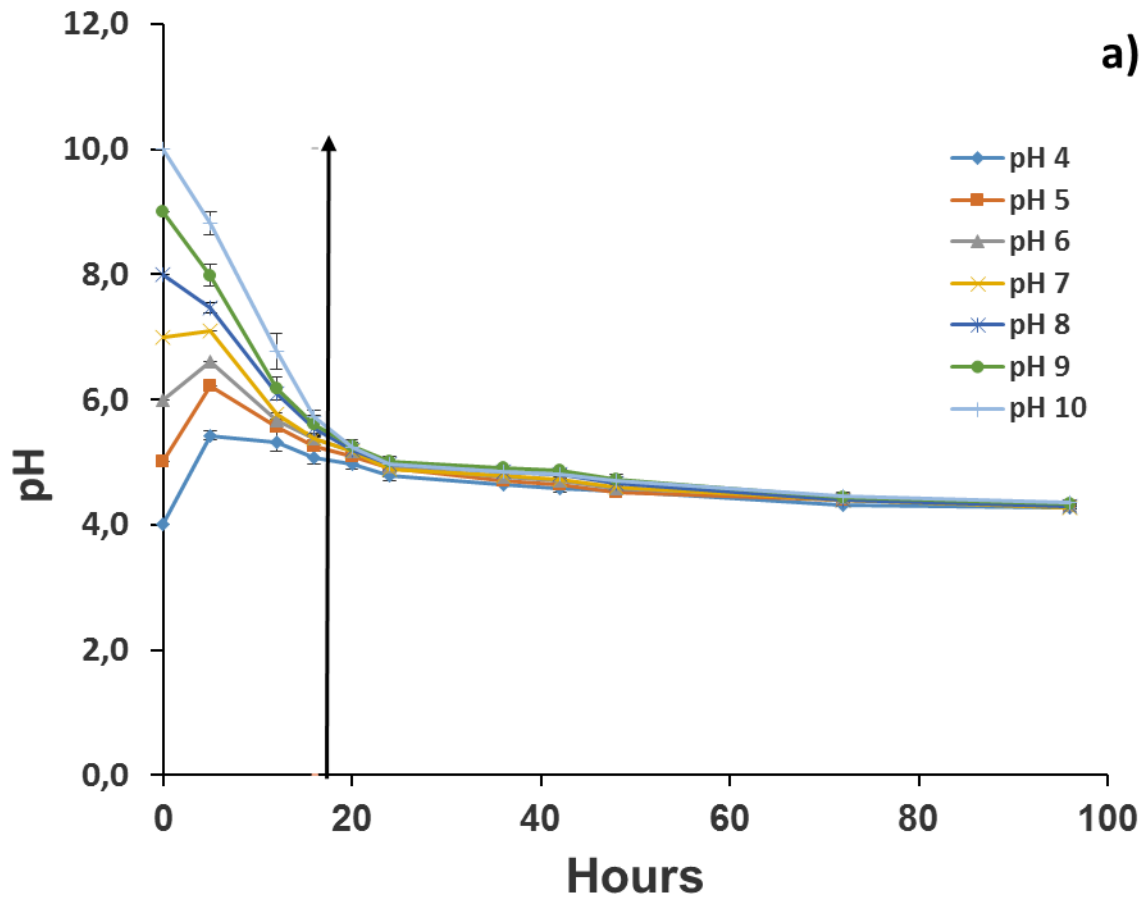
Tabella 5. Valori dei parametri del modello Gompertz in funzione del pH iniziale nella DF del PE. λ , fase lag; Rmax, tasso massimo di produzione di H₂; Hmax, ammontare massimo della produzione di H₂. Tutti i modelli sono significativi per P<0.001. Sono stati riportati anche il valore finale del pH ed il lattosio residuo dopo 96 ore di fermentazione [148]

Initial pH	λ (h)	Rmax (mol H ₂ mol ⁻¹ lactose h ⁻¹)	Hmax (mol H ₂ mol ⁻¹ lactose)	Final pH	Residual lactose (% initial)
4	17.6	0.0346	1.12	4.28	52.9
5	15.9	0.0359	1.35	4.30	59.0
6	15.3	0.0369	1.47	4.32	47.2
7	14.5	0.0417	1.55	4.28	47.8
8	16.6	0.0459	1.81	4.29	47.4
9	15.8	0.0405	1.69	4.33	45.5
10	14.9	0.0480	1.64	4.35	47.3
Mean	15.7	0.0402	1.52	4.31	49.6
HSD ¹	4.25 ^{NS}	0.0078***	0.22***	0.24 ^{NS}	4.89**

1319 ¹ at P=0.05. Level of significance of the model: * =P<0.05, ** =P<0.01, *** =P<0.001; NS=not significant

1320

1321 Durante questa fase, però, il pH ha raggiunto un valore medio di 5.4 (SD= 0.13) in
1322 tutti i campioni prelevati alla 16^a ora. Il pH si è innalzato quando il valore di partenza
1323 era di 4 o 5 e si è abbassato quando i valori di pH iniziali erano >5. Un abbassamento
1324 del pH più rapido è stato osservato nei reattori che avevano un pH iniziale più alto. (Fig.
1325 12a). Quando il valore del pH ha raggiunto il valore di 5.4, è iniziata la produzione
1326 esponenziale di H₂ (Fig. 12b). Nelle ore successive, i valori di pH sono ulteriormente
1327 scesi con un andamento simile in tutti i reattori. Alla fine del periodo di osservazione, il
1328 valore medio di pH misurato era di 4.3, senza differenze significative tra i vari
1329 trattamenti (Tab. 5).



1330

1331

1332 **Figura 12.** Andamento temporale di a) pH e b) produzione di H₂ durante la DF di PE. Le barre verticali
1333 rappresentano il valore della differenza meno significativa per ogni tempo di misurazione tra le medie secondo il
1334 test HSD di Tukey. La freccia indica la durata media della fase lag (15.8 ore) come stimato dal modello
1335 Gompertz [148].
1336

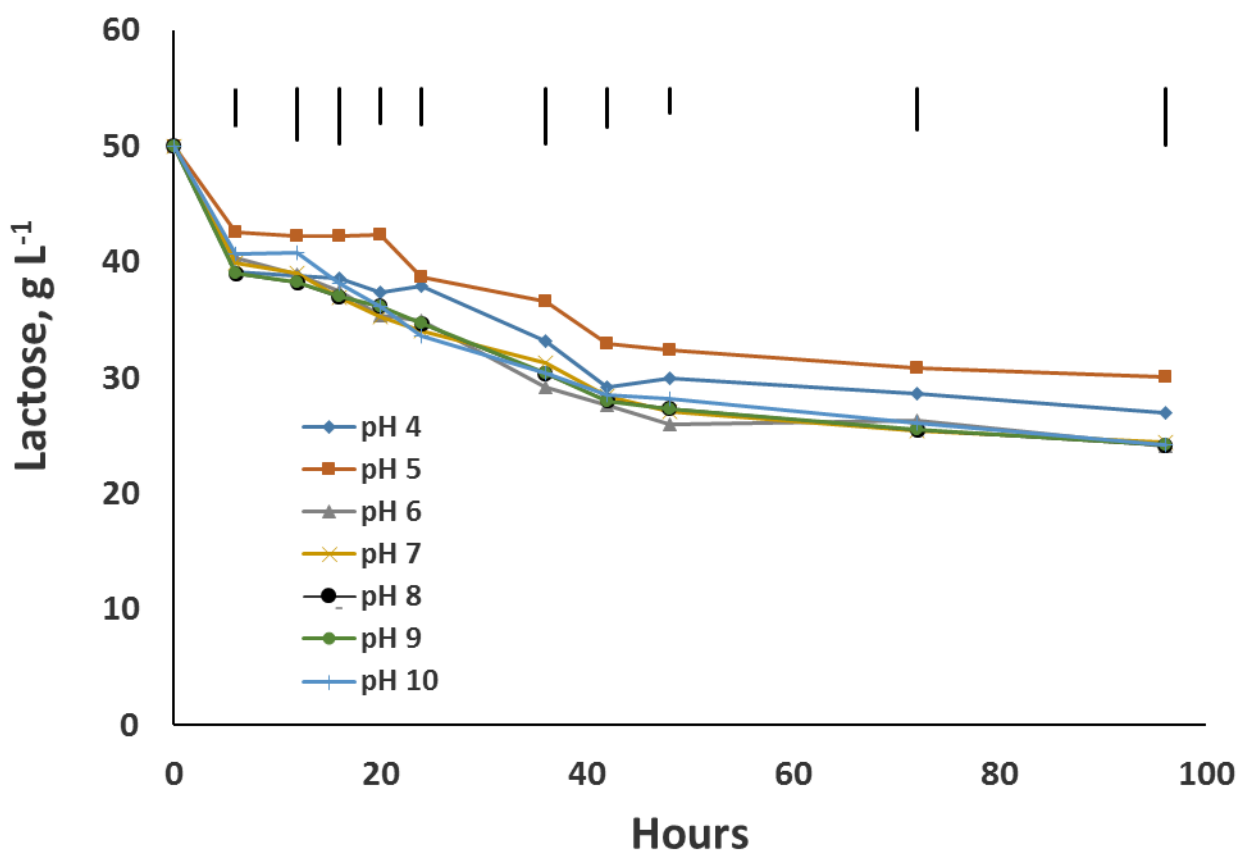
1337 Dopo 24 ore di fermentazione, il pH era di 4.9 in tutti i reattori. Già da questo
1338 momento, in base ai valori di R_{max}, è stato possibile dividere i trattamenti in 2 gruppi: il
1339 gruppo “acido” e quello “alcalino” (Tab. 5). I valori di R_{max} sono aumentati in maniera
1340 direttamente proporzionale all’aumentare dei valori di pH iniziali ($R_{max} = 0.0021pH +$
1341 0.0258 ; $R^2 = 0.64$, $P < 0.0001$), R_{max} a pH 7 si è posto in una posizione intermedia.
1342 Mediamente, il valore di R_{max} era del 26% più alto nel gruppo “alcalino” (pH 8 - 10),
1343 rispetto al gruppo “acido” (pH 4-6; 0.045 vs 0.035 mol H₂ mol⁻¹ lattosio h⁻¹). Questo
1344 tasso di produzione più alto si è tradotto in una resa in H₂ più elevata osservata nel
1345 gruppo “alcalino”. Il valore di H_{max} del gruppo “alcalino”, infatti, è stato più alto del
1346 31%, in media, rispetto al valore di H_{max} del gruppo “acido”. A pH 7, il valore di H_{max}
1347 si è posto in una posizione intermedia. La relazione tra H_{max} e pH potrebbe essere
1348 spiegata bene da una curva di distribuzione normale, stimata secondo un modello
1349 polinomiale di secondo grado ($H_{max} = -0.027pH^2 + 0.468pH - 0.336$; $R^2 = 0.85$, $P <$
1350 0.0001). Poiché H_{max} in funzione del valore del pH iniziale è massimo quando la
1351 derivata della funzione è 0, ponendo come 0 la derivata della funzione ($0 = -$
1352 $2*0.027pH+0.468$) è stato possibile stimare il valore di pH iniziale che permetterebbe di
1353 ottenere il valore massimo di H_{max}. Tale valore di pH è risultato essere uguale a 8.7.

1354

1355 *5.3.1. LATTOSIO RESIDUO*

1356

1357 La maggior parte del lattosio è stata consumata nelle prime ore della DF, prima
 1358 dell'inizio della produzione di H₂. Circa la metà (51%, in media) del consumo totale di
 1359 lattosio è avvenuta durante le prime 16 ore di fermentazione. Il consumo di lattosio
 1360 durante il periodo di fermentazione è stato piuttosto omogeneo in tutti i reattori ad
 1361 eccezione dei reattori a pH 4 e 5 che ne hanno consumato di meno (Fig. 13). Alla fine
 1362 del periodo di osservazione, in media, il 51.5% del lattosio inizialmente disponibile non
 1363 era stato ancora fermentato. Questo può essere dovuto all'effetto inibente
 1364 dell'abbassamento del pH a valori molto acidi, dovuti alla DF condotta in un sistema
 1365 non tamponato.



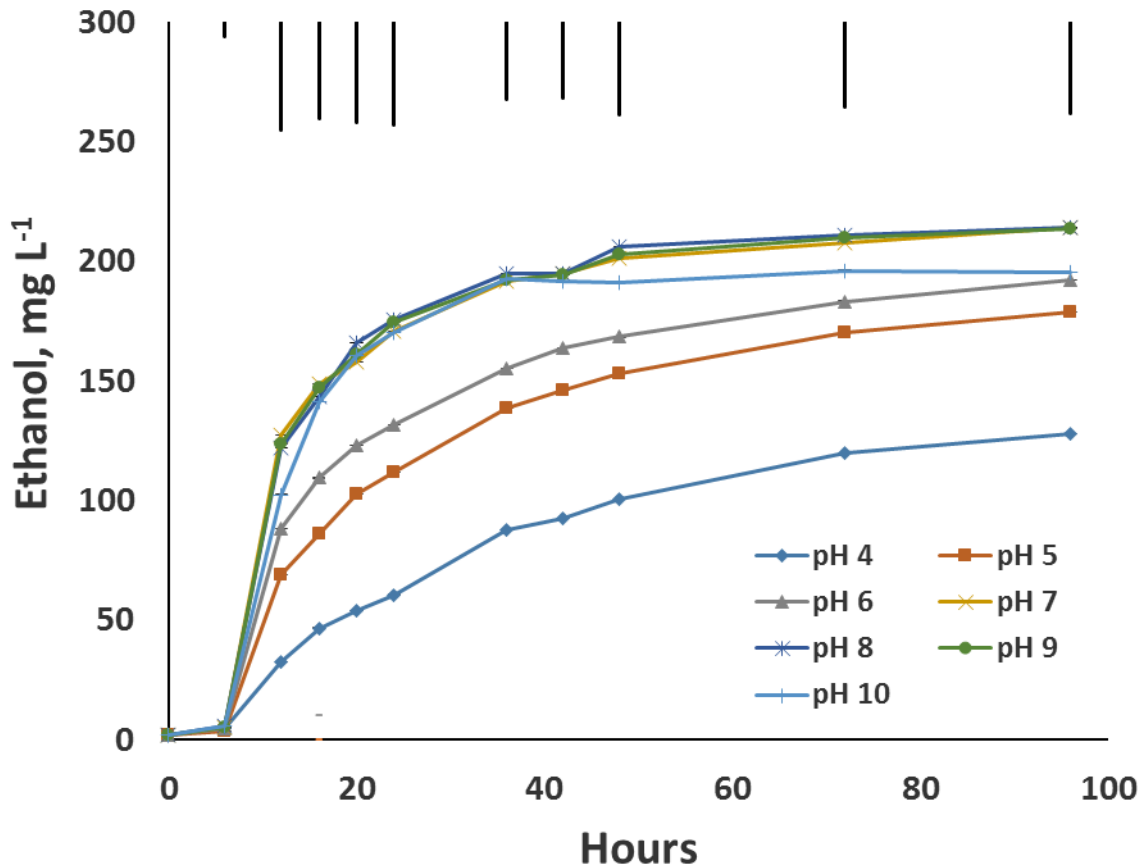
1366 **Figura 13.** Consumo di lattosio durante la DF di PE a diversi valori di pH iniziale. Le barre verticali
 1367 rappresentano il valore della differenza meno significativa per ogni tempo di misurazione tra le medie secondo il
 1368 test HSD di Tukey. [148].
 1369
 1370

1371 5.3.2. *METABOLITI FINALI*

1372 *ETANOLO*

1373

1374 La produzione di etanolo ha avuto un andamento simile a quella dell' H_2 , con
1375 produzioni iniziali più alte nel gruppo “alcalino” (Fig. 14). Dopo 16 ore di
1376 fermentazione, infatti, i reattori con il pH iniziale alcalino avevano prodotto,
1377 mediamente, il 78% di etanolo in più rispetto ai reattori con il pH iniziale acido (144 mg
1378 L^{-1} e 81 mg L^{-1} , rispettivamente). Nelle prime 16 ore di fermentazione, nel gruppo
1379 “alcalino” era stato prodotto mediamente il 69% dell’etanolo totale, durante lo stesso
1380 periodo, nel gruppo “acido” era stato prodotto solo il 49% dell’ etanolo totale. Alla fine
1381 del periodo di osservazione, i trattamenti con un pH iniziale compreso tra 6 e 10 avevano
1382 prodotto mediamente il 34% in più di etanolo rispetto agli altri (206 mg L^{-1} e 153 mg L^{-1} ,
1383 rispettivamente). Alla 48^a ora di fermentazione la produzione di etanolo a pH 10 si è
1384 fermata e, alla fine del periodo di osservazione, era uguale a quella ottenuta a pH 6.



1385

1386 **Figura 14.** Andamento della concentrazione di etanolo nel brodo di fermentazione di PE durante la DF a diversi
 1387 valori di pH iniziale. Le barre verticali rappresentano il valore della differenza meno significativa per ogni tempo
 1388 di misurazione tra le medie secondo il test HSD di Tukey. [148].
 1389

1390 *ACIDI GRASSI VOLATILI*

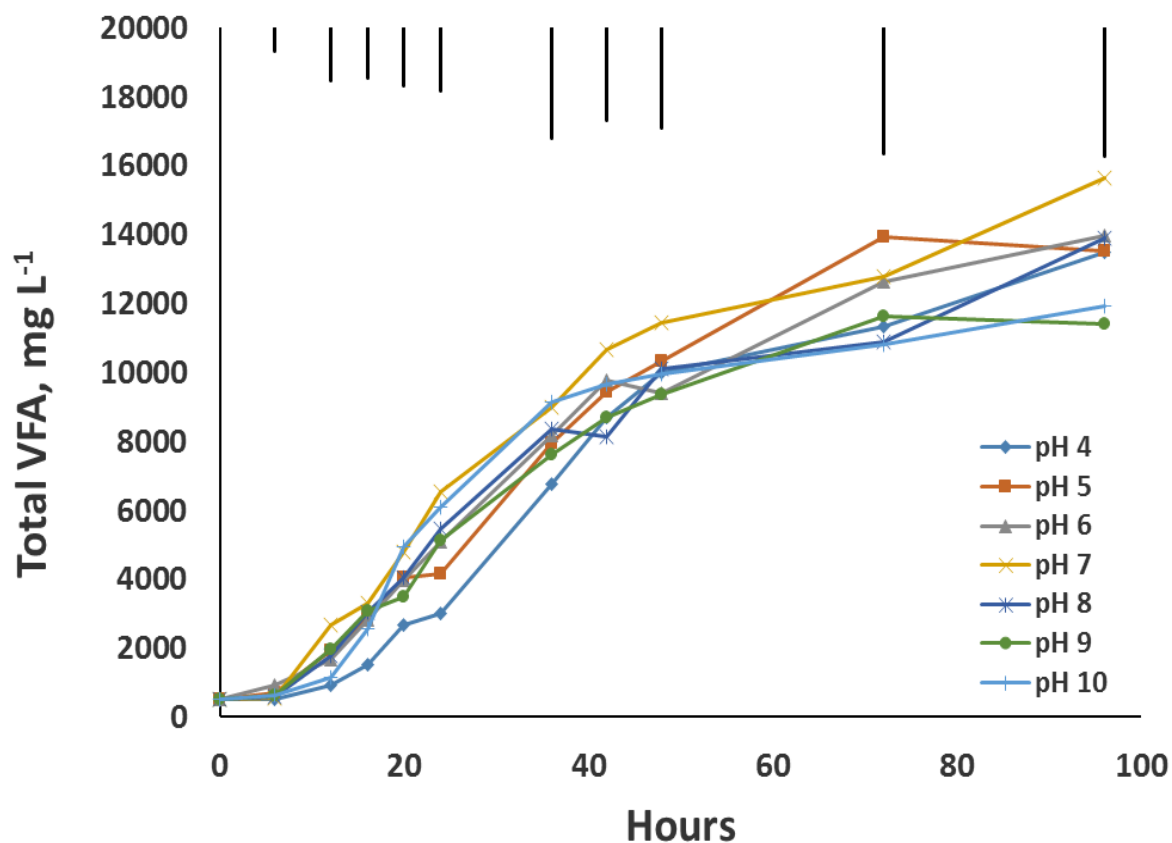
1391

1392 La concentrazione di VFA è aumentata durante il periodo di fermentazione (Fig.

1393 15). All'inizio della fermentazione la produzione di VFA è stata più bassa ai valori di pH

1394 più bassi, aumentando nel periodo intermedio della fermentazione.

1395

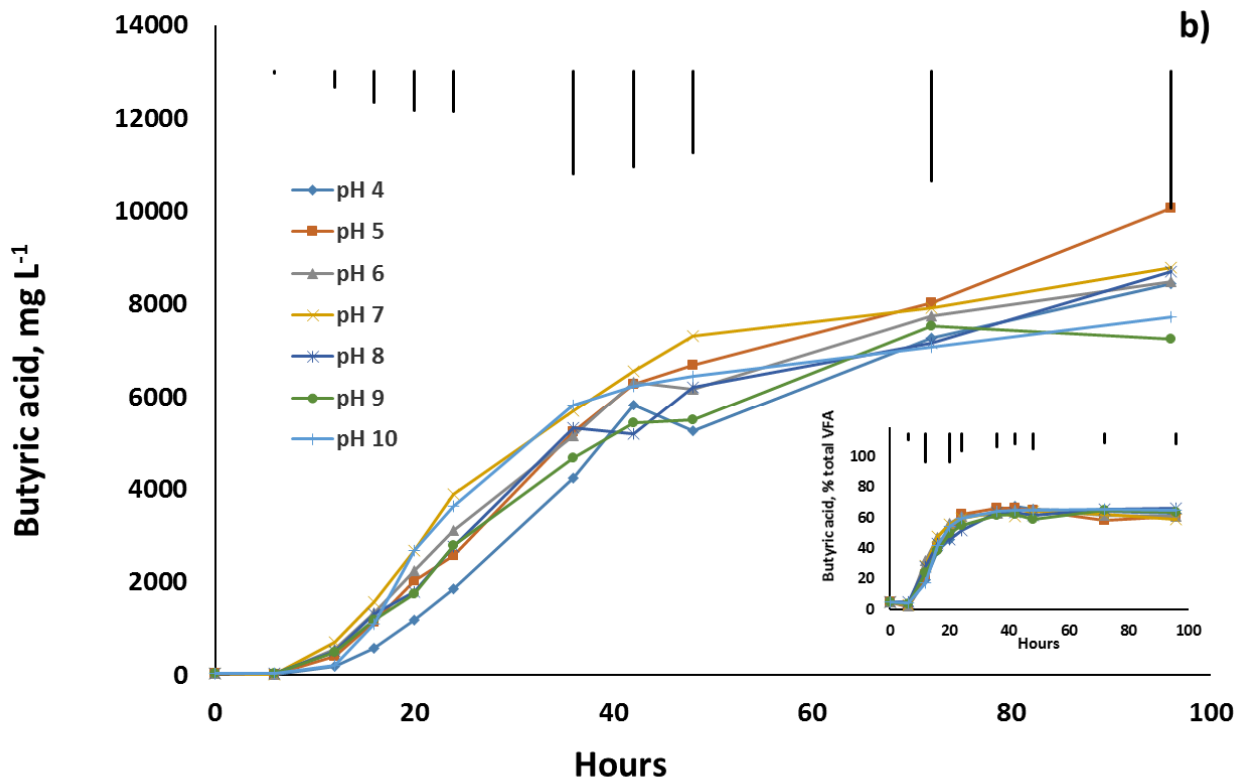
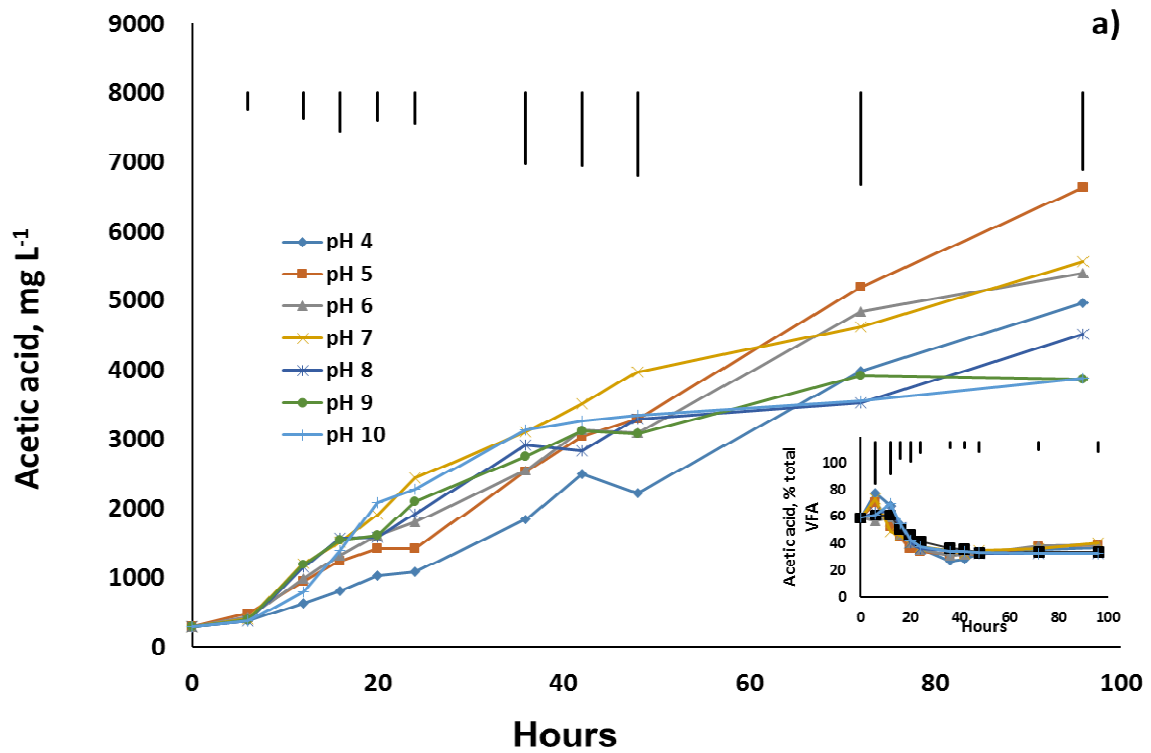


1396

1397 **Figura 15.** Andamento della concentrazione di acidi grassi volatili (VFA) nel brodo di fermentazione di PE
 1398 durante la DF a diversi valori di pH iniziale. Le barre verticali rappresentano il valore della differenza meno
 1399 significativa per ogni tempo di misurazione tra le medie secondo il test HSD di Tukey. [148].

1400

1401 Nelle prime 16 ore di fermentazione, l'acido acetico costituiva la maggiore
 1402 percentuale dei VFA totali (Fig. 16a, grafico interno); dopo 40 ore di fermentazione,
 1403 però, la situazione era invertita in favore dell'acido butirrico (Fig. 16b, grafico interno).
 1404 Alla fine del periodo di osservazione, i VFA più abbondanti erano l'acido acetico e
 1405 butirrico, che rappresentavano rispettivamente il 36.4% e il 62.4% (98.8% in totale) dei
 1406 VFA totali.



1407

1408

1409 **Figura 16.** Andamento della concentrazione di a) acido acetico e b) butirrico nel brodo di fermentazione di PE
 1410 durante la DF a diversi valori di pH iniziale. I grafici interni rappresentano l'andamento nella concentrazione
 1411 come percentuale dei VFA totali. Le barre verticali rappresentano il valore della differenza meno significativa per
 1412 ogni tempo di misurazione tra le medie secondo il test HSD di Tukey. [148].
 1413

1414

1415 La produzione di VFA più elevata si è registrata a pH 7 (Tab. 6). I livelli di VFA più
1416 bassi sono stati osservati ai pH alcalini (-21%, in media, rispetto a pH 7) o acidi (-13%, in
1417 media, rispetto a pH 7). La concentrazione di VFA minori come acido isovalerico,
1418 valerico e caproico è stata più alta ai valori di pH più elevati.

1419 **Tabella 6.** Concentrazione dei VFA nel brodo di fermentazione di PE a diversi valori di pH iniziale [148]

Initial pH	Acetic	Propionic	Isobutyric	Butyric	Isovaleric	Valeric	Isocaproic	Caproic	Total VFA
	(mg L ⁻¹)								
4	4969	29	8.3	8444	5	12	3.1	27	13497
5	5229	39	8.9	8205	20	0	4.7	16	13523
6	5402	36	8.4	8485	24	0	1.9	24	13982
7	6254	38	7.3	9251	47	13	2.7	35	15648
8	4516	38	6.7	9199	55	54	1.5	20	13891
9	3868	36	7.4	7253	66	93	5.3	57	11386
10	3880	33	8.2	7718	46	90	3.1	129	11907
Mean	4874	36	7.9	8365	37	37	3.2	44	13405
HSD¹	1112***	12 ^{NS}	2.1*	2940 ^{NS}	41**	54***	12.4 ^{NS}	30***	3717*

1420 ¹ at P=0.05. Level of significance of the model: * =P<0.05, ** =P<0.01; *** =P<0.001; NS=not significant

1421 Analogamente all'etanolo, anche l'accumulo di acido acetico ha seguito l'andamento
1422 della produzione di H₂, con produzioni più elevate e veloci a pH iniziale neutro o
1423 alcalino (Fig. 16a). In questi reattori, nelle prime 24 ore di fermentazione, è stato
1424 prodotto mediamente il 49% di acido acetico totale, mentre, nello stesso periodo, nei
1425 reattori con un pH iniziale acido è stato prodotto, in media, solo il 25% dell'acido acetico
1426 totale. Sedici e 24 ore dopo l'inizio della fermentazione, la concentrazione di acido
1427 acetico nel gruppo "neutro-alcalino" (pH 7-10) era mediamente più alta (34% e 52%,
1428 rispettivamente) rispetto al gruppo "acido". Successivamente, la concentrazione di acido
1429 acetico nel gruppo "alcalino" è divenuta più bassa rispetto alla concentrazione registrata
1430 nel gruppo "neutro-acido".

1431 La produzione temporale di acido butirrico non è stata influenzata dal valore del
1432 pH iniziale, se non nelle prime ore di fermentazione, quando essa è stata più lenta a pH
1433 4 (Fig. 16b).

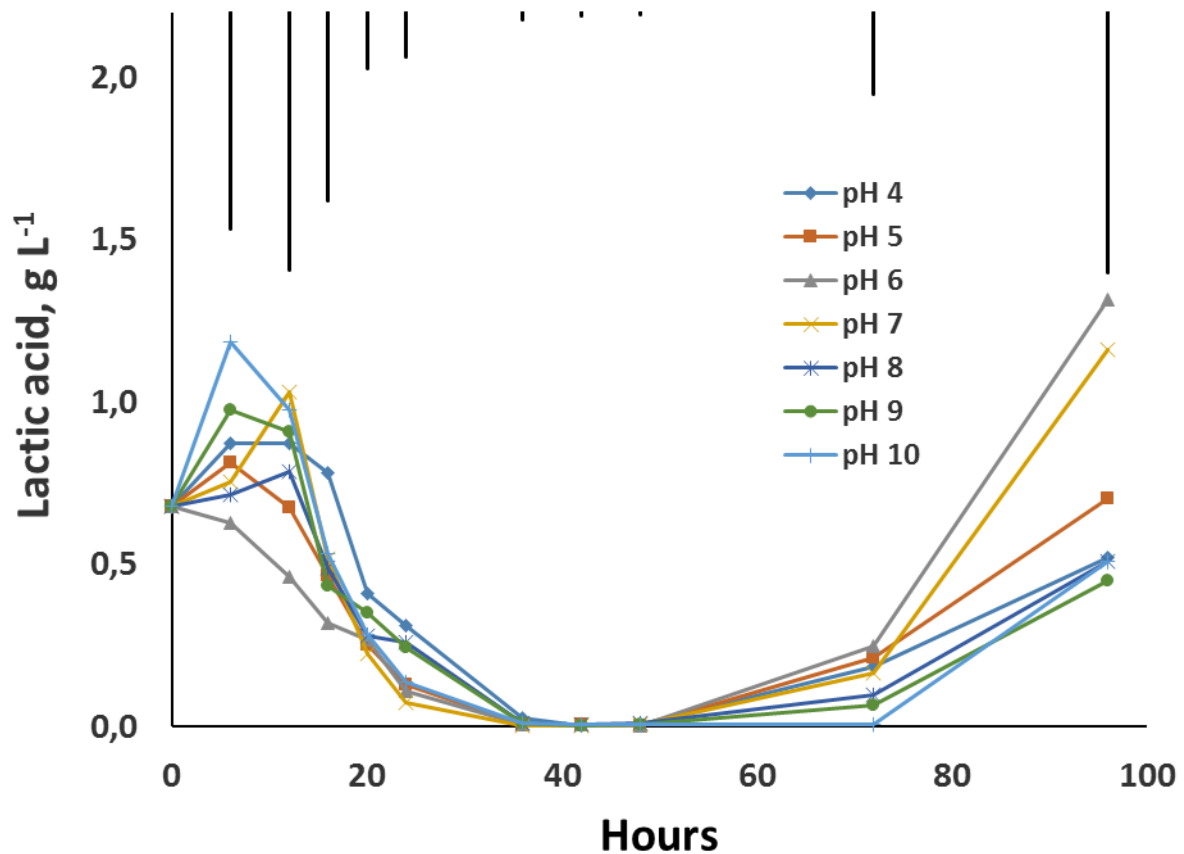
1434

1435 *ACIDO LATTICO*

1436

1437 La produzione di acido lattico è stata quasi istantanea e si è interrotta bruscamente
1438 tra la 12[^] e la 16[^] ora di fermentazione (Fig. 17). Tra la 16[^] e la 36[^] ora l'acido lattico
1439 era quasi scomparso. Il campione della 72[^] ora, invece, ha mostrato un nuovo
1440 incremento della concentrazione di acido lattico il cui incremento è continuato fino alla
1441 fine dell'esperimento.

1442



1443

1444 **Figura 17.** Andamento della concentrazione di acido lattico nel brodo di fermentazione di PE durante la DF a
 1445 diversi valori di pH iniziale. Le barre verticali rappresentano il valore della differenza meno significativa per ogni
 1446 tempo di misurazione tra le medie secondo il test HSD di Tukey. [148].
 1447

1448

1448 5.4. ESPERIMENTO "D" – INFLUENZA DEL pH INIZIALE SULLA

1449

1449 COMUNITA' MICROBICA IN DF

1450

1451 In questo esperimento è stato studiato l'effetto che il pH iniziale ha avuto sulla
 1452 composizione delle comunità microbiche coinvolte nel processo della DF, usando PE
 1453 come substrato. L'evoluzione delle comunità microbiche è stata monitorata attraverso
 1454 l'HTS dei geni 16s rRNA, nei reattori a pH iniziale 4, 8 e 10 e a 7 tempi selezionati (0, 6,
 1455 16, 24, 48, 72 e 96 ore).

1456

1457

Come detto in precedenza, nelle prime 16 ore di fermentazione in tutti i reattori è
 stata osservata una stabilizzazione del pH ad un valore uguale a $5.4 (\pm 0.1)$. Con

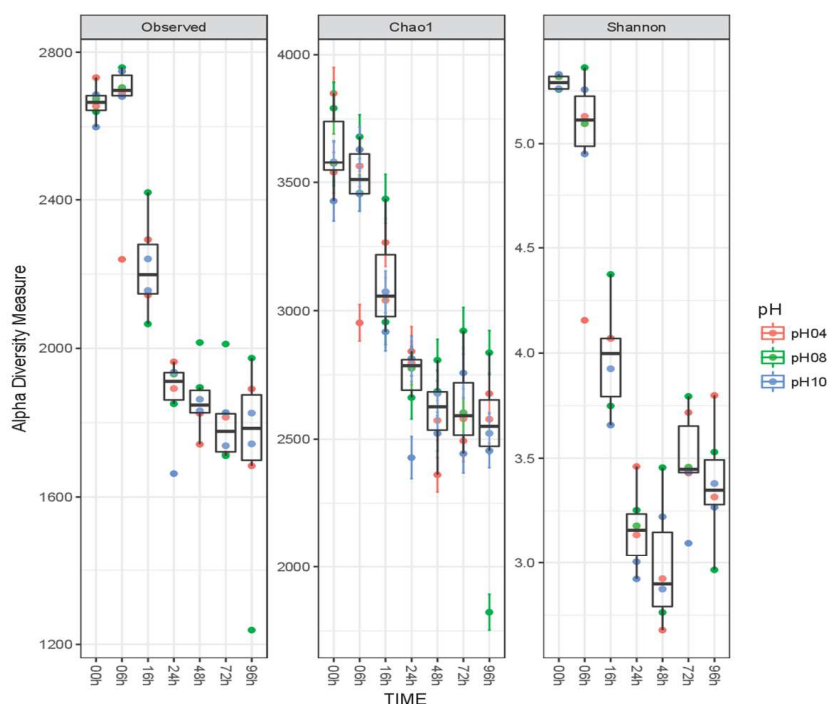
1458 l'avanzamento della DF il pH ha continuato a calare in maniera molto uniforme in tutti i
1459 reattori. In base dell'andamento del pH e della produzione di H₂, è stato possibile
1460 dividere la DF in 3 fasi: una fase lag (0-16 ore, fase 1), la fase di produzione esponenziale
1461 di H₂ (16-72 ore, fase 2) e una fase finale stazionaria (72-96 ore, fase 3).

1462

1463 *5.4.1. ALFA DIVERSITY*

1464

1465 L' α diversity era più alta all'inizio che dopo 96 ore di fermentazione (Fig. 18) man
1466 mano che la fermentazione proseguiva solo alcuni gruppi microbici selezionati hanno
1467 proliferato e, conseguentemente, in tutti i reattori hanno prevalso gli stessi gruppi
1468 microbici. Poiché questa riduzione dell' α diversity è comune a tutti i trattamenti, essa è
1469 stata "lactose driven", piuttosto che influenzata dal pH iniziale.



1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478

Figura 18. Alpha diversity tracciata in funzione del tempo. L'alfa diversità rappresenta la misura della diversità delle specie presenti in un habitat. Tre colori differenti sono stati utilizzati per i vari pH. L'alfa diversità è stata calcolata per tutti i campioni utilizzando il numero di OTU osservate, per lo stimatore Chao1 e l'indice di Shannon. [da Vasmara C., Pindo M., Micheletti D., Marchetti R., "INITIAL PH INFLUENCES MICROBIAL COMMUNITIES COMPOSITION IN DARK FERMENTATION OF SCOTTA PERMEATE" – submitted to International journal of Hydrogen Energy (HE)].

5.4.2. ABBONDANZA RELATIVA

1479

1480

Durante la DF, in tutti i reattori c'è stato un incremento generale dell'abbondanza

1481

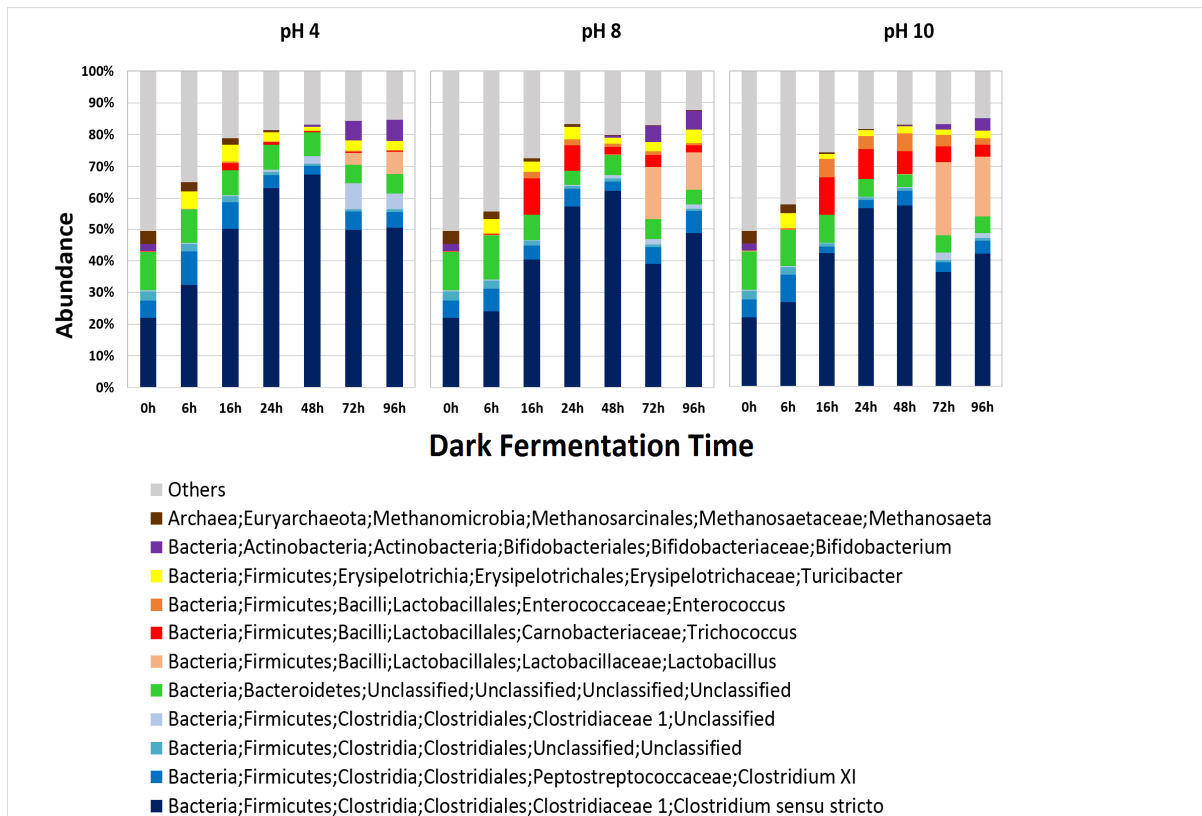
dei gruppi microbici capaci di metabolizzare il lattosio. L'incidenza relativa di ogni

1482

gruppo microbico sul totale della popolazione, invece, è stata chiaramente influenzata dal

1483

valore del pH iniziale (Fig. 19).

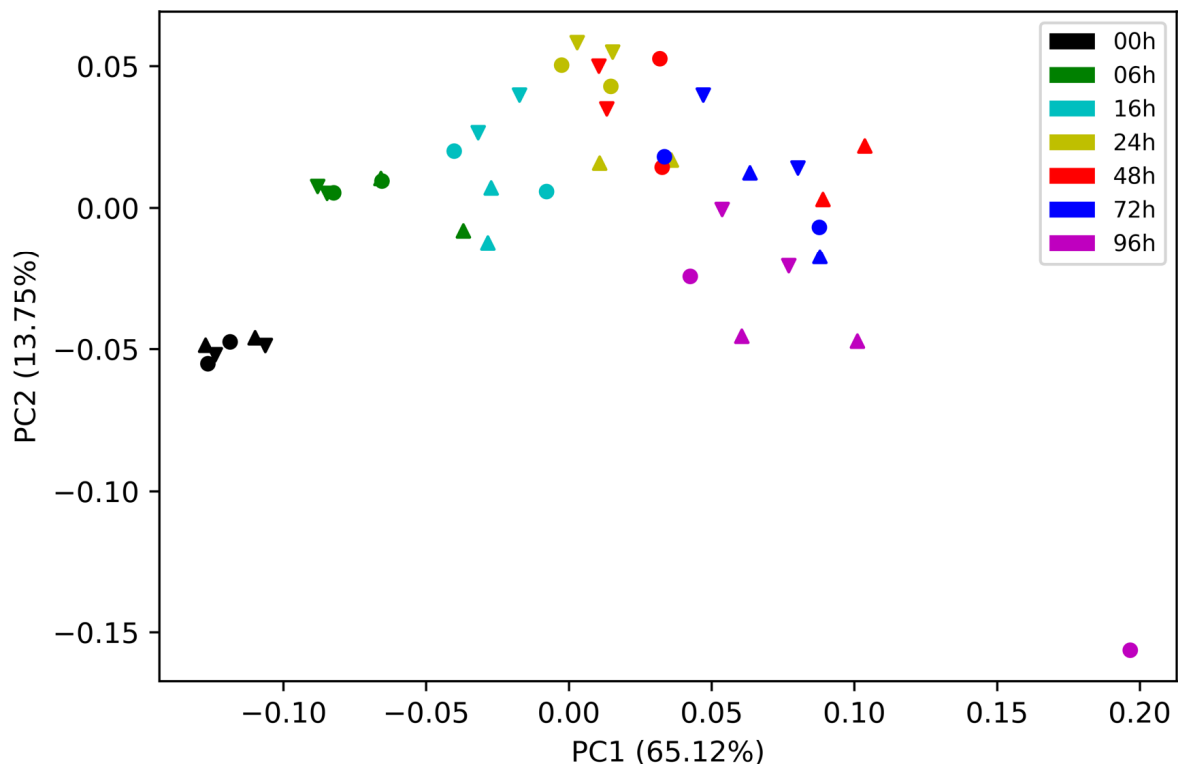


1484

1485 **Figura 19.** Evoluzione della composizione delle comunità microbiche nei reattori (valori medi delle letture) con
 1486 pH iniziale di 4, 8 e 10. Sono stati considerati i 12 generi più abbondanti. [da Vasmara C., Pindo M., Micheletti
 1487 D., Marchetti R., “INITIAL PH INFLUENCES MICROBIAL COMMUNITIES COMPOSITION IN DARK
 1488 FERMENTATION OF SCOTTA PERMEATE” – submitted to HE].

1489

1490 Nella PCoA applicata all'abbondanza degli OTU, i primi due componenti della
 1491 PCoA hanno intercettato il 78% della varianza totale, e i campioni erano chiaramente
 1492 distribuiti lungo l'asse 1 in relazione al tempo di misurazione, mentre non c'era un chiaro
 1493 schema di distribuzione guidato dal pH (Fig. 20).



1494

1495 **Figura 20.** Analisi delle Coordinate Principali (PCoA) della distanza tra campioni. Triangoli all'insù: pH 4; cerchi:
 1496 pH8; triangoli all'ingiù pH 10. [da Vasmara C., Pindo M., Micheletti D., Marchetti R., "INITIAL PH
 1497 INFLUENCES MICROBIAL COMMUNITIES COMPOSITION IN DARK FERMENTATION OF
 1498 SCOTTA PERMEATE" – submitted to HE].

1499

1500 Nella Tabella 7 è stata correlata la distribuzione delle 5 OTU più abbondanti alle
 1501 fasi di produzione di H₂ in DF. Le abbondanze di *Bifidobacterium* e *Clostridium* sensu
 1502 strictu erano significativamente influenzate solo dal fattore *Periodo*. Il fattore pH, invece,
 1503 ha avuto un effetto significativo sull'abbondanza di *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Trichococcus*,
 1504 con una significativa interazione pH x *Periodo*.

1505

1506 *FASE 1, FASE "LAG"*

1507

1508 Durante questa fase non sono state osservate differenze nella composizione della
 1509 composizione microbica ai vari pH iniziali (Tab. 7).

1510
1511
1512
1513

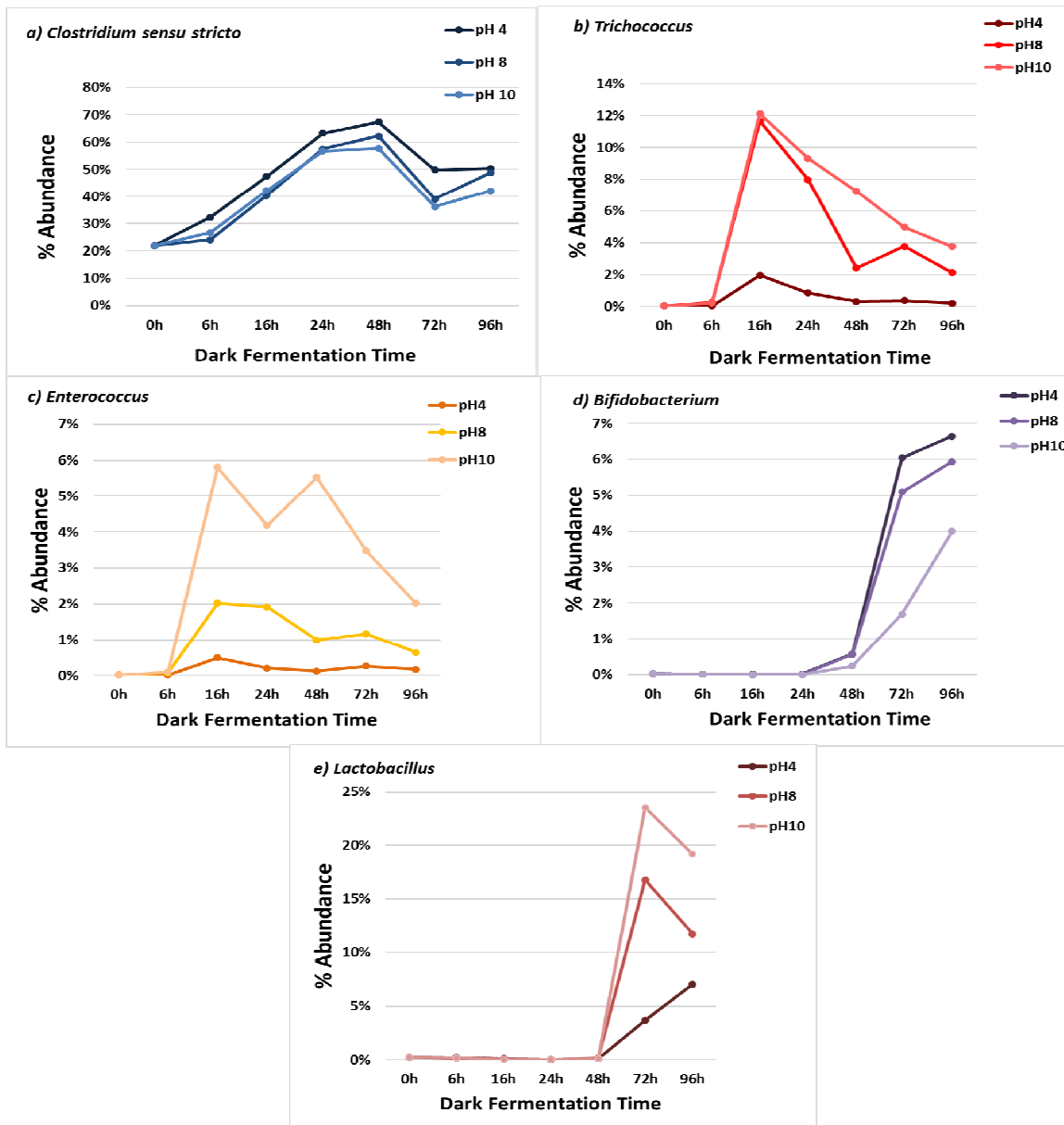
Tabella 7. Abbondanza relativa delle OTUs più rappresentative in funzione del pH e del *periodo* di DF. *Periodo 1:* 0, 6 h; *Periodo 2:* 16, 24 e 48 h; *Periodo 3:* 72 e 96 h. da Vasmara C., Pindo M., Micheletti D., Marchetti R., “INITIAL PH INFLUENCES MICROBIAL COMMUNITIES COMPOSITION IN DARK FERMENTATION OF SCOTTA PERMEATE” – submitted to International journal of Hydrogen Energy (HE)].

		Abundance (%)									
pH	Periodo DF	<i>Bifidobacterium</i>		<i>Clostridium sensu strictu</i>		<i>Enterococcus</i>		<i>Lactobaciullus</i>		<i>Trichococcus</i>	
4	1	0.02	c	27.1	cd	0.02	c	0.24	b	0.04	c
	2	0.20	c	59.3	a	0.28	c	0.10	b	1.04	c
	3	6.35	a	50.1	ab	0.22	c	5.35	b	0.30	c
8	1	0.02	c	23.0	d	0.05	c	0.21	b	0.15	c
	2	0.19	c	53.3	ab	1.65	bc	0.10	b	7.35	ab
	3	5.51	ab	43.9	ab c	0.91	c	14.28	a	2.95	bc
10	1	0.02	c	24.3	d	0.06	c	0.23	b	0.14	c
	2	0.08	c	52.2	ab	5.17	a	0.08	b	9.55	a
	3	2.85	bc	39.2	bc d	2.75	b	21.33	a	4.38	bc

In ogni colonna, le medie seguite da lettere uguali non sono significativamente diverse per $P < 0.05$ (test Tukey-Kramer).

1514
1515

1516 Inizialmente l'inoculo era composto dal 94% di batteri e dal 6% di archea. La
1517 popolazione più abbondante era quella dei *Clostridi* (31%), seguita dai *Bacteroidetes* (12%).
1518 Dopo 6 ore di fermentazione a pH 4 si è avuto un incremento del gruppo dei *Clostridia*
1519 (Fig. 19). In generale, però, la situazione era sostanzialmente immutata rispetto a quella
1520 iniziale. Ai valori di pH iniziali alcalini, comunque, è stato osservato un marcato
1521 incremento di *Trichococcus* (appartenenti all'ordine dei *Lactobacillales*). L'abbondanza di
1522 *Trichococcus* era aumentata da 0.04% a 12% (sia a pH 8 che a pH 10), mentre a pH4
1523 l'incremento è stato più ridotto (+2%) (Fig. 21b). In questa fase, *Trichococcus* era il genere
1524 di *Lactobacillales* maggiormente rappresentato in tutti i reattori (Fig. 19).



1525

1526 **Figura 21.** Abbondanza relativa (percentuale della popolazione totale) dei generi più rappresentativi durante la
 1527 DF. a) *Clostridium sensu stricto*, b) *Trichococcus*, c) *Enterococcus*, d) *Bifidobacterium*, e) *Lactobacillus*. [da Vasmara C., Pindo
 1528 M., Micheletti D., Marchetti R., "INITIAL PH INFLUENCES MICROBIAL COMMUNITIES
 1529 COMPOSITION IN DARK FERMENTATION OF SCOTTA PERMEATE" – submitted to HE].
 1530
 1531

1532 *FASE 2, PRODUZIONE ESPONENZIALE DI H₂*

1533

1534 La seconda fase (16 -72 ore) è stata la fase caratterizzata dalla produzione
 1535 esponenziale di H₂ (Fig. 12b). In questa fase, in tutti i reattori, l'ordine prevalente era
 1536 quello dei clostridiales (68 ± 0.05%, in media). La loro incidenza, sulla popolazione

1537 totale, era quasi raddoppiata rispetto a quella dell'inoculo iniziale (Fig. 19). Tra la 24[^] e la
1538 48[^] ora di fermentazione, l'incidenza di *Trichococcus* era drasticamente scesa (0.3% a pH
1539 4, 2% a pH 8 e 7% a pH 10) (Fig. 21b). Questo decremento è stato accompagnato dal
1540 simultaneo aumento della abbondanza relativa di *Clostridium sensu stricto* (Fig. 21a). In tutti
1541 i reattori, la loro incidenza è aumentata dal 43% che, mediamente, si era misurato dopo
1542 16 ore di fermentazione, al 67% che, in media, è stato misurato dopo 48 ore (Fig. 21a).
1543 Alla fine della fase 2 *Clostridium sensu stricto* costituiva, in media, il 92% \pm 0.86 della
1544 popolazione totale dei *Clostridia* (Fig. 19).

1546 *FASE 3, FASE STAZIONARIA*

1547
1548 La terza fase della DF (72-96 ore) è stata la fase stazionaria di produzione
1549 d'idrogeno. In questa fase, in tutti i reattori, è stato osservato un incremento
1550 generalizzato dei generi *Bifidobacterium* (Fig. 21d) e *Lactobacillus* (Fig. 21e), specialmente
1551 nei reattori dove era stato prodotto più H₂. Infatti, in questa fase, i 2 generi
1552 rappresentavano, rispettivamente, il 20 e 24% del totale della popolazione nei reattori
1553 che avevano un pH iniziale di 8 e 10, mentre nei reattori a pH iniziale 4 il loro
1554 incremento è stato più ridotto (12%). In questa fase, inoltre, si è registrato un
1555 progressivo abbassamento della produzione di H₂, il cui tasso di produzione oraria è
1556 sceso, mediamente, a 0.02 mol H₂, rispetto a 0.06 mol H₂ prodotti mediamente nella fase
1557 2 (Fig. 12b). L'incremento dell'incidenza di *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* si può
1558 considerare come una degenerazione della comunità microbica che era stata più
1559 produttiva nelle ore precedenti in cui i 2 generi erano quasi assenti (Fig. 19 e 21).

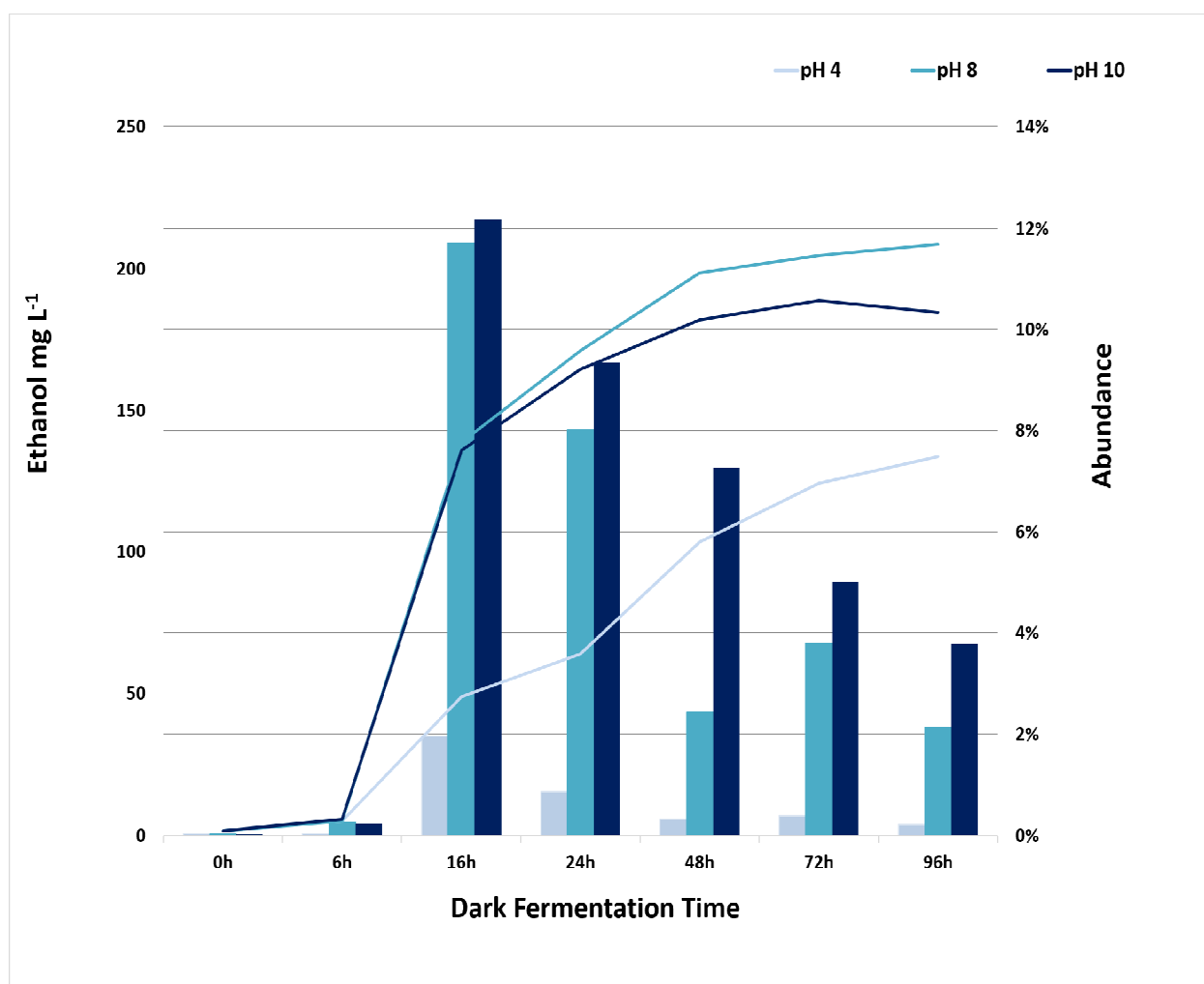
1560

1561 5.4.3. RELAZIONE TRA LA COMPOSIZIONE DELLA COMUNITA'

1562 MICROBICA E LA PRODUZIONE DI METABOLITI

1563

1564 Nella fase 1, nei reattori a pH iniziale alcalino, è stata osservata una massiccia
1565 produzione di etanolo ($142 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ in media) che è stata molto più alta di quella
1566 osservata nei reattori con pH iniziale 4 (47 mg L^{-1}) (Fig. 22).



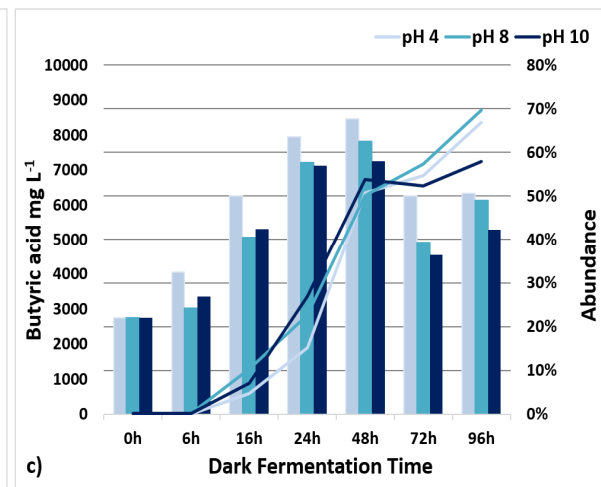
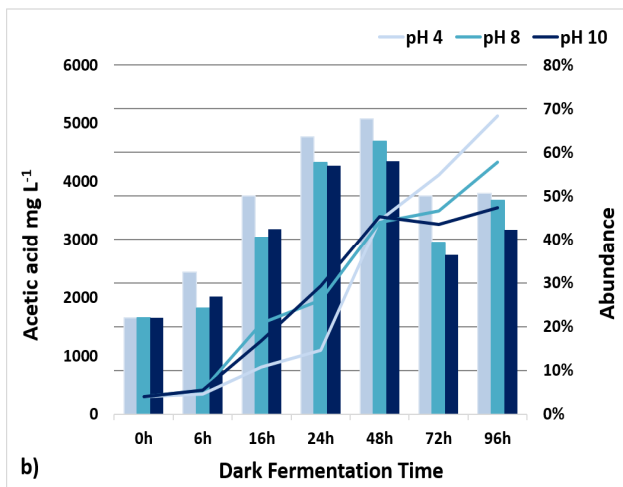
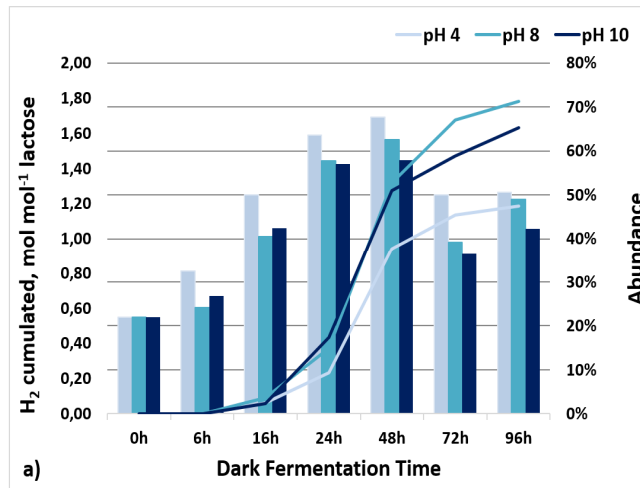
1567

1568 **Figura 22.** Produzione di etanolo (line) in relazione con la proliferazione del genere *Trichoboccus* (istogrammi). Le
1569 barre verticali rappresentano la deviazione standard della media [da Vasmara C., Pindo M., Micheletti D.,
1570 Marchetti R., "INITIAL PH INFLUENCES MICROBIAL COMMUNITIES COMPOSITION IN DARK
1571 FERMENTATION OF SCOTTA PERMEATE" – submitted to HE].

1572

1573 In particolare, nelle prime 16 ore di fermentazione, nei reattori a pH iniziale
1574 alcalino, era stato prodotto il 70% dell'etanolo prodotto durante l'intero periodo di
1575 fermentazione. Nello stesso periodo, invece, i reattori con pH iniziale 4 avevano
1576 prodotto solo il 37% dell'etanolo totale. Nei reattori con pH alcalino, inoltre, era stato
1577 prodotto anche più acido acetico rispetto a quello prodotto nei reattori a pH 4 (Fig.16a).
1578 La massiccia produzione di etanolo nei reattori alcalini può essere riferita alla grande
1579 proliferazione del genere *Trichococcus*, che si è avuta a questi valori di pH (Fig. 22).

1580 Per tutta la durata della fase 2 è stato osservato un forte incremento della
1581 popolazione del genere *Clostridium* sensu stricto. La proliferazione di tale genere si è
1582 tradotta con la massiccia produzione di H₂ osservata in tutti i reattori (Fig. 23a). Durante
1583 questo periodo, inoltre, c'era stato un ulteriore incremento della concentrazione di acido
1584 acetico (da 1257 ± 394 mg L⁻¹, in media dopo 16 ore a 2954 ± 635 mg L⁻¹, in media a 48
1585 ore) (Fig. 23b) e anche un incremento esponenziale della produzione di acido butirrico
1586 (da 1001 ± 373 mg L⁻¹, in media dopo 16 ore a 6129 ± 755 mg L⁻¹, in media a 48 ore)
1587 (Fig. 23c).



1588

1589 **Figura 23.** a) produzione di H₂ (linee) in relazione con la proliferazione del genere *C. sensu stricto* (istogrammi).
 1590 b) produzione di acido acetico e c) butirrico (linee) in relazione con la proliferazione del genere *C. sensu stricto*
 1591 (istogrammi). Le barre verticali rappresentano la deviazione standard della media [da Vasmara C., Pindo M.,
 1592 Micheletti D., Marchetti R., "INITIAL PH INFLUENCES MICROBIAL COMMUNITIES COMPOSITION
 1593 IN DARK FERMENTATION OF SCOTTA PERMEATE" – submitted to HE].

1594

1595

La fase 3 è stata caratterizzata dall'incremento della concentrazione di acido lattico

1596

in tutti i reattori. Tale acido, durante la fase 2, non era stato rilevato in nessun reattore.

1597

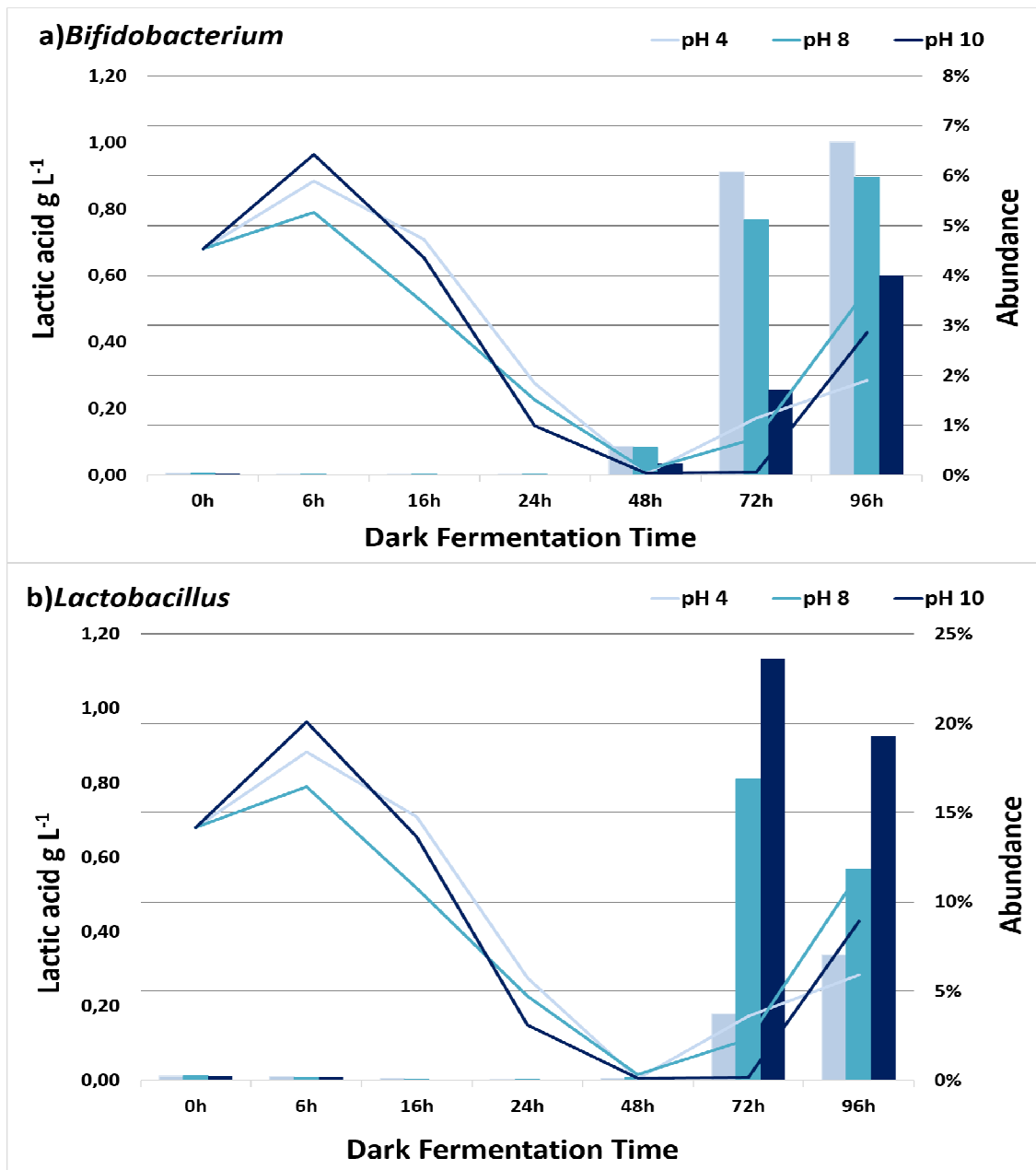
L'incremento dell'acido lattico registrato in tutti i reattori è stato in concomitanza con la

1598

proliferazione dei generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, particolarmente abbondante in

1599

questa fase (Fig. 24).



1600

1601 **Figura 24.** Andamento della concentrazione di acido lattico (linee) in relazione con la proliferazione dei generi
 1602 *Bifidobacterium* (a) e *Lactobacillus* (b). Le barre verticali rappresentano la deviazione standard della media [da
 1603 Vasmara C., Pindo M., Micheletti D., Marchetti R., “INITIAL PH INFLUENCES MICROBIAL
 1604 COMMUNITIES COMPOSITION IN DARK FERMENTATION OF SCOTTA PERMEATE” – submitted
 1605 to HE].

1606

1607

5.5. ESPERIMENTO “E” – VALUTAZIONE DEI SUPPORTI PER

1608

L'IMMOBILIZZAZIONE DI BIOMASSA MICROBICA

1609

1610

In quest'esperienza sono stati valutati i supporti scelti per l'immobilizzazione della

1611

biomassa microbica produttrice di H₂.

1612 I supporti valutati sono stati divisi in 2 gruppi in base alla loro origine: inorganici
 1613 (Biomax e zeoliti) e organici (i 2 biochar). La valutazione di tali supporti è stata fatta in
 1614 base alla capacità di assorbire acqua. A parità di volume di supporto (50 mL) i supporti
 1615 organici hanno mostrato più capacità di assorbire acqua (Tab. 8).

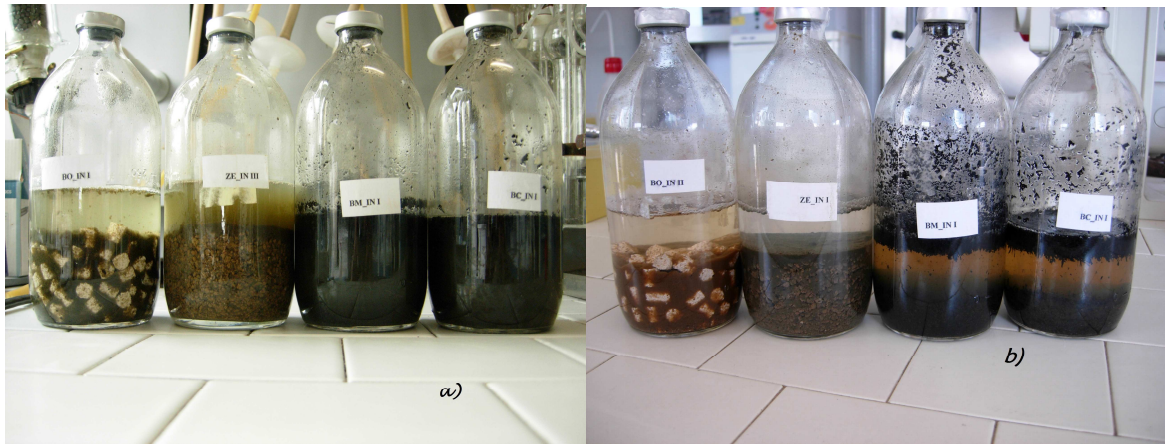
1616 **Tabella 8.** Capacità di assorbimento dell'acqua dei supporti testate per l'immobilizzazione della biomassa
 1617 microbica. BO = Biomax (ceramica), ZE = zeoliti, BM = biochar manure, BC = biochar cippato. Deviazione
 1618 standard in parentesi (n = 3)

Support	volume support (mL ⁻¹)	Adsorbed water (mL ⁻¹)	operating volume support (mL ⁻¹)	Adsorbed water (mL ⁻¹)
BO	50	11.89 (0.01)	170	40.42 (0.01)
ZE	50	11.38 (0.01)	170	38.69 (0.01)
BM	50	42.41 (0.02)	50	42.41 (0.02)
BC	50	40.26 (0.03)	50	40.46 (0.03)

1619
 1620 Al fine di lavorare a parità di capacità di assorbire acqua, si è scelto di usare volumi
 1621 diversi di supporti (170 mL per i supporti inorganici e 50 mL per i supporti organici).
 1622 Così facendo, infatti, la capacità media di assorbire acqua è stata 39.6 mL per i supporti
 1623 inorganici e di 41.3 mL per i supporti organici (Tab. 8).

1624
 1625 *5.6. ESPERIMENTO "F" – CONFRONTO DI PRODUZIONE DI H₂ DA*
 1626 *BIOMASSA ADESA E SOSPESA*

1627
 1628 In questo esperimento è stata valutata la produzione di H₂ da biomassa adesa sui
 1629 vari supporti testati, in confronto alla produzione di H₂ ottenuta da biomassa sospesa.
 1630 L'esperimento è stato ripetuto 2 volte per testare la capacità di ritenzione della biomassa
 1631 dei supporti. Dopo una fase di acclimatamento della biomassa sui supporti durata 7
 1632 giorni (Fig. 25), si è proceduto con i 2 cicli di DF.



1633

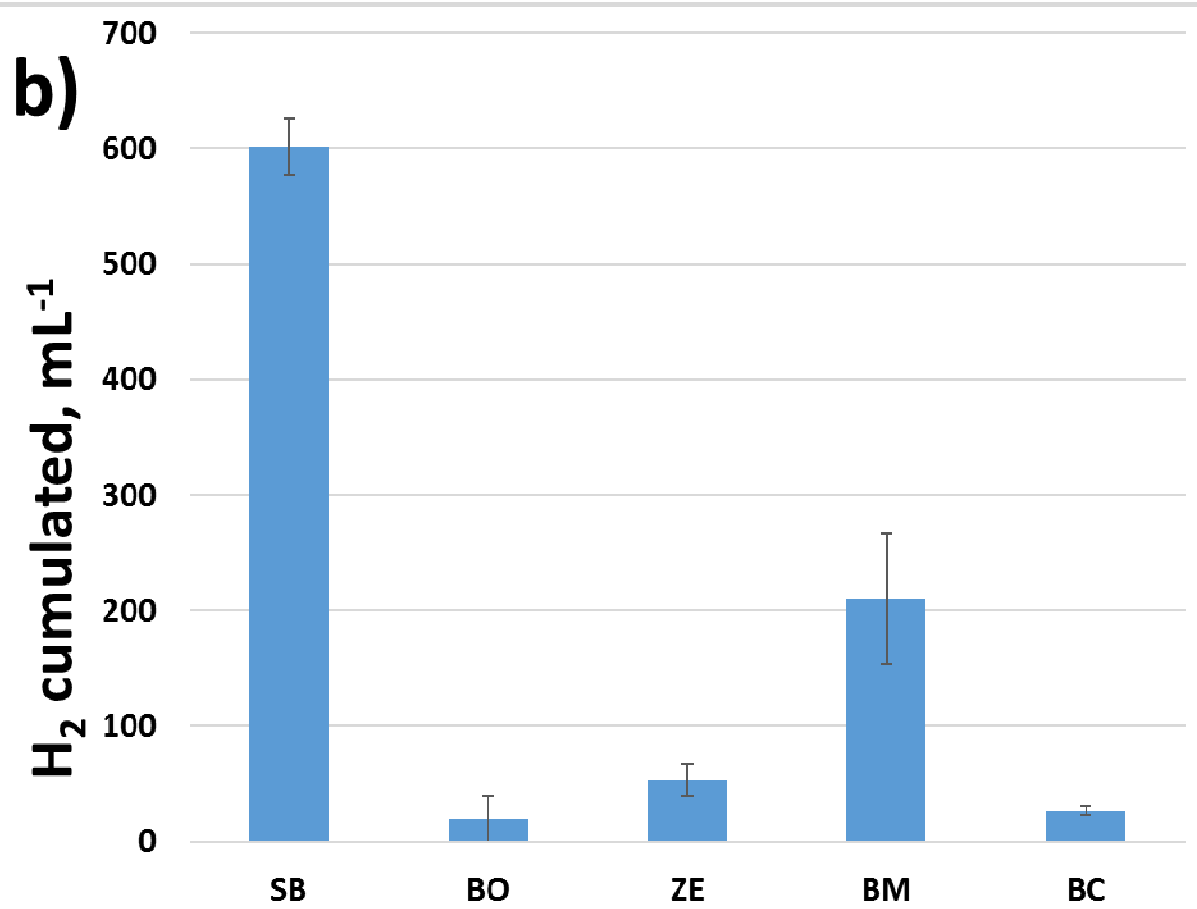
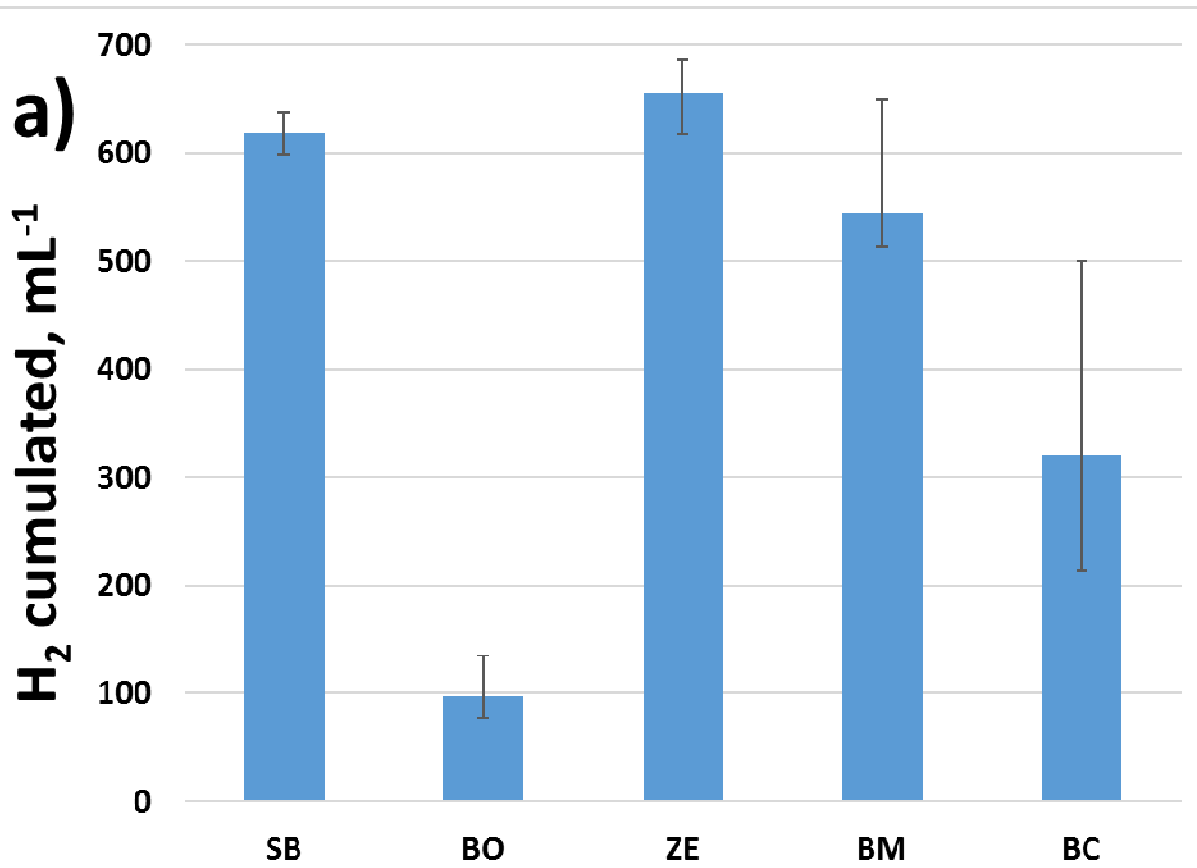
1634 **Figura 25.** Acclimatamento dell'inoculo sui supporti testati a) dopo 1 giorno e b) dopo 7 giorni.

1635

1636 *5.6.1. PRODUZIONE DI H₂*

1637

1638 La produzione di H₂ nel primo ciclo di DF è stata abbastanza simile nei reattori SB
 1639 e ZE (618 e 655 mL⁻¹, in media, rispettivamente), seguiti da BM (543 mL⁻¹ in media). La
 1640 produzione di H₂ più bassa è stata registrata in BO (96 mL⁻¹ in media), BC si è posto in
 1641 posizione intermedia (320 mL⁻¹ in media) da notare, però, che BC ha anche mostrato la
 1642 SD più elevata (Fig. 26a).



1643

1644

1645 **Figura 26.** Produzione di H₂ sui vari supporti testati per l'adesione della biomassa microbica (BO = Biomax, ZE
 1646 = zeoliti, BM = biochar manure, BC = biochar cippato) in confronto con la produzione di H₂ da biomassa

1647 sospesa (SB), a) nel primo e b) nel secondo ciclo di DF su PE. Le barre verticali rappresentano la deviazione
1648 standard della media.
1649

1650 Nel secondo ciclo di DF, i reattori in cui erano presenti i supporti per
1651 l'immobilizzazione, hanno mostrato una drastica riduzione della produzione di H₂ (Fig.
1652 26b). Solo in BM la riduzione è stata meno drastica (-59%, in media), mentre sia in ZE
1653 che in BC la produzione di H₂ è calata di 11 volte. In BO, invece, la produzione di H₂ è
1654 calata di 4 volte. La produzione di H₂ misurata in SB è rimasta sostanzialmente invariata
1655 tra il primo e il secondo ciclo di DF (618 mL⁻¹ e 602 mL⁻¹, in media rispettivamente)
1656 nonostante i reattori SB siano stati inoculati *ex novo*.

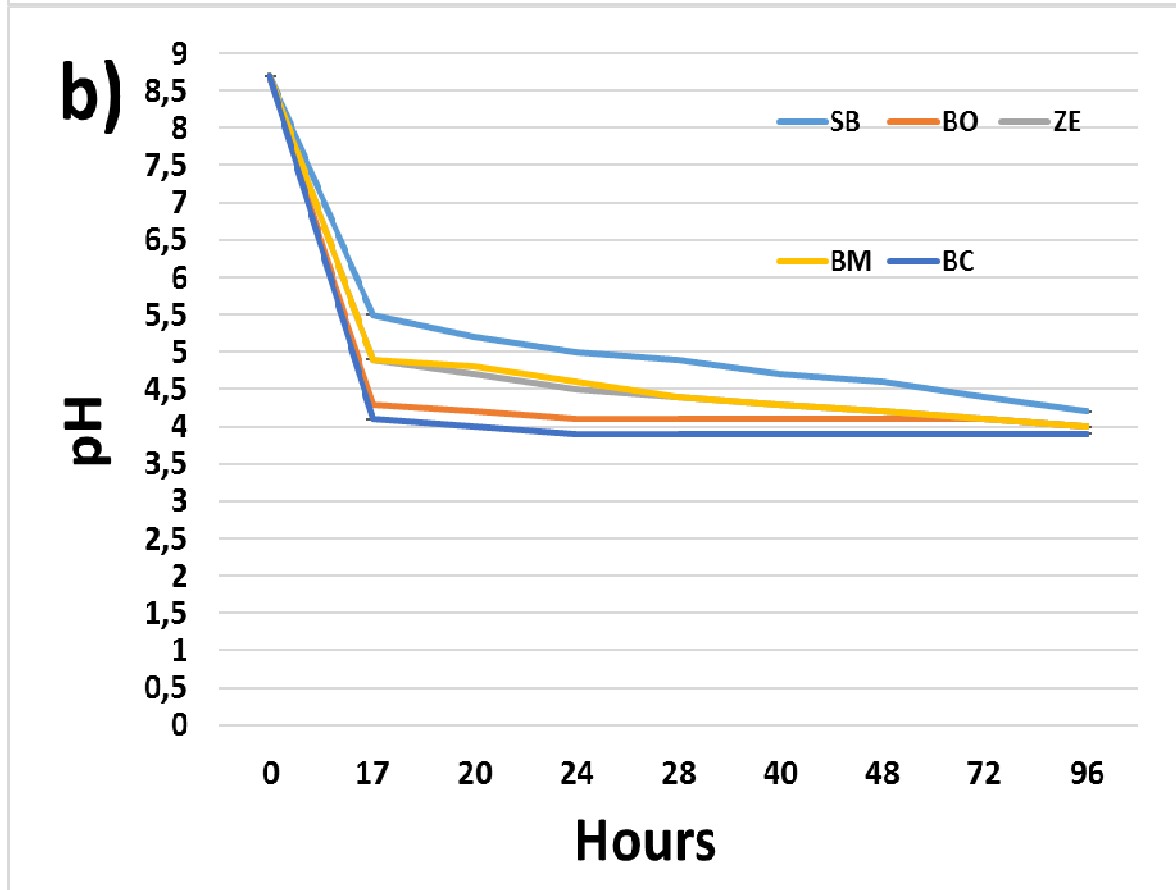
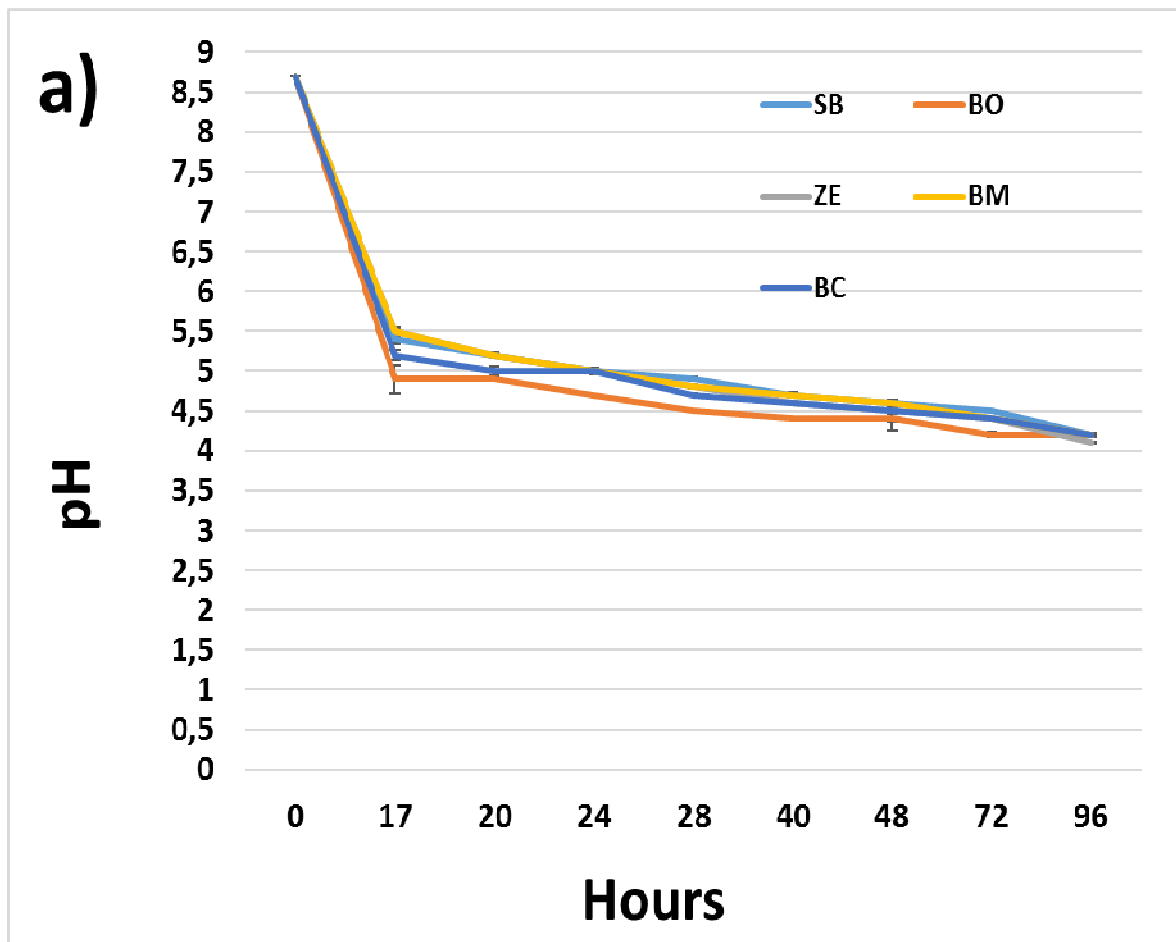
1657

1658 5.6.2. pH

1659

1660 L'andamento del pH nel primo ciclo di DF è stato molto omogeneo in tutti i
1661 reattori. Dopo 17 ore di fermentazione, infatti, esso era sceso, in media, a 5.3 ± 0.1 ,
1662 leggermente più basso in BO (Fig. 27a), per poi continuare a diminuire con l'avanzare
1663 delle DF fino ad arrivare, mediamente, a 4.2.

1664



1666
1667
1668

Figura 27. Andamento del pH del brodo di fermentazione derivante da DF dai vari supporti testati per l'adesione della biomassa microbica (BO = Biomax, ZE = zeoliti, BM = biochar manure, BC = biochar cippato)

1669 in confronto con l'andamento del pH del brodo di fermentazione derivante da biomassa sospesa (SB), a) nel
1670 primo e b) nel secondo ciclo di DF su PE. Le barre verticali rappresentano la deviazione standard della media.

1671

1672 Nel secondo ciclo di DF, però, il calo di pH nei reattori con biomassa adesa è stato più

1673 repentino che in SB. Dopo 17 ore di fermentazione, infatti, i reattori con biomassa adesa

1674 avevano un pH medio di 4.6 mentre il pH medio di SB era 5.5. (Fig. 27b). Alla fine del

1675 periodo di osservazione, comunque, tutti i reattori avevano un pH simile (4 ± 0.02).

1676

1677 *5.6.3. CONSUMO DI LATTOSIO E PRODUZIONE DI METABOLITI*

1678

1679 Il lattosio residuo è stato molto simile in tutti i reattori (22 g L^{-1} , in media) sia nel

1680 primo ciclo che nel secondo ciclo di DF (Tab. 9 e 10). Questo indica un consumo di

1681 lattosio abbastanza omogeneo in entrambi i cicli di DF. Poiché la concentrazione di

1682 lattosio iniziale nel permeato era di 51 g L^{-1} , alla fine di ogni ciclo, mediamente, era stato

1683 consumato il 43% del lattosio. Una situazione analoga è già stata descritta in precedenza

1684 (cfr. par. 5.3.1).

1685

1686
1687
1688

Tabella 9. Concentrazione di lattosio, acido lattico e VFA nei brodi di fermentazione alla fine del 1° ciclo di DF di PE da biomassa sospesa (SB) e biomassa immobilizzata su Biomax (BO), zeoliti (ZE), biochar manure (BM) e biochar cippato (BC). SD = è la deviazione standard (n = 3). PE = permeato iniziale usato come substrato.

	Lactose	Lactic acid	Acetic	Propionic	Isobutyric	Butyric	Isovaleric	Valeric	Isocaproic	Caproic	TOTAL VFA
	g L ⁻¹	g L ⁻¹	mg L ⁻¹								
SB	21	0.47	4881	34	4	8945	38	35	2	33	13972
SD	1	0.06	117	1	1	19	2	1	1	3	99
BO	25	1.15	4353	48	215	9795	25	76	24	0	14538
SD	1	0.21	280	2	5	20	0	2	5	0	310
ZE	22	0.70	4395	29	106	9913	26	64	0	0	14799
SD	2	0.10	234	2	3	129	1	2	0	0	332
BM	20	0.97	4004	107	157	6285	47	48	6	0	10721
SD	1	0.06	2	29	2	121	3	3	1	0	149
BC	21	1.30	3293	104	64	10327	67	4870	108	0	18833
SD	2	0.12	102	5	2	501	2	0	0	0	493
PE	51	0.68	58	339	17	728	0	0	8	0	1151

1689
1690
1691
1692

Tabella 10. Concentrazione di lattosio, acido lattico e VFA nei brodi di fermentazione alla fine del 2° ciclo di DF di PE da biomassa sospesa (SB) e biomassa immobilizzata su Biomax (BO), zeoliti (ZE), biochar manure (BM) e biochar cippato (BC). SD = è la deviazione standard (n = 3). PE = permeato iniziale usato come substrato.

	Lactose	Lactic acid	Acetic	Propionic	Isobutyric	Butyric	Isovaleric	Valeric	Isocaproic	Caproic	TOTAL VFA
	g L ⁻¹	g L ⁻¹	mg L ⁻¹								
SB	20	0.45	4730	34	5	8520	41	34	2	32	13399
SD	1	0.03	148	2	0	374	1	2	1	3	521
BO	25	4.15	2353	2658	249	2795	229	1576	24	0	9885
SD	3	0.21	280	267	53	20	33	281	5	0	405
ZE	21	3.33	2292	2701	262	2590	234	1766	26	0	9870
SD	2	0.15	266	296	30	203	25	41	3	0	689
BM	23	2.37	4006	495	356	5267	432	4936	129	0	15621
SD	3	0.21	1	4	3	52	23	21	17	0	77
BC	21	2.03	3220	1065	348	5290	342	4764	122	0	15152
SD	4	0.06	85	47	24	7	35	93	16	0	170
PE	50	0.70	52	371	13	727	0	0	8	0	1171

1693 La produzione totale di VFA nel primo ciclo di DF è stata più abbondante che nel
1694 secondo (14573 e 12785 mg L⁻¹, in media, rispettivamente). Questo perché la produzione
1695 di VFA totali su supporti inorganici (BO e ZE) si è abbassata (-33%, in media).
1696 Comunque, in entrambi i cicli, i VFA più rappresentati erano acido acetico (3585 e 3320
1697 mg L⁻¹, in media rispettivamente) e butirrico (9053 e 4892 mg L⁻¹, in media
1698 rispettivamente). Nel secondo ciclo, c'è stato un netto aumento della concentrazione di
1699 acido propionico in BO e ZE (2353 e 2292 mg L⁻¹ in media, rispettivamente) e in BC
1700 (1065 mg L⁻¹, in media). La produzione di acido propionico, invece, è rimasta molto
1701 bassa in SB in entrambi i cicli (34 mg L⁻¹, in media) BM, nel secondo ciclo, ha fatto
1702 registrare una concentrazione media di acido propionico di 495 mg L⁻¹. Nel primo ciclo,
1703 in generale, la produzione di acido propionico era stata molto contenuta (64 mg L⁻¹ in
1704 media) e solo BM e BC avevano superato i 100 mg L⁻¹ (Tab. 9 e 10).

1705 La produzione di acido lattico è stata nettamente più abbondante nei reattori a
1706 biomassa adesa, in particolare nel secondo ciclo di DF (Tab. 9 e 10). Nei reattori a
1707 biomassa adesa, infatti, l'acido lattico misurato alla fine del secondo ciclo era
1708 mediamente di 2.97 g L⁻¹ (con il massimo di 4.15 g L⁻¹ in BO). Poiché alla fine del primo
1709 ciclo gli stessi reattori avevano prodotto, in media, 1.03 g L⁻¹ di acido lattico, la
1710 produzione media è quasi triplicata. In SB, invece, la produzione media di acido lattico
1711 tra i 2 cicli è stata molto simile (0.47 e 0.45 g L⁻¹, rispettivamente) (Tab. 9 e 10).

1712

1713 **6. DISCUSSIONE**

1714

1715 Dall'esperimento "A" è emerso che non ci sono state sostanziali differenze nella
1716 produzione di H_2 in DF utilizzando scotta o permeato. Questo era un risultato atteso sia
1717 perché i vari substrati avevano contenuti di lattosio uguale (Tab. 1), sia perché era già
1718 stato ottenuto H_2 da permeato di SL [65] che, di fatto, è del tutto simile al permeato di
1719 scotta in quanto entrambi derivano dall'ultrafiltrazione. Una riconferma preliminare,
1720 tuttavia, era necessaria.

1721

1722 *6.1. EFFETTO DEL pH SULLA PRODUZIONE DI H_2*

1723

1724 Fin dall'esperimento "B" è stata evidenziata l'influenza del pH sulla produzione di
1725 H_2 . In quell'esperimento, infatti, la produzione totale di H_2 da scotta e permeato
1726 aumentava all'aumentare del pH iniziale. Tale risultato è diventato più evidente nel corso
1727 dell'esperimento "C", in cui sono stati testati i valori di pH iniziale tra 4 e 10. In
1728 quell'esperimento l' H_2 è stato prodotto a tutti i valori di pH testati, ma la produzione più
1729 elevata si è registrata ai valori di pH alcalini. La produzione di H_2 più elevata è stata di
1730 $1.8 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ lattosio iniziale ed è stata registrata nei reattori a pH iniziale 8 (Tab. 5).
1731 A causa della finalità dell'esperimento, il pH è stato lasciato libero di scendere a valori
1732 bassi che hanno portato al blocco della DF che, volutamente, non è stata fatta
1733 proseguire. Poiché è stato consumato solo il 52.6% di lattosio (Fig. 13) si può
1734 presupporre che se la DF fosse stata portata a termine, sarebbero state prodotte 3.44
1735 $\text{mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ lattosio iniziale. Questa resa è più alta di quella riportata dalla maggior
1736 parte degli autori che hanno lavorato su lattosio: $1.1 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ lattosio [62], 2.5 mol
1737 $H_2 \text{ mol}^{-1}$ lattosio [57], $2.6 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ lattosio [64], $2.74 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1}$ lattosio [63] (che,

1738 però, hanno utilizzato un ceppo di *Escherichia coli* modificato) e 2.8 mol H₂ mol⁻¹ lattosio
1739 [60] ed è molto simile a quella riportata da Davila et al. [56] (3.1 mol H₂ mol⁻¹ lattosio) e
1740 da Azbar et al. [149] (3.5 mol H₂ mol⁻¹ lattosio). Questi ultimi autori, però, hanno
1741 arricchito il SL con micro e macro nutrienti. Nel nostro caso, invece, è stato manipolato
1742 solo il pH iniziale e non è stata fatta nessuna integrazione in termini di micro e macro
1743 elementi.

1744 Diversi autori hanno descritto l'effetto positivo che il pH alcalino ha sulla
1745 produzione di H₂. Lee et al. [78] hanno ottenuto la massima produzione di H₂ da
1746 saccarosio a pH 9 e 10, ma la produttività era più bassa a pH < 5 o > 9. A pH 3, 11 e 12
1747 non vi era stata produzione di H₂. Davila-Vazquez et al. [56] ha ottenuto la produzione
1748 di H₂ più elevata a pH 6 da SL in polvere. Tuttavia, il tasso di produzione volumetrico di
1749 H₂ (mmol H₂ L⁻¹ h⁻¹) aumentava all'aumentare del pH, raggiungendo il massimo a pH
1750 8.12 (che era il massimo valore di pH testato). Romão et al. [65] hanno usato un
1751 consorzio microbico che includeva specie dei generi *Clostridium*, *Lactobacillus* ed
1752 *Enterobacter* per la DF del permeato di SL che conteneva 20 g L⁻¹ di lattosio, combinando
1753 diversi fattori di processo come pH e Fe e sali di NH₄. L'intervallo di pH testato era
1754 compreso tra 5.6 e 8.4. I valori di pH >7 hanno permesso di ottenere la resa in H₂ più
1755 elevata. Ferchichi et al. [55], hanno valutato l'effetto del pH iniziale (nel range 5-10) sulla
1756 produzione di H₂ utilizzando *C. saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021 per la DF del SL
1757 tal quale ed ha osservato una maggiore velocità di fermentazione nel range di pH 6-8, ma
1758 la produzione totale di H₂ più elevata c'è stata a pH 5 e 6. La fase lag è stata più lunga a
1759 pH acido piuttosto che a pH alcalino. Gli stessi autori [150], d'altronde, utilizzando lo
1760 stesso ceppo microbico su glucosio invece che SL come fonte di carbonio e testando un

1761 range di pH iniziale tra 5 e 8.5, hanno registrato il tasso di produzione più alto a pH 7,
1762 mentre la maggiore resa in H₂ è stata osservata a pH 8.5, mentre, a pH 5 non c'è stata
1763 produzione di H₂. Junghare et al. [151] hanno ottenuto la resa più alta in H₂ utilizzando
1764 un ceppo alcalino-tollerante di *C. butyricum*.

1765 Nell' esperimento "C", la produzione di H₂ è partita quando il pH era uguale a 5.4.
1766 Molti autori [81, 152-153] suggeriscono un pH acido come ottimale per la produzione di
1767 H₂, ma i risultati dell'esperimento "C" indicano che questa soglia di pH è necessario più
1768 che ottimale. Siccome in questo esperimento la produzione totale di H₂ più elevata si è
1769 avuta a pH iniziali alcalini, per la produzione di H₂ in DF andrebbero presi in
1770 considerazione 2 valori di pH entrambi fondamentali: l'*optimum* iniziale che permette di
1771 avere la maggiore resa in H₂ e il *necessario*, ovvero, il valore di pH che permette di
1772 produrre H₂. Questa distinzione è in accordo con quanto definito da [73]. Questa
1773 distinzione diviene più chiara guardando i risultati dell'esperimento "D".

1774

1775 6.2. EFFETTO DEL pH SULLA COMUNITA' MICROBICA IN DF

1776

1777 Nell' esperimento "D", è stato valutato l'effetto che il pH iniziale ha avuto sulla
1778 composizione della comunità microbica. I risultati di questo esperimento sono stati
1779 messi in relazione con quelli dell'esperimento "C" in cui era stato valutato l'effetto del
1780 pH iniziale sulla produzione di H₂.

1781 L'effetto del pH iniziale sulla comunità microbica coinvolta nella DF è stata poco
1782 esaminata. Kim et al. [73], che hanno testato l'influenza di diversi pH iniziali sulla DF di
1783 scarti alimentari, hanno esaminato la composizione microbica solo alla fine della DF,

1784 utilizzando la DGGE (elettroforesi su gel in gradiente denaturante). I risultati hanno
1785 mostrato una netta predominanza di *Clostridia* senza differenze di rilievo tra i vari pH
1786 iniziali. Il substrato, però, era stato pretrattato termicamente per eliminare le popolazioni
1787 competitive con i produttori di H₂ e favorire i clostridi che, essendo sporigeni, sono in
1788 grado di sopravvivere ad un tale pre-trattamento. Romão et al [65], hanno isolato ed
1789 identificato i microorganismi dell'inoculo utilizzato per la DF del permeato di SL a
1790 diversi valori iniziali. L'inoculo, che proveniva da un impianto di digestione di reflui di
1791 caseificio e che non era stato adattato preliminarmente al consumo di lattosio, era
1792 costituito maggiormente da individui dei generi *Lactobacillus*, *Enterobacter* e *Clostridium*.
1793 Tuttavia, l'influenza del pH iniziale sull'evoluzione di questi gruppi microbici durante la
1794 DF non è stata riportata. Nell'esperimento "D" la composizione del consorzio
1795 microbico, invece, è stata monitorata dall'inizio alla fine della DF, così da poterne
1796 studiare l'evoluzione mediante l'utilizzo della tecnica HTS.

1797 Siccome il permeato e l'inoculo utilizzati per la DF erano gli stessi in tutti i reattori,
1798 la riduzione dell' α -diversity registrata dopo la fase lag era da attribuire al prevalere dei
1799 generi capaci di fermentare il lattosio, come riportato in [65]. Il pH iniziale, però, ha
1800 influenzato nettamente l'abbondanza relativa del genere *Trichococcus*.

1801 Il genere *Trichococcus* include batteri Gram-positivi e non sporigeni, che hanno una
1802 morfologia delle colonie variegata: possono organizzarsi singolarmente, in paia, in catene
1803 corte o come conglomerati irregolari. Attualmente, questo genere comprende 5 specie:
1804 *T. flocculiformis*, *T. palustris*, *T. pasteurii*, *T. collinsii* and *T. patagoniensis*, che presentano
1805 un'elevata somiglianza nelle loro sequenze del gene 16S rRNA. I membri del genere
1806 *Trichococcus* sono stati descritti come anaerobi facoltativi capaci di creare condizioni

1807 riducenti e di ridurre la resazurina in substrati aerobici durante la loro crescita. Inoltre,
1808 essi sono tutti ossidasi e catalasi negativi e possono crescere su una grande varietà di
1809 zuccheri e altri substrati [154].

1810 L'incremento dell'abbondanza relativa di *Trichococcus* durante la transizione tra la
1811 fase 1 e la 2, osservata specialmente a pH alcalini, può essere attribuita al pH registrato
1812 durante la loro fase di crescita. Questo genere può crescere in un ampio range di pH (5.5
1813 - 9) con l'ottimale attorno a 7.8 [155]. Nei reattori che avevano il pH iniziale alcalino,
1814 dopo 6 ore di fermentazione il pH medio era 7.9 e, dopo 12 ore, era di 6.2. Nei reattori a
1815 pH iniziale 4, invece, dopo 6 ore di fermentazione il pH era di 6.3 e, dopo 12 ore, era di
1816 5.8 (Fig. 12a). Il genere *Trichococcus*, inoltre, è anche capace di metabolizzare il lattosio
1817 [156], producendo etanolo, acido acetico, formico e lattico [154-155 e 157]. I risultati
1818 ottenuti sono in linea con quanto dichiarato da questi autori: nelle prime 16 ore di
1819 fermentazione, infatti, i reattori con pH iniziale alcalino avevano prodotto quasi il 70%
1820 dell'etanolo totale (in concomitanza con la massiccia proliferazione di *Trichococcus*), nei
1821 reattori a pH 4, dove la proliferazione di *Trichococcus* è stata molto più contenuta, nelle
1822 prime 16 ore di fermentazione era stato prodotto solo il 37% dell'etanolo totale (Fig. 22).
1823 Nella seconda fase si è osservata una riduzione dell'incidenza di *Trichococcus* sulla
1824 popolazione totale, che può essere spiegata con il contemporaneo abbassamento del pH
1825 che si è assestato attorno a 5.4 in tutti i reattori (Fig. 12a). Questo valore di pH, come
1826 detto in precedenza, è leggermente più basso del limite del range di crescita di questo
1827 genere. Nella seconda fase, comunque, c'è stato un netto predominio dei *Clostridia* in
1828 tutti i reattori (Fig. 19), tale situazione era attesa poiché questo gruppo microbico è
1829 capace di metabolizzare i substrati particolarmente ricchi in lattosio ed è pesantemente

1830 coinvolto nella produzione di H₂ in DF, così come riportato da diversi autori [28-29]. Il
1831 genere *Clostridium* sensu stricto, che ha nettamente prevalso nella comunità microbica di
1832 tutti i reattori durante la fase 2, è in grado di proliferare bene in un intervallo di pH
1833 compreso tra 3.6 e 7 senza un valore ottimale specifico [158]. I componenti del genere
1834 *Clostridium* sensu stricto sono indicati come buoni produttori di H₂ [7] e questo spiega la
1835 massiccia produzione di H₂ registrata durante la fase 2 in tutti i reattori. Tuttavia, la
1836 produzione totale di H₂ è stata più alta quando il valore di pH iniziale era pari a 8 (+
1837 64% in confronto a pH 4) (Tab. 5). Nelle prime 24 ore di fermentazione la produzione
1838 di H₂ nei reattori alcalini era 1.9 volte più alta che a pH 4 (Fig. 12b). L'abbondante
1839 proliferazione del genere *Trichococcus* a pH alcalini suggerisce un'azione coadiuvante
1840 dovuta al metabolismo di tali batteri capaci di modificare il substrato di partenza nelle
1841 prime fasi di fermentazione, in modo da favorire la successiva produzione di H₂ ad opera
1842 dei clostridi. Il genere *Trichococcus*, effettivamente, ha delle capacità riducenti [154],
1843 dunque, può migliorare le condizioni ambientali, rendendole più adatte alla DF. Infatti,
1844 sebbene la proliferazione di *C.* sensu stricto fosse stata simile in tutti i reattori, a pH 4,
1845 dove la proliferazione di *Trichococcus* era limitata, è stato osservato un ritardo sia nella
1846 produzione di H₂ che di acido acetico e butirrico se confrontate alle produzioni ottenute
1847 a pH iniziale alcalino in cui *Trichococcus* è stato capace di proliferare abbondantemente
1848 nelle prime 16 ore (Fig. 21 e 23). Inoltre, è interessante notare che tra la 20^a e la 24^a ora
1849 il tasso di produzione oraria a pH 10 era più alto che a pH 8 (+24%) (Fig. 23a). Questo
1850 può essere dovuto all'incremento del genere *Enterococcus* che c'è stato a pH 10 (Tab.7 e
1851 Fig. 21c). Poiché i rappresentanti di tale genere sono produttori di H₂ [7], è possibile che
1852 essi stessi abbiano partecipato attivamente alla produzione di H₂. Tuttavia, la coesistenza

1853 di Clostridium ed Enterococchi non è stata fruttuosa, poiché il tasso di produzione
1854 oraria di H₂ è progressivamente calato tanto che, alla fine, a pH 10, era stato prodotto
1855 meno H₂ che a pH 8 (Tab. 5). La coesistenza tra i due generi, d'altronde, è conflittuale
1856 [159-160].

1857

1858 6.3. CONSUMO DI LATTOSIO

1859

1860 Al termine degli esperimenti "C" e "D", in tutti i reattori quasi la metà del lattosio
1861 iniziale era stato consumato. Questo può essere spiegato dall'effetto inibitorio del pH
1862 molto acido che deriva dal processo di DF non tamponato. In effetti, l'enzima lattasi ha
1863 un optimum di attività a pH neutro [161], un pH acido, invece, inibisce l'attività di tale
1864 enzima [162]. Alla fine del periodo di osservazione, comunque, il lattosio residuo era
1865 molto simile in tutti i reattori, ovvero, in tutti i reattori era stato consumato lo stesso
1866 quantitativo di lattosio. Poiché ci sono state differenze nella produzione di H₂ tra i vari
1867 trattamenti, si può dire che l'efficienza di conversione del lattosio in H₂ è stata
1868 influenzata dal pH iniziale.

1869

1870 6.4. RELAZIONE TRA COMPOSIZIONE DELLA COMUNITÀ 1871 MICROBICA E PRODUZIONE DEI METABOLITI

1872

1873 Durante la DF propriamente detta assieme all'H₂ vengono prodotti, tipicamente,
1874 anche acido acetico e butirrico. La sintesi di tali acidi, infatti, è la tipica via metabolica
1875 seguita dai clostridi per produrre H₂ in DF [62, 81 e 163]. Durante la fase 2 della DF

1876 (fase di produzione esponenziale di H₂), cioè durante la proliferazione attiva dei
1877 *Clostridium*, in effetti, è stato osservato un incremento della concentrazione di acido
1878 acetico e butirrico (Fig. 23b e c). Tali acidi, inoltre, erano quelli più abbondanti sul totale
1879 di VFA prodotti. La produzione totale di acido acetico e butirrico era stata più alta ai
1880 valori di pH più bassi, mentre la concentrazione finale di etanolo è stata più elevata ai
1881 pH alcalini in accordo con quanto riportato in [28]. I livelli di acido propionico prodotti
1882 durante questo esperimento sono stati sempre molto bassi indipendentemente dal pH
1883 iniziale. La produzione di acido propionico ha conseguenze negative per la produzione
1884 di H₂ in DF, poiché la produzione di acido propionico non permette il rilascio di H₂ (cfr.
1885 eq. 1.23).

1886 Anche la produzione di acido lattico ha un effetto negativo sulla produzione di H₂
1887 (cfr. eq. 1.25). La maggior parte dell'acido lattico è stata prodotta nella fase 3 della DF
1888 cioè nella fase finale, ovvero, nella fase stazionaria della produzione di H₂, quando il pH
1889 nei vari reattori era di 4.4 (\pm 0.02) (Fig. 12a). Tale valore di pH ha favorito la
1890 proliferazione dei generi *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (Fig. 24) che producono
1891 maggiormente acido lattico, in maniera più abbondante a pH < 4.5 [164]. In questa fase,
1892 infatti, in tutti i reattori è stata osservato un incremento nella produzione di acido lattico
1893 che era praticamente scomparso alla fine della fase 1 (Fig. 24). La proliferazione attiva di
1894 *Lactobacillus* e il simultaneo arresto della produzione di H₂, d'altronde, è in accordo con
1895 quanto riferito da Etchebehere et al., [127] che hanno notato una massiccia presenza di
1896 lattobacilli nei reattori che producevano basse quantità di H₂.

1897 In sintesi i risultati dell'esperimento "C" e "D" hanno permesso di identificare 2
1898 valori di pH ugualmente fondamentali per ottimizzare la produzione di H₂. Questi due

1899 valori sono il pH iniziale 8 che ha permesso di ottenere una particolare configurazione
1900 della comunità microbica che ha permesso di produrre più H₂ (Fig. 19) e un pH
1901 “operativo” di 5.4, il cui mantenimento, permetterebbe di mantenere la configurazione
1902 più produttiva della comunità microbica evitando che la stessa degeneri quando il pH si
1903 è abbassato a valori intorno a 4 (Fig. 19) e non si è registrata più produzione di H₂,
1904 nonostante circa la metà del lattosio fosse ancora indigerita.

1905

1906 6.5. INOCULO

1907

1908 L'inoculo utilizzato era un consorzio microbico misto ottenuto da liquame suino.
1909 Nessun pretrattamento atto ad eliminare la flora microbica idrogenotrofa è stato
1910 effettuato, poiché lo scopo della ricerca era quello di ottimizzare la produzione di H₂
1911 minimizzando gli input esterni. Nonostante l'inoculo non fosse stato pretrattato, però,
1912 non si è registrata alcuna produzione di CH₄ durante la fase di DF nei vari esperimenti.
1913 Inoltre, benché siano stati utilizzati lotti diversi di inoculo, le prestazioni degli inoculi
1914 stessi, a parità di condizioni, sono state sempre molto simili. Poiché il substrato di
1915 partenza era sempre lo stesso, i risultati dei vari esperimenti possono essere messi a
1916 confronto a parità di condizioni, cioè, H₂ prodotto dopo 96 ore e a pH iniziale ottimale
1917 compreso tra 8 ed 8.7. In base a quanto appena affermato è possibile confrontare i mL
1918 di H₂ prodotti per mL di permeato. Nell'esperimento “B” a pH iniziale 8 sono stati
1919 prodotti 3.4 mL di H₂ per mL di permeato e 3.7 mL di H₂ per mL di permeato a pH 8.5,
1920 nell'esperimento “C” sono stati prodotti 3.6 mL di H₂ per mL di permeato a pH 8,
1921 nell'esperimento “F” (a pH 8.7) sono stati prodotti 3.1 e 3 mL di H₂ per mL di

1922 permeato. In conclusione, a pH compreso tra 8 e 8.7, mediamente, sono stati prodotti
1923 3.36 ± 0.3 mL di H_2 per mL di permeato. Poiché la concentrazione di lattosio della scotta
1924 è simile a quella del permeato, si può verificare che, nell'esperimento "B", dalla scotta
1925 "G" (che ha generato il permeato) è stato possibile ottenere 3.4 mL di H_2 per mL di
1926 scotta a pH 8 e 3.6 mL di H_2 per mL di scotta a pH 8.5. Questo permette di affermare
1927 che i dati ottenuti sperimentalmente sono molto riproducibili e ciò è dovuto anche
1928 all'estrema omogeneità della composizione dei vari lotti di inoculo (Tab. 2). I risultati
1929 altamente riproducibili e la bassa variabilità della composizione dei vari lotti di inoculo,
1930 uniti al fatto che la fonte di inoculo fosse stata sempre la stessa (liquame suino)
1931 suggeriscono che anche il comportamento del microbiota descritto nell'esperimento "D"
1932 si sia replicato negli altri esperimenti.

1933

1934 6.6 IMMOBILIZZAZIONE

1935

1936 Nell'esperimento "F" sono stati testati vari materiali per immobilizzare la
1937 biomassa all'interno del reattore ed evitarne il dilavamento, così da aumentare il tasso
1938 orario di produzione di H_2 . Sebbene nel primo ciclo di DF, ZE e BM avevano mostrato
1939 produzioni di H_2 simili ai reattori SB, nel secondo ciclo di DF si è assistito ad un
1940 generale abbassamento della produzione totale di H_2 nei reattori a biomassa adesa.
1941 Poiché il consumo di lattosio tra il primo e il secondo ciclo di DF è stato simile in tutti i
1942 reattori, il calo della produzione di H_2 indicava un dilavamento della biomassa idrogeno-
1943 produttrice dai vari reattori che, quindi, non ha aderito ai supporti. Guardando il profilo
1944 metabolico (Tab. 9 e 10) si può osservare che, durante il secondo ciclo di DF, nei reattori

1945 a biomassa adesa c'è stata una massiccia produzione di acido lattico (2.97 g L^{-1}), questo
1946 valore è simile a quello riportato in [165] ottenuto da biomassa adesa. Gli autori di
1947 questo lavoro hanno testato la produzione di H_2 da biomassa adesa (che ha formato un
1948 biofilm su pietre di granito) e l'hanno confrontata con la produzione di H_2 da biomassa
1949 granulare. La produzione di H_2 da biomassa granulare è stata più elevata rispetto alla
1950 produzione di H_2 da biomassa adesa. Gli autori, inoltre, riportano che la concentrazione
1951 di acido lattico, è stata pari a 2.4 g L^{-1} da biomassa adesa, mentre, tale acido non è stato
1952 rilevato dalla biomassa granulare. Nel nostro caso la concentrazione di acido lattico da
1953 SB, in entrambi i cicli di DF, è stata più bassa (0.46 g L^{-1}) della concentrazione misurata
1954 nel permeato iniziale (0.69 g L^{-1}). Nei reattori a biomassa adesa, invece, durante il primo
1955 ciclo di DF (quello più produttivo) la concentrazione media di acido lattico era di (1.03 g
1956 L^{-1}), nel secondo ciclo di DF la concentrazione di acido lattico in questi reattori è quasi
1957 triplicata. Questo risultato, insieme al calo di pH più rapido osservato in questi reattori
1958 durante il secondo ciclo di DF, fa supporre che la biomassa che ha aderito ai supporti
1959 fosse costituita da batteri lattici. Inoltre, poiché la produzione di H_2 è calata tra il primo
1960 ed il secondo ciclo di DF, si può supporre che la popolazione di clostridi non abbia
1961 aderito ai supporti e, pertanto, sia stata dilavata quando i reattori sono stati svuotati.

1962 Kumar et al. [166], d'altronde, pur riportando che l'immobilizzazione per
1963 adsorbimento è la tecnica più comunemente utilizzata, presenta un punto cruciale
1964 costituito dalla scelta dei supporti, poiché non tutti i supporti presentano le
1965 caratteristiche giuste per permettere l'adesione della biomassa, così come ogni supporto
1966 ha un certo "indice di gradimento" che varia a seconda del microorganismo. Gli stessi
1967 autori riportano che, recentemente, un amalgama di calcio-alginato e carbone attivo ha

1968 dato risultati interessanti. Un amalgama del genere, infatti, permette di contenere
1969 l'abbassamento del pH [167] che, inevitabilmente, avviene durante il corso della DF e,
1970 come ampiamente discusso in precedenza, il mantenimento del pH operativo è una
1971 condizione necessaria per portare a termine la DF con successo.

1972

1973 6.7. CO-DIGESTIONE

1974

1975 Nell'esperimento "B" è stato valutato l'effetto della co-digestione di scotta e
1976 permeato con liquame suino sulla produzione di H₂. I risultati hanno mostrato che dal
1977 liquame suino non è stato possibile ottenere H₂ e la presenza del liquame suino nella co-
1978 digestione ha avuto un effetto molto negativo sulla produzione di H₂ tanto che la
1979 produzione di H₂ dalle varie miscele è stata molto al disotto di quella attesa se
1980 confrontata con la produzione quella ottenuta da scotta e permeato in monodigestione.
1981 Guardando la Tab. 3, si può notare che nei reattori in co-digestione era stato sempre
1982 prodotto un grosso quantitativo di acido propionico, la cui concentrazione ha avuto il
1983 picco massimo (circa 29 g L⁻¹, in media) quando nella miscela era presente il 75% di
1984 liquame, mentre la concentrazione più bassa (circa 4 g L⁻¹) è stata ritrovata nei reattori in
1985 cui in miscela c'era il 25% di liquame. Quando scotta e permeato sono stati fermentati in
1986 assenza di liquame, invece, la concentrazione media di acido propionico è stata solo di
1987 0.07 g L⁻¹. Poiché la produzione di acido propionico è antagonista della produzione di H₂
1988 (cfr. eq. 1.23), l'abbondante concentrazione di acido propionico osservata in co-
1989 digestione può spiegare la bassa produzione di H₂ osservata in questi reattori.
1990 Indubbiamente il liquame suino ha indotto la produzione di acido propionico,

1991 probabilmente perché il liquame suino ha abbassato il rapporto C/N (Tab. 3).
1992 L'influenza negativa dell'azoto sulla produzione di H₂ da lattosio è stata
1993 precedentemente riportata in [66], gli autori di questo lavoro, infatti, riportano che
1994 all'aumentare della concentrazione di N nel substrato, la produzione di H₂ calava, in
1995 accordo con i risultati dell'esperimento "B".

1996

1997 7. CONCLUSIONI

1998

1999 In questo studio è stato dimostrato che è possibile recuperare le siero proteine dalla
2000 scotta mediante ultrafiltrazione e valorizzarne lo scarto per produrre un carrier
2001 energetico come l'H₂. La monodigestione del permeato, inoltre, risulta essere più
2002 redditizia (in termini di rese in H₂) rispetto alla co-digestione con liquame suino. I
2003 risultati ottenuti dimostrano che il pH è un parametro fondamentale durante la
2004 produzione di H₂ in DF. Infatti, la produzione di H₂ è avvenuta quando il pH aveva
2005 raggiunto valori poco al disotto del 6 e si è fermata quando il pH ha raggiunto valori
2006 intorno a 4, tuttavia, è stato possibile influenzare la produzione totale di H₂ manipolando
2007 il pH iniziale. In particolare, aumentando il valore del pH iniziale è stato possibile
2008 aumentare sia il tasso di produttività oraria che la produzione totale dell'H₂, questo
2009 perché la manipolazione del pH iniziale ha permesso di modificare i rapporti
2010 interspecifici della popolazione microbica coinvolta nella DF del permeato e, pertanto, è
2011 stato possibile identificare un profilo metatassonomico associato alla produzione di H₂
2012 più elevata. Tale profilo è quello che è stato ottenuto quando il valore di pH iniziale era
2013 pari ad 8 ed era costituito, oltre che da *Clostridiales*, anche da *Trichococcus*, le cui attività

2014 metaboliche, che hanno anticipato quelle dei *Clostridiales*, si sono rivelate essere
2015 propedeutiche per la successiva produzione d'idrogeno.

2016

2017 **RICONOSCIMENTI**

2018

2019 Le attività di ricerca sono state svolte presso il laboratorio del Consiglio per la
2020 ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro Zootecnia e acquacoltura,
2021 Sede di Modena, e finanziariamente supportate dal Ministero dell'Istruzione,
2022 dell'Università e della Ricerca (MIUR; CTN01_00230_450760). Il permeato è stato
2023 prodotto e fornito dal Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi dell'ENEA, Centro Ricerca
2024 Casaccia. Un ringraziamento speciale ad Anna Orsi e Lidia Sghedoni per le analisi di
2025 laboratorio e l'assistenza fornita.

2026

2027 **BIBLIOGRAFIA**

- 2028 1. Nazaroff W.W., Alvarez-Cohen L., 2001. Environmental Engineering Science. John Wiley &
2029 Sons, Inc., New York City - U.S., pp. 704.
- 2030 2. The U.S. Energy Information Administration (EIA)
2031 (<https://www.eia.gov/todayinenergy/detail.php?id=9650>) [ultimo accesso 13/12/2017]
- 2032 3. Buchner W., Schliebs R., Winter G., Buchel K.H., 1996. Chimica Inorganica Industriale. Piccin,
2033 Padua - Italy, pp. 694.
- 2034 4. Cappella P., Fedeli E., Bonaga G., Lercker G., 1997. Manuale degli oli e dei grassi. Tecniche
2035 Nuove, Milan-Italy, pp.488.
- 2036 5. DoITPoMS - University of Cambridge <https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/fuel-cells/intro.php>
2037 [ultimo accesso 13/12/2017]
- 2038 6. Riis T., Hagen E. F., Vie P.J.S., Ulleberg, Ø., 2006. Hydrogen production and storage: R&D
2039 priorities and gaps. IEA, Paris - France, pp. 33.
- 2040 7. Wang J., Yin Y., 2017. Biohydrogen Production from Organic Wastes. Springer Singapore.
- 2041 8. Das D., Veziroglu T.N., 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of
2042 literature. Int. J. Hydrogen Energy 26, 13-28.
- 2043 9. Gaffron H., Rubin J., 1942. Fermentative and photochemical production of hydrogen by algae.
2044 J. Gen. Physiol. 26, 219-240.

- 2045 10. Wykoff D.D., Davies J.P., Melis A., Grossman A.R., 1998. The regulation of photosynthetic
2046 electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol.* 117,
2047 129-139.
- 2048 11. Schnackenberg J., Schulz R., Senger H., 1993. Characterization and purification of a
2049 hydrogenase from eukaryotic green alga *Scenedesmus obliquus* FFB Lett. 327, 21-24.
- 2050 12. Greenbaum E., 1990. Hydrogen production by photosynthetic water splitting. In: Veziroglu
2051 T.N., Takashashi P.K., (Eds.). *Hydrogen energy progress VIII. Proceedings 8th WHEC,*
2052 *Hawaii. Pergamon Press, New York – U.S., pp. 743-754.*
- 2053 13. Kok B., 1953. Pilot-plant in the production of chlorella. In: Burlew J.S., (Ed.). *Algal culture:*
2054 *from laboratory to pilot plant. Washington D.C.: Carnegie Institute of Washington, pp.235-*
2055 *272.*
- 2056 14. Vyas D., Kumar H.D., 1995. Nitrogen fixation and hydrogen uptake in four cyanobacteria. *Int.*
2057 *J. Hydrogen Energy* 22, 163-168.
- 2058 15. Benemann J.R., Berenson J.A., Kaplan N.O., Kamen M.D., 1973. Hydrogen evolution by a
2059 chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 2317-2320.
- 2060 16. Thauer R.K., Jungermann K.A., Decker K., 1977. Energy conservation in chemotrophic
2061 anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180.
- 2062 17. Hallenbeck P.C., 2010. Microbial technologies in advanced biofuels production. *Biofuels* I, 129-
2063 142.
- 2064 18. Levin D.B., Azbar N., 2012. Biohydrogen in Perspective. In: Azbar, N., Levin, D.B. (Eds.),
2065 *State of the Art and Progress in Production of Biohydrogen.* Bentham eBooks, United Arab
2066 Emirates. <http://dx.doi.org/10.2174/97816080522401120101>.
- 2067 19. Claassen P.A.M., van Lier J.B., Lopez C.A.M., van Niel E. W. J., Sijtsma L., Stams A. J. M., de
2068 Vries S. S., Weusthuis R. A., 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers.
2069 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 741-755.
- 2070 20. Levin D.B., Pitt L., Love M., 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to
2071 practical application. *Int. J. Hydrogen Energy* 29, 173-185.
- 2072 21. Nandi R., Sengupta S., 1998. Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit. Rev.*
2073 *Microbiol.* 24, 61-84.
- 2074 22. Nath K., Das D., 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: various
2075 approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 520-529.
- 2076 23. Gottschalk G., 1986. *Bacterial metabolism.* 2nd ed. Springer. Berlin - Germany.
- 2077 24. Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matsui T., Nishio N., 2005. Hydrogen and ethanol
2078 production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process.
2079 *J. Biosci. Bioeng.* 100, 260-265.
- 2080 25. Chong M.L., Sabaratnam V., Shirai Y., Hassan A., 2009. Biohydrogen production from biomass
2081 and industrial wastes by dark fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 3277-3287.
2082 doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.010.
- 2083 26. McInerney M.J., Rohlin L., Mouttaki H., Kim M., Rebecca S., Krupp R.S., Rios-Hernandez L.,
2084 Sieber J., Struchtemeyer C.G., Bhattacharyya A., Campbell J.W., Gunsalus R.P., 2007. The
2085 genome of *Syntrophus aciditrophicus*: life at the thermodynamic limit of microbial growth. *Proc.*
2086 *Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7600–7605.
- 2087 27. Wang J., Wei W., 2009. Kinetic models for fermentative hydrogen production: a review. *Int. J.*
2088 *Hydrogen Energy* 34, 3313-3323.
- 2089 28. Guo X.M., Trably E., Latrille E., Carrere H., Steyer J.P., 2010. Hydrogen production from
2090 agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy.*
2091 doi:10.1016/j.ijhydene.2010.03.008.
- 2092 29. Wang J., Wan W., 2009. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int. J.*
2093 *Hydrogen Energy* 34, 799-811.
- 2094 30. Hallenbeck, P., 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis.
2095 *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 7379-7389.

- 2096 31. Hawkes F.R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R., Hawkes D.L., 2007. Continuous dark
2097 fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *Int. J.*
2098 *Hydrogen Energy* 32, 172–184.
- 2099 32. Ghimire A., Frunzo L., Pirozzi F., Trably E., Escudie R., Lens P.N.L., Esposito G., 2015. A
2100 review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process
2101 parameters and use of by-products. *Appl. Energy* 144, 73–95.
2102 doi:10.1016/j.apenergy.2015.01.045.
- 2103 33. Cheong D.Y., Hansen .C.L., 2006. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen
2104 production in cattle manure sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 635-643.
- 2105 34. Hu B., Chen S.L., 2007. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen
2106 fermentation. *Int. J Hydrogen Energy* 32, 3266-3273.
- 2107 35. Zhu H.G., Beland M., 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen
2108 producing seeds from digested wastewater sludge. *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 1980-1988.
- 2109 36. Wang J.L., Wan W., 2008. Comparison of different pretreatment methods for enriching
2110 hydrogen-producing cultures from digested sludge. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 2934-2941.
- 2111 37. Manish S., Venkatesh K.V., Banerjee R., 2007. Metabolic flux analysis of biological hydrogen
2112 production by *Escherichia coli*. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 3820-3830.
- 2113 38. Minnan L., Jinli H., Xiaobin W., Huijuan X., Jinzao C., Chuannan L., Fengzhang Z., Liangshu
2114 X., 2005. Isolation and characterization of a high H₂-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1
2115 from a hot spring. *Res. Microbiol.* 156, 76–81.
- 2116 39. Oh Y.K., Seol E.H., Kim J.R., Park S.H., 2003. Fermentative biohydrogen production by a new
2117 chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *Int. J. Hydrogen Energy* 28, 1353-1359.
- 2118 40. Chen C-C., Chuang Y-S., Lin C-Y., Lay C-H., Sen B., 2012. Thermophilic dark fermentation of
2119 untreated rice straw using mixed cultures for hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*
2120 37, 15540-15546.
- 2121 41. Fang H.H.P., Zhang T., Liu H., 2002. Microbial diversity of a mesophilic hydrogen producing
2122 sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 112-118.
- 2123 42. Shin H.S., Youn J.H., Kim S.H., 2004. Hydrogen production from food waste in anaerobic
2124 mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int. J. Hydrogen Energy* 29, 1355-1363.
- 2125 43. Girbal L., Croux C., Vasconcelos I., Soucaille P., 1995. Regulation of metabolic shifts in
2126 *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 287-297.
- 2127 44. Yokoi H., Ohkawara T., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y., 1995. Characteristic of hydrogen
2128 production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 571-574.
- 2129 45. Yokoi H., Takushige T., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y., 1998. H₂ production from starch by
2130 a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotech. Lett.* 20, 143-147.
- 2131 46. Yokoi H., Maki R., Hirose J., Hayashi S., 2002. Microbial production of hydrogen from starch-
2132 manufacturing wastes. *Biomass Bioenerg.* 22, 389-395.
- 2133 47. Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M., 2005.
2134 Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biores.*
2135 *Technol.* 96, 673-686.
- 2136 48. Taguchi F., Yamada K., Hasegawa K., Taki-Saito T., Hara K., 1996. Continuous hydrogen
2137 production by *Clostridium* sp. strain no 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two phase
2138 system. *J. Ferment. Bioeng.* 82, 80-83.
- 2139 49. Levin D.B., Islam R., Cicek N., Sparling R., 2006. Hydrogen production by *Clostridium*
2140 *thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 1496-1503.
- 2141 50. Liu H., Zhang T., Fang H.P.P., 2003. Thermophilic H₂ production from cellulose containing
2142 wastewater. *Biotechnol. Lett.* 25, 365-369.
- 2143 51. Lay J.J., 2001. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline
2144 cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 74, 280-287.
- 2145 52. Fan Y.T., Zhang G.S., Guo X.Y., Xing Y., Fan M.H., 2006. Biohydrogen production from beer
2146 lees biomass by cow dung compost. *Biomass. Bioenergy* 30, 493-496.

- 2147 53. Fan Y.T., Zhang Y.H., Zhang S.F., Hou H.W., Ren B.Z., 2006. Efficient conversion of wheat
2148 straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Biores. Technol.* 97, 500-505.
- 2149 54. Zhang M.L., Fan Y.T., Xing Y., Pan C.M., Zhang G.S., Lay J.J., 2007. Enhanced biohydrogen
2150 production from corn stalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic
2151 culture. *Biomass Bioenergy* 31, 250-254.
- 2152 55. Ferchichi M., Crabbe E., Gil G.H., Hintz W., Almadidy A., 2005. Influence of initial pH on
2153 hydrogen production from cheese whey. *J. Biotech.* 120, 402-409.
- 2154 56. Davila-Vazquez G., Alatríste-Mondragón F., de León-Rodríguez A., Razo-Flores E., 2008.
2155 Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and
2156 glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *Int. J. Hydrogen Energy* 33,
2157 4989-4997. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.06.065.
- 2158 57. Azbar N., Dokgoz F.T., Keskin T., Eltem R., Korkmaz K.S., Gezgin Y., Akbal Z., Öncel S.,
2159 Dalay M. C., Gönen Ç., Tutuk F., 2009. Comparative evaluation of bio-hydrogen production
2160 from cheese whey wastewater under thermophilic and mesophilic anaerobic conditions. *Int. J.*
2161 *Green Energy* 6, 192-200.
- 2162 58. Azbar N., Dokgöz Çetinkaya F.T., Keskin T., Korkmaz K.S., Syed H.M., 2009. Continuous
2163 fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic
2164 anaerobic conditions. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 7441-7447.
- 2165 59. Castelló E., García y Santos C., Iglesias T., Paolino G., Wenzel J., Borzacconi L., Etchebehere
2166 C., 2009. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor:
2167 links between microbial community and reactor performance. *Int. J. Hydrogen Energy* 34,
2168 5674-5682.
- 2169 60. Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C.B., Rosales-Colunga, L.M., de León-Rodríguez, A., Razo-
2170 Flores, E., 2009. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the
2171 hydrogen production rate. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 4296-4304.
2172 doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.063.
- 2173 61. Napoli F., Olivieri G., Russo M.E., Marzocchella A., Salatino P., 2012. Continuous lactose
2174 fermentation by *Clostridium acetobutylicum*-Assessment of energetics and product yields of the
2175 acidogenesis. *Enzyme and Microbial Technol.* 50, 165-172.
- 2176 62. Perna V., Castelló E., Wenzel J., Zampol C., Fontes Lima D.M., Borzacconi L., Varesche M.B.,
2177 Zaiat M., Etchebehere C., 2013. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed
2178 reactor used to treat cheese whey. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 54-62.
- 2179 63. Rosales-Colunga L.M., Alvarado-Cuevas Z.D., Razo-Flores E., De León Rodríguez A., 2013.
2180 Maximizing Hydrogen Production and Substrate Consumption by *Escherichia coli* WDHL in
2181 Cheese Whey Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*,171, 704-715.
- 2182 64. De Giannis G., Friargiu M., Massi E., Muntoni A., Poletini A., Pomi R., Spiga D.,
2183 2014. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *Int.*
2184 *J. Hydrogen Energy* 39, 20930-20941.
- 2185 65. Romão B.B., Batista F.R.X., Ferreira J.S., Costa H.C.B., Resende M.M., Cardoso, V.L., 2014.
2186 Biohydrogen production through dark fermentation by a microbial consortium using whey
2187 permeate as substrate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 3670-3685. doi:10.1007/s12010-014-
2188 0778-5.
- 2189 66. Moreno R., Fierro J., Fernández C., Cuetos M.J., Gómez X., 2015. Biohydrogen production
2190 from lactose: influence of substrate and nitrogen concentration. *Environ. Technol.* 36, 2401-
2191 2409. DOI:10.1080/09593330.2015.1032365.
- 2192 67. Ren N.Q., Li J.Z., Li B.K., Wang Y., Liu S.R., 2006. Biohydrogen production from molasses by
2193 anaerobic fermentation with a pilot scale bioreactor system. *Int. J. Hydrogen Energy* 31,
2194 2147-2157.
- 2195 68. Zhang T., Liu H., Fang H.H.P., 2003. Biohydrogen production from starch in wastewater under
2196 thermophilic condition. *J. Environ. Mang.* 69, 149-156.
- 2197 69. Van Ginkel S.W., Oh S.E., Logan B.E., 2005. Biohydrogen gas production from food
2198 processing and domestic wastewaters. *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 1535-1542.

- 2199 70. Fang H.H.P., Li C., Zhang T., 2006. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. Int.
2200 J. Hydrogen Energy 31, 683-692.
- 2201 71. Kim S.H., Han S.K., Shin H.S., 2004. Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-
2202 digestion of food waste and sewage sludge. Int. J. Hydrogen Energy 29, 1607-1616.
- 2203 72. Pan J., Zhang R., El-Mashad H.M., Sun H., Ying Y., 2008. Effect of food to microorganism
2204 ratio on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation. Int. J.
2205 Hydrogen Energy 33, 6968-6975.
- 2206 73. Kim D.H., Kim S.H., Jung K.W., Kim M.S., Shin H.S., 2011. Effect of initial pH independent
2207 of operational pH on hydrogen fermentation of food waste. Bioresour. Technol. 102, 8646-
2208 8652. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.030>.
- 2209 74. Dabrock B., Bahl H., Gottschalk G., 1992. Parameters affecting solvent production by
2210 *Clostridium pasteurianum*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1233-1239.
- 2211 75. Luo G., Xie L., Zou Z., Zhou Q., Wang J.Y., 2010. Fermentative hydrogen production from
2212 cassava stillage by mixed anaerobic microflora: effects of temperature and pH. Appl. Energy
2213 87, 3710-3717.
- 2214 76. Wu X., Yao W., Zhu J., 2010. Effect of pH on continuous biohydrogen production from liquid
2215 swine manure with glucose supplement using an anaerobic sequencing batch reactor. Int. J.
2216 Hydrogen Energy 35, 6592-6599.
- 2217 77. De Gioannis G., Muntoni A., Poletti A., Pomi R., 2013. A review of dark fermentative
2218 hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. Waste Management 33,
2219 1345-1361.
- 2220 78. Lee Y.J., Miyahara K., Noike T., 2002. Effect of pH on microbial hydrogen fermentation. J.
2221 Chem. Technol. Biotechnol. 77, 694-698.
- 2222 79. Rechtenbach D., Meyer M., Stegmann R., 2008. (Dis-) continuous production of biohydrogen
2223 and biomethane from raw and waste materials by fermentation. In: Proceedings of Venice
2224 2008. Second International Symposium on Energy from Biomass and Waste, Venice (I), 17-
2225 20 November 2008 (manuscript on CD ROM, 10 pp.).
- 2226 80. Rechtenbach D., Stegmann R., 2009. Combined bio-hydrogen and methane production. In:
2227 Proceedings of Sardinia 2009 Twelfth International Waste Management and Landfill
2228 Symposium, S. Margherita di Pula (I), 5-9 October 2009, pp. 79-80 (manuscript on CD
2229 ROM, 11 pp.).
- 2230 81. Khanal S.K., Chen W.H., Li L., Sung S., 2004. Biological hydrogen production: effects of pH
2231 and intermediate products. Int. J. Hydrogen Energy 29, 1123-1131.
- 2232 82. Valdez-Vazquez I., Poggi-Varaldo H., 2009. Alkalinity and high total solids affecting H₂
2233 production from organic solid waste by anaerobic consortia. Int. J. Hydrogen Energy 34,
2234 3639-3646.
- 2235 83. Van Ginkel S., Sung S.W., Lay J.J., 2001. Biohydrogen production as a function of pH and
2236 substrate concentration. Environ. Sci. Technol. 35, 4726-4730.
- 2237 84. Hafez H., Nakhla G., El Naggat H., 2012. Biological hydrogen production. In: Sherif SA,
2238 editor. Handbook of hydrogen energy. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis.
- 2239 85. Sinha P., Pandey A., 2011. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen
2240 production. Int. J. Hydrogen Energy 36, 7460-7478.
- 2241 86. Elsharnouby O., Hafez H., Nakhla G., El Naggat M. H., 2013. A critical literature review on
2242 biohydrogen production by pure cultures. Int. J. Hydrogen Energy 38, 4945-4966.
- 2243 87. Lee K.S., Lin P.J., Chang J.S., 2006. Temperature effects on biohydrogen production in a
2244 granular sludge bed induced by activated carbon carriers. Int. J. Hydrogen Energy 31, 465-
2245 472.
- 2246 88. Bastidas-Oyanedel J-R., Mohd-Zaki Z., Zeng R.J., Bernet N., Pratt S., Steyer J-P., Damien
2247 JohnBatstone D.J., 2012. Gas controlled hydrogen fermentation. Bioresour. Technol. 110,
2248 503-509.
- 2249 89. Mandal B., Nath K., Das D., 2006. Improvement of biohydrogen production under decreased
2250 partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*. Biotechnol. Lett. 28, 831-835.

- 2251 90. Mizuno O., Dinsdale R., Hawkes F.R., Hawkes D.L., Noike T., 2000. Enhancement of
2252 hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Biores. Technol.* 73, 59-65.
- 2253 91. Tanisho S., Kuromoto M., Kadokura N., 1998. Effect of CO₂ removal on hydrogen production
2254 by fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* 23, 559-563.
- 2255 92. Lay J.J., 2000. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge concerting starch to
2256 hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.* 68, 269-278.
- 2257 93. Bisailon A., Turcot J., Hallenbeck P.C., 2006. The effect of nutrient limitation on hydrogen
2258 production by batch cultures of *Escherichia coli*. *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 1504-1508.
- 2259 94. Salerno M.B., Park W., Zuo Y., Logan B.E., 2006. Inhibition of biohydrogen production by
2260 ammonia. *Water Res.* 40, 11671172.
- 2261 95. Lay J.J., Fan K.S., Hwang J.I., Chang J.I., Hsu P.C., 2005. Factors affecting hydrogen
2262 production from food wastes by Clostridium-rich composts. *J. Environ. Eng.* 131, 595-602.
- 2263 96. Argun H., Kargi F., Kapdan I.K., Oztekin R., 2008. Biohydrogen production by dark
2264 fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and
2265 formation rate. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 1813-1819.
- 2266 97. O-Thong S., Prasertsan P., Intrasungkha N., Dhamwichukorn S., Birkeland N.K., 2008.
2267 Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD
2268 reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge. *Int. J. Hydrogen
2269 Energy* 33, 1221-1231.
- 2270 98. Li C.L., Fang H.H.P., 2007. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid
2271 wastes by mixed cultures. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 37 1–39.
- 2272 99. Lin C.Y., Lay C.H., 2005. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using
2273 anaerobic sewage sludge microflora. *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 285-292.
- 2274 100. Voet D., Voet J.G., Pratt C.W., 1999. *Fundamentals of biochemistry*. US: John Wiley; p. 382.
- 2275 101. Liu G.Z., Shen J.Q., 2004. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production
2276 from starch using anaerobic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 251-256.
- 2277 102. Zhang Y.F., Liu G.Z., Shen J.Q., 2005. Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria
2278 with sucrose under different iron concentrations. *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 855-860.
- 2279 103. Lee Y.J., Miyahara T., Noike T., 2001. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation.
2280 *Biores. Technol.* 80, 227-231.
- 2281 104. Show K., Zhang Z., Tay J., Tee D., Lee D., Ren N., Wang A. 2010, . Critical assessment of
2282 anaerobic processes for continuous biohydrogen production from organic wastewater. *Int. J.
2283 Hydrogen Energy* 35, 13350-13355.
- 2284 105. Show K., Lee D., Chang J., 2011. Bioreactor and process design for biohydrogen production.
2285 *Bioresour. Technol.* 102, 8524-8533.
- 2286 106. Zhang Z., Show K., Tay J., Liang D., Lee D., 2008. Biohydrogen production with anaerobic
2287 fluidized bed reactors- a comparison of biofilm-based and granule-based systems. *Int. J.
2288 Hydrogen Energy* 33, 1559-1564.
- 2289 107. Motte J-C., Trably E., Escudié R., Hamelin J., Steyer J-P., Bernet N., Delgenes J-P., Dumas C.,
2290 2013. Total solids content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion.
2291 *Biotechnol. Biofuels* 6, 164.
- 2292 108. Motte J-C., Trably E., Hamelin J., Escudié R., Bonnafous A., Steyer J-P., Bernet N., Delgenès J-
2293 P., Dumas C., 2014. Total solid content drives hydrogen production through microbial selection
2294 during thermophilic fermentation. *Bioresour. Technol.* 166, 610-615.
- 2295 109. Robledo-Narváez P.N., Muñoz-Páez K.M., Poggi-Varaldo H.M., Ríos-Leal E., Calva-Calva G.,
2296 Ortega-Clemente L.A., Rinderknecht-Seijas N., Estrada-Vázquez C., Ponce-Noyola M.T.,
2297 Salazar-Montoya J.A., 2013. The influence of total solids content and initial pH on batch
2298 biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes. *J. Environ.
2299 Manage.* 128, 126-137.
- 2300 110. Gavala H., Skiadas I., Ahring B., 2006. Biological hydrogen production in suspended and
2301 attached growth anaerobic reactor systems. *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 1164-1175.

- 2302 111. Wang X., Zhao Y., 2009. A bench scale study of fermentative hydrogen and methane
2303 production from food waste in integrated two-stage process. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 245-
2304 254.
- 2305 112. Alais C., 2000. *Scienza del latte. Tecniche nuove.* Milan - Italy, pp. 780.
- 2306 113. Malaspina F., Cellamare C.M., Stante L., Tilche A., 1996. Anaerobic treatment of cheese whey
2307 with a downflow-upflow hybrid reactor. *Bioresour. Technol.* 55, 131-139.
- 2308 114. Siso M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour.*
2309 *Technol.* 57, 1-11.
- 2310 115. Venetsaneas N., Antonopoulou G., Stamatelatos K., Kornaros M., Lyberatos G., 2009. Using
2311 cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with
2312 alternative pH controlling approaches. *Bioresour. Technol.* 100, 3713-3717.
- 2313 116. Prazeres A.R., Carvalho F., Rivas J., 2012. Cheese whey management: a review. *J. Environ.*
2314 *Manag.* 110, 48-68.
- 2315 117. Mollea C., Marmo L., Bosco F., 2013. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy
2316 industry, in: Muzzalupo I. (Ed.), *Food Industry. Agricultural and Biological Sciences Series.*
2317 *InTech.* Croatia, UE, pp. 549-588. doi:10.5772/53159.
- 2318 118. Sansonetti S., Curcio S., Calabrò V., Iorio G., 2009. Bio-ethanol production by fermentation of
2319 ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and Bioenergy* 33,
2320 1687-1692. doi:10.1016/j.biombioe.2009.09.002.
- 2321 119. Hinkova A., Zidova P., Pour V., Bubnik Z., Henke S., Salova A., Kadlec P., 2012. Potential of
2322 membrane separation processes in cheese whey fractionation and separation, in: *Procedia*
2323 *Engineering.* pp. 1425-1436. doi:10.1016/j.proeng.2012.07.536.
- 2324 120. Feng G.L., Letey J., Chang A.C., Campbell Mathews M., 2005. Simulating dairy liquid waste
2325 management options as a nitrogen source for crops. *Agri. Ecosys. Environ.* 110, 219-229.
- 2326 121. Nath A., Dixit M., Bandiya A., Chavda S., Desai A.J., 2008. Enhanced PHB production and
2327 scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Biores.*
2328 *Technol.* 99, 5749-5755.
- 2329 122. Tolvanen K.E.S., Karp M.T., 2011. Molecular methods for characterizing mixed microbial
2330 communities in hydrogen-fermenting systems. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 5280-5288.
- 2331 123. De Vrieze J., Saunders A. M., He Y., Fang J., Nielsen P. H., Verstraete W., Boon N., 2015.
2332 Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion
2333 microbiome. *Water Research* 75, 312-323.
- 2334 124. Werner J.J., Knights D., Garcia M.L., Scalfone N.B., Smith S., Yarasheski K., Cummings T.A.,
2335 Beers A.R., Knight R., Angenenta L.T., 2011. Bacterial community structures are unique and
2336 resilient in full-scale bioenergy systems. In: Pace, N. R. (Ed.) *Proceedings of the National*
2337 *Academy of Sciences of the United States of America.* pp. 4158-4163.
- 2338 125. Ferraz J.A.D., Etchebehere C., Zaiat M., 2015. High organic loading rate on thermophilic
2339 hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a
2340 residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. *Bioresour. Technol.* 186, 81-88
- 2341 126. Laothanachareon T., Kanchanasuta S., Mhuanthong W., Phalakornkule C., Pisutpaisal N.,
2342 Champreda V., 2014. Analysis of microbial community adaptation in mesophilic hydrogen
2343 fermentation from food waste by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *J. Environ. Manage.*
2344 144, 143 -151.
- 2345 127. Etchebehere C., Castelló E., Wenzel J., del Pilar Anzola-Rojas M., Borzacconi L., Buitrón G.,
2346 Cabrol L., Carminato V.M., Carrillo-Reyes J., Cisneros-Pérez C., Fuentes L., Moreno-Andrade
2347 I., Razo-Flores E., Ruiz Filippi G., Tapia-Venegas E., Toledo-Alarcón J., Zaiat M., 2016.
2348 Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454
2349 pyrosequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3371-3384.
- 2350 128. Vasmara C., Cianchetta S., Marchetti R., Galletti S., 2015. Biogas production from wheat straw
2351 pre-treated with ligninolytic fungi and co-digestion with pig slurry. *Environ. Eng. Manag. J.* 14,
2352 1751-1760. 107.

- 2353 129. Owen W.F., Stuckey D.C., Healy J.B., Young L.Y., McCarty P.L., 1979. Bioassay for monitoring
2354 biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485–492.
2355 doi:10.1016/0043-1354(79)90043-5.
- 2356 130. Vasmara C., Marchetti R., 2016. Biogas production from biodegradable bioplastics. *Environ.*
2357 *Eng. Manag. J.* 15, 2041–2048.
- 2358 131. APHA, 1992. American Public Health Association (APHA) method 9221: Standard methods
2359 for the examination of water and wastewater, Standard Methods.
- 2360 132. Handajani M., 2004. Degradation of whey in an anaerobic fixed bed (AnFB) reactor. Thesis,
2361 Universität Karlsruhe, Faculty of Civil Engineering, Geo- and Environmental Sciences.
- 2362 133. Malaspina F., Cellamare C. M., Stante L., Bortone G., Tilche A., 2000. Gaschromatographic
2363 determination of volatile fatty acids produced by anaerobic digestion. *Inquinamento* 20, 58-64.
- 2364 134. Littell R.C., Milliken G.A., Stroup W.W., Wolfinger R.D., 1996. SAS system for mixed models,
2365 SAS System for Mixed Models. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- 2366 135. McMurdie P.J., Holmes S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis
2367 and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8 e61217.
2368 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- 2369 136. Hamady M., Lozupone C., Knight R., 2010. Fast UniFrac: facilitating high-throughput
2370 phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and
2371 PhyloChip data. *ISME J.* 4, 17-27.
- 2372 137. Salmaso N., Albanese D., Capelli C., Boscaini A., Pindo M., Donati C., 2017. Diversity and
2373 cyclical seasonal transitions in the bacterial community in a large and deep perialpine lake.
2374 *Microb. Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1120-x>
- 2375 138. Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C. A., Turnbaugh P.J.
2376 Fierer N., Knight R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of
2377 sequences per sample. In: Gordon, J. I. (ed.), *Proceedings of the National Academy of Sciences*
2378 of the United States of America. pp. 4516-4522.
- 2379 139. Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., Weber, L., 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA
2380 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*
2381 75, 129-137.
- 2382 140. Albanese D., Fontana P., De Filippo C., Cavalieri D., Donati C., 2015. MICCA: a complete and
2383 accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. *Sci.Rep.* 5, 9743.
- 2384 141. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid
2385 assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73,
2386 5261-5267.
- 2387 142. McMurdie P.J., Holmes S., 2013. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis
2388 and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8, e61217.
- 2389 143. Schloss P.D., Handelsman J. 2007. The last word: books as a statistical metaphor for microbial
2390 communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 23-34.
- 2391 144. Shannon C., 1984. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 27, 379-423.
- 2392 145. Alberini A., 2013. Production of bio-hydrogen in dark fermentation from agro-food industry
2393 wastes using hyperthermophilic bacteria. Thesis, Alma Mater Studiorum – Università di
2394 Bologna, PhD school of Biological, biomedical and biotechnological sciences.
2395 <http://amsdottorato.unibo.it/5388/>
- 2396 146. Montalvo S., Guerrero L., Borja R., Sánchez E., Milán Z., Cortés I., de la la Rubia M. A., 2012.
2397 Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. *Appl. Clay Sci.* 58,
2398 125-133.
- 2399 147. Marchetti R., Castelli F., 2013. Biochar from Swine solids and digestate influence nutrient
2400 dynamics and carbon dioxide release in soil. *J. Environ. Qual.* 42, 893-901.
- 2401 148. Vasmara C., Marchetti R., 2017. Initial pH influences in-batch hydrogen production from scotta
2402 permeate. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 14400-14408.

- 2403 149. Azbar N., Dokgöz Çetinkaya F.T., Peker Z., 2009. Optimization of basal medium for
2404 fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater. *Int. J. Green Energy* 6, 371-
2405 380.
- 2406 150. Ferchichi M., Crabbe E., Hintz W., Gil G.H., Almadidy A., 2005. Influence of culture
2407 parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC
2408 27021. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 855–862. doi:10.1007/s11274-004-5972-0.
- 2409 151. Junghare M., Subudhi S., Sharma P. M., Mandal A. K., L.B., 2012. Mesophilic hydrogen
2410 production by *Clostridium butyricum* strain TM-9A, an alkaline-tolerant dark fermentative
2411 bacterium. *Dyn. Biochem. Process Biotechnol. Mol. Biol.* 6, 32–37.
- 2412 152. Fang H.H.P., Liu H., 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed
2413 culture. *Bioresour. Technol.* 82, 87–93. doi:10.1016/S0960-8524(01)00110-9.
- 2414 153. Wongthanate J., Chinnacotpong K., Khumpong M., 2014. Impacts of pH, temperature and
2415 pretreatment method on biohydrogen production from organic wastes by sewage microflora.
2416 *Int. J. Energy Environ. Eng.* 5, 1–6. doi:10.1007/s40095-014-0076-6.
- 2417 154. van Gelder A.H., Aydin R., Alves M.M., Stams A.J., 2013. 1,3-Propanediol production from
2418 glycerol by a newly isolated *Trichococcus* strain. *Microb. Biotechnol.* 5, 573-578.
- 2419 155. Liu J.R., Tanner R.S., Schumann P., Weiss N., McKenzie C.A., Janssen P.H., Seviour E.M.,
2420 Lawson P.A., Allen T.D., Seviour R.J., 2002. Emended description of the genus *Trichococcus*,
2421 description of *Trichococcus collinsii* sp. nov., and reclassification of *Lactosphaera pasteurii* as
2422 *Trichococcus pasteurii* comb. nov. and of *Ruminococcus palustris* as *Trichococcus palustris* comb. nov. in
2423 the low-G+C gram-positive bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1113-1126.
- 2424 156. Scheff G., Salcher O., Lingens F., 1984. *Trichococcus flocculiformis* gen. nov. sp. nov. A new gram-
2425 positive filamentous bacterium isolated from bulking sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19,
2426 114-119.
- 2427 157. Strepis N., Sánchez-Andrea I., van Gelder A.H., van Kruistum H., Shapiro N., Kyrpides N.,
2428 Göker M., Klenk H.P., Schaap P., Stams A.J., Sousa D.Z., 2016. Description of *Trichococcus ihys*
2429 sp. nov. by combined physiological and in *silico* genome hybridization analyses. *Int. J. Syst. Evol.*
2430 *Microbiol.* 66, 3957-3963.
- 2431 158. Wiegel J., Tanner R., Rainey F.A., 2006. An Introduction to the Family *Clostridiaceae*. In: *The*
2432 *Prokaryotes*. New York: Springer US, pp. 654-678.
- 2433 159. Noike T., Takabatake H., Mizuno O., Ohba M., 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of
2434 organic wastes by lactic acid bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1367-1371.
- 2435 160. Sreela-or C., Imai T., Plangklang P., Reungsang A., 2011. Optimization of key factors affecting
2436 hydrogen production from food waste by anaerobic mixed cultures *Int. J. Hydrogen Energy* 36,
2437 14120-14133.
- 2438 161. Dickson R.C., Dickson L.R., Markin J.S., 1979. Purification and properties of an inducible beta-
2439 galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 137, 51-61.
- 2440 162. Rajakala P., Karthigai Selvi P., 2006. The effect of pH, temperature and alkali metal ions on the
2441 hydrolysis of whey lactose catalysed by b-Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. *Int. J. Dairy*
2442 *Sci.* 1, 167-172. <http://dx.doi.org/10.3923/ijds.2006.167.172>
- 2443 163. Lin P.-Y., Whang L.-M., Wu Y.-R., Ren W.-J., Hsiao C.-J., Li S.-L., Chang, J.-S., 2007. Biological
2444 hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model
2445 simulation. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 1728-1735.
- 2446 164. Chramostova J., Mosnova R., Lisova I., Pesek E., Drbohlav J., Nemeckova I., 2014. Influence
2447 of cultivation conditions on the growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., and
2448 *Streptococcus thermophilus*, and on the production of organic acids in fermented milks. *Czech J.*
2449 *Food Sci.* 32, 422-429.
- 2450 165. Chojnacka A., Błaszczak M.K., Szczesny P., Nowak K., Sumińska M., Tomczyk-Żak K.,
2451 Zielenkiewicz U., Sikora A., 2011. Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial
2452 biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. *Bioresour.*
2453 *Technol.* 102, 10057-10064.

- 2454 166. Kumar G., Mudhoo A., Sivagurunathan P., Nagarajan D., Ghimire A., Lay C.-H., Lin C.-Y., Lee
2455 D.-J., Chang J.-S., 2016. Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark
2456 fermentative hydrogen production. *Bioresour. Technol.* 219, 725-737, ISSN 0960-8524,
2457 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.065>.
- 2458 167. Penniston J., Gueguim Kana E. B., 2017. Impact of medium pH regulation on biohydrogen
2459 production in dark fermentation process using suspended and immobilized microbial cells.
2460 *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, DOI: 10.1080/13102818.2017.1408430.