

LA VITA SEGRETA DEI GIARDINI DI POMONA

Angela de Gennaro
Maria Franca Rubino

Classe 5^A Biotecnologie Ambientali A. S. 2023/2024



PREFAZIONE

L'anno scolastico 2023-2024 rappresenta una tappa fondamentale nella storia dell'Istituto che dirigo da circa un decennio, infatti l'IISS "Galileo Ferraris" si appresta a celebrare il 50° anniversario della sua istituzione.

In questi anni l'Istituto è stato in continuo "dialogo" con il territorio e le Istituzioni locali e non.

Ne sono scaturite importanti esperienze, anche in ambito internazionale, che hanno arricchito la formazione degli studenti e indotto i docenti a misurarsi con determinazione, coraggio ed entusiasmo in progetti di didattica innovativa che li stimolano ad oltrepassare i limiti delle competenze maturate nel corso della propria carriera scolastica.

Ne risulta la tendenza a voler caratterizzare l'Istituto non solo per la varietà dell'offerta formativa, ma anche per la capacità di produrre nuove conoscenze.

È proprio il caso del lavoro scientifico che sto presentando in questa prefazione, realizzato in seguito ad un sodalizio scientifico nato tre anni fa con il Conservatorio botanico "I Giardini di Pomona", fondato dal Dr. Paolo Belloni e sito in Contrada Figazzano a Cisternino (BR), su iniziativa delle docenti Angela de Gennaro e Maria Franca Rubino.

La classe coinvolta nell'A.S. 2021-2022 era la 3^A del Settore Biotecnologie Ambientali che nel corso del triennio seguente ha condotto un lavoro di ricerca concernente la Microbiologia ambientale relativa a questo sito di importanza internazionale per la notevole biodiversità custodita, in particolare per le numerose specie di *Ficus carica* e *Punica granatum*.

Nel corso del triennio di studi, i maturandi dell'A.S. 2023-2024 hanno accumulato un bagaglio di conoscenze, abilità e competenze in ambito microbiologico con la progettazione e messa in opera di una vera e propria "fabbrica di batteri", rivisitando in chiave moderna una famosa ed antica metodica che si può considerare la base su cui si fonda tutta la Microbiologia ambientale.

La considerazione che la maggior parte dei microrganismi sulla Terra sono considerati *incoltivabili*, cioè che non possono essere isolati con le tecniche classiche, ha indotto le docenti citate a riprodurre in colonne di vetro condizioni che imitano molto fedelmente l'habitat naturale in cui si trovano i microrganismi e consentono di farli crescere in laboratorio.

Il risultato straordinario è consistito nel rendere visibile ciò che gli occhi non vedono, con le specie batteriche che nel corso degli anni hanno dato origine ad un vero e proprio ecosistema con una comunità microbica di cui sono stati chiariti la sequenza ed i ruoli dei microrganismi.

Questa antica, ma ancora valida, tecnica colturale ha consentito di studiare un numero più ampio di specie microbiche e comprendere il loro ruolo e la loro importanza per i cicli biogeochimici del pianeta Terra senza necessariamente doverli coltivare in isolamento.

Nel lavoro si è data rilevanza ad alcune specie vegetali custodite presso il Conservatorio botanico che presentano caratteristiche peculiari come quella di fissare nel terreno grandi quantità di azoto, fungendo da fertilizzanti naturali ed anche di fissare enormi quantità di anidride carbonica atmosferica contrastando la crescente concentrazione di questo gas climalterante.

Inoltre si è posta l'attenzione su specie che possono fungere contemporaneamente da fitodepuratori, possono essere impiegate nella bioremediation da metalli pesanti, pesticidi e insetticidi, possono assorbire il litio diventando una miniera a cielo aperto da cui attingere questo *critical raw material* alla base di tutta la tecnologia finalizzata alla transizione energetica.

In seguito alla individuazione delle specie microbiche è emerso che alcune di queste possono essere impiegate nella produzione di bioidrogeno, i cui processi di produzione sono descritti in dettaglio.



Infine le docenti hanno indotto la formazione di biofilm batterici su substrati in materiale plastico che provengono da materiali di scarto, al fine di mimare le condizioni di esercizio di un'impianto di depurazione delle acque innovativo che costituisce un esempio concreto di economia circolare.

Sono comprensibilmente orgoglioso di aver promosso l'istituzione del settore Biotecnologie Ambientali, che ha preso le mosse nell'A.S. 2017-2018, e nel corso degli anni si è distinto anche per la partecipazione, con esiti vincenti nel 2022, a contest nazionali come il "Mad for Science", indetto annualmente dalla multinazionale farmaceutica DiaSorin.

Ringrazio le docenti Angela de Gennaro e Maria Franca Rubino per l'impegno profuso in questa originale avventura di ricerca, scoperta e condivisione del loro lavoro con la comunità scolastica ed il territorio, ed in particolare il Dr. Paolo Belloni per aver accettato da subito, con entusiasmo e con generoso spirito di accoglienza, la proposta di collaborazione scientifica con la nostra realtà scolastica.

IL DIRIGENTE SCOLASTICO

Prof. Luigi Melpignano

INTRODUZIONE

LA LEZIONE DEL METODO SCIENTIFICO NELL'EPOCA DELL'INFORMAZIONE E DELLA CONOSCENZA

Il metodo scientifico è ormai patrimonio comune dell'umanità.

Oggi infatti chiamiamo “scientifica” un'affermazione che è possibile sperimentare e ripetere tramite esperimenti in laboratorio.

Sperimentare e ripetere, ottenendo determinati risultati, costituisce la prova che un certo fenomeno avviene proprio in un certo modo che era stato ipotizzato.

Allargando lo sguardo aldilà della comunità scientifica, questo metodo conduce alla formazione dello spirito critico, ossia un modo di porsi nei confronti della realtà: apprenderlo nel corso del curriculum scolastico costruisce la mentalità dei discenti nonché il loro approccio al sapere.

Lo spirito critico insegna, per esempio, la necessità di procurarci una conoscenza precisa e rigorosa dei fatti su cui si fondano le nostre idee e convinzioni; inoltre insegna a valutare, alla luce di questo stesso rigore, le idee, le informazioni, gli argomenti dei nostri interlocutori, siano amici con cui si sta discutendo, giornalisti di cui si legge un articolo, perfetti sconosciuti di cui si leggono fiumi di post sui social.

LO SVILUPPO DELLE COMUNITÀ BATTERICHE ALL'INTERNO DELLE COLONNE DI VINOGRADSKIJ

Nel corso della visita didattica di Venerdì 19 Novembre 2021 presso il Conservatorio Botanico denominato "I Giardini di Pomona" sito in Contrada Figazzano, 114 Cisternino 72014 (Brindisi), gli studenti dell'allora classe 3[^] A dell'Indirizzo Biotecnologie Ambientali dell'IISS "Galileo Ferraris" di Molfetta, attuale classe 5[^] A, raccolsero due distinte aliquote di materiale necessario alla realizzazione delle colonne di Vinogradskij.

Come dichiarato al termine del primo Report prodotto sull'attività svolta per l'allestimento delle colonne di Vinogradskij, pubblicato nella sezione **COLLABORAZIONI**, e tuttora consultabile sul sito:

<https://www.igiardinidipomona.it>

a distanza di circa due anni, con il presente secondo Report si intende trasmettere la documentazione relativa agli stadi di avanzamento della procedura sperimentale in corso che, come è noto, richiede tempi dilatati, al fine di verificare i risultati di tale metodologia di coltura microbica.

L'OBIETTIVO prefissato consisteva nel dimostrare la presenza e il comportamento di diverse specie batteriche nel suolo de "I Giardini di Pomona" e pertanto era necessario inizialmente creare un ecosistema, tema oggetto del primo Report, e in seguito identificare la comunità microbica e chiarire la sequenza e i ruoli dei microrganismi, temi questi ultimi che costituiscono l'oggetto del presente secondo Report.

OSSERVAZIONI SPERIMENTALI

L'esperimento è stato condotto in duplicato allestendo due colonne identiche, assemblate con le medesime quantità e tipologie di materiali, e collocate nel medesimo ambiente confinato, al riparo da vibrazioni e manomissioni causate dalla intrusione di individui non autorizzati all'accesso, e con illuminazione indiretta proveniente da una finestra sovrastante le colonne nel corso della mattinata.

L'esposizione indiretta delle colonne alla luce del sole per circa due anni ha prodotto al loro interno un gradiente di aerobiosi/anaerobiosi e un gradiente di concentrazione di zolfo.

Questi due gradienti causano la crescita di una notevole diversità di microrganismi come *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Rhodomicrobium*, *Beggiatoa*, molte altre specie batteriche, cianobatteri e alghe.

Nelle colonne si sono formati numerosi gradienti di concentrazione, in conseguenza e a seconda delle sostanze nutritive aggiunte, che favoriscono la crescita di una ricca varietà di microrganismi.

Le fasi principali nelle colonne sono due: la fase aerobica costituita da acqua e terreno e la fase anaerobica costituita dal fondo sottostante la cenere lavica del Vesuvio.

A causa della bassa solubilità dell'ossigeno in acqua quest'ultima è diventata rapidamente anossica all'interfase fra acqua e terreno.



FOTO 1: Interfase acqua/terreno con sviluppo di alghe verdi e cianobatteri fotosintetici di colore verde e rosso-marrone che producono ossigeno la cui concentrazione diminuisce progressivamente al di sotto dell'interfase.



Le due colonne hanno presentato uno sviluppo delle comunità microbiche differente l'una dall'altra, con una che mostrava una progressiva differenziazione degli strati, mentre l'altra, pur avendo sviluppato presto nello strato addizionato di C e S le tipiche manifestazioni della presenza dei solfuri metallici con una puntiforme colorazione nerastra, stentava ad evidenziare la stratificazione nella parte superiore della colonna.

Questa difformità di stato di avanzamento nella formazione delle comunità microbiche fra le due colonne induce a formulare l'ipotesi che non si sia formato il gradiente relativo alla concentrazione di ossigeno molecolare nella parte superiore di una delle due colonne.

Inaspettatamente però, nel corso del periodo estivo 2023, la situazione appare tornata alla normalità anche nella seconda colonna che mostra finalmente una definita stratificazione nel corpo della stessa dal basso verso l'alto.

SUCCESSIONE MICROBICA

Le colonne di Vinogradskij costituiscono un ecosistema in miniatura e chiuso usato per arricchire le comunità microbiche dei sedimenti, in particolare quelle coinvolte nel ciclo dello zolfo.

La maggior parte dei microrganismi sulla Terra sono considerati *incoltivabili*, cioè che non possono essere isolati con le classiche tecniche in provetta o capsula di Petri.

Questa impossibilità di coltivare tutti i microrganismi esistenti è dovuta a molti fattori, tra cui la condizione stringente che molti microrganismi dipendono da altri per determinati prodotti metabolici.

Le condizioni in una colonna di Vinogradskij imitano molto fedelmente l'habitat naturale in cui si trovano i microrganismi, comprese le loro interazioni con altri microrganismi, e consentono di farli crescere in laboratorio.

Questa tecnica colturale pertanto consente di studiare un numero più ampio di specie microbiche e capire il loro ruolo e la loro importanza per i cicli biogeochimici del pianeta Terra senza necessariamente doverli coltivare in isolamento.

Tutti i comparti ambientali terrestri, atmosfera compresa, sono pieni di microrganismi che prosperano in tutti i tipi di habitat.

In tutti gli habitat i microrganismi dipendono l'uno dall'altro.

Nel corso della sua crescita un microrganismo consuma particolari substrati, come quelli ricchi di carbonio, ad esempio gli zuccheri, varie sostanze nutritive, ad esempio le vitamine, ed anche gas come l'ossigeno.

Quando queste importanti risorse si esauriscono, altri microrganismi con diverse esigenze metaboliche potranno prosperare al posto dei predecessori.

Ad esempio, nelle colonne di Vinogradskij i microrganismi consumano prima il materiale organico aggiunto mentre esauriscono l'ossigeno negli strati inferiori della colonna.

Una volta esaurito l'ossigeno, gli organismi anaerobici possono quindi prendere il sopravvento e consumare diversi materiali organici.

Tale sviluppo consecutivo di diverse comunità microbiche nel tempo è chiamato *successione*.

La successione microbica è importante in una colonna di Vinogradskij dove l'attività microbica cambia la chimica del sedimento che quindi influenza l'attività di altri microrganismi e così via.

Molti microrganismi nei suoli e nei sedimenti vivono anche lungo *gradienti* che sono zone di transizione tra due diversi tipi di habitat in base alle concentrazioni di certi substrati.



Nel punto corretto del gradiente un microrganismo può ricevere quantità ottimali di diversi substrati.

Man mano che una colonna di Vinogradskij si sviluppa, inizia ad imitare questi gradienti naturali, in particolare nell'ossigeno e nel solfuro.

I microrganismi fotosintetici iniziano a svilupparsi negli strati superiori del sedimento.

Questi microrganismi fotosintetici sono in gran parte composti da *cianobatteri* che producono ossigeno e appaiono come uno strato verde o rosso-marrone.

Mentre la fotosintesi produce ossigeno, questo gas non è facilmente solubile in acqua e pertanto diminuisce al di sotto di questo strato.

Tale situazione crea un gradiente di ossigeno che va da elevate concentrazioni di ossigeno negli strati superiori ad una condizione di anossia negli strati inferiori.

Lo strato ossigenato è chiamato strato *aerobico*, mentre lo strato privo di ossigeno viene detto strato *anaerobico*.

Nello strato anaerobico possono proliferare molte e diverse comunità microbiche a seconda del tipo e della quantità di substrati disponibili, della fonte dei microrganismi introdotti inizialmente nella colonna e della porosità del sedimento.

Nella parte inferiore della colonna pertanto possono svilupparsi quei microrganismi che degradano la materia organica anaerobicamente.

Nello strato anaerobico quindi la *fermentazione* microbica produce acidi organici dalla decomposizione della cellulosa.

In seguito tali acidi organici possono quindi essere utilizzati dai microrganismi *riduttori di solfato* che ossidano quelle sostanze organiche utilizzando il solfato, producendo il solfuro come sottoprodotto di tale processo riduttivo.

L'attività dei microrganismi riduttori di solfato è chiaramente messa in evidenza dall'annerimento del sedimento presente nella parte inferiore della colonna, perché ferro e anione solfuro reagiscono per dare solfuro di ferro che ha un colore nero.

Il solfuro si diffonde anche verso l'alto, creando un altro gradiente in cui le concentrazioni di solfuro sono alte nella parte inferiore della colonna e basse nella parte superiore.

Intorno alla parte centrale della colonna, i microrganismi *ossidanti dello zolfo* sfruttano l'apporto di ossigeno dall'alto e di solfuro dal basso.

In condizioni ottimali di illuminazione, i microrganismi ossidanti fotosintetici dello zolfo possono svilupparsi in questo strato centrale.

Questi microrganismi sono noti come *batteri dello zolfo verde e viola* e spesso appaiono come filamenti e macchie verdi, viola o rosso porpora.

I batteri dello zolfo verde hanno una maggiore tolleranza per il solfuro e pertanto solitamente si sviluppano nello strato direttamente al di sotto i batteri dello zolfo viola.

Al di sopra dei batteri dello zolfo viola possono svilupparsi anche batteri viola non solfurei.

Questi ultimi microrganismi fotosintetizzano utilizzando acidi organici come donatori di elettroni anziché il solfuro e spesso appaiono come uno strato rosso, viola, arancione o marrone.

I microrganismi *ossidanti dello zolfo non fotosintetici* possono svilupparsi al di sopra dei batteri viola non solfurei e di solito appaiono come filamenti bianchi.

Lo sviluppo di bolle di gas negli strati aerobici indica la produzione di ossigeno da parte dei cianobatteri.

Lo sviluppo di bolle di gas negli strati anaerobici può essere dovuto anche all'attività dei batteri *metanogeni*, microrganismi che degradano anaerobicamente la materia organica e formano metano come sottoprodotto, oltre che all'attività di microrganismi riduttori del solfato ad acido solfidrico.

Posizione nella colonna	Gruppo funzionale	Esempi di organismi	Indicatore visivo
In alto	Fotosintetizzatori	Cianobatteri	Strato verde o bruno-rossastro. A volte bolle di ossigeno.
	Ossidanti dello zolfo non fotosintetici	<i>Beggiatoa, Thiobacillus</i>	Strato bianco.
	Batteri viola non sulfurei	<i>Rhodomicrobium, Rhodospirillum, Rhodopseudomonas</i>	Strato rosso, viola, arancione o marrone
	Batteri dello zolfo viola	<i>Chromatio</i>	Strato viola o rosso porpora
	Batteri dello zolfo verde	<i>Chlorobio</i>	Strato verde
	Batteri che riducono il solfato	<i>Desulfovibrio, Desulfotomaculum, Desulfobacter, Desulfuromonas</i>	Strato nero
In basso	Metanogeni	<i>Methanococcus Methanosarcina</i>	A volte bolle di metano

Tabella 1: I principali gruppi di batteri che possono apparire in una classica colonna di Vinogradskij, dall'alto verso il basso. Vengono forniti esempi di organismi di ciascun gruppo e vengono elencati gli indicatori visivi di ciascuno strato di organismi.



FOTO 2 : COLONNA 1

Questa colonna fu allestita nel mese di Dicembre 2021.

Ecco come appare in questa foto del 28 Agosto 2023.

La colonna ha incubato a temperatura ambiente e sottoposta ad illuminazione naturale indiretta per circa 20 mesi per mostrare uno sviluppo completo.

Questa colonna mostra una migliore differenziazione degli strati e si è sviluppata più rapidamente dell'altra.

Il fondo della colonna, che ne costituisce circa $\frac{1}{4}$ dello spessore totale, è popolato da batteri del suolo strettamente anaerobici come i metanogeni *Methanococcus* e *Methanosarcina*.

Al di sopra di questo strato vivono batteri come *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfuromonas* che riducono il solfato ad acido solfidrico che reagendo con vari metalli forma solfuri responsabili della colorazione nera delle macchie visibili in questa zona, comparse già un mese dopo l'allestimento della colonna.

Al di sopra di questo strato vivono batteri solfurei verdi fototrofi, detti *batteri dello zolfo verde* come *Chlorobio*, e batteri che riducono lo zolfo.

In questa zona c'è una grande presenza di zolfo ed una scarsità di ossigeno.

Molti dei rappresentanti di queste specie batteriche possono essere individuati in corrispondenza delle macchie verdi presenti nella zona mediana della colonna.

La zona sovrastante ospita molti batteri dello zolfo che sono fototrofi e viola, detti *batteri dello zolfo viola* come *Chromatio*.

La loro fotosintesi funziona con un diverso donatore di elettroni ed invece del verde le loro macchie appaiono viola.

La zona superiore contiene poco zolfo ed è aerobica, essa è occupata da *batteri viola non solfurei* come *Rhodomicrobium*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*.

I batteri presenti in questa zona effettuano la fotosintesi con composti non solforati.

Al di sopra di questo strato, a sinistra ed al centro della foto, appaiono delle zone dal colore che varia dal bianco al giallo chiaro indicative della presenza di batteri detti *ossidanti dello zolfo non fotosintetici* come *Beggiatoa* e *Thiobacillus*.

Nella parte superiore della colonna, esaminandola dal basso verso l'alto fino a raggiungere l'interfase solido – liquido, si osserva uno spesso strato cianobatterico bruno – aranciato sovrastato da un più sottile strato cianobatterico verde con presenza di alghe, entrambi rappresentati da microrganismi fotosintetizzatori produttori di ossigeno.

Questi microrganismi effettuano la fotosintesi ossigenica e fanno in modo che questa zona superiore rimanga aerobica.

Fra le specie cianobatteriche verdi si intende approfondire la specie *Anabaena azollae* che è stata rinvenuta perché i prelievi dei campioni sono stati effettuati in una cisterna piena d'acqua stagnante la cui superficie era ricoperta da una piccola felce acquatica galleggiante appartenente alla famiglia delle *Azollacee* con la quale il già citato cianobatterio vive in simbiosi.

L'AZOLLA



FOTO 3 : La piccola felce galleggiante del genere *Azolla*.

La piccola felce acquatica galleggiante appartenente alla famiglia delle *Azollaceae*, è originaria del centro e sud America ed è stata introdotta in Europa e gran parte dell'Asia.

Le specie di *Azolla* formano delle simbiosi con il cianobatterio *Anabaena azollae*, che vive all'interno di cavità formate dal lobo fogliare superiore della felce, in grado di fissare l'azoto atmosferico rendendolo così biodisponibile.

Con tali cavità la felce fornisce al simbiote un ambiente protetto per la sua crescita e il suo sviluppo.

Si tratta di una piccola piantina galleggiante costituita da un corto fusto ramificato con foglie verdi a più lobi che si alternano tra loro.

Le radici fluttuanti sottili come capelli assorbono le sostanze nutritive disciolte nell'acqua sviluppando in poco tempo nuove piante che ricoprono densamente la superficie dell'acqua.

Questa proliferazione apporta grandi benefici alla qualità dell'acqua riducendone il carico organico ed aumentandone l'ossigeno.

IL CIANOBATTERIO *Anabaena azollae*



FOTO 4: Il cianobatterio *Anabaena azollae* simbiote delle piccole felci del genere *Azolla* fluttuanti sulla superficie delle acque.

Questo cianobatterio eterocistato vive in simbiosi con le felci acquatiche del genere *Azolla* che presentano delle cavità nelle foglie in cui si trova il microrganismo.

IL SUPERORGANISMO AZOLLA

La simbiosi *Azolla - Anabaena azollae* è stata definita come un “superorganismo” che combina i talenti naturali di due organismi molto diversi fra loro.

Il cianobatterio *Anabaena azollae* è comparso durante i primi stadi della storia evolutiva della Terra più di 3 miliardi di anni fa, quando l’atmosfera del pianeta era priva di ossigeno.

L’altro organismo è la piccola felce del genere *Azolla*.

Le foglie galleggianti di questo genere di felce contengono delle cavità che forniscono un microambiente ideale per la vita del cianobatterio *Anabaena azollae* che è in grado di fissare circa 2500 Kg di azoto atmosferico per ettaro per anno.

Da tempi antichi tale felce è stata utilizzata in Oriente come fertilizzante naturale nelle risaie.

L’azoto costituisce un fertilizzante naturale per la crescita dell’*Azolla*, liberando la pianta dalla sua dipendenza dal terreno e consentendole di crescere galleggiando sui corpi idrici.

PERCHÉ IL SUPERORGANISMO AZOLLA È UN SISTEMA BIOLOGICO UNICO

Nel 2010 Francisco Carrapiço propose di considerare la simbiosi *Azolla - Anabaena azollae* un superorganismo “a causa dell’unicità della simbiosi nella quale i due organismi sono coevoluti con successo in un sistema che fornisce importanti contributi all’ecologia, alla biofertilizzazione e alla biotecnologia”.

Il superorganismo *Azolla - Anabaena azollae* è unico.

Non sono note altre relazioni simbiotiche fra un cianobatterio ed una pianta tramandate durante la riproduzione di generazione in generazione.

Poche altre piante hanno una relazione simbiotica con i cianobatteri, come alcune *Cicadee* e le antofite *Gunnera*, ma la relazione simbiotica deve essere rinnovata ad ogni generazione successiva; essa infatti si interrompe dopo la morte della pianta e nuovi cianobatteri devono ricolonizzare le piante al fine di continuare la relazione simbiotica.

Al contrario *Azolla* ed *Anabaena azollae* non sono mai separate; non lo sono mai state per almeno 100 milioni di anni.

Questi organismi sono evoluti insieme continuamente durante questo lunghissimo periodo di tempo in cui il clima terrestre è mutato da una tipologia a effetto serra alla fase presente di cicli glaciali e interglaciali.

La morfologia dell’*Azolla* è differente da quella delle altre felci ed in particolare la sua struttura fogliare è evoluta per fornire all’*Anabaena azollae* un ambiente ideale per il suo sviluppo.

Il ciclo vitale dell’*Azolla* rende possibile per l’*Anabaena azollae* di passare ininterrottamente da una generazione di *Azolla* alla successiva.

Ciò ha permesso ai due organismi di evolvere continuamente insieme per 100 milioni di anni, una relazione sconosciuta altrove sul pianeta.

Ciascuna foglia ha un lobo ventrale molto sottile e uno spesso lobo dorsale fotosintetico verde o, con l’arrivo dell’autunno e conseguente abbassamento della temperatura, tendente al rosso per la formazione di antociani, contenente una cavità che rappresenta la chiave della simbiosi fra *Azolla* ed *Anabaena azollae*.

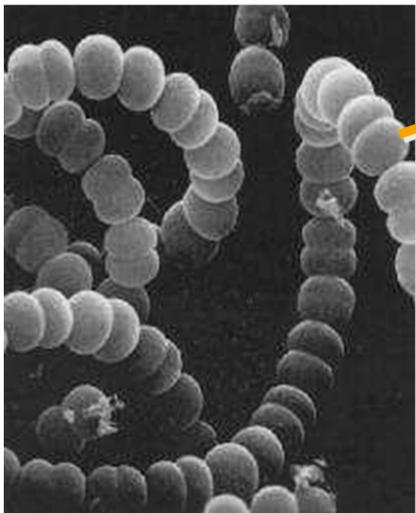
Tale cavità è una struttura altamente specializzata che si forma durante la crescita dell’*Azolla* mediante il ripiegamento verso l’interno di parte dell’epidermide fogliare durante lo sviluppo dell’*Azolla*.

La cavità misura circa 0.15 x 0.3 mm e si apre verso l’ambiente esterno attraverso un poro che è circondato da due strati di cellule.

Il centro della cavità è riempito di gas o di liquido e i batteri sono immobilizzati nell’area periferica della cavità da una rete di fibrille mucillaginose.



Azolla leaf



Anabaena

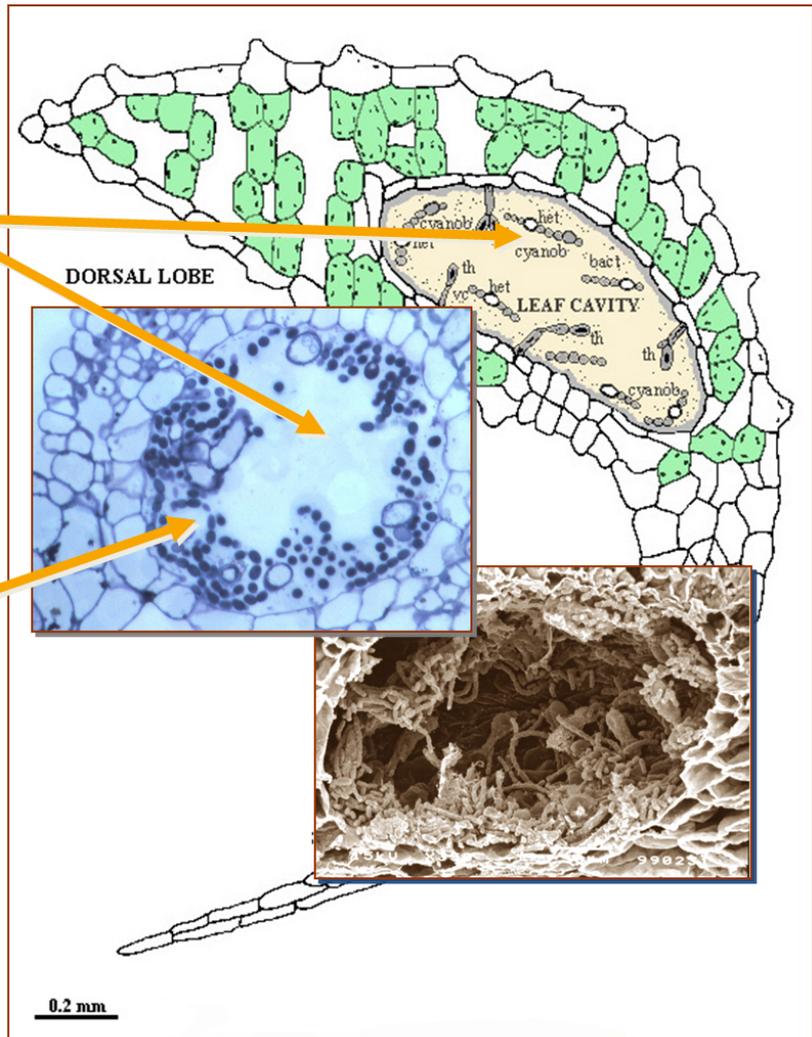


FOTO 5 : Le cavità della parte dorsale della foglia di *Azolla* forniscono un micro-ambiente ideale all'*Anabaena azollae*, cianobatterio eterocistico azotofissatore di aspetto filamentoso. Questa è la chiave della capacità dell'*Azolla* di sequestrare enormi quantità anche di anidride carbonica atmosferica.



FOTO 6 : Campione del genere *Azolla* prelevato dal Dr. Paolo Belloni fondatore del Conservatorio Botanico “I Giardini di Pomona”.

IL GIACINTO D'ACQUA: UN'ARMA SEGRETA CONTRO L'INQUINAMENTO



FOTO 7 : Cisterna d'acqua stagnante con tappeto galleggiante di piccole felci del genere *Azolla*. Nella cisterna sono presenti anche esemplari isolati di *Pontederia crassipes* un'idrofito galleggiante.

Questo giacinto d'acqua in estate produce capsule piene di piccoli semi che germinano in acqua. Inoltre, a parte la riproduzione sessuale, la pianta presenta un altro efficacissimo meccanismo di moltiplicazione, quello per stoloni cioè fusti modificati che producono piante geneticamente identiche alla pianta madre e che a causa della loro fragilità vengono spezzati facendo diventare autonome le singole piante galleggianti.

Questo aspetto della sua biologia spiega la sua tendenza a diventare invasiva, tanto da essere stata inserita nell'elenco delle 100 tra le specie aliene più dannose del mondo.

Le sue radici possono estrarre dall'acqua materia organica e pertanto questa pianta viene impiegata efficacemente nei processi di fitodepurazione, riuscendo ad ottenere una riduzione degli inquinanti organici che va dal 90% fino al 99%.



BIOREMEDIATION DELL'INQUINAMENTO DA METALLI

Un'altra importante applicazione di questa pianta è la *bioremediation*, offrendo la possibilità di intervenire su uno dei contesti più difficili nell'ambito dell'inquinamento ambientale che riguarda la decontaminazione naturale delle acque inquinate per effetto di operazioni minerarie, come quelle derivanti dalle miniere di rame.

In questo caso però l'efficacia di assorbimento del rame da parte del giacinto d'acqua presenta dei limiti, infatti quando la concentrazione di rame nell'acqua supera il limite massimo di 4 mg/l, la pianta mostra segni evidenti di sofferenza e tossicità.

Il giacinto d'acqua è particolarmente tollerante ed efficace per l'assorbimento del Cr (VI), detto *Cromo esavalente*, dai reflui prodotti da numerose lavorazioni industriali, la cui cancerogenicità è ormai accertata.

Questa pianta acquatica mostra inoltre una straordinaria capacità di assorbimento dell'arsenico quando nello specchio d'acqua, a livello della sua zona rizomatosa, vive in simbiosi con i rizobatteri, che è una strategia fondamentale per amplificare le capacità di assorbimento degli inquinanti.

Il giacinto d'acqua può far parte di una strategia naturale per ripristinare completamente la natura nelle aree ex-minerarie e/o petrolchimiche.

L'attenuazione naturale di questo tipo di inquinanti richiede tempi anche molto lunghi, invece mediante la bioremediation con il giacinto d'acqua la rimozione dei metalli, come il cromo ed il rame, ed anche di altri mix di metalli pesanti, avviene in un periodo di tempo molto ridotto, cioè in massimo un paio di settimane di attività, a condizione di trovare la giusta proporzione fra biomassa e massa di effluente da trattare.

È davvero importante usare soluzioni naturali per il risanamento delle acque superficiali nelle zone ex-minerarie ed ex-petrolifere per evitare il rischio di compromettere il futuro delle attività agricole e la biodiversità dell'area interessata e di quelle limitrofe.

Il giacinto d'acqua si è rivelato utile anche nella rimozione dalle acque dei cosiddetti *inquinanti emergenti*, detti anche *microinquinanti*, a cominciare dal bisfenolo A, ma ha mostrato anche di poter esercitare un'ottima azione di risanamento dell'acqua dalla presenza di pesticidi ed insetticidi.

È possibile pertanto impostare una strategia per il contrasto agli effetti dei pesticidi ed insetticidi basata sull'uso dei giacinti d'acqua, che consiste nell'utilizzo di una specie invasiva, ma che se viene adeguatamente controllata e disposta in alcuni luoghi chiave, può far parte di una milizia di barriere naturali di contrasto all'inquinamento.

Se l'obiettivo dell'utilizzo del giacinto d'acqua è quello di contrastare i microinquinanti non è del tutto necessario farlo utilizzando la pianta viva, perché essa si può utilizzare anche in condizioni particolari, magari quando si vuole evitare che ci sia una popolazione troppo numerosa di questa pianta, che quindi potrebbe determinare un problema di tipo meccanico e fisico per la salubrità dell'ecosistema, perché sottrae troppi nutrienti e ossigeno e quindi le condizioni di vita per la flora acquatica peggiorano. Si possono adottare anche altre soluzioni come la sola radice di giacinto d'acqua polverizzata che posta in acqua svolge l'identica funzione della pianta intera, quindi la funzione di assorbimento degli inquinanti, evitando il problema dell'invasività di questa specie e il problema delle radici che possono intrecciarsi determinando una sorta di soffocamento dell'ambiente acquatico all'interno del quale vivono.

Bisogna fare delle considerazioni sull'importanza e sul valore che alcune soluzioni naturali per l'ambiente possono avere anche quando vengono descritte come delle piante invasive, come qualcosa che va combattuto.

Il giacinto d'acqua va combattuto dove è invasivo, ma non va rifiutato a priori, bensì utilizzato, facendo in modo che tale specie possa diventare una straordinaria barriera all'inquinamento ambientale, avendo delle ottime capacità contro un range molto ampio di inquinanti.

IL GIACINTO D'ACQUA: UNA MINIERA DI LITIO

Il giacinto d'acqua presenta anche ottime capacità di sottrarre all'acqua il litio.

Bisogna porre particolare attenzione a questa ulteriore capacità mostrata dalla pianta acquatica in tempi nei quali la mobilità elettrica e le tecnologie più avanzate portano all'utilizzo di batterie sempre più sofisticate che richiederanno la disponibilità sempre crescente di litio che viene tuttora considerato fra i *critical raw materials*.

È ormai necessario studiare delle soluzioni naturali che ci permettano di fronteggiare i problemi conseguenti alla scarsità di questa risorsa.

È in corso un filone di studi che tende a modificare geneticamente il giacinto d'acqua in modo da aumentare la sua capacità di assorbimento del litio.

Sono tuttora allo studio tutta una serie di soluzioni basate sull'ingegneria genetica tese a modificare la capacità di assorbimento del litio da parte di diversi organismi naturali, tra cui anche, ma non solo, il giacinto d'acqua in modo tale che diventino specializzati nella decontaminazione ambientale senza però diventare un problema per la biodiversità.

IL GIACINTO D'ACQUA E LE ZANZARE: UN RAPPORTO SPECIALE

Il giacinto d'acqua funge da barriera naturale contro i pesticidi e gli insetticidi.

L'effetto barriera contro gli insetticidi è stato scoperto mentre erano in corso delle campagne di disinfestazione dalle zanzare in zone nelle quali era presente il giacinto d'acqua.

Si è potuto constatare che solo subito dopo il trattamento disinfestante le larve sono morte, ma poco tempo dopo esse venivano ospitate in gran numero fra le radici della pianta.

Le larve delle zanzare si sono spostate progressivamente nella zona delle radici dei giacinti d'acqua, perché protetta dalla presenza dell'insetticida che era nel frattempo stato assorbito dalle stesse radici.

Questa evidenza dimostra inequivocabilmente il rapporto di mutuo scambio fra la pianta e gli organismi acquatici.

Bisogna pertanto, per finalità di difesa naturale, sfruttare la capacità del giacinto d'acqua di creare zone immuni agli effetti di pesticidi ed insetticidi.



FOTO 8 : Giacinto d'acqua

I MICRORGANISMI PER LA PRODUZIONE DI IDROGENO:

UNA VIA A BASSO IMPATTO AMBIENTALE CHE SFRUTTA FONTI DI ENERGIA RINNOVABILI

INTRODUZIONE

La produzione biologica di idrogeno presenta caratteristiche tali da renderla potenzialmente vantaggiosa rispetto alle tecniche termochimiche ed elettrochimiche attualmente in uso, dal momento che i microrganismi possono produrre questo gas a partire da fonti di energia rinnovabili in processi a basso impatto ambientale, operanti a temperatura e pressione ambiente, i quali possono anche essere alimentati da rifiuti di natura organica (scarti vegetali, sottoprodotti di industrie alimentari etc.).

I processi biologici capaci di produrre H₂ sono di tre tipi:

- (a) la biofotolisi dell'acqua, condotta da alcune microalghe e cianobatteri;
- (b) la fermentazione di composti organici condotta da batteri chemoeterotrofi (in particolare Clostridi, Enterobatteri e alcuni batteri termofili appartenenti ai generi *Caldicellulosiruptor* e *Thermotoga*);
- (c) la fermentazione di composti organici condotta da batteri fotosintetici anossigenici (in particolare i batteri rossi non sulfurei, in seguito indicati con l'acronimo BRNS).

Al fine di ampliare il campo di applicabilità dei sistemi biologici nella produzione di idrogeno, è stato suggerito di combinare processi diversi, realizzando sistemi biologici misti, che operano attraverso una prima fase di fermentazione, condotta da batteri chemoeterotrofi anaerobi e una fase successiva di fotodegradazione, condotta con batteri fotosintetici anossigenici che utilizzano gli acidi grassi a basso peso molecolare prodotti nella fase precedente.

È stato infatti ipotizzato che l'uso dei due processi fermentativi in serie (il primo processo condotto da batteri chemoeterotrofi e il secondo condotto da batteri fotosintetici) potesse consentire la produzione massima teoricamente ottenibile di 12 moli di idrogeno per mole di glucosio consumata.

Alla luce di queste considerazioni, le ricerche condotte in Italia dall'inizio del nuovo millennio avevano come obiettivo l'approfondimento delle conoscenze sui sistemi combinati di produzione di idrogeno al fine di individuare le condizioni adeguate all'ottimizzazione delle rese di conversione dei substrati organici, in particolare di residui vegetali, in idrogeno.

Lo scopo principale di vari progetti di ricerca era quindi quello di sperimentare e ottimizzare, in scala di laboratorio, la produzione di idrogeno attraverso la combinazione dei due processi microbici sopra menzionati, fermentazione al buio e successiva fotodegradazione, utilizzando come substrati iniziali scarti di natura vegetale.

PROCESSI BIOLOGICI DI PRODUZIONE DI IDROGENO

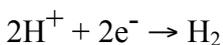
Come sopra menzionato, i processi biologici che portano alla produzione di idrogeno sono i seguenti:

- 1) produzione di idrogeno dalla biofotolisi dell'acqua, condotta da microalghe e da cianobatteri
- 2) produzione di idrogeno per via fermentativa (fermentazione al buio) condotta da microrganismi chemoeterotrofi
- 3) produzione di idrogeno per via fotofermentativa (fotofermentazione) condotta da batteri fotoeterotrofi
- 4) sistemi integrati di produzione di idrogeno, che uniscono fermentazione al buio e fotofermentazione.

BIOFOTOLISI DELL'ACQUA

La possibilità di utilizzare microrganismi fotosintetici ossigenici (cianobatteri e microalghe) per la produzione simultanea di idrogeno e ossigeno, sfruttando la fotolisi dell'acqua dovuta al processo fotosintetico, è considerata un'opzione molto interessante per la produzione di idrogeno biologico. In effetti, questo processo utilizza fonti di energia e di idrogeno ampiamente disponibili, quali la luce solare e l'acqua, per produrre H₂ in un processo pulito "carbon neutral".

Uno schema semplificato di questo processo può essere descritto come segue: i fotoni che derivano dalla luce del sole determinano la reazione di scissione dell'acqua al fotosistema II (PSII) di cellule di microalghe o cianobatteri e gli elettroni che derivano da questo processo sono convogliati, attraverso la ferredossina, alla idrogenasi (una Fe-Fe idrogenasi nel caso delle microalghe o una Ni-Fe idrogenasi nel caso di alcuni cianobatteri) o alla nitrogenasi (nella maggior parte dei cianobatteri), entrambi enzimi in grado di catalizzare la reazione di formazione di idrogeno:



Le idrogenasi sono enzimi reversibili, vale a dire catalizzano la reazione in entrambe le direzioni, a seconda delle condizioni ambientali, mentre la nitrogenasi è unidirezionale, ma richiede ATP per poter trasferire gli elettroni allo ione H⁺.

Nonostante il fascino esercitato da questa via pulita ed elegante per ottenere idrogeno da acqua e luce solare, ci sono tre principali limitazioni che ostacolano lo sfruttamento industriale di questo processo per la produzione di H₂:

- a) sia l'idrogenasi che la nitrogenasi sono enzimi sensibili all'ossigeno che viene prodotto in grandi quantità durante la fotosintesi
- b) nel processo si sviluppano miscele di idrogeno e ossigeno che sono potenzialmente esplosive
- c) il processo è caratterizzato da bassi tassi di produzione di H₂ in confronto con altri metodi biologici.

PRODUZIONE DI IDROGENO PER VIA FERMENTATIVA (FERMENTAZIONE AL BUIO)

Molti batteri chemoeterotrofi sono in grado di produrre idrogeno in condizioni anaerobiche degradando materia organica in processi fermentativi chiamati comunemente “fermentazione al buio” per distinguerli dalla “foto-fermentazione”, descritta nel paragrafo successivo. La produzione di idrogeno durante la fermentazione è conseguenza della necessità delle cellule di eliminare l'eccesso di potere riducente prodottosi nell'ossidazione dei substrati organici. Gli elettroni in eccesso vengono quindi incanalati verso l'idrogenasi, l'enzima che catalizza la formazione di idrogeno gassoso nei batteri chemoeterotrofi. Se il materiale organico fermentato deriva da biomasse vegetali (residui agricoli, rifiuti derivanti da prodotti alimentari, ecc.) il bioidrogeno così ottenuto è considerato come derivante da fonte energetica rinnovabile in quanto le biomasse vegetali hanno tratto origine dalla fotosintesi.

Tuttavia, i batteri fermentativi possono anche in parte avvalersi di altre vie metaboliche per eliminare il potere riducente in eccesso, con il conseguente rilascio di altri composti solubili ridotti, quali acetato, butirrato, etanolo ecc., a seconda della via fermentativa utilizzata, diminuendo in tal modo la resa di produzione in idrogeno.

Le vie fermentative che portano alla produzione di H_2 iniziano sempre con la degradazione della frazione zuccherina presente nei substrati fermentescibili. I carboidrati sono degradati, attraverso la via glicolitica o la via dei pentosi fosfato, a piruvato il quale può essere ulteriormente ossidato seguendo due percorsi differenti, uno catalizzato dalla piruvato ferredossina ossidoriduttasi (PFOR) e l'altro dalla piruvato formiato liasi (PFL). Nel primo percorso, tipico dei clostridi, il piruvato viene degradato ad acetil-CoA, CO_2 e ferredossina ridotta, in una reazione catalizzata dalla PFOR. Quindi, la ferredossina ridotta dona gli elettroni a una [Fe-Fe] idrogenasi, con la conseguente formazione di idrogeno. In aggiunta all'idrogeno prodotto per questa via, anche il NADH prodotto durante la glicolisi può essere riossidato, in presenza di bassi valori di pressione parziale di idrogeno e con la partecipazione di una [Fe-Fe] idrogenasi, dando luogo così alla formazione di quantità aggiuntive di idrogeno. Tuttavia, quando la pressione parziale di idrogeno è a valori moderati o alti, la reazione sopra descritta diventa sfavorevole e quindi la riossidazione del NADH viene condotta utilizzando l'acetil-CoA come substrato, con la conseguente produzione di butirrato invece che di idrogeno.

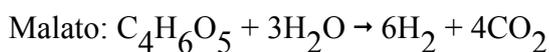
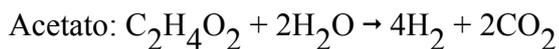
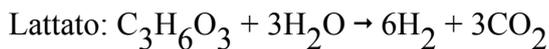
Nella fermentazione acido-mista, tipica dei batteri enterici, il piruvato derivante dalla degradazione dei carboidrati viene scisso in acetil-CoA e formiato, il quale a sua volta viene convertito in H_2 e CO_2 in una reazione catalizzata dalla PFL in condizioni di basso pH. Occorre però sottolineare che, a bassi valori di pH, è attiva la lattato deidrogenasi (LDH), la quale catalizza la riduzione del piruvato a lattato, con la conseguente sottrazione di NADH e di una molecola di piruvato non più disponibili quindi per la reazione di formazione di idrogeno. L'acetil-CoA prodotto insieme al formiato può essere convertito in acetato o in etanolo, a seconda delle condizioni di coltura.

È stato dimostrato che, nelle fermentazioni condotte dai batteri chemoeterotrofi si possono ottenere un massimo di 4 moli di H_2 per mole di glucosio consumata a causa di limitazioni metaboliche e termodinamiche. Questo limite, chiamato limite di Thauer, è determinato dalla necessità per le cellule di ottenere, tramite fosforilazione a livello del substrato, almeno 1 mole di ATP per mole di glucosio consumata per sostenere i processi metabolici.

PRODUZIONE DI IDROGENO PER VIA FOTOFERMENTATIVA (FOTOFERMENTAZIONE)

Nella fotofermentazione, batteri fotosintetici anossigenici, in particolare i batteri rossi non sulfurei (BRNS) riducono gli ioni H^+ a H_2 gassoso utilizzando il potere riducente derivante dall'ossidazione di composti organici (quali ad esempio acidi grassi a basso peso molecolare) e l'energia derivante dalla luce solare. Questo processo è generalmente considerato molto promettente a causa delle alte rese di conversione del substrato in idrogeno, della capacità dei BRNS di utilizzare un ampio spettro di lunghezze d'onda della luce solare, dell'assenza di reazioni che portano allo sviluppo di O_2 (che abbiamo visto inibire gli enzimi che catalizzano la produzione di H_2) e della possibilità di associare la produzione di H_2 a processi di smaltimento di rifiuti organici. Nel processo fotofermentativo, i BRNS ossidano composti organici a basso peso molecolare (PM), quali ad esempio acidi organici come acetato, lattato, malato, ecc.; il potere riducente così ottenuto viene quindi convogliato, attraverso il flusso inverso di elettroni, alla ferredossina e successivamente alla nitrogenasi, l'enzima che catalizza la formazione di idrogeno nei BRNS. Questo processo richiede grandi quantità di ATP sia per attivare il flusso inverso di elettroni che per l'attività della nitrogenasi.

La quantità massima di idrogeno ottenibile dagli acidi organici più frequentemente utilizzati può essere calcolata dalle reazioni stechiometriche della loro ossidazione completa:



Tuttavia, va sottolineato che una parte del substrato organico è utilizzato come fonte di carbonio per la crescita cellulare e che alcuni acidi organici, come l'acetato e il butirato, possono essere utilizzati dalle cellule per la sintesi di poli-beta-idrossibutirrato (PHB) anziché per la produzione di H_2 . Così, molto frequentemente, la conversione del substrato in idrogeno rimane al di sotto del valore teorico.

L'efficienza di conversione è fortemente influenzata dal rapporto carbonio/azoto nella cultura: un elevato rapporto C/N nei terreni di coltura solitamente porta ad un'elevata produzione di idrogeno, mentre un basso rapporto C/N porta a un'elevata crescita cellulare, con conseguente bassa resa di produzione di H_2 .

SISTEMI INTEGRATI DI PRODUZIONE DI IDROGENO

Come sopra riportato, la fermentazione al buio può portare alla produzione massima di 4 moli di H_2 per mole di glucosio consumato, con il rilascio contemporaneo nel terreno di coltura di un certo numero di composti organici parzialmente ossidati, prevalentemente acidi grassi a basso PM, che ancora potrebbero essere utilizzati come donatori di elettroni. Tuttavia, la loro ossidazione per ottenere ulteriore potere riducente è termodinamicamente sfavorita a causa dei valori molto positivi di ΔG^0 di queste reazioni. Per esempio, nel caso dell'ossidazione di acetato a CO_2 e H_2 il valore di ΔG^0 è di $104,6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Di conseguenza, questo processo è impraticabile per i batteri chemoeterotrofi ma diventa possibile attraverso la fotofermentazione dell'acetato o di altri composti analoghi ed effettuata dai BRNS, i quali ricavano dalla luce solare l'energia necessaria per queste reazioni endoergoniche.

Muovendo da queste considerazioni, negli ultimi anni molti gruppi di ricerca hanno studiato la possibilità di utilizzare un processo in due fasi in cui, nella prima fase, la fermentazione di substrati organici viene condotta utilizzando batteri chemoeterotrofi, i quali producono H_2 e acidi organici a basso PM, mentre nella seconda fase gli acidi precedentemente prodotti sono utilizzati dai BRNS come donatori di elettroni per la fotoevoluzione di idrogeno catalizzata dalla nitrogenasi.

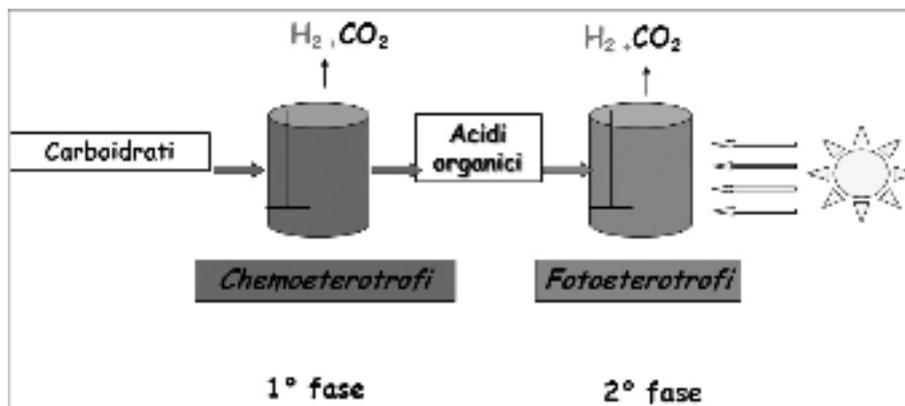


FOTO 9 : Schema dei processi integrati a due fasi per la produzione di bioidrogeno

Diversi studi sono stati condotti negli ultimi anni sui sistemi integrati, ottenendo in alcuni casi risultati molto promettenti, per esempio, risultati molto interessanti sono stati riportati utilizzando biomassa algale come substrato di partenza per la produzione di idrogeno, raggiungendo una produttività complessiva di 8,3 moli di H_2 per mole di glucosio. Ottimi risultati sono stati ottenuti anche utilizzando come substrato residui di fecola di patate dolci, con i quali è stata ottenuta una produttività di 7,2 moli di H_2 per mole di glucosio. Con i melassi di barbabietola sono state ottenute 6,85 moli di H_2 per mole di glucosio consumata.

LIMITI DEI SISTEMI BIOLOGICI DI PRODUZIONE DI IDROGENO

E PROBLEMI DA RISOLVERE

PROCESSO	MICRORGANISMI	VANTAGGI	SVANTAGGI
BIOFOTOLISI DELL'ACQUA	Microalghe verdi Cianobatteri	-Produzione da H ₂ O e luce solare	-Enzimi coinvolti nella produzione di H ₂ sono sensibili a O ₂ -Bassi tassi di produzione di H ₂
FERMENTAZIONE AL BUIO	Batteri chemoeterotrofi fermentanti	-Processo anaerobico -Può utilizzare substrati rinnovabili e di scarto di altri processi industriali -Non è influenzato dai cicli luce/buio -Alti tassi di produzione	-Ossidazione incompleta dei substrati -È influenzato negativamente dalla pressione parziale di H ₂ -Produce CO ₂ che occorre separare da H ₂
FOTOFERMENTAZIONE	Batteri fotosintetici anossigenici (batteri rossi non sulfurei – BNRS)	-Usa composti presenti in acque reflue industriali o derivanti dalla fermentazione al buio -Usa un'ampia gamma di lunghezze d'onda della luce solare	-La nitrogenasi consuma grandi quantità di ATP -La nitrogenasi è sensibile a NH ₄ ⁺ -Bassa efficienza di conversione dell'energia luminosa in H ₂

TABELLA 2 : Principali vantaggi e svantaggi dei processi biologici di produzione di H₂

I principali vantaggi e svantaggi dei processi biologici di produzione di idrogeno sono riassunti nella Tabella 2.

In particolare, a causa dei bassi tassi di produzione dell'idrogeno e dell'inibizione degli enzimi che catalizzano la formazione di H_2 dovuta all'ossigeno prodotto dalla fotosintesi, non sembra per il momento molto realistico proporre la biofotolisi dell'acqua per la produzione industriale di idrogeno per via microbiologica.

D'altra parte, la fermentazione al buio mostra i più alti tassi di produzione di H_2 rispetto agli altri sistemi biologici e ha il vantaggio di poter utilizzare substrati organici complessi di scarto (cellulosa, rifiuti alimentari, rifiuti urbani, ecc.) per la produzione del gas.

Occorre però sottolineare come la resa in idrogeno sia bassa, circa il 17%, e come l'ossidazione incompleta dei carboidrati lasci nel brodo di fermentazione un certo numero di composti solo parzialmente ossidati. La fotofermentazione sembra essere piuttosto promettente, grazie alla sua capacità di utilizzare un gran numero di composti organici rilasciati dalla fermentazione al buio o presenti in rifiuti industriali e alla sua capacità di sfruttare l'energia della luce solare con un processo fotosintetico che non rilascia O_2 . D'altra parte, la fotofermentazione mostra una bassa efficienza di conversione della luce e la nitrogenasi, l'enzima che catalizza la formazione di H_2 nei BRNS, è sensibile all'ammoniaca, un composto spesso presente ad alte concentrazioni nei brodi derivanti dalla fermentazione al buio.

A questo proposito, l'uso di sistemi integrati in due fasi è realisticamente il processo più adatto per la futura produzione di idrogeno per via biologica. Come sopra riportato, i microrganismi più frequentemente utilizzati nei processi fermentativi di produzione di idrogeno al buio sono batteri chemoeterotrofi mesofili, appartenenti ai Clostridi o agli Enterobatteri, e alcuni batteri termofili appartenenti ai generi *Caldicellulosiruptor* e *Thermotoga*. I vantaggi nell'utilizzo di batteri termofili sono correlati alla cinetica più veloce di produzione di H_2 e a un miglior controllo della contaminazione del bioreattore da parte di altri microrganismi. Questi vantaggi potrebbero controbilanciare i maggiori costi energetici dovuti all'uso di batteri termofili; inoltre, va sottolineato come l'uso per la termostatazione di questi processi di acque ad alta temperatura derivanti da cicli di raffreddamento di processi industriali potrebbe portare a una significativa riduzione dei costi di un processo condotto con batteri termofili. Per quanto riguarda la fase di fotofermentazione, i BRNS sono gli organismi più adatti a causa delle alte rese di conversione del substrato che possono essere raggiunte, della possibilità di utilizzare un'ampia gamma di lunghezze d'onda della luce solare, e dell'ampia varietà di composti organici che possono utilizzare come substrato per la produzione di idrogeno.

Anche se l'integrazione di questi due processi sembra essere la soluzione migliore per la produzione di idrogeno per via biologica, restano aperti una serie di problemi da affrontare e risolvere per rendere economicamente sostenibile questo processo.

Infatti, in aggiunta alle limitazioni dei due processi presi singolarmente, l'integrazione implica l'insorgere di ulteriori problemi specifici: in primo luogo, le modalità di coltura possono influenzare le strategie di integrazione dei due processi, in particolare per quanto riguarda la separazione dal fermentato della biomassa sviluppatasi nella prima fase del processo. Inoltre, se si intende operare in condizioni axeniche con il solo microrganismo inoculato, l'effluente deve essere sterilizzato e trattato in maniera adeguata (cioè integrato con alcuni nutrienti presenti in quantità limitanti la crescita o modificato nella composizione di azoto), portando così a un aumento dei costi. Inoltre, nel caso della fase di fotofermentazione, vi è la necessità di garantire una distribuzione ottimale della luce all'interno del fotobioreattore, parametro che influenza in maniera significativa l'efficienza di conversione della luce in idrogeno.

LE FRONTIERE DELLA RICERCA SUL PROCESSO DI FOTOFERMENTAZIONE CONDOTTO DA BATTERI ROSSI NON SOLFUREI (BRNS)

L'approfondimento delle conoscenze del processo di fotofermentazione condotto da batteri rossi non solfurei, in particolare si propone di:

1. selezionare, tra batteri fotosintetici rossi non solfurei isolati da ambienti naturali in apposite campagne di campionamento, ceppi dotati della migliore capacità di produrre idrogeno;
2. creare una collezione di ceppi di batteri fotosintetici rossi non solfurei a fini di studio e applicativi;
3. ottimizzare, con i ceppi prescelti, le condizioni di coltura per la produzione di idrogeno con substrati organici di varia natura e origine;
4. sperimentare, in scala di laboratorio e di impianto semipilota, la possibilità di accoppiare il processo fermentativo di decomposizione di composti organici di vario tipo (reflui civili e/o industriali, rifiuti organici di varia origine, ecc.), condotto da batteri eterotrofi anaerobi, e la fotodecomposizione, da parte dei BRNS, delle molecole organiche a basso peso molecolare formatesi nel corso della fermentazione.

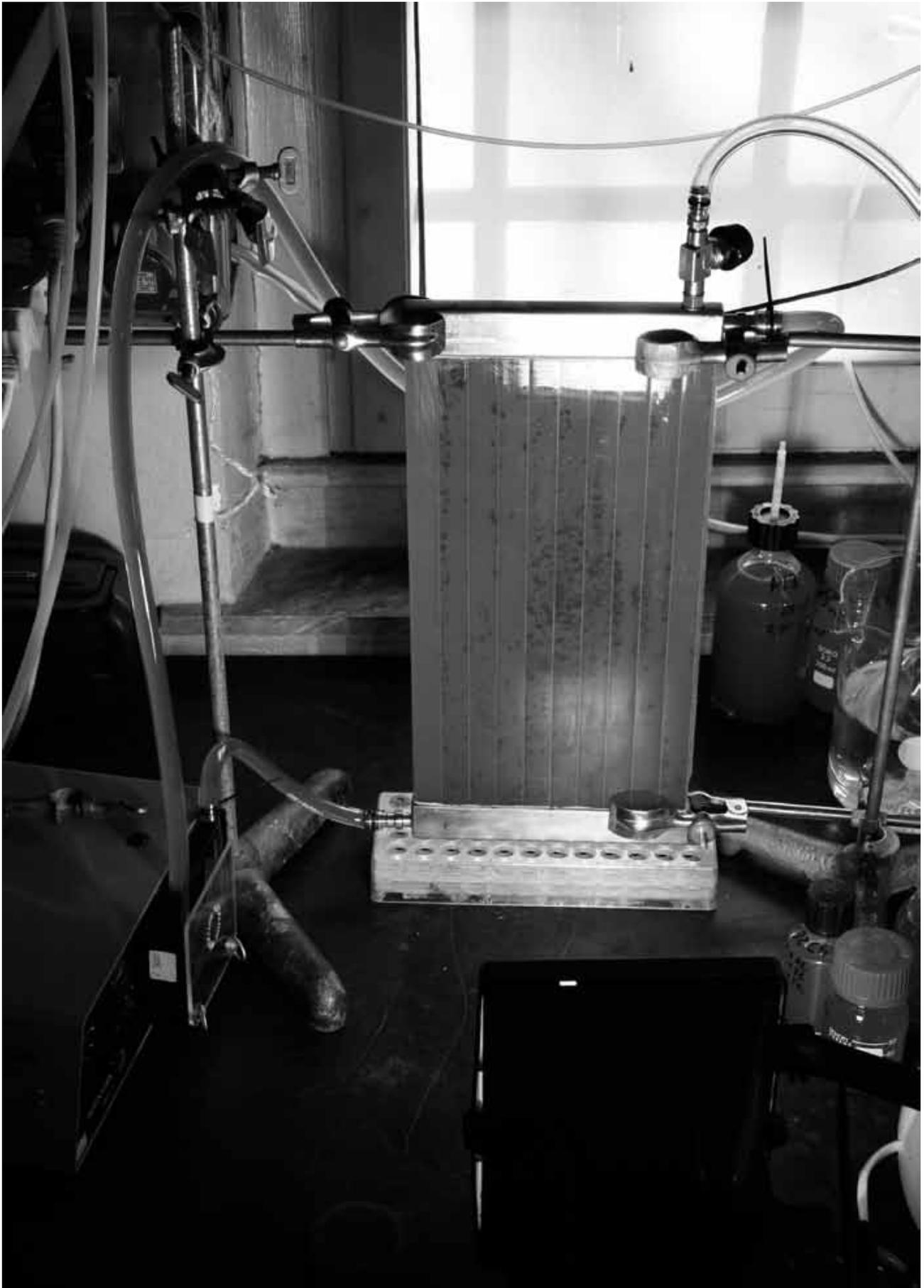


FOTO 10 : Fotobioreattore planare in fase di produzione di idrogeno



FOTO 11 : Fotobioreattore in produzione di idrogeno su fermentato vegetale

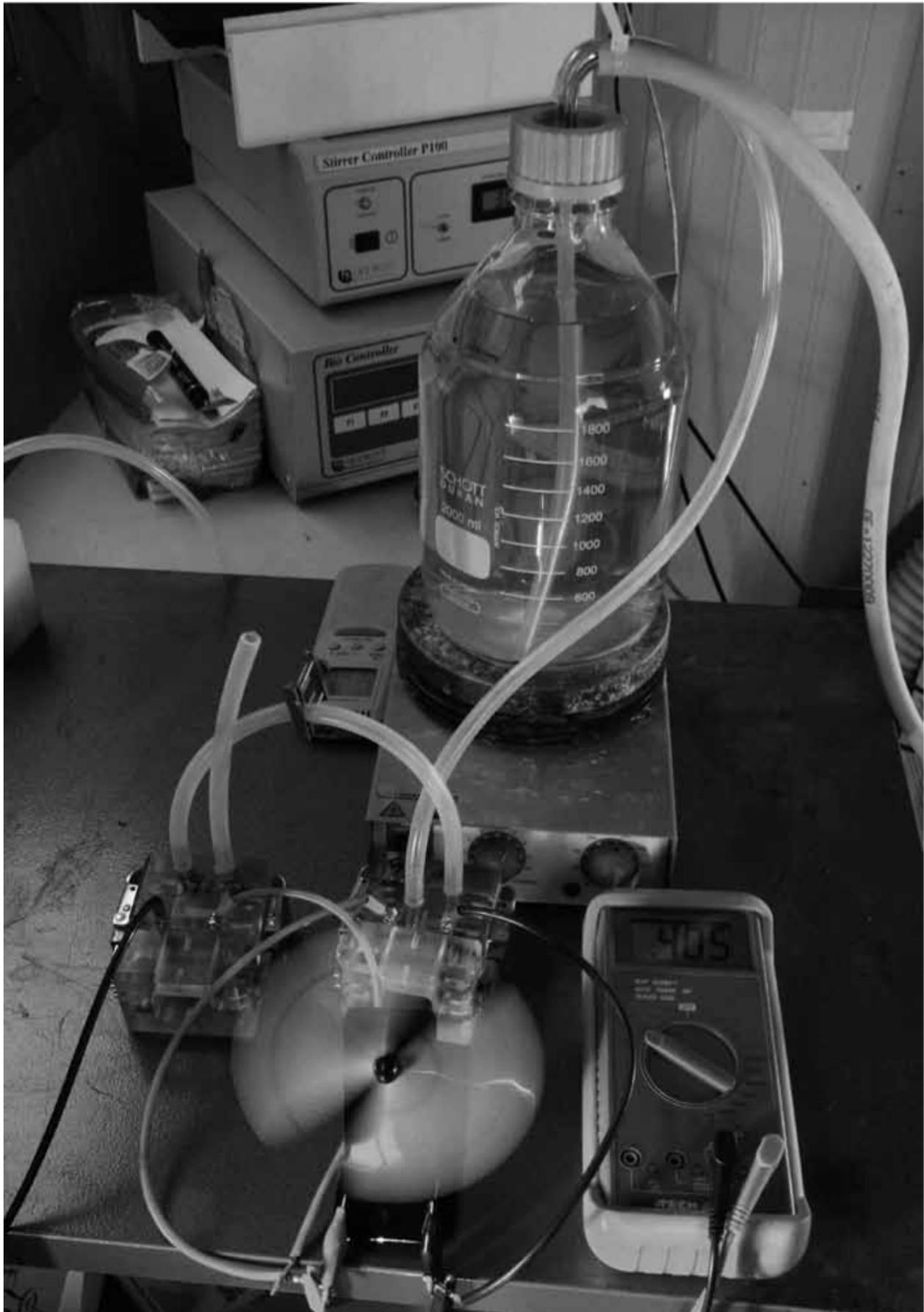


FOTO 12 : Cella a combustibile di tipo PEMFC collegata alla coltura batterica in produzione di idrogeno su brodo di fermentazione derivato dalla fermentazione di rifiuti vegetali

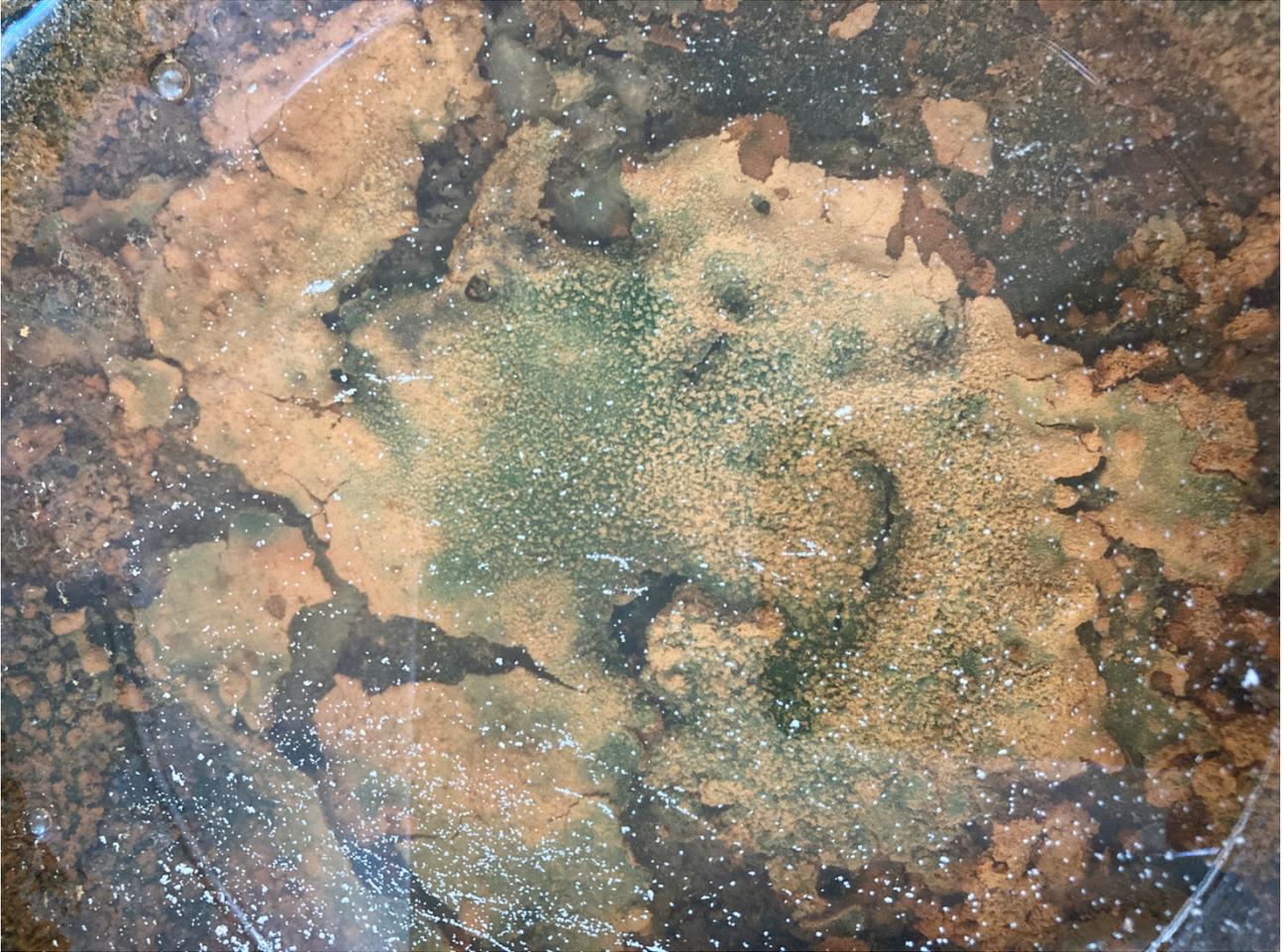


FOTO 13 : COLONNA 1 Interfasi Fase solida – Fase acquosa e Fase acquosa – Fase aeriforme

All'interfase Fase solida – Fase acquosa si nota uno spesso strato di cianobatteri di color bruno – aranciato sovrastato da uno strato più sottile di cianobatteri verdi.

All'interfase Fase acquosa – Fase aeriforme si nota un tappeto galleggiante e trasparente costituito da un biofilm.



FOTO 14 : COLONNA 2

Questa colonna fu allestita nel mese di Dicembre 2021.

Ecco come appare in questa foto del 28 Agosto 2023.

La colonna ha incubato a temperatura ambiente e sottoposta ad illuminazione naturale indiretta per circa 20 mesi per mostrare uno sviluppo completo.

Questa colonna mostra una differenziazione degli strati più modesta rispetto alla COLONNA 1 e si è sviluppata più lentamente dell'altra.



FOTO 15 : COLONNA 2 Interfasi Fase solida – Fase acquosa e Fase acquosa – Fase aeriforme

All'interfase Fase solida – Fase acquosa si nota uno spesso strato di cianobatteri di color bruno – aranciato sovrastato da uno strato più sottile di cianobatteri verdi.

All'interfase Fase acquosa – Fase aeriforme si nota un tappeto galleggiante e trasparente costituito da un biofilm più spesso e sviluppato rispetto a quello della COLONNA 1.



FOTO 16 : Cianobatteri nel tappeto galleggiante della COLONNA 1 ingranditi 1000 volte.



FOTO 17 : Cianobatteri nel tappeto galleggiante della COLONNA 2 con diatomee ingranditi 1000 volte.

In alto alla diatomea dalle dimensioni maggiori che presenta superiormente una struttura a forma stellata si nota un esemplare di cianobatterio policistato.

BIOFILM : CARATTERISTICHE GENERALI E FUNZIONI

Il **biofilm** è un **aggregato di microorganismi** in cui tutte le cellule sono sia attaccate tra di loro che ancorate ad una particolare superficie; esso può svilupparsi sulle superfici più disparate.

Queste cellule sono spesso incorporate all'interno di una matrice polisaccaridica, nota come **EPS**, contenente zuccheri e DNA, che intrappola una grandissima serie di composti vantaggiosi per la crescita batterica.

FASI DI SVILUPPO DEL BIOFILM

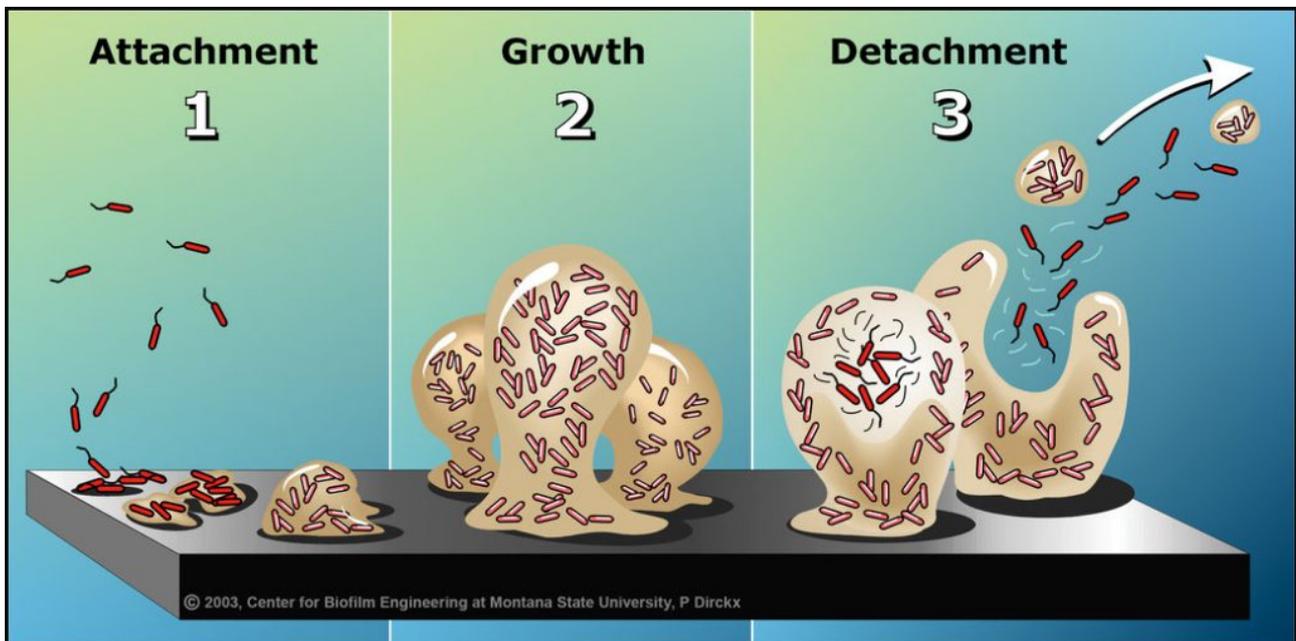


FOTO 18 : Fasi di sviluppo del biofilm

PRIMA FASE

L'attacco iniziale dei microorganismi ad un biofilm avviene grazie alle forze di Van Der Waals, attraverso un legame debole; tale attacco è regolato dalle caratteristiche ambientali.

SECONDA FASE

Nel momento in cui il microorganismo constata che la superficie è vantaggiosa per la formazione di un biofilm, si consuma l'**attacco irreversibile**.

I microorganismi iniziano a sintetizzare una serie di **strutture superficiali (pili, fimbrie, proteine di ancoraggio)** che lo aiutano ad aderire alla superficie e ad altri batteri, formando una **microcolonia**.

Questa fase di attacco irreversibile non è controllata dalle caratteristiche ambientali, ma dal **quorum sensing**.

TERZA FASE

Dopo la formazione delle microcolonie avviene la **maturazione** del biofilm, mediante la produzione di materiale polisaccaridico che forma l'**EPS**.

Invece, i microorganismi prossimi all'EPS possono sfruttare il meccanismo della **dispersione**, cioè uscire dal biofilm e colonizzare ambienti limitrofi.

CARATTERISTICHE DEL BIOFILM

Il biofilm è una **struttura molto vantaggiosa** perché assicura la **vicinanza ad una fonte nutritiva** ed **aumenta la possibilità di trasferimento genico** tra batteri; infatti, se nel biofilm ci sono batteri non virulenti, questi possono diventarlo grazie all'acquisizione di DNA esogeno.

Durante la crescita di batteri in un biofilm i microrganismi presentano **fenotipi biofilm specifici**, cioè cambia la loro fisiologia, l'espressione genica e la velocità di crescita (replicano in modo più lento).

In particolare, negli strati più superficiali del biofilm abbiamo microorganismi che sfruttano facilmente nutrienti e ossigeno in condizioni ottimali, mentre nello strato sottostante vi sono batteri che vengono definiti **slow growing**, che a un certo punto modificano il loro metabolismo e la loro crescita, rallentandoli.

Questo è importante perché trattando, ad esempio, un biofilm con una cura antibiotica, si avrà la morte dei microrganismi che si trovano più in superficie, mentre negli strati sottostanti ci saranno questi batteri dal metabolismo rallentato sui quali l'antibiotico non riesce ad agire.

Inoltre, l'utilità del biofilm è rafforzata dalla produzione di proteine che favoriscono l'estrusione di sostanze tossiche dall'interno del biofilm stesso.

FATTORI CHE INFLUENZANO LA FORMAZIONE DEL BIOFILM

La formazione del biofilm è influenzata da diversi fattori:

- **superficie**: le cui proprietà chimico-fisiche favoriscono o meno la formazione di biofilm. Nella fattispecie, esso cresce più velocemente su **plastica** e **substrati naturali**;
- **pellicole**: piccoli strati di materia organica o inorganica che si presentano sulla superficie in cui si forma il biofilm. In particolare, la presenza di una pellicola favorisce l'attacco dei microrganismi e, quindi, la formazione del biofilm;
- **condizioni generali**: pH, temperatura e presenza di nutrienti;
- **proprietà cellulari**: caratteristiche della parete dei batteri. Ad esempio, se i batteri presentano pili o fimbrie, oppure sviluppano proteine di adesione saranno chiaramente facilitati a formare biofilm.

Tuttavia, i **biofilm possono essere anche dannosi per i batteri**, poiché i batteri che si trovano nello strato più superficiale hanno accesso ai nutrienti, cosa che non accade a quelli negli strati basali le cui sostanze citoplasmatiche sono rilasciate nel biofilm e sfruttate dagli altri microrganismi; lo stesso discorso vale per l'ossigeno.

SVILUPPO DEL BIOFILM E *QUORUM SENSING*

Una volta che i microorganismi hanno aderito formando una microcolonia, prima che si sviluppi un biofilm maturo deve attivarsi il meccanismo del *quorum sensing*.

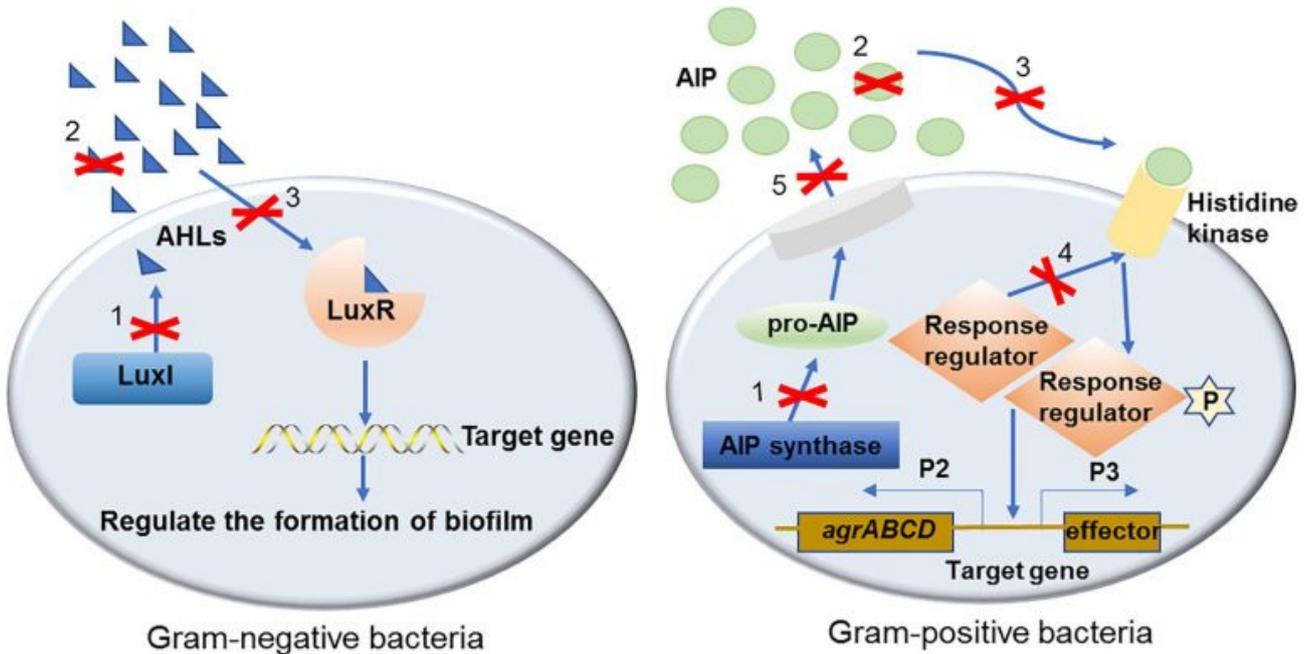


FOTO 19 : *Quorum sensing* in batteri gram negativi e positivi

I batteri iniziano a comunicare tra loro tramite composti chimici e quando si arriva ad una certa concentrazione di questi composti (detta appunto *quorum sensing*) si scatena una risposta a cascata che porta alla formazione del biofilm.

I composti in questione sono gli **autoinduttori** e servono a reclutare altri batteri; specificamente, la sintesi e la captazione di queste peculiari sostanze è un meccanismo che porta alla modulazione dell'espressione genica come risposta ad una determinata molecola.

Ciò favorisce l'espressione dei geni utili alla sintesi di pili, fimbrie, alla mitosi, al metabolismo, alla biosintesi di polisaccaridi, la sintesi di trasportatori di membrana e la sintesi di fattori sigma alternativi.

BIOFOULING E QUORUM QUENCHING

Il **biofouling** è un particolare tipo di biofilm all'interno del quale possono entrare particelle di natura non biologica e formare **incrostazioni**.

Esempi di *biofouling* sono quelli che si formano all'interno delle superfici d'acciaio delle condutture di acqua potabile.

Questo fenomeno si verifica anche a livello delle valvole cardiache dove, nella fattispecie, la fibrina, nel tentativo di proteggere il sistema, forma una sorta di barriera protettiva impedendo l'azione delle cellule immunitarie.

Tutto ciò, determina la costituzione di un'incrostazione che, se non trattata in tempo, può originare **endocarditi batteriche**.

Quindi, il *biofouling* è lo sviluppo di un **biofilm indesiderato che causa un'incrostazione dovuta all'accumulo e al trasporto di molecole non biologiche nell'interfaccia tra batteri e soluzione acquosa**.

Un caso molto interessante è quello dei *biofilm* che si formano durante il trattamento delle acque reflue, in cui essi possono andare ad intasare le membrane filtranti tramite incrostazioni, bloccando il processo di filtrazione.

Il metodo impiegato per evitare l'insorgenza di questo fenomeno consiste nel modificare i segnali chimici che i batteri si scambiano nel processo di *quorum sensing*; in particolare, molti gruppi di ricerca stanno provando a bloccare completamente questo processo.

In particolare è stato constatato che la **pressione transmembrana** durante il processo di depurazione delle acque in un bioreattore a membrana, ha un **andamento vario**.

Nella fattispecie, la **prima fase** è abbastanza lunga ed ha una pressione transmembrana costante nel tempo; mentre, la **seconda fase** è molto più veloce ed è caratterizzata da una pressione transmembrana crescente.

Nello specifico, quest'ultima fase corrisponde alla formazione del biofilm sulla superficie di filtrazione della membrana.

Quindi è stato ipotizzato che si può variare la velocità di aumento della pressione transmembrana riducendo o addirittura rimuovendo le molecole coinvolte nel *quorum sensing*, come ad esempio l'**omoserina lattone** che è responsabile anche del passaggio dalla fase 1 a quella 2.

Per ridurre la quantità di queste molecole vengono utilizzate altre molecole coinvolte nel **quorum quenching**, cioè l'inibizione del *quorum sensing*.

Queste molecole sono secrete da microrganismi specifici aggiunti appositamente per questo processo.

In particolare, sono state utilizzate delle **biglie** caratterizzate da **pori contenenti batteri** capaci di produrre **enzimi** coinvolti nel *quorum quenching*.

In questo modo, i batteri non si mescolano con la comunità microbica del bioreattore, ma gli enzimi passano attraverso i pori e svolgono la loro funzione.

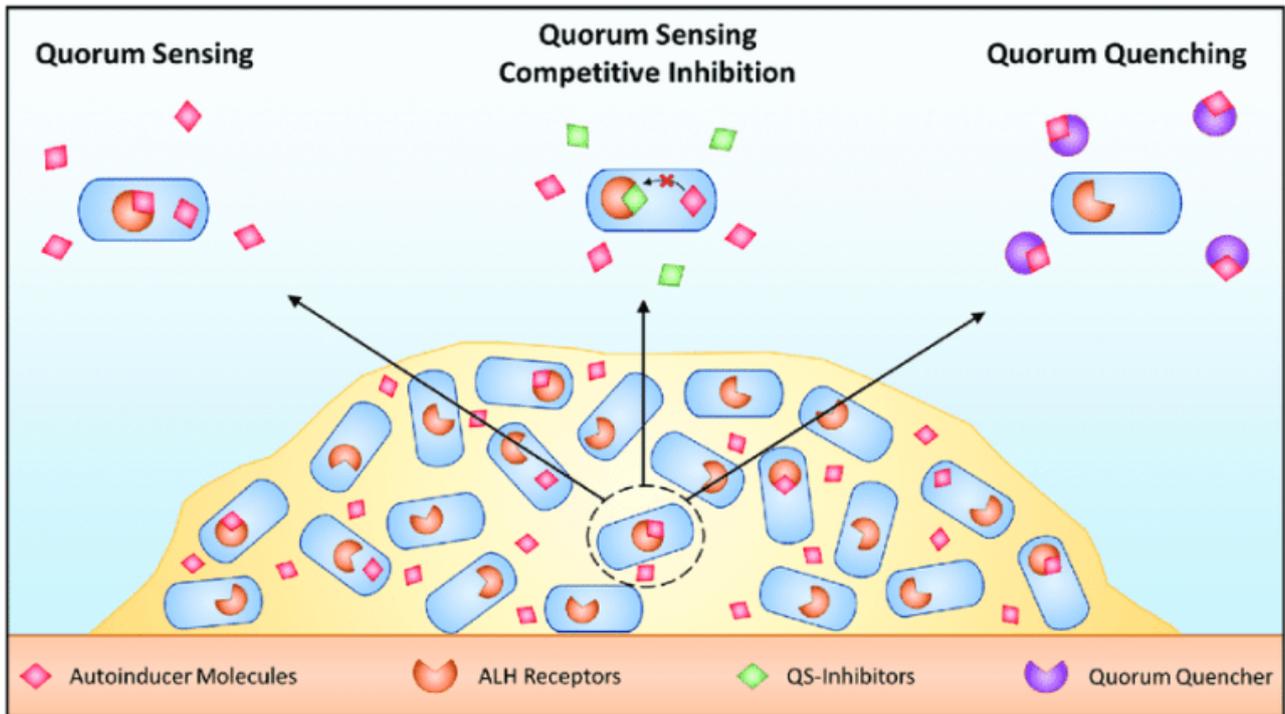


FOTO 20 : Meccanismi di *Quorum sensing* e *Quorum quenching*

INDUZIONE DELLA FORMAZIONE DI BIOFILM NELLE COLONNE DI VINOGRADSKIJ

Al fine di indurre la formazione di biofilm nelle colonne di Vinogradskij, il 03/02/2023 sono stati collocati dei tappi di polietilene con funzione di substrato all'interfase solido – liquido.



FOTO 21 : Inserimento di tappi di PE con funzione di substrato per la crescita di biofilm.

VERIFICA DELLA FORMAZIONE DI BIOFILM NELLE COLONNE DI VINOGRADSKIJ

Una prima verifica della formazione di biofilm nelle colonne di Vinogradskij è stata effettuata il 10/03/2023.

Si è notata un'iniziale formazione di biofilm sui substrati artificiali introdotti 1 mese prima ed inoltre una stratificazione di batteri verdi sotto lo strato superficiale di alghe, cianobatteri e rodobatteri.

Una successiva verifica della formazione di biofilm sui substrati artificiali introdotti 7 mesi prima è stata effettuata il 28/08/2023.

Risulta evidente una crescita di biofilm più copiosa sulla Colonna 2 rispetto a quella più ridotta sulla Colonna 1.



FOTO 22 : Biofilm formati sui tappi inseriti con funzione di substrati nelle colonne 1 e 2.



IMPIANTO DI DEPURAZIONE DELLE ACQUE UN ESEMPIO CONCRETO DI ECONOMIA CIRCOLARE BASATO SUL SISTEMA “ROTATING CELL BIOFILM REACTOR” (RCBR)

Il **Rotating Cell Biofilm Reactor (RCBR)**, o reattore a cella rotante a **biofilm**, è una nuova tipologia di processo biologico a fanghi attivi a biomassa adesa, impiegata nel trattamento delle acque reflue. I reattori RCBR costituiscono un'evoluzione degli impianti a dischi biologici: questi sistemi sono infatti in grado di sviluppare circa 10 volte la superficie biologica di questi ultimi, a parità di volume di reattore biologico (costituito dal pacco dei dischi).

Tale risultato viene ottenuto adoperando, in luogo di una serie di dischi fissati ad un albero centrale strutturale, una moltitudine di elementi plastici tridimensionali in qualità di carrier, atti a fornire la superficie biologica necessaria all'adesione del film batterico responsabile del processo depurativo. I suddetti elementi plastici sono a loro volta contenuti entro una cella permeabile di forma cilindrica, che richiama la sagoma del pacco reattore di una tradizionale macchina a biodischi.

Una delle principali peculiarità delle macchine RCBR è rappresentata dal fatto che i carriers biologici con cui viene riempita la cella di reazione sono comuni tappi di plastica di bottiglie d'acqua riciclati; il messaggio intrinseco portato da questa tecnologia è evidente: “Riconvertire un rifiuto trasformandolo in una risorsa per l'ambiente”.

Le acque reflue da trattare (industriali, civili, domestiche), in seguito a un trattamento primario di decantazione e/o grigliatura, vengono pompate all'interno dei moduli RCBR.

I tappi di plastica, a contatto con le acque sporche, vengono rivestiti da un film biologico di batteri, i quali si nutrono della sostanza organica disciolta nell'acqua, depurandola.

Le acque così depurate possono essere scaricate in un corpo idrico superficiale o nel terreno.

Se opportunamente disinfettate, integrando ai moduli un processo terziario di depurazione, le acque disinfettate possono essere riutilizzate per irrigare, riempire le vaschette delle toilette o per lavare oggetti, strade etc.



FOTO 23 : Cestello RCBR riempito con i carrier costituiti da tappi di plastica riciclati.



FUNZIONAMENTO

Una cella in acciaio inox piena di tappi di plastica di varie dimensioni ruota lentamente (1-3 giri al minuto) parzialmente immersa in una vasca, ove vengono fatte affluire le acque sporche da depurare. I tappi di plastica a contatto con le acque reflue formano spontaneamente un biofilm batterico, che in successione vede prima la formazione di batteri eterotrofi in grado di nutrirsi delle sostanze inquinanti a base di carbonio organico, quindi la diminuzione di concentrazione di COD e BOD e successivamente la formazione di batteri autotrofi, appartenenti ai generi *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* in grado di ossidare l'ammonio trasformandolo in nitriti e nitrati. La cella contenente i carriers (tappi) può essere allagata a piacimento; in questo modo si ottiene il controllo del processo di depurazione che può essere orientato sia alla rimozione del carbonio sia alla denitrificazione delle acque reflue. Questi impianti, come avviene per i dischi biologici, non necessitano di soffianti per l'ossigenazione del film batterico. È la lenta rotazione del reattore, immerso alternativamente nel liquame e in atmosfera, a garantire l'apporto di ossigeno sufficiente all'ossidazione per via aerobica degli inquinanti ad opera del film biologico aderente ai carriers. In questo modo si riducono notevolmente i costi di funzionamento e gestionali del trattamento.

CONFIGURAZIONI

La tecnologia RCBR è a tutti gli effetti un sistema di trattamento biologico delle acque in grado di rendere più compatta ed efficiente la biologia di qualunque impianto di trattamento delle acque reflue. Per la depurazione delle acque reflue urbane viene installato a valle dei trattamenti primari (grigliatura, disoleazione, dissabbiatura, sedimentazione primaria) e a monte dei trattamenti terziari di disinfezione chimica o fisica (raggi ultravioletti, ozono) delle acque. La possibilità che il sistema offre di realizzare in spazi contenuti una notevole superficie di adesione per le colonie batteriche attive nella depurazione lo rende particolarmente adatto anche alla rimozione dell'azoto dalle acque di scarico in configurazione nitro-denitro: abbinando più moduli in serie, alcuni sommersi totalmente dal refluo (quindi in condizioni di anossia) operano come stadio di denitrificazione. Altri immersi solo parzialmente nel refluo, in presenza di ossigeno, operano invece la rimozione del carbonio e contestuale nitrificazione dell'ammonio. La semplicità del sistema e l'efficienza dimostrata nell'abbattere anche elevate concentrazioni di solidi sospesi e carbonio organico lo rendono utilizzabile quale pretrattamento a monte dei sistemi di potabilizzazione delle acque superficiali e sotterranee inquinate (fiumi, canali, falde, stagni e pozze temporanee di acqua piovana).

CONSUMI E MANUTENZIONE

Questo sistema a biofilm adeso non necessita dell'applicazione di aria insufflata per ossigenare la popolazione batterica. È la semplice rotazione del cestello a determinarne l'ossigenazione per semplice diffusione. I costi energetici di questa tecnologia sono quindi molto bassi e relativi solo al moto rotatorio impresso da un motore elettrico alla cella di reazione per mantenere il dispositivo in lento movimento. L'applicazione della tecnologia RCBR abbatte generalmente del 90% i costi elettrici della depurazione, con un consumo medio di circa 0,25 kilowattora per metro cubo di refluo civile depurato. I bassi consumi di questa tecnologia rendono molto semplice l'integrazione di questi impianti con energie rinnovabili, quali impianti fotovoltaici o eolici. L'impianto meccanico delle macchine RCBR non necessita di importanti operazioni di manutenzione ordinaria o di competenze tecniche specializzate per controllarne il funzionamento: infatti è richiesto solo il comune ingrassaggio dei supporti di rotazione della cella.

L'INVENZIONE

RCBR è un'invenzione italiana del chimico Sergio Modenese. Il primo brevetto relativo alla tecnologia RCBR è stato depositato nel luglio 2013 da un'azienda start-up innovativa trentina di cui l'inventore risulta essere uno dei soci fondatori.



FOTO 24 : La cella rotante



FOTO 25 : Modulo RCBR singolo



FOTO 26 : Pannello di controllo



FOTO 27 : Un impianto di depurazione a misura d'uomo

COME E DOVE È STATA SVILUPPATA LA TECNICA RCBR



FOTO 28 : I contatti dell'azienda produttrice del depuratore RCBR

Il depuratore ecosostenibile? Altro che hi-tech, funziona con tappi di plastica riciclati

“Li comperiamo dalle onlus che li raccolgono presso scuole ed associazioni, sostenendo in tal modo diversi progetti di solidarietà”, spiega Dario Savini, amministratore delegato di Eco-Sistemi. La giovane azienda, nata nel 2013 come spin-off dell'Università di Pavia, è una delle startup innovative attratte in Trentino grazie all'incubatore green e quindi sostenuta finanziariamente con il Seed Money.

Il primo cliente? Un birrificio di Novara

L'idea messa a punto nei laboratori dell'Università di Pavia e diventata impresa in Trentino, è geniale, economica ed ecologica: utilizzare banalissimi **tappi di plastica riciclati** al posto di costosi dispositivi prestampati, dove far crescere le colonie batteriche che, mangiandosi “lo sporco”, rendono possibile la depurazione.

Un prototipo funziona già presso il depuratore di Rovereto, in località Navicello. Eco-Sistemi è stata impegnata anche in Puglia, in un cantiere internazionale per la realizzazione di un fitodepuratore. Ma il primo “vero” cliente è il birrificio agricolo Hordeum di Novara, dove la startup ha installato un sistema che **rimuove il carbonio e l'azoto contenuti negli scarti di lavorazione** della birra. La “macchina” si chiama RCBR, sigla che sta per “Rotating Cell Biofilm Reactor”, e tratta 5,5 metri cubi di refluo al giorno, corrispondente ad un carico inquinante di un piccolo paese con 300 abitanti.

«I tappi di plastica, oltre 430 chilogrammi – spiega Dario Savini - sono contenuti in un cestello in acciaio inox che ruota lentamente all'interno di una vasca dove vengono fatte confluire le acque da depurare. Ruotando nell'acqua i tappi sviluppano una pellicola batterica, comunità di micro-organismi che rimuovono il carbonio organico ossidando l'ammoniaca a nitrati».



I vantaggi per la bolletta e l'ambiente

I dati del monitoraggio che arrivano dall'impianto di Novara sono ottimi. «Abbiamo registrato **consumi molto limitati**, pari a 1,2-1,5 kWh – spiega Savini – equivalenti a circa un decimo dei consumi di un impianto tradizionale, in linea con quanto riscontrato con il prototipo di Rovereto». La formazione del biofilm batterico avviene in solo una settimana di tempo e dopo tre settimane vengono abbattuti i valori della sostanza organica, dei solidi sospesi, dell'azoto nelle sue varie forme e del fosforo e le acque reflue rientrano nei parametri di legge e possono essere rilasciate negli scarichi. Anche l'**impatto paesaggistico è limitato**: mentre i depuratori tradizionali arrivano ad occupare una superficie di circa 20-25 metri quadrati, la macchina messa a punto da Eco-Sistemi misura 3,30 metri di lunghezza per 1,30 di larghezza.

La spinta del Seed Money

Eco-Sistemi, startup tecnologica sostenuta grazie al fondo Seed Money-Fesr è composta da quattro soci, due biologi, un chimico e un impiantista: Sergio Modenese (presidente), Dario Savini (amministratore delegato), Anna Occhipinti (consigliera) e Aniello Esposito (responsabile di produzione).

Oltre ai quattro soci fondatori dà lavoro ad altri due giovani ingegneri chimici.

«Con il Seed Money – spiega Savini – abbiamo finanziato il prototipo, registrato i brevetti e ci siamo affidati ad un'agenzia di marketing che ci sta aiutando nel definire la strategia di vendita, nella realizzazione del sito web e di altro materiale promozionale».

Guarda il video:

<https://youtu.be/jb9QHqV2NNQ?si=I-fGynHQ4qZbZqwo>