Dottorato: Sustainable Agricultural and Forestry Systems and Food Security-SASF 40° Ciclo

Titolo: Approccio integrato di nuovi bioprocessi per la valorizzazione di biomasse di scarto
Supervisor: Paolo Dessì e Olimpia Pepe
Co-supervisor: Valeria Ventorino e Ida Romano

Obiettivi del progetto di ricerca nel triennio e collaborazioni interdisciplinari:
Lo sviluppo delle tecnologie omiche integrate con le tecniche colturali ovvero la "culturomica", permette di isolare microrganismi che non possono essere coltivati utilizzando tecniche convenzionali, avviando così la rinascita della coltura in microbiologia (Lagier et al., 2018). La culturomica rappresenta un metodo di coltura ad alto rendimento che può permettere di ottenere nuovi ceppi batterici con un ruolo specifico, futuri candidati per la produzione di nuovi biocatalizzatori e bioprodotti (Ventorino et al. 2017; Pennacchio et al. 2018; Robertiello et al., 2023). L'uso di molteplici condizioni di coltura selettiva combinate con un'incubazione prolungata consente l'isolamento di nuovi ceppi o specie batteriche da ecosistemi naturali o sottoposti ad arricchimento selettivo. Il primo obiettivo di questo progetto di ricerca è individuare molteplici condizioni colturali, per migliorare le caratteristiche selettive dei terreni di coltura in modo da promuovere la crescita di popolazioni batteriche con attività funzionali specifiche. Da tali popolazioni si otterranno, quindi, gli isolati batterici da identificare e caratterizzare mediante tecniche molecolari di nuova generazione (NGS e ONT) (Agustinho et al., 2024). Lo studio dell'ecologia microbica dei biosistemi colturali mediante analisi metagenomiche (Pagliano et al. 2019) sarà utilizzato per comprendere l'efficacia dell'approccio culturomico sulla selezione di specifiche popolazioni batteriche funzionali. Questo aspetto sarà confermato anche dalla valutazione dell'espressione di geni di interesse biotecnologico in determinate condizioni culturali. I nuovi ceppi batterici saranno caratterizzati e selezionati in base al loro potenziale biotecnologico attraverso l'utilizzo di saggi semiquantitativi e quantitativi utilizzando anche substrati di crescita contenenti scarti e sottoprodotti agroindustriali a diversi livelli di scala (Pagliano et al. 2020).
Una volta selezionati e coltivati gli organismi di interesse, il successivo step include il design e l'ottimizzazione del processo per ottenere selettività e tasso di produzione più alti possibili. Tipo di bioreattore, regime (batch o continuo) e condizioni operative (temperatura, pH, tempo di ritenzione idraulica e altri) devono essere scelti caso per caso, poiché dipendenti sia dal tipo di scarto o sottoprodotto agricolo da trattare, sia dal metabolismo del microorganismo responsabile del processo. Microorganismi fermentatori, che degradano i complessi substrati presenti negli scarti in prodotti di valore come acidi organici e alcool, sono particolarmente di interesse per le bioraffinerie (Alibardi et al. 2020). Tra i bioreattori di fermentazione, quelli a flusso verticale sono particolarmente adatti al trattamento di scarti agroindustriali liquidi, come il siero da latte (Dessì et al. 2020), mentre bioreattori ad agitazione meccanica sono preferibili con scarti solidi o semi-solidi, come scarti lignocellulosici (Nzeteu et al. 2022). Lo scopo di questa parte del progetto è di sfruttare l'intero potenziale dei microorganismi selezionati sviluppando, in bioreattori, le condizioni necessarie per ottenere alti tassi di produzione di biomasse microbiche e molecole di interesse come gli acidi carbossilici, tra le altre.

Collaborazioni interdisciplinari
AGRI-08/A – Microbiologia agraria, alimentare e ambientale (ex AGR/16 - MICROBIOLOGIA AGRARIA); CEAR-02/A - Ingegneria sanitaria-ambientale (ex ICAR/03 – INGEGNERIA SANITARIA E AMBIENTALE)
Durante lo sviluppo del progetto di tesi di dottorato potranno anche essere inserite ulteriori collaborazioni interdisciplinari

Elementi di innovazione e/o originalità del progetto rispetto allo stato dell'arte:
Molti sono gli elementi di innovazione e originalità del progetto che riguardano l'approccio integrato proposto e le metodologie che saranno utilizzate. Infatti, la culturomica rappresenta un metodo di coltura ad alto rendimento utilizzato con successo, fino ad oggi, soprattutto in campo medico (Song et al., 2024). Il suo utilizzo anche in altri campi della microbiologia può

permettere di ottenere nuovi ceppi batterici con un ruolo specifico, futuri candidati per interessanti applicazioni biotecnologiche per la produzione di nuovi biocatalizzatori e bioprodotti. Tale obiettivo prevede la ricerca di nuovi ecosistemi naturali e la pianificazione di protocolli colturali specifici e complessi associati a tecnologie molecolari di nuova generazione da adattare alla culturomica applicata alla bioeconomia. Inoltre, la selezione biotecnologica mediante metodi colturali e enzimatici specifici, prevederà anche l'uso di tecnologie molecolari per rilevare alcuni geni di interesse in grado di mettere in evidenza nuovi ceppi microbici con elevate performance applicative.
Da un punto di vista ingegneristico, diversi progetti hanno esplorato l'utilizzo di colture microbiche miste, non definite (per esempio da fango anaerobico o sedimenti naturali) in biotecnologia. Questo approccio è stato spesso preferito per semplificare le operazioni ma lascia dei dubbi sulla riproducibilità e sulla standardizzazione dei processi. Colture pure, e in particolare ceppi isolati, sono stati utilizzati di raro in fermentatori ad alto tasso di produzione per il trattamento di scarti organici. Un'innovazione chiave di questo progetto è lo sviluppo di bioreattori che consentano di mantenere pure le colture microbiche, evitando possibili contaminazioni microbiche dagli scarti. Questo sarà ottenuto utilizzando membrane selettive che consentano il passaggio dei substrati necessari per il processo, evitando un contatto diretto tra scarti contaminati e microorganismi di interesse.

Disponibilità fondi:
PNNR MUR – M4C2. Investimento 1.4. Agritech. Budget: 210.000,00 €
Progetto AGER 2022-3307 - From SOil to Soil: origin and remediation to KIWIfruit Vine Decline Syndrome (SOS-KIWI). Budget: 99.000,00 €
Fondi Dipartimento Eccellenza – Progetto RESTART. Budget: 50.000,00 €

Collaborazioni con istituzioni straniere:
Collaborazione con prof. Sebastià Puig presso il Laboratorio di ingegneria chimica e ambientale (LEQUIA) dell'Università di Girona, Spagna, per lo sviluppo e operazione di bioreattori avanzati ad alto tasso di produzione.

PhD: Sustainable Agricultural and Forestry Systems and Food Security-SASF 40° Cicle

Title: Integrated approach of novel bioprocesses for the valorization of waste biomasses
Supervisor: Paolo Dessì e Olimpia Pepe
Co-supervisor: Valeria Ventorino e Ida Romano

Objectives of the research project and interdisciplinary collaborations:
The development of omics technologies integrated with cultural techniques or "culturomics", allows the isolation of microorganisms that cannot be cultivated using conventional techniques, thus starting the rebirth of culture in microbiology (Lagier et al., 2018). Culturomics represents a high-throughput culture method to obtain new bacterial strains with a specific role, future candidates for interesting biotechnological applications to produce new biocatalysts and bioproducts (Ventorino et al. 2017, Pennacchio et al. 2018, Robertiello et al., 2023). The use of multiple selective culture conditions combined with prolonged incubation allows the isolation of new bacterial strains or species from natural ecosystems or those subjected to selective enrichment. The first objective of this research project is to identify multiple cultivation conditions, to improve the selective characteristics of culture media to promote the growth of bacterial populations with specific functional activities. From these populations, bacterial isolates will therefore be obtained to be identified and characterized using new-generation molecular techniques (NGS and ONT) (Agustinho et al., 2024). The study of the microbial ecology of cultural biosystems using a metagenomic approach (Pagliano et al. 2019) allows to understand the effectiveness of the culturomics approach on the selection of specific functional bacterial populations. This aspect will also be confirmed by the evaluation of the expression of

genes of biotechnological interest in certain cultural conditions. The bacterial strains obtained from culturomic approach will be identified and selected based on their biotechnological potential through semi-quantitative and quantitative assays also using growth substrates containing agro-industrial wastes and by-products at different scale levels (Pagliano et al., 2020).
Once the strains of interest have been identified and cultivated, the next step involves process design and optimization to achieve the highest production rate and selectivity. Bioreactor type, regimen (continuous or batch) and operation conditions (temperature, pH, hydraulic retention time, among others) must be selected on a case-by-case basis, as dependent both on the agricultural waste to be treated, and on the metabolism of the microorganisms carrying out the transformation. Fermentative microorganisms, that degrade complex organic waste substrates into valuable products such as organic acids and alcohols, are of particular interest for circular biorefineries (Alibardi et al. 2020). Among fermentative bioreactors, up-flow bioreactors are particularly suited for liquid agro-industrial wastes, such as cheese whey (Dessì et al. 2020), while mechanically mixed reactors must be preferred with dry or semi-dry waste, such as lignocellulosic waste material (Nzeteu et al. 2022). The scope of this part of the project is to exploit the full potential of the identified microorganisms, in bioreactors, to obtain high-rate production of microbial biomass and valuable molecules such as carboxylic acids, among others.

Interdisciplinary collaborations
Agricultural microbiology (AGRI-08/A); Sanitary and environmental engineering (CEAR-02/A).

Innovation and originality of the project in relation to the state of the art:
There are many elements of innovation and originality in the project concerning the integrated approach proposed and the methodologies that will be used. Culturomics represents a high-yield culture method used successfully, to date, especially in the medical field (Song et al., 2024). Its use also in other fields of microbiology can allow to obtain new bacterial strains with a specific role, future candidates for interesting biotechnological applications to produce new biocatalysts and bioproducts. This objective involves the search for new natural ecosystems and the planning of specific and complex cultivation protocols associated with new-generation molecular technologies to be adapted to culturomics applied to the bioeconomy. Furthermore, biotechnological selection, through specific cultural and enzymatic methods, will also include the use of molecular technologies to detect some genes of interest for the identification of new microbial strains with high application performance.
From an engineering point of view, a multitude of projects explored the use of undefined mixed cultures of microorganisms (e.g., collected from anaerobic sludge or natural sediments) for biotechnology. This approach has been often preferred for ease of operation but poses a question mark in aspects such as replicability and product standardization. Pure cultures, and particularly new, isolated strains, have been rarely used in high-rate fermenter treating waste. One key innovation of this project will be to develop bioreactors allowing to maintain pure microbial cultures, avoiding possible microbial contamination from the waste substrates. This will be obtained through the use of selective membranes that allow cross-over of the substrates required for the process, while avoiding direct contact between contaminated waste and microorganisms of interest.

Grant availability:
PNNR MUR – M4C2 Investimento 1.4 Agritech
Progetto AGER 2022-3307 - From SOil to Soil: origin and remediation to KIWIfruit Vine Decline Syndrome (SOS-KIWI).
Department of Excellence funds –RESTART project (Prof. Paolo Dessì, 000001 BUDGET ECONOMICO)

Collaborations with foreign institutions:

Collaboration with prof. Sebastià Puig at the Laboratory of chemical and environmental engineering (LEQUIA) of University of Girona, Spain, for the development and operation of high-rate bioreactors.

References

Alibardi, L., Astrup, T. F., Asunis, F., Clarke, W. P., De Gioannis, G., Dessì, P., Lens, P. N. L., Lavagnolo, M. C., Lombardi, L., Muntoni, A., Pivato, A., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., Spagni, A., & Spiga, D. (2020). Organic waste biorefineries: Looking towards implementation. *Waste Management*, *114*, 274–286.

Agustinho, D. P., Fu, Y., Menon, V. K., Metcalf, G. A., Treangen, T. J., & Sedlazeck, F. J. (2024). Unveiling microbial diversity: harnessing long-read sequencing technology.*Nature Methods*, 1-13.

Dessì, P., Asunis, F., Ravishankar, H., Cocco, F. G., De Gioannis, G., Muntoni, A., & Lens, P. N. L. (2020). Fermentative hydrogen production from cheese whey with in-line, concentration gradient-driven butyric acid extraction. *International Journal of Hydrogen Energy*, *45*, 24453–24466.

Lagier, J. C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., ... & Raoult, D. (2018). Culturing the human microbiota and culturomics. Nature Reviews Microbiology, 16(9), 540-550.

Nzeteu, C., Coelho, F., Davis, E., Trego, A., & O'Flaherty, V. (2022). Current Trends in Biological Valorization of Waste-Derived Biomass: The Critical Role of VFAs to Fuel A Biorefinery. In *Fermentation* (Vol. 8, Issue 9). MDPI

Pagliano, G., Gugliucci, W., Torrieri, E., Piccolo, A., Cangemi, S., Di Giuseppe, F.A., Robertiello, A., Faraco, V., Pepe, O., Ventorino, V. (2020). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from dairy wastewater effluent: bacterial accumulation, structural characterization, and physical properties. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 7:29.

Pagliano, G., Ventorino, V., Panico A., Romano I., Pirozzi F., Pepe O. (2019). Anaerobic process for bioenergy recovery from dairy waste: Meta-analysis and enumeration of microbial community related to intermediates production. Frontiers in Microbiology, 9:3229.

Pennacchio, A., Ventorino, V., Cimini, D., Pepe, O., Schiraldi, C., Inverso, M., Faraco, V. (2018). Isolation of new cellulase and xylanase producing strains and application to lignocellulosic biomasses hydrolysis and succinic acid production. Bioresource Technology, 259:325-333

Robertiello, A., Romano, I., Ventorino, V., Faraco, V., Pepe, O. (2023). Enhancing succinic scid production by sequential adaptation of selected *Basfia succiniciproducens* strains to *Arundo donax* hydrolysate. Fermentation, 9:573.

Song, H. S., Kim, Y. B., Kim, J. Y., Roh, S. W., & Whon, T. W. (2024). Advances in Culturomics Research on the Human Gut Microbiome: Optimizing Medium Composition and Culture Techniques for Enhanced Microbial Discovery.

Ventorino, V., Robertiello, A., Cimini, D., Argenzio, O., Schiraldi, C., Montella, S., Faraco, V., Ambrosanio, A., Viscardi, S., Pepe, O. (2017). Bio-based succinate production from *Arundo donax* hydrolysate with the new natural succinic acid-producing strain *Basfia succiniciproducens* BPP7. Bioenergy Research, 10:488-498.