



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE (DEB)**

**Corso di Dottorato di Ricerca in**

Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche - XXVIII Ciclo

**“Studio delle comunità microbiche coinvolte nel processo di digestione anaerobica e valorizzazione energetica di biomasse lignocellulosiche di scarto”**

(s.s.d. BIO/07)

**Tesi di Dottorato**

Dott.ssa Valentina Mazzurco Miritana

**Coordinatore del corso**

Prof. Daniele Canestrelli

**Tutore**

Prof. Massimiliano Fenice

**Co-Tutore per l'Enea**

Dott.ssa Giulia Massini

Dott.ssa Silvia Rosa

**16/06/2017**

*A Filippo*

## INDICE

PARTE INTRODUTTIVA .....	4
<b>PREMESSA</b> .....	4
1. LA DIGESTIONE ANAEROBICA .....	9
1.1 Caratteristiche del processo .....	9
1.1.1 Principali parametri chimico-fisici di processo e fattori di inibizione.....	14
1.1.2 Digestori anaerobici e configurazioni di processo .....	17
1.2 Comunità microbiche della DA: aspetti ecologico-funzionali.....	19
1.2.1 Sintrofia: aspetti ecologici ed energetici .....	20
1.2.2 Caratteristiche evolutive e composizione della guild di metanogeni.....	23
1.3 I Funghi Ruminali Anaerobi: potente componente idrolitica .....	26
1.3.1 Caratteristiche ecologiche dei funghi anaerobi ruminali .....	27
1.3.2 Proprietà idrolitiche.....	28
1.3.3 Applicazione dei funghi anaerobi ruminali nella digestione anaerobica .....	29
1.4 Analisi della comunità microbica .....	32
1.4.1 Marcatori molecolari in ecologia microbica .....	32
1.5 Tecniche molecolari basate sull'amplificazione PCR .....	34
1.5.1 New Generation Sequencing (NGS) .....	35
1.6 Analisi della composizione di specifiche comunità microbiche mediante Fluorescence In Situ Hybridization (FISH).....	37
SCOPO DEL LAVORO .....	39
2 MATERIALI E METODI.....	40
2.1 Substrato: Paglia di Grano .....	40
2.1.1 Caratterizzazione.....	40
2.2 Inoculi .....	41
2.2.1 Funghi Anaerobi Ruminali.....	41
2.2.2 Pool batterico fermentante F210.....	44
2.2.3 Comunità metanogena.....	45
2.3 Analisi della produzione di biogas.....	47
2.3.1 Water Displacement .....	47
2.3.2 Gas Cromatografia (GC).....	48
2.4 Analisi degli intermedi di processo tramite High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	48
2.5 Allestimento dei reattori e Campionamenti - I sperimentazione .....	49
2.6 Allestimento dei reattori e Campionamenti - II sperimentazione .....	50
2.6 Analisi microbiologiche.....	51
2.6.1 Stima della densità cellulare tramite conta diretta in Microscopia ad Epifluorescenza....	51
2.6.2 Preparazione dei campioni per la FISH .....	53

---

2.7 Illumina .....	56
2.7.1 Estrazione del DNA .....	56
2.8 Elaborazione dati.....	56
2.8.1 Misure di diversità .....	56
2.8.2 Calcolo produzioni cumulative .....	57
2.8.3 Analisi statistica dei dati sperimentali .....	58
3. RISULTATI.....	59
3.1 Descrizione della rationale degli esperimenti e motivazione della scelta sperimentale.....	59
3.2 Parametri di processo misurati.....	60
3.3 I sperimentazione: ruolo della struttura degli inoculi nella produzione di biogas .....	61
3.3.1 Piano Sperimentale .....	61
3.4 Risultati I Sperimentazione.....	62
3.4.1 Produzione di biogas.....	62
3.4.2 Produzione di intermedi di processo.....	63
3.4.3 Analisi tassonomica della comunità microbica: metodo Illumina.....	64
3.4.4 Analisi funzionale della comunità microbica: FISH.....	70
3.5 II Sperimentazione: bioaugmentation con Funghi Anaerobi Ruminali e batteri fermentanti F210 .....	77
3.5.1 Piano sperimentale .....	77
3.6 Risultati II Sperimentazione.....	78
3.6.1 Produzione di biogas.....	78
3.6.2 Produzione di intermedi di processo.....	80
3.6.3 Analisi tassonomica della comunità microbica: metodo Illumina.....	82
3.6.4 Analisi funzionale della comunità microbica: FISH.....	88
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....	93
4.1 I sperimentazione .....	93
4.1.1 Produzione di biogas.....	93
4.1.2 Caratterizzazione ed identificazione delle comunità microbiche .....	94
4.2 II sperimentazione.....	100
4.2.1 Produzione di biogas.....	100
4.2.2 Produzione di intermedi di processo.....	101
4.2.3 Caratterizzazione ed identificazione delle comunità microbiche .....	102
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>106</b>
Bibliografia .....	109
Abbreviazioni ed acronimi.....	124

## PARTE INTRODUTTIVA

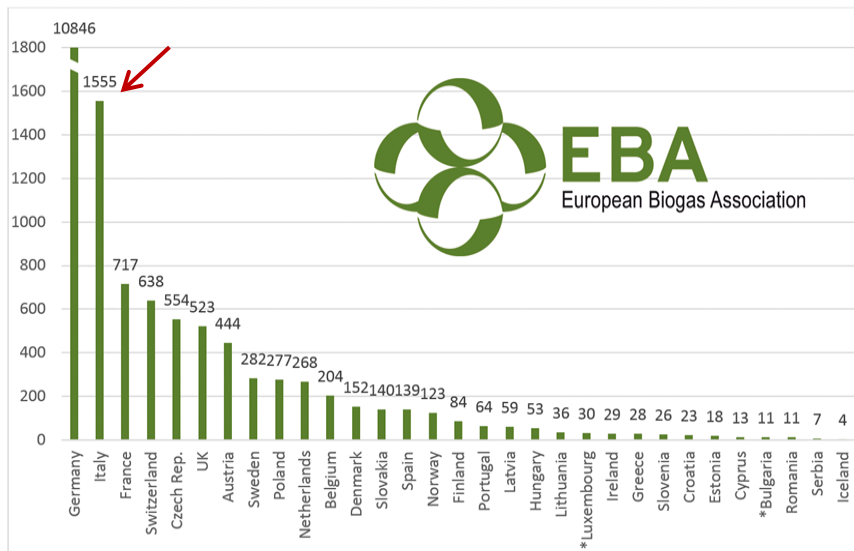
### PREMESSA

Due problematiche sono strettamente interconnesse con qualsiasi insediamento umano: il fabbisogno energetico e lo smaltimento di scarti e/o residui organici. La combinazione di questi due fattori, enfatizzata dalla crescita esponenziale della popolazione umana, sta mettendo in pericolo gli equilibri che regolano gli ecosistemi del pianeta. Per questo motivo l'attuale sistema di approvvigionamento energetico, insieme alla necessità di trattare gli scarti organici secondo cicli più virtuosi, richiede profonde trasformazioni (Moriarty and Honnery, 2012) e pertanto anche le più recenti politiche Europee sono orientate in questa direzione: la proposta di Direttiva (European Commission, 2016) in via di approvazione definitiva, pone come obiettivo al 2030 che il 27% dei consumi elettrici globali debbano derivare da fonti rinnovabili, e tale obiettivo deve essere accompagnato da una riduzione del 40% delle emissioni di gas serra (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, CFC) rispetto ai valori di riferimento, del 1990; ulteriori documenti strategici attualmente in discussione in sede EU pongono per il 2050 l'obiettivo della completa decarbonizzazione della produzione di energia elettrica.

Spinti da queste consapevolezza e da questi coraggiosi obiettivi, la comunità scientifica è alla ricerca del miglior sfruttamento possibile di fonti di energia alternativa, che siano diversificate, rinnovabili, facilmente disponibili e accumulabili, oltre che associate ad una tecnologia relativamente semplice ed economica. Sulla base di questi requisiti sta trovando ampio interesse la produzione di bioenergie utilizzando quale materiale di partenza le biomasse di scarto derivanti da lavorazioni agroindustriali e produzioni zootecniche oltre che dai rifiuti domestici (FORSU). Da questi è possibile ottenere, mediante processi biologici, energia in forma di biogas contenente CH<sub>4</sub>, ma anche bioidrogeno, o bio-alcool, attraverso un percorso virtuoso comunemente denominato "Waste-to-Energy" che mira ad incrementare processi produttivi sostenibili per il pianeta (Deublein & Steinhauser, 2008; Kothari et al., 2010).

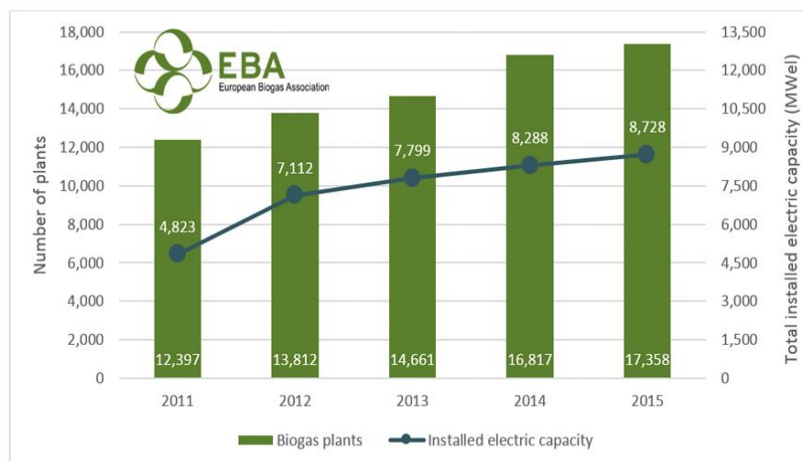
Di particolare interesse è la produzione di biogas mediante **Digestione Anaerobica (DA)** già ampiamente applicata, soprattutto presso le aziende zootecniche. Il processo consente, attraverso una tecnologia piuttosto collaudata, di assolvere il duplice compito di produrre energia smaltendo al contempo rifiuti organici, lungo un percorso virtuoso di valorizzazione energetica di biomasse di scarto (Paritosh et al., 2017). Il biogas ottenuto viene convogliato in "unità di cogenerazione" per ottenere elettricità e calore. Per i vantaggi offerti e per la relativa economicità e facilità di gestione, in Europa attualmente si contano più di 17.350 impianti a biogas (Fig. 1 e 2). L'Italia si colloca al secondo posto in Europa dopo la Germania: attualmente ne sono censiti 1550 (EBA, *European*

*Biogas Association*, report 2016), questo è dovuto anche agli incentivi concessi dal Governo Italiano riguardo le produzioni elettriche (Bortoluzzi et al., 2014), in recepimento delle Direttive Europee, che peraltro premiano l'uso di scarti e sottoprodotti della filiera agroalimentare e scoraggiano l'uso di colture dedicate (Direttiva Europea 17/10/2012).



17,358 biogas plants in Europe (31/12/2015)

Figura 1. Numero di impianti a biogas in Europa sulla base dei dati della European Biogas Association, aggiornati al 2016 (<http://european-biogas.eu/>)



Number of biogas plants and total installed capacity in Europe 2011 - 2015

Figura 2. Numero di impianti a biogas installati in Europa tra il 2011 e il 2015 e la relativa capacità elettrica installata European Biogas Association, 2016 – (<http://european-biogas.eu/>)

Se dunque la DA è tra i più promettenti processi per la valorizzazione energetica delle biomasse di scarto limitando al contempo le emissioni di CH<sub>4</sub> in atmosfera, è vero anche che l'efficienza del processo potrebbe essere ancora migliorata: il contenuto in CH<sub>4</sub> nel biogas è mediamente intorno al 55%-65%, poco più della metà del gas prodotto, mentre una grande quantità di energia chimica resta nel digestato. Inoltre non sono infrequenti malfunzionamento e collassi di processo e quindi, per motivi di precauzione, la gestione dei reattori viene di fatto effettuata mantenendo il sistema al di sotto della sua **capacità portante**. Da un'indagine condotta in Germania emerge che la quinta causa di malfunzionamento sia riconducibile alla **microbiologia** del reattore (indagine KTBL, dati 2008). E se i guasti di natura tecnologica possono essere riparati con una certa rapidità mediante interventi meccanici, elettrici ed idraulici le problematiche di natura biologica interessano tutta la microflora del digestore ed il corretto ripristino del processo richiede settimane ed interventi onerosi. Malgrado ciò gli impianti non sono monitorati per la componente microbiologica. Koch et al., (2014) sottolineano come composizione e funzione della comunità microbica siano analizzate solo retrospettivamente, soprattutto in caso di malfunzionamenti. Anzi si può affermare che, a livello impiantistico la comunità microbica, il vero motore della DA, è ancora considerata una “*black box*” e la ricerca, soprattutto nel campo dell'**ecologia microbica**, deve fare ancora molti passi per migliorare la stabilità operativa e l'efficienza del processo (Fisgativa et al., 2016) e non ultimo per riconoscere parametri di chiave, di natura microbiologica, che siano monitorabili con tecniche piuttosto speditive (De Vrieze et al., 2016).

La DA è un processo naturale, operato da complesse comunità microbiche per mezzo delle quali, in assenza di ossigeno, la sostanza organica viene degradata e trasformata in biogas, composto principalmente da CH<sub>4</sub> (50-75%) e anidride carbonica (25-45%). Durante il processo si assiste all'idrolisi e alla liquefazione dei biopolimeri complessi e alla gassificazione degli intermedi di produzione (Ali Shah et al., 2014). Ciò che rimane indigerito alla fine del processo è un residuo solido detto digestato.

La comunità microbica che opera la DA è complessa ed è composta da differenti gruppi funzionali di microorganismi che hanno **coevoluto** la capacità di operare in sequenza: i ruoli chiave che svolgono sono riconosciuti nelle attività degli idrolitici, degli acidogeni, degli omoacetogeni, dei sintrofici acetogenici e, solo in ultimo, dei metanogeni (Kato & Watanabe, 2010; Ito et al., 2011; Lane et al., 2013; Ali Shah et al., 2014; Gosh et al., 2016). Tutti i gruppi funzionali devono essere presenti per poter completare l'intero processo di DA, anche qualora si utilizzi una sola tipologia di substrato. Tuttavia, quando si fa riferimento alla comunità microbica del processo di DA si fa fondamentalmente riferimento alla sola componente batterica. Studi recenti hanno messo in luce

come struttura e composizione della comunità microbica variano sulla base delle strategie che le componenti microbiche adottano per affrontare le condizioni ecologiche che si determinano nei digestori (Demirel and Yenigun, 2006; Theuerl et al., 2015). Si tratta di vere e proprie *guild*<sup>1</sup> funzionali e le ricerche più avanzate stanno indagando sulle **dinamiche inter ed intra-guild** in risposta alle condizioni operative del processo di DA (O’Flaherty et al., 2006; Ali Shah et al., 2014; De Vrieze et al., 2016) con l’obiettivo di renderlo più efficiente. A tutt’oggi si conosce poco su come i differenti gruppi di microorganismi interagiscono ma, soprattutto, come tali interazioni influenzino la produzione di biogas (Verstraete et al., 2007; Vanwonterghem et al., 2014).

In un tale scenario si è anche aperto un vivace dibattito sulla produzione di bioidrogeno, un vettore energetico di grande interesse. L’idrogeno (H<sub>2</sub>), infatti, è prodotto e consumato durante il processo di DA, nella fase di acidogenesi, ma una configurazione di processo innovativa, organizzata in due fasi, può permettere di separare l’H<sub>2</sub> prima del suo consumo da parte dei metanogeni ed in ogni caso ottimizza le condizioni di nicchia ecologica per le prime due fasi (Pohland et al., 1971; Demirel e Yenigun, 2002; Patriarca et al., 2016). Recenti ricerche sono dunque indirizzate verso una configurazione del processo in doppio stadio: nel primo reattore la fermentazione permette la rapida produzione di acidi organici ed alcoli (idrolisi e acidogenesi), che rilasciati nel secondo facilitano la produzione di CH<sub>4</sub> (Parawira et al., 2008; Saady & Hung, 2015) da parte della comunità metanogena, completa di tutte le sue componenti funzionali. Si tratta di una strategia per ottimizzare le **nicchie ecologiche** di differenti componenti funzionali della comunità microbica. Tuttavia il processo di produzione di H<sub>2</sub> è l’anello debole di questa nuova configurazione in quanto i processi di feedback negativi, quali la pressione parziale di H<sub>2</sub> e l’abbassamento repentino del pH, sono di difficile regolazione. Per questo motivo la sperimentazione è ancora a scala banco con poche esperienze in campo pilota.

Per tutti questi motivi si può affermare che la tecnologia legata alla DA è un tipico caso in cui lo **sviluppo tecnologico** è proceduto **più velocemente dello sviluppo delle conoscenze ecologiche**: con il lavoro di questo dottorato si è inteso contribuire ad ampliare le conoscenze ecologiche relative al processo di DA, ponendo l’attenzione sulle interazioni inter-intra guild.

---

<sup>1</sup> Il termine *guild* identifica un “gruppo di organismi in genere tassonomicamente relati, che svolgono funzioni simili in modo simile”. Pertanto il termine *guild* può essere anche sostituito dall’espressione “*guild* funzionale”. Un esempio di *guild* funzionale è rappresentato dal gruppo di microrganismi appartenenti al dominio *Archaea* in grado di produrre metano (*guild* di metanogeni).

Le ricerche riportate in questa tesi fanno parte del piano di ricerche dell'Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA, sulla Ricerca di Sistema Elettrico per la “Valorizzazione energetica di scarti agrozootecnici”. Le attività hanno avuto come obiettivo la “Valorizzazione energetica di scarti agrozootecnici” (RdS/PAR2012/2013/183) e il “Trattamento biologico di biomasse lignocellulosiche e chitinose per la produzione di H<sub>2</sub> e/o CH<sub>4</sub>” (RdS/PAR2013/252).

Le attività sperimentali sono state svolte presso l'ENEA –Centro Ricerche Casaccia, nel laboratorio Biomasse e Biotecnologie per l'Energia con la collaborazione dell'Università della Tuscia (UNITUS), Dipartimento di Ecologia e Biologia (DEB); laboratorio di microbiologia (cattedra di Microbiologia), Prof. Fenice.

# 1. LA DIGESTIONE ANAEROBICA

## 1.1 Caratteristiche del processo

La Digestione Anaerobica (DA) è un processo ampiamente diffuso negli ecosistemi naturali, ricchi di sostanza organica ma con basso tenore di ossigeno e anche di nitrato, solfato, ferro o manganese ossidato (Schink, 1997) (tab.1).

Tra questi ecosistemi sono compresi acque dolci poco profonde quali paludi, risaie, suoli sommersi, ma anche tratti intestinali umani e animali (grossi erbivori ruminanti e non, termiti e tarli) e ambienti di origine antropica, come discariche e digestori anaerobi. Per ragioni termodinamiche la metanazione si instaura quando sia l'ossigeno che altri accettori di elettroni termodinamicamente più convenienti sono consumati (Liu & Whitman, 2008) (Fig. 3), motivo per cui raramente si realizza in ambienti salmastri, solitamente ricchi in solfato (Izzo & Hull., 1991; Izzo et al., 2014).

Reaction	$E_h$ (V)	$\Delta G^\circ$
Reduction of $O_2$ $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2O$	0.812	-29.9
Reduction of $NO_3^-$ $2NO_3^- + 6H^+ + 6e^- \rightleftharpoons N_2 + 3H_2O$	0.747	-28.4
Reduction of $Mn^{4+}$ to $Mn^{2+}$ $MnO_2 + 4H^+ + 2e^- \rightleftharpoons Mn^{2+} + 2H_2O$	0.526	-23.3
Reduction of $Fe^{3+}$ to $Fe^{2+}$ $Fe(OH)_3 + 3H^+ + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+} + 3H_2O$	-0.047	-10.1
Reduction of $SO_4^{2-}$ to $H_2S$ $SO_4^{2-} + 10H^+ + 8e^- \rightleftharpoons H_2S + 4H_2O$	-0.221	-5.9
Reduction of $CO_2$ to $CH_4$ $CO_2 + 8H^+ + 8e^- \rightleftharpoons CH_4 + 2H_2O$	-0.244	-5.6

Tabella 1. Sequenza termodinamica per la riduzione di composti inorganici a pH 7; la metanogenesi è l'ultima delle reazioni attese lungo la scala di decrescita del potenziale redox (da Schlesinger, 1991).

Il processo di DA consiste in una sequenza di reazioni biochimiche operate da *guild* di microrganismi che in assenza di  $O_2$  convertono molecole organiche complesse come polisaccaridi, lipidi e proteine, principalmente in  $CH_4$  (50-75%) e  $CO_2$  (25-45%) (Saady, 2013; Bassani et al., 2015). Sono inoltre prodotte piccole quantità di altre sostanze, complessivamente il 5%, quali  $H_2S$ ,  $H_2$ ,  $CO$ ,  $N_2$ ,  $NH_3$ ,  $O_2$  e  $H_2O$  (Ali Shah et al., 2014). I principali passaggi metabolici sono riportati in figura 3: nel rettangolo sono evidenziate le fasi di idrolisi (A), acidogenesi (B) ed acetogenesi (C), tutte operate da microrganismi del dominio *Bacteria*; nel cerchio è evidenziata invece la fase di metanogenesi (D) operata esclusivamente da microrganismi del dominio *Archaea* (Garcia et al., 2000; Hedderich et al., 2013) (si veda oltre).

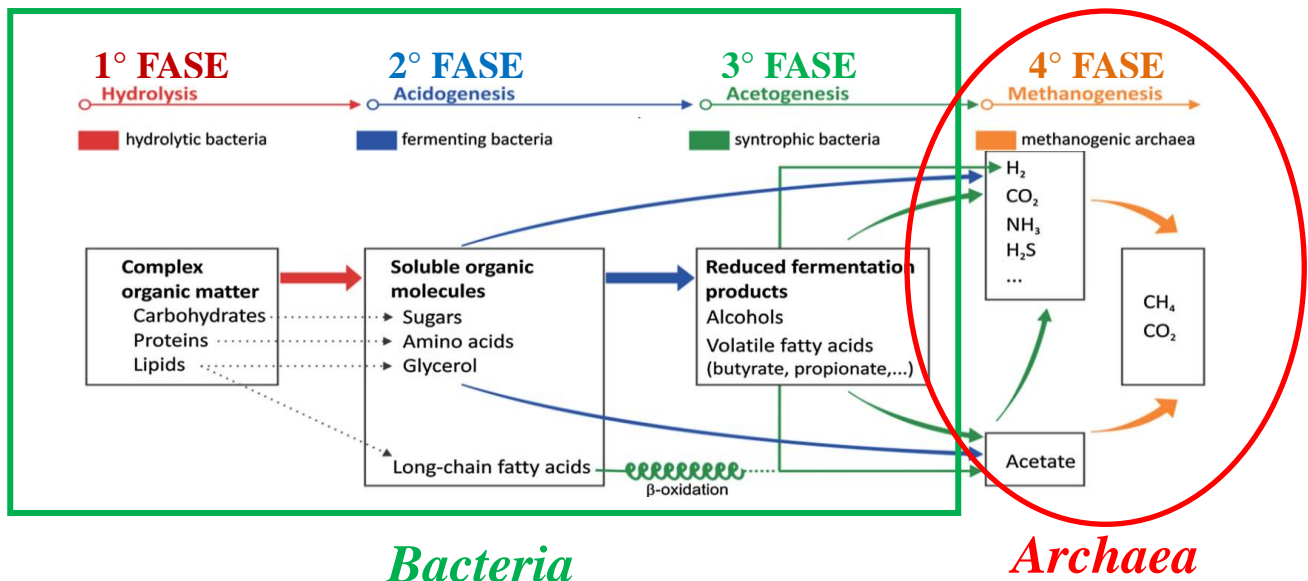


Figura 3. Rappresentazione schematica della catena metabolica del processo di DA, modificato da Cabezas et al., (2015). Nel rettangolo sono evidenziate le fasi operate da microrganismi del dominio *Bacteria*, nel cerchio le fasi operate dagli *Archaea*.

#### A. Idrolisi

In questa fase iniziale, molecole organiche complesse e biopolimeri, quali carboidrati, proteine e lipidi, vengono scissi in dimeri e monomeri solubili quali mono- e disaccaridi, aminoacidi e acidi grassi. Grazie a enzimi extracellulari del gruppo delle idrolasi (amilasi, proteasi e lipasi), prodotti da ceppi di batteri idrolitici (principalmente dei generi *Streptococcus*, *Enterobacterium*, *Ruminococcus*, *Anaerovibrio*, *Bacillus*) (Ali Shah et al., 2014) viene realizzata la rottura di legami chimici, principalmente di tipo C-O, C-N e C-C (Krause et al., 2003). Soprattutto nel caso di substrati costituiti da biopolimeri complessi, quali quelli lignocellulosici e chitinosi, l'idrolisi rappresenta un "collo di bottiglia" per la funzionalità dell'intero processo (Haitjema et al., 2014). Si stima che nel corso della digestione di scarti solidi fino al 50% dei composti rimanga nel suo stato originario a causa della carenza di enzimi necessari alla loro degradazione (Parawira et al., 2008).

Solo negli ultimi decenni, studiando le dinamiche degli ecosistemi ruminanti, si è compreso il ruolo chiave di un gruppo quasi sconosciuto di microorganismi, i Funghi Anaerobi Ruminanti (ARF) (Orpin, 1975; Orpin, 1977; Orpin & Joblin, 1986 e 1997; Haitjema et al., 2014; Solomon et al., 2016). Agli ARF è oggi riconosciuta una eccezionale capacità idrolitica che permette di aggredire i biopolimeri complessi, principalmente materiali lignocellulosici recalcitranti, superiore a quella di qualsiasi altro microorganismo e non solo nel ruminante. La loro azione è di natura sia fisica che chimica: infatti la crescita invasiva dei rizoidi è associata alla produzione di potenti enzimi idrolitici che degradano i polisaccaridi. Tra questi: cellulasi, xilanasi, emicellulasi, proteasi, amilasi, amiloglicosidasi, pectinasi (Lowe et al., 1987; Srinivasan et al., 2001). Gli enzimi attaccano la

parete cellulare, contribuendo per il 40-70% alla digestione del materiale vegetale in animali erbivori ruminanti e non (Akin & Rigsby, 1987; Akin et al., 1990).

### B. Acidogenesi

L'acidogenesi è la fase della DA in cui i metaboliti ottenuti dall'idrolisi vengono scissi in molecole organiche più semplici e vengono generati acidi grassi a catena corta: questo passaggio avviene ad opera di **batteri fermentanti**, detti **acidogeni**. Sono compresi batteri dei generi *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus* e *Flavobacterium* (Ali Sahah et al., 2014) che ossidano i substrati organici prodotti durante l'idrolisi a piruvato. Quest'ultimo viene poi trasformato in acidi grassi volatili (VFA, Volatile Fatty Acid), acido lattico, alcoli e chetoni.

Da un punto di vista termodinamico è interessante rilevare che la fermentazione è di fatto un processo metabolico anaerobico di tipo ossido-riduttivo in cui le molecole organiche costituiscono al contempo sia il donatore che l'accettore di elettroni ( $e^-$ ). In questa fase il substrato iniziale del processo viene solo parzialmente ossidato: il bilancio ossidoriduttivo viene mantenuto producendo uno o più prodotti organici che conservano ancora parte dell'energia del composto iniziale, ma soprattutto producendo  $H_2$  molecolare. L'acidogenesi prende anche il nome di fermentazione primaria o acido-mista, ed i suoi prodotti di maggior interesse nella DA sono l'acido lattico, l'acido acetico, l'acido propionico, l'acido butirrico e l'etanolo. Questi costituiscono utilizzati nella successiva fase acetogenica.

### C. Acetogenesi

In questa fase i **batteri fermentanti sintrofici** detti **acetogeni**, consumano gli acidi grassi volatili, l'acido lattico e gli alcoli formati nella fase precedente, producendo acido acetico,  $CO_2$  e  $H_2$ . L'acetogenesi gioca un ruolo chiave nell'efficienza del processo di produzione di biogas, soprattutto se condotto in condizioni di mesofilia ( $37^\circ C$ ) per il quale circa il 70% della produzione di  $CH_4$  si stima derivi dalla riduzione dell'acetato prodotto durante questa fase.

Le concentrazioni di  $H_2$ , che rischiano di inibire il processo, vengono mantenute sufficientemente basse ( $<100 Pa$ , Shink, 1997) grazie all'azione di microrganismi metanogeni che utilizzano l' $H_2$ , attraverso una relazione di simbiosi instaurata con gli acetogeni, per formare  $CH_4$  nel passaggio metabolico successivo. Dunque i batteri acetogeni costituiscono gli intermediari metabolici tra i batteri delle fermentazioni primarie (*Bacteria*), nella fase precedente, e i metanogeni (*Archaea*), coinvolti nella fase successiva. Shink, (1997) affrontando gli aspetti termodinamici di tale interazione ecologica, mette in luce che il *pool* di acetogeni deve essere tenuto piccolo (rispetto a quello delle altre componenti funzionali) per consentire una particolare ed efficiente associazione

mutualistica di cooperazione metabolica per entrambi gli organismi partner (si veda oltre paragrafo “Sintrofia: aspetti ecologici ed energetici”).

Gli acetogeni comprendono specie appartenenti alla classe *Deltaproteobacteria* (principalmente generi *Syntrophobacter*, *Geobacter*, *Desulfovibrio*, etc.) e specie Gram-positive a basso contenuto “G+C” (come *Syntrophomonas*, *Syntrophothermus*) (McInerney et al., 2008).

Sono coinvolti in questo passaggio degradativo anche i batteri **omoacetogeni**, un gruppo di microrganismi strettamente anaerobi capaci di passare da un metabolismo eterotrofo acetogenico, con consumo di acetato e produzione di  $H_2/CO_2$ , (Ito et al., 2011) ad un metabolismo autotrofo omoacetogeno, con reazioni metaboliche identiche ma con direzione inversa, ovvero consumo di  $H_2$  e  $CO_2$  per produrre acetato (Fig. 4).

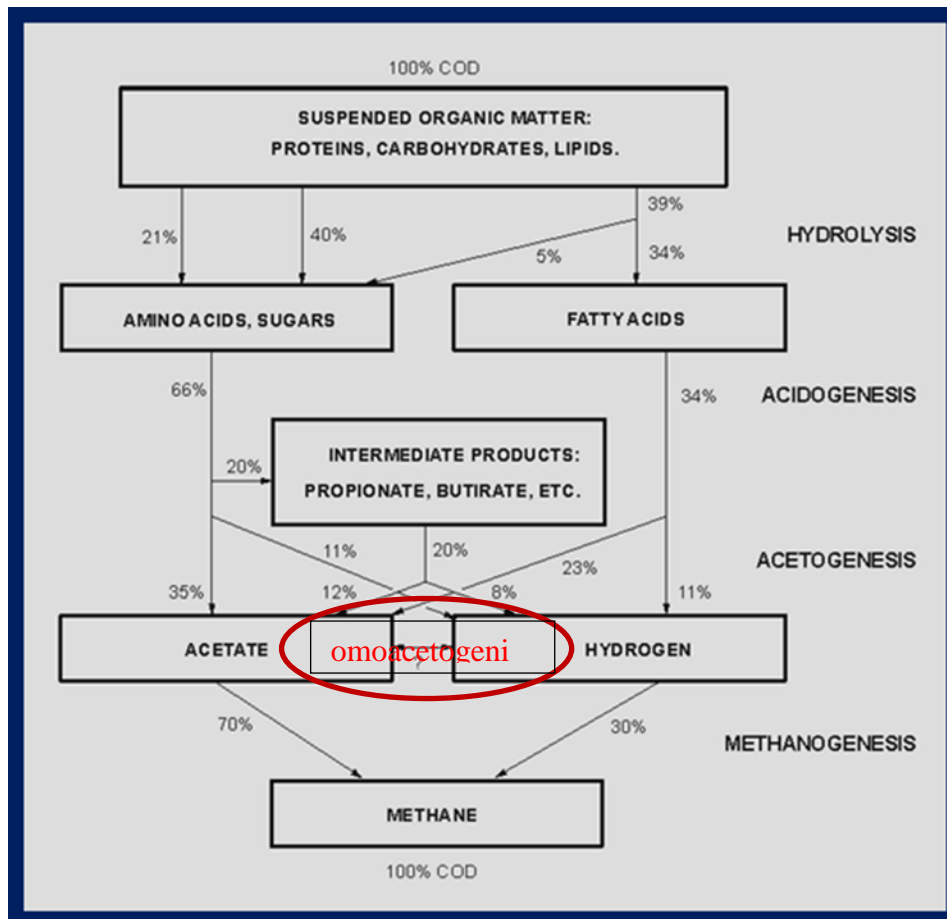


Figura 4. Rappresentazione schematica della rete di relazioni metaboliche del processo di DA. Nel cerchio è evidenziato il ruolo svolto dagli omoacetogeni. Confrontando le figure 3 e 4 si evidenzia come in quest'ultima emerge la complessità della rete di interazioni

Alti tassi di produzione di  $H_2$  fanno sì che la comunità microbica attui questa seconda via metabolica, cioè quella di consumo di  $H_2$  (Saady et al., 2013). Dunque questo gruppo di batteri

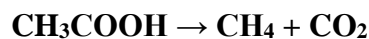
svolge un ruolo determinante nella regolazione dell'intero processo di DA, conferendo alla comunità la resilienza per adattarsi alle condizioni metaboliche create nei passaggi precedenti. Quattro passaggi metabolici sono infatti molti per una catena trofica (Post, 2002), e non è un caso che il meccanismo di regolazione degli omoacetogeni si sia evoluto al terzo passaggio, nel punto cruciale di interazione tra batteri appartenenti al dominio dei *Bacteria* e degli *Archaea*. Infatti la lunghezza delle catene trofiche è limitata oltre che da motivi termodinamici, cioè per la dissipazione dell'energia tra un passaggio e un altro (Odum & Barrett, 2007), anche perché aumentando il numero di passaggi aumenta il rischio di instabilità dell'intero processo.

E' interessante rilevare che l'utilizzo dell'H<sub>2</sub> da parte dei metanogeni produce più energia di quella derivante dall'omoacetogenesi, dunque si può affermare che gli omoacetogeni abbiano scarsa possibilità di competere con successo per l'utilizzo dell'H<sub>2</sub>, se presente a basse concentrazioni (Schink, 1997). I principali generi riconosciuti attivi nell'acetogenesi sono: *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Butyric bacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, etc. (Saady et al., 2013).

#### D. Metanogenesi

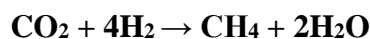
I composti semplici fin qui generati (CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) vengono infine convertiti in biogas (CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>) da parte di ***Archaea* metanogeni**. La produzione di CH<sub>4</sub> avviene attraverso due principali pathway metabolici:

- 1) *via acetoclastica*, operata da metanogeni acetotrofi principalmente dell'ordine dei *Methanosarcinales*, che consiste nel “*cleavage*” dell'acetato in CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> secondo la reazione:



questa via metabolica prevale in condizioni di mesofilia ed è attuata da microorganismi dei generi *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (si veda oltre);

- 2) *via idrogenotrofa*, operata da metanogeni idrogenotrofi ordini *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, in cui l'anidride carbonica viene ridotta a CH<sub>4</sub> mediante ossidazione dell' H<sub>2</sub>:



questa via metabolica prevale in condizioni di termofilia (Demirel & Scherer, 2008; Gagliano et al., 2014).

Una terza via è costituita dall'utilizzo dei composti metilici.

### 1.1.1 Principali parametri chimico-fisici di processo e fattori di inibizione

L'efficienza del processo di DA dipende da svariati parametri ma poiché differenti gruppi funzionali di microorganismi sono coinvolti nella produzione di CH<sub>4</sub> nei reattori devono essere instaurate condizioni che mantengano in equilibrio tutte le componenti. A conferma di ciò si consideri che la DA è un processo lento ed è stato osservato che ci vogliono almeno tre settimane affinché la comunità microbica si adatti a seguito di cambiamenti quali ad esempio, tipologia di substrato o temperatura (Deublein & Steinhauser, 2008; Adekunle & Okolie 2015).

Di seguito viene riportata una breve sintesi dei principali parametri chimico-fisici che interessano il processo e dei principali fattori di inibizione, poiché sono tra gli unici generalmente considerati nel monitoraggio per la gestione degli impianti a scale reale. In risposta alle condizioni di processo infatti i diversi gruppi di microorganismi della comunità microbica possono seguire più di una via metabolica, oppure vie metaboliche alternative. Inoltre può cambiare la composizione tassonomica delle *guild* funzionali. Diversi parametri discriminano chi diventa prevalente (Patriarca et al., 2016): tra questi pH, Temperatura, Pressione parziale di H<sub>2</sub>, tempo di ritenzione idraulica o HRT, concentrazione di acidi organici volatili(VFA), mappatura delle risorse (quantità e tipo di substrato di fermentazione), concentrazione di ioni metallici.

#### pH

Le variazioni del pH si traducono in una variazione delle condizioni elettrostatiche (ioni H<sup>+</sup>) che portano ad una modifica nella conformazione degli enzimi e dell'attività enzimatica responsabile dei processi metabolici riducendone l'azione catalitica. In figura 5 vengono riportati i range di pH in cui le diverse fasi della DA possono aver luogo.

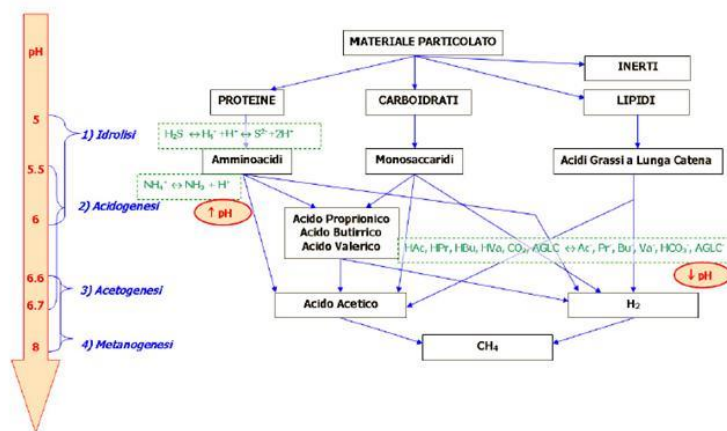


Figura 5. Range di pH ottimale per le diverse fasi della DA (Beccari & Rolle, 2012).

**Temperatura**

Negli ecosistemi naturali, il CH<sub>4</sub> viene prodotto a temperature che variano da 0 a 97 °C: sono quindi compresi ambienti di ghiacciai (0°C), paludi e sedimenti acquatici (4-15°C) ma anche ambienti ruminali (39°C) e sorgenti termali (>50°C). La maggior parte degli studi sul biogas vengono effettuati in condizioni mesofile (25-45°C) e termofile (45-60°C). Condizioni termofile portano a tassi idrolitici più alti, con brevi tempi di ritenzione idraulica e volumi del digestore inferiori alle condizioni mesofile. Inoltre, temperature più alte offrono il vantaggio di distruggere eventuali patogeni. Tuttavia, negli impianti operanti in condizioni termofile la diversità microbica è più bassa e ciò rende il processo di DA più specializzato e meno resiliente. In regime termofilo sono anche più elevati i rischi di un effetto inibitorio dell'ammoniaca in quanto la sua tossicità aumenta con l'aumentare della temperatura. Per questo insieme di motivi, attualmente, la maggior parte dei digestori di biogas impiegati nel settore industriale opera in condizioni mesofile.

**Pressione parziale d'idrogeno**

L'H<sub>2</sub> viene prodotto nel corso della fermentazione. Daltra parte, un'elevata pressione parziale di H<sub>2</sub>(>100 Pa) ha effetti negativi sulla metanogenesi, poiché porta a una diminuzione nella velocità di degradazione dei substrati. Inoltre, elevate pressioni parziali di H<sub>2</sub> (>100 Pa, Schink, 1997) comportano una inibizione della fase di acidogenesi con un impatto diretto sulla velocità ed efficienza del processo. L'H<sub>2</sub> è un intermedio fondamentale nella reazione dell'acetogenesi, poiché essa avrà luogo soltanto se la sua pressione parziale sarà sufficientemente bassa da consentire la conversione termodinamica di tutti gli acidi. Questo abbassamento della pressione parziale è operato da batteri che ossidano l'H<sub>2</sub> per produrre CH<sub>4</sub> (idrogenotrofi), acido acetico (omoacetogeni), acido solfidrico (batteri solfato-riduttori). La concentrazione di H<sub>2</sub> è pertanto un indicatore dello stato di funzionalità nel digestore.

La pressione parziale di H<sub>2</sub> ha un ruolo molto importante nel processo di produzione di idrogeno. Studi teorici dimostrano che un aumento della pressione parziale di H<sub>2</sub> inibisce la resa stessa di produzione (Hallenbeck, 2005). Ciò è dovuto ad un meccanismo di inibizione a feedback negativo, che fa sì che vengano attivati percorsi metabolici alternativi, che portano alla sintesi di substrati più ridotti, come il lattato, l'etanolo, il butanolo o l'alanina. Un incremento di circa il 50% della produzione di H<sub>2</sub> è stato ottenuto infatti rimuovendo il gas dallo spazio di testa del bioreattore mediante "flussaggio" con azoto (Kraemer & Bagley 2006).

**HRT**

Studi hanno dimostrato che il grado di acidificazione durante il processo di fermentazione aumenta in relazione al tempo di ritenzione idraulica passando da 28,2% a 4h a 59,1% a 24h. Inoltre l'aumento dell'HRT favorisce la biodegradabilità di alcuni composti, seguendo l'ordine di degradazione: carboidrati > proteine > lipidi (Fang & Yu, 2000).

L'HRT ha anche effetti significativi sulla distribuzione dei metaboliti prodotti durante il processo di fermentazione come riportato da Elefsiniotis e Oldham (1994) e da Henry et al. (1987). Infatti tempi di ritenzione più brevi favoriscono la produzione di propionato, ma in generale la produzione totale di VFA/alcool raddoppia passando da un tempo di ritenzione idraulico di 4h a 12h.

**VFA**

Gli acidi organici volatili sono strettamente legati al pH dell'ambiente di reazione, in grado di selezionare la via di fermentazione e anche alla produzione di H<sub>2</sub> collegato alla produzione di acidi (in particolare acetato e butirato) da precisi rapporti stechiometrici. La stessa formazione di H<sub>2</sub> accompagna la formazione di acidi organici, il cui accumulo influenza non solo la velocità di produzione di H<sub>2</sub> ma può anche cambiare le strategie di fermentazione (Nath & Das, 2004).

La fermentazione anaerobica porta oltre alla produzione di VFA, anche alla formazione di alcoli e prodotti terminali ridotti (coinvolgendo l'ossidazione dell'NADH), come etanolo, butanolo e lattato che contengono atomi di H<sub>2</sub> non liberati come gas e che quindi riducono le rese di H<sub>2</sub>.

**Caratteristiche e concentrazione del substrato**

Il tipo di substrato favorisce una competizione interspecifica tra i microorganismi H<sub>2</sub> produttori, mentre la quantità di substrato determina una competizione intraspecifica e contribuisce a modificare l'attività enzimatica batterica determinando uno *shift* metabolico verso la produzione di acido lattico diminuendo le rese di produzione.

Il numero di popolazioni dominanti allo stadio stazionario dipende dalle caratteristiche del substrati, ciò però non significa che la fermentazione anaerobica di un particolare substrato segua un solo *pathways* metabolico. I percorsi metabolici possono variare nel corso della fermentazione con l'autoregolazione metabolica dei microorganismi che si adattano ai cambiamenti "ecosistemici" (Li et al., 2007).

**Concentrazione ioni metallici**

Gli ioni metallici (Na, Mg, Zn, Fe) sono micronutrienti essenziali per il metabolismo batterico, poiché sono richiesti nei processi di trasporto e metabolismo enzimatico. Il Fe ad esempio è

coinvolto nell'ossidazione del piruvato ad Acetil-CoA e nel corretto funzionamento dell'enzima idrogenasi. Concentrazioni non ottimali di ione Fe possono determinare *shift* dei *pathway* metabolici. Quando la concentrazione di ioni Fe è molto bassa nel medium di fermentazione l'attività enzimatica favorisce la produzione di acido lattico all'etanolo riducendo la produzione di H<sub>2</sub>. Recenti studi di letteratura hanno dimostrato che il ferro e il nichel sono elementi essenziali per la produzione del biogas da parte dei microrganismi anaerobi, dato che sono costituenti indispensabili dell'enzima idrogenasi, il quale catalizza la reazione di ossidazione dell'H<sub>2</sub> e di riduzione dei protoni durante il processo fermentativo di degradazione (Casalot & Rousset, 2001). I risultati di differenti ricerche (Lee et al., 2001; Wang & Wan, 2008a e b) hanno confermato che il dosaggio ottimale di Ni e Fe all'interno del sistema anaerobico, così come quello inibente la produzione di H<sub>2</sub>, sono strettamente dipendenti dal substrato, dall'inoculo e dalle condizioni operative utilizzate nel processo di digestione.

Ioni	Concentrazione (mg/l)		
	stimolante	inibente	
		debolmente	fortemente
Sodio Na <sup>+</sup>	100-200	3500-5500	8000
Potassio K <sup>+</sup>	200-400	2500-4500	12000
Calcio Ca <sup>++</sup>	100-200	2500-4500	8000
Magnesio Mg <sup>++</sup>	75-150	1000-1500	3000
Ammonio NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	50-200	1500-2000	3000 tossico
Zolfo S <sup>-</sup>	-	<200	200

Tabella 2. Concentrazioni ammesse o tossiche di alcuni ioni.

### 1.1.2 Digestori anaerobici e configurazioni di processo

Per quanto riguarda la temperatura con la quale viene realizzato il processo, si distinguono:

- digestori in termofilia (55-75°C);
- digestori in mesofilia (35-45°C).

La condizione che massimizza le rese di biogas è quella termofila. Tuttavia la termofilia comporta degli svantaggi rispetto alla mesofilia: innanzi tutto richiede un maggior dispendio energetico per mantenere elevata la temperatura del reattore. Inoltre il processo è soggetto a maggiore instabilità soprattutto quando si verificano variazioni improvvise dei parametri d'esercizio degli impianti (quali per esempio il tasso del carico organico immesso nei processi di DA in continuo<sup>2</sup>) a causa

<sup>2</sup> Come per l'HRT, anche il tasso di carico organico (Organic Loading Rate – OLR) è un parametro che esula dagli scopi di questa tesi.

della minore diversità tassonomica della comunità. La temperatura alla quale avviene il processo di DA infatti influenza anche le due principali vie della metanogenesi: in condizioni mesofile si ritiene che la principale via di produzione del CH<sub>4</sub> sia quella acetoclastica responsabile di circa il 70% del CH<sub>4</sub> prodotto (Smith & Ingram-Smith, 2007; Conklin et al., 2006); in termofilia invece predomina la metanogenesi idrogenofila (Hao et al., 2010; Ali-Shah et al., 2014; Gagliano et al., 2014). Pertanto la maggior parte dei digestori anaerobici in esercizio operano in un intervallo di temperature mesofilo (circa 40°C).

### **Configurazioni di processo**

La trattazione completa delle tipologie impiantistiche esula dagli scopi di questa tesi ma vengono di seguito delineate le differenze essenziali tra le configurazioni di processo in “*batch*” e in “*continuo*”. A seconda delle modalità di alimentazione, cioè di ingresso di substrati o biomasse nel reattore si identificano:

- processi condotti in “*batch*”: il sistema è chiuso, nel senso che il substrato viene fornito una sola volta all’avvio del processo in presenza della componente microbica e si protrae nel tempo fino alla conclusione della produzione di biogas. Questo tipo di configurazione è ottimale per lo studio delle comunità microbiche: è infatti possibile individuare vere e proprie successioni di microorganismi sia inter che *intra-guild*; inoltre risultano efficaci configurazioni in “*fed-batch*”, in cui il sistema è periodicamente alimentato (ed anche privato periodicamente del suo surplus);
- processi “*in continuo*”: il sistema è aperto. In questo caso infatti la comunità microbica presente nel reattore riceve continuamente il nuovo mezzo di crescita, e pertanto c’è un flusso di massa in entrata ed uno in uscita. Il processo di digestione “*in continuo*”, a sua volta, può essere classificato a seconda delle modalità idrodinamiche della componente fluida contenuta nel reattore, individuando principalmente reattori a completa miscelazione *Continuous Stirred Tank Reactor* (CSTR) e reattori non miscelati in configurazione *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB).

Il processo può inoltre essere realizzato attraverso la convenzionale configurazione in monostadio o secondo l’innovativa configurazione in bistadio proposta da Pohland and Gosh (1971) in rispetto ai requisiti delle nicchie ecologiche delle diverse componenti funzionali della comunità microbica.

In particolare e con riferimento alla modalità di processo *batch* utilizzata in questo studio:

- in monostadio tutte le fasi della DA avvengono contemporaneamente nello stesso reattore, compatibilmente con la disponibilità nel mezzo dei substrati necessari ai microrganismi per

attuare gli specifici passaggi metabolici. Infatti, in questa configurazione le comunità microbiche coinvolte nelle fasi della DA si trovano fin dall'avvio del processo a condividere lo stesso spazio all'interno del reattore;

- l'aspetto saliente della configurazione in bistadio è la separazione delle condizioni di nicchia ecologica (principalmente pH, dimensioni del reattore, HRT) tra il primo stadio, con un *optimum* ecologico riferito ai *Bacteria* ed il secondo, organizzato soprattutto in riferimento al metabolismo, agli *Archaea*. Il bistadio comporta dunque una separazione spaziale e temporale delle nicchie ecologiche delle *guild* microbiche coinvolte nel processo, ai fini di una ottimizzazione di quest'ultimo: in particolare, nel primo stadio si realizzano solo idrolisi ed acidogenesi (grazie alla presenza nel reattore delle sole *guild* funzionali coinvolte in queste fasi), mentre nel secondo stadio, che riceve gli effluenti del primo, si realizzano tutte le fasi della DA. L'avvio del secondo stadio è infatti determinato dall'inoculo all'interno del reattore delle comunità di microrganismi metanigeni, che cooperano per realizzare anche le fasi di acetogenesi e metanogenesi. E' da tenere presente che all'interno del secondo reattore sono quindi compresenti tutte le *guild* funzionali coinvolte nelle quattro fasi principali della DA. Nel caso delle modalità di processo *batch*, le fasi di idrolisi ed acidogenesi, possono essere avviate e protratte per alcuni giorni prima dell'avvio del secondo stadio, mediante inoculo con comunità metanogena. In questo caso dunque il secondo stadio si svolge all'interno dello stesso reattore in cui è stato impostato il primo stadio, iniziando in un tempo successivo.

## 1.2 Comunità microbiche della DA: aspetti ecologico-funzionali

La complessità e l'efficienza della comunità microbica attiva nella DA mettono in evidenza la prevalenza delle interazioni di tipo cooperativo evolute tra i differenti gruppi funzionali di microorganismi (Ghosh et al., 2016). Tali interazioni, quali cooperazione, mutualismo, commensalismo, conferiscono un vantaggio ad almeno un partecipante alle interazioni ed il ruolo funzionale di ciascun gruppo, in termini ecologici ogni nicchia, contribuisce al bilanciamento ed alla stabilità del processo di DA. I microrganismi coinvolti nel processo di DA sono quindi legati da strette relazioni metaboliche e nei diversi passaggi della catena trofica i prodotti derivati dal metabolismo di una *guild* diventano il substrato esclusivo di crescita di un'altra (Kato & Watanabe, 2010). All'interno di ogni *guild* (intra-guild), idifferenti taxa microbici possono essere sostituiti da altri, come conseguenza delle condizioni ecologiche, ma il ruolo funzionale metabolico svolto e rappresentato da ciascuna *guild* deve essere mantenuto. Le *guild* sono quindi strettamente interconnesse (inter-guild) sia spazialmente sia temporalmente, tanto che l'intero processo viene operativamente considerato come un *unicum* in cui la produzione di CH<sub>4</sub> rappresenta solamente

l'ultimo passaggio. Stabilità e *performance* del processo di DA dipendono dall'equilibrio di crescita e dalla sincronizzazione del tasso metabolico dei gruppi di microrganismi che cooperano alla realizzazione della rete trofica (Demirel & Scherer, 2008) mentre si ritiene che il mancato equilibrio tra *guild* sia spesso la causa primaria dell'instabilità dell'intero processo (Demirel & Yenigun, 2006).

D'altra parte, le prime 3 fasi della digestione anaerobica sono operate da microrganismi appartenenti al dominio degli *Bacteria* mentre la produzione di CH<sub>4</sub>, è operata da metanogeni del dominio degli *Archaea*. Questi due gruppi di microrganismi hanno fisiologia diversa, differenti richieste nutrizionali, cinetiche di crescita differenti e diverse sensibilità alle condizioni ambientali (Pholand & Gosh, 1971). All'interconnessione metabolica tra *Bacteria* ed *Archaea*, appartenenti a domini differenti si è evoluto un tipo molto particolare di mutualismo, definito sintrofia (Shink, 1997). Sono di seguito analizzate alcune caratteristiche peculiari della rete trofica della DA e che possono costituire criticità del processo, in particolare il ruolo della relazione di sintrofia, le caratteristiche e la composizione della *guild* di metanogeni in risposta al metabolismo dei *Bacteria*, il ruolo idrolitico degli ARF.

### 1.2.1 Sintrofia: aspetti ecologici ed energetici

Shink (1997) ha definito la sintrofia “un caso speciale di cooperazione simbiotica, evoluta tra due tipi di batteri filogeneticamente lontani, che dipendono l'uno dall'altro per la degradazione di un determinato substrato, tipicamente per motivi energetici”. Il termine deve essere limitato ai casi in cui la dipendenza reciproca non può essere superata semplicemente aggiungendo un substrato o qualsiasi tipo di nutriente. L'aspetto chiave infatti è quello energetico ed il motivo che ha evolutivamente costretto i microrganismi in una cooperazione così efficiente risiede nella piccola quantità di energia disponibile nella conversione metanogenica.

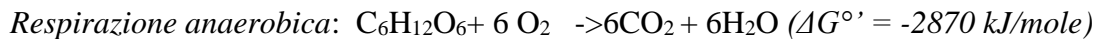
Infatti, nonostante la loro notevole varietà dal punto di vista metabolico in colture pure, i batteri sintrofici, sono incapaci di realizzare le reazioni tipiche di ossidazione degli acidi grassi per produrre acetato: hanno invece bisogno di trovarsi associati, e quindi nelle vicinanze, di un partner che sottragga H<sub>2</sub>, proprio a causa degli insoliti meccanismi bioenergetici legati alla sintrofia (De Bok et al., 2012; Madigan et al., 2016). Più nello specifico, l'energetica delle reazioni di fermentazione di acidi quali ad esempio il butirrato, il propionato, ecc, fornirebbe una variazione di energia libera ( $\Delta G^\circ$ ) positiva se le reazioni stesse procedessero in condizioni standard (soliti: 1M; gas: 1 atm; T: 25°C) (tab.3). In altri termini verrebbe consumata energia invece di liberarne! Di contro, il consumo di H<sub>2</sub> e quindi la riduzione della sua pressione parziale, influenza drasticamente

l'energetica della reazione, rendendola favorevole, cioè con valori di  $\Delta G$  negativi: questo si realizza quando le concentrazioni di  $H_2$  sono mantenute prossime allo zero dall'organismo partner, consumatore di  $H_2$ . Schink (1997, 2005) riconosce come molte delle reazioni di fermentazione che avvengono durante il processo di DA diventano esoergoniche, e quindi spontanee senza consumo di energia, se attuate in sequenza, come fosse un'unica reazione, e ciò può avvenire in condizioni anaerobiche simili a quelle che troviamo nei sedimenti marini e all'interno dei digestori anaerobici.

Tabella 3. Variazione dell'energia libera di Gibbs ( $\Delta G^0$ ) in condizioni standard durante le reazioni di produzione di  $H_2$  mediante ossidazione di alcuni VFA prodotti nella Digestione Anaerobica (Shink 1997).

Reazione	$\Delta G^0$ (kJ per mole)
Acetato + $H^+$ + $H_2O \rightarrow 2 CO_2 + 4H_2$	+94.9
Butirrato + $2H_2O \rightarrow 2$ Acetato + $H^+$ + $H_2$	+48.3
Propionato + $2H_2O \rightarrow$ Acetato + $CO_2 + 3H_2$	+76
Valerato + $CO_2 + H_2O \rightarrow 3$ Acetato + $2H^+$ + $2H_2$	+ 25.2
Etanolo + $H_2O \rightarrow$ Acetato + $H_2$	+ 9.6

La metanogenesi è un processo metabolico esoergonico ma è scarsamente efficiente: la conversione di un esoso a  $CH_4$  rilascia solo il 15% dell'energia ottenibile dalla degradazione aerobica:



Dunque la coevoluzione della sintrofia supporta questo difficile passaggio e cioè il trasferimento interspecie di  $H_2$  e  $CH_3COOH$  tra *Bacteria* acetogeni, che producono questi composti, ed *Archaea* metanogeni, che li utilizzano: in questo modo i metanogeni consentono di mantenere bassa la pressione parziale di  $H_2$ , e consentendo quindi la stabilità termodinamica di tutto il processo di DA. Questo mette in luce come grazie all'azione sintrofica, *Bacteria* ed *Archaea* riescono a sopravvivere condividendo quantità molto piccole di energia, avendo per necessità evoluto sistemi catabolici molto efficienti tali da consentire loro di proliferare in ambienti termodinamicamente sfavorevoli (Lane et al., 2013).

La necessità di una cooperazione energetica così stretta ha portato a ritenere che in alcune associazioni sintrofiche il trasferimento di  $H_2$  si realizzi per *conduzione diretta*, in cui gli elettroni sono trasferiti grazie a strutture simili a cavi elettrici e pertanto capaci di condurre elettricità. Tale trasferimento risultano avvantaggiati da una disposizione spaziale ben strutturata (O'Flaherty et al., 2006; Felchner-Zwirello et al., 2013) con la formazione di aggregati cellulari, principalmente in

floculi o granuli, tra *guild* di microrganismi funzionalmente diversi (Ishii et al., 2006; Khemkhao et al., 2011; Shen et al., 2016). Riguardo la formazione di questi aggregati sono state formulate svariate ipotesi (Pol et al., 2004), ma comunque la disposizione che appare più efficace è quella definita *multi-layer*, suggerita da MacLeod et al., (1990) (Figg. 6-7).

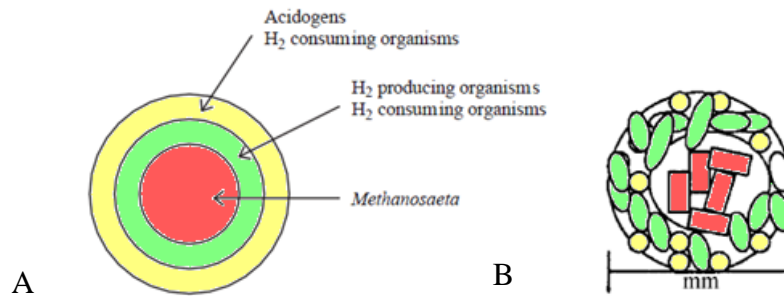


Figura 6. A) Struttura degli aggregati cellulari costituiti da diverse *guild* di microrganismi attivi nella DA (MacLeod et al., 1990); B) Rappresentazione della struttura dei granuli secondo Khemkhao et al. (2011): *core* centrale costituito da *Archaea* metanogeni (in rosso) circondati da batteri acetogeni sintrofici (in verde) ed esternamente da batteri acidogeni (in giallo). Le dimensioni degli aggregati possono raggiungere l'ordine dei millimetri.

La composizione dei floculi prevede un *core* costituito da metanogeni (Fig. 6) che occupano la parte centrale e più profonda dell'aggregato: è questa la zona in cui viene prodotto  $\text{CH}_4$ ; i batteri acetogeni sintrofici avvolgono questa parte centrale con un primo strato. Questa disposizione facilita le relazioni di simbiosi. La porzione più esterna è occupata dai batteri acidogeni fermentanti che sono a diretto contatto con la sostanza organica da fermentare (MacLeod et al., 1990; Polet al., 2004). Di fatto ognuna di queste aggregazioni di per sé può essere considerata una unità funzionale in cui si realizza il processo di DA.

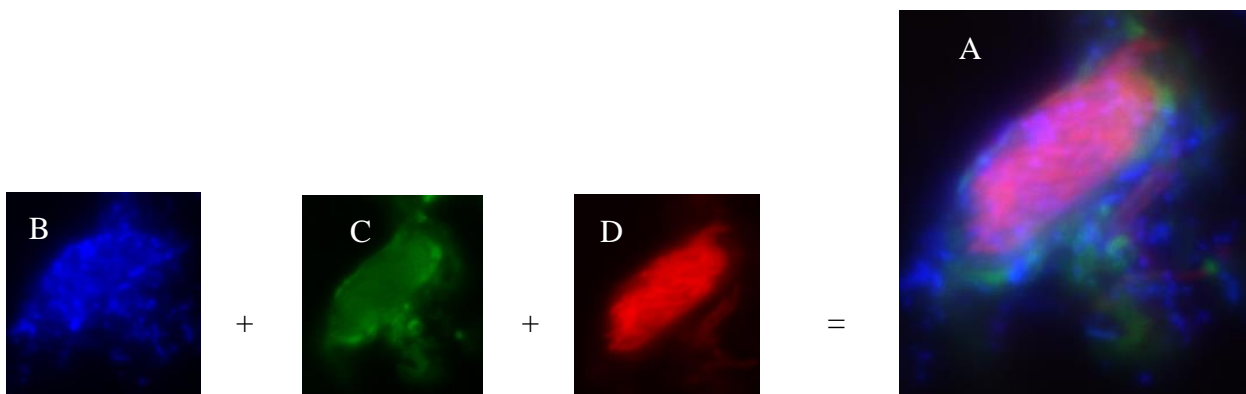


Figura 7. Aggregati cellulari osservati con tecnica FISH. In A) la sovrapposizione delle colorazioni fluorescenti rilevate in B)C)D) mostra la disposizione spaziale assunta dalle *guild* di microrganismi attivi nella DA. B) la colorazione DAPI (blu) rileva tutte le cellule costituenti l'aggregato; in C) la sonda FISH EUB mix 338 rileva la componente batterica (in verde) che costituisce la porzione esterna del granulo; in D) la sonda FISH ARC915 rileva la componente di *Archaea* metanogeni (in rosso) situata nel core dell'ammasso (in questo caso *Methanosaeta* sp.). Tale disposizione spaziale viene assunta per massimizzare il trasferimento di metaboliti nella catena trofica della DA. Micrografie realizzate nel corso di questa tesi nei laboratori ENEA utilizzando un microscopio ad epifluorescenza Zeiss (Axioskop 40, Germany)

### 1.2.2 Caratteristiche evolutive e composizione della guild di metanogeni

I microorganismi produttori obbligati di CH<sub>4</sub> appartengono al phylum *Euryarchaeota* evolutisi all'interno del dominio degli *Archaea* (Fig.8).

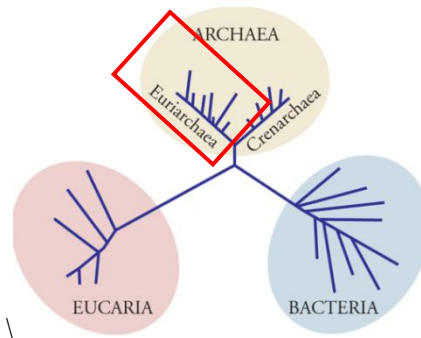


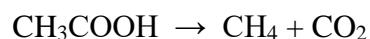
Figura 8. Albero filogenetico esseri viventi, (da Williams, Frausto de Silva 2005)

Questi batteri sono prevalentemente estremofili, cioè in grado di vivere in ambienti molto severi rispetto alle condizioni standard di vita in fatto di temperatura, pressione, composizione dell'atmosfera.

I metanogeni producono CH<sub>4</sub> partendo da una serie molto ristretta di substrati quali H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, formato, acetato e alcuni composti metilici (Kato et al., 2010). Agli albori della vita sulla Terra molto probabilmente l'H<sub>2</sub> a loro necessario veniva ottenuto attraverso una “route geochimica”, nelle zone delle sorgenti idrotermali suboceaniche mediante il processo di serpentinizzazione<sup>3</sup> (Sousa et al., 2013).

In termini evolutivi solo successivamente la metanogenesi, ad oggi considerata la parte conclusiva dell'intero processo di DA, si è “raccordata” alle attività metaboliche di altri gruppi di microorganismi che però appartengono all'altro dominio evolutivo dei procarioti, quello dei batteri (*Bacteria*) propriamente detti (Lane et al., 2013).

Nei digestori anaerobici operanti in mesofilia si stima che circa il 70% del CH<sub>4</sub> prodotto durante il processo di DA derivi dalla trasformazione dell'acetato per opera dei metanogeni acetoclasti (Conklin et al., 2006), appartenenti alla famiglia delle *Methanosarcinales* (Jeris et al., 1965; Auguet et al., 2010), secondo la seguente reazione:



Sorprendentemente solo due generi di *Archaea* metanogeni sono noti come utilizzatori di acetato

<sup>3</sup> La serpentinizzazione avviene nella crosta terrestre suboceanica. Infatti questa è composta in gran parte da silicati-ferro magnesio - ad esempio olivine - nei quali lo stato redox del ferro è Fe<sup>+2</sup>: l'acqua di mare, infiltrandosi in profondità nelle rocce del fondo degli oceani (in condizioni di elevate pressioni, e temperature intorno ai 150°C) ossida il Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup> dando luogo a rocce con ossidi di ferro, mentre l'H<sub>2</sub> rilasciato risale all'interfaccia fondo-acqua dove può venir utilizzato dai metanogeni.

per la produzione di CH<sub>4</sub>: *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (Smith & Ingram-Smith, 2007). Le loro principali caratteristiche sono riportate in tabella 4.

Tabella 4. Tabella riassuntiva delle principali proprietà morfologiche, fisiologiche, metaboliche, cinetiche ed ecologiche dei due principali generi di *Archaea* metanogeni acetotrofi (1) Demirel and Scherer, 2008; (2); (3) Staley et al., 2011; (4) Goberna et al., 2010; (5) Ali Shah et al., 2014; (6) Liu et al., 2008; Smith and Ingram-Smith, 2007 (7) , (8) Hao et al., 2010; (9) Nettmann et al., 2010; (10) Spanheimer et al., 2008; (11) Qu et al., 2009; (12) Andrews & Harris, 1986; Blogosatskaya et al., 2003; Conklin et al., 2006)

		<i>Methanosarcina</i>	<i>Methanosaeta</i>	
Fonte		Letame	Letame	
Morfologia		cocchi raggruppati in cluster (sarcine)	Banstoncellari, raggruppati in lunghi finalmente o gomitoli	(1)
Dimensioni		2-10 µm	2-6 µm	
pH <sub>opt</sub>		5-8	6,5-8,5	(3)
T <sub>opt</sub> (°C)		1-70	7-65	(4)
Substrati utilizzati per la produzione di biogas		composti metilici (metilotrofi); H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (idrogenotrofi occasionali); CH <sub>3</sub> COOH (minimo 250mM) (acetotrofi facoltativi)	Solo CH <sub>3</sub> COO, minimo 5-20 µM (acetotrofi obbligati)	(5)
		⇒ <b>GENERALISTI</b>	⇒ <b>SPECIALISTI</b>	(6)
Tempo duplicazione (giorni)		1-1.2	4-6	(7)
Concentrazioni tollerate	acetato (mg/l)	< 15'000	<3'000	(8)
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	< 7'000	< 3'000	(9)
	Na <sup>+</sup>	<10'000	<18'000	(10)
Costanti Cinetiche	µ <sub>max</sub> (g <sup>-1</sup> )	0.60	0.20	(11)
	K <sub>s</sub> (mg COD/l)	200-280	10-50	(11)
Strategia ecologica		<b>r-strateghi</b>	<b>K-strateghi</b>	(12)

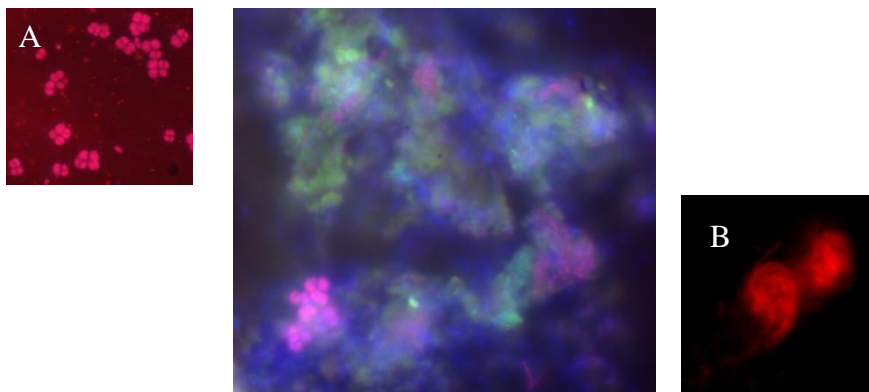


Figura 9. Morfologia degli *Archaea* metanogeni appartenenti al genere *Methanosarcina* (A) e *Methanosaeta* (B), visualizzata con tecnica FISH. La colorazione rossa è conferita dal fluoroforo CY3 covalentemente legato alla sonda ARC915 volta alla rilevazione dei componenti del dominio *Archaea*. La micrografia al centro evidenzia tutte le componenti batteriche presenti in una comunità metanogena. Micrografie realizzate nel corso di questa tesi nei laboratori ENEA mediante microscopio ad epifluorescenza Zeiss (Axioskop 40, Germany)

Le principali differenze tra questi due generi sono comprese nella diversa strategia ecologica adottata, di tipo prevalentemente *r-selection* o *K-selection* (Andrews & Harris, 1986). Diversi autori riportano infatti una strategia “r” per i *Methanosarcina* contro una strategia “K” per i *Methanosaeta* (Smith & Ingram-Smith, 2007; Liuet al., 2008) (Fig. 9). L’essenza del concetto di selezione “r” o “K” sta nel fatto che ciascun organismo lotta per massimizzare la propria *fitness* per sopravvivere in ambienti affollati (selezione-K) o non affollati (selezione-r). In relazione all’ambiente, quindi, i microrganismi si trovano a “scegliere” se prediligere un elevato tasso di acquisizione di nutrienti (e quindi di crescita) o un’elevata affinità per il substrato, “fare una cosa bene” (metabolismo specialista) o “fare molte cose in modo indifferente” (metabolismo generalista) (Andrews & Harris, 1986). I *Methanosarcina*, in qualità di r-strateghi, sono “generalisti”, perché caratterizzati da un più alto tasso di crescita ( $\mu_m$ ) in condizioni di eccesso di nutrienti, ed infatti hanno una minore affinità per il substrato ( $K_s$  maggiore) rispetto ai K-strateghi (Blagodatskaya et al., 2004; 2013). Dunque i *Methanosarcina* hanno un metabolismo molto versatile, sia acetotrofo che idrogenotrofo, che consente loro di utilizzare un vasto spettro di substrati (acetato, composti metilati, metilammine,  $H_2/CO_2$ ), e di sopravvivere anche in condizioni subottimali (De Vrieze et al., 2012). I *Methanosaeta* sono invece “specialisti” K-strateghi poiché sono in grado di utilizzare esclusivamente acetato, sono cioè acetotrofi obbligati ed infatti sono caratterizzati da una maggiore affinità per il substrato ( $K_s$  minore); la soglia minima di concentrazione dell’acetato richiesta per la loro crescita è di circa 5-20  $\mu M$  contro la concentrazione di 1 mM dei *Methanosarcina* (Smith & Ingram-Smith, 2007). I *Methanosaeta* sono quindi avvantaggiati in condizioni di risorse limitanti (Blagodatskaya et al., 2004; 2013).

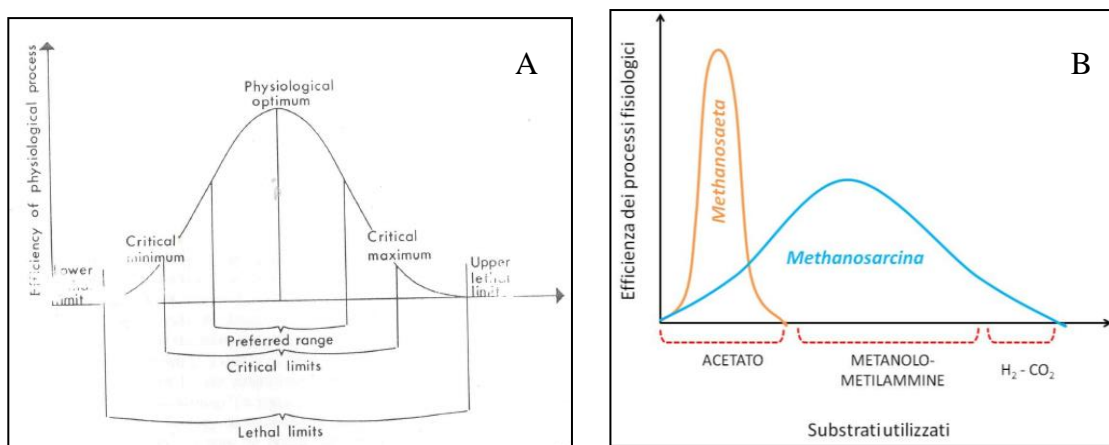


Figura 10. A) Efficienza dei processi fisiologici in funzione dei limiti di tolleranza ecologici (modificato da Puttman and Wratten, 1984). B) modello teorico A) efficienza dei processi fisiologici attribuiti a *Methanosaeta* e *Methanosarcina* in relazione a diverse tipologie di substrato utilizzate.

Le proprietà eco-fisiologiche dei *Methanosarcina* sono rispecchiate dalla morfologia cellulare: la loro forma sferica e la tendenza a formare i caratteristici raggruppamenti di cellule (Fig. 9A), determinano una minor superficie esposta all'ambiente fisico-chimico circostante. I *Methanosarcina* si distinguono inoltre dagli altri metanogeni, per la capacità di tollerare meglio gli stress e gli shock ambientali<sup>4</sup> (come riportato in tab.4) (De Vrieze et al., 2012). I *Methanosaeta* (Fig. 9B), invece, sono costituiti da cellule bastoncellari (2-6 µm), che possono formare lunghi aggregati filamentosi (Mladenovska & Ahring, 2000). In questo caso, il contatto con l'ambiente circostante può venire minimizzato grazie alla formazione di compatti aggregati cellulari in cui i *Methanosaeta* occupano la parte centrale (cioè il *core* dell'aggregato cellulare), mentre il contatto con l'ambiente è mediato da uno strato di *Bacteria* (Pol et al., 2004) (Fig. 6-7).

### 1.3 I Funghi Ruminali Anaerobi: potente componente idrolitica

I Funghi Ruminali Anaerobi (ARF) sono stati individuati per la prima volta nel 1910 (Liebetanz, 1910) ma poiché alternano una forma a tallo con una flagellata vennero erroneamente scambiati per protozoi; solo agli inizi degli anni '70 Orpin (Orpin, 1975) ne identificò la parete cellulare costituita da chitina e li classificò nel regno dei Funghi confermando il dogma centrale in microbiologia (definito così da Krause et al., 2013) che tutti i funghi fossero organismi aerobi, tutt'al più facoltativi.

Gli ARF sono simbionti del tratto intestinale degli erbivori dove costituiscono circa l'8-10% della biomassa microbica (Nagpal et al., 2010; Krause et al., 2013) ed insieme a batteri e protozoi compongono la comunità del ruminante e non solo. Sono stati ritrovati in tutti i continenti e in tutte le regioni geografiche in cui sono stati indagati e si sono rivelati ubiquitari in tutti i ruminanti come bufalo, capra, pecora, cervo nonché in erbivori non ruminanti come cavallo, asino, elefante, zebra, canguro (Bauchop et al., 1979; Li et al., 1990; Dey et al., 2004; Thareja et al., 2006).

Gli ARF hanno un ciclo vitale rapido (Fig. 11), di circa 23-32 ore di tipo vegetativo: le zoospore mono- o poli-flagellate (fase motile) evolvono in uno zoosporangio (fase vegetativa) che può essere rispettivamente mono- o policentrico (Lowe et al., 1987). Il primo forma più zoosporangio a partire da una sola zoospora; il secondo forma un solo zoosporangio per zoospora (Ho & Barr, 1995). Recentemente è stato inoltre individuato un terzo stadio di sviluppo rappresentato da spore resistenti aerotolleranti capaci di mantenere vitale il fungo oltre 9 mesi (Haitjema et al., 2014).

<sup>4</sup> Gli *stress* sono causati da condizioni non ottimali o subottimali che si protraggono nel tempo; gli *shock* sono costituiti da eventi puntuali

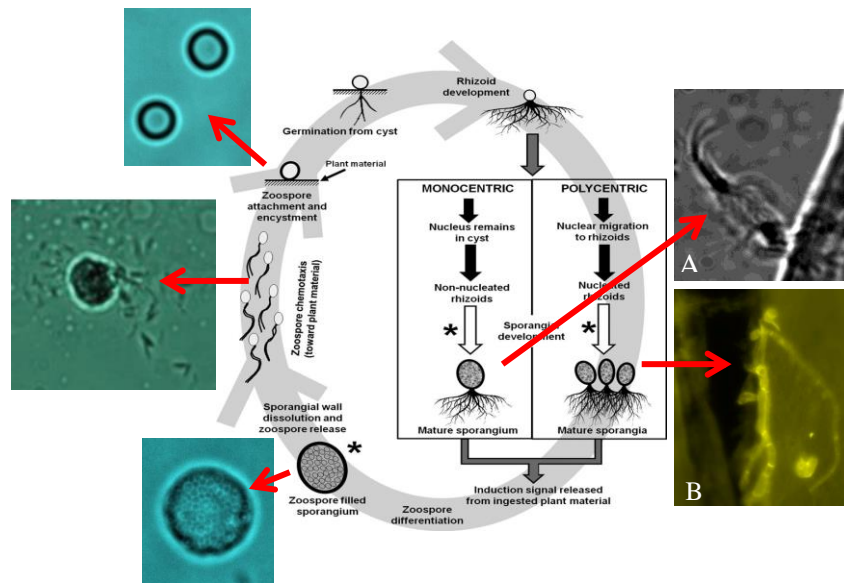


Figura 11. Schema del ciclo vitale degli ARF (modificato da Gruninger et al., 2014). In A) zoospore monocentrica di *Neocallimastix* sp. e in B) ifa policentrica di *Orpinomyces* sp. durante l'attacco su paglia. In questo studio è stato possibile seguire lo sviluppo ed i movimenti delle zoospore fungine in microscopia con luce diretta (microscopio Axioshop 40, Zeiss, Germany) mediante il modulo Time Lapse (Update Axiovision). Le micrografie sono state ottenute in laboratorio ENEA con microscopio Zeiss.

Il *phylum* al momento comprende 8 generi, ognuno dei quali distinguibile per due caratteristiche morfologiche principali quali il tallo (rizoidale o bulboso) e il flagello della spora (monoflagellato o poliflagellato) (Ho & Barr, 1995; Ozkose et al., 2001). Tali caratteristiche vengono riassunte nella Tabella 5. Attualmente sono state riconosciute e descritte una trentina di specie ma la loro tassonomia è soggetta a continue modifiche.

Tabella 5. Classificazione morfologica dei generi di funghi anaerobi attualmente riconosciuti; tallo e tipologia di flagello sono le due caratteristiche principali che permettono di discriminare i generi (da Gruninger et al., 2014). *Neocallimastix* sp. e *Orpinomyces* sp. sono i due ceppi utilizzati in questo studio

GENERE	TALLO	RIZOIDE	FLAGELLI PER ZOOSPORA
<i>Neocallimastix</i>	Monocentrico	Filamentoso	Poliflagellato (7-30 flagelli)
<i>Piromyces</i>	Monocentrico	Filamentoso	Uniflagellato (talvolta 2 o 4 flagelli)
<i>Caecomyces</i>	Monocentrico	Bulboso	Uniflagellato (talvolta bi- o quadri-flagellato)
<i>Orpinomyces</i>	Policentrico	Filamentoso	Poliflagellato (14-24 flagelli)
<i>Anaeromyces</i>	Policentrico	Filamentoso	Uniflagellato
<i>Cyllamyces</i>	Policentrico	Bulboso	Uniflagellato (talvolta bi- o tri-flagellato)

### 1.3.1 Caratteristiche ecologiche dei funghi anaerobi ruminanti

Gli ARF insieme a batteri e protozoi compongono la comunità dell'ecosistema "rumine". I substrati principalmente introdotti nella dieta degli erbivori sono complessi polimeri lignocellulosici lentamente biodegradabili: ciò è dovuto alla rigida e compatta struttura della parete cellulare di questi substrati caratterizzata dalla presenza di lunghe fibre di cellulosa (35-50%) rinforzate da

emicellulose (20-35%) e ricoperte da lignina (10-25%) che formano una complessa struttura con diverso grado di degradabilità (Sawatdeenarunat et al., 2015). Cellulosa e derivati non possono però essere idrolizzati dai soli enzimi digestivi animali (Leis et al., 2014). Nel rumine, questi substrati vengono invece idrolizzati in condizioni anaerobiche da una complessa comunità microbica costituita da batteri, protozoi, funghi e *Archaea* metanogeni, (Prochazka et al., 2012), e in cui i funghi hanno un ruolo cruciale (Fontes & Gilbert, 2010). Si ritiene infatti che, gli ARF siano i primi colonizzatori delle fibre lignocellulosiche e che il loro attacco faciliti la successiva attività fibrolitica dei batteri (Sehgal et al., 2008; Kumar et al., 2015) di cui contribuiscono a determinare la composizione (Kittelmann et al., 2012).

E' da considerare che nel rumine il CH<sub>4</sub> è un prodotto indesiderato in quanto sottrae Acidi Grassi Volatili, fonte di sostentamento per gli erbivori.

### 1.3.2 Proprietà idrolitiche

Attualmente gli ARF sono ritenuti essere gli organismi con le più elevate capacità di idrolisi della cellulosa. Hanno infatti capacità fibrolitiche maggiori rispetto a quella dei batteri e protozoi ruminali grazie ad un'ampia produzione di **enzimi idrolitici**, quali cellulasi, xilanasi (Lowe et al., 1987; Srinivasan et al., 2001) ma anche emicellulasi, proteasi, amilasi, amiloglicosidasi, pectinasi. Il motivo principale di questo così ampio corredo enzimatico sembra sia da attribuire al trasferimento genico orizzontale dai batteri verso gli ARF (Dollhofer et al., 2015). A differenza di quanto avviene per i batteri idrolitici aerobi, che secernono gli enzimi in forma solubile a livello extracellulare (quindi privi di un'organizzazione spaziale), nei microrganismi anaerobi, compresi i funghi ruminali, viene frequentemente prodotto un complesso multi-enzimatico extracellulare ad elevato peso molecolare, 3-80 MDa, chiamato **cellulosoma** (Wilson & Wood, 1992; Krause et al., 2003; Joblin et al., 2002; Fontes et al., 2010; Haitjema et al., 2014). Infatti si ritiene che l'ambiente anaerobico abbia favorito l'evoluzione di un più efficiente apparato degradativo delle pareti cellulari vegetali (Fontes et al., 2010). La struttura complessa del cellulosoma, individuata e caratterizzata originariamente nel batterio idrolitico del rumine *Clostridium thermocellum* nel 1980 da Bayer & Lamed (Fontes et al., 2010), rimane ancora non ben caratterizzata per gli ARF. A livello funzionale però è noto che il cellulosoma favorisce in primo luogo l'adesione alla parete cellulare vegetale: la formazione di un complesso macromolecolare consente la prossimità spaziale delle unità catalitiche, che ne potenzia le interazioni sinergiche (Fontes et al., 2010).

La suscettibilità delle biomasse vegetali all'azione enzimatica delle comunità ruminali viene inoltre

favorita dalla penetrazione dei **miceli** fungini all'interno delle fibre vegetali (Prochazka et al., 2012), che contribuisce ad una disgregazione anche meccanica dei substrati. Grazie a queste spiccate capacità idrolitiche, gli ARF forniscono ai batteri una maggiore superficie per la colonizzazione delle fibre vegetali (Ho et al., 1988; Orpin & Joblin, 1997), garantendo un vantaggio competitivo ai microrganismi in grado di utilizzare i prodotti solubili della sua idrolisi (Schwart, 2001). L'importanza del ruolo funzionale degli ARF è confermata dal fatto che la loro rimozione dal ruminale riduce l'assimilazione dei nutrienti e la degradazione del materiale secco (Akinet al., 1987).

Il ruolo funzionale degli ARF è sottolineato dall'osservazione che negli erbivori ruminanti, essi colonizzano le fibre fresche appena ingerite nei primissimi minuti in cui vengono in contatto con il liquido ruminale (Theodorou et al., 2005). Inoltre, particelle di materiale vegetale risultano degradate dagli ARF allo stesso tasso indipendentemente dalla loro dimensione, mentre il tasso di degradazione da parte della componente di *Bacteria* decresce in maniera proporzionale all'aumentare della dimensione delle particelle (France et al., 1993).

In prossimità degli ARF si osservano batteri fibrolitici impegnati nella degradazione delle pareti cellulari vegetali e/o altri batteri che utilizzano i prodotti di tale degradazione come substrato per la crescita (Orpin & Joblin, 1997) sviluppando relazioni di cooperazione ma anche di competizione. Le interazioni degli ARF con la componente batterica possono essere sia di natura antagonistica che simbiotica (Bernalier et al., 1992). In generale, entrambe le componenti sono almeno in parte in competizione per la stessa nicchia ecologica, ma la rottura delle fibre vegetali da parte degli ARF può favorire l'efficienza dei batteri idrolitici.

### **1.3.3 Applicazione dei funghi anaerobi ruminali nella digestione anaerobica**

Recenti studi stanno prendendo in considerazione la possibilità di aumentare l'efficienza della fase idrolitica della DA ed incrementare le produzioni di CH<sub>4</sub> da biomasse lignocellulosiche, attraverso la *bioaugmentation* di comunità microbiche con specifici microrganismi, in particolare con ARF (Dollhofer et al., 2015; Massini et al., 2015).

Infatti, tra le diverse biomasse di scarto disponibili per la produzione di biogas, quelle a matrice lignocellulosica occupano un ruolo di primo piano. Gli inventari disponibili in diverse parti del mondo attestano, infatti, che gli scarti lignocellulosici costituiscono lo stock energetico potenziale principale nel campo dei rifiuti (Perlack et al., 2005; Jiang et al., 2012; Xu et al., 2014; Sawatdeenarunat et al., 2015), grazie alla loro abbondanza, diffusione e ricchezza nel contenuto

organico. Si consideri inoltre che la maggior parte degli impianti a biogas è alimentata con reflui zootecnici e che questi ultimi contengono una notevole frazione di paglie derivanti dai mangimi, dalle lettiere ed altro. Attualmente si stima che il 40-60% del carbonio organico contenuto nelle biomasse vegetali impiegate nella DA rimanga inutilizzato (Haitjema, 2014). Questo perché cellulosa (35-50%), emicellulosa (20-35%) e lignina (10-25%), sono rigidamente legate tra di loro, formando una struttura altamente resistente e recalcitrante alla degradazione. (Mckendry et al., 2013; Khanal et al., 2008; Frigon et al., 2010; Sawatdeenarunat et al., 2015) (Fig. 12). Questa peculiarità associata alla natura cristallina polimerica della cellulosa, riduce, tra l'altro, la superficie inizialmente attaccabile dai microorganismi.

Per tutta questa serie di motivi la fase di idrolisi è considerato un vero e proprio “collo di bottiglia” della DA, soprattutto quando il processo è alimentato con biomasse vegetali (Haitjema et al., 2014). Infatti ad una elevata l'efficienza di idrolisi corrisponde una maggiore quantità di biomassa convogliata nel processo di DA; viceversa, incrementa la quantità di materiale indigerito.

Con l'obiettivo di migliorare la resa totale in  $\text{CH}_4$  attraverso il potenziamento dell'idrolisi sono stati condotti molti studi circa possibili pre-trattamenti da effettuare sulle biomasse destinate alla DA: questi si basano su metodi meccanici (macinazione); termici (*steam-explosion*, lavaggio con acqua calda); chimici (acidificanti; alcalinizzanti; enzimatici, etc.).

D'altra parte si rilevano molti inconvenienti di tipo impiantistico, economico ed ambientale: infatti si complica l'organizzazione degli impianti, si riduce la sostenibilità economica della produzione di biogas (costi economici, energetici ed in termini di tempo) e l'intero processo di DA può essere ostacolato dalla presenza di sottoprodotti tossici, che non è detto che vengano completamente metabolizzati e quindi smaltiti durante il processo.

Per trovare adeguate soluzioni, sostenibili sia in termini economici (minori richieste energetiche e di sostanze chimiche) che ecologici, (utilizzo di condizioni operative più blande e minima produzione di sottoprodotti indesiderati e tossici) sono stati presi in considerazione trattamenti di tipo biologico (Yi et al., 2014; Zheng et al., 2014; Mutschlechner et al., 2015) basati fondamentalmente sulla capacità di microrganismi di produrre specifici enzimi. Nell'ambito della DA il principale obiettivo del pretrattamento biologico consiste nel minimizzare la perdita di carboidrati ma al contempo di massimizzare la rimozione della lignina per aumentare la digeribilità del substrato avviato a DA (Zheng et al., 2014). Negli ambienti naturali solo pochi microrganismi sono in grado di degradare la cellulosa (Yue et al., 2013; Lazuka et al., 2015) e solo i funghi sono in grado di degradare, mediante attacco sia fisico (azione delle ife) che chimico (azione enzimatica), la lignina e le emicellulose, aumentando l'esposizione della cellulosa (Fig.12).

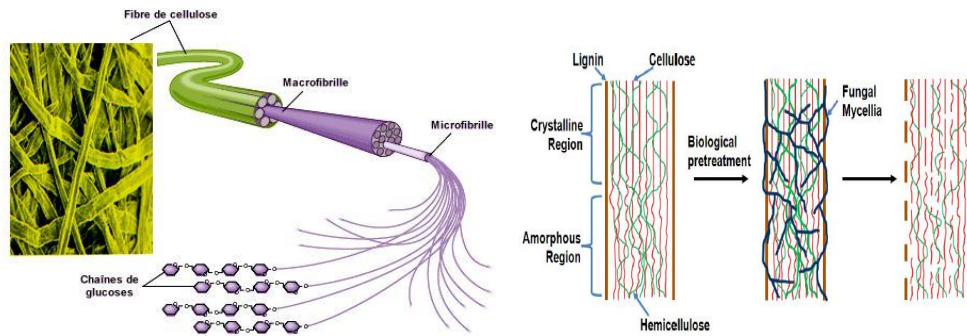


Figura 12. Diagramma schematico dell'attacco fungino pretrattamento biologico di substrati lignocellulosici. Il ruolo degradativo svolto dai funghi consente di diminuire il contenuto di lignina ed alterare la struttura chimica delle fibre lignocellulosiche così da rendere la loro biodegradazione mediante DA, più efficiente (Isroi et al., 2011).

Nell'ambito del **pre-trattamento** biologico, è stata valutata l'efficacia idrolitica di funghi aerobi ma i risultati ottenuti non sono stati sempre apprezzabili, mentre dal punto di vista impiantistico, l'inserimento di un pre-trattamento aerobico ne aumenta la complessità (Keller et al., 2003; Amirta et al., 2006; Muthangya et al., 2009; Mackulak et al., 2012).

Recentemente gli studi per l'ottimizzazione della DA, esplorando il potenziale offerto dalla biodiversità microbica, hanno considerato la possibilità di degradare con efficienza le biomasse lignocellulosiche in anaerobiosi, con microrganismi che hanno evoluto capacità idrolitiche in ambienti privi di ossigeno, e tra questi gli ARF si sono rivelati i più interessanti (Nakashimada et al., 2000; Weimeret et al., 2009; Chapleur et al., 2014; Prochazka et al., 2012; Leis et al., 2014; Lee et al., 2014; Nkemka et al., 2015; Sawatdeenarunat et al., 2015; Li et al., 2017).

La tecnica di *bioaugmentation*, rappresenta un recente approccio utilizzato in DA per migliorare l'idrolisi delle biomasse lignocellulosiche (Fotidis et al., 2013). La *bioaugmentation* consiste nel potenziare la comunità microbica con l'aggiunta di specifici microrganismi (ceppi puri, pool microbici selezionati) al fine di migliorare una particolare capacità metabolica del processo. Si ipotizza che il potenziamento della comunità microbica attiva nella DA mediante *bioaugmentation* di ARF possa incrementare l'attività idrolitica della comunità, con maggior efficienza rispetto al pre-trattamento con funghi aerobi: infatti la funzione degli ARF non si esplicherebbe a monte del processo, come avviene con l'impiego di funghi aerobi, ma sarebbe contestuale al processo stesso, integrandosi perfettamente con la prima fase della DA (l'idrolisi) che verrebbe pertanto così potenziata (cioè se ne aumenterebbe l'efficienza) attraverso un **co-trattamento**.

La soluzione per massimizzare la produzione di biogas senza comportare un incremento dei costi operativi, una maggiore complessità gestionale o gravi impatti ambientali, può essere quindi ricercata nel rumine (Prochazka et al., 2012).

## 1.4 Analisi della comunità microbica

La microbiologia convenzionale propone per lo studio della biodiversità microbica l'applicazione di metodi che prevedono l'identificazione dei microrganismi attraverso l'isolamento di colture pure seguito da test che analizzano alcune caratteristiche morfo-fisiologiche e biochimiche. Queste analisi non sono sufficienti per l'identificazione della maggior parte delle specie di microrganismi in quanto limitate alle specie coltivabili che rappresentano una piccolissima percentuale di tutte le specie presenti in natura. L'applicazione di qualunque metodo di analisi che preveda la coltivazione dei microrganismi opera di fatto una selezione, permettendo la crescita delle sole specie in grado di trovare condizioni idonee. Tutte le altre specie che necessitano di condizioni più restrittive non possono essere osservate e studiate, comportando così una notevole perdita di informazione. Per tale ragione negli ultimi quindici anni sono state messe a punto una serie di tecniche molecolari colture-indipendenti, alternative ai metodi convenzionali. In generale, quindi, le tecniche utilizzate per analizzare le comunità batteriche possono essere classificate in:

1. **metodi convenzionali:** a partire dalla coltivazione su piastra, permettono la distinzione dei vari ceppi presenti sulla base delle caratteristiche fenotipiche; essi impiegano terreni di coltura selettivi o arricchiti per specifiche attività metaboliche (ad esempio resistenza ad antibiotici o capacità di degradare fonti di carbonio specifiche);
2. **metodi molecolari:** permettono l'analisi delle caratteristiche biochimiche, metaboliche e genetiche delle popolazioni che compongono la comunità. Nell'ambito degli studi genetici si ricorre all'analisi di geni "marcatori" che consentono di distinguere tassonomicamente i membri delle comunità stesse o di evidenziare la presenza di particolari attività metaboliche. Le tecniche genetico-molecolari possono a loro volta essere suddivise in due sottocategorie:
  - tecniche che analizzano l'informazione genetica contenuta nel DNA totale estratto da un campione ambientale (*Whole Community DNA Analysis*), senza ricorrere all'uso della reazione a catena della polimerasi (PCR);
  - tecniche che analizzano una parte dell'informazione genetica (*Partial Community DNA Analysis*), focalizzandosi su sequenze genomiche che vengono amplificate mediante PCR.

### 1.4.1 Marcatori molecolari in ecologia microbica

Il marcatore molecolare maggiormente utilizzato in microbiologia ambientale è il gene codificante l'RNA ribosomiale (l'rRNA). Gli rRNA sono molecole essenziali per la vita cellulare poiché costituiscono la parte non proteica dei ribosomi e rappresentano un elemento chiave della sintesi

proteica. La funzione da loro svolta è quella di fornire un meccanismo di decodifica dell'RNA messaggero in amminoacidi e di interagire con il tRNA, provvedendo all'attività della peptidil-trasferasi. Gli RNA ribosomiali sono così delle molecole relativamente grandi, dotate della medesima funzione, presenti in tutti gli organismi e caratterizzati dalla presenza di diverse regioni nucleotidiche ben conservate in tutte le specie. I ribosomi dei batteri hanno un coefficiente di sedimentazione pari a 70 unità Svedberg (70S). Sono composti da due subunità, una piccola (30S) e una grande (50S). La subunità 30S contiene una molecola di rRNA (16S) composta da 1542 nucleotidi e da 21 proteine differenti; la subunità 50S contiene due molecole di rRNA formate rispettivamente da 2904 nucleotidi (23S) e da 120 nucleotidi (5S) associate a 34 differenti proteine. L'RNA 16S è l'orologio molecolare più usato per studiare la filogenesi ed identificare i batteri. I geni che codificano sono organizzati universalmente in operoni costituiti da una regione promotrice e una sequenza codificante per l'rRNA 16S, una regione spaziatrice (ITS, *intergenic space region*) contenente un numero variabile di geni per l'RNA transfer, la sequenza dell'rRNA 23S e, dopo una seconda ITS, quella per il 5S. Durante l'evoluzione degli organismi viventi, il gene che codifica per l'rRNA 16S (16S rRNA), ha subito pochissime mutazioni e solo in rarissimi casi è soggetto ad eventi di trasferimento genico orizzontale. Questa peculiarità permette, attraverso l'analisi comparativa della sequenza del 16S rDNA, di poter costruire alberi filogenetici e di stabilire le relazioni tra i vari organismi.

In particolare, il gene codificante il 16S rRNA contiene regioni altamente conservate interspaziate da regioni ipervariabili, ovvero quelle regioni che possono accettare mutazioni e che differiscono tra organismi diversi (Fig.13). Sono proprio queste regioni ipervariabili quelle utilizzate per la tassonomia e la filogenesi. Le regioni altamente conservate permettono, invece, la sua amplificazione *in vitro* mediante PCR, attraverso l'utilizzo di diverse coppie di *primers*, detti appunto "universali" selezionati e ampiamente utilizzati negli anni (Giovannoni et al., 1990; Muyzer et al., 1993).

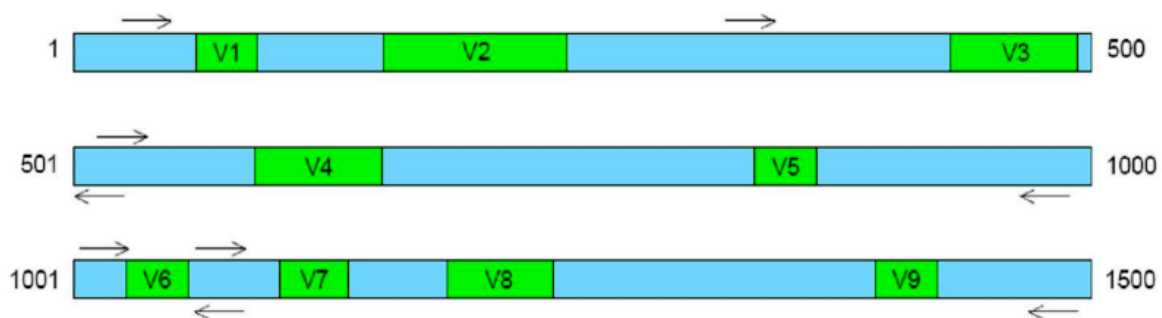


Figura 13. Rappresentazione schematica della sequenza del gene 16S rDNA batterico. In verde le sequenze ipervariabili, in azzurro le regioni conservate e complementari ai primers universali indicati dalle frecce.

Attualmente il 16S rDNA è il marcatore genico di elezione per gli studi tassonomici e filogenetici nei procarioti. L'altro essenziale vantaggio è la sua dimensione compatibile con l'amplificazione PCR e con uno sforzo di sequenziamento non eccessivo.

La sua applicabilità e diffusione ha permesso negli anni la creazione di una banca dati ricchissima che consente il confronto tra sequenze di ceppi noti e le sequenze già depositate.

Tuttavia, l'utilizzo del 16S rDNA non è esente da due tipi di errori: da un lato, esso porta ad una sovrastima della diversità batterica della comunità poiché alcuni microrganismi posseggono copie multiple dei geni ribosomiali; dall'altro lato, il DNA estratto da campioni ambientali spesso comporta la formazione di sequenze "chimeriche" dovute all'associazione di sequenze appartenenti a specie diverse.

L'amplificazione delle sequenze chimeriche, una volta formatesi, procede con la stessa efficienza delle altre sequenze di rDNA presenti e quindi, anche in questo caso, si ha una sovrastima della reale biodiversità di un campione. Infine, la formazione di sequenze chimeriche non permette il confronto con quelle note, depositate nelle banche dati. Va comunque detto che una sequenza chimerica può essere riconosciuta sia controllando la complementarità di alcune regioni della sequenza stessa, sia effettuando un'analisi comparativa di differenti sezioni del prodotto di amplificazione dell'rDNA 16S.

## **1.5 Tecniche molecolari basate sull'amplificazione PCR**

Queste tecniche si basano sull'analisi delle sequenze di DNA derivate dall'amplificazione di geni marcatori presenti in tutti i membri della comunità microbica studiata. La miscela complessa dei frammenti di DNA prodotti dall'amplificazione dei geni marcatori può essere risolta mediante due approcci diversi:

- con il clonaggio seguito dal sequenziamento dei singoli frammenti di DNA inseriti in ciascun clone. Le sequenze così ottenute vengono confrontate con quelle depositate in banche dati come GenBank e/o Ribosomal Database Project (RDP). Questa metodologia fornisce informazioni sulla diversità della comunità microbica e sull'affiliazione filogenetica dei singoli membri che la compongono;
- con il *genetic finger printing* che tramite l'analisi elettroforetica genera profili di bande che rappresentano la struttura genetica della comunità batterica. Le tecniche che producono questo genere di profili si basano sulla PCR ma non richiedono la costruzione di una libreria genetica di cloni. Esse separano i frammenti amplificati mediante migrazione elettroforetica su gel di agarosio o di poliacrilammide, sfruttando la diversa

lunghezza dei frammenti, come ad esempio nei t-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*; Liu et al., 1997), nei RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*; e nei RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA Analysis*; Hadrys et al., 1992 ) o la loro diversa composizione in basi come nella DGGE/TGGE (*Denaturing or Temperature Gradient Gel Electrophoresis*; Muyzer et al., 1993; Muyzer, 1999). Quest'ultimo approccio viene utilizzato in particolar modo per comparare le comunità microbiche.

Le tecniche molecolari descritte finora presentano numerosi vantaggi:

- Rapidità e possibilità di processare i campioni in contemporanea;
- Affidabilità ed alta riproducibilità;
- Possibilità di ottenere informazioni qualitative e/o quantitative;
- Possibilità di indagare le relazioni filogenetiche tra i membri della comunità analizzata.

### 1.5.1 New Generation Sequencing (NGS)

Le tecniche NGS hanno notevoli prestazioni e hanno aumentato la velocità di sequenziamento del DNA, in quanto producono migliaia o addirittura milioni di sequenze a bassi costi. Le sequenze prodotte consentono un'ampia identificazione dei diversi taxa microbici presenti anche in piccole quantità, compresi gli “*uncultured*”. Dunque, le tecniche NGS hanno implementato le conoscenze nel campo dell'ecologia microbica e recentemente sono state usate per indagare parecchi ecosistemi (Mayo et al., 2014).

In particolare i metodi di seconda generazione generano dati di sequenza 100 volte più velocemente rispetto ai metodi precedenti. La caratteristica dei sequenziamenti di seconda generazione è l'uso dei metodi di “gestione massiva in parallelo”. In altre parole, un gran numero di campioni viene sequenziato uno accanto all'altro nella stessa macchina. Tra i metodi di seconda generazione più usati ci sono: *Pyrosequencing 454*, *Illumina Genome Analyzer*.

Nello specifico (Fig. 14 a), come il sequenziamento di tipo Sanger, il *pyrosequencing 454* implica la sintesi di un filamento complementare da parte di una DNA polimerasi. Tuttavia, invece di terminare la catena, ogni volta che un nuovo deossiribonucleotide viene inserito nel filamento di DNA in crescita, viene rilasciato una molecola di pirofosfato (PPi). Questo, è utilizzato dall'enzima sulfurilasi per produrre ATP dall'AMP + PPi. L'ATP viene così consumato dall'enzima luciferasi, che emette luce. La luce prodotta viene letta da un sensore che permette, tramite un programma, di capire quanti nucleotidi identici sono presenti uno successivo all'altro nella sequenza, grazie all'intensità della luce prodotta (Pinto et al., 2012; Madigan et al., 2016).

Il sistema *Illumina Genome Analyzer* utilizza un approccio di sequenziamento che assomiglia al sequenziamento di tipo Sanger nell'utilizzo della sintesi del DNA e dei nucleotidi terminatori della catena. Tuttavia, nel sistema *Illumina* (Fig.14 b), grazie all'utilizzo di oligonucleotidi “*adapters*” le molecole di DNA vengono legate con entrambe le estremità al supporto solido così uno dei due adapters permette al frammento di appaiarsi, una volta denaturato, ad un oligonucleotide legato covalentemente alla superficie di una piastra di vetro detta “*flow cell*” . A questo punto, avvenuto l'appaiamento, il frammento di DNA si ripiega a ponte, si aggiunge la polimerasi e così può avvenire l'amplificazione. In particolare, ciascuno dei quattro differenti deossiribonucleotidi trasporta il proprio marcatore fluorescente che funziona come terminatore per il gruppo 3'-OH, provocando così l'interruzione della catena. Questa serie di passaggi continua per un determinato numero di cicli, come stabilito dalle impostazioni dello strumento definite dall'utente (Mardis, 2008; Madigan et al., 2016).

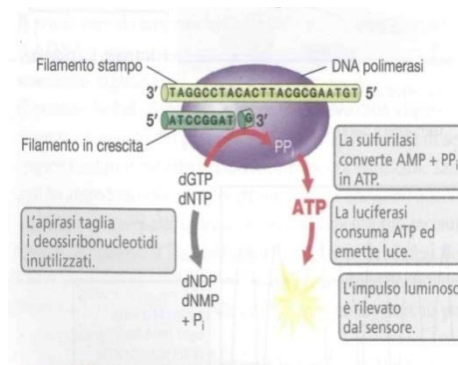


Figura 14 a. Schema riassuntivo del pirosequenziamento 454 (Madigan et al., 2016).

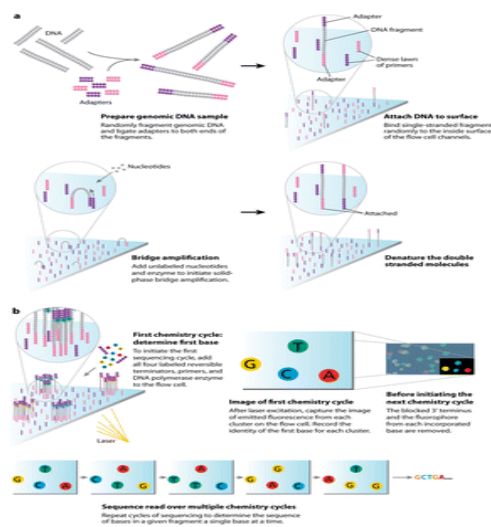


Figura 14 b. Schema riassuntivo del metodo *Illumina Genome Analyzer* (Mardis,2008).

## 1.6 Analisi della composizione di specifiche comunità microbiche mediante Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

L'ibridazione fluorescente *in situ* (**Fluorescence In Situ Hybridization, FISH**) permette la visualizzazione, l'identificazione, l'enumerazione e la localizzazione di microrganismi metabolicamente attivi senza dover ricorrere a tecniche colturali.

La tecnica si basa sull'utilizzo di sonde molecolari oligonucleotidiche a DNA (lunghe 15-20 nucleotidi), legate covalentemente con un fluorocromo all'estremità 5', che impartiscono una fluorescenza rilevabile in microscopia ad epifluorescenza alle cellule che contengono una sequenza di acido nucleico complementare (Amann & Ludwig, 2000; Daims et al., 2005; Barra Caracciolo et al., 2005) (Fig. 14 c).

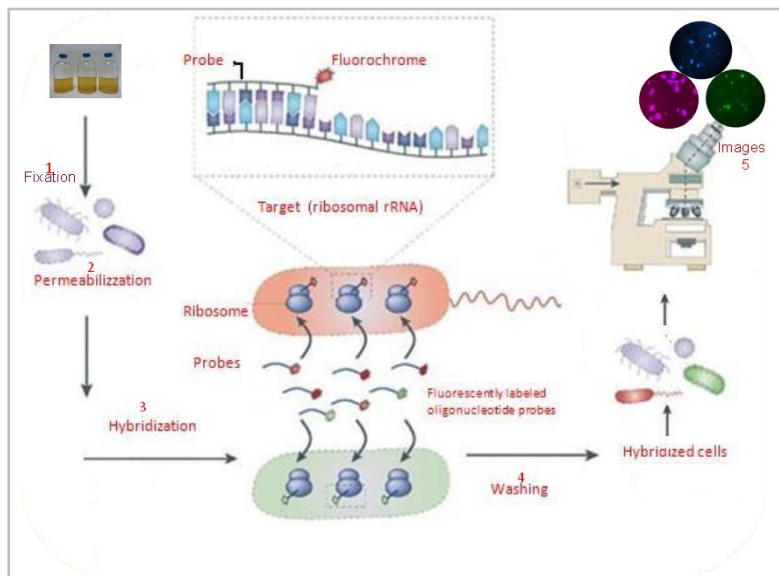


Figura 14 c. Rappresentazione schematica delle fasi di realizzazione della tecnica FISH per l'analisi delle comunità microbiche attive.

I più interessanti vantaggi offerti dalla tecnica ai fini di questa ricerca sono dati dal fatto che:

- 1) consente di evidenziare i soli **microrganismi metabolicamente attivi** in quanto le sonde utilizzate hanno un target a rRNA (16S o 23S), dunque ogni cellula microbica risulterà fluorescente al microscopio se n-molecole (nell'ordine di un paio di centinaia) del suo rRNA avranno ibridato. L'approccio della FISH è quindi "dinamico" perché si basa sui cambiamenti dello stato di attività dei microrganismi in seguito a variazioni ambientali (che siano apporto di substrato, dinamiche di competizione, fattori abiotici) (Blagodatskaya & Kuzyakov, 2013);

- 2) permette di studiare struttura e composizione della comunità su **più livelli tassonomici**: l'approccio che viene utilizzato in questo studio è infatti di tipo *nested* (nidificato) per cui si procede all'utilizzo delle sonde in maniera sequenziale, *dal generale al particolare* (definito anche *Top-to-Bottom Approach*) (Amman et al., 1995). In questo modo è possibile applicare le sonde per diversi gruppi filogenetici in maniera mirata, a diversi livelli tassonomici (di *phylum*, ordine, famiglia, genere e addirittura specie). L'applicazione simultanea e gerarchica delle sonde migliora l'affidabilità del rilevamento del *target* che si sta cercando (Loy et al., 2003).

Inoltre, un apparente svantaggio della tecnica, cioè l'uso di un numero limitato di sonde, può rivelarsi un vantaggio quando si intenda individuare specifici gruppi tassonomici e/o funzionali che svolgano ruoli chiave nell'ambito della DA. In tal senso, future ricerche mirate ad individuare *bioindicatori* di processo, potranno avvalersi della tecnica FISH, con indagini mirate su specifici target, evitando laboriose elaborazioni comprendenti anche componenti minori delle comunità, che contribuiscono solo in termini di diversità o come pool di riserva per la stessa.

## SCOPO DEL LAVORO

Con la ricerca del presente dottorato si è inteso contribuire alla comprensione delle interazioni che si svolgono tra popolazioni microbiche attive nel processo di DA. Lo scopo ultimo è il miglioramento dell'efficienza di produzione di CH<sub>4</sub> da substrati lignocellulosici nel contesto della valorizzazione energetica di biomasse di scarto. Il problema rappresentato dalla recalcitranza alla degradazione dei materiali lignocellulosici nella DA rappresenta infatti un "collo di bottiglia" per l'intero processo (Haitjema et al., 2014) principalmente per la scarsa efficienza della fase iniziale di idrolisi. Le ricerche hanno inteso approfondire questo aspetto, affrontandolo dal punto di vista microbiologico, approfondendo le caratteristiche strutturali e funzionali della comunità.

Due sono i principali esperimenti realizzati: l'avvio del processo, mediante uso di due inoculi di stessa origine ma diversamente strutturati e il potenziamento della fase di idrolisi mediante *bioaugmentation* con specifiche componenti microbiche; sono state studiate inoltre le strategie adottate dalle *guild* funzionali, principalmente dei batteri metanogeni in risposta alle condizioni sperimentali:

- 1° sperimentazione - Ruolo della struttura della comunità microbica utilizzata per l'avvio del processo di DA ed importanza della simbiosi;
- 2° sperimentazione - Potenziamento della fase idrolitica, mediante *bioaugmentation* con colture di Funghi Anaerobi Ruminanti (ARF), e dell'acidogenesi mediante un pool batterico fermentante F210 isolato da un ecosistema costiero. Entrambe le componenti microbiche derivano da ecosistemi naturali, il primo di natura ruminale e il secondo da sedimenti lagunari.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Substrato: Paglia di Grano

La Paglia di Grano (PG) (Fig. 15) tal quale è stata fornita da un'azienda agricola nei pressi del CR-ENEA Casaccia (Osteria Nuova - Roma). Per l'uso, i frustoli sono stati tagliati in frammenti di lunghezza massima di 2 cm. Per evitare disomogeneità, gli internodi sono stati eliminati. Nell'allestimento delle prove sperimentali la paglia essiccata (T ambiente) è stata termicamente trattata (121°C per 20 minuti) in assenza di acqua per ridurre la flora microbica autoctona ed evitando al massimo l'idrolisi fisica.



Figura 15. Paglia di Grano

#### 2.1.1 Caratterizzazione

Per stimare la quantità di biomassa valorizzabile mediante DA, il substrato è stato caratterizzato tramite determinazione dei solidi totali (TS) e solidi volatili (VS) (metodiche APHA, 2005), riportate in tabella 6. Le stime percentuali sono state calcolate come segue:

- $TS \% = \frac{(P_{105} - T)}{(P - T)} \times 100$
- $VS \% = \frac{(P_{105} - P_{550})}{(P_{105} - T)} \times 100$

Dove:  $P_{105}$ , peso secco a 105°C  
 T, Tara  
 P, peso campione a temperatura ambiente  
 $P_{550}$ , peso secco ceneri a 550°C

In particolare i TS indicano il contenuto in sostanza secca di un campione (frazione organica e inorganica), mentre i VS, ricavati per differenza della sostanza incenerita rispetto al TS, stimano la quantità della frazione di sostanza organica della biomassa.

Tabella 6. Caratterizzazione paglia di grano

<b>TS</b>	w/w %	<b>92,64</b>
<b>VS</b>	w/w %	<b>84,38</b>
<b>COD*</b>	gr O <sub>2</sub> / gr di TS	<b>1,32</b>
<b>COD**</b>	gr O <sub>2</sub> / gr di t.q.	<b>1,22</b>
<b>COD**</b>	kJ/gr di TS	<b>18,77</b>
<b>COD**</b>	<b>kJ/gr t.q.</b>	<b>17,35</b>

## 2.2 Inoculi

### 2.2.1 Funghi Anaerobi Ruminali

Poiché i Funghi Anaerobi Ruminali (ARF) costituiscono un argomento di ricerca piuttosto recente (paragrafo 1.3), non è attualmente possibile reperire ceppi puri da ceppoteche commerciali. I due ceppi di ARF utilizzati nel presente studio –*Neocallimasti xsp* e *Orpinomyces sp* - sono stati originariamente forniti al CR-ENEA-Casaccia (Laboratorio di Biomasse e Bioenergie per le Biotecnologie) da un team di ricercatori della *Kahramanmaraş Sütçü İmam University*, (Turchia), nel corso di una precedente collaborazione scientifica (2012).

Allestimento delle colture fungine. La riattivazione dei ceppi ARF, conservati a -20°C in soluzione di glicerolo (15%), è stata effettuata su terreno liquido Basal Medium (BM) come indicato dal protocollo descritto da *Miller e Wolin, 1973*, con modifiche messe a punto nei laboratori ENEA nel corso di precedenti sperimentazioni<sup>5</sup>. Il terreno è stato preparato 24 ore prima della riattivazione dei ceppi ARF. Per la preparazione delle Soluzioni di Sali I e II, si è fatto riferimento alla tabella 7. Il BM è stato preparato aggiungendo in un becher i componenti in ordine presenti in tabella 8 esclusi glucosio e cisteina.

Tabella 7. Composizione delle Soluzioni di Sali I e II e della Soluzione di Acidi Grassi per un volume finale di H<sub>2</sub>O distillata di 100 ml

<sup>5</sup>I funghi anaerobi sono molto sensibili alle variazioni dei parametri ambientali. Vivono infatti all'interno del rumine dove le condizioni ambientali sono costanti: temperatura di 39°C, pH intorno a 7, anaerobiosi mantenuta dalla CO<sub>2</sub>. In particolare il liquido ruminale è composto da: 80-85% acqua e 2-15% acidi grassi, dei quali 60% acido acetico, 25% acido propionico, 15% acido butirrico.

Soluzione Sali I (%P/V)	Soluzione Sali II (%P/V)	Soluzione acidi grassi (15 ml)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,6	NaCl 1,2	Acetico 9 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,6	Butirrico 2ml
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,6	Propionico 4 ml
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0,245	
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,159	

Tabella 8. Composizione del Basal Medium con le quantità relative ad un volume finale di 1 litro. Le quantità per i componenti contrassegnati dall'asterisco (peptone e soluzione di acidi grassi) sono state modificate rispetto al protocollo di riferimento (modifiche ENEA/ Univ. della TUSCIA)

Basal Medium	in 1L
Soluzione di Sali I	40 ml
Soluzione di Sali II	40 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4 g
Estratto di lievito	2g
Peptone*	5 g
Soluzione di acidi grassi*	1 ml
Cloramfenicolo (0,1g/l)	1ml
Resazurina (1g/l)	1 ml
Cisteina-HCl	1,2 g
Glucosio (200g/L)	25 ml
(H <sub>2</sub> O distillata)	A volume

La soluzione così composta, è stata portata ad ebollizione e solo successivamente è stata aggiunta a caldo la cisteina. Il tutto è stato riversato in una bottiglia Pirex con tappo a 3 valvole (VICI Jour): una di queste è stata adibita al flussaggio con CO<sub>2</sub>, per un tempo necessario a far sì che la Resazurina (indicatore colorimetrico solubile dello stato anossigenico), virasse da colore rosa a giallo indicando l'instaurarsi di una condizione priva di ossigeno (Fig. 16).



Figura 16. Preparazione del terreno Basal Medium per la coltura fungina. Il viraggio del colore della soluzione, da rosa (A) a giallo (B), indica l'instaurarsi di una condizione anaerobica.

La soluzione è stata quindi sterilizzata in autoclave (120°C, 1,5 atm, 20') e flussata nuovamente con CO<sub>2</sub>, apponendo questa volta un filtro da 0,22 µm all'estremità del tubo di insufflaggio per garantire la sterilità. Continuando a flussare, è stata aggiunta l'aliquota di glucosio, precedentemente sterilizzata per filtrazione (filtro da 0,22 µm MillexGV-Merck Millipore). Il pH finale era di 6,6-6,8. Per l'allestimento delle colture sono state utilizzate bottiglie serologiche da 120 ml contenenti circa 0,5 g di paglia quale substrato per la crescita degli ARF. Le bottiglie contenenti solo paglia, sono state sigillate e sottoposte al trattamento termico (121°C, 1,5 atm, 20 minuti). Una volta raffreddate, in ogni bottiglia sono stati aliquotati 50 ml di terreno BM mediante siringhe sterili, sempre sotto flusso di CO<sub>2</sub>. La fase successiva, di inoculo di ARF, è stata eseguita con particolari accortezze per evitare contaminazioni batteriche, inquinamento da ossigeno e sbalzi di temperatura: pertanto si è lavorato vicino ad una fonte di calore generata da una fiamma utilizzata per sterilizzare e per mantenere l'ambiente caldo, dal momento che la temperatura vitale dei funghi ha un optimum a 39°C. In particolare, per ciascun ceppo di ARF si è proceduto come segue: le fiale in cui erano conservati i ceppi sono state scongelate dai -20°C alla temperatura ambiente; per prelevare l'aliquota di funghi, sono state aperte velocemente e mantenendo il flusso di CO<sub>2</sub> tramite aghi ricurvi precedentemente flambati sono stati prelevati ed inoculati 3 ml di coltura, utilizzando siringhe sterili. Le colture sono state poste ad incubare a 39°C per due giorni.

Dopo 6 giorni, quando cioè la produzione di zoospore raggiunge il culmine (Lowe et al., 1987), da ogni bottiglia sono state prelevate aliquote di circa 7,5 ml e ripassate in serum bottle con 50 ml di terreno BM fresco. Dopo un secondo ripasso (6 giorni) nei reattori veniva raggiunta una concentrazione dell'ordine di 10<sup>8</sup> zoospore/ml, stimata tramite conta diretta al microscopio ad epifluorescenza (si veda oltre) con colorazione Calcofluor-White. Tale concentrazione è stata

utilizzata per inoculare gli ARF nei reattori, come riportato nel piano sperimentale. La purezza delle colture rispetto ad inquinamenti batterici è stata verificata mediante tecnica FISH (si veda oltre).

### 2.2.2 Pool batterico fermentante F210

Il *pool* F210 composto da *Bacteria* fermentanti e idrogeno-produttori (Fig. 17), è stato isolato e caratterizzato nei laboratori ENEA a partire da sedimento della laguna ipertrofica di Fogliano (Izzo et al., 2014) in cui sono presenti componenti microbiche a differente tolleranza nei confronti dell'ossigeno: il *pool* è stato arricchito per 210 h su glucosio (10 g/L), in un bioreattore *Continuous Stirred Tank Reactor* (CSTR) ed è stato caratterizzato tramite il clonaggio del gene 16S rRNA che ha evidenziato una struttura ben definita composta da due componenti principali di batteri idrogeno produttori appartenenti al genere *Clostridia* (41%) ed *Enterobacter* (56%) (Di Bonito et al., 2011; Izzo et al., 2014).

Per l'allestimento delle prove sperimentali il *pool* è stato cresciuto in terreno *Basal Fermentation Medium* (BFM) a 37°C (Pan et al., 2008; Marone et al., 2012) (tab.9), 24 ore prima del suo inoculo nei reattori. La colorazione in DAPI ha consentito di rilevare una densità cellulare di  $2,9 \cdot 10^8$  cell/ml  $\pm$   $1,6 \cdot 10^7$  mediante conta diretta in microscopia ed epifluorescenza (si veda "Analisi microbiologiche"). La quantità e la concentrazione di H<sub>2</sub> prodotta da F210 era quella comunemente registrata nelle riattivazioni (Di Bonito et al., 2011).

Studi precedenti riguardanti la caratterizzazione filogenetica dell'F210 condotti in collaborazione con CNR-IRSA, hanno evidenziato che in questo *pool* microbico non sono presenti *Archaea* metanogeni.

Tabella 9. Composizione del BFM; le quantità si riferiscono a 1 l di Tampone Fosfato (si veda più avanti nel capitolo)

<b>BFM</b>	
Peptone	3 g
Estratto di lievito	1 g
L-cisteina · HCl · H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,21 g

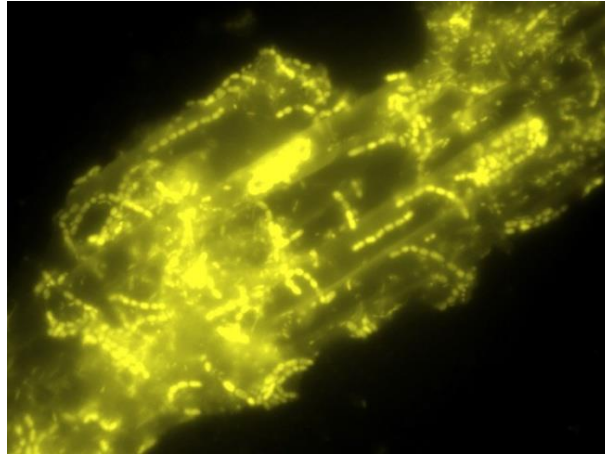


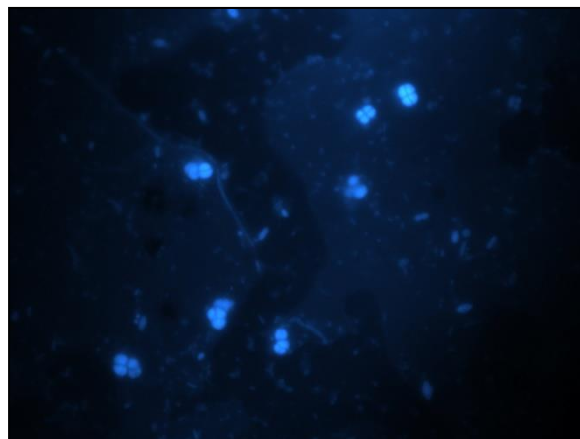
Figura 17. Pool di batteri fermentanti  $H_2$ -produttori “F210” colonizzanti una fibra di paglia di grano. Micrografie realizzate nei laboratori ENEA mediante microscopio ad epifluorescenza Zeiss (Axioskop 40, Germany).

### 2.2.3 Comunità metanogena

Nel primo esperimento la produzione di  $CH_4$  è stata avviata confrontando due inoculi a differente struttura: inoculo disaggregato **D** e inoculo aggregato in granuli **A**, entrambi ottenuti da un impianto pilota (Fig. 18 A) alimentato con effluenti liquidi delle produzioni casearie (scotta). Nel secondo esperimento è stato utilizzato solo **D**. Più in particolare, per l’inoculo denominato **D** (Fig. 18 B) è stato utilizzato un digestato proveniente da un impianto pilota di piccola taglia di DA presente nel CR- Casaccia ENEA come di seguito descritto.



A



B

Figura 18. Nelle micrografie sono mostrati in: A. l’impianto pilota ENEA. B. Comunità microbica colorata in DAPI. Particolarmente evidenti gli *Archaea* metanogeni a quadrifoglio appartenenti al genere *Methanosarcina*, acetotrofi generalisti. Micrografie realizzate nel corso di questa tesi nei laboratori ENEA mediante microscopio ad epifluorescenza Zeiss (Axioskop 40, Germany)

Nell’ambito del progetto METISOL (Coordinato dal Centro Ricerche FIAT - WP1 “Produzione di Bio-Metano per l’alimentazione di Impianti di steam reforming”) è stato realizzato un digestore anaerobico a due fasi per la produzione di  $H_2$  e  $CH_4$ . La sperimentazione aveva il duplice obiettivo

di: 1) mettere a confronto la tecnologia tradizionale monofase di produzione di metano con quella innovativa bifase, 2) produrre una miscela di H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> (bioidrometano), un carburante da utilizzare nella trazione dei veicoli. L'impianto è dunque costituito da un primo reattore (10L) mirato alla produzione di H<sub>2</sub> e da un secondo (50L), alimentato dal primo, per la produzione di CH<sub>4</sub> (descritto in Lembo et al., 2016). Entrambi i reattori sono continuamente miscelati (*Continuous-flow Stirred-Tank Reactor* o CSTR) e termostati (37°C). La sperimentazione è stata effettuata utilizzando la scotta, un refluo dell'industria lattiero-casearia che si ottiene quando il siero di latte è trattato termicamente (80-90°C per circa 25 min) e chimicamente (soluzione acida di sali) per la produzione della ricotta. In particolare, nel primo reattore viene prodotto H<sub>2</sub> tramite l'inoculo F210. Gli effluenti liquidi di questa fase, nella quale sono attivi i processi di idrolisi e di acidogenesi, alimentano il secondo reattore, dove la comunità metanogena introdotta con l'inoculo liquame bufalino, attiva il processo di produzione di CH<sub>4</sub>. In questo secondo reattore coesistono tutte le fasi della DA – idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi. Il processo di produzione di H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> è stato condotto in continuo utilizzando la scotta non diluita. La velocità di flusso dal substrato al primo stadio e da questo al secondo veniva regolata da una pompa peristaltica. Nel secondo stadio l'uscita dell'effluente era regolata da una elettrovalvola comandata da un sensore di livello. Inoltre, una beuta (0,4L) di decantazione era posta a monte dell'elettrovalvola per evitare che l'orefiziosità di quest'ultima venisse otturato da residui solidi presenti nel digestato. I tempi di ricambio idraulico (HRT) del primo e del secondo reattore erano di 24h e di 16 giorni, rispettivamente. Nel primo stadio il controllo del pH (5-5.5) era effettuato con tampone fosfato (0,1M), nel secondo con NaHCO<sub>3</sub> (5-10g/L). L'inoculo CSTR (D) è stato prelevato quando il processo era condotto in monofase. Durante questa sperimentazione nella beuta di decantazione sia l'elevato carico organico (circa 150g/giorno di lattosio, il principale composto presente nella scotta), sia l'elevato HRT (3-3,5 h) hanno innescato il processo noto come "granulazione anaerobica della biomassa batterica", ovvero l'inoculo A (Fig.19).

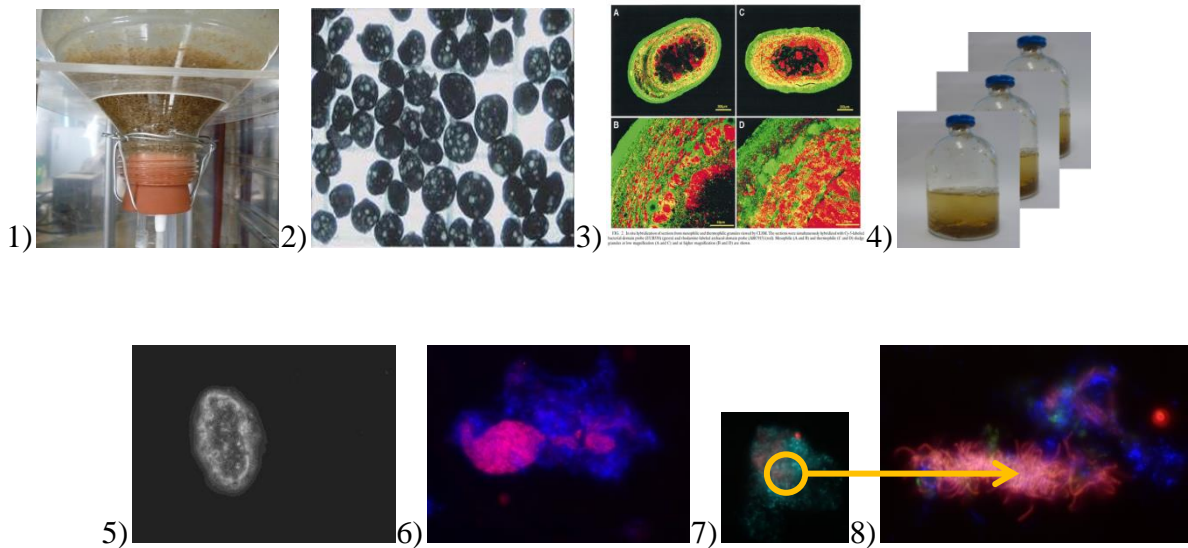


Figura 19. Sono riportate alcune immagini relative all'inoculo A: 1) il modulo dell'impianto pilota adibito alla decantazione; 2) immagini di repertorio delle comunità microbiche strutturate in granuli; 3) sezioni di granuli colorate mediante tecnica FISH (da Sekiguki et al. 2001); 4) batch sperimentali allestiti con l'inoculo A; 5, 6, 7 e 8) immagini ottenute mediante tecnica FISH nel corso delle ricerche

## 2.3 Analisi della produzione di biogas

### 2.3.1 Water Displacement

Per la misura quantitativa del gas si è adottato un sistema volumetrico a spostamento di liquido (Water Displacement) (Fig. 20) (Kalia et al., 1994). Esso prevede l'utilizzo di una siringa graduata su cui è montata una piccola valvola a farfalla per consentirne l'apertura e la chiusura. Durante la misura tale siringa viene riempita completamente del liquido barriera (acqua) e immersa in un becher. Il gas viene convogliato alla siringa attraverso un tubicino dotato di un sistema aperto/chiuso all'estremità, dove un ago sterile permette il passaggio del biogas dal reattore al sistema di misura. Il biogas viene così fatto gorgogliare nella parte di siringa immersa nel becher e, andando ad occuparne lo spazio di testa, crea una sovrappressione che spinge il liquido contenuto nella siringa stessa verso il basso fino a ristabilire l'equilibrio di pressione. Il volume di liquido spostato rappresenta la misura del biogas (ml) prodottosi nel reattore.

Figura 20. Misurazione tramite Water Displacement della quantità di biogas prodotto.



### 2.3.2 Gas Cromatografia (GC)

La composizione del biogas prodotto, in termini di  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  (valori %) è stata analizzata tramite Gas Cromatografo Varian 4900.

### 2.4 Analisi degli intermedi di processo tramite High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

La concentrazione dei principali intermedi di reazione prodotti nel mezzo liquido durante il processo di DA è stata determinata mediante High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ThermoSpectrasystem P4000) di cui si riportano le specifiche tecniche: rivelatore a UV ( $\lambda = 210$  nm) e rilevatore a indice di rifrazione, utilizzando il metodo di analisi isocratica a  $75^\circ\text{C}$  con colonna  $300 \times 7,8$  mm Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (Phenomenex) a  $65^\circ\text{C}$ , particelle da  $8 \mu\text{m}$ , precolonna con cartucce Carbo-H (Phenomenex); fase mobile  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5mN (flusso: 0,6 ml/min).

In particolare tra gli Acidi Grassi Volatili (VFA) sono stati determinati gli acidi: acetico, butirrico, propionico, lattico, succinico, formico, valerico e isovalerico. Prima dell'iniezione in colonna i campioni liquidi sono stati opportunamente diluiti (generalmente 1:20) in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5mN e poi centrifugati a 13'000 rpm per 10 minuti. Circa 600  $\mu\text{l}$  di surnatante sono stati quindi aliquotati negli appositi tubi per l'analisi.

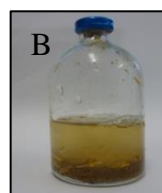
## 2.5 Allestimento dei reattori e Campionamenti - I sperimentazione

### Allestimento dei reattori

Le condizioni sperimentali (tab.13) sono state testate in reattori costituiti da bottiglie sierologiche da 120 ml. I reattori sono stati allestiti in modalità di processo *batch* (paragrafo 1.1.2), che rappresenta la modalità di processo più conveniente per identificare in via preliminare le problematiche di processo. Il volume totale di lavoro è stato di 50 ml di cui il 20% costituito dalla sola componente metanogena come inoculo e da Tampone Fosfato (TP 0,1 M: 6,08g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 7,1g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 1 l di acqua distillata), utilizzato per mantenere il pH a 6,8 e impedire l'acidificazione del mezzo data dalla produzione di acidi organici che avviene durante il processo di DA.

Per l'allestimento dei reattori si è proceduto in questo modo: le bottiglie da 120 ml sono state riempite con la paglia di grano (dove prevista) alle concentrazioni di 8 gVS/l. I reattori sono stati quindi sigillati con tappi di silicone fermati da ghiere in alluminio e sterilizzati in autoclave (121°C per 20 minuti). Successivamente si è proceduto ad aggiungere il TP secondo i volumi del Piano Sperimentale; i reattori sono stati poi flussati (5min) con  $\text{N}_2$  per instaurare la condizione di anaerobiosi e dopo è stata aggiunta l'aliquota di inoculo di metanogeni. I reattori così allestiti sono stati subito posti in un bagno termostato a 37°C (mesofilia), in agitazione (con oscillazione orbitale di 100 rpm) e al buio (Fig. 21). Tutte le condizioni sperimentali sono state condotte in configurazione di processo monostadio.

Figura 21. A) Alloggiamento dei reattori da 120 ml in agitatore termostato. B) Reattore batch da 120 ml



### Campionamenti

Le misure delle produzioni quali-quantitative di biogas ed i prelievi del mezzo di coltura sono stati effettuati nella prima settimana ogni 3 giorni, e successivamente ogni 5 giorni. Dopo 20 giorni le misure ed i campionamenti sono stati effettuati settimanalmente, protraendosi per 112 giorni (fino a

quando, cioè, la produzione di biogas si è conclusa completamente). Sono stati misurati: quantità e composizione del biogas prodotto e concentrazione dei principali intermedi di processo. Aliquote di 0,6 ml del mezzo liquido sono stati prelevati, fissati (PFA 4%) e -20°C per le successive analisi microbiologiche. Successivamente la scelta dei campioni da analizzare è stata effettuata sulla base degli andamenti delle curve cumulative di produzione di CH<sub>4</sub>.

La scelta di analizzare i campioni degli intermedi di processo (VFA) relativi a specifici tempi di campionamento invece è stata fatta per completare le informazioni relative al processo per meglio comprendere la corrispondenza delle produzioni di CH<sub>4</sub> con la composizione della comunità microbica.

## 2.6 Allestimento dei reattori e Campionamenti - II sperimentazione

### Allestimento dei reattori

Tutti i test condotti sono stati effettuati a 39 °C (oscillazione orbitale 100 rpm), utilizzando PG (6,5 g/l VS) come unico substrato da idrolizzare caratterizzata come in tabella 10. Sono state utilizzate bottiglie sierologiche anche in questo caso da 120 ml (Fig. 20 A e B) con working volume finale (wv) di 62,5 ml. Per mantenere il pH ottimale degli H<sub>2</sub> produttori, il medium dell'esperimento era costituito da tampone fosfato (0,1 M).

Gli inoculi sono stati immessi nelle bottiglie contenenti la paglia, dopo trattamento termico come descritto per il primo esperimento e dopo aggiunta di tampone fosfato (TP 0,1 M: 6,08g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 7,1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1l di acqua distillata), utilizzato per mantenere il pH a 6,8 e impedire l'acidificazione del mezzo data dalla produzione di acidi organici che avviene durante il processo di DA.

L'inoculo F210, è stato riattivato per 24 ore ed utilizzato tal quale (paragrafo 2.2.3). L'inoculo fungino è stato utilizzato dopo riattivazione come descritto nel paragrafo 2.2.3.

Il digestato del CSTR, invece, poiché mediante analisi all'HPLC risultava contenere elevate quantità di acido acetico, è stato utilizzato come inoculo solo dopo essere stato centrifugato due volte e risospeso in PBS (Phosphate Buffered Saline). La quantità di inoculo, **D**, aggiunta nella I e nella II fase corrisponde al 20% del volume totale di lavoro (62 ml). Per tutta la durata dell'esperimento il pH del mezzo di coltura si è mantenuto costante con valori compresi tra 6,5-7. Il pH finale era per tutti i batch 6,5.

## **Campionamenti**

Le misure delle produzioni quali-quantitative di biogas ed i prelievi del mezzo di coltura sono stati effettuati a partire dall'inoculo (T0) ogni 2 giorni nella prima settimana sperimentale e successivamente una volta ogni sette giorni per un totale di 24 tempi di campionamento, fino a rilevare il termine della produzione di biogas (T63).

Sono stati misurati: quantità e qualità del biogas prodotto; inoltre è stata prelevata un'aliquota di mezzo liquido da destinare sia all'analisi degli intermedi di processo tramite HPLC, sia per le successive analisi microbiologiche. I campioni per le analisi microbiologiche sono stati opportunamente conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ , aspettando di scegliere, sulla base degli andamenti delle curve di produzione del  $\text{CH}_4$ , quali analizzare.

## **2.6 Analisi microbiologiche**

### **2.6.1 Stima della densità cellulare tramite conta diretta in Microscopia ad Epifluorescenza**

La densità cellulare, espressa come numero totale di cellule microbiche per ml di mezzo di coltura ( $n^{\circ}\text{cell/ml}$ ), è stata stimata mediante conta diretta in microscopia ad epifluorescenza utilizzando la colorazione DAPI (Fig. 23), come riportato in Barra Caracciolo et al. (2005). La tecnica si basa sulla proprietà della molecola 4'-6'-diamino-2-fenilindolo (DAPI) di formare complessi fluorescenti con il doppio filamento di DNA delle cellule (Porter & Feig, 1980), intercalandosi tra le basi Adenina e Timina. Ciascun campione, opportunamente diluito, è stato incubato al buio per 20 minuti con colorante DAPI ( $1\mu\text{g/ml}$ ) e poi filtrato su una membrana (filtro) in policarbonato (Millipore, Black-porosità  $0,2\ \mu\text{m}$  e diametro 25 mm) (Fig. 22 b) utilizzando un sistema di filtrazione con pompa da vuoto (Sartorius) (Fig. 22 a) sempre lavorando in condizioni di oscurità per preservare la fluorescenza della molecola. Il filtro così ottenuto è stato posizionato su un vetrino da microscopio e coperto da un copri-oggetto, con interposizione di olio da immersione per microscopia (Zeiss). L'osservazione è stata realizzata con microscopio ad epifluorescenza (Axioskop 40, Zeiss, Germany) dotato di un illuminatore HXP con fibra ottica e collettore per microscopio (lampada HXP 120V), con obiettivo ad immersione ingrandimento 100X.

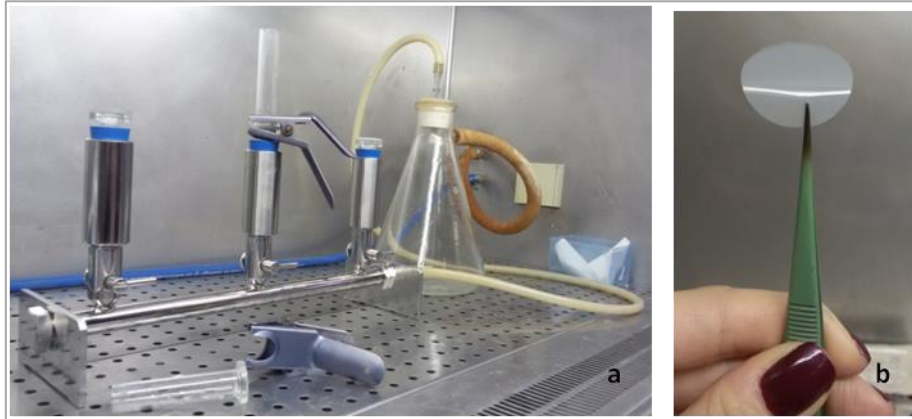


Figura 22. a) Apparato di filtrazione Sartorius utilizzato per l'immobilizzazione dei campioni su membrana di policarbonato. b) Membrana in policarbonato Millipore su cui vengono fissati e osservati i campioni.

Per ogni replica di ogni condizione sperimentale è stata effettuata la conta delle cellule presenti in 15 campi distribuiti su porzioni del filtro delimitate da una griglia di conta (integrata negli oculari del microscopio) e individuati in modo casuale. Il numero di cellule sull'intero filtro è stato calcolato con la seguente formula (Franklin et al., 2011):

$$n^{\circ}\text{cell/ml} = \frac{X_m \times A_f \times 0,1}{A_g \times V}$$

$X_m$  = il numero medio di cellule batteriche per campo.

$A_f$  = l'area del filtro su cui sono state raccolte le cellule (176,625 mm<sup>2</sup>)

$A_g$  = area della griglia osservata (mm<sup>2</sup>).

$V$  = volume di campione filtrato su membrana (ml)

0,1 = 1/10 = prima diluizione del campione

Le immagini sono state ottenute con una camera digitale (Zeiss Axiocam MCR, Zeiss, Germany) ed elaborate attraverso il software Axio – Vision (Axio Cam MRm, Zeiss, Germany).

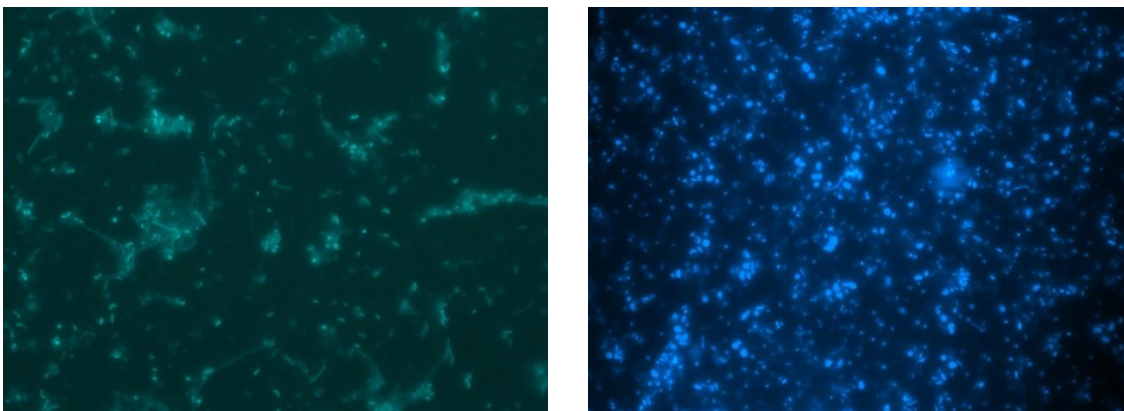


Figura 23. Esempi di visualizzazione della colorazione DAPI in microscopia ad epifluorescenza. Diluizione 1:100. Micrografie ottenute nel corso di questa tesi nei laboratori ENEA con microscopio Axioshop 40, Zeiss; obiettivo 100X.

### 2.6.2 Preparazione dei campioni per la FISH

Campioni del mezzo di coltura da destinare alle analisi microbiologiche sono stati prelevati e fissati in concomitanza alle analisi delle produzioni di biogas e al prelievo per la caratterizzazione degli intermedi di processo: aliquote di 500 µl sono state fissate in 1,5 ml di PFA (Parafolmaldeide) al 4% per 3 ore a 4°C (Daims et al., 2005; Amman & Binder 1990); i campioni sono poi stati centrifugati per 5 minuti a 15'000 rpm e il surnatante è stato sostituito con PBS 1X (Tampone Fosfato Salino), ripetendo questa operazione due volte; infine il pellet è stato risospeso in 500 µl di PBS 1X, per mantenere il campione alla diluizione iniziale. I campioni così preparati sono stati conservati a -20°C. La scelta dei campioni da analizzare è stata effettuata sulla base delle curve di produzione ottenute a fine esperimento.

Il protocollo FISH di riferimento utilizzato è quello stabilito da Amann et al. (1990) così come utilizzato da Daims et al. (2005) e Barra Caracciolo et al. (2005) ed i cui principali passaggi metodologici sono riportati in figura 14c (paragrafo 1.6). D'altra parte, rispetto a quanto già disponibile in bibliografia, la tecnica è stata sviluppata e messa a punto adeguandola a matrici molto eterogenee lavorando soprattutto in merito alla purificazione dei campioni, all'individuazione della loro diluizione ottimale e alla permeabilizzazione della membrana cellulare. In sintesi:

- A. **Fissaggio** dei campioni in PFA e distribuzione su filtro (come in 2.6.2) di policarbonato (Nucleopore White, porosità 0,2 µm, diametro 45 mm), usando una pompa a vuoto;
- B. **Permeabilizzazione** delle membrane cellulari mediante pre-trattamenti enzimatici con Lisozima (10 mg/ml) e Proteinasi-K (5 µg/ml) (Pernthaler et al., 2002; Sambrook et al., 1989) per favorire l'ingresso delle sonde oligonucleotidiche, particolarmente nei batteri del gruppo Gram +;
- C. **Ibridazione** delle sonde oligonucleotidiche marcate con fluorocromi, con sequenze di rRNA *target* nei campioni (tab. 11 a-b);
- D. **Lavaggio** del campione per rimuovere le sonde non legate e preparazione del vetrino;
- E. **Osservazione al microscopio** ad epifluorescenza. Il microscopio è dotato di filtri specifici (tab.11) integrati per la rilevazione del segnale luminoso emesso dalle sonde fluorescenti applicate.

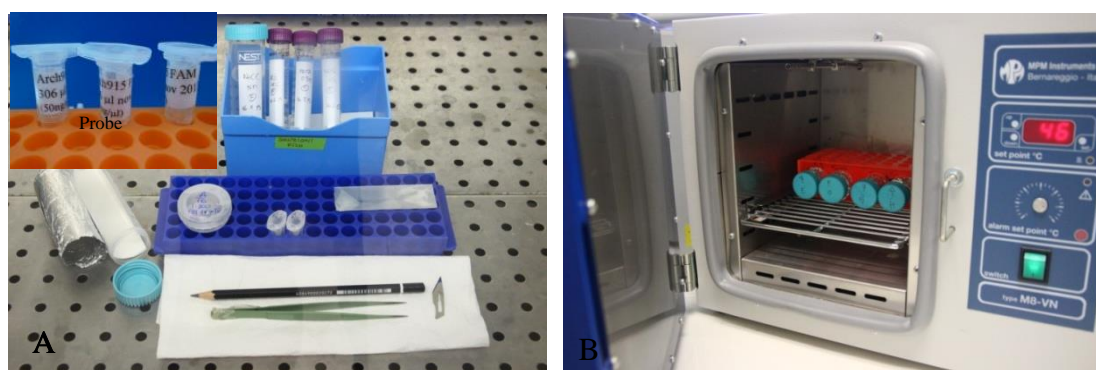


Figura 24. Tecnica FISH. A) Kit di lavoro: la membrana su cui è immobilizzato il campione viene tagliata con un bisturi in piccole sezioni (spicchi, 6-8) posizionate su vetrino rivestito da parafilm; le sezioni vengono così incubate in presenza della Probe Solution, posizionate orizzontalmente in un tubo di polipropilene da 50 ml rivestito da carta argentata e incubato in stufa a 46°C. B) per l'ibridazione

Tabella 10. Lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione massima dei marcatori fluorescenti associati alle sonde oligonucleotidiche e relativi filtri Zeiss utilizzati

Composto fluorescente	$\lambda$ Eccitazione	$\lambda$ Emissione	Filtro Zeiss
DAPI - 4,6-diamidino-2-phenylindole	530 nm	470 nm (blu)	1 (cod.01)
Calcofluor White	365 – 395 nm	420 nm (celeste)	1 (cod.01)
CY3 – Indocarbocianina 3	545-525 nm	605-670 nm (rosso)	3 (cod.43)
FAM/FITC/Alexa	494 nm	518 nm (verde)	(4 cod.38 HE)

Le lista delle sonde utilizzate in questo studio è riportata in tabella 11a per gli *Archaea* e 11b per i *Bacteria*. Per le specifiche delle sonde si rimanda a Loy 2002 ([www.probebase.net](http://www.probebase.net)). Per osservare e contare le cellule ibridate con le sonde evidenziate da specifici fluorofori, sono stati utilizzati i filtri Zeiss con le specifiche riportate in tabella 10.

Tabella 11a. Lista delle sonde utilizzate in questa tesi relative al Domino degli *Archaea*

ARCHAEA TAXA TARGET	FUNZIONE ECOLOGICA	SONDA	SEQUENZA (5' --> 3')	POSIZIONE rRNA	RIFERIMENTO
<i>Archaea</i>	Metanogeni	ARCH915	GTGCTCCCCGCC AATTCCT	16S(915 - 934)	Stahl&Amann, 1991
<i>Methanosarcina</i>	Metanogeni acetotrofi	MS821	GGCTCGCTTCACG GCTTCCCT	16S (860-880)	Raskin et al., 1994
<i>Methanosaeta</i>	Metanogeni acetotrofi	MX825	TCGCACCGTGGGA CACCTAGC	16S(825-847)	Raskin et al., 1994
<i>Methanococcales</i>	Metanogeni idrogenotrofi	MC1109	GCAACATAG GGCACGGGT CT	16S (1109-1128)	Raskin et al., 1994
<i>Methanobacteriales</i>	Metanogeni idrogenotrofi	MB1174	ACCTTGTGTCAGG TTCCATCTCC	16S(311-333)	Raskin et al., 1994
<i>Methanomicrobiales</i>	Metanogeni idrogenotrofi	MG1200b	CRGATAATTCGGG GCATGCTG	16S(1200-1220)	Crocetti et al., 2006

Tabella 11b. Lista delle sonde utilizzate in questa tesi relative al Domino dei *Bacteria*.

BACTERIA TAXA TARGET	FUNZIONE ECOLOGICA	SONDA	SEQUENZA (5' --> 3')	POSIZIONE rRNA	RIFERIMENTO
<i>Bacteria</i>	Non metanogeni	EUB338I	GCTGCCTCCCGTA GGAGT	16S(338-355)	Amman et al., 1990
<i>Bacteria</i> (phylum <i>Planctomycetes</i> )	Non metanogeni	EUB338II	GCAGCCACCCGTA GGTGT	16S(338-355)	Daims et al., 1999
<i>Bacteria</i> ( <i>Verrucomicrobia</i> )	Non metanogeni	EUB338III	GCTGCCACCCGTA GGTGT	16S(338-355)	Daims et al., 1999
<i>Desulfobacterales</i> , <i>Desulfuromonales</i> , <i>Syntrophobacterales</i> , <i>Myxococcales</i> e altri Batteri	Solfato-riduttori	SRB385Db	CGG CGT TGC TGC GTC AGG	16S(385- 402)	Rabus et al., 1996
<i>Firmicutes</i>	Idrolitici	LGC354a	TGGAAGATTCCCT ACTGC	16S(354-371)	Meier et al., 1999;
<i>Firmicutes</i>	Idrolitici	LGC354b	CGGAAGATTCCCT ACTGC	16S(354-371)	Meier et al., 1999;
<i>Firmicutes</i>	Idrolitici	LGC354c	CCGAAGATTCCCT ACTGC	16S(354-371)	Meier et al., 1999;
<i>Clostridium</i>	Idrolitici	CHIS150	TTATGCGGTATTA ATCTYCCTTT	16S(150-172)	Yi et al., 2012
<i>α-Proteobacteria</i>	Idrolitici	ALF1b	CGTTCGYTCTGAG CCAG	16S(19-35)	Manz et al., 1992
<i>α-Proteobacteria</i>	Idrolitici	ALF968	GGTAAGGTTCTGC GCGTT	16S(968-985)	Neef, 1997
<i>β-Proteobacteria</i>	Idrolitici	BET42a	GCCTTCCCCTTC GTTT	23S(1027- 1043)	Manz et al., 1992
<i>γ-Proteobacteria</i>	Idrolitici	GAM42a	GCCTTCCCACATC GTTT	23S(1027- 1043)	Manz et al., 1992
<i>δ-Proteobacteria</i>	Idrolitici	DELTA495a	AGTTAGCCGGTGC TTCCT	16S(495-512)	Loy et al., 2003
<i>δ-Proteobacteria</i>	Idrolitici	DELTA495b	AGTTAGCCGGCGC TTCCT	16S(495-512)	Loy et al., 2003
<i>δ-Proteobacteria</i>	Idrolitici	DELTA495c	AATTAGCCGGTGC TTCCT	16S(495-512)	Loy et al., 2003
<i>Enterobacteriaceae</i>	Idrolitici	EBAC1790	CGTGTTTGCACAG TGCTG	23S(1790-1807)	Bohnert et al., 2000

La sonda GM5 (tab. 11c), sperimentata nel corso di questa ricerca, non è registrata sul database ma è stata proposta da Brookman et al. (2000a,b) per il rilevamento del genere di ARF *Neocallimastix* sp.

Tabella 11c. Sonda testata per il rilevamento degli ARF appartenenti al genere *Neocallimastix* sp.

<i>Neocallimastix</i> spp.	Funghi idrolitici	GM5	CTGAATTGAGAGT GATT	ITS1(162-178)	Brookman et al., 2000
----------------------------	-------------------	-----	-----------------------	---------------	--------------------------

Tutte le ibridazioni ottenute con sonde specifiche sono state realizzate in combinazione con la colorazione DAPI per poter stimare l'abbondanza relativa delle cellule positive rispetto al totale delle cellule presenti (Barra Carracciolo et al., 2005; Gagliano et al., 2015).

## 2.7 Illumina

Le analisi di *Illumina* eseguite in questo studio e in particolare le fasi di amplificazione e purificazione dei DNA bersaglio e le successive preparazioni per le analisi delle sequenze sono state effettuate dal Prof. Ercolini presso il Dipartimento di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

In tabella 12 i primers target per la regione V3-V4 utilizzati in questo studio (Klindworth, et al 2013).

Tabella 12. Primers

	Primer	Sequenza
<i>Bacteria</i>	341F	CCTACGGGNGGCWGCAGTTTGATCNTGGCTCAG
	785R	GACTACHVGGGTATCTAATCC

### 2.7.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA totale dai campioni è stata effettuata da 1,5 ml di sospensione batterica prelevata nel corso delle sperimentazioni. I pellets ottenuti dopo centrifugazione (10 min, 13000g) sono stati lavati con la soluzione salina (PBS buffer) prima di procedere all'estrazione del DNA. L'estrazione del DNA è stata condotta utilizzando il kit commerciale: Bacterial & Yeast Genomics (DNA purification kit) dell'EURx (fornito dalla ditta Carlbiotech) e applicando il protocollo operativo come consigliato.

## 2.8 Elaborazione dati

### 2.8.1 Misure di diversità

#### Indice di Shannon

La diversità batterica dei campioni è stata stimata mediante l'Indice di Shannon e Evenness sulla base dei risultati ottenuti con la tecnica *Illumina*. L'indice di Shannon (Shannon, 1948 in Wilson & Bossert, 1974) è stato calcolato come segue, con  $\log_2$ :

$$\text{Diversità (H')} = -\sum(n_i/N) * \log_2(n_i/N)$$

dove:

$n_i$  = numero di individui in un taxon

$N$  = numero totale di individui

L'indice non ha limite superiore mentre quello inferiore è 0 (0 incertezza).

L'indice misura la probabilità che un individuo preso a caso dalla popolazione appartenga ad una specie differente da una specie estratta in un precedente ipotetico prelievo; l'indice tiene conto sia del numero di specie sia delle abbondanze relative delle medesime. Maggiore sarà il valore di  $H'$  maggiore è la diversità.

### Indice di Evenness

Per valutare il grado di uniformità nella distribuzione degli individui tra le diverse specie è stato calcolato l'indice di Evenness o di equiripartizione di Pielou (J) (Pielou E.C., 1975). L'indice misura la ripartizione delle abbondanze delle varie specie: è massimo quando tutte le specie sono presenti con la stessa abbondanza, ha invece valori bassi quando è presente una sola specie abbondante e numerose specie rare. L'indice mostra quanto la diversità sia dovuta ad un equilibrato rapporto tra le specie, ed è calcolato come rapporto  $H'/H_{max}$ .

$$J = H'/H_{max} = H'/\ln S$$

dove:

$S$  = numero delle specie del campione;

$H'$  = indice di Shannon;

$H_{max}$  = indice di Shannon calcolato per una situazione teorica di riferimento.

### 2.8.2 Calcolo produzioni cumulative

Le produzioni cumulative di  $CH_4$  calcolate per ogni condizione sperimentale sono riportate in figura 25. Le produzioni cumulative sono state calcolate, utilizzando l'equazione riportata in Logan et al. (2002) ed adattata al caso di studio:

$$V_{CH_4,i} = V_{CH_4,i-1} + C_{CH_4,i} * V_{B,i} + V (C_{CH_4,i} - C_{CH_4,i-1})$$

Dove:

$V_{CH_4,i}$  = volume cumulativo di  $CH_4$  prodotto fino al momento dell'analisi (i);

$V_{CH_4,i-1}$  = volume cumulativo di  $CH_4$  prodotto fino al momento dell'analisi precedente (i-1);

$V_{B,i}$  = è il volume del biogas dell'analisi in corso (i);

$C_{CH_4,i}$  e  $C_{CH_4,i-1}$  = concentrazioni percentuali di  $CH_4$  misurate mediante Gas-Cromatografia al momento dell'analisi (i) e al momento dell'analisi precedente (i-1)

$V$  = volume dello spazio testa nel reattore, cioè il volume del reattore non occupato da mezzo liquido.

Il calcolo delle produzioni cumulative consente di seguire nel tempo la produzione in ml di CH<sub>4</sub>, e/o di H<sub>2</sub>. I valori ottenuti dal calcolo delle produzioni cumulative sono stati standardizzati riportandoli al volume di un litro (la misura in grafico viene pertanto indicata in “ml/l”).

### **2.8.3 Analisi statistica dei dati sperimentali**

Per testare la significatività delle differenze riscontrate nelle diverse prove sperimentali è stata applicata l'analisi ANOVA a una via utilizzando il software SigmaStat (Systat Software Inc.). Inoltre, i dati sono stati sottoposti a test di Tukey per evidenziare le coppie di confronti significativi.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Descrizione della razionale degli esperimenti e motivazione della scelta sperimentale

Le presenti sperimentazioni fanno parte del piano di ricerche dell'Accordo di Programma tra Ministero dello Sviluppo Economico ed ENEA (Ricerca di Sistema Elettrico, Piano Annuale di Realizzazione 2013 e 2014). Le attività hanno avuto come obiettivo la “Valorizzazione energetica di scarti agrozootecnici” (RdS/PAR2012/2013/183) e il “Trattamento biologico di biomasse lignocellulosiche e chitinose per la produzione di H<sub>2</sub> e/o CH<sub>4</sub>” (RdS/PAR2013/252).

In quest'ambito, le attività sperimentali sono state svolte in collaborazione con l'Università della Tuscia (UNITUS), Dipartimento di Ecologia e Biologia (DEB); laboratorio di microbiologia cattedra di Microbiologia, Prof. Fenice.

Le sperimentazioni sono state effettuate a scala di banco, alimentando i reattori unicamente con paglia di grano (PG), un substrato di scarto ampiamente prodotto dalle aziende agricole e spesso presente in grande quantità nelle biomasse impiegate nei digestori. Per la sua struttura lignocellulosica è tra le più resistenti alla degradazione e pertanto l'ultima ad essere digerita. Tale substrato è stato quindi scelto perché il più ostico al processo di DA ed è stato utilizzato dopo trattamento termico per abbattere la flora microbica autoctona.

Ai fini di realizzare una più efficiente produzione di biogas, la sperimentazione è stata impostata in due fasi: la prima rivolta a individuare un inoculo metanogeno che enfatizzasse i vantaggi offerti dalle interazioni di cooperazione tra le componenti microbiche che operano la DA; la seconda, mirata a studiare il potenziamento della sua attività mediante bioaugmentation delle fasi di idrolisi ed acidogenesi. Pertanto la comunità metanogena è stata arricchita con ARF, riconosciuti come altamente idrolitici, e con un pool batterico fermentante denominato F210, selezionato nei laboratori ENEA.

Entrambe le sperimentazioni sono state realizzate in modalità *batch* (120 ml), cioè in sistema chiuso in cui il substrato viene fornito una sola volta, all'avvio del processo ed in presenza della componente microbica, e si protrae nel tempo fino all'esaurimento della capacità di produrre biogas dal substrato stesso. Tale sperimentazione, a scala di banco, consente di confrontare differenti condizioni sperimentali. Oltre alle produzioni quali-quantitative del biogas e del suo contenuto in CH<sub>4</sub> sono stati analizzati gli intermedi di reazione considerando i principali acidi grassi volatili presenti nel volume di lavoro.

Le analisi delle comunità microbiche sono state condotte nella fasi ritenute più interessanti della DA

sulla base delle curve di produzione di CH<sub>4</sub>. Le tecniche utilizzate sono state l'Illumina per la classificazione tassonomica e la FISH, per il rilevamento di specifiche componenti microbiche metabolicamente attive. Pertanto fornisce informazioni riguardante l'ecologia funzionale della comunità.

**I Sperimentazione:** è stato allestito un esperimento volto a confrontare l'efficienza di produzione di CH<sub>4</sub> utilizzando inoculi costituiti da comunità batteriche a) disaggragate (D), in cui il contatto fisico e la vicinanza tra cellule è casuale e, b) aggragate (A) cioè strutturate in granuli sulla base di una disposizione ordinata dei diversi gruppi funzionali di microorganismi (cfr 1.2.1). Entrambi gli inoculi sono stati ottenuti da due componenti differenti di uno stesso impianto pilota, realizzato in ENEA (Laboratorio Biomasse e Biotecnologie per l'Energia) per la produzione di biogas da liquidi di scarto derivanti dalla produzione casearie, (scotta).

La **II Sperimentazione** volta a verificare se la bioaugmentation della comunità microbica, effettuata con componenti microbiche naturali idrolitiche e fermentanti, migliori le produzioni di CH<sub>4</sub> da PG. La sperimentazione è stata condotta sia mediante la convenzionale configurazione di processo monostadio che con l'innovativa configurazione di processo bistadio, quest'ultima realizzata affinché i microrganismi coinvolti nelle fasi di idrolisi ed acidogenesi della DA possano avvantaggiarsi di un optimum ecologico definito da una iniziale separazione dalla comunità metanogena (cfr parte introduttiva): dal punto di vista operativo, la comunità metanogena viene inoculata solo quando non si rileva più produzione di H<sub>2</sub>, un prodotto dell'attività fermentante degli idrolitici e acidogenici.

Entrambe le sperimentazioni sono state realizzate in condizioni di mesofilia (37 °C), la condizione che richiede un minor dispendio energetico rispetto alle condizioni di termofilia ed inoltre garantisce una maggiore resilienza al processo per la più elevata diversità della comunità microbica.

### 3.2 Parametri di processo misurati

Per monitorare il processo di DA condotto in questi studi sono stati misurati i seguenti parametri:

- 1) **quantità di biogas** prodotto (ml/l);
- 2) **concentrazione di metano** nel biogas prodotto (%) e relativa **quantità** (ml/l);
- 3) le **concentrazioni di Acidi Grassi Volatili** (VFA, ppm) rilasciate nel mezzo di coltura, quali intermedi del processo di DA;
- 4) composizione tassonomica delle comunità microbiche tramite metodo *Illumina*.
- 5) densità cellulare, microscopia in epifluorescenza (DAPI)
- 6) composizione specifica delle principali *guild* funzionali tramite tecnica FISH.

### 3.3 I sperimentazione: ruolo della struttura degli inoculi nella produzione di biogas

#### 3.3.1 Piano Sperimentale

Di seguito viene riportato lo schema del Disegno Sperimentale della Prima Sperimentazione (tab.13). Sono state allestite cinque condizioni sperimentali:

1. **DP**: è stato utilizzato come inoculo (20% v/v), digestato proveniente dall' impianto pilota ENEA reattore configurato CSTR in cui la comunità microbica è disgregata dalla continua agitazione e come substrato PG.
2. **D**: prova analoga alla precedente, ma senza substrato per la determinazione della "biometanazione potenziale" dell'inoculo metanogeno D.
3. **AP**: in questa prova è stato utilizzato un inoculo (20% v/v), nel quale la comunità è strutturata in granuli ed è stato fornito substrato PG.
4. **A**: prova analoga alla precedente ma senza substrato per la determinazione della "biometanazione potenziale" dell'inoculo metanogeno A.
5. **P**: prova condotta come controllo, utilizzando solo PG senza nessun tipo di inoculo per verificare l'assenza di attività da parte della flora microbica autoctona eventualmente residua.

Tabella 13. Schema riassuntivo della I Sperimentazione. Le prove sono distinte in base al tipo di inoculo metanogeno utilizzato.

Prova	Inoculi		Volume di lavoro	Substrato
	%	ml	ml	
DP	20	10	50	Paglia di grano 8 g/L VS)
D	20	10	50	
AP	20	10	50	
A	20	10	50	
P	-	-	50	

### 3.4 Risultati I Sperimentazione

#### 3.4.1 Produzione di biogas

Come mostrato dal grafico in figura 25 le produzioni cumulative di CH<sub>4</sub> significativamente più elevate sono state ottenute per la condizione **AP** con valori di CH<sub>4</sub> di  $1454,4 \pm 177,3$  ml/l al 35°giorno (T35). La condizione sperimentale **A** costituita dallo stesso inoculo ma senza substrato ha prodotto  $368,8 \pm 21,2$  ml/l di CH<sub>4</sub>.

Per quanto riguarda le altre prove effettuate con l'inoculo **D** i risultati al T35 sono stati: per la condizione **DP** produzione media di CH<sub>4</sub> di  $908,5 \pm 59,5$  ml/l mentre per la prova **D**, ovvero senza substrato, sono stati ottenuti  $214,7 \pm 14,5$  ml/l di CH<sub>4</sub>.

Al T70, tempo di fine produzione di CH<sub>4</sub>, i risultati sono stati rispettivamente:  $1784,7 \pm 125,6$  ml/l di CH<sub>4</sub> (**AP**) e  $435,2 \pm 25,2$  ml/l (**A**); nonché  $1115,4 \pm 60,0$  ml/l per **DP** e  $223,1 \pm 5,6$  ml/l di CH<sub>4</sub> per **D**.

La condizione di controllo P (PG), condotta cioè con il solo substrato in assenza di qualsiasi tipo di inoculo, non ha fatto rilevare alcuna produzione e pertanto di seguito non verrà più riportata.

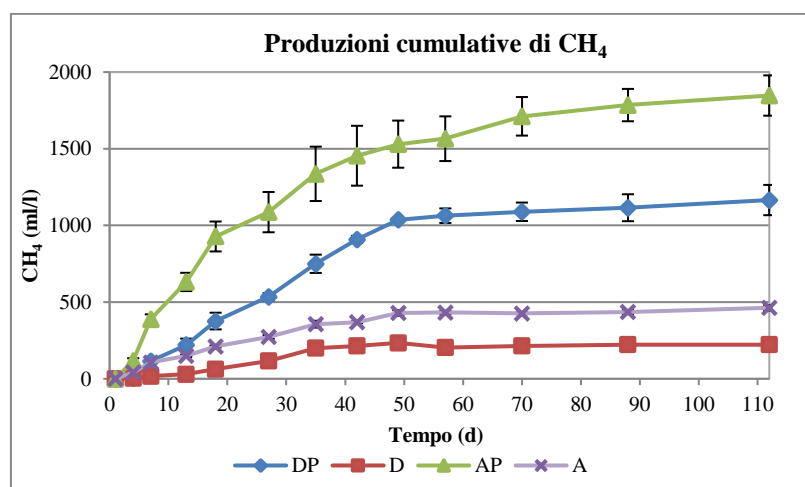


Figura 25. Produzioni cumulative di CH<sub>4</sub> (ml/l) ottenute dalle prove sperimentali della I Sperimentazione. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi di produzione di CH<sub>4</sub> calcolati per ogni condizione sperimentale (riportata in legenda) su 3 repliche.

L'Analisi della Varianza (ANOVA) effettuata su tutte le prove con un valore di significatività  $\alpha=0,05$ , mostra differenze statisticamente significative con un valore critico pari a  $2,8 \cdot 10^9$ . E' stato quindi effettuato il test di Tukey i cui risultati sono indicati in tabella 14.

In tabella 15 si riportano le concentrazioni di CH<sub>4</sub> nel biogas espresse in %, i valori di produzioni cumulative di CH<sub>4</sub> (ml/l) e le rese delle produzioni di CH<sub>4</sub> espresse come ml di CH<sub>4</sub>/gVS. I valori si riferiscono al T35 e al T70, rispettivamente tempo di massima produzione di CH<sub>4</sub> e tempo di fine produzione, dopo 70 giorni anche se l'esperimento è stato seguito fino a un T\_Finale di 112 giorni.

Tabella 14. Parametri di produzione di CH<sub>4</sub>: concentrazioni (%), produzione cumulativa (ml/l) e rese (ml/gVS) ottenuti nei giorni 35 (T35) e 70 (T70) di DA.

	Prova	Concentrazione CH <sub>4</sub> nel biogas (%)	Produzione cumulativa CH <sub>4</sub> (ml/l)	Resa in CH <sub>4</sub> (ml/gVS)
T35	DP	43,8 ± 0,8 <sup>A</sup>	908,5 ± 59,5 <sup>A</sup>	113,5 ± 7,4 <sup>A</sup>
	D	14,3 ± 0,9 <sup>B</sup>	214,7 ± 14,5 <sup>BD</sup>	26,8 ± 3,3 <sup>BD</sup>
	AP	51,4 ± 1,3 <sup>C</sup>	1454,4 ± 177,3 <sup>C</sup>	181,8 ± 22,6 <sup>C</sup>
	A	22,2 ± 1,1 <sup>D</sup>	368,8 ± 21,2 <sup>DB</sup>	46,1 ± 2,1 <sup>DB</sup>
T70	DP	49,2 ± 0,8 <sup>A</sup>	1115,4 ± 60,0 <sup>A</sup>	139,4 ± 7,5 <sup>A</sup>
	D	14,9 ± 0,3 <sup>B</sup>	223,1 ± 5,6 <sup>B</sup>	27,89 ± 1,3 <sup>B</sup>
	AP	50,7 ± 0,4 <sup>C</sup>	1784,7 ± 125,6 <sup>C</sup>	223,1 ± 15,7 <sup>C</sup>
	A	26,2 ± 0,6 <sup>D</sup>	435,2 ± 25,2 <sup>D</sup>	54,4 ± 0,9 <sup>D</sup>

Nel grafico in figura 26 vengono riportati i valori di contenuto percentuale di CH<sub>4</sub> nel biogas nel corso dell'esperimento. La percentuale più elevata viene raggiunta dalla prova AP, con un valore del 50,9 %; questa prova, inoltre, si distacca da tutte le altre in termini di concentrazione di CH<sub>4</sub> nel biogas sin dai primi tempi sperimentali. La percentuale più bassa è stata ottenuta dalla prova D con un valore di 13%.

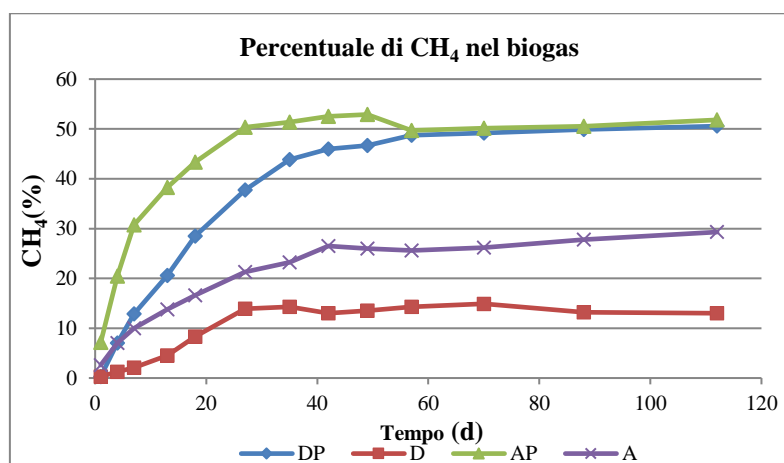


Figura 26. Percentuale di CH<sub>4</sub> nel biogas nel corso del tempo

### 3.4.2 Produzione di intermedi di processo

Nelle tabelle 15 e 16, vengono presentate le concentrazioni rilevate (ppm) dei principali VFAs prodotti e consumati durante il processo della DA, misurati tramite HPLC. In particolare, riportati sono stati monitorati i seguenti acidi: acetico, propionico, butirrico, isobutirrico, isovalerico, valerico, formico, succinico ed il lattico. Per gli zuccheri sono stati analizzati lattosio e glucosio, mentre per gli alcoli 1,3 propandiolo ed etanolo.

Tabella 15. Concentrazione degli Acidi Grassi Volatili (ppm), rilevate nel mezzo di coltura per le varie condizioni sperimentali. Nel T Finale non si rilevano più acidi.

T0	Succinico	Lattico	Formico	Acetico	Propionico	Isobutirrico	Butirrico	Isovalerico	Valerico
AP	10,9 ± 0,6 <sup>A</sup>	-	208,3 ± 1,4 <sup>A</sup>	2,4 ± 0,6 <sup>A</sup>	-	72,8 ± 1,9 <sup>A</sup>	-	-	-
A	11,5 ± 0,6 <sup>A</sup>	-	-	-	-	71,3 ± 2,2 <sup>A</sup>	-	-	-
DP	-	-	485,7 ± 0,0 <sup>B</sup>	14,2 ± 2,1 <sup>B</sup>	207,5 ± 2,9 <sup>A</sup>	70,8 ± 0,4 <sup>A</sup>	-	-	-
D	-	-	-	9,3 ± 0,9 <sup>C</sup>	180,2 ± 0,7 <sup>B</sup>	71,0 ± 1,6 <sup>A</sup>	-	-	-

T35	Succinico	Lattico	Formico	Acetico	Propionico	Isobutirrico	Butirrico	Isovalerico	Valerico
AP	-	-	-	-	-	-	-	874,8 ± 0,9 <sup>A</sup>	-
A	2,2 ± 0,1	-	-	-	-	69,3 ± 1,2 <sup>A</sup>	-	-	-
DP	-	13,3 ± 0,0	-	95,7 ± 41,5	65,7 ± 25,1	101,4 ± 3,6 <sup>B</sup>	-	256,0 ± 30,8 <sup>BC</sup>	61,4 ± 0,0
D	-	-	-	-	-	-	-	329,3 ± 57,4 <sup>CB</sup>	-

Tabella 16. Concentrazione degli Zuccheri ed Alcoli (ppm), rilevate nel mezzo di coltura per le varie condizioni sperimentali.

T0	Lattosio	Glucosio	Galattosio	1.3Propandiolo
AP	57,4 ± 1,5 <sup>A</sup>	-	16,9 ± 0,3	-
A	56,6 ± 1,1 <sup>BA</sup>	-	-	-
DP	172,7 ± 1,5 <sup>C</sup>	-	18,3 ± 1,1	180,1 ± 1,6
D	157,7 ± 1,7 <sup>D</sup>	-	-	191 ± 19,5

T35	Lattosio	Glucosio	Galattosio	1.3Propandiolo
AP	95,5 ± 2,0 <sup>A</sup>	6,9 ± 1,2	-	-
A	69,0 ± 0,2 <sup>B</sup>	-	-	-
DP	170,5 ± 5,5 <sup>C</sup>	-	-	66,1 ± 14,4
D	160 ± 3,0 <sup>D</sup>	7,6 ± 0,7	-	-

TF	Lattosio	Glucosio	Galattosio	1.3Propandiolo
AP	95,6 ± 0,02 <sup>AB</sup>	-	-	-
A	78,2 ± 0,2 <sup>B</sup>	-	-	-
DP	153,0 ± 16,7 <sup>C</sup>	-	-	-
D	-	-	-	-

### 3.4.3 Analisi tassonomica della comunità microbica: metodo Illumina

#### Inoculi

##### *Bacteria*

L'identificazione delle comunità microbiche degli inoculi **A** e **D** effettuata con il metodo Illumina è rappresentato graficamente nella figura 27. Per l'inoculo **A** la classificazione tassonomica rileva la dominanza di batteri appartenenti al Phylum *Firmicutes* (76,3%) e l'identificazione delle rispettive Classi *Clostridia* (50,3%) e *Bacilli* (25,8%). Gli altri Phyla rilevati con minore frequenza sono: *Synergistetes* (10,7%) , *Proteobacteria* (8,1%), *Actinobacteria* (1,8%) *Chloroflexi* (1,5%) oltre al

piccolo gruppo di *Bacteroidetes* (0,6%) Nell'inoculo **D** i Phyla dominanti sono rappresentati da *Bacteroidetes* (43,6%) e *Synergistetes* (33,1%), con le rispettive Classi *Bacteroidia* (39,7%) e *Synergistia* (33,1%). Il profilo della comunità microbica è completato dalla presenza dei Phyla *Actinobacteria* (11%) e *Firmicutes* (4,9%) di cui il 4,7% *Clostridia* e lo 0,1% di *Bacilli* (Fig.27).

Gli indici di diversità ecologica applicati al set di dati e in particolare l'indice di Shannon ( $H'$ ) ci indica come la maggiore diversità è espressa dall'inoculo **D** rispetto all'inoculo **A**.

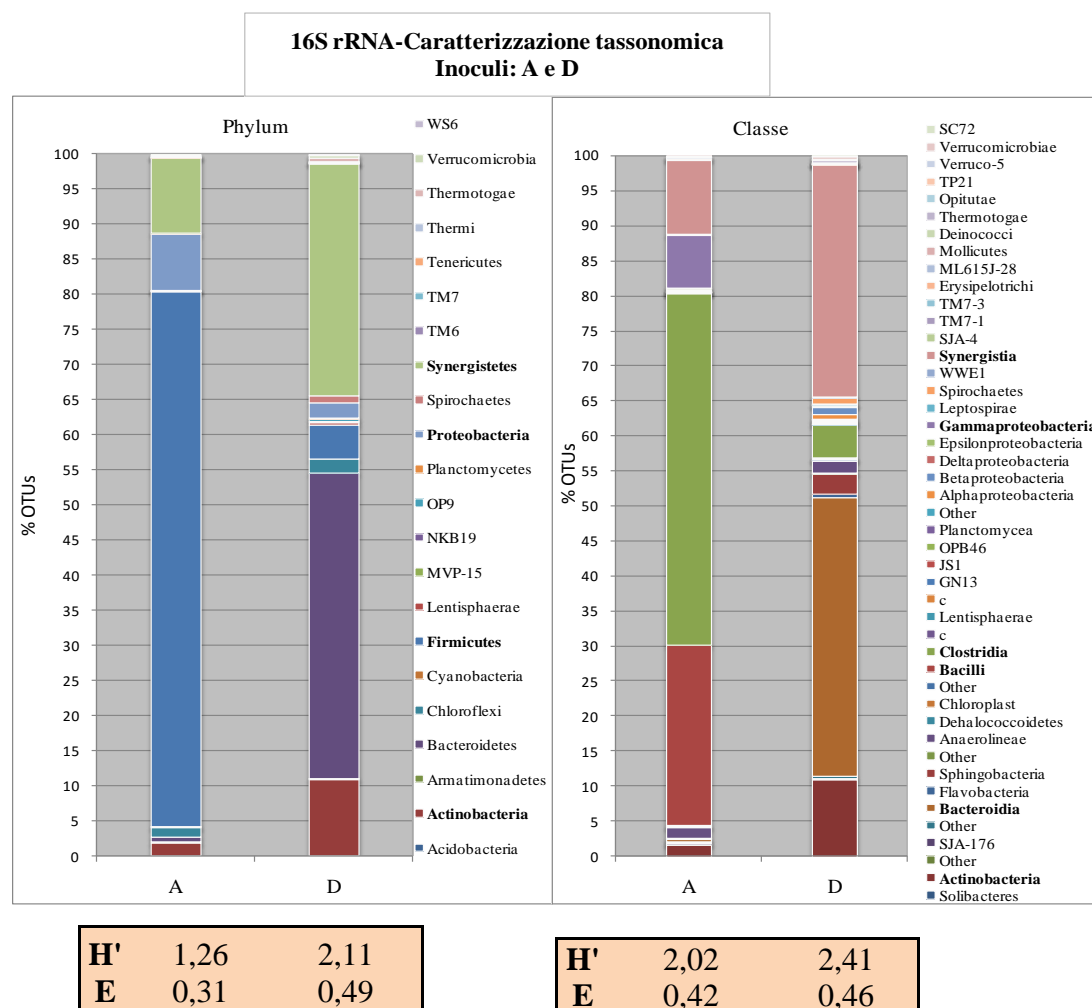


Figura 27. I grafici sono relativi alla classificazione tassonomica di Phylum e Classe dei *Bacteria*. Gli istogrammi forniscono una rappresentazione grafica (%) dei taxa presenti negli inoculi A e D. In tabella i risultati degli indici di Shannon ( $H'$ ) e Evenness (E).

### Archaea

Per quanto riguarda la *guild* dei metanogeni, l'inoculo **A** è costituito da due classi principali: *Methanomicrobia* (50%) e *Methanobacteria* (50%) entrambe con un unico genere: *Methanosaeta* e *Methanobacterium*, rispettivamente (Fig.28).

Il pool microbico dell'inoculo **D** è distribuito in tre classi: *Methanomicrobia* (77,2%), *Methanobacteria* (16,5%) e *Crenarchaeota* (6,3%). All'interno dei *Methanomicrobia*, si distinguono i generi *Methanospirillum* (3,8%), *Methanoculleus* (10,1%), *Methanocorpusculum* (57%) e *Methanosaeta* (6,3%).

Per quanto riguarda i *Methanobacteria*, al suo interno ritroviamo il solo genere *Methanobacterium* (16,5%).

L'inoculo **D** è nuovamente caratterizzato da una maggiore diversità rispetto all'inoculo A che si esprime a livello dei Generi identificati, così come confermato anche dagli indici Shannon ( $H'$ ) ed Evenness (E).

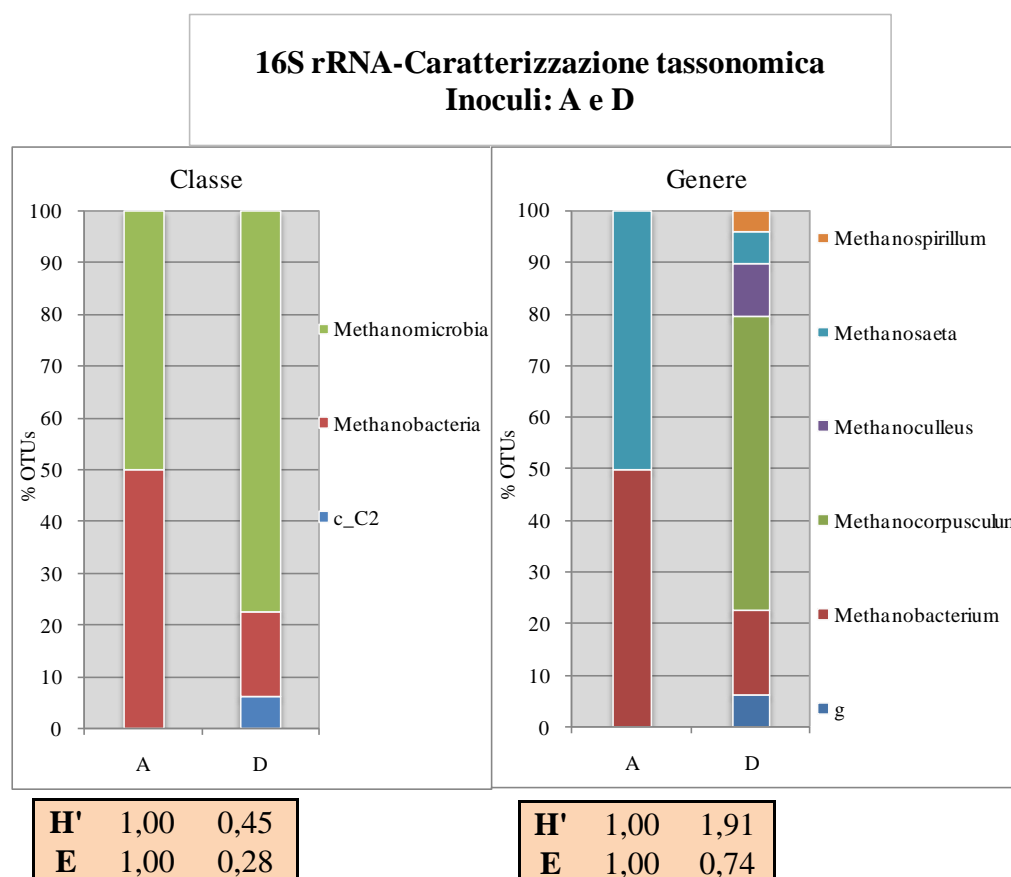


Figura 28. I grafici sono relativi alla classificazione tassonomica di Classe e Genere degli *Archaea*. Gli istogrammi forniscono una rappresentazione grafica (%) dei taxa presenti negli inoculi A e D. In tabella i risultati degli indici di Shannon ( $H'$ ) e Evenness (E).

### Composizione di comunità nei reattori: T35 e TF (fine sperimentazione)

#### *Bacteria*

La composizione delle comunità microbiche presenti negli inoculi **A** e **D** dopo 35 giorni di DA (AP\_35, DP\_35) ed alla fine della sperimentazione (AP\_F, DP\_F), quando la produzione di  $CH_4$  si era ormai arrestata, è rappresentata nella figura 29. Nell'inoculo aggregato **A** la presenza del Phylum *Firmicutes* è in AP\_35 e in AP\_F 6,8% e 15,6%, rispettivamente. Analogamente, i *Proteobacteria* in AP\_35 corrispondono all'1,8% mentre successivamente in AP\_F sono il 4,1%; il Phylum *Synergistetes* a fine esperimento è del 26,6%. Nell'inoculo AP\_35, alla riduzione dei Phyla presenti al tempo zero (Fig. 27), corrisponde la comparsa di nuove comunità microbiche: *Chloroflexi* (37,1%), *Bacteroidetes* (15,7%), *Spirochaetes* (3,9%), *Thermotogae* (2,9%), *Armatimonadetes* (16,1%) e *Acidobacteria* (2,6%), tutte presenti anche alla fine della DA anche se

con una ridotta rappresentatività. Nelle prove sperimentali dove è stato utilizzato l'inoculo aggregato **D** si osserva dopo 35 giorni di DA (DP\_35) che il Phylum dei *Proteobacteria* (93,5%) domina l'intera struttura della comunità, (Fig. 29). La comunità dei *Proteobacteria* è stabile fino alla fine dell'esperimento ed è rappresentata dall'unica classe dei *Gammaproteobacteria* (93,5%). La composizione dell'inoculo **D** è opposta a quella evidenziata per l'inoculo **A**: alla maggiore diversità della comunità strutturata in granuli evidenziati nell'inoculo originario (Fig. 27) segue una uniformità nella composizione delle comunità che si mantiene stabile nel corso dell'esperimento.

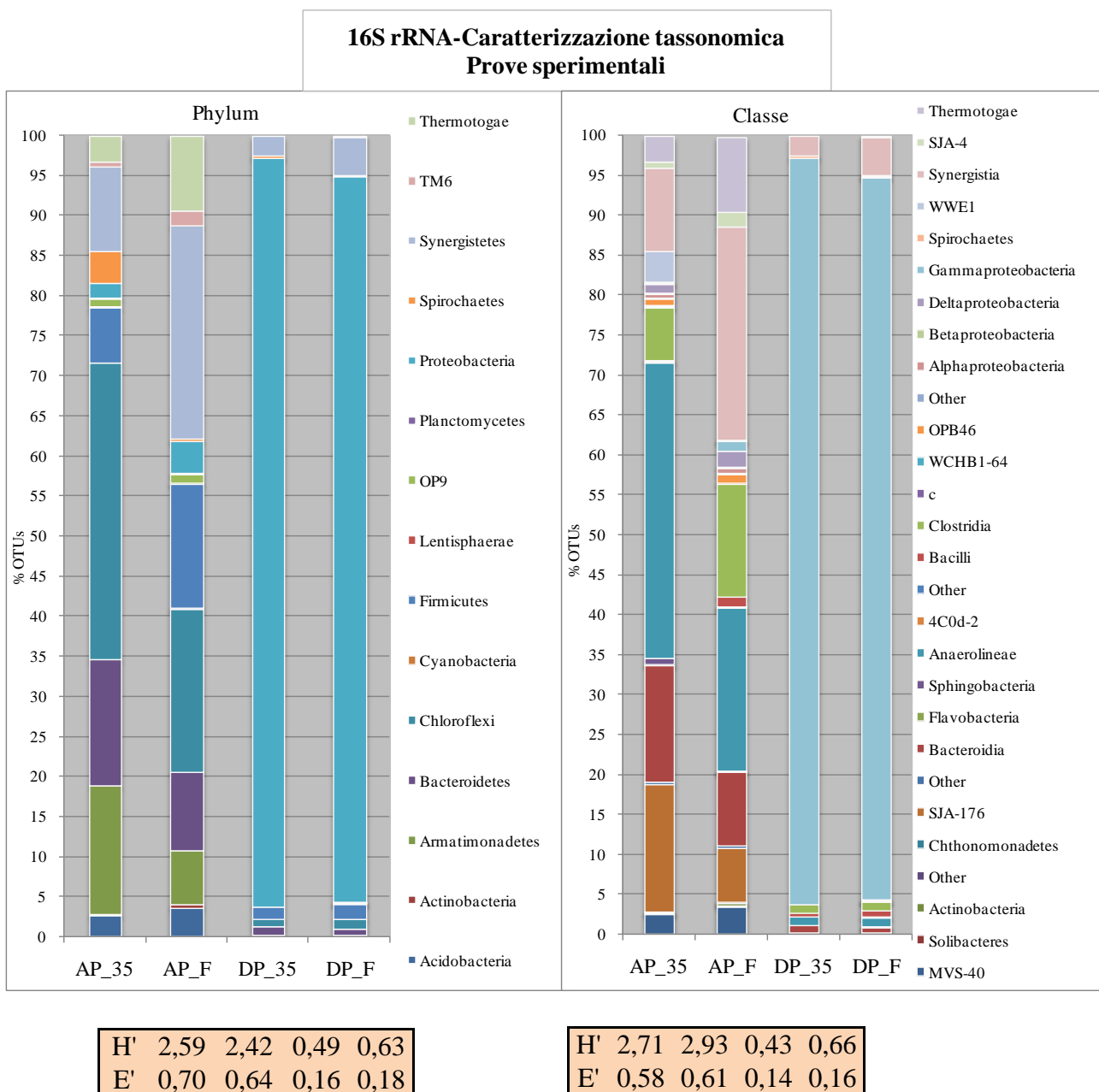


Figura 29. I grafici sono relativi alla classificazione tassonomica di Phylum e Classe dei *Bacteria*. Gli istogrammi forniscono una rappresentazione grafica dei taxa (%) presenti nelle prove sperimentali. In tabella i risultati degli indici di Shannon (H') e Evenness (E).

### Archaea

All'interno della comunità degli *Archaea* identificati nell'inoculo **A** (Fig. 30) si rileva che la classe dei *Methanomicrobia* è dominante dal T35 fino alla fine della produzione di CH<sub>4</sub> (**AP\_35**=75,7% e **AP\_F**= 84,5%), mentre la classe dei *Methanobacteria* si riduce (**AP\_35**= 23,5 e **AP\_F**= 12,4), rispetto a quanto osservato nell'inoculo di partenza (Fig. 28). Analogamente, la stessa Classe dei *Methanomicrobia* domina nell'inoculo **D** (**DP\_35**=**94,3%**, **DP\_F**=**86,5**).

L'identificazione a livello di genere all'interno dei *Methanomicrobia* evidenzia nell'inoculo **A** un incremento dei *Methanosaeta* (**AP\_35**=73,6% e **AP\_F**=81,7%) e una corrispondente diminuzione del Genere *Methanobacterium* (**AP\_35**= 23,4% e **AP\_F**=12,1%). Inoltre compaiono i Generi *Methanospirillum* (**AP\_35**=2,2% e **AP\_F**=2,8%), e *Methanoculleus* (**AP\_35**=1,6% e **AP\_F**=3,8%). Nell'inoculo **D** si rileva il genere *Methanospirillum* (**AD\_35**=48,4% e **AD\_F**=59,6%), e si differenziano i Generi *Methanosaeta* (**AD\_35**=32,3% e **AD\_F**=17,3%), *Methanosarcina* (**AD\_35**=16,1% e **AD\_F**=5,8%).

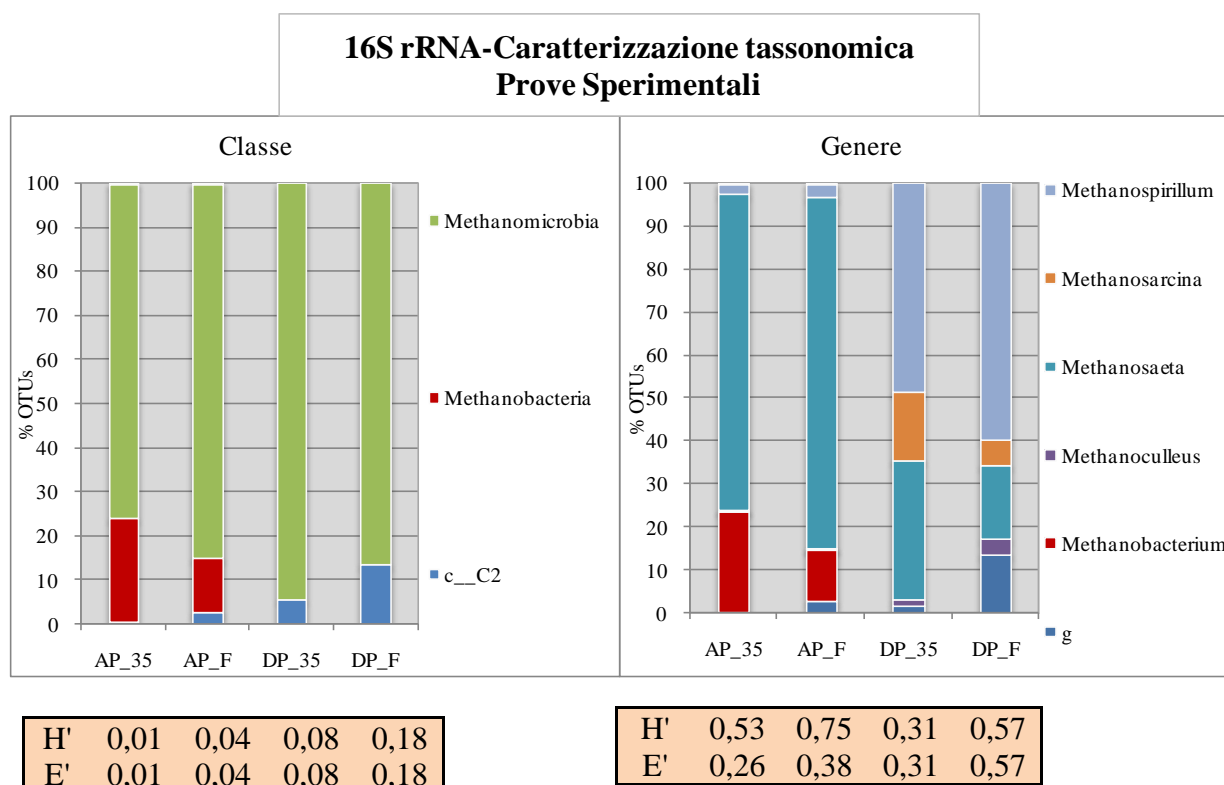


Figura 30. I grafici sono relativi alla classificazione tassonomica di Classe e Genere degli *Archaea*. Gli istogrammi forniscono una rappresentazione grafica dei taxa (%) presenti nelle prove sperimentali. In tabella i risultati degli indici di Shannon (H') e Evenness (E).

### Organizzazione funzionale della guild dei metanogeni

In figura 31 sono evidenziati i *pathways* metabolici propri degli *Archaea* metanogeni individuati nella comunità microbica dopo 35 giorni di DA e alla fine della sperimentazione. Si può osservare che alla diversa struttura individuata nei due inoculi corrisponde anche una diversa attività funzionale. Infatti nelle prove sperimentali AP\_35 e AP\_F è potenzialmente predominante la via metabolica degli acetoclasti obbligati, propria del genere *Methanosaeta*. Nella prova DP\_35 e DP\_F la presenza dei due generi di acetotrofi *Methanosaeta* e *Methanosarcina* indica la possibilità di una copresenza del metabolismo ‘specializzato’ ad opera dei primi, ed un metabolismo più versatile ad opera dei secondi, in grado di utilizzare tutti i *pathways* della metanogenesi utilizzando le diverse tipologie di substrati. Il limitato consumo di acido acetico modifica il metabolismo verso un pathway idrogenotrofo, come dimostrato dalla maggiore componente ‘idrogenotrofa’ rilevata in DP\_35 e DP\_F.

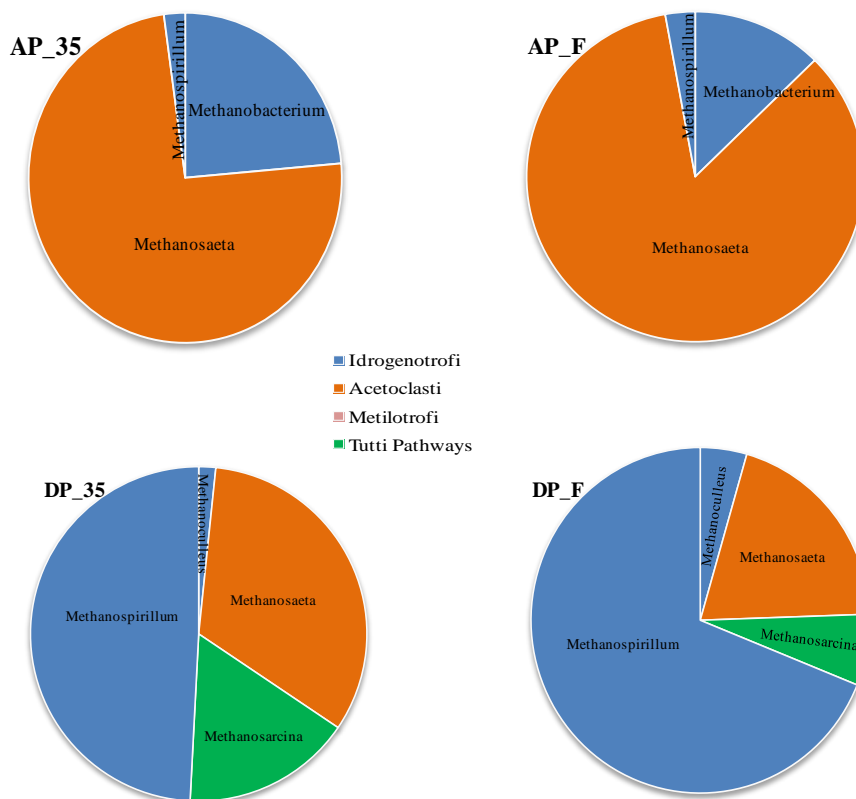


Figura 31. Distribuzione dell'organizzazione funzionale della *guild* degli *Archaea* metanogeni a livello di Genere in alcune delle prove sperimentali, ottenuta in base alla composizione tassonomica.

### 3.4.4 Analisi funzionale della comunità microbica: FISH

#### Caratterizzazione degli inoculi

L'analisi FISH condotta per l'inoculo metanogeno denominato **A** (Fig. 32) ha mostrato una % di *Bacteria* (EUB338,II,III) pari a  $48,8\% \pm 4,8$  mentre  $26,7\% \pm 1,4$  sono state le cellule positive alla sonda per gli *Archaea* (ARCH915) rispetto al totale visualizzato in DAPI.

L'analisi FISH condotta per l'inoculo metanogeno denominato **D** rileva il  $37,3 \pm 2,1\%$  di cellule positive per i *Bacteria* (EUB338,II,III) e  $11,3 \pm 1,3 \%$  di cellule positive alla sonda per gli *Archaea* (ARCH915) rispetto a quelle visualizzate in DAPI.

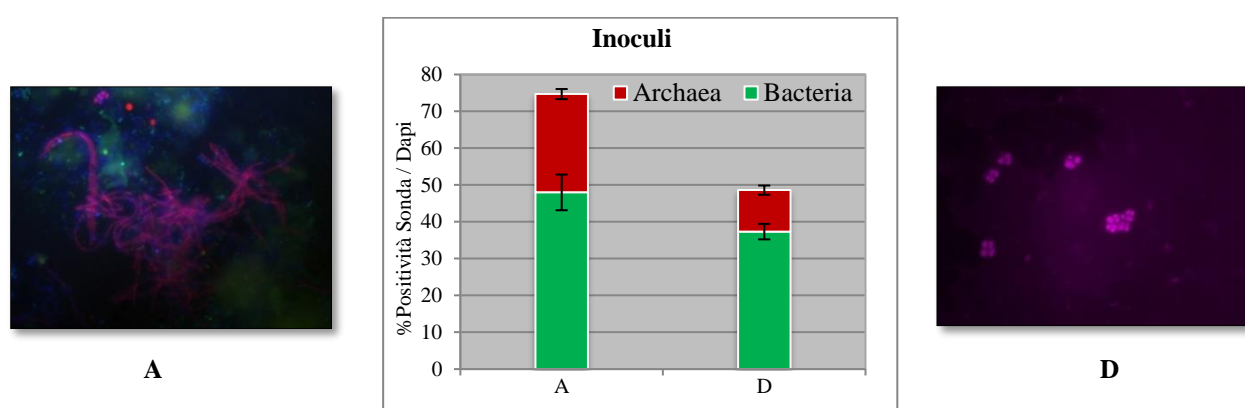


Figura 32. Composizione in *Bacteria* ed *Archaea* della comunità negli inoculi A e D, rilevata con tecnica FISH. Le percentuali sono espresse come il numero di cellule che rispondono alla sonda rispetto al totale delle cellule contate in DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche. Ai lati del grafico micrografie degli inoculi mediante tecnica FISH: addensamenti di *Methanosaeta* in A in cui la comunità si presentava aggregata. Visualizzazione della componente microbica appartenente al genere *Methanosarcina* presenti in D in cui la comunità è disaggregata. La micrografia è stata ottenuta nel corso di questo dottorato nei laboratori ENEA mediante microscopio ed epifluorescenza Zeiss (Axioskop, 40 – Germany)

Nella caratterizzazione degli inoculi si è poi passati all'analisi della *guild* dei *Bacteria* e degli *Archaea*.

#### *Bacteria*

Per l'inoculo **A**, all'interno dei *Bacteria* si rileva il  $22,4\% \pm 1,4$  di batteri *Firmicutes* (LGC), Gram-positivi (Fig. 33A). Utilizzando sonde più specifiche, è stato possibile rilevare all'interno di questo Phylum il  $18,6\% \pm 1,3$  di batteri appartenenti al genere *Clostridium* (Chis150).

Il  $27,3\% \pm 1,1$  dei batteri appartiene al gruppo dei solfatoriduttori (SRB).

Si è riscontrato inoltre il  $2,6\% \pm 0,5$  di *Alpha-Proteobacteria* (ALF) il  $5\% \pm 0,4$  di *Gamma-Proteobacteria* (Fig. 33B) e di questi ultimi il  $2,1\% \pm 0,3$  appartengono alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (EBAC).

Per l'inoculo **D** invece, nei *Bacteria*, si riscontra il  $3,7\% \pm 0,4$  di *Alpha-Proteobacteria* e il  $14,6\% \pm$

2,4 di *Gamma-Proteobacteria*, di cui il  $5,8\% \pm 0,6$  di *Enterobacteriaceae*. Non sono però stati rilevati batteri appartenenti al Phylum dei *Firmicutes*. In questo inoculo i *SRB* costituiscono una frazione rilevante della comunità con valori del  $19,5\% \pm 2,1$ .

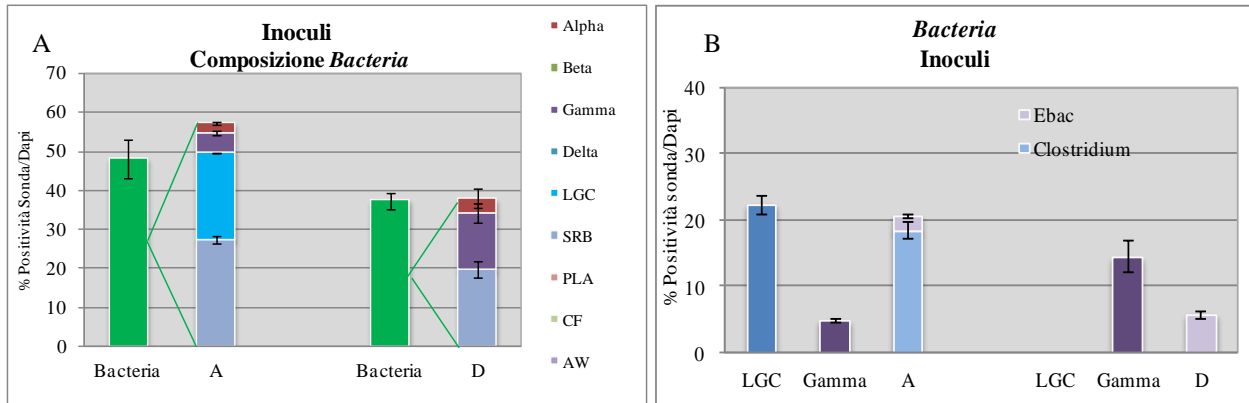


Figura 33 A. Composizione percentuale all'interno dei *Bacteria* negli inoculi A e D mediante analisi FISH: Alpha = *Alpha-Proteobacteria*; Beta = *Beta-Proteobacteria*; Gamma = *Gamma-Proteobacteria*; Delta = *Delta-Proteobacteria*; LGC = Gram + con basso contenuto di G+C (*Firmicutes*); SRB = batteri solfato riduttori; PLA = *Planctomycetes*; CF = *Bacteroidetes*; AW = Batterii acetogeni. B. Composizione percentuale all'interno dei *Bacteria* nello specifico all'interno di LGC = Gram + con basso contenuto di G+C (*Firmicutes*) e dei Gamma = *Gamma-Proteobacteria*; Le percentuali sono espresse come il numero di cellule che rispondono alla sonda rispetto al totale delle cellule contate in DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche.

### Archaea

Inoculo aggregato **A**: tra i metanogeni acetotrofi si riscontra il  $24,2\% \pm 3,6$  di batteri appartenenti al genere *Methanosaeta*, acetotrofi obbligati (Fig. 34), mentre non sono stati rilevati batteri per il genere *Methanosarcina*. Le sonde per i metanogeni idrogenotrofi *Methanobacteriales* e *Methanomicrobiales* non hanno dato positività rispetto al DAPI.

Inoculo disaggregato **D**: tra i metanogeni acetotrofi si rileva il  $4\% \pm 0,9$  di *Methanosarcina*, acetotrofi non obbligati e  $8,2\% \pm 0,4$  di *Methanosaeta*. Anche in questo caso, le sonde per i *Methanobacteriales* e *Methanomicrobiales* non hanno dato positività rispetto al DAPI (Fig. 34).

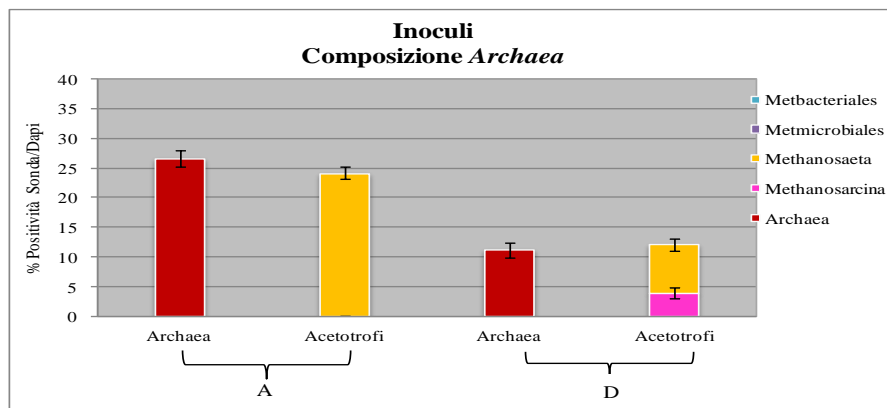


Figura 34. Composizione percentuale degli *Archaea* negli inoculi A e D. Le percentuali sono espresse come il numero di cellule che rispondono alla sonda rispetto al totale delle cellule contate in DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche.

### Densità cellulare

In figura 35 sono riportati i valori delle densità cellulari dei due inoculi, **A** e **D** ottenuti moltiplicando la frequenza della singola componente microbica per la densità cellulare determinata in DAPI. I valori per i *Bacteria* negli inoculi **A** e **D** sono stati rispettivamente di  $5,33 \cdot 10^9$  e  $1,14 \cdot 10^9$  cell/ml; mentre per gli *Archaea* sono stati rilevati rispettivamente  $2,97 \cdot 10^9$  e  $3,45 \cdot 10^8$  cell/ml.

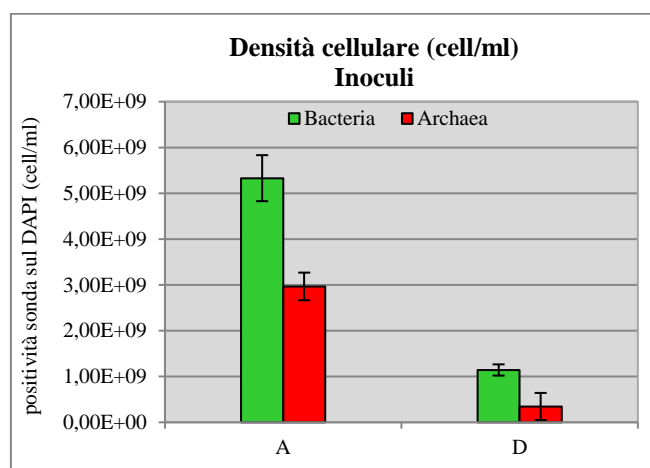


Figura 35. Densità cellulare della comunità microbica negli inoculi.

### Composizione di comunità nei reattori: T35

In figura 36 si riporta la composizione percentuale in *Bacteria*, *Archaea* nella fase di produzione di  $\text{CH}_4$  al T35 rilevate mediante FISH: la percentuale più alta di *Bacteria*, pari al  $49,8\% \pm 9,0$  e di *Archaea* del  $33,4\% \pm 3,4$  si osserva nella prova **AP**; per **A** si registrano % di *Bacteria* e di *Archaea* rispettivamente di  $46,4\% \pm 0,9$  e di  $30\% \pm 2,2$ .

In **DP** e **D** invece l'abbondanza percentuale dei *Bacteria*, al T35 è di  $38,8\% \pm 6,7$  e  $36,5\% \pm 3,4$  rispettivamente mentre per gli *Archaea* in **DP** erano il  $31,2\% \pm 12,1$  mentre in **D** è osservata la più bassa percentuale, pari a  $15,3\% \pm 0,8$ .

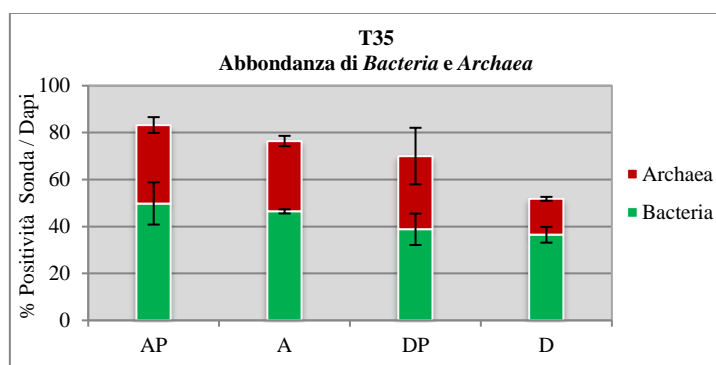


Figura 36. Composizione percentuale in *Bacteria* ed *Archaea* stimate mediante FISH delle comunità microbiche nella fase di produzione di  $\text{CH}_4$  T35. La composizione è espressa come percentuale di cellule positive allacolorazione DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni condizione sperimentale in triplicato.

In figura 37 sono mostrati i valori di densità cellulare ( $n^{\circ}$ cell/ml), in corrispondenza della fase di produzione di  $\text{CH}_4$  T35: i valori per le principali componenti della comunità microbica sono stati calcolati moltiplicando il valore percentuale di ciascuna componente ottenuto mediante FISH per le densità cellulari di ciascuna componente ottenute con colorazione DAPI.

Le densità cellulari nelle prove **AP** ed **A** composte dallo stesso inoculo ma con assenza substrato, mostrano un andamento simile; per i *Bacteria* vengono rispettivamente raggiunte le densità di,  $13 \cdot 10^9$  e  $1,08 \cdot 10^9$  cell/ml. Un'osservazione analoga a questa appena descritta, può essere fatta riguardo le densità cellulari calcolate per gli *Archaea* infatti i valori sono:  $7,59 \cdot 10^8$  per **AP** e  $7,01 \cdot 10^8$  per **A**.

Le densità cellulari nella prova **DP** sono invece maggiori di un ordine di grandezza rispetto a tutte le prove:  $3,35 \cdot 10^9$  cell/ml per i *Bacteria* e  $2,69 \cdot 10^8$  cell/ml calcolate per gli *Archaea*.

Le densità cellulari minori, con valori di *Bacteria* ed *Archaea* rispettivamente pari a  $4,0 \cdot 10^8$  e  $1,68 \cdot 10^8$  cell/ml sono state riscontrate per la prova **D**.

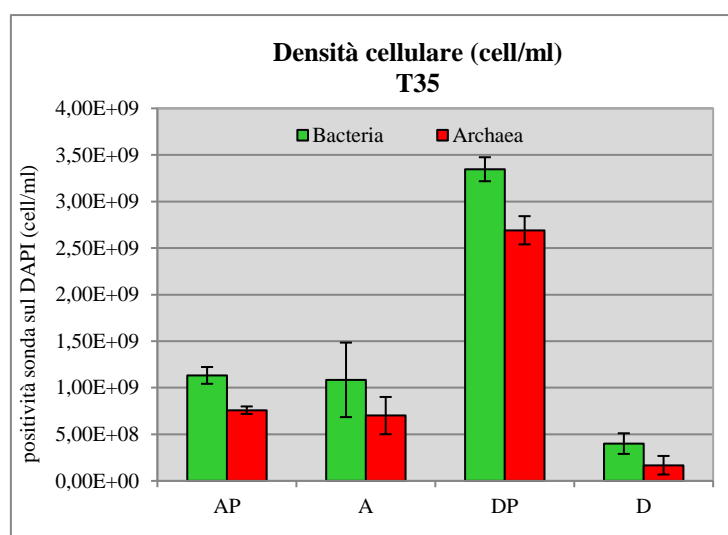


Figura 37. Densità cellulare della comunità microbica della I Sperimentazione al T35. I valori di densità media sono stati calcolati moltiplicando il valore percentuale di ciascuna componente (delle condizioni sperimentali indagate) ottenuto mediante FISH per le densità cellulari di ciascuna componente ottenute con colorazione DAPI. I valori di densità sono espressi come  $n^{\circ}$  cell/ml che hanno risposto positivamente alle sonde FISH.

### *Bacteria*

Nei *Bacteria* (Fig. 38 A e B ) della prova **AP**, si registrano positività delle sonde per gli *Alpha-Proteobacteria* e i *Gamma-Proteobacteria* con valori rispettivamente di  $3,3\% \pm 0,1$  e  $9,1\% \pm 0,9$  mentre diminuiscono i *Firmicutes* che fanno registrare valori del  $15\% \pm 1,1$ . All'interno di quest'ultimi i batteri del genere *Clostridium* sono  $11,4\% \pm 1,6$ .

Nella prova di controllo **A** si rilevano i *Firmicutes* con il  $15,5\% \pm 1,3$  di cui il  $12,3\% \pm 1,4$  appartenenti al genere *Clostridium*. *Alpha-Proteobacteria* con  $1,5\% \pm 0,7$  e *Gamma-*

*Proteobacteria* con il  $4,5\% \pm 0,9$ . Nella prova **DP** le percentuali degli *Alpha-Proteobacteria* sono del  $4,2\% \pm 0,3$  mentre per i *Gamma-Proteobacteria* è stato rilevato il  $4,2\% \pm 0,3$ . Non sono stati rilevati segnali positivi delle sonde utilizzate per il Phylum *Firmicutes*.

Per la prova **D** *Alpha-Proteobacteria* costituiscono il  $2,4\% \pm 0,5$  e i *Gamma-Proteobacteria* il  $2,6\% \pm 0,9$ .

In tutte e quattro le prove sperimentali sono stati rilevati inoltre batteri in grado di compiere la Solfato-Riduzione (SRB): per **AP**= $25\% \pm 2,0$ , **A**= $19,20 \pm 1,6$ ; **DP**= $11,2\% \pm 0,7$ , **D**= $17\% \pm 0,9$ .

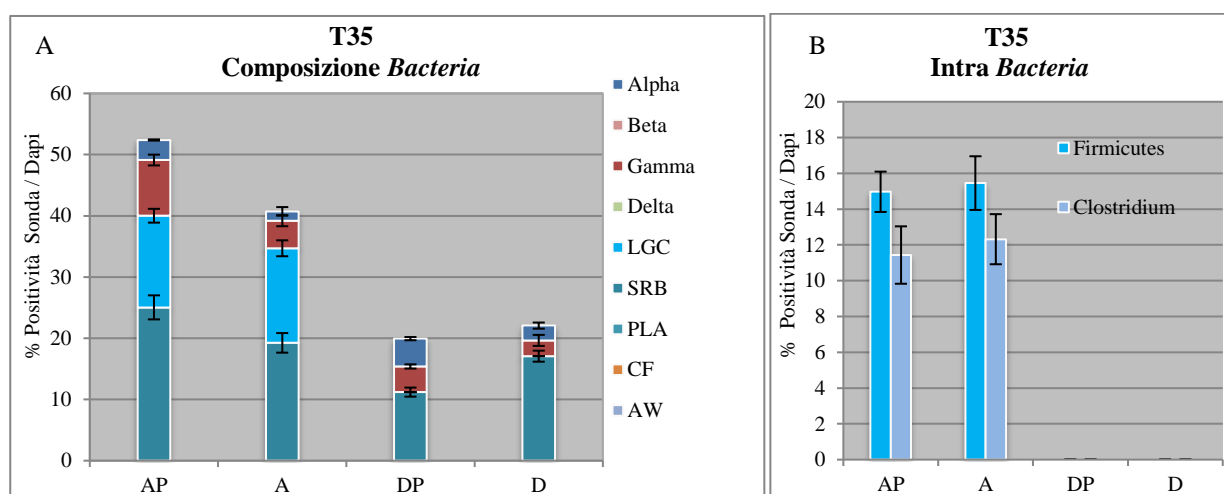


Figura 38. A. Composizione percentuale dei *Bacteria* stimata mediante FISH delle comunità microbiche nella fase di produzione di  $\text{CH}_4$  T35. B. Composizione percentuale dei *Firmicutes*. La composizione è espressa come percentuale di cellule che hanno risposto positivamente alla sonda rispetto alla colorazione DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni condizione sperimentale in triplicato.

### Densità cellulare

In figura 39A, sono mostrate le densità cellulari registrate per le varie prove: per gli *Alpha-proteobacteria*  $7,44 \cdot 10^7$  cell/ml nella prova **AP**  $3,58 \cdot 10^7$  cell/ml in **A**; per la prova **DP** e **D** si osservano i valori di  $3,92 \cdot 10^8$  cell/ml e  $2,65 \cdot 10^7$  cell/ml rispettivamente.

I *gamma-proteobacteria* mostravano per le prove **AP** e **A** valori rispettivamente pari a  $2,07 \cdot 10^8$  cell/ml e  $1,05 \cdot 10^8$  cell/ml; le prove **DP** e **D** avevano una densità cellulare pari a  $3,61 \cdot 10^8$  cell/ml e  $2,83 \cdot 10^7$  cell/ml.

I *LGC* (Fig. 39 B) sono stati rilevati in **AP** ed **A** con valori rispettivamente di  $3,40 \cdot 10^8$  cell/ml e  $3,61 \cdot 10^8$  cell/ml. All'interno batteri appartenenti al genere *Clostridium* (Fig. 39 B) mostravano una densità cellulare per **AP** e **A** rispettivamente di  $2,60 \cdot 10^8$  cell/ml e di  $2,88 \cdot 10^8$  cell/ml.

Gli *SRB* nella prova **AP** avevano dei valori di densità pari a  $5,69 \cdot 10^8$  cell/ml e nella prova **A**  $4,50 \cdot 10^8$  cell/ml. I valori più elevati si registrano per **DP**:  $9,66 \cdot 10^8$  cell/ml invece nella prova **D** si osservano i valori più bassi:  $1,87 \cdot 10^8$  cell/ml.

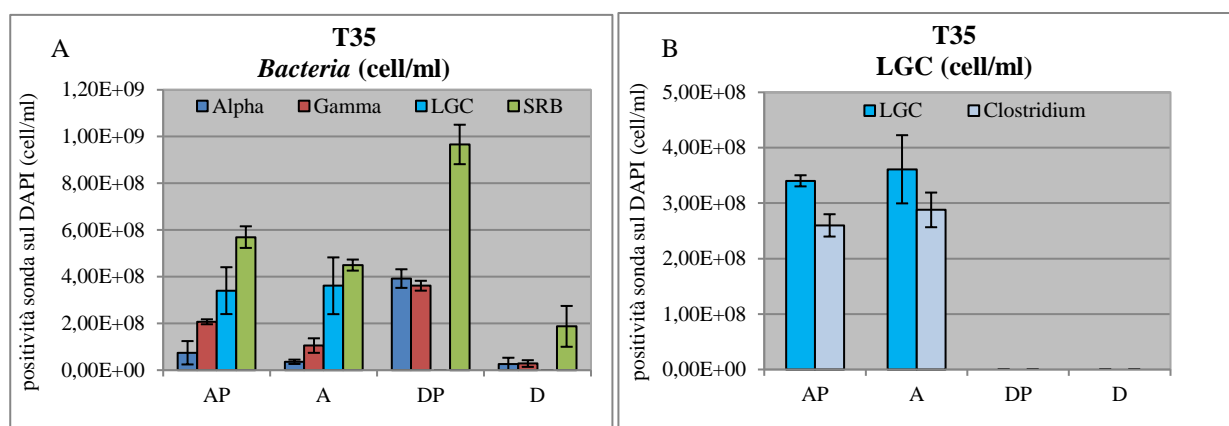


Figura 39. Densità cellulare delle principali componenti dei *Bacteria* nei reattori della I Sperimentazione in corrispondenza della fase di produzione di CH<sub>4</sub> T35. A. Densità cellulare dei *Bacteria*. B. Densità cellulare dei Batteri del genere *Clostridium* all'interno dei LGC nei rispettivi inoculi. I valori di densità media sono stati calcolati moltiplicando il valore percentuale di ciascuna componente (delle condizioni sperimentali indagate) ottenuto mediante FISH per le densità cellulari di ciascuna componente ottenute con colorazione DAPI.

### Archaea

Per gli *Archaea* sono stati indagati gli ordini: *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*. Di seguito viene riportato il grafico delle percentuali (Fig.40). La *guild* risulta dominata dai *Methanosarcinales*, in tutte e 4 le prove (**AP**=15% ± 7,4; **A**=13,5% ± 2,6; **DP**= 36,7 ± 11,6; **D**= 13,2 ± 0,9) mentre non sono stati rilevati segnali positivi per le altre sonde utilizzate.

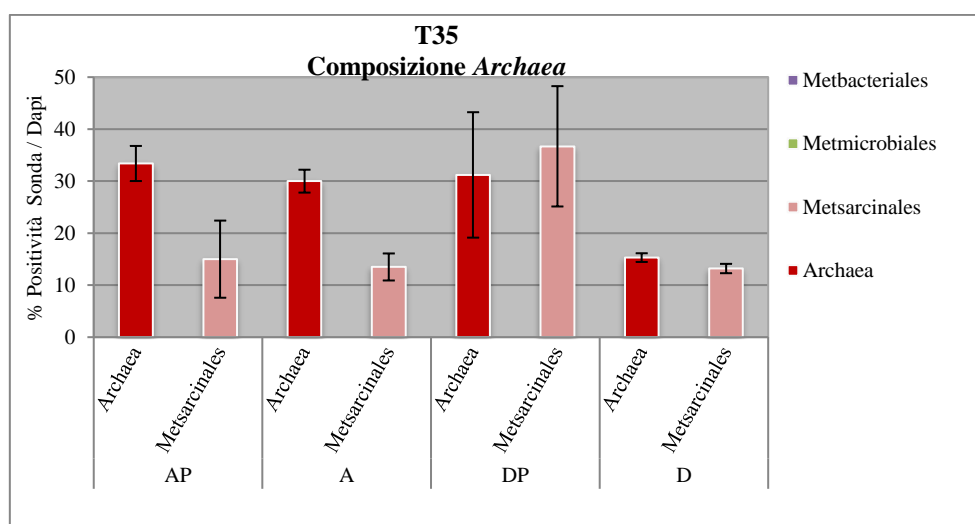


Figura 40. Struttura delle comunità al T35 della *guild* di metanogeni stimata mediante FISH. Composizione percentuale degli *Archaea*. La composizione è espressa come percentuale di cellule che hanno risposto positivamente alla sonda rispetto alla colorazione DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni condizione sperimentale in triplicato.

All'interno dei *Methanosarcinales* acetotrofi (Fig. 41), i *Methanosaeta*, specialisti, sono stati rilevati per tutte le prove con valori rilevati rispettivamente di: **AP**=35,3%±1,3; **A**= 42,2%±1,9; **DP**= 16,5% ±10,7; **D**=14,5%±4,0, mentre i *Methanosarcina*, generalisti, sono stati individuati solo per le prove **DP** e **D** con valori rispettivamente del 31,3%±11,8 e 9,8%±4,2. *Methanobacteriales* e

*Methanomicrobiales* non sono stati rilevati.

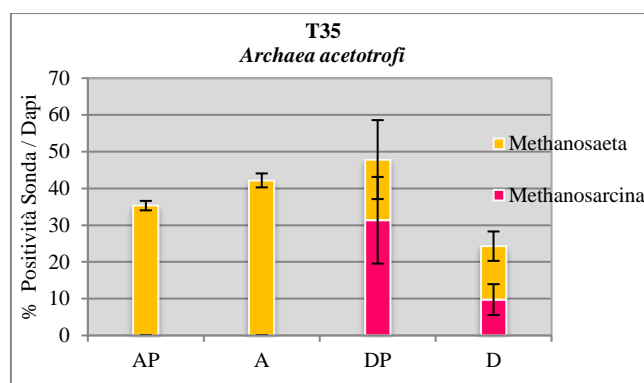


Figura 41. Composizione percentuale al T35, degli *Archaea* in particolare frazione dei metanogeni acetotrofi. La composizione   espressa come percentuale di cellule che hanno risposto positivamente alla sonda rispetto alla colorazione DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni condizione sperimentale in triplicato.

### Densit  cellulare

Nelle condizioni sperimentali si osserva una densit  cellulare (Fig. 42A) di *Methanosarcinales* superiore in **DP** rispetto a tutte le prove superiore di un ordine di grandezza:  $3,17 \cdot 10^9$  cell/ml. In **AP** e **A** le densit  sono rispettivamente di:  $3,42 \cdot 10^8$  e  $3,15 \cdot 10^8$  cell/ml.

All'interno della guild dei metanogeni, gli acetotrofi (Fig. 42 B) *Methanosarcina*, presenti solo in **DP** e **D** mostrano rispettivamente densit  cellulari pari a  $2,70 \cdot 10^9$  e  $1,07 \cdot 10^8$  cell/ml.

Per i *Methanosaeta* i valori sono in **AP** e **A** rispettivamente di  $8,03 \cdot 10^8$  e  $9,86 \cdot 10^8$  cell/ml. Il valore pi  alto si riscontra in **DP**  $1,42 \cdot 10^9$  cell/ml mentre il pi  basso in **D**  $1,60 \cdot 10^8$  cell/ml.

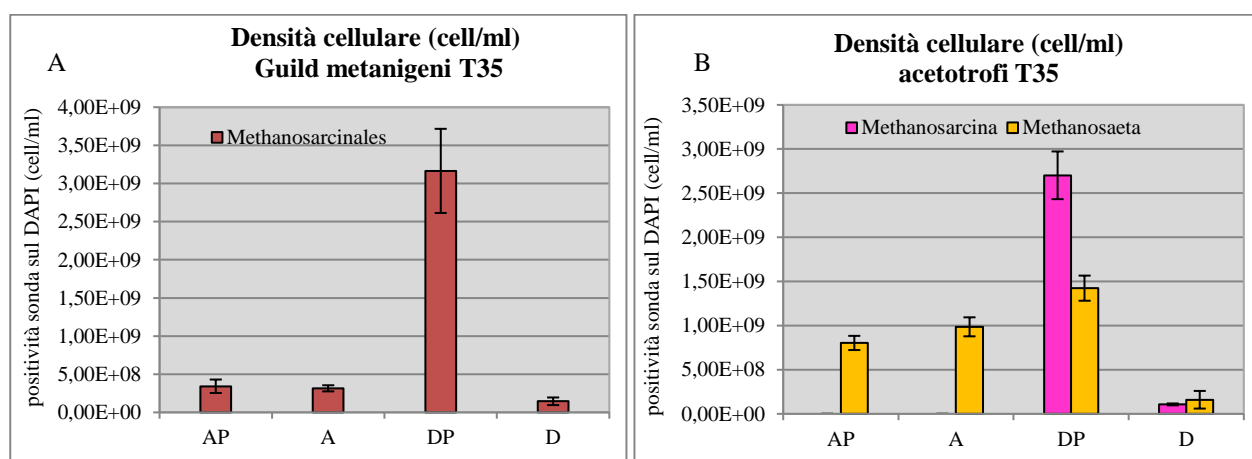


Figura 42. Densit  cellulare delle principali componenti degli *Archaea* nei reattori della I Sperimentazione in corrispondenza della fase di produzione di  $\text{CH}_4$  T35. A. Densit  cellulare degli *Archaea*. B. Densit  cellulare degli *Archaea* acetotrofi. I valori di densit  media sono stati calcolati moltiplicando il valore percentuale di ciascuna componente (delle condizioni sperimentali indagate) ottenuto mediante FISH per le densit  cellulari di ciascuna componente ottenute con colorazione DAPI. I valori di densit  sono espressi come n  cell/ml che hanno risposto positivamente alle sonde FISH (riportate anche nelle etichette degli istogrammi).

### 3.5 II Sperimentazione: bioaugmentation con Funghi Anaerobi Ruminali e batteri fermentanti F210

#### 3.5.1 Piano sperimentale

Nella tabella 17 è riportato lo schema del Disegno Sperimentale della Seconda Sperimentazione. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando una configurazione di processo in bifase:

- I fase – idrolisi e acidogenesi con produzione di H<sub>2</sub>;
- II fase – digestione anaerobica completa con produzione di CH<sub>4</sub>.

Per attivare la prima fase i reattori sono stati inoculati con i ceppi di ARF *Neocallimastix* sp. e *Orpinomyces* sp. e con il pool batterico H<sub>2</sub>-produttore F210 nelle combinazioni riportate in tabella 17. Successivamente, al termine della produzione di H<sub>2</sub>, la metanogenesi è stata avviata utilizzando il digestato della scotta dell'impianto pilota CSTR, lo stesso utilizzato nella Sperimentazione I (inoculo D). Si tratta di una comunità disaggregata, scelta per imporre alla sperimentazione le condizioni più difficoltose.

Tabella 17. Schema riassuntivo della II Sperimentazione.

I Fase: IDROLISI - FERMENTAZIONI			II Fase: METANOGENESI		
PROVA	CONDIZ. SPERIM. INOCULI	SUBSTRATO	Dopo 9 giorni	INOCULO	
F Orp	10% F210 + 10% Orpinomyces	Paglia di grano 6,5 g/L VS		Dopo 9 giorni	20% cstr
F Mix	10% F210 + 10% Mix ARF				
F Neo	10% F210 + 10% Neocallimastix				
F210	20% F210				
Orpi	20% Orpinomyces				
Neo	20% Neocallimastix				
Mix	20% Mix ARF				

## 3.6 Risultati II Sperimentazione

### 3.6.1 Produzione di biogas

Risultati I FASE: produzione di H<sub>2</sub>

In tabella 18 sono riportate le percentuali di H<sub>2</sub> rilevate nel gas, gli ml/l prodotti e le rese di H<sub>2</sub> (g/VS) ottenuti al tempo di massima produzione (168h). Non sono state rilevate tracce di CH<sub>4</sub> durante questa fase dell'esperimento a conferma della purezza degli inoculi, ARF ed F210, rispetto alla componente metanogena. Le produzioni più elevate di H<sub>2</sub> nei batch inoculati con ceppi singoli si ottengono con *Orpinomyces* sp. con 107,4±7,4 ml/l rispetto alla prova in cui è stato utilizzato il ceppo di *Neocallimastix* sp. per la quale sono stati ottenuti 7,9±2,2 ml/l. Le produzioni di H<sub>2</sub> più elevate invece si ottengono dalle due prove sperimentali in cui F210 è unito sia a *Neocallimastix* sp. (186,8 ± 12,2 ml/l) che alla mix di entrambi gli ARF (184,9±6,8 ml/l). Inoltre, si può notare che l'efficienza di produzione di H<sub>2</sub> della mix F210 + *Orpinomyces* sp. (158,9±11,4 ml/l) risulta uguale a quella ottenuta quando l'inoculo F210 è stato utilizzato da solo (158,9±1,5 ml/l). Questi risultati evidenziano che il contributo di *Neocallimastix* sp. all'ottimizzazione della fase di idrolisi e acidogenesi è decisamente superiore di quello prodotto da *Orpinomyces* sp. Quest'ultimo, in particolare, più efficiente quando utilizzato da solo, sembra essere inibito dalla presenza della comunità microbica di F210.

Nel grafico in figura 43 sono rappresentate le curve cumulative relative alla produzione di H<sub>2</sub> (ml/gVS) nel corso di tutto l'esperimento.

Tabella 18. Confronto dei parametri di processo di produzione di H<sub>2</sub> dei diversi inoculi riferiti alle 168h

PROVA	Condizioni Sperim	Substrato	Tempo produzione max. (h)	H <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> (ml/l)	H <sub>2</sub> (ml/gVS)	pH fin.
F Orp	10% F210 + 10% Orpinomyces	Paglia di grano 6,5 g/l VS	24	9,1±1 <sup>A</sup>	158,9±11,4 <sup>A</sup>	23,4±1,6 <sup>AD</sup>	6,5
F Mix	10% F210 + 10% Neocallimastix		24	9,8±0,5 <sup>B</sup>	186,8±12,2 <sup>BC</sup>	27,5±1,8 <sup>BC</sup>	6,5
F Neo	10% F210 + 10% Mix*		24	10±0,6 <sup>CD</sup>	184,9±6,8 <sup>CB</sup>	27,5±1,8 <sup>CB</sup>	6,5
F210	20% F210		24	8,6±0,4 <sup>D</sup>	158,9±1,5 <sup>DA</sup>	23,4±0,2 <sup>DA</sup>	6,5
Orpi	20% Orpinomyces		168	7,7±0,5 <sup>EA</sup>	107,4±7,4 <sup>E</sup>	15,8±1,1 <sup>EG</sup>	6,5
Neo	20% Neocallimastix		168	0,6±0,2 <sup>F</sup>	7,9±2,2 <sup>F</sup>	1,2±0,3 <sup>F</sup>	6,5
Mix	20% Mix*		72	5,7±0 <sup>G</sup>	93,5±0 <sup>G</sup>	13,7±0 <sup>GE</sup>	6,5

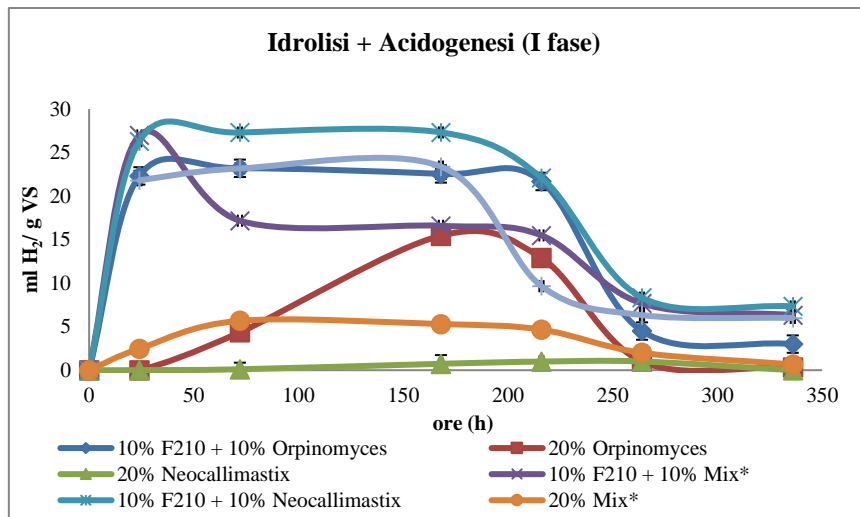


Figura 43. Produzione di H<sub>2</sub> nel tempo con diversi inoculi

### Risultati II FASE: produzione di CH<sub>4</sub>

Il pH ad inizio esperimento era 6,5-7 e si è mantenuto tale fino al 63° giorno, ultimo giorno di esperimento per valutare la stabilità del processo.

I risultati relativi al 63° giorno di sperimentazione, riportati nella figura 44 mostrano che la bioaugmentation con ARF+F210 fornisce le maggiori produzioni cumulative di CH<sub>4</sub>, per tutte e tre le condizioni sperimentali, rispettivamente: *Orpinomyces* sp.+F210, 1357,0±140,8 ml/l; *Neocallimastix* sp.+F210 1279,6±47,9 ml/l; mix di ARF (50%+50%) + F210 1397,2±73,2 ml/l;

Le prove con bioaugmentation di solo F210 hanno prodotto 988,3±148,2 ml/l; mentre le produzioni più basse sono state registrate quando la bioaugmentation è stata limitata agli ARF, rispettivamente: 435,1±194,2 ml/l (*Orpinomyces* sp.); 236,3±27,9 ml/l (*Neocallimastix* sp.) e 250,8±14,6 ml/l (mix di ARF).

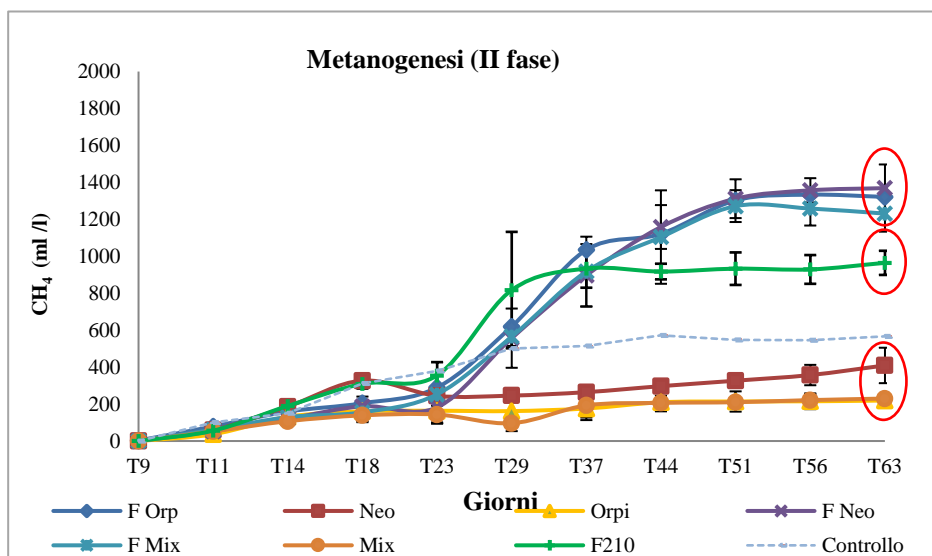


Figura 44. Produzione cumulativa di CH<sub>4</sub> nel tempo. Il T9 corrisponde al T0 della metanogenesi. Sono riportate le barre delle deviazioni standard.

L'Analisi della Varianza (ANOVA) ad un fattore, con un valore di significatività  $\alpha = 0,01$  effettuata per le produzioni di CH<sub>4</sub> ha mostrato che le differenze osservate tra i gruppi sono statisticamente significative. L'analisi statistica ha evidenziato tre distinte condizioni sperimentali (evidenziate con dei cerchi in rosso in Fig. 44) con produzioni di CH<sub>4</sub> decrescenti: mix ARF e F210, aggiunta solo di F210, aggiunta solo di ARF. In tabella 19 sono riportati i risultati del test Tukey.

Anche in termini di resa (ml CH<sub>4</sub>/g VS) i risultati migliori sono stati ottenuti per le condizioni in cui sono presenti sia F210 che ceppi ARF (199,6±20,7 ml CH<sub>4</sub>/gVS con *Orpinomyces* sp. 188,2±7,0 ml CH<sub>4</sub>/gVS con *Neocallimastix* sp. 205,5±10,8 ml CH<sub>4</sub>/gVS con la mix degli ARF) rispetto ai batch inoculati solo con F210 (145,3±21,8 ml CH<sub>4</sub>/gVS) o solo ARF (64,0±28,6 ml CH<sub>4</sub>/gVS) con *Orpinomyces* sp. 34,7±4,1 ml CH<sub>4</sub>/g VS con *Neocallimastix* sp. e 36,9±2,2 ml CH<sub>4</sub>/gVS con la mix ARF).

Tabella 19. Confronto dei parametri di processo di produzione di CH<sub>4</sub> dei diversi inoculi

PROVA	Condizioni Sperim	Substrato	Tempo fine produzione. (gg.)	CH <sub>4</sub> (%)	CH <sub>4</sub> (ml/l)	CH <sub>4</sub> (ml/gVS)	pH fin.
F Orp	10% F210 + 10% Orpinomyces	Paglia di grano 6,5 g/l VS	51	56,4±3,0 <sup>A</sup>	1335,7±109,2 <sup>A</sup>	196,2±16,0 <sup>A</sup>	6,5-6,8
F Mix	10% F210 + 10% Neocallimastix		51	54,0±1,1 <sup>B</sup>	1271,7±91,9 <sup>BC</sup>	187,0±13,5 <sup>BC</sup>	6,5-6,8
F Neo	10% F210 + 10% Mix*		51	57,7±3,7 <sup>CD</sup>	1338,6±86,3 <sup>CB</sup>	196,8±12,7 <sup>CB</sup>	6,5-6,8
F210	20% F210		51	50,5±3,5 <sup>DC</sup>	952,7±77,3 <sup>D</sup>	140,1±11,4 <sup>D</sup>	6,5-6,8
Orpi	20% Orpinomyces		77	29,5±10,8 <sup>EF</sup>	467,7±214,3 <sup>EF</sup>	68,8±31,5 <sup>EF</sup>	6,5-6,8
Neo	20% Neocallimastix		77	16,7±1,9 <sup>FE</sup>	244,7±31,2 <sup>FE</sup>	35,9±4,6 <sup>FE</sup>	6,5-6,8
Mix	20% Mix*		77	19,3±1,2 <sup>G</sup>	275,0±21,8 <sup>G</sup>	40,4±3,2 <sup>G</sup>	6,5-6,8

### 3.6.2 Produzione di intermedi di processo

Nei grafici in figura 45 a,b,c vengono presentati gli andamenti nel tempo delle concentrazioni rilevate (ppm) dei principali VFAs prodotti e consumati durante il processo della DA: acidi acetico, propionico, butirrico, formico, lattico, succino e etanolo. Le analisi sono state effettuate in considerazione dei principali prodotti di fermentazione ottenuti nelle idrolisi fungine da Lwin et al., 2012 e Jin et al., 2011. Alla fine della prima fase (O'Fallon et al., 1991) i maggiori prodotti metabolici sono risultati gli acidi acetico e butirrico, mentre un'elevata produzione di acido lattico si è notata in presenza degli inoculi con i funghi, suggerendo che questa via metabolica sia quella preferenziale. E' noto infatti da letteratura che alcuni funghi, tra cui *Neocallimastix frontalis*, hanno un metabolismo ad acido lattico dovuto alla presenza della lattato deidrogenasi.

Le prove con ARF+F210 mostrano un accumulo di acido acetico fino al T23; dopo tale periodo le concentrazioni decrescono in quanto consumato dai microorganismi per la produzione di  $\text{CH}_4$ .

Di contro nelle prove con bioaugmentation con soli ARF l'acido acetico persiste nel corso di tutto l'esperimento, indicando che non viene consumato. Per la prova, con bioaugmentation di solo F210 si registra un consumo dell'acetico al T18.

L'acido butirrico, fa registrare un picco di produzione intorno al T9 nelle prove ARF+F210 e solo F210.

Gli acidi, isobutirrico e isovalerico non fanno registrare valori degni di nota per tutto il tempo dell'esperimento, mantenendosi costantemente a concentrazioni basse per tutte le prove.

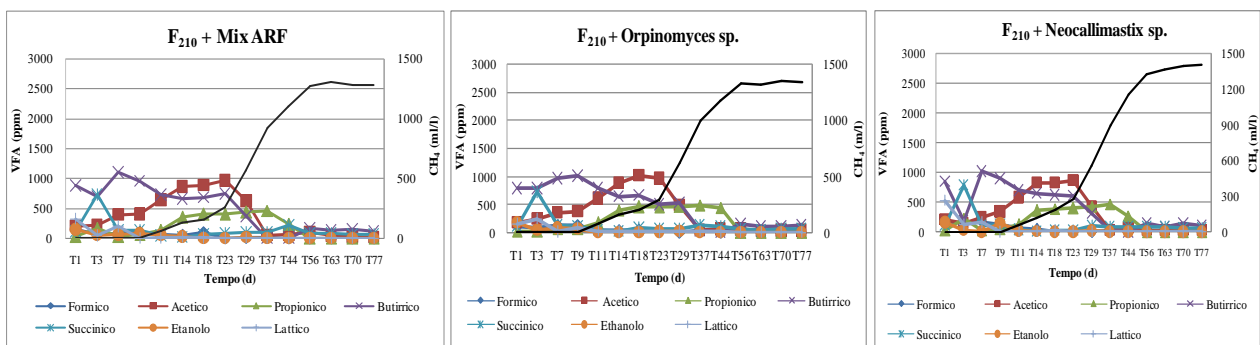


Figura 45a. Andamento della concentrazione degli Acidi Grassi Volatili ed Alcooli (ppm), rilevate nel mezzo di coltura per le prove sperimentali con F210 e ARF. La curva in nero rappresenta la produzione cumulativa di  $\text{CH}_4$  (asse destro).

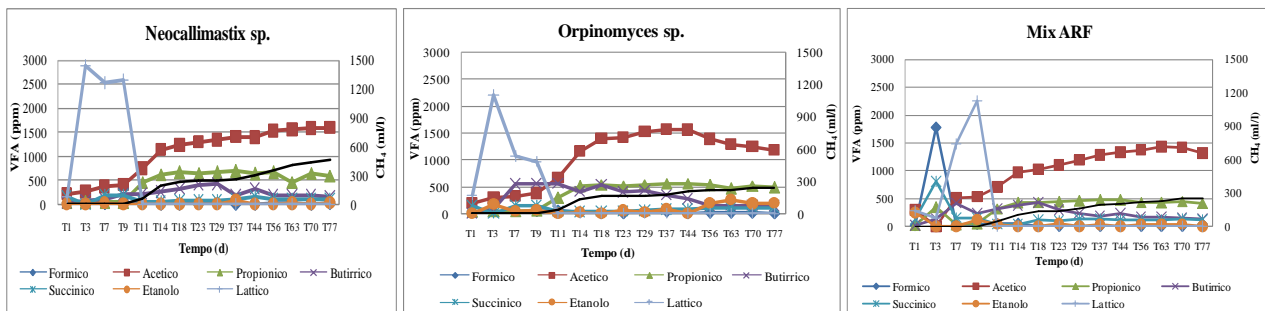


Figura 45b. Andamento della concentrazione degli Acidi Grassi Volatili (ppm), rilevate nel mezzo di coltura per le varie condizioni sperimentali con solo ARF senza F210. La curva in nero rappresenta la produzione cumulativa di  $\text{CH}_4$  (asse destro).

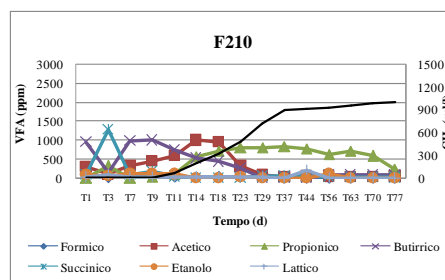


Figura 45c. Andamento della concentrazione degli Acidi Grassi Volatili (ppm), rilevate nel mezzo di coltura per la condizione sperimentale con solo F210. La curva in nero rappresenta la produzione cumulativa di  $\text{CH}_4$  (asse destro).

### 3.6.3 Analisi tassonomica della comunità microbica: metodo Illumina

#### Inoculi

Nel grafico (Fig. 46) viene rappresentata la composizione tassonomica dell'inoculo F210: il Phylum *Firmicutes* (99,4%) è risultato dominante, e una piccola comunità di di *Proteobacteria* (0,6%) completa il suo profilo. Non si rilevano batteri appartenenti al Dominio degli *Archaea*.

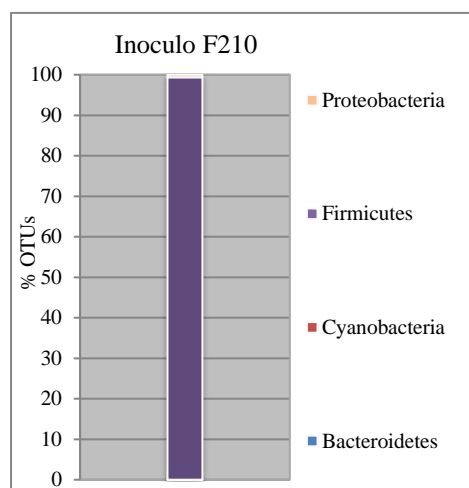


Figura 46. Composizione tassonomica dell'inoculo F210 utilizzato come componente idrogeno-produttrice.

La caratterizzazione tassonomica dell'inoculo metanogeno **D**, proveniente dal reattore CSTR, è stata descritta nel paragrafo 3.4.3 (Fig. 27-28). Brevemente, l'inoculo è risultato costituito dai seguenti Phyla: *Bacteroidetes* (43,6% ), *Synergistetes* (33,1%), *Actinobacteria* (11%), *Firmicutes* (4,95%), *Proteobacteria* (2,6%) e *Chloroflexi* (1,9%) appartenenti al Dominio dei *Bacteria*, e dai Generi: *Methanospirillum* (3,8%), *Methanosaeta* (6,3%), *Methanoculleus* (10,1%), *Methanocorpusculum* (57%) e *Methanobacterium* (16,5% ) del Dominio *Archaea* (Fig. 47).

Si osserva il 6,3% di un genere non identificato appartenente al Phylum dei *Crenarchaeota*.



corrispondenti Classi *Bacteroidia* e *Gamma-proteobacteria*.

Successivamente, dopo l'inoculo della comunità metanogena, la distribuzione tende a modificarsi e nel tempo **T14**, fase di avvio di produzione di CH<sub>4</sub>, oltre ai *Firmicutes* (22,2%), *Bacteroidetes* (30,5%) e *Proteobacteria* (23%), si osservano due Phyla in più: *Synergistetes* (6,9%) ed *Actinobacteria* (17,4%). Questa caratterizzazione si mantiene invariata nel tempo successivo (**T29**), mentre nel campione **T44** la distribuzione degli stessi Phyla evidenzia un aumento del *Bacteroidetes* (50,6%) e la comparsa del Phylum degli *Spirochaetes* (2,3%).

Nei tempi di fine produzione **T56** e **T63** si osserva la dominanza del Phylum dei *Synergistetes* (82,1% e 92,9%) con la Classe *Synergistia*, mentre la restante frazione della comunità è composta dai Phyla *Firmicutes* (9,4% – 3,6%), *Bacteroidetes* (2,5% – 1,5%), ed *Actinobacteria* (5,8% - 0,8%). Come atteso la diversità della comunità microbica aumenta in seguito all'inoculo della comunità metanogena e con il progredire della DA; i valori massimi di H' ed E' coincidono con i tempi di massima produzione di CH<sub>4</sub> (Fig. 48).

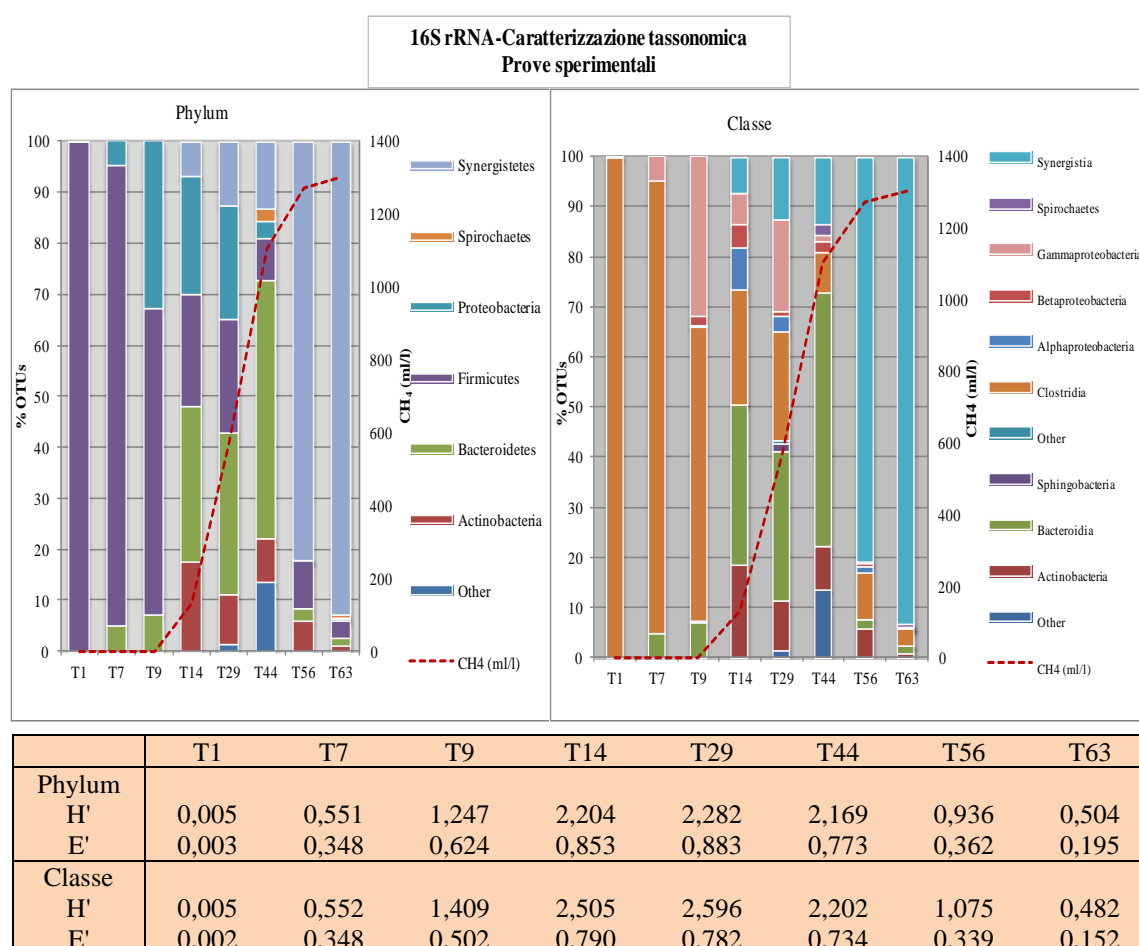


Figura 48. I grafici sono relativi al Phylum e alla Classe dei *Bacteria*. Gli istogrammi forniscono una rappresentazione grafica dei taxa presenti. La curva tratteggiata in rosso rappresenta la curva di produzioni cumulative di CH<sub>4</sub> (ml/l) ottenute dalle prove sperimentali. In tabella i risultati degli indici di diversità Shannon (H') e Evennes (E).

*Archaea*

La caratterizzazione della comunità *Archaea* è stata effettuata dal tempo T9, successivo all'inoculo della comunità metanogena, e fino alla fine dell'esperimento (Fig. 49). Al **T14** la *guild* risultava distribuita in due Classi: *Methanomicrobia* (94%) e *Methanobacteria* (6%), entrambe appartenenti al Phylum *Euryarchaeota*.

All'interno dei *Methanomicrobia* il genere dominante, appartenente all'Ordine *Methanomicrobiales*, è rappresentato dal *Methanospirillum* (37,8%) mentre nel secondo ritroviamo il solo genere *Methanosaeta* (55,6%), appartenente all'Ordine *Methanosarcinales*.

All'interno della classe dei *Methanobacteria*, si distingue il solo ordine dei *Methanobacteriales* a sua volta composto dal Genere *Methanobacterium* (6,6%).

Successivamente, al **T29** la Classe *Methanobacteria* passa al (44,6%) con conseguente aumento del Genere *Methanobacterium* (40,3%) mentre diminuisce la Classe *Methanomicrobia* (55,4%) e il corrispondente Genere *Methanospirillum* (15,9%).

Il dato più significativo si ha all'interno della Classe *Methanomicrobia* in cui diminuisce il genere *Methanosaeta* (5,1%) e compare il genere *Methanosarcina* (31,3%).

Nei successivi tempi di prelievo (**T44** e **T56**) in cui la produzione di CH<sub>4</sub> è al massimo, la tendenza osservata in precedenza si inverte: aumenta la classe *Methanomicrobia* (T44=71,4% e T56=84%) e diminuisce la classe *Methanobacteria* (T44=24,5% e T56=16%). La distribuzione della comunità microbica a livello di genere evidenzia la diminuzione di *Methanosaeta* (T44=1,6%) fino alla scomparsa (T56) a cui corrisponde un deciso aumento del genere *Methanosarcina* (T44=40,6% e T56=33,3%) e *Methanospirillum* (T44=22,3% e T56=47,6%). Per quanto riguarda la Classe *Methanobacteria*, si osserva una analoga diminuzione del genere *Methanobacterium* (T44=24% e T56=19%).

Infine, nel campione **T63**, quando la produzione di CH<sub>4</sub> era ormai terminata, il profilo della comunità metanogena cambia drasticamente: compare la Classe *Miscellaneous Crenarchaeotic Group* (MCG, 85,7%) e si evidenzia una piccola frazione appartenente alla Classe *Methanomicrobia* (14,3%).

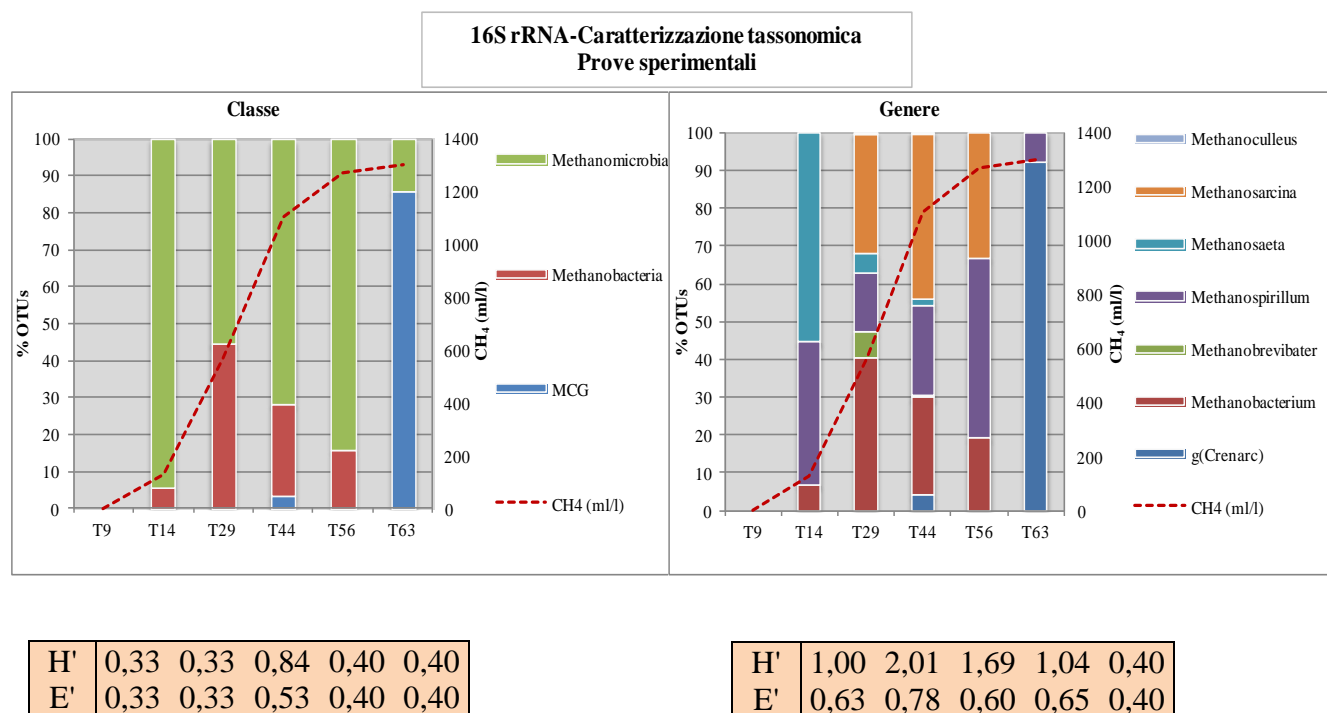


Figura 49. I grafici sono relativi alla classificazione tassonomica di Classe e Genere degli *Archaea*. Gli istogrammi forniscono una rappresentazione grafica dei taxa (%) presenti. La curva tratteggiata in rosso rappresenta la curva di produzioni cumulative di CH<sub>4</sub> (ml/l) ottenute dalle prove sperimentali. In tabella i risultati degli indici di diversità Shannon (H') e Evenness (E).

Per quanto riguarda l'analisi della diversità tassonomica a livello di Genere dei campioni analizzati si può osservare che la maggiore diversità è espressa dal campione T29 così come indicato dall'aumento dell'indice Shannon (H') (Fig. 49); nel campione T63, che corrisponde alla fase finale del processo di produzione di CH<sub>4</sub>. La distribuzione dei taxa identificati è costante tutti i livelli filogenetici identificati come espresso dal valore costante dell'indice Evenness (E).

### Organizzazione funzionale della guild dei metanogeni

Al variare della composizione degli *Archaea* metanogeni, la comunità coinvolta nella produzione di CH<sub>4</sub>, corrisponde la variazione dei *pathways* metabolici attivati. In figura 50 sono riportati quelli utilizzati nei punti più rappresentativi della produzione di CH<sub>4</sub>: T14 in fase di avvio, T29 e T44 alla sua massima produzione, T56 a fine produzione. E' interessante notare che ad ogni tempo di campionamento si visualizza una diversa composizione funzionale della comunità e di conseguenza una combinazione diversa delle vie di metanogenesi. Alle basse produzioni di CH<sub>4</sub> osservate al tempo T14 è probabilmente correlata l'abbondante presenza del genere *Methanosaeta*, metanogeni acetoclasti obbligati, mentre le più alte produzioni osservate nei tempi T29 e T44, sono la conseguenza della dominanza del genere *Methanosarcina* metanogeni con la capacità di utilizzare un più ampio spettro di substrati attivando i diversi percorsi metabolici per la produzione di CH<sub>4</sub> (Abendroth et al., 2015). I generi *Methanospirillum* e *Methanobacterium*, metanogeni idrogenotrofi, sono risultati abbondanti in tutti e quattro i tempi di campionamento.

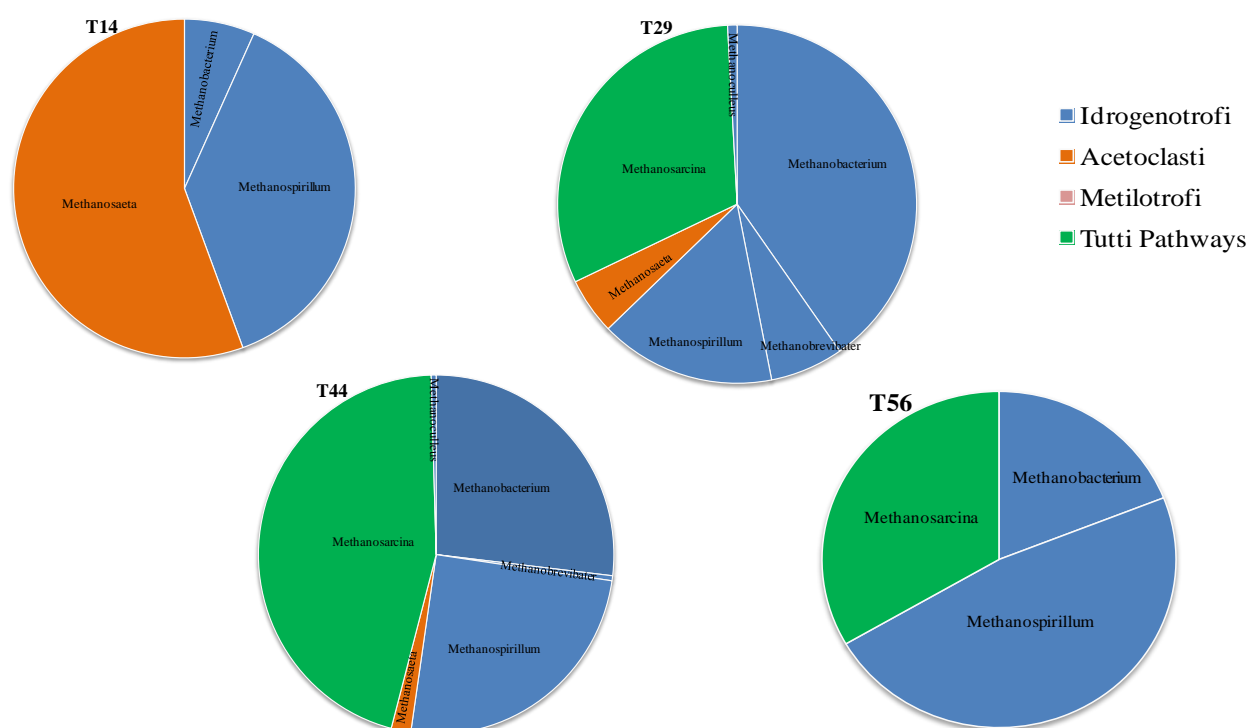


Figura 50. Rappresentazione grafica dell'organizzazione funzionale della *guild* degli *Archaea* metanogeni a livello di Genere in alcune delle prove sperimentali.

### 3.6.4 Analisi funzionale della comunità microbica: FISH

#### Caratterizzazione degli inoculi di partenza

##### Inoculo F210

Per questo inoculo (Fig. 53) di cui si conosce la classificazione tassonomica (Izzo et al., 2014) sono state applicate le sonde FISH (Fig.51): il  $78,8\% \pm 3,0$  dei batteri è positivo al dominio dei *Bacteria*, mentre non è stato rilevato nessun segnale positivo per il dominio degli *Archaea*. All'interno dei *Bacteria* (Fig. 52) il  $41,7\% \pm 0,3$  sono *Alpha-proteobacteria*, il  $19,8\% \pm 0,1$  *Gamma-proteobacteriae* il  $30\% \pm 4,2$  di LGC. All'interno della Classe dei *Gamma-Proteobacteria* il  $9,2\% \pm 0,5$  risulta costituito da *Enterobacteriaceae* mentre all'interno dei *LGC* si rileva come il  $16\% \pm 0,9$  appartenga al genere *Clostridium*.

##### Inoculo di metanogeni: D

La colorazione in DAPI ha fornito una densità pari a  $9,81 \cdot 10^9 \text{ cell/ml} \pm 1,80 \cdot 10^9$ .

Nel grafico (Fig. 51) viene riportata la composizione dell'inoculo di metanogeni (D) (Fig. 53) in termini di *Bacteria* ed *Archaea* e la composizione specifica all'interno della guild dei metanogeni. Nello specifico, l'analisi FISH indica la presenza di:  $74,7\% \pm 3,8$  di cellule positive alle sonde per gli *Bacteria* (EUB338,II,III) rispetto al totale visualizzate in DAPI e  $7,2\% \pm 3,5$  di cellule positive alla sonda per gli *Archaea* (ARCH915) rispetto al totale delle cellule visualizzate in DAPI.

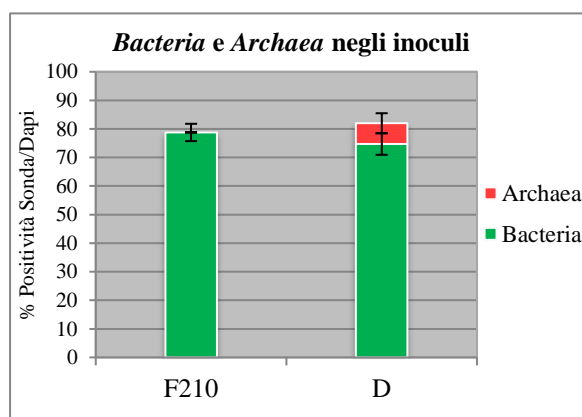


Figura 51. Analisi della comunità batterica negli inoculi mediante tecnica FISH. Percentuali di *Bacteria* ed *Archaea* negli inoculi F210 e D. Le barre verticali riportano le deviazioni standard per tre repliche.

##### *Bacteria*

Per l'inoculo **D** (Fig. 52), nei *Bacteria*, si riscontra il  $3,7\% \pm 0,4$  di *Alpha-Proteobacteria* e il  $14,6\% \pm 2,4$  di *Gamma-Proteobacteria*, di cui il  $5,8\% \pm 0,6$  di *Enterobacteriaceae*. Non sono però stati rilevati batteri appartenenti al Phylum dei *Firmicutes*. Sono stati rilevati inoltre *SRB*, i quali costituiscono una frazione rilevante della comunità con valori del  $19,5\% \pm 2,1$ .

### Archaea

La *guild* dei metanogeni è risultata costituita da *Methanosaeta*  $5,7\% \pm 2,9$ , specialisti nell'uso dell'acetato, (Fig. 52) mentre lo  $0,5\% \pm 0,2$  delle cellule è risultato positivo alla sonda per i *Methanosarcina* (Fig. 52).

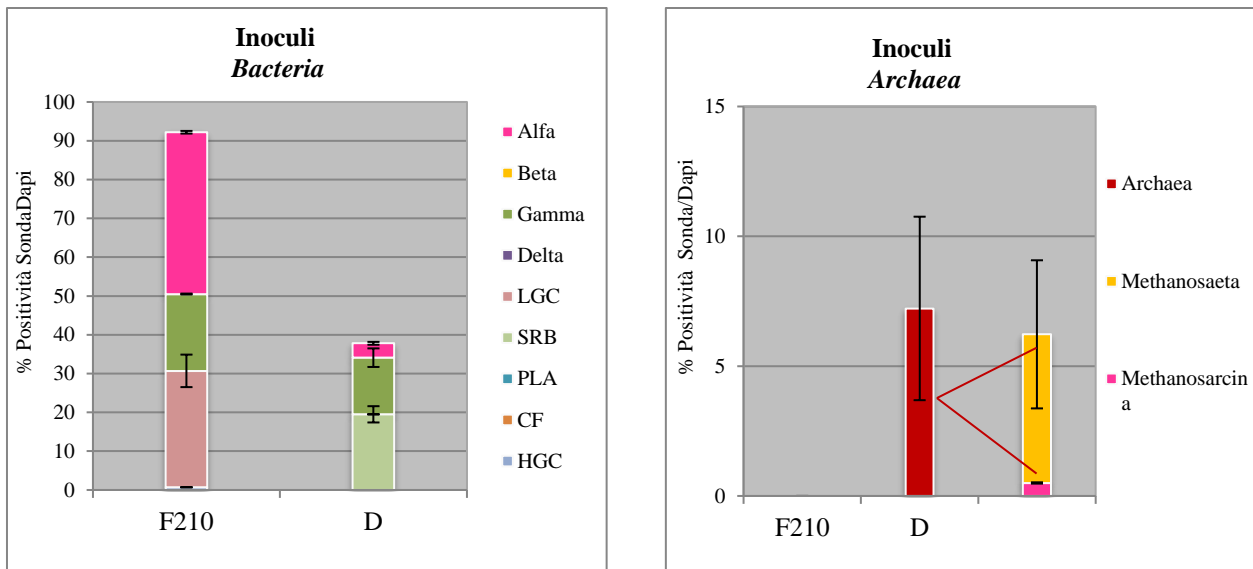


Figura 52. Analisi della comunità batterica negli inoculi mediante tecnica FISH. Composizione dei due inoculi. A sx i risultati per i *Bacteria* rispettivamente per F210 e inoculo D: Alfa = *Alpha-Proteobacteria*; Beta = *Beta-Proteobacteria*; Gamma = *Gamma-Proteobacteria*; Delta = *Delta-Proteobacteria*; PLA = *Planctomycetes*; CF = *Cytophaga-Flavobacter*; HGC = Gram + con alto contenuto di G+C (*Actinobacteria*); LGC = Gram + con basso contenuto di G+C (*Firmicutes*) SRB= Solfatoriduttori batterici. A dx i risultati per gli *Archaea* rispettivamente per F210 e inoculo D: le barre verticali riportano le deviazioni standard per tre repliche. A dx Micrografie inoculo F210: cellule batteriche marcate contemporaneamente con DAPI e sonde EUB 338, I,II,III marcate con Indocarbocianina Cy3 per il rilevamento dei Batteri.

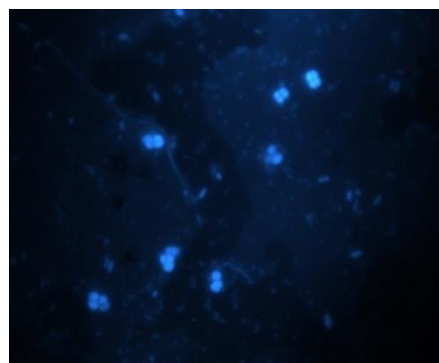
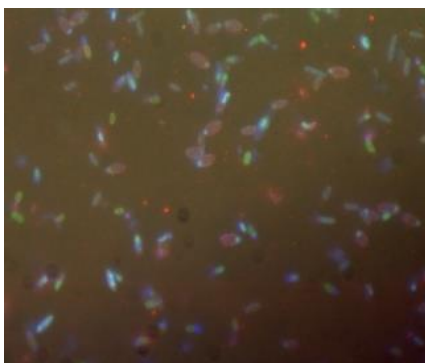


Figura 53. Micrografie inoculi. A sx Inoculo F210: cellule batteriche marcate contemporaneamente con DAPI e sonde EUB 338, I,II,III marcate con Indocarbocianina Cy3 per il rilevamento dei Batteri. A dx Inoculo D: *Archaea* e *Bacteria* evidenziati con colorazione DAPI.

### FISH - Caratterizzazione microbiologica al T7

Le indagini microbiologiche nella prima fase dell'esperimento sono state condotte per tutte le prove sperimentali ponendo l'attenzione sul tempo di campionamento T7 perché conclusivo della prima fase, con produzione di H<sub>2</sub> (Fig. 54). L'analisi della comunità dopo 7 giorni di DA e prima dell'inoculo D ha messo in evidenza come quasi tutta la comunità dei *Bacteria* ( $87\% \pm 2,3$ ) fosse costituita da batteri appartenenti al Phylum dei *Firmicutes* ( $79,2\% \pm 4,1$ ) oltre che da una frazione di *Gamma-Proteobacteria* ( $3,9\% \pm 0,9$ ).

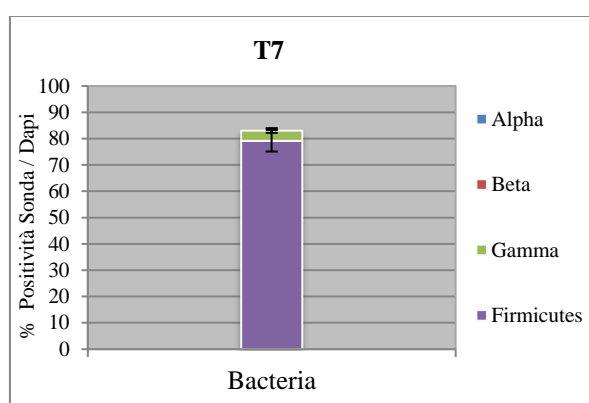


Figura 54. Analisi dei *Bacteria*. Alpha = *Alpha-Proteobacteria*; Beta = *Beta-Proteobacteria*; Gamma = *Gamma-Proteobacteria*; LGC = Gram + con basso contenuto di G+C (*Firmicutes*). Le barre verticali riportano le deviazioni standard per tre repliche.

### FISH - Caratterizzazione microbiologica al T11 e T56

Le indagini microbiologiche nella seconda fase dell'esperimento, cioè quelle in cui è stato prodotto CH<sub>4</sub>, sono state condotte su tutte le condizioni sperimentali relativamente ai tempi di campionamento T11 e T56 che corrispondono rispettivamente alla fase di avvio e di conclusione della produzione di CH<sub>4</sub>. In Figura 55 sono graficate, le percentuali di *Bacteria* e di *Archaea* nel T11 all'interno delle differenti condizioni sperimentali, rispettivamente: F Orpi  $40,3\% \pm 6,3 - 5,4\% \pm 0,5$ , F Neo  $45\% \pm 1,4 - 2\% \pm 0,5$ , F Mix  $46,1\% \pm 4,1 - 3,9\% \pm 0,8$ , F210  $59,6\% \pm 1,2 - 3\% \pm 0,2$ , Orpi  $36\% \pm 2,4 - 4,1\% \pm 0,6$ , Neo  $35,9\% \pm 1,3 - 3,2\% \pm 1,9$ , Mix ARF  $24,7\% \pm 1,5 - 4,1\% \pm 1,2$ . Nel T56 (Fig. 55) si nota un incremento percentuale dei *Bacteria* in presenza di bioaugmentation con ARF+F210 e anche con solo F210. Tali osservazioni sono confermate dall'analisi statistica (si veda oltre).

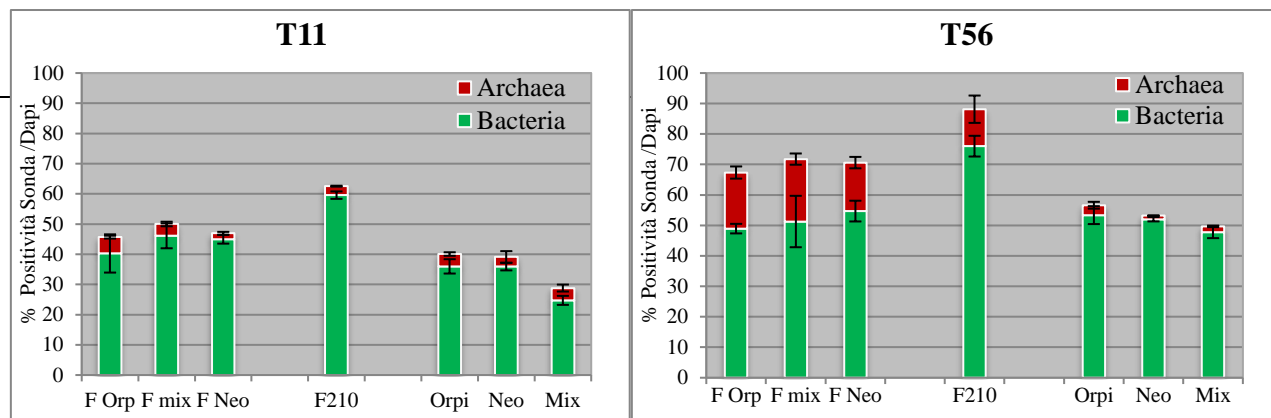


Figura 55. Composizione percentuale di *Bacteria* ed *Archaea* stimate mediante FISH delle comunita' microbiche nella fase di produzione di CH<sub>4</sub> al T11 e T56. La composizione e' espressa come percentuale di cellule che hanno risposto positivamente alla sonda rispetto alla colorazione DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni condizione sperimentale in triplicato.

Differenti composizioni delle *guild* di metanogeni al T11 e T56 vengono osservate in figura 56. Nel T11 si osserva in tutte le prove, come le sonde utilizzate abbiano dato esito positivo soltanto per il genere *Methanosaeta*. Nel T56 entrambi i Generi di acetoclasti, *Methanosaeta* e *Methanosarcina* sono stati rilevati nelle prove F210+ARF e nella prova con solo F210. I risultati per i *Methanosaeta* sono stati: F Orpi 8% ± 1,4 , F Neo 8,5% ± 2,6, F Mix 10,3% ± 1,4, F210 5,9% ± 1,2, Orpi 3,2% ± 1,1, Neo 1,2% ± 0,1, Mix ARF 1,9% ± 0,2.

Per i *Methanosarcina* invece sono state rilevate le seguenti %: F Orpi 10,4% ± 2, F Neo 7,4% ± 1,6, F Mix 10,1% ± 1,4, F210 7,8% ± 3,3, Orpi 0%, Neo 0%, Mix ARF 0%.

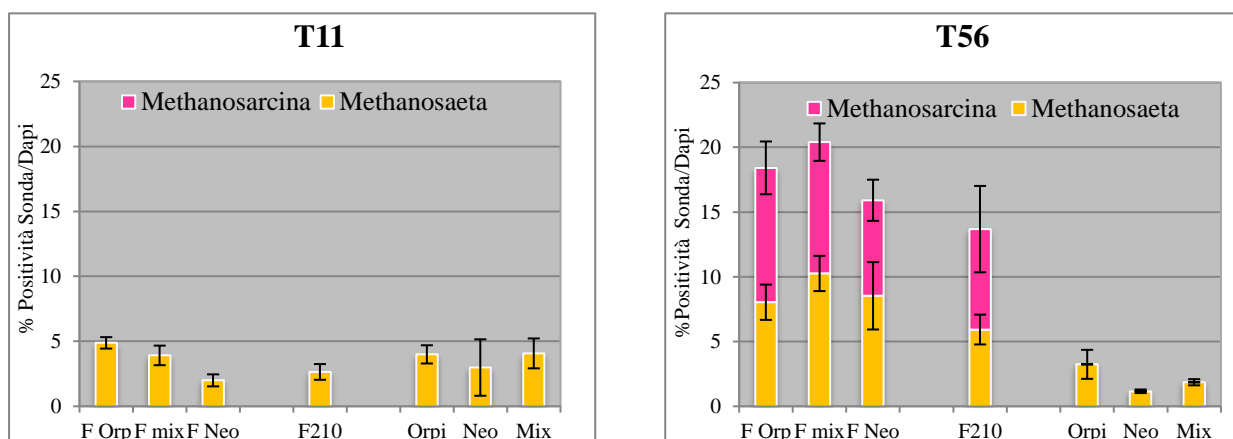


Figura 56. Struttura della *guild* di metanogeni stimata mediante FISH. A. Composizione percentuale al T11. B. Composizione percentuale al T56. La composizione e' espressa come percentuale di cellule che hanno risposto positivamente alla sonda rispetto alla colorazione DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni condizione sperimentale in triplicato.

Nel corso dello studio e' stata testata anche l'innovativa sonda GM5 (Brookman et al., 2000) per l'identificazione del genere *Neocallimastix* (tab. 11c), usato insieme a *Orpinomyces* sp. come inoculo per l'arricchimento della fase idrolitica. D'altra parte, ne' la sonda e' inserita nella lista del Probase, ne' sono riportate le specifiche per il suo utilizzo. Sebbene siano state effettuate molte prove a differenti valori di stringenza<sup>6</sup>, la sonda non ha mai dato esito positivo. Sono dunque

<sup>6</sup> Con il termine "stringenza" ci si riferisce alla capacita' che ogni sonda ha di appaiarsi con le sequenze complementari ed e' una caratteristica distintiva di ogni sonda; le condizioni di stringenza ottimali dipendono dalla combinazione di

necessarie ulteriori prove per mettere a punto un protocollo per l'utilizzo della sonda GM5.

### **Analisi statistica dei dati sperimentali ottenuti con l'indagine FISH**

Per testare la significatività delle differenze riscontrate alle diverse condizioni sperimentali è stata applicata l'Analisi della Varianza (ANOVA) con un valore di significatività  $\alpha = 0,05$  e il test di Tukey.

I risultati ottenuti all'interno dei due domini *Bacteria* ed *Archaea*, mostrano una differenza significativa tra i campioni con ARF+F210 rispetto ai campioni con solo F210, sia per quanto riguarda il T11 e il T56.

Inoltre all'interno degli *Archaea*, sono state riscontrate differenze significative al T11 anche tra i campioni con ARF+F210 rispetto ai campioni con solo ARF; al T56 negli *Archaea* si riscontrano differenze significative anche nel campione con solo F210 rispetto ai campioni con solo ARF.

Nei *Bacteria*, invece, i risultati ANOVA confermano l'assenza di differenze significative all'interno dei campioni con ARF+F210, e all'interno dei campioni con solo ARF. Ciò vale sia per il T11 sia per il T56.

La significatività all'interno degli *Archaea* non mostra differenze per quanto riguarda il genere *Methanosaeta* nel T11.

Nel T56 si osserva una differenza significativa per i *Methanosaeta* tra i campioni ARF+F210 e i campioni solo F210, tra ARF+F210 e ARF.

Nel T56 per quanto riguarda i *Methanosarcina* ci sono differenze significative tra i gruppi ARF+F210 mentre non si osservano differenze significative all'interno.

## 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

### 4.1 I sperimentazione

#### 4.1.1 Produzione di biogas

Con la I sperimentazione si è potuto dimostrare l'importanza del ruolo svolto dalle caratteristiche strutturali dell'inoculo utilizzato per avviare la produzione di biogas, utilizzando quale substrato per alimentare il processo unicamente PG, uno scarto lignocellulosico, molto resistente alla degradazione (Frigon et al., 2010; Sawatdeenarunat et al., 2015). In particolare si è messo in luce come l'organizzazione in granuli dell'inoculo sulla base di una disposizione spaziale ben strutturata e organizzata di batteri appartenenti alle diverse *guild* funzionali (MacLeod et al., 1990; Thaveesri et al., 1995; Khemkhao et al., 2011), possa avvantaggiare i passaggi metabolici su cui si fonda la DA (Shen et al., 2016). Infatti sebbene gli inoculi utilizzati provenissero dallo stesso impianto pilota (ENEA) per la produzione di biogas da scarti della lavorazione casearia (Lembo et al., 2016), le prove avviate con la comunità metanogena aggregata AP, hanno fornito produzioni maggiori di CH<sub>4</sub> (Fig. 25; tab. 15) rispetto alla comunità disaggregata DP.

Come rilevabile dal grafico in figura 25 gli andamenti delle produzioni cumulative di CH<sub>4</sub> ottenute con inoculo A e D si differenziano fin dai primi giorni di esperimento: infatti, la fase di avvio della produzione di CH<sub>4</sub> è stata più rapida nel caso della prova AP per la quale già a 13 giorni dall'inizio dell'esperimento sono state ottenute produzioni cumulative di CH<sub>4</sub> con un contenuto % nel biogas più elevato rispetto a quello ottenuto per DP (rispettivamente 928 ml/l contro 375ml/l e 38,2% contro 20,6%); a fine esperimento la condizione AP ha il 42% in più di CH<sub>4</sub>. A 35 giorni dall'avvio della DA, corrispondente alla fase di maggiore produzione di CH<sub>4</sub> (Fig.25) e quindi di maggior interesse per l'applicazione del processo a scala reale, la condizione AP aveva prodotto circa 1/3 in più rispetto a DP facendo registrare una produzione cumulativa di CH<sub>4</sub> di 1450 ml/l  $\pm$  177 contro la produzione di 908 ml/l  $\pm$  59 ottenuta con DP. Anche le rese sono state maggiori per AP, con valori di 181,8  $\pm$  22,6 ml CH<sub>4</sub>/gVS rispetto a DP con 113,5  $\pm$  7,4 ml CH<sub>4</sub>/gVS. La performance dell'inoculo AP è peraltro molto interessante considerando la natura scarsamente idrolitica dell'inoculo, acclimatato su un substrato liquido: i valori ottenuti sono infatti confrontabili con quelli riportati in letteratura, ottenuti per DA di paglia di grano ma utilizzando un inoculo metanogeno più ricco, derivante dai reflui zootecnici e da reflui municipali (Sapci et al., 2013). Questi ultimi inoculi si suppone contengano comunità microbiche in cui si è selezionata una componente idrolitica più efficace, capace di degradare materiale solido.

Dall'analisi degli acidi grassi, intermedi di processo per entrambe le condizioni è interessante osservare che non si rilevano concentrazioni particolari per alcuna tipologia né di acido né di

zuccheri (tab.15 e 16). Si ricorda che le quantità rilevate di entrambi rappresentano il surplus tra la quantità prodotta e quella consumata dalla comunità. Pertanto si può considerare che il metabolismo della comunità è efficiente in tutte le prove sperimentali, e che ciò che viene prodotto viene anche consumato.

#### 4.1.2 Caratterizzazione ed identificazione delle comunità microbiche

Le caratteristiche delle comunità microbiche, sia negli inoculi che nelle varie condizioni sperimentali ed ai diversi tempi di processo, sono state studiate utilizzando due tecniche molecolari: l'*Illumina* e la FISH. La prima, una tecnica NGS basata sull'amplificazione tramite PCR di un frammento del gene 16S rRNA, ha fornito indicazioni circa la composizione tassonomica della comunità *in toto* e quindi sull'entità della diversità microbica, indicando il potenziale funzionale della stessa. La seconda, basata sull'ibridazione delle sonde direttamente sulle cellule, ha permesso di mettere in evidenza le principali componenti funzionali delle comunità metabolicamente attive nel processo (Blagodatskaya et al., 2013) e dunque direttamente coinvolte nel processo. Mediante tecnica *Illumina* è stata definita la composizione tassonomica delle comunità microbiche degli inoculi **A** e **D**, e delle prove sperimentali ai tempi T35, corrispondente alla massima produzione di CH<sub>4</sub>, e alla fine delle produzioni (TF) mentre con la tecnica FISH sono stati analizzati gli inoculi e le prove sperimentali al tempo T35.

#### Inoculi A e D

La caratterizzazione dei profili delle comunità microbiche ha evidenziato importanti differenze nella composizione tassonomica degli inoculi **A** e **D**, differentemente strutturati (figg. 27 e 28) con una maggiore diversità quali-quantitativa per **D**, così come evidenziato anche dagli indici H' e E. Due domini principali, *Bacteria* ed *Archaea*, sono stati identificati negli inoculi **A** e **D** ma solo all'interno del Dominio dei *Bacteria* di **A** è stata rilevata la dominanza dei *Firmicutes* con il 76,3% di cui il 50,3% appartenenti alla classe dei *Clostridia*. I *Clostridia* sono particolarmente efficienti nella degradazione di materiali lignocellulosici tanto che recentemente sono stati utilizzati per condurre esperimenti di bioaugmentation ai fini di migliorare le rese di CH<sub>4</sub> in reattori alimentati con scarti agricoli (Tspekos et al., 2017). Anche nell'analisi delle comunità microbiche di reattori a scala reale, i *Clostridia* costituiscono spesso una frazione considerevole della comunità (De Vrieze et al., 2016), dove di concerto con i *Synergistia*, rilevati in **A** con il 10,7%, includono numerosi ceppi di batteri che possono degradare in maniera efficiente complessi materiali organici e fermentare acidi lattico ed acetico a H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Jang et al., 2014; Wirth et al., 2012).

Di contro nell'inoculo **D** i *Clostridia* costituiscono solo il 4,7% mentre sono predominanti i *Synergistia* (33,1%). Questi sono in grado di utilizzare amminoacidi producendo acidi grassi a catena corta utili ai metanogeni e solfato per i solfato riduttori; sono inoltre presenti i *Bacteroidia* (3,7%), comprendenti ceppi in grado di fermentare zuccheri o proteine ad acetato e succinato come principali prodotti.

L'identificazione tassonomica ha messo in evidenza come nell'inoculo **A** la *guild* degli *Archaea* metanogeni fosse costituita per metà da *Methanosaeta* (24,2%), specialisti nell'utilizzo dell'acetato (Smith & Igram Smith, 2007), e per la restante parte dal Genere *Methanobacterium*, costituito da batteri funzionalmente idrogenotrofi obbligati, ossia che utilizzano  $H_2/CO_2$  o formato per la produzione di  $CH_4$ . Anche nell'inoculo **D** sono stati identificati i *Methanosaeta*, ma con percentuali minori (8,2%) mentre predominano i *Methanocorpusculum* (57%) che insieme a frazioni minori di *Methanobacterium* (16,5), *Methanoculles* (10,1%) e *Methanospirillum* (3,8%) possiedono anch'essi il metabolismo idrogenotrofo obbligato. Si ricorda che questa componente funzionale è conosciuta per essere predominante nella *guild* metanogena in condizioni di termofilia mentre sia **A** che **D** sono stati ottenuti da condizioni operative di mesofilia.

La tecnica molecolare FISH ha consentito di verificare quali, tra le principali componenti delle comunità rilevate con *Illumina*, fossero in uno stato di attivazione metabolica, una condizione fisiologica necessaria per svolgere un ruolo attivo nel processo di DA (Blagodatskaya et al., 2013).

Per l'inoculo aggregato **A** (è stato possibile identificare il 74,7% del totale di cellule rilevate con la colorazione in DAPI), la comunità è risultata composta per il  $48\% \pm 4,8$  da cellule di *Bacteria* e per il  $26,7\% \pm 1,4$  da *Archaea* (Fig. 27). Quest'ultima percentuale è più elevata di quella riportata in letteratura, generalmente intorno a valori non superiori al 10% (Arieyady et al., 2007).

Entrambe le percentuali, sia di *Bacteria* che di *Archaea* rilevate in **A**, sono più elevate di quelle riscontrate per l'inoculo disaggregato **D**, per il quale i valori erano rispettivamente solo del  $37,3\% \pm 2,1$  e dell' $11,3\% \pm 1,3$  (Fig. 28). D'altra parte l'identificazione delle cellule dell'inoculo **D** è stato reso difficoltoso dalla scarsa luminescenza restituita. In questo senso è da sottolineare che le sonde oligonucleotidiche marcate con fluorocromi, di cui si avvale la tecnica, penetrano nelle cellule ibridando direttamente con l'rRNA presente nei ribosomi ed il numero di sonde fluorescenti che si lega ad una cellula è in relazione al n° dei suoi ribosomi. Pertanto l'intensità del segnale luminoso è in relazione con la quantità di ribosomi presenti e dunque alla attività metabolica della cellula stessa (Moter & Gobel, 2000). Ciò induce a ritenere che la struttura disaggregata della comunità, svantaggiando le interazioni inter-guild, deprima il metabolismo della comunità.

Concordemente con quanto rilevato con *Illumina*, mediante tecnica FISH nella *guild* dei *Bacteria* nell'inoculo **A** è stato possibile individuare, la presenza di batteri LGC, comprendenti i batteri

appartenenti al Phylum dei *Firmicutes* (22,4%±1,4). Utilizzando sonde tassonomicamente più specifiche è stato possibile rilevare all'interno dei *Firmicutes* (sonda LCG) i batteri appartenenti alla classe dei *Clostridia* (18,6%±1,3), come già detto idrolitici ed H<sub>2</sub>-produttori (Levin et al., 2009). Inoltre sono state rilevate cellule metabolicamente attive all'interno del Phylum dei *Proteobacteria* per le classi rispettivamente degli *Alphaproteobacteria* (2,6%±0,5) e dei *Gammaproteobacteria* (5%±0,4). E' stata inoltre utilizzata la sonda SRB, specifica per la componente funzionale dei *Solfato-riduttori batterici* (SRB) appartenenti alla classe dei *Deltaproteobacteria* (27,3%±1,1). L'entità del loro ruolo all'interno della comunità della digestione anaerobica è da approfondire: da un lato infatti possono essere dei competitori metabolici dei metanogeni perché utilizzano l'H<sub>2</sub> per formare H<sub>2</sub>S; dall'altro questa stessa attività può contribuire a mantenere bassa la pressione parziale dell'H<sub>2</sub>, favorendo così le interazioni simbiotiche tra acetogeni e metanogeni.

Le analisi FISH concordano anche per quanto l'*Illumina* ha rilevato per l'inoculo **D**: non sono stati identificati batteri positivi alla sonda dei *Firmicutes*, e anche la sonda più specifica per i *Clostridia*, non ha dato alcun segnale. In **D** invece una componente di rilievo è data dai *Gammaproteobacteria* (14,6%±2,4) di cui il 5,8%±0,6, è risultato appartenere alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*: si tratta di batteri fermentanti anaerobi facoltativi, capaci di prosperare in ambienti poco stabili riguardo alle condizioni di anaerobiosi. La loro presenza comunque è garanzia del mantenimento dell'anaerobiosi: infatti per motivi termodinamici essi utilizzano l'ossigeno disponibile prima di passare ad un metabolismo di tipo fermentativo. Tra i *Bacteria*, anche in quest'inoculo è presente una frazione di *SRB* (19,5%±2,1), e di *Alphaproteobacteria* (3,7%±0,4).

Per quanto riguarda l'analisi FISH della *guild* degli *Archaea* è interessante considerare che questi pesano maggiormente nella composizione dell'inoculo **A** di cui costituiscono circa 1/3 della comunità, rispetto all'inoculo **D**, in cui gli *Archaea* costituiscono circa 1/4 della comunità.

D'altra parte (Fig. 34) sia in **A** che in **D** risulta essere attiva prevalentemente la componente funzionale degli acetotrofi a cui, si ricorda, è attribuito circa il 70% della produzione di CH<sub>4</sub> in condizioni di mesofilia (37°C). Infatti si rileva la dominanza dei *Methanosarcinales* per entrambi gli inoculi ma con percentuali del 21,2%±2,5 per **A** e 11,9%±1,2 per **D**. Un ulteriore approfondimento ha messo in evidenza come in **A** tutti i *Methanosarcinales* appartenessero al genere *Methanosaeta*, acetotrofi obbligati (24,2%±3,6), e dunque specialisti nell'uso dell'acetato (Smith & Igram Smith, 2007) mentre in **D** i 2/3 degli *Archaea* sono *Methanosaeta* sp ed il restante 1/3 circa sono *Methanosarcina* sp cioè appartenenti all'altro genere di acetotrofi conosciuto,

(rispettivamente  $8,2\% \pm 0,4$  e  $4\% \pm 0,9$ ) (Smith & Igram-Smith, 2007; Liu et al., 2008). I *Methanosarcina* sono generalisti nell'uso dei substrati perché in grado di attuare anche la via metabolica idrogenotrofa, e pertanto sono in grado di prosperare in ambienti meno prevedibili e di maggiore stress rispetto a quelli richiesti dai *Methanosaeta*.

Un aspetto che resta da approfondire il fatto che le sonde specifiche per i metanogeni idrogenotrofi obbligati riferite agli ordini *Methanobacteriales* e *Methanomicrobiales* non hanno fornito nessun segnale positivo<sup>7</sup> nè per **A** né per **D**, sebbene la loro presenza sia stata rilevata con *Illumina*. Ulteriori studi saranno necessari per rilevare se la loro presenza sia da attribuirsi soltanto ad una potenzialità della *guild*. D'altronde si ricorda che il *pathway* metabolico idrogenotrofo è comunque presente nella comunità se essa è composta da una frazione di *Methanosarcina*.

### Prove sperimentali

I risultati ottenuti con *Illumina* (Fig. 29) evidenziano come dopo 35 giorni di DA (T35), la comunità microbica della condizione AP sia caratterizzata dalla riduzione della componente idrolitica e H<sub>2</sub>-produttrice dei *Firmicutes*, propria delle prime fasi della DA, a vantaggio delle componenti *Chloroflexi* (37,1%), *Synergistetes* (26,6%), e *Bacteroidetes* (15,7%). Strutture analoghe nella composizione della comunità microbica sono riportate in precedenti studi (Rivier et al 2009; Nelson et al., 2011; Jang et al., 2014), sebbene con diverse abbondanze relative. In particolare, Rivier et al., (2009) e Nelson et al., (2011) evidenziano che i microorganismi del Phylum *Chloroflexi*, risultato più abbondante, svolgono un ruolo importante nella DA di fanghi di depurazione, mentre i *Bacteroidetes*, a cui si deve un ruolo funzionale proteolitico, sono maggiormente presenti nel caso della DA di rifiuti solidi. Questi dati evidenziano come nella fase di avvio e di massima produzione di CH<sub>4</sub> le comunità microbiche dominanti siano coinvolte nella degradazione più complessa del substrato per formare i monomeri solubili utilizzabili dagli acidogeni per la sintesi degli acidi grassi. A conferma si può notare che alla fine del processo, quando la produzione di CH<sub>4</sub> è ormai terminata, aumenta la componente dei *Synergistetes*, microorganismi a cui si attribuisce la degradazione di substrati meno complessi quali gli aminoacidi. Inoltre alcune specie sono in grado di ossidare l'acetato assolvendo al ruolo di omoacetogeni (Ito et al., 2011), e dunque di stabilizzatori della rete trofica (paragrafo 1.2.1). In questa stessa fase diminuiscono i *Bacteroidetes* e i *Chloroflexi*, così come riscontrato anche da altri autori (Chen & Dong, 2005 e Robert et al., 2007).

---

<sup>7</sup>Prove non riportate, effettuate su ceppi ordinati presso la DSMZ avevano mostrato la loro rilevanza mediante specifiche sonde FISH (Massini et al., 2015).

Tra i Phyla meno abbondanti ma che contribuiscono alla diversificazione della comunità, è da segnalare il phylum *Thermotogae* (2,9%), a cui appartengono microorganismi anaerobi in grado di fermentare polisaccaridi complessi producendo idrogeno in condizioni di termofilia. La presenza di una comunità notoriamente termofila anche nelle condizioni di mesofilia è supportata da altri dati di letteratura (Nesbo et al., 2006) e si suppone costituisca un potenziale dell'intera comunità per le sue capacità di fermentare polisaccaridi complessi e di produrre H<sub>2</sub>.

Nella condizione DP la comunità risulta molto meno diversificata di AP (si vedano gli indici H' e E), sia al T35 che a fine produzione: i dati evidenziano la dominanza del Phylum *Proteobacteria* ed in particolare della classe dei *Gamma-proteobacteria*, suggerendo un drastico cambiamento nella comunità rispetto a quanto rilevato nell'inoculo D. Tale *shift* è certamente legato alla fase operativa del processo che, dopo 35 giorni e alla fase di massima produzione di CH<sub>4</sub> necessita di una comunità con minore capacità degradative ma con una maggiore capacità acetogenica. I *Gamma-Proteobacteria* come già spiegato contribuiscono al mantenimento delle condizioni di anaerobiosi.

La composizione tassonomica all'interno della *guild* degli *Archaea* (Fig. 30) in AP\_35 AP\_F mostra la prevalenza degli acetotrofi, tutti appartenenti al genere *Methanosaeta*, acetotrofi obbligati. Nella condizione DP\_35 e DP\_F, predomina il genere *Methanospirillum* costituito da idrogenotrofi obbligati. All'interno della componente acetotrofa invece, si rilevano entrambi i due generi noti, *Methanosaeta* (32,3%) ed i *Methanosarcina* (16,1%). Si ricorda che in condizioni di mesofilia la metanogenesi acetotrofa è la principale via di produzione di CH<sub>4</sub> e solo due Generi *Methanosarcina* e *Methanosaeta* sono in grado di trasformare l'acetato in CH<sub>4</sub> (Gagliano et al., 2014; Smith and Ingram-Smith, 2007). Poichè le loro cinetiche di crescita sono principalmente correlate alla concentrazione di acetato ma con affinità diversa - *Methanosaeta* nell'ordine delle µM mentre *Methanosarcina* nell'ordine di mM - si è inclini a ritenere che la presenza anche dei *Methanosarcina* fornisca indicazioni circa un processo più speditivo (De vrieze et al., 2012).

Inoltre, proprio a causa della versatilità metabolica dei *Methanosarcina*, capaci di sfruttare tre differenti *pathway* metabolici, (quindi non solo la via acetotrofica), la loro presenza sembra conferire alla comunità una maggiore resistenza e resilienza di processo.

Gli indici di Shannon-Weaver (H') e l'Evenness (E) sono stati applicati per stimare la diversità ecologica delle comunità sulla base dei dati relativi all'*Illumina*. H' mostra valori compresi rispettivamente tra 2 e 3 per la condizione AP, sia al T35 che al TF, per Phylum e Classe; mentre per la condizione DP i valori sono compresi tra 0,4 e 0,7 (Figg. 29-30) rilevando una diversità qualitativa molto ridotta. Anche l'E' (il valore dell'indice è compreso tra 0 e 1) indica una elevata

variabilità di AP rispetto ad AD.

L'analisi FISH è stata circoscritta al T35, tempo di maggiore interesse in riferimento alla produzione di CH<sub>4</sub>, analizzando la composizione della *guild* di metanogeni (Fig. 36), ultima e critica fase dell'intero processo: infatti le differenti cinetica di crescita e riproduzione degli *Archaea*, sembra influire sulle fasi precedenti della DA, controllandone il procedere mediante l'effetto di sottrazione dell'H<sub>2</sub> (Adekunle & Okolie, 2015).

Per la condizione **AP** la percentuale di *Archaea* risulta aumentata rispetto alla composizione dell'inoculo A (dal 26,7% al 33,4%±3,4). Per la condizione di controllo **A** il valore è stato del 30,0% ± 2,0.

Anche per la prova **DP** la percentuale di *Archaea* aumenta dal 11,3% al 31,2%±12,1 mentre per la condizione di controllo **D** i valori sono stati del 15,3%±0,8.

Per quanto riguarda la composizione della *guild* degli *Archaea* metanogeni (Fig. 41) nelle prove sperimentali **AP** tutti gli acetotrofi sono *Methanosaeta* sp, rispettivamente 35,3%±1,3 confermando quanto rilevato con *Illumina*. Di contro la *guild* di *Archaea* in **DP** continua ad essere costituita sia da *Methanosaeta* sp che da *Methanosarcina* sp, ma in proporzioni differenti da quelle dell'inoculo di partenza: infatti quest'ultima componente diviene predominante facendo registrare una concentrazione pari al 31,3%±11,8 mentre per i *Methanosaeta* sp era del 16,5 %±10,7.

E' interessante rilevare che riportando i valori percentuali alla densità cellulare determinata con colorazione DAPI (Figg. 39-42), per la prova **DP**, i valori sono di un ordine di grandezza maggiori di quelli rilevati per la prova **AP**: malgrado ciò, le produzioni cumulative di CH<sub>4</sub>, le rese, nonché il contenuto % in CH<sub>4</sub> sono comunque inferiori rispetto ad **AD** rivelando una minore efficienza dell'intero processo.

Inoltre, le sonde applicate per gli idrogenotrofi non hanno confermato i dati ottenuti con *Illumina* rilevando una prevalente inattività metabolica di questa componente.

## 4.2 II sperimentazione

### 4.2.1 Produzione di biogas

Con la seconda sperimentazione si è dimostrato che mediante *bioaugmentation* della comunità microbica attiva nella DA di scarti lignocellulosici con i funghi anaerobi ruminali ARF e l'inoculo F210 è possibile incrementare le produzioni cumulative di CH<sub>4</sub>. Come si può osservare dai grafici riportati in figura 44 e dai dati in tabella 20, le maggiori produzioni CH<sub>4</sub>, in termini di produzioni cumulative (ml/l) di rese (CH<sub>4</sub>/gVS) e di contenuto (%) di CH<sub>4</sub> si ottengono mediante *bioaugmentation* effettuato sia con ARF che F210. Sorprendentemente le prove effettuate utilizzando solo ARF, sia singolarmente che in una miscela dei due ceppi, *Orpinomyces* sp e *Neocallimastix* sp, hanno fornito risultati decisamente deludenti (Fig. 44 e tab. 20). A livello ecologico però questi stessi risultati hanno consentito di riconoscere il ruolo prevalentemente idrolitico di questa componente della comunità microbica e di evidenziare come essa debba essere supportata da una integrazione di batteri fermentanti come quelli presenti nell'F210, affinché il collo di bottiglia nella fase idrolitica non venga traslocato nella successiva fase fermentante, continuando ad ostacolare le produzioni di CH<sub>4</sub>. Ciò conferma quanto sostenuto da Sundberg et al. (2013) e cioè che l'efficienza e la stabilità dell'intero processo dipendono in gran misura dall'equilibrio metabolico delle sue componenti funzionali.

Questo esperimento è stato condotto in configurazione di processo bifase allo scopo di avvantaggiare le fasi idrolitiche e acidogene della comunità creando le rispettive condizioni di optimum di nicchia (presenti nel primo stadio). Nel grafico di figura 43 sono riportati gli andamenti della produzione di H<sub>2</sub>: i risultati hanno mostrato che negli esperimenti dove gli ARF sono stati utilizzati singolarmente è stato prodotto H<sub>2</sub>, seppur in concentrazioni limitate, a dimostrazione sia della capacità idrolitica di questi due ceppi fungini, sia a conferma del fatto che gli ARF sono in grado di produrre H<sub>2</sub> mediante gli idrogenosomi, organelli, deputati alla conversione degli zuccheri in H<sub>2</sub> (Haitjema et al., 2014). Le produzioni più elevate di H<sub>2</sub> in presenza di singoli ceppi si ottengono alle 168 ore con *Orpinomyces* sp. ( $107,4 \pm 7,4$  ml/l), mentre *Neocallimastix* sp. è risultato decisamente meno efficiente ( $7,9 \pm 2,2$  ml/l). Le produzioni di H<sub>2</sub> più elevate invece si ottengono dall'associazione *Neocallimastix* sp.+ F210 ( $186,8 \pm 12,2$  ml/l): l'ipotesi che si instauri una interazione di cooperazione è supportata dall'incremento di produzione di H<sub>2</sub> del 15% rispetto al solo inoculo di batteri F210.

Per quanto riguarda la seconda fase, quella in cui viene prodotto CH<sub>4</sub>, l'analisi statistica ANOVA applicata sui risultati del 63° giorno, (Fig.44) ha evidenziato 3 differenti andamenti sulla base delle

produzioni cumulative (ml/lCH<sub>4</sub>) ottenute:

- 1) le maggiori produzioni sono state ottenute in condizioni di bioaugmentation con ARF+F210, (1397,2±73,2 ml/l con la Mix di ARF; 1357,0±140,8 ml/l con *Orpinomyces* sp; 1279,6±47,9 ml/l con *Neocallimastix* sp;
- 2) valori di produzione intermedia sono stati ottenuti mediante bioaugmentation con il pool fermentante F210, 988,3±148,2 ml/l rilevando le capacità idrolitiche che lo mettono in grado di utilizzare substrati recalcitranti quali la PG;
- 3) le produzioni minori sono state rilevate in caso di bioaugmentation con la sola componente ARF (435,1±194,2 ml/l CH<sub>4</sub> per *Orpinomyces* sp; 236,3±27,9 ml/l CH<sub>4</sub> con *Neocallimastix* sp e 250,8±14,6 ml/l CH<sub>4</sub> con la Mix di ARF). Anche Nkemka et al., (2015) non hanno riscontrato incrementi significativi nelle produzioni di CH<sub>4</sub> in bioaugmentation con soli ARF, in condizioni peraltro analoghe quali la configurazione di processo in bifase e l' utilizzo substrati lignocellulosici.

I risultati migliori in termini di produzione (ml/l CH<sub>4</sub>) sono stati ottenuti dunque, in tutti i casi, dove sono presenti sia ARF che F210. Si può quindi supporre, che anche nella seconda fase dell'esperimento, si instauri una cooperazione trofica tra ARF e batteri fermentanti (F210), determinando incrementi nella produzione di CH<sub>4</sub>. Tali incrementi sono del 40,5% nelle condizioni con F210+Mix ARF rispetto alle condizioni solo F210.

Questi risultati contribuiscono ad individuare la corretta collocazione funzionale degli ARF lungo la catena trofica della DA: essi si collocano nella fase iniziale idrolitica e come detto, devono essere supportati dall'attività dei batteri fermentanti acidogeni contraddicendo almeno in parte l'efficacia, ai fini della produzione di CH<sub>4</sub>, di una loro interazione diretta con i metanogeni (Orpin et al., 1997; Nakashima et al., 2000; Cheng et al., 2009; Leis et al., 2014; Dollohofer et al., 2015). Evidentemente non ci sono scorciatoie efficaci, lungo la catena trofica!

#### 4.2.2 Produzione di intermedi di processo

Tra i principali prodotti di fermentazione considerati (Lwin et al., 2012; Jin et al., 2011) e monitorati nel corso dell'esperimento l'acido acetico risulta consumato quando la produzione di CH<sub>4</sub> è al culmine (Fig. 45a). E' interessante rilevare che nelle condizioni in cui è stata realizzata la bioaugmentation unicamente con ceppi di ARF (senza F210) l'acetico persiste anche a fine esperimento quando le produzioni di CH<sub>4</sub> sono le più basse registrate. Questa osservazione evidenzia nuovamente come nel corso degli esperimenti la produzione di CH<sub>4</sub> sia stata realizzata dalla via metabolica effettuata dagli acetotrofi e conferma come il potenziamento della comunità

con batteri fermentanti (F210) sia indispensabile per garantire l'efficienza del processo.

A fine produzione (giorno 77°), tempo in cui non è più stata rilevata la produzione di CH<sub>4</sub>, tutti i metaboliti rilevati (propionico, butirrico, formico, lattico, succinico ed etanolo) non risultano più disponibili nelle prove con ARF, mentre gli stessi metaboliti risultano essere ancora presenti (Fig.45 a, b, c), e quindi non consumati, nelle prove condotte con solo ARF.

#### 4.2.3 Caratterizzazione ed identificazione delle comunità microbiche

La modalità *batch* con cui sono stati condotti gli esperimenti ha offerto il grande vantaggio di poter rilevare l'avvicendamento di gruppi tassonomici nel corso del processo, riconducendo gli *shift* nella composizione di comunità a delle vere e proprie successioni ecologiche all'interno dei reattori.

Nella II sperimentazione, le analisi Illumina sono state eseguite per indagare la composizione tassonomica di *Bacteria* e *Archaea* della prova sperimentale F<sub>210</sub>+Mix ARF che è risultata essere la migliore, in termini di produzioni di CH<sub>4</sub> (paragrafo 4.2.1).

Essa è stata eseguita per i tempi T1,T7,T9, rappresentativi della fase di produzione di H<sub>2</sub> precedentemente all'aggiunta dell'inoculo metanogeno, e successivamente per i tempi T14 in fase di avvio di produzione di CH<sub>4</sub>, T29 e T44 nel periodo della sua massima produzione, nonché al T56 e T63 a fine produzione.

I risultati hanno confermato che al T1,T7,T9 è presente una comunità microbica composta di soli *Bacteria*, così come atteso (Fig. 48). Inoltre, si rileva la frazione dei *Bacteroidetes* i quali noti per le capacità proteolitiche, intervengono prima nella degradazione delle proteine e poi nella fermentazione degli amminoacidi ad acetato.

Al T14,T29, T44, T56 e T63 la comunità identificata è risultata costituita da *Bacteria* (Fig. 48) ed *Archaea* (Fig. 49).

Con il procedere della DA all'interno dei *Bacteria* diminuisce la frazione di taxa di batteri idrolitici e idrogeno-produttori (*Firmicutes* e *Proteobacteria*) mentre, nel periodo intermedio aumenta quella dei *Bacteroidetes* fino al T44, per poi successivamente diminuire a fine produzione di CH<sub>4</sub>: la loro dominanza intermedia, nel corso della produzione di CH<sub>4</sub> è riconducibile alla capacità di fermentare zuccheri o proteine ad acetato e succinato. A fine produzione si osserva la predominanza del Phylum dei *Synergistetes*. Essi sono presenti con percentuali crescenti nel corso del processo: al T14, T29, T44 si registrano valori rispettivamente del 6,9%, 12,6%, 13,4%. Al T56 e T63, quando la produzione di CH<sub>4</sub> è ormai conclusa, arrivano a costituire rispettivamente l'82,1% e il 92,9% della comunità (Fig. 48). Questo risultato è piuttosto sorprendente in quanto i *Synergistetes* possono utilizzare amminoacidi producendo acidi grassi a catena corta utili per i metanogeni e anche per gli

*SRB*. A questo proposito, Ito et al., (2011) hanno individuato un ceppo batterico, appartenente al gruppo dei *Synergistetes*, in grado di ossidare l'acetato a  $H_2/CO_2$ , ricoprendo il ruolo funzionale degli omoacetogeni. Le loro attività metaboliche pertanto sono da porre in relazione di simbiosi con i metanogeni idrogenotrofi, sia obbligati che facoltativi.

In questo studio, mentre al T14 tutti gli acetotrofi *Methanosarcinales* appartengono al genere *Methanosaeta* (55,6%) specialisti nell'uso dell'acetato, (dal T29 si affermano i *Methanosarcina*, in grado di svolgere tutti i *pathway* metabolici e pertanto anche quello idrogenotrofo, con percentuali al T29, T44 e T56 rispettivamente del 31,3%, 40,6%, 33,3%. Di contro, i *Methanosaeta* mostrano percentuali decrescenti al T29 (5,1%), T44 (1,6%) e al T56, alla fine della produzione di  $CH_4$ , non vengono più rilevati (Fig. 50).

La funzione ecologica dei *Crenarchaeota* nella DA, non è ancora ben chiara e il motivo della loro identificazione al T63 (85,7%) richiede ulteriori approfondimenti.

Le analisi delle principali componenti funzionali condotte con tecnica FISH per gli inoculi F210 e D (Figg. 46-47) ha consentito di aggiungere informazioni circa le relazioni tra comunità attive nella DA e produzione di  $H_2$  e  $CH_4$ .

L'inoculo F210 (Fig. 46) con le sue capacità idrolitiche e fermentanti, svolge nella DA un ruolo funzionale necessario per accentuare l'attività idrolitica degli ARF. Le informazioni ottenute dalla sua caratterizzazione hanno evidenziato una struttura della comunità microbica ben definita e costituita da tre componenti principali di batteri: *Alphaproteobacteria* (41,7%), *Gammaproteobacteria* (19,8%) di cui il 9,2% *Enterobacteriaceae*,  $H_2$ -produttori, anaerobi facoltativi e *Firmicutes* (30%) di cui il 16% *Clostridium*, anaerobi obbligati. Secondo Hung et al. (2011), la presenza delle *Enterobacteriaceae* è una garanzia dell'instaurarsi delle condizioni di anaerobiosi necessarie per la fermentazione da parte di *Clostridium*.

Anche per questo esperimento l'inoculo metanogeno **D** era stato ottenuto dall'impianto pilota ENEA, analogamente come per il primo esperimento, utilizzando la condizione disaggregata al fine di mettere in maggiore evidenza l'eventuale efficacia della bioaugmentation. In altri termini si è scelto di utilizzare un inoculo strutturalmente svantaggiato.

Si ricorda che nell'inoculo metanogeno sono comunque presenti tutte le componenti funzionali della comunità della DA comprese quelle idrolitiche e quelle acidogene. L'interesse nella sua caratterizzazione è stato comunque rivolto alla *guild* deputata alla produzione di  $CH_4$  in considerazione del fatto che pure la fase conclusiva della DA, la metanogenesi, è considerata potenzialmente limitante la velocità e l'efficienza del processo. Infatti, se nella fase iniziale l'idrolisi pone un limite per la difficoltà nel degradare molecole organiche complesse, la lentezza delle cinetiche di crescita degli *Archaea* e quindi della rimozione dell' $H_2$  controlla ed eventualmente

limita l'attività degli acetogeni. Il valore percentuale di *Archaea* (Fig.52) è stato di  $7,2\% \pm 3,5$  all'interno del quale è stato poi possibile rilevare entrambe le componenti di acetotrofi sebbene i *Methanosaeta* sp, specialisti nell'uso dell'acetato siano risultati predominanti rispetto ai *Methanosarcina* sp, (rispettivamente  $5,7\% \pm 2,9$  e  $0,5\% \pm 0,2$ ).

### Composizione di comunità nei reattori

L'analisi FISH eseguita al T7 (Fig.54) rappresentativo della fase di produzione di  $H_2$  e precedente l'aggiunta dell'inoculo metanogeno, ha evidenziato, oltre come atteso, una comunità microbica costituita solamente da *Bacteria*, con la dominanza assoluta dei *Firmicutes* (79,2%) così come evidenziato anche dall'Illumina (90,5%).

L'analisi FISH è stata effettuata per tutte le condizioni sperimentali dopo due giorni l'avvio della fase di metanogenesi (T11) e alla fine della fase di produzione di  $CH_4$ . Due giorni si è atteso dopo l'inoculo con **D** perché la comunità metanogena necessita di un paio di giorni di adattamento, prima dei quali si assiste generalmente ad una temporanea riduzione delle attività metaboliche (Demirel & Yenigun, et al., 2006). D'altra parte al T11 (Fig. 55), le frazioni di *Bacteria* e *Archaea* rilevate sono generalmente ancora inferiori rispetto a quelle dell' inoculo D (Fig. 51).

All'interno della guild di *Archaea* metanogeni (Fig. 56), risulta prevalere la componente funzionale degli acetotrofi a cui, si ricorda, è attribuito il 70% della produzione di  $CH_4$  nelle condizioni sperimentali di mesofilia (37°C).

La *guild* di metanogeni acetotrofi, analizzata mediante FISH, mostra rilevanti differenze nella sua composizione tra l'inizio dell'esperimento e la fase finale.

Al T11 si osserva un predominanza assoluta degli acetotrofi obbligati *Methanosaeta* (Fig. 56) che comunque non raggiungono neanche il 5% in nessuna delle prove sperimentali. La situazione cambia drasticamente alla fine della produzione di  $CH_4$  (Fig. 56): la percentuale di acetotrofi incrementa anche fino al 20%, ma solo per le prove in bioaugmentation ARF+F210 e solo con ARF. Le prove effettuate in bioaugmentation unicamente con ARF, continuano ad avere una frazione di *Archaea* acetotrofi al di sotto del 5% e sempre composta soltanto da *Methanosaeta* sp. Di contro cambiamenti si registrano anche nella composizione della *guild* degli acetotrofi in cui è presente F210: in tutti i casi circa la metà di essa risulta composta da acetotrofi generalisti *Methanosarcina* sp. (Fig. 56) (Smith & Ingram-Smith, 2007; Liu et al., 2008) che sono in grado di utilizzare più tipologie di substrati e non solo acetato, e di modificare il metabolismo verso un *pathway* idrogenotrofo. La presenza di *Methanosarcina* è stata rilevata anche con Illumina ma dal T29 in poi, in concomitanza con la fase di massima produzione di  $CH_4$  mentre al T14 l'Illumina rileva ancora la predominanza di *Methanosaeta*. Questi risultati concordano con quanto riportato da

Demirel & Scherer (2008) che sottolineano la predominanza dei metanogeni filamentosi *Methanosaeta* a basse concentrazioni di acetato mentre l'aumentare delle sue concentrazioni avvantaggia i *Methanosarcina*. Le curve cumulative di produzione di CH<sub>4</sub> associate alle curve di concentrazione degli acidi mettono in luce come l'avvio della maggiore produzione di CH<sub>4</sub> coincida con il decremento della concentrazione principalmente di acido acetico (Fig. 45 a e c).

Di contro per le condizioni in cui non è presente F210 l'acido acetico viene rilevato fino a fine esperimento e dunque non viene consumato; coerentemente infatti aggiungendo solo *Neocallimastix* sp la produzione di CH<sub>4</sub> rimane intorno ai 600 ml/l mentre per le altre due condizioni, aggiungendo unicamente *Orpinomyces* sp o la Mix dei due ceppi di ARF, i valori non raggiungono i 300 ml di CH<sub>4</sub> (Fig. 45 b). Poiché i *Methanosaeta* hanno un'affinità nell'ordine delle µM mentre l'affinità dei *Methanosarcina* è di mM la predominanza dei *Methanosaeta* sp e l'assenza dei *Methanosarcina* sp è quindi in accordo con le concentrazioni di acido acetico rilevate, e con i dati ampiamente riportati in letteratura (Conklin et al., 2006; Klocke et al., 2008; Demirel et al., 2008; Toumi et al., 2015).

## 5. CONCLUSIONI

Sebbene la Digestione Anaerobica sia tra i più promettenti processi per la valorizzazione energetica delle biomasse di scarto, è vero anche che la stabilità operativa e l'efficienza del processo devono essere ancora migliorate. D'altra parte lo stato attuale delle conoscenze impone di andare oltre agli aspetti ingegneristici, già ampiamente sviluppati, indirizzando il processo mediante nuove conoscenze relative all'ecologia delle complesse comunità microbiche coinvolte, vero motore del processo.

Con le ricerche svolte nel corso del presente dottorato sono state studiate le interazioni che si realizzano tra le differenti componenti microbiche che, operando in sequenza, realizzano la DA. Le ricerche sono state focalizzate principalmente sull'iniziale fase di idrolisi e su quella finale di metanogenesi, entrambe individuate come critiche per l'efficienza del processo. Come substrato è stata utilizzata paglia di grano, una tipologia di biomassa particolarmente resistente alla degradazione, e gli inoculi per la metanogenesi sono stati ottenuti da un impianto pilota alimentato a scarti caseari.

In particolare:

la **I sperimentazione** ha consentito di dimostrare l'importanza dell'organizzazione spaziale e strutturale della comunità metanogena. Infatti:

- la condizione sperimentale avviata con la comunità metanogena aggregata **A**, ha fornito produzioni maggiori di CH<sub>4</sub> (42%) rispetto a quella avviata con comunità disaggregata **D**;
- la tecnica molecolare FISH ha consentito di rilevare per **A** una disposizione spaziale organizzata della comunità, in cui gli *Archaea* metanogeni occupano la parte centrale degli aggregati per essere poi circondati dai *Bacteria*, secondo una disposizione che favorisce i passaggi metabolici su cui si fonda la DA;
- la caratterizzazione dei profili delle comunità microbiche mediante il sequenziamento Illumina ha evidenziato importanti differenze nella composizione tassonomica qualitativa sia tra gli inoculi **A** e **D** che tra le comunità campionate nelle fasi di maggiore produzione di CH<sub>4</sub> e al termine di queste. I valori della diversità sono stati determinati mediante gli indici di Shannon e Evenness;
- sia Illumina che FISH hanno evidenziato come solo l'inoculo **A** fosse costituito da una frazione preponderante di *Firmicutes*, microorganismi funzionalmente riconosciuti come idrolitici fermentanti e come durante la DA la composizione delle comunità di entrambe le condizioni sperimentali si sia diversifica da quelle iniziali;
- anche per quanto concerne la *guild* dei metanogeni, indagini condotte con Illumina e con

FISH hanno consentito di rilevare variazioni quali-quantitative nel corso della DA: la loro frazione nella comunità aumenta mentre a livello inter-guild si rileva un diverso adattamento alle diverse condizioni sperimentali. Infatti nelle prove AP sono stati identificati solo specialisti nell'uso dell'acetato (*Methanosaeta* sp) mentre nelle prove DP sono stati rilevati anche i generalisti (*Metanosarcina* sp). Gli idrogenotrofi rilevati con Illumina non hanno fornito segnali positivi con la tecnica FISH.

Con la **II Sperimentazione** è stata verificata l'efficacia, in termini di produzione di CH<sub>4</sub>, della *bioaugmentation* della comunità microbica mediante Funghi Anaerobi Ruminali (ARF), noti per essere altamente idrolitici, e un pool microbico acidogeno (F210), selezionato dai sedimenti di un ecosistema marino costiero. I risultati ottenuti hanno consentito sia di verificare che la *bioaugmentation* della comunità migliora le produzioni di CH<sub>4</sub>, che di definire la corretta collocazione funzionale degli ARF nell'ambito della catena trofica della DA. Infatti:

- la *bioaugmentation* con **ARF** si è dimostrata efficace per migliorare le produzioni di CH<sub>4</sub> purché supportata dalla *bioaugmentation* con **F210** per potenziare la successiva fase di acidogenesi. In tal modo si evita che il “collo di bottiglia” del processo, generalmente corrispondente all'idrolisi, possa essere trasferito alle fasi successive;
- in presenza di *bioaugmentation* con solo ARF le produzioni di CH<sub>4</sub> sono deludenti; pertanto ai fini della produzione di CH<sub>4</sub>, risulta contraddetta l'efficacia di una interazione diretta tra ARF e metanogeni, convenzionalmente riportata in letteratura; anche il consumo di acetato, risultato costituire la maggior parte degli intermedi di processo, se posto in relazione alle produzioni cumulative di CH<sub>4</sub>, supporta questa evidenza. I risultati sottolineano come nella comunità microbica un corretto equilibrio tra le componenti funzionali sia indispensabile per l'efficienza del processo;
- la modalità *batch* con cui sono stati condotti gli esperimenti ha offerto il vantaggio di poter rilevare l'avvicendamento di gruppi tassonomici (tecnica Illumina) durante il processo di DA, riconducendo gli *shift* nella composizione di comunità a delle vere e proprie successioni ecologiche all'interno dei reattori. L'avvicinarsi dei gruppi tassonomici identificati nella migliore condizione sperimentale Mix ARF+F210 risulta funzionalmente coerente con le principali fasi metaboliche del processo di DA: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi metanogenesi;
- nel corso della DA la *guild* di metanogeni acetotrofi si modifica in termini quantitativi e qualitativi, passando dalla dominanza degli specialisti *Methanosaeta*, nella fase iniziale, ad

una loro decrescita all'aumentare della concentrazione di acetato ed alla predominanza degli acetotrofi generalisti *Methanosarcina* nella fase di massima produzione di CH<sub>4</sub>;

- l'uso complementare delle tecniche molecolari Illumina e FISH si è rivelato uno strumento di indagine particolarmente efficace per lo studio delle dinamiche delle comunità microbiche nel corso della DA. Inoltre i risultati ottenuti mediante Illumina indicano quali sonde FISH applicare per monitorare, nel corso del processo, i parametri microbiologici chiave.

Dai risultati scaturiti dalle ricerche fin qui condotte si ritiene che gli studi di ecologia microbica siano alla base del miglioramento tecnologico del processo di DA e che studi interdisciplinari siano indispensabili per compiere il difficile passaggio di scala che porta ad integrare le conoscenze sulle comunità microbiche con la risultante delle loro attività metaboliche, misurate in decine di m<sup>3</sup> di biogas.

## Bibliografia

1. Abendroth, C., Vilanova, C., Günther, T., Luschig, O., & Porcar, M. (2015). *Eubacteria and archaea communities in seven mesophile anaerobic digester plants in Germany*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 87.
2. Adekunle, K. F., & Okolie, J. A. (2015). *A review of biochemical process of anaerobic digestion*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(03), 205.
3. Akin, D. E., & Borneman, W. S. (1990). *Role of rumen fungi in fiber degradation*. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 3023-3032.
4. Akin, D. E., & Rigsby, L. L. (1987). *Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(9).
5. Ali Shah, F., Mahmood, Q., Maroof Shah, M., Pervez, A., & Ahmad Asad, S. (2014). *Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis*. *The Scientific World Journal*, 2014.
6. Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1919-1925.
7. Amann, R. I. (1995). *In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes*. In *Molecular Microbial Ecology Manual* (pp. 331-345). Springer Netherlands.
8. Amann, R., & Ludwig, W. (2000). *Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 555-565.
9. Andrews & Harris. (1986). *r - and K-selection and Microbial ecology*. *Advances in Microbial Ecology*, 9: 99-114.
10. APHA, (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21th ed.* Washington, DC: American Public Health Association.
11. Ariesyady, H. D., Ito, T., & Okabe, S. (2007). *Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester*. *Water Research*, 41(7), 1554-1568.
12. Auguet, J. C., Barberan, A., & Casamayor, E. O. (2010). *Global ecological patterns in uncultured Archaea*. *The ISME Journal*, 4(2), 182-190.
13. Barra Caracciolo, A., Grenni, P., Cupo, C., & Rossetti, S. (2005). *In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads*. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 55-58.

14. Bassani, I., Kougiyas, P. G., Treu, L., & Angelidaki, I. (2015). *Biogas upgrading via hydrogenotrophic methanogenesis in two-stage continuous stirred tank reactors at mesophilic and thermophilic conditions*. *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12585-12593.
15. Bauchop, T. (1979). *Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(1), 148-158.
16. Bayer, E. A., Kenig, R., & Lamed, R. (1983). *Adherence of Clostridium thermocellum to cellulose*. *Journal of Bacteriology*, 156(2), 818-827.
17. Beccari M., & Rolle E. (2012). *"Energia da biomasse. Il ruolo crescente della digestione anaerobica"*.
18. Bernalier, A., Fonty, G., Bonnemoy, F., & Gouet, P. (1992). *Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria*. *Current Microbiology*, 25(3), 143-148.
19. Blagodatskaya, E. V., Ermolaev, A. M., & Myakshina, T. N. (2004). *Ecological strategies of soil microbial communities under plants of meadow ecosystems*. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 31(6), 620-627.
20. Blagodatskaya, E., & Kuzyakov, Y. (2013). *Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches*. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 192-211.
21. Bortoluzzi, G., Gattia, M., Sognia, A., & Consonnia, S. (2014). *Biomethane production from agricultural resources in the Italian scenario: techno-economic analysis of water wash*. *Chemical Engineering*, 37, 259-264.
22. Bouvier, T., & Del Giorgio, P. A. (2003). *Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports*. *FEMS Microbiology Ecology*, 44(1), 3-15.
23. Brookman, J. L., Mennim, G., Trinci, A. P. J., Theodorou, M. K., & Tuckwell, D. S. (2000a). *Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA*. *Microbiology*, 146(2), 393-403.
24. Brookman, J. L., Ozkose, E., Rogers, S., Trinci, A. P., & Theodorou, M. K. (2000b). *Identification of spores in the polycentric anaerobic gut fungi which enhance their ability to survive*. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 261-267.
25. Cabezas, A., de Araujo, J. C., Callejas, C., Galès, A., Hamelin, J., Marone, A., & Etchebehere, C. (2015). *How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?* *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*, 14(4), 555-593.
26. Cai, M., Liu, J., & Wei, Y. (2004). *Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment*. *Environmental Science & Technology*, 38(11), 3195-3202.
27. Casalot, L., & Rousset, M. (2001). *Maturation of the [NiFe] hydrogenases*. *Trends in Microbiology*, 9(5), 228-237.

28. Čater, M., Fanelj, L., & Logar, R. M. (2013). *Microbial community analyses in biogas reactors by molecular methods*. Acta Chimica Slovenica, 60(2), 243-255.
29. Chapleur, O., Bize, A., Serain, T., Mazéas, L., & Bouchez, T. (2014). *Co-inoculating ruminal content neither provides active hydrolytic microbes nor improves methanization of 13C-cellulose in batch digesters*. FEMS Microbiology Ecology, 87(3), 616-629.
30. Chen, S., & Dong, X. (2005). *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(6), 2257-2261.
31. Conklin, A., Stensel, H. D., & Ferguson, J. (2006). *Growth kinetics and competition between Methanosarcina and Methanosaeta in mesophilic anaerobic digestion*. Water Environment Research, 78 (5):486-496.
32. Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). *The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set*. Systematic and Applied Microbiology, 22(3), 434-444.
33. Daims, H., Stoecker, K., & Wagner, M. (2005). *Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes*. Molecular Microbial Ecology, 213, 239.
34. Deublein, D. & Steinhauser, A. (2008). *Biogas from Waste and renewable Resources: An Introduction*. Wiley-VCH, Weinheim, 89-290.
35. De Bok, F. A. M., Plugge, C. M., & Stams, A. J. M. (2004). *Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia*. Water Research, 38(6), 1368-1375.
36. De Poli, F., Fiocchetti, F., Izzo, G., Marone A., Massini G., Mentuccia L., Patriarca C., Rosa S., Signorini A., Varrone C. (2011). Valorizzazione bioenergetica degli scarti agro zootecnici. Ricerca di Sistema Elettrico ENEA, Rapporto tecnico RdS/2011/268; Accordo di Programma MSE/ENEA.
37. De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2012). *Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation*. Bioresource Technology, 112, 1-9
38. De Vrieze, J., Raport, L., Roume, H., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D. H., & Boon, N. (2016). *The full-scale anaerobic digestion microbiome is represented by specific marker populations*. Water Research, 104, 101-110.
39. Demirel, B., & Yenigün, O. (2002). *Two phase anaerobic digestion processes: a review*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77(7), 743-755.
40. Demirel, B., & Yenigün, O. (2006). *Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor*. Bioresource Technology, 97(10), 1201-1208.
41. Demirel, B., & Scherer, P. (2008). *The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review*. Reviews in Environmental Science and BioTechnology, 7(2), 173-190.

42. Dey, A., Sehgal, J. P., Puniya, A. K., & Singh, K. (2004). *Influence of an anaerobic fungal culture (Orpinomyces sp.) administration on growth rate, ruminal fermentation and nutrient digestion in calves*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 17(6), 820-824.
43. Di Bonito R., Marone A., Massini G., Patriarca C., Rosa S., & Signorini A. (2011). *Characterization of the bacterial community during biohydrogen production in an anaerobic reactor using marine sediment as inoculums*. Conference paper: 1st International Conference On Biogas Microbiology, Leipzig, Energy, Sustainability and Society (Springer Open Journal)
44. Dollhofer, V., Podmirseg, S. M., Callaghan, T. M., Griffith, G. W., & Fliegerová, K. (2015). *Anaerobic Fungi and Their Potential for Biogas Production*. In Biogas Science and Technology (pp. 41-61). Springer International Publishing.
45. Elefsiniotis P. & Oldham W.K. (1994). *Effect of HRT on acidogenic digestion of primary sludge*. Environmental Engineering 120:645–660.
46. EUROPEAN COMMISSION - Directive of the European Parliament and of the Council on the “Promotion Of The Use Of Energy From Renewable Sources” Brussels, 30.11.2016 COM(2016) 767 final 2016/0382 (COD).
47. Fang, H. H., & Yu, H. Q. (2000). *Effect of HRT on mesophilic acidogenesis of dairy wastewater*. Journal of Environmental Engineering, 126(12), 1145-1148.
48. Felchner-Zwirello, M., Winter, J., & Gallert, C. (2013). *Interspecies distances between propionic acid degraders and methanogens in syntrophic consortia for optimal hydrogen transfer*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(20), 9193-9205.
49. Fisgativa, H., Tremier, A., & Dabert, P. (2016). *Characterizing the variability of food waste quality: a need for efficient valorisation through anaerobic digestion*. Waste Management, 50, 264-274.
50. Fontes, C. M., & Gilbert, H. J. (2010). *Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates*. Annual Review of Biochemistry, 79, 655-681.
51. Fotidis, I. A., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2013). *Bioaugmentation with an acetate-oxidising consortium as a tool to tackle ammonia inhibition of anaerobic digestion*. Bioresource Technology, 146, 57-62.
52. France, J., Dhanoa, M. S., Theodorou, M. K., Lister, S. J., Davies, D. R., & Isac, D. (1993). *A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds*. Journal of Theoretical Biology, 163(1), 99-111.
53. Franklin, R. B., Campbell, A. H., Higgins, C. B., Barker, M. K., & Brown, B. L. (2011). *Enumerating bacterial cells on bioadhesive coated slides*. Journal of Microbiological Methods, 87(2), 154-160.
54. Frigon J.,C. & Guiot S.,R. (2010). *Biomethane production from starch and lignocellulosic crops: a comparative review*. Biofuels, Bioproduction, Biorefinery, 4: 447-458.

55. Gagliano, M. C., Braguglia, C. M., Gallipoli, A., Gianico, A., & Rossetti, S. (2015). *Microbial diversity in innovative mesophilic/thermophilic temperature-phased anaerobic digestion of sludge*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7339-7348.
56. Garcia, J. L., Patel, B. K., & Ollivier, B. (2000). *Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea*. *Anaerobe*, 6(4), 205-226.
57. Ghosh, S., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2016). *Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4283-4295.
58. Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L., & Field, K. G. (1990). *Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton*. *Nature*, 345(6270), 60.
59. Goberna M., Gadermaier M., Garcia C., Wett B., & Insam H. (2010). *Adaptation of methanogenic communities to the cofermentation of cattle excreta and olive mill wastes at 37°C and 55°C*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19):6564-6571.
60. Gonzalez-Martinez, A., Garcia-Ruiz, M. J., Rodriguez-Sanchez, A., Osorio, F., & Gonzalez-Lopez, J. (2016). *Archaeal and bacterial community dynamics and bioprocess performance of a bench-scale two-stage anaerobic digester*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-21.
61. Ghosh, S., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2016). *Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4283-4295.
62. Gruninger, R.J., Puniya, A.K., Callaghan, T.M., Edwards, J.E., Youssef, N., Dagar, S.S., & McAllister, T. (2014). *Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential*. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 1-17.
63. Hadrys, H., Balick, M., & Schierwater, B. (1992). *Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology*. *Molecular Ecology*, 1(1), 55-63.
64. Haitjema, C. H., Solomon, K. V., Henske, J. K., Theodorou, M. K., & O'Malley, M. A. (2014). *Anaerobic gut fungi: Advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production*. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(8), 1471-1482.
65. Hallenbeck P.C. (2005). *Fundamentals of the fermentative production of hydrogen*. *Water Sci. Technol* 52:21–29.
66. Hao, L.P., Lü, F., He, P.J., Li, L., & Shao, L. M. (2010). *Predominant contribution of syntrophic acetate oxidation to thermophilic methane formation at high acetate concentrations*. *Environmental Science & technology*, 45(2), 508-513.
67. Hedderich, R., & Whitman, W. B. (2013). *Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea*. In *The Prokaryotes* (pp. 635-662). Springer Berlin Heidelberg.
68. Henry, M. P., Sajjad, A., & Ghosh, S. (1987). *The effects of environmental factors on acid-phase digestion of sewage sludge* (No. CONF-8705302-2). Institute of Gas Technology, Chicago, (USA).

69. Ho, Y. W., & Barr, D. J. S. (1995). *Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia*. Mycologia, 655-677.
70. Ho, Y. W., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (1988). *Colonization of guinea grass by anaerobic rumen fungi in swamp buffalo and cattle*. Animal Feed Science and Technology, 22(1), 161-171.
71. Hung, C. H., Chang, Y. T., & Chang, Y. J. (2011). *Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems—a review*. Bioresource Technology, 102(18), 8437-8444.
72. Ishii, S. I., Kosaka, T., Hotta, Y., & Watanabe, K. (2006). *Simulating the contribution of coaggregation to interspecies hydrogen fluxes in syntrophic methanogenic consortia*. Applied and Environmental Microbiology, 72(7), 5093-5096.
73. Ito, T., Yoshiguchi, K., Ariesyady, H. D., & Okabe, S. (2011). *Identification of a novel acetate-utilizing bacterium belonging to Synergistes group 4 in anaerobic digester sludge*. The ISME Journal, 5(12), 1844-1856.
74. Izzo, G., & Hull, V. (1991). *The anoxic crises in dystrophic processes of coastal lagoons: an energetic explanation*. EcologicalPhysicalChemistry. Elsevier, Amsterdam, 559-572.
75. Izzo, G., Rosa, S., Massini, G., Patriarca, C., Fenice, M., Fiocchetti, F., Marone, A., Varrone, C., & Signorini, A. (2014). *From Hypertrophic Lagoons to Bioenergy Production*. Journal of Environmental Protection and Ecology 15(2):537.
76. Jang, H. M., Kim, J. H., Ha, J. H., & Park, J. M. (2014). *Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high-strength food wastewater*. Bioresource Technology, 165, 174-182.
77. Jeris J.S., & McCarty P.L. (1965). *The biochemistry of methane fermentation using <sup>14</sup>C tracers*. J. Water Pollution Contr. Fed. 37:178-192.
78. Jiang, D., Zhuang, D., Fu, J., Huang, Y., & Wen, K. (2012). *Bioenergy potential from crop residues in China: Availability and distribution*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16(3), 1377-1382.
79. Jin, W., Cheng, Y. F., Mao, S. Y., & Zhu, W. Y. (2011). *Isolation of natural cultures of anaerobic fungi and indigenously associated methanogens from herbivores and their bioconversion of lignocellulosic materials to methane*. Bioresource Technology, 102(17), 7925-7931.
80. Joblin, K. N., Matsui, H., Naylor, G. E., & Ushida, K. (2002). *Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of Fibrobacter succinogenes*. Current Microbiology, 45(1), 46-53.
81. Kalia, V. C., Jain, S. R., Kumar, A., & Joshi, A. P. (1994). *Fermentation of biowaste to H<sub>2</sub> by Bacillus licheniformis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10(2), 224-227.

82. Kato, S., & Watanabe, K. (2010). *Ecological and evolutionary interactions in syntrophic methanogenic consortia*. *Microbes and Environments*, 25(3), 145-151.
83. Khanal, S. K., Chen, W. H., Li, L., & Sung, S. (2004). *Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(11), 1123-1131.
84. Khanal SK, (2008). *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications*. Jhon Wiley & Sons Inc., Ames, Iowa.
85. Khemkhao, M., Nuntakumjorn, B., Techkarnjanaruk, S., & Phalakornkule, C. (2011). *Effect of chitosan on UASB treating POME during a transition from mesophilic to thermophilic conditions*. *Bioresource Technology*, 102(7), 4674-4681.
86. Kittelmann, S., Naylor, G. E., Koolaard, J. P., & Janssen, P. H. (2012). *A proposed taxonomy of anaerobic fungi (class Neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis*. *PLoS One*, 7(5), e36866.
87. Koch, C., Müller, S., Harms, H., & Harnisch, F. (2014). *Microbiomes in bioenergy production: from analysis to management*. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 65-72.
88. Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. 624 2013. *Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and 625 next-generation sequencing-based diversity studies*. *Nucleic Acids Res*, 41, e1-e1.
89. Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Souidi, K., Mumme, J., & Linke, B. (2008). *Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(3), 190-205.
90. Kothari, R., Tyagi, V. V., & Pathak, A. (2010). *Waste-to-energy: A way from renewable energy sources to sustainable development*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), 3164-3170.
91. Kraemer, J. T., & Bagley, D. M. (2006). *Supersaturation of dissolved H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> during fermentative hydrogen production with N<sub>2</sub> sparging*. *Biotechnology Letters*, 28(18), 1485-1491.
92. Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R. I., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T., & McSweeney, C. S. (2003). *Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics*. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(5), 663-693.
93. Krause, D. O., Nagaraja, T. G., Wright, A. D. G., & Callaway, T. R. (2013). *Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology*. *Journal of Animal Science*, 91(1), 331-341.
94. Kumar, S., Indugu, N., Vecchiarelli, B., & Pitta, D. W. (2015). *Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 781.

95. Lane, N., Martin, W. F., Raven, J. A., & Allen, J. F. (2013). *Genes and evolution: introduction to an evolutionary sintesys*. Philosophical Transaction of the Royal Society B: Biological Science 368, 1662.
96. Lazuka, A., Auer, L., Bozonnet, S., Morgavi, D. P., O'Donohue, M., & Hernandez-Raquet, G. (2015). *Efficient anaerobic transformation of raw wheat straw by a robust cow rumen-derived microbial consortium*. Bioresource Technology, 196, 241-249.
97. Lee, Y. J., Miyahara, T., & Noike, T. (2001). *Effect of iron concentration on hydrogen fermentation*. Bioresource Technology, 80(3), 227-231.
98. Lee, S. M., Guan, L. L., Eun, J. S., Kim, C. H., Lee, S. J., Kim, E. T., & Lee, S. S. (2015). *The effect of anaerobic fungal inoculation on the fermentation characteristics of rice straw silages*. Journal of Applied Microbiology, 118(3), 565-573.
99. Leis, S., Dresch, P., Peintner, U., Fliegerová, K., Sandbichler, A. M., Insam, H., & Podmirseg, S. M. (2014). *Finding a robust strain for biomethanation: anaerobic fungi (Neocallimastigomycota) from the Alpine ibex (Capra ibex) and their associated methanogens*. Anaerobe, 29, 34-43.
100. Levin, D. B., Carere, C. R., Cicek, N., & Sparling, R. (2009). *Challenges for biohydrogen production via direct lignocellulose fermentation*. International Journal of Hydrogen Energy, 34(17), 7390-7403.
101. Lembo G., Massini G., Mazzurco Miritana V., Fenice M., Felici C., Liberatore R., Signorini A. *Anaerobic digestion of ricotta cheese whey: effect of phase separation on methane production and microbial community structure*. EUBCE 2016 - 24th European Biomass Conference & Exhibition 6-9 June – Amsterdam (Oral presentation). Codice presentazione 2DO.1.4, proceedings book pag. 599-607 ISBN 978-88-89407-165.
102. Li, J., Heath, I. B., & Bauchop, T. (1990). *Piromyces mae and Piromyces dumbonica, two new species of uniflagellate anaerobic chytridiomycete fungi from the hindgut of the horse and elephant*. Canadian Journal of Botany, 68(5), 1021-1033.
103. Li, Y. F., Ren, N. Q., Chen, Y., & Zheng, G. X. (2007). *Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria*. International Journal of Hydrogen Energy, 32(6), 755-760.
104. Li K., Zhu H., Zhang Y., & Zhang H. (2017). *Characterization of the microbial communities in Rumen fluid inoculated reactors for the biogas digestion of wheat straw*. Sustainability, 9 (2), 243.
105. Liebetanz, E. (1910). *Die parasitischen Protozoen des Wiederkauermagen*. Arch Protistenkunde 19: 19.
106. Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology, 63(11), 4516-4522.
107. Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). *Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1125(1), 171-189.

108. Logan, B. E., Oh, S. E., Kim, I. S., & Van Ginkel, S. (2002). *Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers*. Environmental Science & Technology, 36(11), 2530-2535.
109. Lowe, S. E., Griffith, G. G., Milne, A., Theodorou, M. K., & Trinci, A. P. (1987). *The life cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus*. Microbiology, 133(7), 1815-1827.
110. Loy, A., Horn, M. & Wagner, M. (2002). *probeBase: an online resource for rRNA-target oligonucleotide probes*. Nucleic Acids Research, 31(1), 514-516.
111. Lwin, K. O., Kondo, M., Bantokuda, T., Lapitan, R. M., Del Barrio, A. N., Fujihara, T., & Matsui, H. (2012). *Ruminal fermentation and microbial ecology of buffaloes and cattle fed the same diet*. Animal Science Journal, 83(12), 767-776.
112. MacLeod, F. A., Guiot, S. R., & Costerton, J. W. (1990). *Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor*. Applied and Environmental Microbiology, 56(6), 1598-1607.
113. McKendry P. (2013). *Energy production from biomass (Part I): overview of biomass*. Bioresource Technology, 130: 418-423.
114. Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Sthal D.A. (2016). Brock: *Biologia dei microrganismi*. Pearson.
115. Mardis E.R. (2008). *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 9:387-402, 2008.
116. Marone, A., Massini, G., Patriarca, C., Signorini, A., Varrone, C., & Izzo, G. (2012). *Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities*. International Journal of Hydrogen Energy, 37(7), 5612-5622.
117. Massini G., Dottorini G., Felici C., Gaetani A., Lembo G., Liberatore R., Mazzurco Miritana V., Mehariya S., Signorini A. (2015). *Sviluppo di processi di digestione anaerobica di matrici non convenzionali*. Ricerca di Sistema Elettrico ENEA, Rapporto tecnico RdS/PAR2014/145; Accordo di Programma MSE/ENEA.
118. Mayo, B., TCC Rachid, C., Alegría, Á., MO Leite, A., S Peixoto, R., & Delgado, S. (2014). *Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology*. Current Genomics, 15(4), 293-309.
119. McInerney, M. J., Struchtemeyer, C. G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A. J., Schink, B., & Gunsalus, R. P. (2008). *Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1125(1), 58-72.
120. Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1973). *Formation of hydrogen and formate by Ruminococcus albus*. Journal of Bacteriology, 116(2), 836-846.
121. Mladenovska Z. & Ahring, B.K. (2000). *Growth kinetics of thermophilic Methanosarcina spp. isolated from full-scale biogas plants treating animal*

- manures*. FEMS Microbiology Ecology 31:225-229.
122. Moriarty P. & Honnery D. 2012 *What is the global potential for renewable energy?* Renewable and Sustainable Energy Reviews 16, 244–252.
  123. Moter A, & Gobel UB, (2000). *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of Microorganisms*, Journal of Microbiological Methods, 41: 85–112.
  124. Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology, 59(3), 695-700.
  125. Muyzer, G. (1999). *DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems*. Current Opinion in Microbiology, 2(3), 317-322.
  126. Nagpal, R., Puniya, A. K., Sehgal, J. P., & Singh, K. (2010). *Influence of bacteria and protozoa from the rumen of buffalo on in-vitro activities of anaerobic fungus Caecomyces sp. isolated from the feces of elephant*. Journal of Yeast and Fungal Research, 1(8), 152-156.
  127. Nakashimada, Y., Srinivasan, K., Murakami, M., & Nishio, N. (2000). *Direct conversion of cellulose to methane by anaerobic fungus Neocallimastix frontalis and defined methanogens*. Biotechnology Letters, 22(3), 223-227.
  128. N.M.C & Hung Y.T. (2015). *Energy recovery through biohydrogen production for sustainable anaerobic waste treatment: An overview*. International Journal of Environment and Waste Management, 15, (2) , 148-172.
  129. Nath K, & Das D. (2004). *Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches*. Appl Microbiol Biotechnol 65:520–529
  130. Nelson, M. C., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). *A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters*. Bioresource Technology, 102(4), 3730-3739.
  131. Nesbo, C.L., Dlutek, M., Zhaxybayeva, O., & Doolittle, W.F. (2006). *Evidence for existence of "mesotogas" members of the order Thermotogales adapted to low-temperature environments*. Applied Environmental Microbiology, 107 (4), 5061-5068.
  132. Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., & Klocke, M. (2010). *Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants*. Applied and Environmental Microbiology, 76(8), 2540-2548.
  133. Nkemka, V. N., Gilroyed, B., Yanke, J., Gruninger, R., Vedres, D., McAllister, T., & Hao, X. (2015). *Bioaugmentation with an anaerobic fungus in a two-stage process for biohydrogen and biogas production using corn silage and cattail*. Bioresource Technology, 185, 79-88.
  134. Odum, E. P., & Barrett, G. W., (2007). *Fondamenti di ecologia*. 3° Ediz. Italiana. Piccin Nuova Libreria S.p.A
  135. O'Fallon, J. V., Wright, R. W., & Calza, R. E. (1991). *Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus Neocallimastix frontalis EB188*. Biochemical Journal, 274(2), 595-599.

136. O'Flaherty V., Collins G., & Mahony T. (2006). *The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment*. Environmental Science and BioTechnology 5:39–55.
137. Orpin, C., G. (1975). *Studies on the rumen flagellate Neocallimastix frontalis*. Microbiology, 91(2), 249-262.
138. Orpin, C., G. (1977). *The occurrence of chitin in the cell walls of the rumen organisms Neocallimastix frontalis, Piromonas communis and Sphaeromonas communis*. Journal of General Microbiology, 99(1), 215-218.
139. Orpin, C. G., & Greenwood, Y. (1986). *Nutritional and germination requirements of the rumen chytridiomycete Neocallimastix patriciarum*. Transactions of the British Mycological Society, 86(1), 103-109.
140. Orpin, C. G., & Joblin, K. N. (1997). *The rumen anaerobic fungi*. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 140-195). Springer Netherlands.
141. Ozkose, E., Thomas, B. J., Davies, D. R., Griffith, G. W., & Theodorou, M. K. (2001). *Cyllamycesaberensis gen. nov. sp. nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiothecae isolated from cattle*. Canadian Journal of Botany, 79(6), 666-673.
142. Pan, C. M., Fan, Y. T., Xing, Y., Hou, H. W., & Zhang, M. L. (2008). *Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by Clostridium sp. Fanp2*. Bioresource Technology, 99(8), 3146-3154.
143. Parawira, W., Read, J. S., Mattiasson, B., & Björnsson, L. (2008). *Energy production from agricultural residues: high methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion*. Biomass and Bioenergy, 32(1), 44-50.
144. Paritosh, K., Kushwaha, S. K., Yadav, M., Pareek, N., Chawade, A., & Vivekanand, V. (2017). *Food Waste to Energy: An Overview of Sustainable Approaches for Food Waste Management and Nutrient Recycling*. BioMed Research International, 2017.
145. Patriarca C., De Luca E., Felici, C., Lona L., Mazzurco Miritana V., & Massini G. (2016). *Bio-production of Hydrogen and Methane Through Anaerobic Digestion Stages* (pp. 91-109) in De Falco Marcello, Basile Angelo (eds.), Enriched Methane, Springer International Publishing, Switzerland.
146. Perlack R.,D, Wright L.,L, Graham R.,L, Stokes B.,J & Erbach DC, (2005). *Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-to annual supply*. US DOE and USDA, USA.
147. Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2002). *Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 68(6), 3094-3101.
148. Pielou E., (1975). *Ecological Diversity*. John Wiley, New York. N.Y. 165.

149. Pinto, A. J., & Raskin, L. (2012). *PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets*. PloS one, 7(8), 43093.
150. Pohland, F. G., & Ghosh, S. (1971). *Developments in anaerobic stabilization of organic wastes-the two-phase concept*. Environmental Letters, 1(4), 255-266.
151. Pol, L. H., de Castro Lopes, S. I., Lettinga, G., & Lens, P. N. L. (2004). *Anaerobic sludge granulation*. Water Research, 38(6), 1376-1389.
152. Porter, K. G., & Feig, Y. S. (1980). *The use of DAPI for identification and counting aquatic microflora*. Limnol. Oceanogr, 25, 943-948.
153. Post, D., M. (2002). *The long and short of food-chain length*. Trends in Ecology & Evolution, 17(6), 269-277.
154. Procházka, J., Mrázek, J., Štrosová, L., Fliegerová, K., Záborská, J., & Dohányos, M. (2012). *Enhanced biogas yield from energy crops with rumen anaerobic fungi*. Engineering in Life Sciences, 12(3), 343-351.
155. Putman R.J., & Wratten S.D. Principles of ecology (1984). university of California Press. Berkeley and Los Angeles California.
156. Qu, X., Vavilin, V. A., Mazéas, L., Lemunier, M., Duquennoi, C., He, P. J., & Bouchez, T. (2009). *Anaerobic biodegradation of cellulosic material: Batch experiments and modelling based on isotopic data and focusing on acetoclastic and non-acetoclastic methanogenesis*. Waste Management, 29(6), 1828-1837.
157. Raskin, L., Poulsen, L. K., Noguera, D. R., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1994). *Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization*. Applied and Environmental Microbiology, 60(4), 1241-1248.
158. Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., & Sghir, A. (2009). *Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge*. The ISME Journal, 3(6), 700-714.
159. Robert, C., Chassard, C., Lawson, P. A., & Bernalier-Donadille, A. (2007). *Bacteroides cellulosilyticus sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(7), 1516-1520.
160. Saady, N. M. C. (2013). *Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge*. International Journal of Hydrogen Energy, 38(30), 13172-13191.
161. Sambrook, J., Fritsche, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2NDed Cold Spring Harbor, New York; Cold Harbor Laboratory Press.
162. Sapci Z., Morken J., & Linjordet R., 2013. *An Investigation of the Enhancement of Biogas Yields from Lignocellulosic Material using Two Pretreatment Methods: Microwave Irradiation and Steam Explosion*. BioResources, 8:1976-1985.

163. Sawatdeenarunat, C., Surendra, K. C., Takara, D., Oechsner, H., & Khanal, S. K. (2015). *Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities*. *Bioresource Technology*, 178, 178-186.
164. Schwarz, W. H. (2001). *The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5), 634-649.
165. Sekiguchi, Y., Takahashi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., & Harada, H. (2001). *In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5740-5749.
166. Shannon C., E. (1948). *A mathematical theory of communications*. *Bell System technical Journal*, 27: 379-423, 623-656.
167. Schink, B. (1997). *Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(2), 262-280.
168. Schink, B. (2005). *Syntrophic associations in methanogenic degradation*. pp. 1-19. Springer Berlin Heidelberg.
169. Schlesinger, W. H. (1991). *Biogeochemistry in freshwater wetlands and lakes. Biogeochemistry: An analysis of global change*, Springer the Netherlands. 224-260.
170. Sehgal, J. P., Jit, D., Puniya, A. K., & Singh, K. (2008). *Influence of anaerobic fungal administration on growth, rumen fermentation and nutrient digestion in female buffalo calves*. *J Anim Feed Sci*, 17, 510-518.
171. Shen, L., Zhao, Q., Wu, X., Li, X., Li, Q., & Wang, Y. (2016). *Interspecies electron transfer in syntrophic methanogenic consortia: From cultures to bioreactors*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 1358-1367.
172. Sinha P. & Pandey A. (2011). *An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production*. *Int J Hydrogen Energy* 36:7460–7478.
173. Smith, K. S., & Ingram-Smith, C. (2007). *Methanosaeta, the forgotten methanogen?* *Trends in Microbiology*, 15(4), 150-155.
174. Solomon, K. V., Haitjema, C. H., Henske, J. K., Gilmore, S. P., Borges-Rivera, D., Lipzen, A., & Grigoriev, I. V. (2016). *Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes*. *Science*, 351(6278), 1192-1195.
175. Sousa, F. L., Thiergart, T., Landan, G., Nelson-Sathi, S., Pereira, I. A., Allen, J. F., & Martin, W. F. (2013). *Early bioenergetic evolution*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 368(1622), 20130088.
176. Spanheimer, R., & Müller, V. (2008). *The molecular basis of salt adaptation in Methanosarcina mazei GöI*. *Archives of Microbiology*, 190(3), 271-279.

177. Srinivasan, K., Murakami, M., Nakashimada, Y., & Nishio, N. (2001). *Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, Neocallimastix frontalis, in a repeated batch culture*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 91(2), 153-158.
178. Stahl D. A., & Amann R. (1991). *Development and application of nucleic acid probes*. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow Eds - John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England: 205-248.
179. Staley, B. F., Francis, L., & Barlaz, M. A. (2011). *Effect of spatial differences in microbial activity, pH, and substrate levels on methanogenesis initiation in refuse*. Applied and Environmental Microbiology, 77(7), 2381-2391.
180. Sundberg, C., Al-Soud, W.A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S.S., Svensson, B.H., Sørensen, S.J. & Karlsson, A. (2013). *454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters*. Fems Microbiology Ecology 85(3), 612-626.
181. Thareja, A., Puniya, A. K., Goel, G., Nagpal, R., Sehgal, J. P., Singh, P. K., & Singh, K. (2006). *In vitro degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants*. Archives of Animal Nutrition, 60(5), 412-417.
182. Thaveesri, J., Daffonchio, D., Liessens, B., Vandermeren, P., & Verstraete, W. (1995). *Granulation and sludge bed stability in upflow anaerobic sludge bed reactors in relation to surface thermodynamics*. Applied and Environmental Microbiology, 61(10), 3681-3686.
183. Theodorou, M. K., Brookman, J., & Trinci, A. P. J. (2005). *Anaerobic fungi*. In *Makkar HPS, McSweeney CS, editors. Methods in gut microbial ecology for ruminants*. Dordrecht: Springer Netherlands. pp. 55–66.
184. Theuerl, S., Kohrs, F., Benndorf, D., Maus, I., Wibberg, D., Schlüter, A., & Pühler, A. (2015). *Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome*. Applied Microbiology and Biotechnology, 99(18), 7791-7803.
185. Toumi, J., Miladi, B., Farhat, A., Nouria, S., Hamdi, M., Gtari, M., & Bouallagui, H. (2015). *Microbial ecology overview during anaerobic codigestion of dairy wastewater and cattle manure and use in agriculture of obtained bio-fertilisers*. Bioresource technology, 198, 141-149.
186. Tsapekos, P., Kougias, P. G., Vasileiou, S. A., Treu, L., Campanaro, S., Lyberatos, G., & Angelidaki, I. (2017). *Bioaugmentation with hydrolytic microbes to improve the anaerobic biodegradability of lignocellulosic agricultural residues*. Bioresource Technology, 234, 350-359.
187. Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Dennis, P. G., Hugenholtz, P., Rabaey, K., & Tyson, G. W. (2014). *Deterministic processes guide long-term synchronised population dynamics in replicate anaerobic digesters*. The ISME Journal, 8(10), 2015-2028.
188. Verstraete, W., Wittebolle, L., Heylen, K., Vanparys, B., De Vos, P., Van de Wiele, T., & Boon, N. (2007). *Microbial resource management: the road to go for environmental biotechnology*. Engineering in Life Sciences, 7(2), 117-126.

189. Wang, J., & Wan, W. (2008a). *Effect of Fe<sup>2+</sup> concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures*. International Journal of Hydrogen Energy, 33(4), 1215-1220.
190. Wang J. & Wan W (2008b). *Effect of Ni<sup>2+</sup> concentration on biohydrogen production*. Bioresource technology 99:8864–8868.
191. Williams, R. J. P., & Da Silva, J. F. (2005). *The chemistry of evolution: the development of our ecosystem*. Elsevier, Nedherlarnds.
192. Wilson E.O., & Bossert W.H. (1974). *Introduzione alla biologia delle popolazioni*. Piccin,Padova.
193. Wilson C.,A, & Wood T.,M. (1992). *The anaerobic fungus Neocallimastix frontalis: isolation and properties of a cellulose type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogenbond-ordered cellulose*. Applied Microbiology and Biotechnology., 37, 125–129.
194. Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., & Kovács, K. L. (2012). *Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing*. Biotechnology for Biofuels, 5(1), 41.
195. Wolin, M. J. (1975). *Interactions between the bacterial species of the rumen*. Digestion and Metabolism in the Ruminant, 134-148.
196. Wood T.M., & Wilson C.A. (1995). *Studies on the capacity of the cellulose of the anaerobic rumen fungus Piromonas communis P to degrade hydrogen bond-ordered cellulose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 43: 572-578.
197. Xu, F., Wang, Z. W., & Li, Y. (2014). *Predicting the methane yield of lignocellulosic biomass in mesophilic solid-state anaerobic digestion based on feedstock characteristics and process parameters*. Bioresource Technology, 173, 168-176.
198. Yue, Z. B., Li, W. W., & Yu, H. Q. (2013). *Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass*. Bioresource Technology, 128, 738-744.
199. Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). *Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production*. Progress in Energy and Combustion Science, 42, 35-53.

## Abbreviazioni ed acronimi

DA = Digestione Anaerobica

ARF = Funghi Anaerobici Ruminali (Anaerobic Ruminal Fungi)

F210 = pool batterico fermentante idrogeno-produttore

FISH = Ibridazione Fluorescente in situ (Fluorescence in situ Hybridization)

M = comunità metanigena

PG = Paglia di Grano

TS = Solidi Totali (Total Solids)

VFA = Acidi Grassi Volatili (Volatile FattyAcids)

VS = Solidi Volatili (Volatile Solids)

WD = Water Displacement

wv = volume di lavoro (working volume)

A= inoculo aggregato

D= inoculo disaggregato

AP= inoculo aggregato con paglia di grano

DP=inoculo disaaggregato con paglia di grano

CSTR=ContinousStirred Tank Reactor

UASB= Upflow Anaerobic SludgeBlanket