



Ricerca di Sistema elettrico

Bioaugmentation della comunità microbica per rafforzare l'idrolisi di substrati lignocellulosici e chitinosi

Massini G., Dottorini G., Gaetani A., Signorini A.,
Lembo G., Mazzurco Miritana V.

BIOAUGMENTATION DELLA COMUNITÀ MICROBICA PER RAFFORZARE L'IDROLISI
DI SUBSTRATI LIGNOCELLULOSICI E CHITINOSI

Massini G. (ENEA), Dottorini G. (La Sapienza), Gaetani A. (La Sapienza), Signorini A (ENEA), Lembo G. (UniTuscia),
Mazzurco Miritana V. (UniTuscia)

Settembre 2016

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2015

Area: Generazione di energia elettrica con basse emissioni di carbonio

Progetto: Bioenergia

Obiettivo: Nuovi processi di co-produzione flessibile e programmabile di elettricità e biometano

Responsabile del Progetto: Vincenzo Gerardi, ENEA

Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE.....	5
2 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI.....	7
2.1 PRODUZIONE DI METANO DA SCARTI CHITINOSI: BIOAUGMENTATION DI COMUNITÀ MICROBICHE ATTIVE NELLA DA	7
2.2 BIOAUGMENTATION NELLA PRODUZIONE DI BIOGAS DA SCARTI LIGNOCELLULOSICI: ANALISI DELLE COMUNITÀ MICROBICHE E DELLE RELAZIONI STRUTTURA-FUNZIONE	25
2.3 RISULTATI OTTENUTI NELLO SCALING UP DELLE SPERIMENTAZIONI DI BIOAUGMENTATION.....	36
2.4 MICROSCOPIA E MICROSCOPIA IN EPIFLUORESCENZA PER IL RILEVAMENTO DEI FUNGHI ANAEROBI RUMINALI.....	37
3 CONCLUSIONI.....	40
4 BIBLIOGRAFIA.....	42
5 ABBREVIAZIONI ED ACRONIMI.....	46

Sommario

Con le attività sperimentali di questa annualità si è inteso approfondire e implementare gli studi svolti nei precedenti anni a scala di banco, in merito al potenziamento della produzione di biogas tramite mediante bioaugmentation delle comunità microbiche. Pertanto sono stati utilizzati substrati recalcitranti alla degradazione biologica, costituiti da biopolimeri complessi, potenziando la fase idrolitica e fermentativa della Digestione Anaerobica con Funghi Anaerobi Ruminali e con il pool batterico F210: sono proseguiti gli studi di Digestione Anaerobica su paglia di grano, quindi di natura lignocellulosica, e anche su gusci di gamberetti, di natura chitinosa, le cui sperimentazione era stata avviata nell'ottica di estendere la DA a nuovi substrati, in questo caso di natura ittica.

Le indagini circa le caratteristiche funzionali delle comunità microbiche metabolicamente attive nella DA, ponendole in relazione alle produzioni di CH₄, sono state condotte mediante la tecnica molecolare *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH). Poiché tale tecnica consente di rilevare e quantificare le componenti microbiche attive nel processo biogeochimico, risulta particolarmente efficace per contribuire ad approfondire quegli aspetti necessari per compiere il difficile passaggio di scala tra l'attività metabolica di organismi microscopici e le quantità, di biogas prodotto.

Si è lavorato alla messa a punto di tecniche di microscopia in epifluorescenza per l'identificazione dei Funghi Anaerobi Ruminali (ARF) nell'ambito di comunità microbiche complesse. Infatti, sebbene questa componente microbica si sia rilevata oggetto di recente interesse per le produzioni di biogas, (possiedono un corredo enzimatico particolarmente efficace che li rende gli attori chiave nel sistema digestivo di vari animali erbivori), ancora non si dispone di una metodologia efficace e speditiva per riconoscere e quantificare tali microorganismi in comunità microbiche miste.

Inoltre sono stati confrontati i risultati ottenuti nelle diverse serie sperimentali svolte nel corso degli anni, per le stesse condizioni di substrato, cioè per paglia di grano, in presenza di bioaugmentation della comunità microbica (ARF+F210), realizzate incrementando la scala dei reattori, 1:10:100.

1 Introduzione

Nonostante i vantaggi offerti dalla valorizzazione energetica delle biomasse di scarto mediante Digestione Anaerobica, l'efficienza del processo negli impianti reali è ancora subottimale, e la produzione di metano potrebbe essere migliorata, sia in termini di quantità che di qualità. Queste limitazioni sono dovute sia alla recalcitranza alla degradazione degli scarti costituiti da biopolimeri complessi sia alle incomplete conoscenze riguardo alla struttura e funzione della comunità microbica, vero motore del processo.

La DA infatti è operata da gruppi di microrganismi che operano in sequenza all'interno di una complessa rete trofica e la stabilità e l'efficienza dell'intero processo si basa sulle interazioni sinergiche tra popolazioni appartenenti ai diversi gruppi funzionali [42. Saady et al., 2013; 54. Zheng et al., 2015]. Peraltro il metano viene prodotto solo nell'ultima fase del processo, ad opera di microrganismi metanigeni, appartenenti al dominio degli *Archaea* mentre gli step precedenti, idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e omoacetogenesi sono svolti da microrganismi del dominio degli *Eubacteria*.

Attualmente la maggior parte degli impianti di DA opera come una "Black Box" e quando vengono adottate delle strategie per il controllo del processo, raramente si tiene conto di aspetti riguardanti la componente microbica. Generalmente ci si limita al controllo del pH e della concentrazione di ammonio [36. O'Flaherty et al., 2006].

Sono dunque necessarie ulteriori ricerche, soprattutto di ecologia microbica, per compiere il difficile passaggio di scala che porta ad integrare le dinamiche delle comunità attive nella DA, che si realizzano su scala microbica (1 μm -1 mm), con la risultante del processo a livello di reattore a scala reale.

Pertanto nel corso della presente annualità si è provveduto a svolgere studi di microbiologia funzionale per porre in relazione le produzioni di biogas con le caratteristiche delle comunità microbiche coinvolte.

Le indagini sono state condotte mediante tecniche di microscopia in epifluorescenza utilizzando in particolare la *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) [3. Amann R., Ludwig W., 2000; 8. Bouvier T., Del Giorgio, 2003; 5. Barra Caracciolo et al., 2005], una tecnica che consente di individuare e quantificare solo le componenti microbiche metabolicamente attive nel processo, quelle che concorrono alle produzioni finali del processo biogeochimico [7. Blagodaskaya et al., 2013], determinando quantità e composizione del biogas.

Gli studi sono stati svolti sottoponendo a DA scarti costituiti dai biopolimeri complessi tra i più diffusi e abbondanti in natura: materiali lignocellulosici, per quel che concerne il mondo vegetale, e i materiali chitinosi, per quel che concerne il dominio dei funghi e degli animali.

In particolare l'uso di substrati chitinosi, in questo caso scarti della lavorazione dei gamberetti, costituisce un aspetto innovativo della ricerca: attualmente molte tipologie di scarti sono utilizzate per la loro valorizzazione energetica tramite DA, dal letame al liquame, agli scarti vegetali e a quelli della lavorazione dell'industria casearia, ma comunque sono tutte ottenute dalle produzioni agroalimentari e zootecniche, quindi "di terra". Di contro, la valorizzazione degli scarti dell'industria ittico-conserviera è una tematica di crescente interesse, considerando che il consumo mondiale di pesce è raddoppiato nell'ultimo trentennio nei paesi caratterizzati da una rapida crescita della popolazione, di reddito e di urbanizzazione. L'Italia risulta essere tra i primi 10 paesi per consumo di pesce, con una media annua pro capite di circa 25 kg [FAO, Food Outlook 2012, <http://www.fao.org/gIEWS/>].

Si ricorda inoltre che la chitina è il secondo biopolimero più abbondante in natura dopo la cellulosa [26. Kang et al., 2005] ed uno dei principali componenti dell'esoscheletro degli artropodi nonché della parete cellulare dei funghi. Chimicamente è un polisaccaride azotato, $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$, costituito da unità di N-acetil-D-glucosamina unite tra loro da legami β (1-4) glicosidici (gli stessi delle unità di glucosio che compongono la cellulosa) a formare lunghe catene. Queste si possono aggregare in lamine unite mediante legame idrogeno. I vari modi in cui tali lamine si aggregano tra loro determinano le tre forme cristalline note della chitina denominate α , β e γ .

Il potenziamento dell'idrolisi è di fondamentale importanza per poter utilizzare nel processo di DA questi substrati che, sebbene disponibili in gran quantità [43. Sanderson K., 2011], a causa della complessa e recalcitrante struttura pongono severe limitazioni alle produzioni di biogas, rallentando il processo ed in alcuni casi compromettendone la stabilità.

Per tali substrati è proseguita l'attività di ricerca sul potenziamento della fase di idrolisi con Funghi Anaerobi di origine Ruminale (ARF) e fermentazione con il pool microbico F210, cruciali in quanto dall'efficacia di queste fasi dipendono i successivi step del processo di produzione di biogas.

Gli ARF possiedono una gamma ampia, comprensiva e molto attiva di enzimi in grado di degradare la biomassa lignocellulosica [49. Solomon et al., 2016]: l'effetto combinato dell'azione degli enzimi e dell'attività meccanica derivante dall'infiltrazione delle ife nel materiale colonizzato li rende tra i più efficienti microorganismi. Sono infatti dotati di enzimi escreti nonché complessi multi-enzimatici extracellulari (cellulosomi). Nel rumine e nel tratto intestinale di moltissime specie animali, la loro attività costituisce il primo attacco ai materiali lignocellulosici ingeriti e facilita successivamente l'attività fibrinolitica di altri batteri. Pertanto il principale obiettivo del trattamento biologico con ARF consiste nel massimizzare la rimozione della lignina per aumentare la digeribilità del substrato avviato a DA [54. Zheng et al., 2015].

Oltre ai vantaggi menzionati, gli ARF sono considerati candidati innovativi e promettenti per migliorare le produzioni di biogas [39. Procházka et al., 2013; 17. Dollhofer et al., 2015] per il fatto di essere adattati ad ambienti anaerobi. Pertanto gli studi sul potenziamento dell'idrolisi sono state indirizzate verso un approccio di **co-trattamento**, contestualmente al processo di DA, piuttosto che applicare dei **pre-trattamenti** che complicano la configurazione del processo con fasi aggiuntive a monte della DA.

Considerati i risultati ottenuti, collaborazione con l'Università di Napoli "Federico II" sono state programmate sperimentazioni, poi svolte nei loro laboratori, per un ulteriore passaggio di scala delle prove di potenziamento della comunità microbica (di seguito Bioaugmentation) di paglia di grano già svolte negli anni precedenti, utilizzando reattori da 12 litri.

La *bioaugmentation* consiste nell'integrare una comunità microbica con l'aggiunta di specifici microrganismi (ceppi puri, pool microbici selezionati) al fine di migliorare una particolare capacità metabolica del processo. La tecnica di *bioaugmentation*, seppur ampiamente utilizzata nei processi di biorisanamento, costituisce, in questo contesto, un approccio utilizzato per migliorare l'idrolisi delle biomasse lignocellulosiche nel corso del processo di digestione anaerobica.

2 Descrizione delle attività svolte e risultati

Di seguito sono presentate attività relativamente a:

- 1) produzione di CH₄ da scarti chitinosi: bioaugmentation delle comunità microbiche attive nel processo di digestione anaerobica con ARF e F210;
- 2) bioaugmentation con ARF ed F210 di comunità microbiche attive nella produzione di biogas per il co-trattamento di scarti lignocellulosici: analisi delle comunità microbiche ed approfondimento delle relazioni struttura-funzione;
- 3) riepilogo dei risultati ottenuti nel corso di sperimentazioni bioaugmentation con ARF ed F210 ripetute su scala di processo crescente 1:10:100, rispettivamente 120 mL, 1,2 L e 12 L.
- 4) messa a punto di tecniche di microscopia e microscopia in epifluorescenza per il rilevamento delle componenti fungine nelle comunità microbiche attive nella DA.

2.1 Produzione di metano da scarti chitinosi: bioaugmentation di comunità microbiche attive nella DA

Viene di seguito riportato il proseguo delle attività avviate nella precedente annualità [Report RdS/PAR2014/143] riguardo all'uso di substrati chitinosi – gusci di gamberetti – per la produzione di CH₄ considerando sia le produzioni (quantità, qualità e rese) presentando i risultati ottenuti fino al termine della produzione di biogas, che le principali caratteristiche delle comunità batteriche. Inoltre, è nell'ambito di questa serie sperimentale, che nel corso della presente annualità, sono state condotte le indagini sulla produzione di H₂S relativamente alla componente di SRB nella comunità.

Anche in questo serie sperimentale la prima fase della DA, ovvero l'idrolisi delle molecole complesse della chitina, rappresenta un vero e proprio "collo di bottiglia" dell'intero processo [23. Haitjema et al., 2014]. In particolare la chitina nell'esoscheletro dei crostacei risulta di difficile degradazione, poiché combinata con altre sostanze come carbonato di calcio e sali minerali che conferiscono durezza [40. Raabe et al., 2005]. Proprio a causa del basso tasso di degradazione della chitina, l'accumulo di grandi quantità di scarti derivanti dalla lavorazione dei crostacei già da anni è emerso un problema di primaria importanza nell'industria ittica [45. Shahidi et al., 1999]. In questa fase della ricerca gli scarti chitinosi sono stati sottoposti a DA mediante arricchimento delle comunità metanigena, in particolare tramite il rafforzamento della fase idrolitica mediante Funghi Anaerobi Ruminanti (ARF), e della fase acidogenica fermentante aggiunto all'inoculo F210 [47. Shiladitya et al, 2016]. Questo studio approfondisce e sviluppa anche i risultati preliminari già ottenuti in una precedente sperimentazione [37. Patriarca et al., 2014; RdS/PAR2013/252] in cui veniva testata la capacità chitinolitica del pool microbico F210 su scarti chitinosi.

Gli obiettivi principali di questa linea di ricerca sono stati :

- 1) valutare la possibilità di utilizzare scarti chitinosi dell'industria ittica come unico substrato per la DA; poiché in letteratura non figurano casi in cui siano stati utilizzati ai fini della valorizzazione energetica con questo studio ci si propone di indagare le possibilità offerte da questa tipologia di scarto;
- 2) valutare l'efficacia dell'arricchimento della comunità microbica in termini di incremento nella quantità e qualità di biogas prodotto (i.e. percentuale di CH₄ in esso contenuto);
- 3) analizzare la composizione delle principali componenti delle comunità microbiche a livello *inter*-ed *intra-guild*¹, in risposta alle condizioni sperimentali;
- 4) valutare come il passaggio di scala 10x dei reattori influenza le produzioni di biogas;
- 5) valutare la concentrazione di H₂S nel biogas alle diverse condizioni di arricchimento della comunità.

Criterio fondamentale di questa ricerca è stato il rispetto del principio di sostenibilità, in termini sia ambientali che economici. È stato possibile rispettare questo proposito poiché è stato utilizzato uno scarto

¹ Nella digestione anaerobica il termine "guild" viene utilizzato per descrivere un gruppo di microorganismi funzionalmente relati: l'esempio più comune è rappresentato dal gruppo di microorganismi appartenenti al dominio Archaea in grado di produrre metano.

reale ad alto contenuto di chitina, derivante dalla lavorazione dei gamberetti; il substrato è stato utilizzato tal quale senza subire pretrattamenti atti alla degradazione di biopolimeri; il processo è stato realizzato in mesofilia, a 37 °C, dunque con un input energetico contenuto.

Le ricerche sono state svolte mediante due serie sperimentale, entrambe condotte in modalità batch:

- **Prima Serie Sperimentale**, batch da 120 mL, con volume di lavoro di 62,5 mL. Questa sperimentazione ha consentito di confrontare svariate condizioni sperimentali e di selezionare le più interessanti;
- **Seconda Serie Sperimentale** in reattori batch da 1,2 L, con volume di lavoro di 600 mL, quindi in base ad uno scale-up 10x sono state testate quelle condizioni che nella prima serie sperimentale avevano fornito i risultati più interessanti in termini di produzioni di metano; a queste sono state aggiunte anche altre condizioni ritenute interessanti e meritevoli di ulteriore approfondimento (si veda oltre).

Prima Serie Sperimentale

Anche se questa attività sperimentale era già stata avviata nella precedente annualità [Report RdS/PAR2014/143] per chiarezza viene comunque riportato nuovamente lo schema sperimentale (Tab. 1). Si ricorda che i volumi e le quantità utilizzate per allestire le differenti prove sperimentali sono stati scelti per poter confrontare i risultati con altri ottenuti nel corso di precedenti annualità, ottenuti lavorando con substrati lignocellulosici.

Tabella 1. Schema riassuntivo del Piano Sperimentale della Prima Serie Sperimentale svolta con batch da 120 mL. I colori con cui sono indicate le diverse condizioni sperimentali sono gli stessi che verranno utilizzati in seguito per i grafici. ARF = Funghi Anaerobi Ruminali; F210 = Pool microbico fermentante; M = comunità metanigena; Biomet. Potenz. = biometanazione potenziale, ovvero la capacità della sola comunità metanigena di produrre metano in assenza di substrato (prove sono state condotte in triplicato)

PROVA	CONDIZ. SPERIMENT.	REPLICHE	ARF		F210		M		CONC. SUBSTRATO (gVS/L)	CHITINA (g)
			%	mL	%	mL	%	mL		
A	ARF + F210 + M	3	8	5	8	5	20	12,5	6,5	0,75
D	ARF + F210 + M	3	8	5	8	5	20	12,5	9,7	1,12
E	ARF + F210 + M	3	8	5	8	5	20	12,5	13	1,49
B	F210 + M	3			16	10	20	12,5	6,5	0,75
C	M	3					20	12,5	6,5	0,75
H	ARF + M	3	16	10			20	12,4	6,5	0,75
F	M (biomet. potenz.)	2					20	12,4		

Produzione di metano

Come si può rilevare dal grafico in figura 1 e dalle tabelle 2 e 3 relative al primo esperimento, alla concentrazione di substrato di 6,5 gVS/L, la produzione cumulativa di metano ottenuta dalla prova arricchita con entrambi gli inoculi (prova A), è più elevata rispetto al controllo, effettuato con solo inoculo metanigeno (prova C): al T 70, momento di massima produzione di metano, i volumi prodotti sono rispettivamente di 1323 mL/L ± 224 di CH₄ contro 907 mL/L ± 142 CH₄, con un incremento del 46%; a fine produzione (T 146) dalle stesse prove si ottengono rispettivamente 2268 mL/L ± 21 e 1817 mL/L ± 84, con un incremento tra le due condizioni del 25%.

Le comunità microbiche utilizzano efficientemente gli scarti chitinosi e infatti, incrementandone la quantità del 50% (cioè a 9,7 gVS/L) e del 100% (13 gVS/L), le produzioni incrementano al T 70, rispettivamente del 39% (prova A contro prova D) e del 90% (A contro E); a fine produzione gli stessi confronti danno incrementi rispettivamente del 47% e dell'82%.

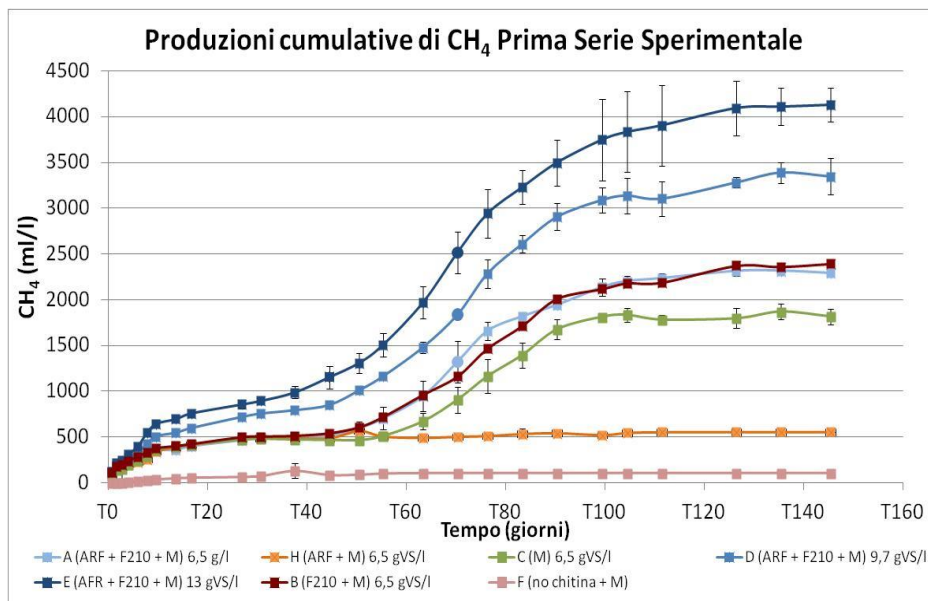


Figura 1. Produzioni cumulative di metano (mL/L) ottenute dalle prove sperimentali della Prima Serie Sperimentale. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi calcolati per ogni prova su tre repliche. Ove non rilevabili, i valori di D.S. sono inferiori alla dimensione del simbolo della coordinata. Le coordinate contrassegnate dal cerchio corrispondono alle principali analisi microbiologiche effettuate.

Tabella 2. Tabella riassuntiva delle produzioni di CH₄: concentrazioni (%), produzioni cumulative (mL/L), rese (mL/gVS) di tutte le prove della Prima Serie Sperimentale; tutti i valori sono riferiti al giorno 146, ovvero l'ultimo tempo di campionamento (fine esperimento)

T 146		Concentraz. Substrato (gVS/L)	Concentrazione CH ₄ nel biogas (%)	Produzione cumulativa CH ₄ (mL/L)	Resa CH ₄ (mL/gVS)
PROVA	CONDIZ. SPERIMENT.				
A	ARF + F210 + M	6,5	66,5 ± 0,3	2269 ± 21	357,7 ± 5
D	ARF + F210 + M	9,7	69,9 ± 4,1	3346 ± 201	348,6 ± 21
E	ARF + F210 + M	13	72,8 ± 2,0	4128 ± 182	322,5 ± 14
B	F210 + M	6,5	68,6 ± 1,4	2395 ± 132	374,2 ± 21
C	M	6,5	63,6 ± 1,8	1817 ± 84	283,8 ± 13
H	ARF + M	6,5	38,5 ± 1,1	554 ± 33	86,5 ± 5
F	M (no chitina)	6,5	10,6 ± 0,7	108 ± 7	/

Tabella 3. Tabella riassuntiva delle produzioni di CH₄: concentrazioni (%), produzioni cumulative (mL/L), rese (mL/gVS) di tutte le prove della Prima Serie Sperimentale; tutti i valori sono riferiti al giorno 70, corrispondente alla fase esponenziale di produzione di CH₄

T 70		Concentraz. Substrato (gVS/L)	Concentrazione CH ₄ nel biogas (%)	Produzione cumulativa CH ₄ (mL/L)	Resa CH ₄ (mL/gVS)
PROVA	CONDIZ. SPERIMENT.				
A	ARF + F210 + M	6,5	61,4 ± 2,8	1323 ± 224	206,7 ± 35
D	ARF + F210 + M	9,7	64,5 ± 1,9	1837 ± 5,5	191,3 ± 6
E	ARF + F210 + M	13	72,3 ± 1,7	2518 ± 229	196,7 ± 18
B	F210 + M	6,5	58,4 ± 3,3	1162 ± 220	181,6 ± 34
C	M	6,5	51,9 ± 2,3	907 ± 142	141,7 ± 22
H	ARF + M	6,5	34,2 ± 1,0	503 ± 30	73,6 ± 5
F	M = biomet. potenz.	6,5	10,6 ± 0,7	108 ± 6,8	/

La prova H (con ARF+M), priva cioè di un rafforzamento della fase intermedia acidogenica, ha invece fornito produzioni di biogas inferiori a quella della prova di controllo, con solo inoculo M (prova C): al T 70 aveva prodotto la metà circa del controllo (503 mL/L \pm 30 vs 907 mL/L \pm 142 di CH₄), mentre al termine dell’esperimento la produzione risultava meno di un terzo (554 mL/L \pm 33,4 vs 1817 mL/L \pm 84), con decrementi dell’80% al T 70 e del 228% a fine produzione.

Questi risultati confermano che la riduzione nella produzione cumulativa di CH₄ non si realizza per effetto di interazioni negative (es. di tipo competitivo) tra componenti microbiche, quanto piuttosto per lo sbilanciamento tra le guild funzionali della comunità: potenziando solo la fase di idrolisi, mediante ARF, e omettendo di arricchire la successiva fase di acidogenesi con F210, si genera una inefficienza nella catena trofica e il “collo di bottiglia” del processo, che generalmente si verifica nella prima fase della DA a carico dell’idrolisi, è probabilmente trasferito a quella successiva, costituita da un eccesso di acidi (si veda in seguito). Anche Theuerl et al., 2015 [52] sottolineano come il processo possa essere perturbato quando un singolo passaggio è sbilanciato e sostengono l’importanza dell’equilibrio tra le guild metaboliche che sono sequenzialmente coinvolte nel processo di DA.

Le migliori produzioni giornaliere di metano si registrano intorno al T 70 (Fig. 2), da parte della condizione ARF + F210 + M con substrato a concentrazione massima, cioè 13 gVS/L (prova E): la produzione giornaliera raggiunge i 451 mL/L; la stessa condizione con concentrazione di substrato di 9,7 gVS/L (prova D) raggiunge la massima produzione giornaliera una settimana dopo, con valore medio di 432 mL/L, insieme alla prova a 6,5 gVS/L (prova A), che però mostra un valore di produzione giornaliera in CH₄ di 301 mL/L. Per la prova B, costituita da F210 + M a 6,5 gVS/L, non si osservano produzioni giornaliere di rilievo.

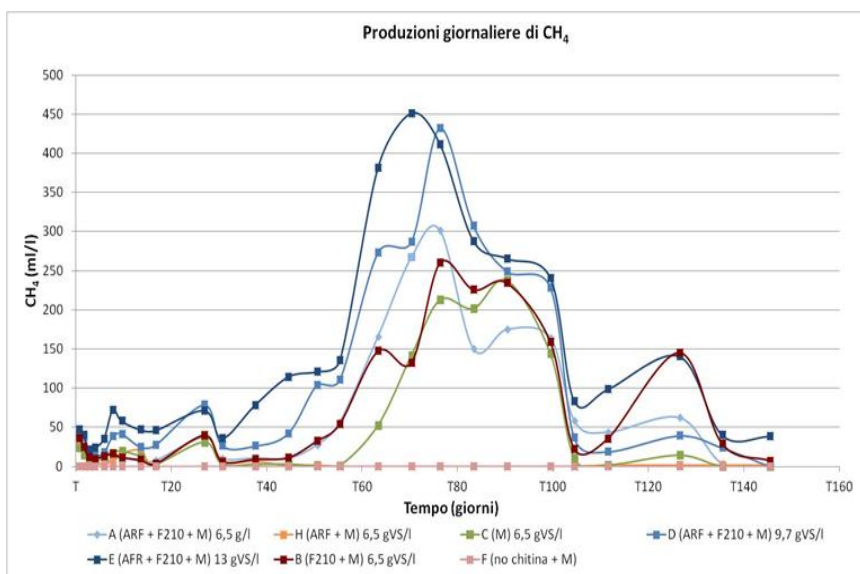


Figura 2. Produzioni giornaliere di CH₄ (mL/L) della Prima Serie Sperimentale, calcolate moltiplicando il volume del biogas ottenuto al tempo di campionamento per la percentuale di metano

Le percentuali di metano nel biogas prodotto nelle differenti prove sperimentali sono di grande interesse: negli impianti reali, proprio perché progettati empiricamente, con volumi di reattori spesso sovradimensionati e processi di trattamento sub-ottimali o instabili [36. O’Flaherty et al., 2006], si ottiene un biogas con una percentuale di CH₄ del 50÷60%; molti studi sono dedicati alla ricerca di soluzioni tecnologiche economicamente sostenibili per la rimozione della CO₂ (upgrading del biogas), che, insieme al CH₄, predomina nel biogas (25÷45%).

Nella prova ARF + F210 + M alla più elevata concentrazione di substrato (13 gVS/L) (prova E), già al T 70 si raggiunge il 72% di contenuto in CH₄ (Tab. 2, Tab. 3 e Fig. 3), con picchi dell’83% ottenuti da singole repliche, dopo il T 130. Si noti che al T 70 la concentrazione di CH₄ rilevata per la prova B (F210 + M) è inferiore, pari al 58,4%, mentre per la prova di controllo è del 51,9%; un valore poco interessante, 39%, viene ottenuto per l’arricchimento con solo ARF (prova H), confermando quanto già esposto sopra.

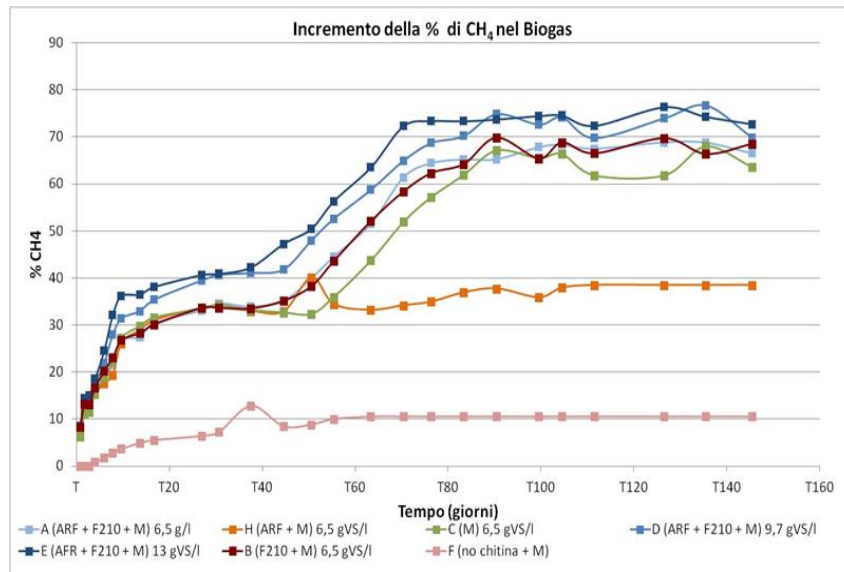


Figura 3. Incremento della percentuale di CH₄ nel biogas ottenuto per ogni prova nella Prima Serie Sperimentale

Le rese migliori in termini di mL di CH₄ prodotto per gVS di scarti chitinosi sono ottenute, sia al T 70 che a fine esperimento (T 146), per le prove ARF + F210 + M alle tre concentrazioni di substrato (prove A, D, E), con valori che si attestano intorno ai 350 mL/gVS, come pure per la prova F210 + M (prova B) per la quale la resa è di 374 mL/gVS ± 20, (Tab. 2) confermando l'efficienza di utilizzazione di questa tipologia di substrato da parte delle comunità microbiche. La condizione con ARF ma priva di F210 (prova H), mostra invece una resa ridotta, 87 mL/gVS ± 5 contro 284 mL/gVS ± 14 della condizione di controllo con solo M (prova C). Anche in questo caso si conferma la necessità di arricchire la fase acidogena fermentante.

L'efficacia dell'uso di scarti chitinosi per la produzione di CH₄ è dimostrata anche dalle percentuali di rimozione del substrato rilevate a fine esperimento e mostrate in tabella 4. Per tutte le prove viene rimosso più del 99% dei Solidi Volatili e più del 97% dei Solidi Totali, dimostrando che anche le parti più refrattarie alla degradazione sono state digerite. Questo risultato è di interesse in quanto al termine del processo la quantità di digestato da smaltire è veramente scarsa. Più in particolare il rapporto C:N:S registrato per lo scarto di partenza è di 39:4:1 mentre a fine esperimento è di 14:4:1 per ARF + F210 + M a 13gVS/L (prova E) e di 8:2:1 per ARF + F210 + M a 9,75 gVS/L (prova D), dimostrando quanto la DA si realizzi a carico del carbonio. D'altra parte questi risultati meritano ulteriori approfondimenti.

Tabella 4. Valori percentuali di TS e di VS ottenuti per il substrato e per ciascuna prova sperimentale a fine esperimento, e relative percentuali di rimozione

	% TS	% VS	rimozione TS (%)	rimozione VS (%)
SUBSTRATO CHITINOSO	87,8 ± 0,70	53,6 ± 0,90	/	/
A	1,97 ± 0,02	0,3 ± 0,01	97,8	99,4
D	2,25 ± 0,03	0,37 ± 0,01	97,4	99,3
E	2,62 ± 0,01	0,52 ± 0,02	97,0	99,0
B	1,94 ± 0,03	0,36 ± 0,03	97,8	99,5
C	2,03 ± 0,01	0,31 ± 0,00	97,7	99,4
H	2,06 ± 0,05	0,31 ± 0,02	97,7	99,4

Intermedi di processo

Dall’analisi degli intermedi di processo emerge che la produzione di CH₄ viene realizzata principalmente attraverso la via metabolica degli acetotrofi, come del resto atteso, per il fatto che il processo si svolge in mesofilia (37°C). Si fa presente che la concentrazione di acidi rilevata è comunque la differenza tra quanto prodotto dalla comunità e quanto da essa stessa consumata.

Dai grafici riportati in figura 4, in cui sull’ordinata di sinistra si rilevano le concentrazioni degli acidi e sulla coordinata di destra le produzioni cumulative di CH₄, si osserva che il decremento nella concentrazione dell’acido acetico si combina con l’incremento di produzione di CH₄. Krakat et al. (2010) [30], Čater et al. (2013) [10], Ali Shah et al. (2014) [1] riportano come l’acetato sia il substrato più importante per i batteri metanigeni in mesofilia (28÷42 °C): si stima che in questa condizione oltre il 70% di CH₄ venga prodotto lungo la via metabolica degli acetotrofi.

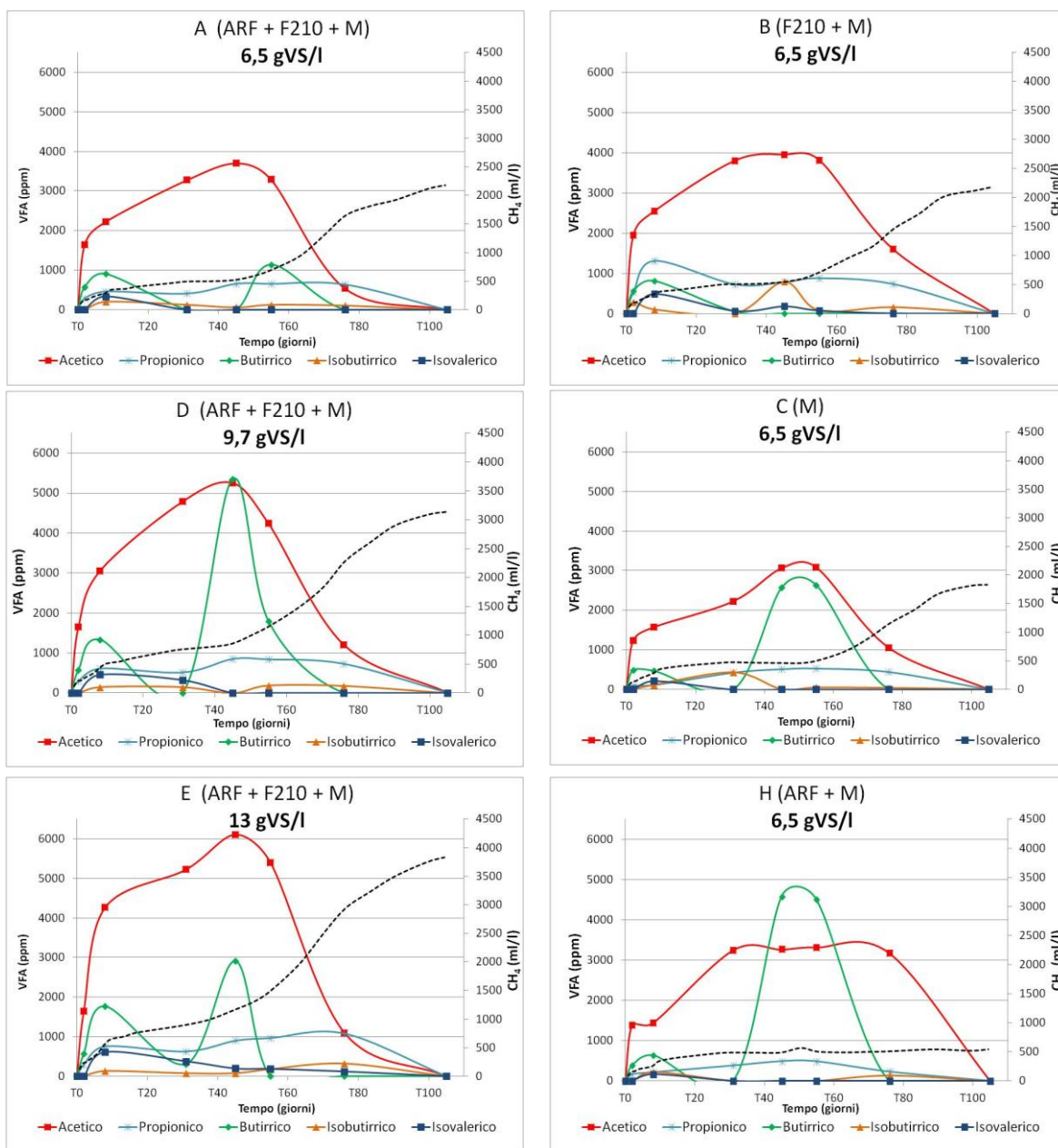


Figura 4. Grafici delle concentrazioni degli acidi grassi volatili (ppm), rilevate nel mezzo di coltura per le varie condizioni sperimentali della Prima Serie Sperimentale; per ogni grafico si riporta anche la curva cumulativa di produzione di CH₄ (mL/L), che figura tratteggiata in nero e che fa riferimento all’asse secondario a destra.

La concentrazione dell'acido acetico è più elevata in corrispondenza della più elevata concentrazione di substrato (13 gVS/L): raggiunge i 6111 ppm intorno al T 45 nella condizione ARF + F210 + M con (prova E), mentre al contempo si registrano 5259 ppm a 9,7 gVS/L e 3700 ppm a 6,5 gVS/L. È interessante rilevare che nella condizione ARF + M (prova H) le concentrazioni di acido acetico, dal T 31 fino almeno al T 76, si attestano intorno ai 3200 ppm e in questo intervallo di tempo non si osservano incrementi nella produzione di CH₄. Questo dimostra la difficoltà da parte della comunità di metabolizzare l'acetato disponibile in questa condizione sperimentale.

Caratteristiche delle comunità microbiche

La densità cellulare è un parametro generalmente non riportato in letteratura ma che nel caso di questo studio ha fornito risultati molto interessanti: infatti oltre a conoscere la frazione % delle componenti microbiche in esame, il valore numerico delle loro densità, come vedremo in seguito, aggiunge una ulteriore informazione all'analisi di comunità e alla definizione della funzionalità del processo.

Nelle prove della Prima Serie Sperimentale le massime densità cellulari si ottengono per le configurazioni di comunità ARF + F210 + M, alle tre concentrazioni di substrato (prove A, D ed E), al T 70, tempo in cui è massima la produzione di CH₄ (Fig. 5); di contro, al T 105, quando non viene più prodotto biogas, i valori di densità cellulare sono più bassi che nella fase di *start-up* (T 8).

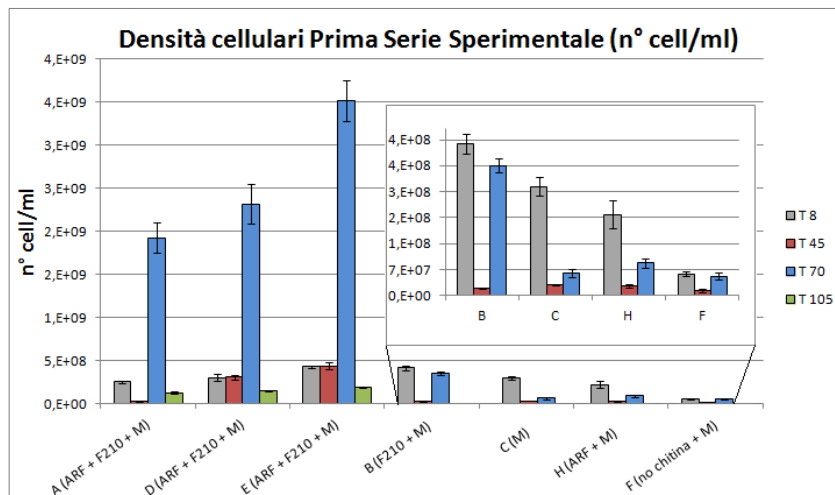


Figura 5. Densità cellulari della Prima Serie Sperimentale (n° cell/mL). Per tutte le prove vengono riportate le densità riferite ai tempi di campionamento T 8, T 45 e T 70 e in più il T 105 per le prove A, D ed E. Per le prove B, C, H e per il controllo F è stato effettuato uno zoom del grafico (riquadro minore), in modo da poter meglio apprezzare le differenze di scala tra le diverse prove e i diversi tempi di campionamento. Si riportano le DS dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche.

L'efficacia nell'uso del substrato da parte delle comunità configurate come ARF + F210 + M è confermata dall'osservazione che all'aumento della quantità di substrato fornito corrisponde anche un incremento nella densità cellulare, e a questi incrementi corrispondono maggiori produzioni di CH₄ (Fig. 1). Le altre prove, compresa la prova B (F210 + M), non mostrano risultati significativi (riquadro di Fig. 5). Pertanto saranno discussi i risultati delle analisi microbiologiche delle sole prove A, D ed E.

È interessante considerare come nella fase di *start-up*, si rilevino frazioni sia di *Eubacteria* che di *Archaea* inferiori a quelle attese sulla base degli inoculi utilizzati: infatti la comunità metanigena M era costituita dal 54,4% di *Eubacteria* e dal 4,9% di *Archaea* (Fig. 6), mentre nell'inoculo F210 la frazione di *Eubacteria* rilevati era del 78,9%. Questi risultati confermano quanto riportato da Demirel & Yenigun, 2006 [16], ovvero che la comunità microbica necessita di un tempo di riadattamento dopo l'avvio del processo, fondamentale ai fini di una efficiente produzione di CH₄.

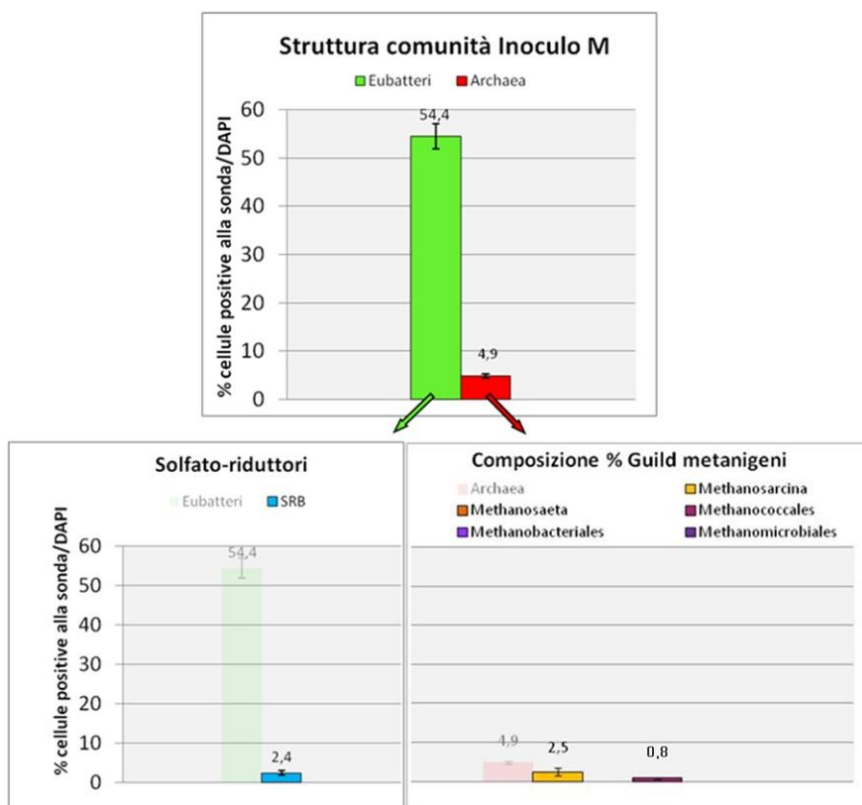


Figura 6. Composizione della comunità microbica dell'inoculo M. In alto: componente Eubacteria e componente Archaea; in basso a sinistra: percentuale di solfato-riduttori e in trasparenza percentuale di Eubacteria totali (per la discussione di questo risultato si veda più avanti); in basso a destra: componenti della guild di metanigeni e in trasparenza percentuale di Archaea totali. Le percentuali sono espresse come il numero di cellule che rispondono alla sonda rispetto al totale delle cellule contate in DAPI. Si riportano DS dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche.

Al T 70, tempo di massima produzione di CH₄, per le condizioni A, D, E, risultano incrementate le frazioni di microrganismi appartenenti ai domini *Eubacteria* ed *Archaea* (Fig. 7); è interessante osservare che al T 70 il rapporto *Archaea:Eubacteria* è di 1:7 contro un rapporto di 1:10 nelle fasi di *start-up* e fine produzione.

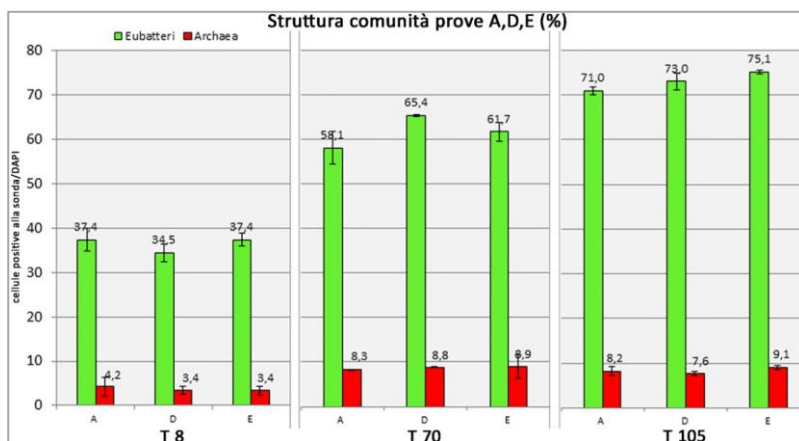


Figura 7. Struttura delle comunità nelle prove A, D ed E ai tempi di campionamento T 8, T 70, T 105. Le percentuali sono espresse come il numero di cellule che rispondono alla sonda rispetto al totale delle cellule contate in DAPI. Si riportano le DS dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche.

Calcolando i corrispettivi valori di densità cellulari per *Eubacteria* e *Archaea*, per i tre tempi sperimentali, si rilevano al T 70 densità per entrambe le componenti superiori di un ordine di grandezza, rispetto alle fasi di inizio e fine produzione, confermando come le dimensioni delle componenti della comunità possano costituire un parametro importante per la valutazione della produzione di CH₄. Ciò è confermato dal fatto che all'aumentare della concentrazione di substrato, si rileva un incremento della densità cellulare sia di *Eubacteria* che di *Archaea* (Fig. 8).

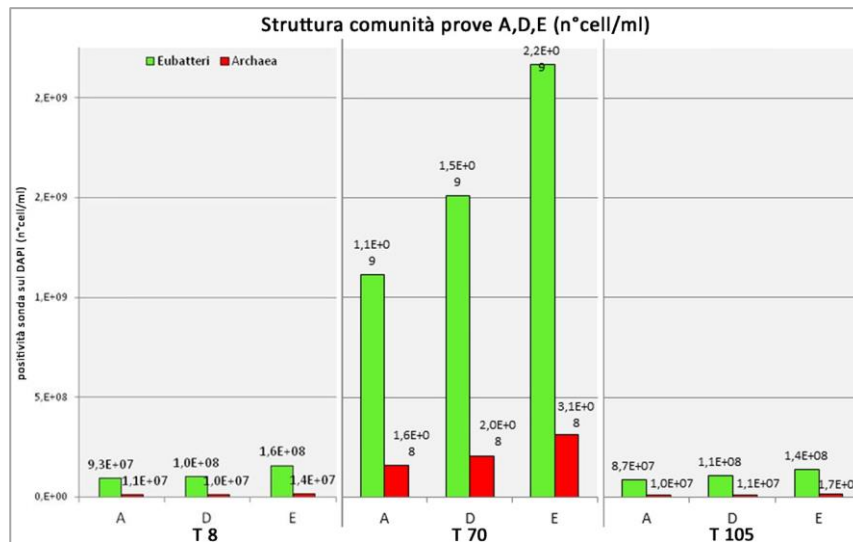


Figura 8. Struttura delle comunità in termini di Eubacteria e Archaea nelle prove A, D ed E ai tempi di campionamento T 8, T 70, T 105. Le densità sono ricavate moltiplicando la frequenza della singola componente microbica per la densità cellulare ottenuta in DAPI.

All'interno della guild di *Archaea* metanigeni (Fig. 9 e Fig. 10), risulta prevalere la componente funzionale degli acetotrofi a cui, si ricorda, è attribuito il 70% della produzione di metano nelle condizioni sperimentali di mesofilia (37 °C).

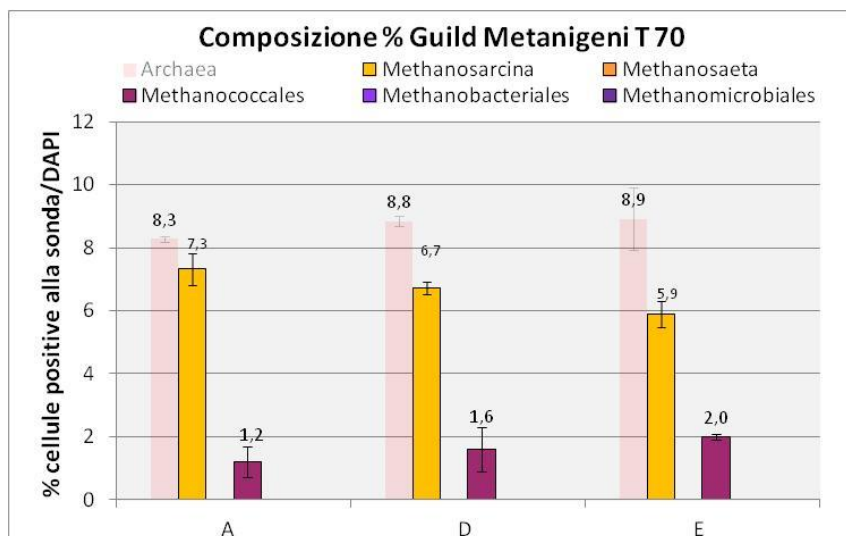


Figura 9. Componenti della Guild di metanigeni nelle prove A, D ed E al T 70 espresse in percentuale e in trasparenza percentuale di *Archaea* totali. Le percentuali sono espresse come il numero di cellule che rispondono alla sonda rispetto al totale delle cellule contate in DAPI. Si riportano le DS dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche.

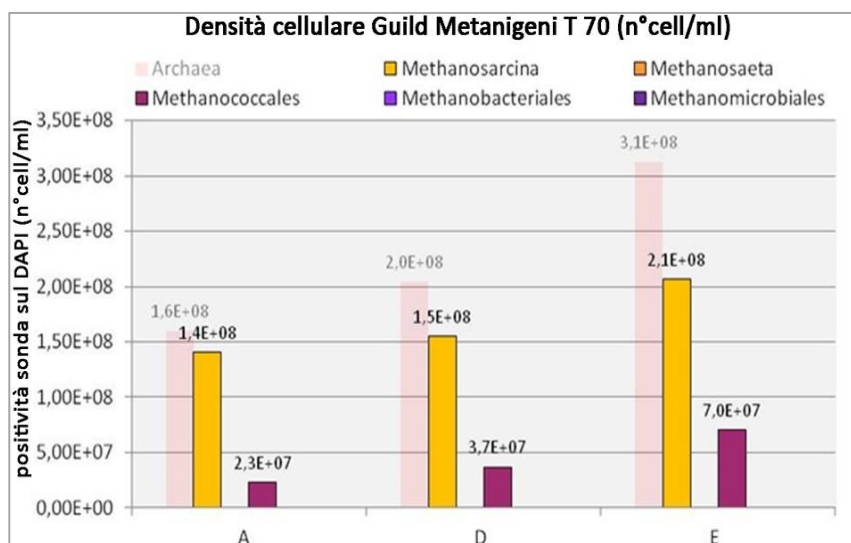


Figura 10. Densità cellulari delle componenti della Guild di metanigeni nelle prove A, D ed E al T 70 ottenute moltiplicando la frequenza della singola componente microbica per la densità cellulare ottenuta in DAPI; in trasparenza si riporta la densità di *Archaea* totali.

Tutti gli acetotrofi rilevati appartengono al genere *Methanosarcina*; di contro la sonda usata per *Methanosaeta*, l'altro genere conosciuto di acetotrofi, non ha dato segnali positivi. I *Methanosarcina* sono considerati generalisti nell'uso dell'acetato [48. Smith & Ingram Smith, 2007; 32. Liu et al., 2008], sia perché hanno una affinità per questo composto nell'ordine di mM, sia perché possono utilizzare altre tipologie di substrato quali l'H₂/CO₂ e composti metilici. Di contro i *Methanosaeta* sono specialisti obbligati nell'uso dell'acetato, con affinità nell'ordine delle μM. La predominanza dei *Methanosarcina*, nel complesso considerati a strategia ecologica di tipo *r*, rispetto ai *Methanosaeta* a strategia *k* (Tab. 5) [4. Andrews & Harris, 1986; 14. De Vrieze et al., 2012] ben concorda con le elevate concentrazioni di acetato riscontrate.

D'altra parte, è stata rilevata anche una frazione di idrogenotrofi nella guild di *Archaea* metanigeni anche se relativa solo ai *Methanococcales* (non sono stati rilevati *Methanobacteriales* e *Methanomicrobiales*) (Fig. 9); le percentuali di *Methanococcales* (1,2% in A; 1,6% in D; 2,0% in E), nonché i relativi valori di densità cellulari, crescono al crescere delle quantità di substrato fornito ai reattori, che peraltro mostrano anche concentrazioni crescenti di acetato, come precedentemente illustrato in Fig. 4. Questo risultato può far ipotizzare un ruolo di crescente importanza della componente batterica omoacetogenica all'aumentare del substrato fornito e alla concentrazione di acetato: questa è in grado di trasformare parte dell'acetato in H₂ e CO₂ e viceversa, sulla base delle condizioni ecologiche del processo [36. O'Flaherty et al., 2006].

In questo studio è stata testata anche l'innovativa sonda GM5 [9. Brookman et al., 2000] per l'identificazione del genere *Neocallimastix*, usato insieme a *Orpinomyces* come inoculo per l'arricchimento della fase idrolitica. Sebbene siano state effettuate diverse prove a differenti valori di stringenza², la sonda non ha dato esito positivo. L'uso di tale sonda è infatti infase di sperimentazione da parte della comunità scientifica e visti gli incerti risultati non è ancora registrata nel database *Probase* delle sonde oligonucleotidiche per rRNA-target (<http://probase.csb.univie.ac.at/>). Pertanto sono state svolte le attività descritte nel successivo paragrafo 2.4, dedicate alla messa a punto delle tecniche di rilevamento degli ARF mediante colorazioni fluorescenti.

² Con il termine "stringenza" ci si riferisce alla capacità che ogni sonda nucleotidica ha di appaiarsi con le sequenze complementari ed è una caratteristica distintiva di ogni sonda; Le condizioni di stringenza ottimali dipendono dalla combinazione di temperatura d'ibridazione, concentrazione salina e percentuale di formammide. Quest'ultima interferisce con i legami idrogeno che formano l'ibrido abbassando la temperatura di *melting* ed è il parametro che viene variato maggiormente.

Seconda Serie Sperimentale

Nella Seconda Serie Sperimentale – Scale-up, si è proceduto ad un aumento di scala 10x della Prima Serie utilizzando reattori da 1,2 L. Di seguito si riporta lo schema del Disegno Sperimentale (Tab. 5). In questa serie sperimentale sono state testate le stesse condizioni della Prima Serie ma per tutte le prove si è deciso di testare il substrato alla massima concentrazione di VS, ovvero 13 gVS/L, avendo ottenuto i migliori risultati di produzione nella Prima Serie. Inoltre:

- 1) Nella condizione “**F210 + M**”, è stata aggiunta una prova (b) in cui la componente F210 figura con una concentrazione dell’8% sul totale del *working volume*, ovvero la metà rispetto alla prova B;
- 2) Nella condizione “**ARF + M**”, è stata aggiunta una prova (h) in cui la componente ARF figura con una concentrazione dell’8% sul totale del *working volume*, ovvero la metà rispetto alla prova H;

Tabella 5. Schema riassuntivo del Piano Sperimentale dello Scale-up svolto utilizzando reattori da 1,2 L. I colori con cui sono indicate le diverse condizioni sperimentali sono gli stessi che verranno utilizzati in seguito per i grafici.
ARF= Funghi Anaerobi Ruminali; F210= Pool microbico fermentante; M= comunità metanigena

PROVA	CONDIZ. SPERIMENT.	REPLICHE	ARF		F210		M		CONC. SUBSTRATO (gVS/L)	SUBSTRATO (g)
			%	mL	%	mL	%	mL		
b	F210 + M	2			8	48	20	120	13	13,8
B	F210 + M	2			16	96	20	120	13	13,8
C	M	2					20	120	13	13,8
E	ARF + F210 + M	2	8	48	8	48	20	120	13	13,8
h	ARF + M	2	8	48			20	120	13	13,8
H	ARF + M	2	16	96			20	120	13	13,8

Per l’allestimento dei reattori e per i campionamenti si è proceduto in modo analogo rispetto alla Prima Serie Sperimentale ma sono state utilizzate bottiglie di vetro Pyrex da 1200 mL munite di tappi a 3 vie (VICI Safety Cap, GL45, 3 ports) che hanno reso più agevoli i campionamenti, non essendoci necessità di capovolgere i reattori (come invece avviene nella Prima Serie Sperimentale) (Fig. 11). I reattori sono stati agitati manualmente ogni giorno per circa 20 secondi ognuno.



Figura 11. Allestimento della II Serie Sperimentale usando reattori da 1,2 L con tappo a tre vie: i reattori sono stati posti nel termostato, a 37 °C e al buio

Produzione di metano

Al T 70 le migliori produzioni cumulative di CH₄ (Fig. 12 e Tab. 6) si registrano per la condizione F210 8% + M (prova b) (1912 mL/L), con un incremento rispetto al controllo con solo inoculo M (prova C) del 15%, mentre la prova ARF + F210 + M (E) ha fatto registrare una produzione di CH₄ di 1703 mL/L; d'altra parte, quest'ultima ha raggiunto una percentuale di CH₄ nel biogas più elevata, facendo registrare una media del 77% al T 70.

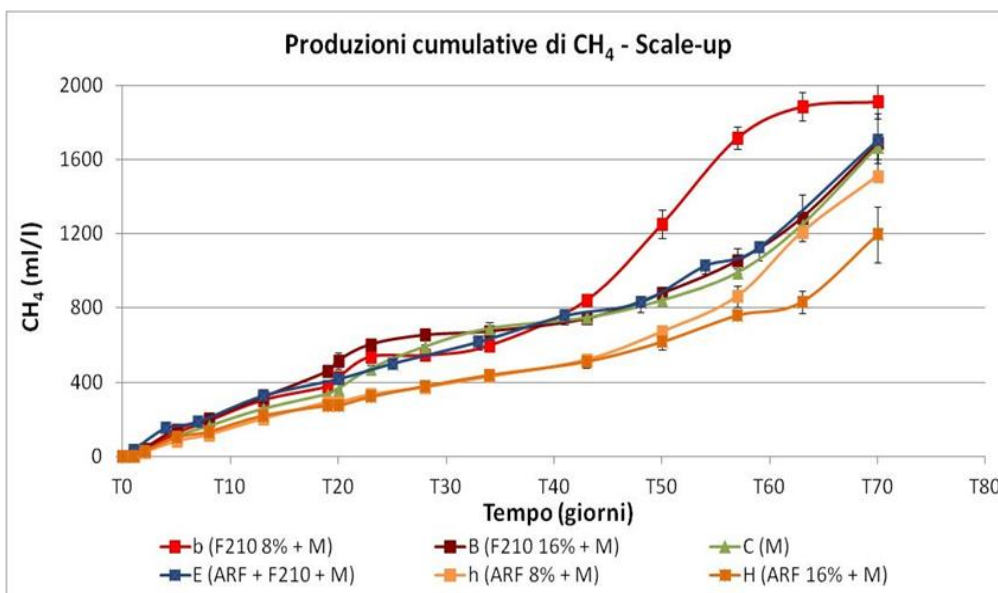


Figura 12. Produzioni cumulative di metano (mL/L) ottenute dalle prove sperimentali dello Scale-up utilizzando reattori da 1, 2 L. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi calcolati per ogni prova su due repliche. Ove non leggibili, i valori di D.S. sono inferiori alla dimensione del simbolo della coordinata.

Tabella 6. Tabella riassuntiva delle produzioni di CH₄: concentrazioni nel biogas (%), produzioni cumulative (mL/L), rese (mL/gVS). Nell'ultima colonna sono riportate le concentrazioni di H₂S nel biogas (%), il cui grafico viene riportato nella sezione successiva, per tutte le prove sperimentali dello scale-up; tutti i valori sono riferiti al giorno 70

PROVA	CONDIZ. SPERIMENT.	CH ₄ nel biogas (%)	Produzione cumulativa CH ₄ (mL/L)	Resa CH ₄ (mL/gVS)	H ₂ S nel biogas (%)
b	F210 (8%) + M	63,6	1912	147,1	0,10
B	F210 (16%) + M	67,8	1685	129,6	0,39
C	M	63,6	1668	128,3	0,31
E	ARF + F210 + M	77,3	1703	131	0,02
h	ARF (8%) + M	66,1	1510	116,1	0,17
H	ARF (16%) + M	62,7	1195	92	0,37

Inoltre gli incrementi % di CH₄ registrati nel corso del tempo della prova E sono più elevati rispetto alle altre prove, fin dalle prime settimane di esperimento (Fig. 13).

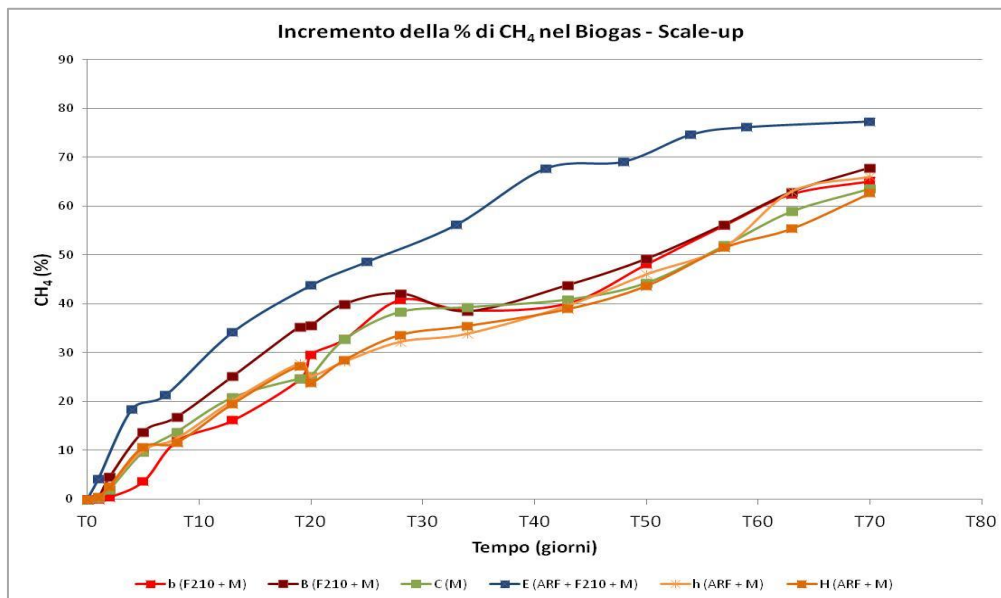


Figura 13. Incremento della percentuale di CH₄ nel biogas ottenuto per ogni prova nello scale-up

Per la prova F210 16% + M (prova B) si ottengono produzioni cumulative di CH₄ maggiori (1685 mL/L) rispetto al primo esperimento (1162 mL/L), con un incremento del 45%. Già in una precedente sperimentazione ENEA effettuata utilizzando substrati lignocellulosici, è stato riscontrato che effettuando uno Scale-up di processo con reattori 10x, i risultati precedentemente ottenuti risultano enfatizzati [RdS/PAR2014/145].

La prova F210 8% + M (b) ha fornito anche le migliori produzioni giornaliere di CH₄: al T 57 sono stati prodotti 421 mL/L di CH₄, anticipando, insieme alla prova ARF + F210 + M (E), le migliori produzioni giornaliere rispetto alle altre prove, rilevate intorno al T 70.

Anche nell'esperimento di Scale-up le condizioni che hanno fornito le produzioni più scarse sono quelle con ARF + M, cioè prive dell'arricchimento della fase acidogenica-fermentante, per entrambe le concentrazioni, rispettivamente ARF 8%+M (prova h) e ARF 16% (prova H).

A questo proposito, Nkemka et al., (2015)[35], utilizzando unicamente funghi ruminali per potenziare la fase di idrolisi di materiali lignocellulosici (paglia di grano), non hanno riscontrato un incremento nelle produzioni di CH₄. Di contro, gli studi condotti in ENEA utilizzando paglia di grano hanno dimostrato che utilizzando gli ARF in combinazione con il pool batterico fermentante F210, gli incrementi nella produzione di metano raggiungono anche il 224% [RdS/PAR2014/145].

I risultati di queste sperimentazioni confermano ancora una volta l'importanza e il ruolo svolto nella DA dalle interazioni tra guild funzionali di microrganismi e come, nel caso di impiego di colture miste per migliorare le produzioni, queste debbano essere comprese a fondo al fine di ottenere comunità funzionalmente bilanciate [21. Ghosh et al., 2016]. Anche Theuerl et al., (2015) [52] sottolineano che la realizzazione di consorzi microbici equilibrati garantisce al processo una alta efficienza come pure la capacità di resilienza rispetto ai disturbi, ed è attualmente considerato come l'aspetto più cruciale per le prestazioni dei reattori e la produzione di biogas.

Intermedi di processo

Anche nel secondo esperimento l'acido acetico predomina per tutte le condizioni sperimentali (Fig. 14) e la decrescita della sua concentrazione si associa con l'incremento delle produzioni di CH₄.

D'altronde le prove ARF + M (h e H) mostrano le più elevate concentrazioni di acido acetico, 6366 ppm (prova con ARF all'8%) e 7228 ppm (prova con ARF al 16%); inoltre la concentrazione di 4000 ppm rilevata già dalla prima settimana per entrambe le prove conferma la difficoltà da parte della comunità nel metabolizzare l'acido acetico, che infatti forniscono le più basse produzioni di CH₄.

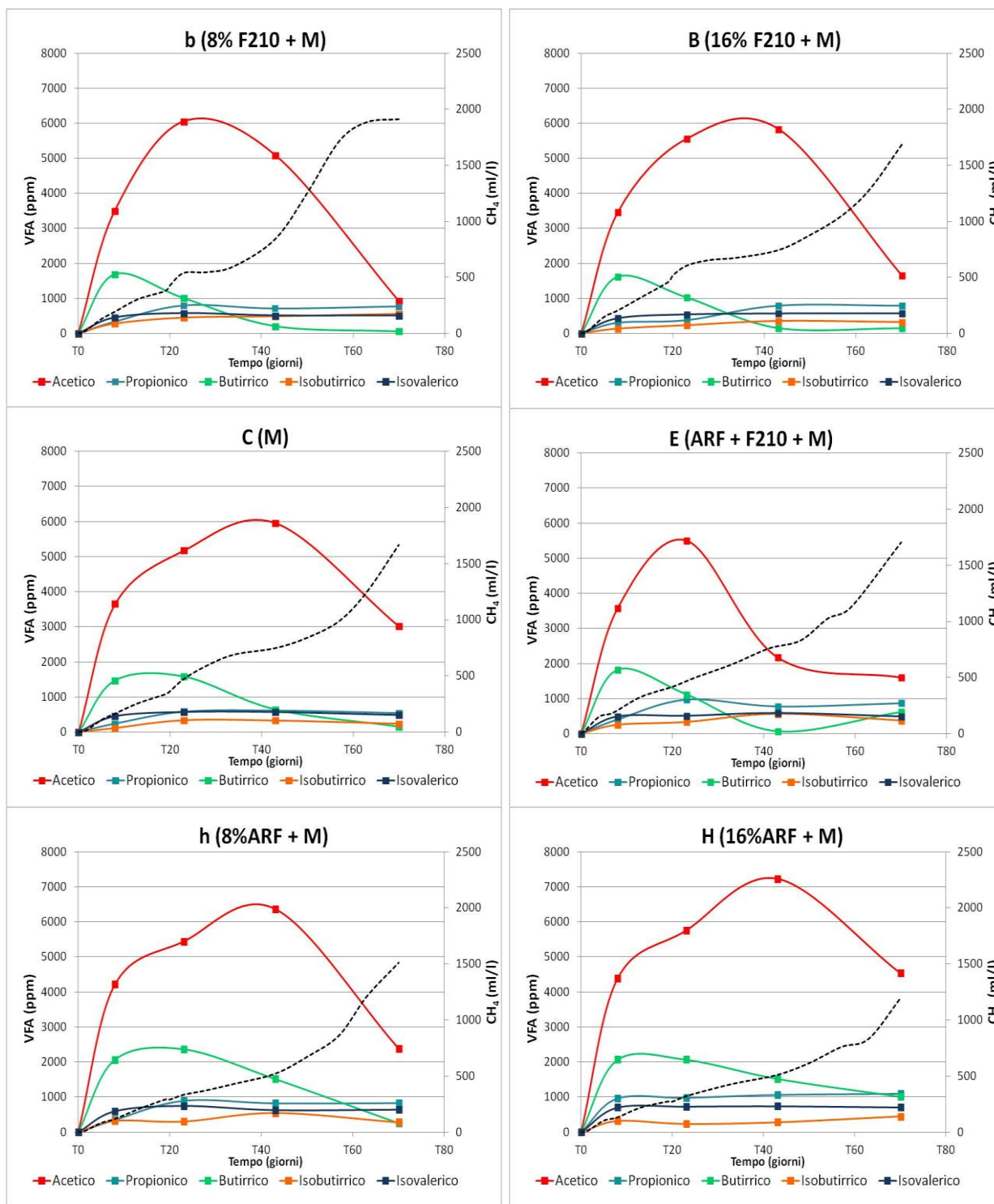


Figura 14. Concentrazioni degli acidi grassi volatili (ppm), rilevate nel mezzo di coltura per le varie condizioni sperimentali dello Scale-up; per ogni grafico si riporta anche la curva cumulativa di produzione di CH₄ (mL/L), che figura tratteggiata in nero e che fa riferimento all'asse secondario a destra

Concentrazione di H₂S nel biogas e di specie di solfuri nel mezzo liquido

Nel corso della Seconda Serie Sperimentale sono state monitorate le concentrazioni di H₂S nel biogas e, dal 28° giorno di esperimento, anche le concentrazioni di specie di solfuri nel mezzo liquido, utilizzando una metodica innovativa [2. Aliboni et al., 2015]. I risultati ottenuti dalle due analisi verranno trattati

separatamente, considerando che la presenza dell' H_2S nel biogas è una problematica legata principalmente alla qualità del biogas prodotto e alla salute degli operatori che lavorano nei pressi degli impianti, mentre nel mezzo liquido l'attività dei Batteri Solfato-Riduttori (SRB) incide sull'efficienza di produzione di CH_4 [53. Weijma et al., 2002], e riporta a studi di ecologia microbica. In Fig. 15 è riportato il grafico con le percentuali di H_2S nel biogas: i valori oscillano notevolmente e questo aspetto dei risultati deve essere ulteriormente indagato.

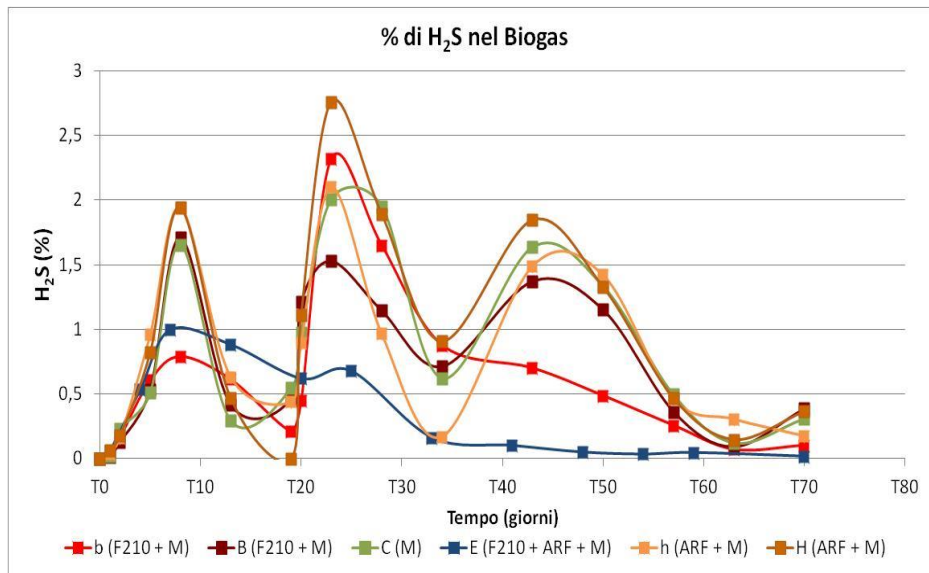


Figura 15. Concentrazioni di H_2S rilevate nel biogas per tutte le prove dello Scale-up, espresse in %

Emerge, però, che la configurazione di comunità più complessa, ARF+F210+M (prova E) mostra un andamento nella produzione di H_2S più stabile, accompagnato da concentrazioni più basse: la percentuale massima, corrispondente all'1%, si rileva dopo la prima settimana e dal T 33 il valore si attesta al di sotto dello 0,16% e al T 70 raggiunge la concentrazione più bassa tra tutte le prove sperimentali con un valore dello 0,02%. Non si può dire altrettanto per le altre prove: in particolare per le condizioni ARF 16% + M (prova H) e F210 8% + M (prova b), al T 23 si raggiungono i valori più alti, rispettivamente 2,8% e 2,1%.

Malgrado l' H_2S sia generalmente presente nel biogas con concentrazioni dello 0÷1% [1. Ali Shah et al., 2014], anche quantità molto basse ne fanno un agente inquinante: si tratta, insomma, di una piccola quantità che fa cambiare la qualità del prodotto. Infatti la sua tossicità è ben nota per la maggior parte degli organismi, compresi i microrganismi; per l'uomo la tossicità si esplica principalmente sul sistema vascolare, oltre che sul fegato e sul cervello; inoltre l' H_2S presenta una soglia di odore molto bassa, già alle concentrazioni di 0,05÷0,13 ppm [51. Sun et al., 2016], causando inquinamenti olfattivi. A livello impiantistico l' H_2S è fonte di danni economicamente onerosi poiché è estremamente corrosivo per le parti metalliche. L'insieme di questi fattori rende indispensabile il *clean-up* del biogas in uscita dai reattori (tematica non tratta in questa tesi), mentre sono allo studio condizioni di processo che a monte ne limitino la produzione.

In figura 16 sono riportate le concentrazioni in mM delle specie di solfuri rilevati nel mezzo liquido a partire dal 28° giorno dell'esperimento (essendosi resi conto dell'importanza anche di questo parametro durante le attività sperimentali, da questa data è stato possibile effettuare le misure).

Anche in questo caso le concentrazioni più elevate sono state ottenute per la condizione ARF+M, ad entrambe le concentrazioni di ARF, 8% e 16%, per le quali sono state rilevate concentrazioni di circa 2,6 mM (T 28). Concordemente con quanto rilevato nel biogas, la prova E, con ARF+F210+M, mostra la curva più interessante per via della minore concentrazione di specie di solfuri: al T 28 essa è inferiore a 1 mM e l'ultimo valore registrato è di 0,36 mM al T 70.

In sintesi, confrontando i grafici delle concentrazioni di H₂S nel biogas e di specie di solfuri nel mezzo liquido con quello delle produzioni cumulative di CH₄, a partire dal T 50 si rileva una coincidenza tra riduzione nella concentrazione di composti dello zolfo con un incremento nelle produzioni di CH₄.

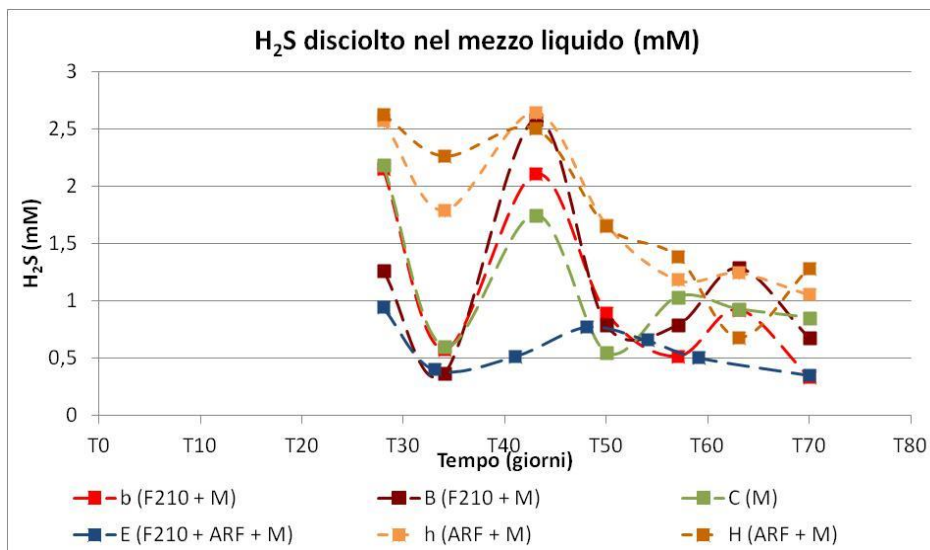


Figura 16. Grafico delle concentrazioni di H₂S rilevate nel mezzo liquido di coltura per tutte le prove dello scale-up, espresse in mM; i tempi di campionamento vanno dal T 28 al T 70

In sintesi, confrontando i grafici delle concentrazioni di H₂S nel biogas e di specie di solfuri nel mezzo liquido con quello delle produzioni cumulative di CH₄, a partire dal T 50 si rileva una coincidenza tra riduzione nella concentrazione di composti dello zolfo con un incremento nelle produzioni di CH₄.

Questi studi preliminari non sono esaustivi, ma intendono porre le basi per ulteriori approfondimenti e pianificazioni di esperimenti.

Caratteristiche delle comunità microbiche

Le analisi microbiologiche relative alla II Serie Sperimentale, effettuate anche in questo caso per i campioni ottenuti nella fase esponenziale di produzione di CH₄, mostrano densità cellulari inferiori a quelle della Prima Serie Sperimentale. D'altra parte, anche in questo caso la massima densità cellulare, indagata nella fase di produzione esponenziale, si rileva per la prova che ha fornito le migliori produzioni di CH₄, ovvero la condizione F210+M, con F210 all'8% (prova b) (Fig. 17).

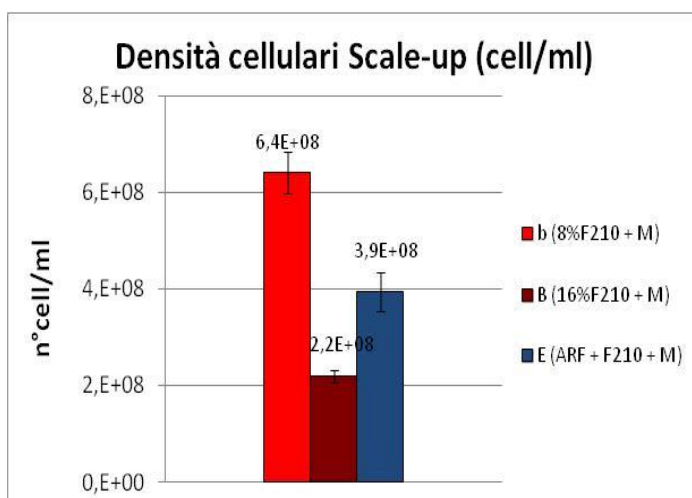


Figura 17. Densità cellulari dei campioni b T 57, B T 70 ed E T 54 relativi allo Scale-up, calcolate come n° cell/mL. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche

È interessante rilevare come quest'ultima presenti la più elevata frazione di *Eubacteria*, anche rispetto alla prova B, F210 16% + M, che inizialmente aveva ricevuto una quantità doppia del *pool* batterico fermentante F210 (Fig. 18 a e b): questo risultato pone molte domande sulla fase di *start-up* della DA, determinante per l'intero processo, ma difficile da indagare per la velocità con cui si svolge [16. Demirel & Yenigun, 2006]. Senz'altro rappresenta una delle tematiche di maggior interesse negli studi futuri sulla microbiologia della DA.

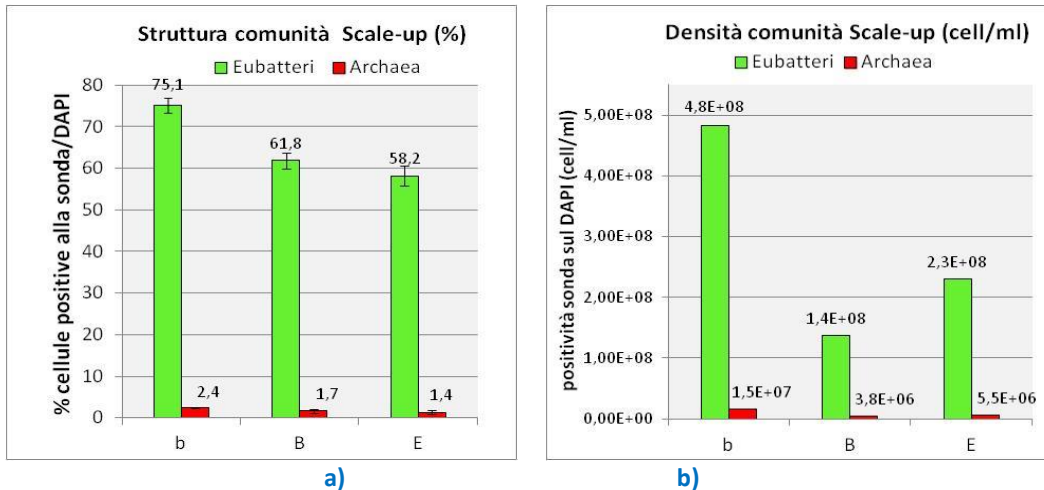


Figura 18. a) Struttura delle comunità nelle prove b, B ed E in termini di Eubacteria ed Archaea. Le percentuali sono espresse come il numero di cellule che rispondono alla sonda rispetto al totale delle cellule contate in DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche; b) Struttura delle comunità in termini di Eubacteria e Archaea nelle prove b, B ed E dello scale-up. Le densità sono ricavate moltiplicando la frequenza della singola componente microbica per la densità cellulare ottenuta in DAPI

Indagine sui batteri solfato-riduttori

All'interno degli *Eubacteria*, l'applicazione della sonda SRB385Db, per rilevare batteri in grado di compiere la Solfato-Riduzione, ha evidenziato che nella Prima Serie Sperimentale al T 70 questi costituiscono una frazione rilevante della comunità (Fig. 19): per A ed E circa 1/3, mentre per la prova D circa 1/4, con percentuali rispettivamente del 18,5% in A, 15% in D e 16,2% in E.

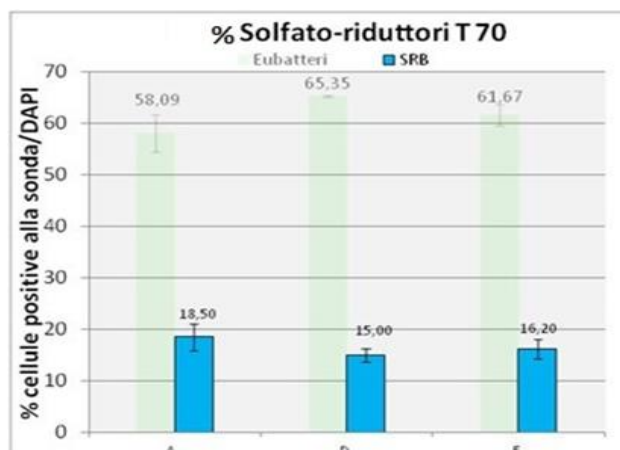


Figura 19. Percentuale di batteri-solfato riduttori (SRB) nelle prove A, D ed E della prima serie sperimentale, al T 70; in trasparenza si riportano le percentuali di *Eubacteria* totali; le percentuali sono espresse come il numero di cellule che rispondono alla sonda rispetto al totale delle cellule contate in DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche al totale delle cellule contate in DAPI. In a) si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche

Tutti questi valori sono più elevati sia rispetto a quelli riscontrati nell'inoculo F210, 10,2% di SRB, sia nell'inoculo di metanigeni M, che era composto solo dal 2,4% in SRB. D'altronde, per il primo esperimento non sono disponibili né le concentrazioni di H₂S nel biogas né quelle di specie di solfuri nel mezzo liquido. Queste misure sono invece state effettuate nel corso del secondo esperimento (Fig. 15 e Fig. 16): la prova E, composta da ARF+F210+M, con F210 all'8%, mostra rispetto alla prova b (F210 8% + M), una percentuale di SRB pari a 1/10; i corrispettivi valori sono infatti del 2,5% contro 22,4% (Fig. 20).

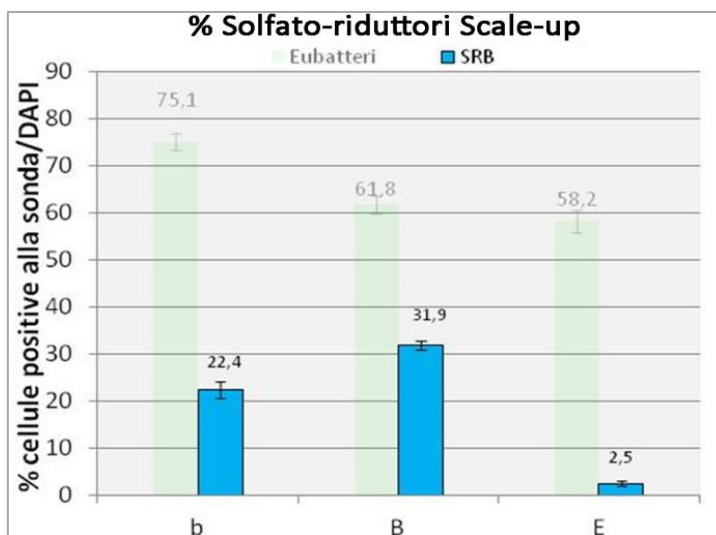


Figura 20. Percentuale di batteri-solfato riduttori (SRB) nelle prove b, B ed E dello Scale-up (seconda serie sperimentale); in trasparenza si riportano le percentuali di Eubacteria totali; le percentuali sono espresse come il numero di cellule che rispondono alla sonda rispetto al totale delle cellule DAPI. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni campione su tre repliche

Questi risultati ben concordano sia con le concentrazioni di H₂S nel biogas che con quelle delle specie di solfuri nel mezzo liquido (Fig. 16) che, come discusso sopra, fanno registrare i valori più bassi per la prova E. Nella prova F210 16% + M (B) la concentrazione di SRB è pari al 31,9%, più della metà di tutti gli Eubacteria presenti. Da un punto di vista ecologico i SRB costituiscono un gruppo specializzato di microrganismi, accumulati dalla capacità di usare il solfato come accettore di elettroni. Da soli o in simbiosi sono quindi in grado di ossidare i principali prodotti della fermentazione batterica, inclusi acido acetico, acido propionico e acido butirrico, i principali intermedi di reazione rilevati in questo studio. D'altra parte è emerso che molti ceppi di SRB possono anche svilupparsi in assenza di solfato, utilizzando l'acido acetico [24. Hao et al., 1996]. Data l'alta concentrazione di acido acetico riscontrata per tutte le prove è ipotizzabile che almeno parte della componente SRB utilizzi questa via metabolica.

Gonzalez-Martinez et al. (2016) [22] ricordano come l'attività dei SRB interferisca in due modi con quella degli Archaea metanigeni: 1) si possono instaurare relazioni di competizione per l'uso dei substrati tra SRB e metanigeni, portando alla formazione di H₂S piuttosto che di CH₄; O'Flaherty et al. (2006) [36] sottolineano come nella scala dei potenziali redox la solfato-riduzione risulti termodinamicamente avvantaggiata rispetto alla produzione di CH₄; 2) la produzione di H₂S, poiché tossico, può inibire il metabolismo dei metanigeni [11. Choi & Rim, 1991; 12. Colleran & Pender 2002].

2.2 Bioaugmentation nella produzione di biogas da scarti lignocellulosici: analisi delle comunità microbiche e delle relazioni struttura-funzione

Vengono presentati i risultati di studi dedicati alla caratterizzazione funzionale della comunità microbica nelle diverse condizioni sperimentali e nelle differenti fasi produttive delle sperimentazioni presentate nella precedente annualità [Report RdS/PAR2014/144 e Report RdS/PAR2014/145]: inizio produzione di CH₄, massima produzione, fine produzione. Particolare attenzione è stata dedicata allo studio delle variazioni della guild di metanigeni acetotrofi in risposta delle condizioni sperimentali.

Come per la precedente linea sperimentale, anche in questo caso l'indagine microbiologica delle comunità è stata condotta mediante tecniche di microscopia in epifluorescenza, utilizzando marcatori fluorescenti. In particolare, utilizzando la tecnica di Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) è stato possibile visualizzare, identificare, contare nonché localizzare i microorganismi metabolicamente attivi, cioè quei microorganismi che concorrono effettivamente alla realizzazione del processo [7. Blagodatskaya, 2013].

Pertanto viene presentato un breve riepilogo delle precedenti sperimentazioni riguardanti la bioaugmentation con Funghi Anaerobi di origine Ruminale (ARF) e batteri fermentanti (inoculo F210) di comunità microbiche attive nella produzione di biogas da scarti lignocellulosici.

Le attività erano state pianificate basandosi principalmente sui seguenti presupposti:

- I materiali lignocellulosici sono quelli disponibili in assoluto in maggiori quantità: gli inventari disponibili in diverse parti del mondo attestano, infatti che gli scarti lignocellulosici costituiscono lo stock energetico potenziale principale nel campo degli scarti grazie alla loro abbondanza, diffusione e ricchezza nel contenuto organico [38. Perlack et al., 2005; 25. Jiang et al., 2012; Xu et al., 2014; 44. Sawatdeenarunat et al., 2015]; si consideri inoltre che attualmente 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.
- Nella maggioranza degli studi condotti finora, la problematica della recalcitranza delle biomasse lignocellulosiche alla degradazione è stata affrontata utilizzando dei pretrattamenti a monte del processo di DA, quali: meccanici (macinazione); termici (steam-explosion); lavaggio con acqua calda; acidificanti; alcalinizzanti; enzimatici, etc. L'effetto che i pretrattamenti hanno è quello di migliorare la fase di idrolisi e la resa totale in metano (problematica principale della DA per i substrati lignocellulosici) ma, di fatto, la maggior parte di essi complica la struttura degli impianti di digestione anaerobica, ostacola la convenienza economica della produzione del biogas, a causa per esempio degli elevati costi e delle richieste energetiche, e grava sull'ambiente, a causa della produzione residua di liquami solido/liquidi, e della formazione di sottoprodotti tossici (acidi, composti fenolici, etc) che possono inoltre inibire le successive fasi del processo di DA.

Sulla base di queste considerazioni le nostre ricerche si sono concentrate sul potenziamento dell'idrolisi in fase di Digestione Anaerobica della paglia mediante arricchimento (bioaugmentation) della comunità microbica con (ARF) effettuando così un co-trattamento realizzato cioè già in fase di DA.

Pertanto, al fine di aumentare le produzioni di CH₄, la sperimentazione della precedente annualità era stata effettuata alimentando reattori in modalità batch unicamente con paglia, una tipologia di biomassa tra le più resistenti alla degradazione biologica. Inoltre, per verificare l'efficacia dell'idrolisi dei Funghi Anaerobi di origine Ruminale (ARF) rispetto a quelli aerobi, oltre alla paglia di grano tal quale (PG) è stata utilizzata anche paglia di seguito definita "di Fungiaia" (PF), ovvero una paglia di grano già sfruttata per la produzione di funghi aerobi (*Pleurotus* sp.) e pertanto già sottoposta a colonizzazione di ife. Nel confronto tra le due tipologie di paglia si considerano le PF come un substrato precedentemente sottoposto ad un attacco fungino aerobico. Gli esperimenti di produzione di biogas da PG e PF sono stati condotti potenziando la fase di idrolisi ed acidogenesi mediante bioaugmentation della comunità microbica rispettivamente con ARF ed F210. Infatti precedenti studi [ENEA Report RdS/PAR 2013/252; 35. Nkemka et al., 2015] hanno dimostrato la necessità di rafforzare anche la componente batterica che utilizza i prodotti metabolici dell'idrolisi fungina, evitando così di traslocare il collo di bottiglia al secondo step della DA.

Come riportato nel report della precedente annualità la sperimentazione è stata condotta sia mediante la convenzionale configurazione di processo monostadio che con l'innovativa configurazione di processo

bistadio, in modo che i microrganismi coinvolti nelle fasi di idrolisi ed acidogenesi della DA potessero avvantaggiarsi da una iniziale separazione dalla comunità metanigena. Dal punto di vista operativo, la comunità metanigena viene inoculata solo quando non si rileva più produzione di H₂, un prodotto dell'attività fermentante di idrolitici e acidogenici.

E' stata utilizzata una modalità di processo in batch che consente di condurre molteplici sperimentazioni in tempi relativamente brevi. Di seguito sono state analizzate le comunità microbiche delle che hanno fornito i risultati più interessanti in termini di produzione CH₄.

Anche per questa linea di ricerca sono state condotte due serie sperimentali: la prima in reattori da 120 mL; successivamente le condizioni che avevano dato le migliori produzioni sono state replicate in un secondo esperimento, utilizzando reattori di dimensione 10 volte maggiori, cioè 1200 mL (Scale-up 10x).

Poiché nel presente Report saranno discussi solo i risultati relativi alle caratteristiche delle comunità microbiche, i risultati ottenuti dalle due serie sperimentali saranno discusse insieme.

Gli andamenti delle produzioni cumulative di CH₄ sono riportati nelle figure 21 e 22. Confrontando i due grafici, a colori uguali corrispondono le medesime condizioni sperimentali. Si ricorda che la prima serie sperimentale è stata condotta presso Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Ingegneria Civile Edile ed Ambientale.

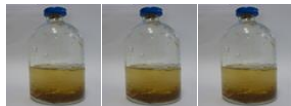
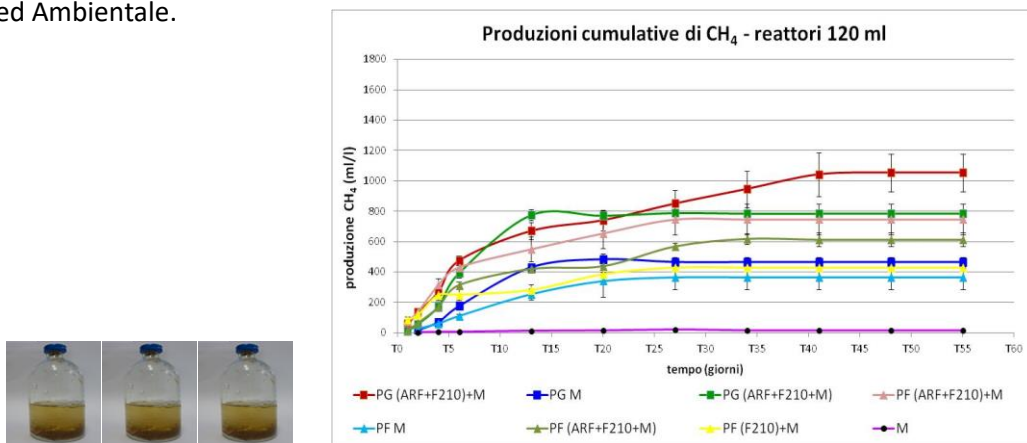


Figura 21. Produzioni cumulative di CH₄ (mL/L) ottenute dalle prove sperimentali della I serie sperimentale condotta su Paglia di Grano (PG) e Paglia di Fungaia (PF). Si riportano le deviazioni standard dei valori medi di produzione di CH₄ calcolati per ogni condizione sperimentale (riportata in legenda) su 3 repliche.

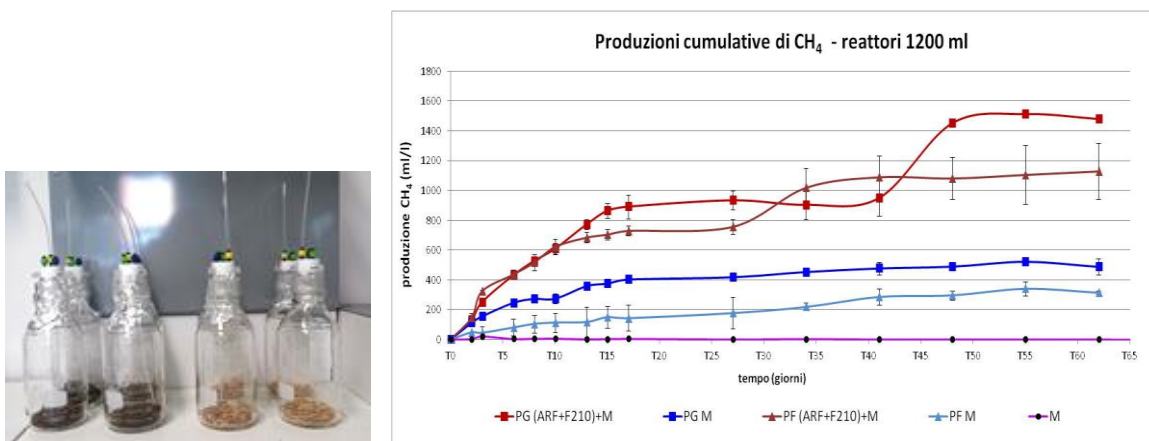


Figura 22. Produzioni cumulative di CH₄ (mL/L) ottenute dalle condizioni sperimentali della II Serie Sperimentale. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi di produzione di CH₄ calcolati per ogni condizione sperimentale (riportata in legenda) su 2 repliche. Per facilitare la lettura del grafico, i colori scelti per ogni condizione sperimentale corrispondono ai colori usati nella figura 21.

Nelle tabelle 7 e 8 sono riassunte le produzioni di CH₄ in termini di concentrazione nel biogas (%), produzioni cumulative a fine produzione e rese, rispettivamente per la prima e per la seconda serie sperimentale

Tabella 7. Prima Serie Sperimentale (120 mL). Tabella riassuntiva delle produzioni di metano calcolate al tempo di fine produzione per le differenti condizioni sperimentali (su 3 repliche): in giallo paglia le prove che sono state poi ripetute nel II esperimento. Sono riportati i valori medi e le deviazioni standard della concentrazione percentuale di CH₄ nel biogas, la produzione cumulativa di CH₄ e la resa di CH₄. Nella parentesi della prima colonna sono stati raggruppati gli inoculi condotti contemporaneamente. La barra (/) indica che non è stato potuto calcolare la resa di produzione in quanto quella condizione sperimentale (ovvero il controllo) è condotta in assenza di substrato.

Tabella riassuntiva delle produzioni di CH ₄ I Serie Sperimentale - batch da 120 mL				
Prove sperimentali	Tempo fine produzione	Concentrazione CH ₄ nel biogas (%)	Produzioni cumulative CH ₄ (mL/L)	Resa CH ₄ (mL/L)*gVS
PG M	T20	33,2 ± 1,7	484,0 ± 34,9	75,6 ± 5,5
PF M	T27	39,4 ± 13,4	366,2 ± 79,4	57,2 ± 12,4
PG (ARF + F ₂₁₀ + M)	T13	46,1 ± 2,2	775,9 ± 34,2	121,2 ± 5,4
PF (ARF + F ₂₁₀ + M)	T34	42,6 ± 4,8	618,4 ± 34,8	96,6 ± 5,4
PG (ARF + F ₂₁₀) + M	T41	55,1 ± 5,8	1041,9 ± 142,7	162,8 ± 22,3
PF (ARF + F ₂₁₀) + M	T41	43,4 ± 7,5	746,9 ± 100,2	116,7 ± 15,6
PF (F ₂₁₀) + M	T27	29,9 ± 2,3	428,1 ± 4,6	66,9 ± 0,7
M	T27	1,3 ± 0,4	20,1 ± 6,5	/

Tabella 8. Seconda serie sperimentale. Tabella riassuntiva delle produzioni di CH₄ calcolate al tempo di fine produzione per le differenti condizioni sperimentali (su 2 repliche). L'esperimento è stato condotto esclusivamente su paglia di grano. Nella parentesi della prima colonna sono stati raggruppati gli inoculi condotti contemporaneamente. Sono riportati i valori medi e le deviazioni standard della concentrazione percentuale di CH₄ nel biogas, la produzione cumulativa e la resa. La barra (/) indica che non si è potuto calcolare la resa di produzione in quanto quella condizione sperimentale (ovvero il controllo) è condotta in assenza di substrato.

Tabella riassuntiva delle produzioni di CH ₄ II Serie Sperimentale - scale-up 10x- batch da 1,2 mL				
Prove sperimentali	Tempo fine produzione	Concentrazione CH ₄ nel biogas (%)	Produzioni cumulative CH ₄ (mL/L)	Resa CH ₄ (mL/L)*gVS
PG M	T55	46,1 ± 2,4	522,4 ± 26,5	81,6 ± 4,1
PF M	T55	26,3 ± 8,3	341,6 ± 46,6	53,4 ± 7,3
PG (ARF + F ₂₁₀) + M	T41	60,2 ± 4,6	949,6 ± 122,8	148,4 ± 40,8
PF (ARF + F ₂₁₀) + M	T55	56,1 ± 4,8	1105,5 ± 196,2	172,7 ± 30,7
M	T8	0,6 ± 0,3	5,3 ± 3,0	/

Caratterizzazione delle comunità microbiche e degli inoculi

L'analisi della composizione delle comunità microbiche presenti nell'inoculo a metano (M) consente di valutare come nel corso del processo le comunità si siano modificate in relazione alle condizioni sperimentali dei reattori. L'inoculo rappresenta infatti la potenzialità dell'attività metanogenica dei microrganismi in esso contenuti. L'interesse nella sua caratterizzazione è stato quindi rivolto soprattutto alla guild deputata alla produzione di CH₄ e, stante le condizioni di mesofilia (37 °C) in cui hanno operato i reattori, è stata analizzata la componente degli acetotrofi. Per entrambe le serie sperimentali è stato utilizzato lo stesso inoculo. L'analisi FISH ha consentito di rilevare la presenza del 18,6 ± 2,0% di cellule positive alla sonda per gli *Archaea* (ARCH915) rispetto a quelle visualizzate in DAPI mentre il 49,1 ± 6,0% delle cellule positive è risultato positivo alle sonde per gli *Eubacteria* (EUB338,II,III) (Fig. 23).

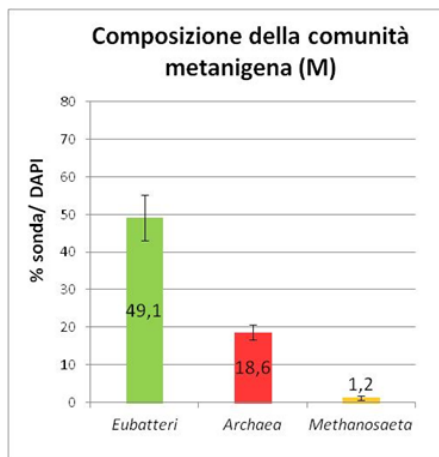


Figura 23. Composizione in *Archaea* ed *Eubacteria* della comunità metanigena utilizzata come inoculo (M) per entrambe le serie sperimentali definita mediante analisi FISH; è riportata anche la frazione del genere *Methanosaeta*, individuati mediante riconoscimento morfologico. Si riportano le deviazioni standard dei valori medi calcolati su 3 repliche.

D'altra parte, analizzando la componente acetotrofa, solo l'1,2% risultava costituito da *Archaea* metanigeni del genere *Methanosaeta*, specialisti nell'uso dell'acetato. Questi erano quasi sempre localizzati all'interno di ammassi cellulari, collocati nella parte più interna (figura 24); gli *Archaea* metanigeni del genere *Methanosarcina*, l'altra componente degli acetotrofi, che ecologicamente si contrappone ai primi per essere generalisti nell'uso dell'acetato (possono anche utilizzare H₂/CO₂ e metilammine) sono stati rilevati sporadicamente, (<0,5%) (Figura 24B).

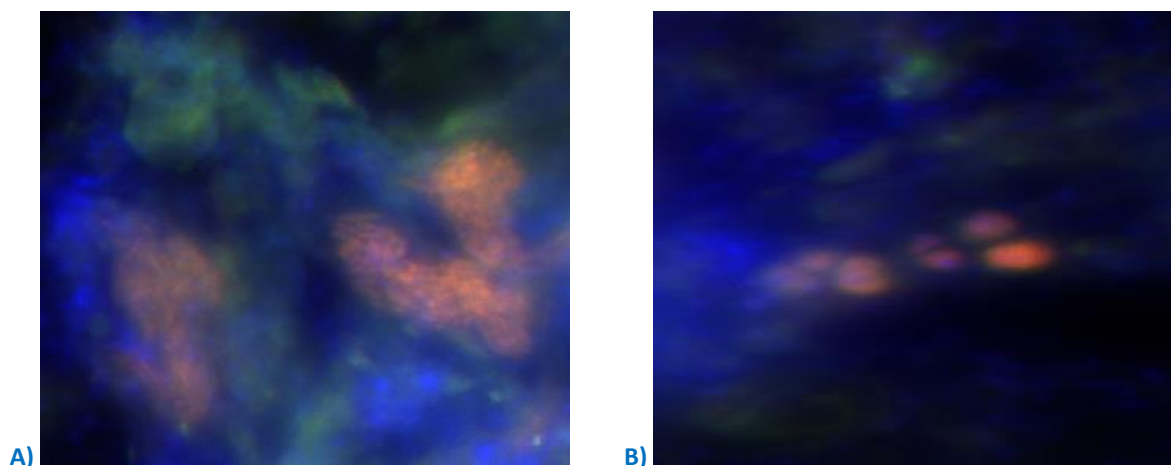


Figura 24. Micrografie ottenute evidenziando le componenti microbiche mediante tecnica FISH relative alla visualizzazione di raggruppamenti di *Methanosaeta* (in A) e *Methanosarcina* (in B) presenti nell'inoculo a CH₄. Le micrografie sono state ottenute mediante microscopio ed epifluorescenza Zeiss (Axioskop, 40 – Germany) (Micrografia G. Dottorini)

Nella comunità metanigena usata per l'inoculo M, è stata rilevata anche la presenza anche di *Archaea* metanigeni con morfologia bastoncellare (diplo-bacillo) e puntiforme (streptococco-catenelle di puntiformi), non riconducibili agli unici due generi riconosciuti di acetotrofi *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (Fig. 25). D'altra parte, come si osserverà in seguito, in accordo con le concentrazioni di acido acetico rilevate nel corso degli esperimenti, quale intermedio di reazione, si assisterà ad un incremento dei *Methanosaeta*, e questi risulteranno coinvolti principalmente nella fase di produzione esponenziale di metano, mentre si ritiene che altre guild di metanigeni possano essersi sviluppati a fine processo.

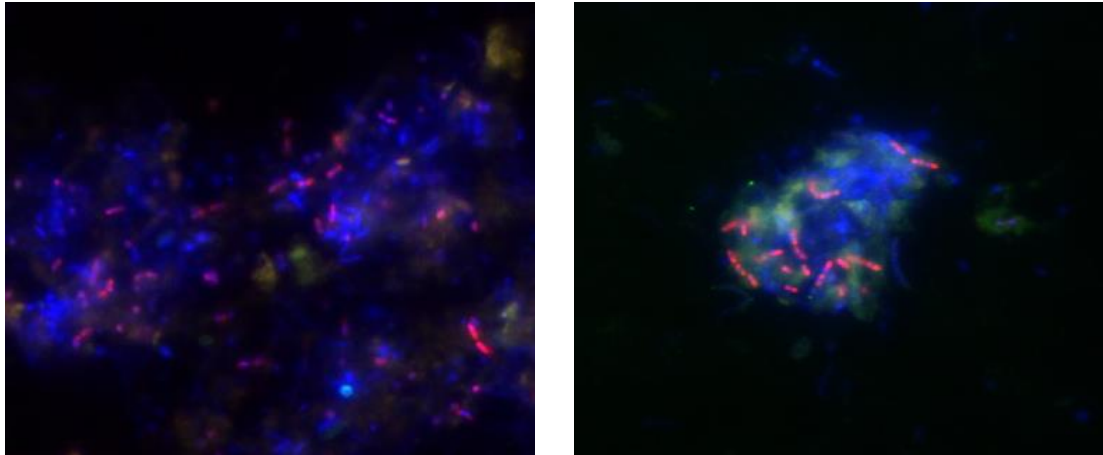


Figura 25. Micrografie ottenute evidenziando le componenti microbiche mediante tecnica FISH relative alla visualizzazione di *Archaea* (sonda "ARC915" in rosso) con morfologie cellulari non riconducibili ai noti generi di metanigeni acetotrofi. La micrografia è stata ottenuta mediante microscopio ed epifluorescenza Zeiss (Axioskop, 40 - Germany) (Micrografia G. Dottorini)

Le caratteristiche dell'inoculo F210 sono già state descritte nel Rapporto tecnico RdS/PAR2011/304. Per l'inoculo ARF è stata utilizzata una mix di due ceppi, *Orpynomyces sp* e *Neocallimastix sp*, anch'essi già precedentemente descritti [Rapporto tecnico RdS/PAR2012/2013/183].

Caratterizzazione delle comunità microbiche presenti nei reattori

Densità cellulare. In figura 26 sono mostrati i valori di densità cellulare (n° cell/mL) ottenuti per le diverse condizioni sperimentali della prima e della seconda serie sperimentale, nelle fasi di:

- avvio del processo o start-up (T2);
- fase di produzione esponenziale di metano (T6);
- fine produzione di metano.

Nelle prove condotte sulle due tipologie di paglie e nei reattori di entrambe le serie sperimentali, la densità cellulare aumenta nel tempo, passando cioè dalla fase di avviamento del processo (start-up), alla fase di produzione esponenziale di CH₄ ed infine alla fase di fine produzione (Fig. 26 A e B). I risultati più interessanti si ottengono per le prove condotte in reattori in bistadio su Paglia di Grano (PG) e Paglia di Fungaia (PF): per queste condizioni infatti la fase di avvio del processo presenta la stessa densità cellulare della fase di massima produzione (peraltro maggiore rispetto a fine produzione) evidenziando il vantaggio conferito dal primo stadio nei riguardi dei microorganismi idrolitici e fermentanti. E' da sottolineare che per queste prove, che mostrano le più elevate densità cellulari, si riscontrano le maggiori produzioni di metano (Fig. 21, Tab. 7).

Questi risultati evidenziano l'efficacia della bioaugmentation e della configurazione di processo in bistadio che consente alla guild di metanigeni di avviare con efficienza il processo di DA, raccordandosi metabolicamente alle popolazioni di ARF e di F210, dopo che queste hanno avuto la possibilità di svilupparsi ed accrescersi in condizioni di optimum ecologico nel primo stadio del reattore in configurazione bistadio.

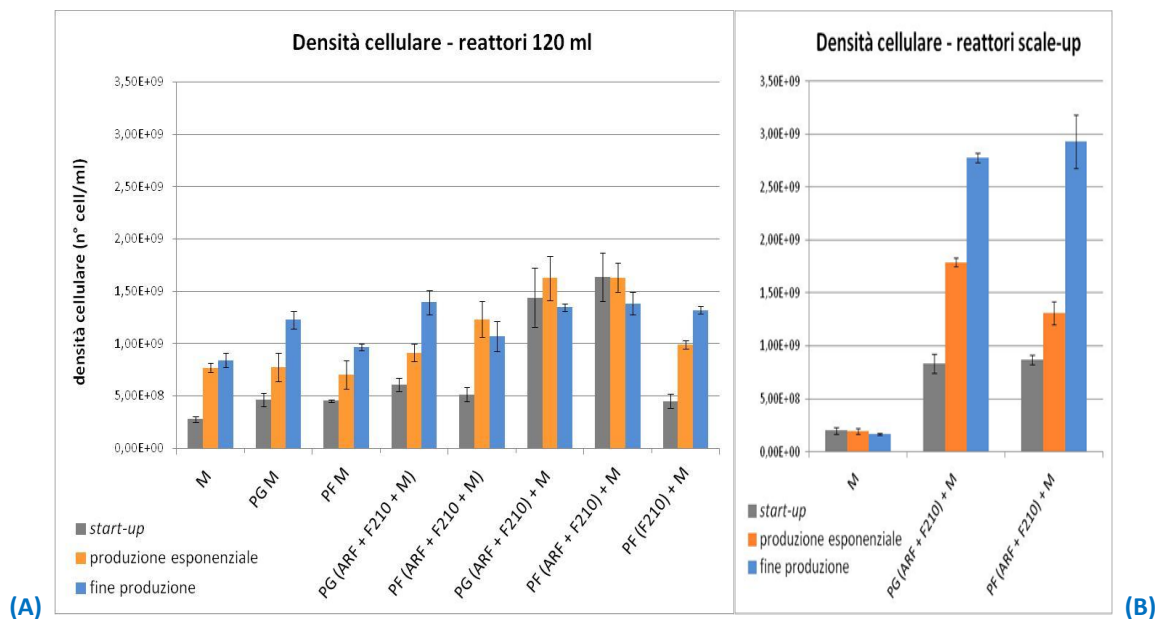


Figura 26. Densità cellulare calcolata nei reattori della I serie sperimentale (A) e della seconda (B) rilevata mediante colorazione DAPI. Si riporta anche la densità della prova di biometanazione potenziale (controllo) condotta con M in assenza di substrato. I diversi colori degli istogrammi indicano i tempi di campionamento analizzati: in grigio: “start-up”= 2 giorni dopo l’inoculo della comunità M; in arancione: “fase esponenziale”= T6, tempo relativo alla produzione esponenziale di metano riportata in figura 21; in blu: “fine produzione” = tempo relativo alla produzione massima di metano a fine processo riportata in figura 21 (questa fase viene raggiunta in giorni diversi dalle varie condizioni sperimentali). Si riportano le deviazioni standard dei valori medi calcolati per ogni condizione sperimentale

Ciò appare ancor più evidente se si considerano le analoghe prove in monostadio PG(ARF+F210+M) nonché PF(ARF+F210+M) per entrambe le quali nelle fasi iniziali (start-up) si rileva una densità cellulare significativamente minore della fase esponenziale (Fig. 26): per queste prove, seppur potenziate con ARF ed F210, le produzioni di metano sono state inferiori (Fig. 21). Inoltre nella prima serie sperimentale il monostadio su paglie già colonizzate da ife fungine - PF(ARF+F210+M) - non mostra differenze tra le fasi di massima produzione e fine produzione.

L’analisi FISH è stata effettuata sulle condizioni sperimentali dalle quali sono state ottenute le maggiori produzioni di CH₄: per entrambe le serie sperimentali, in particolare, sono stati analizzati campioni relativi alle condizioni sperimentali in bistadio, in cui la comunità metanigena è stata potenziata mediante bioaugmentation con ARF ed F210. Le indagini sono state circoscritte alle fasi di produzione esponenziale di metano e di fine produzione.

Fase esponenziale di produzione di CH₄

Nella prima serie sperimentale nelle condizioni sperimentali PG(ARF+F210)+M e PF(ARF+F210)+M, i metanigeni predominanti sono gli acetotrofi *Methanosarcinales* (figura 27A), ed all’interno di questi prevalgono gli acetotrofi obbligati *Methanosaeta* (figura 27 B). Nelle condizioni sperimentali in monostadio prive di bioaugmentation, i *Methanosarcinales* costituiscono solo una parte della guild di metanigeni (corrispondente a circa i 2/3 in PG e 1/2 su PF), mentre la componente dei *Methanosaeta*, a sua volta, rappresenta circa la metà dei metanigeni acetotrofi.

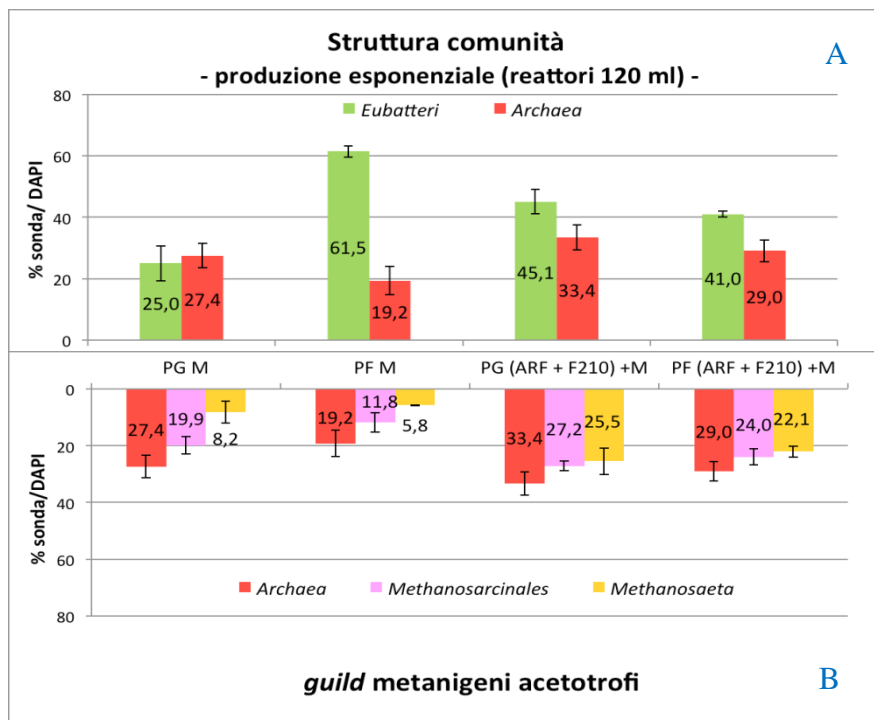


Figura 27. A) composizione percentuale in *Eubacteria* ed *Archaea* stimate mediante FISH delle comunità microbiche nella fase di massima produzione di CH₄ (Fig. 21), nella prima serie sperimentale. B) composizione percentuale della relativa *guild* di metanigeni acetotrofi. La composizione è espressa come percentuale di cellule che hanno risposto positivamente alla sonda rispetto alla colorazione DAPI (percentuale riportata nell'etichetta degli istogrammi). Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni condizione sperimentale in triplicato.

I *Methanosaeta* sono specializzati nell'utilizzare l'acetato a basse concentrazioni (5-20 µM), a differenza dei *Methanosarcina* che necessitano di una concentrazione minima pari a 1 mM [32. Liu and Whitman, 2008]. La predominanza dei primi e l'assenza dei secondi è quindi in accordo con le basse concentrazioni di acido acetico rilevate, e con i dati ampiamente riportati in letteratura [13. Conklin et al., 2006; 28. Klockea et al., 2008; 15. Demirel et al., 2008; Toumi et al., 2015]. Si ritiene pertanto che le produzioni di metano osservate in questa fase (Fig. 21 e 22) siano da attribuirsi principalmente ai *Methanosaeta*: in particolare le maggiori produzioni di CH₄ si ottengono per le condizioni sperimentali costituite da una loro predominanza non solo all'interno della *guild* di metanigeni acetotrofi (*Methanosarcinales*) ma anche all'interno del dominio *Archaea*. Tali deduzioni si applicano anche alle condizioni bistadio su PG della seconda serie sperimentale. Nella seconda serie sperimentale la maggiore percentuale di *Archaea* sui batteri totali (28,9%) osservata per le condizioni sperimentali in bistadio con ARF e F210 su PG rispetto alla percentuale di *Archaea* su PF (13,7%), coincide con le minori produzioni di CH₄ rilevate su PF rispetto a PG (Fig. 28 A). Le condizioni della seconda serie sperimentale presentano una composizione analoga a quelle della prima serie riguardo la *guild* di metanigeni: su PG bistadio (Fig. 28 B) si rileva, per esempio, una frazione minore di *Methanosarcinales* rispetto alla rispettiva condizione bistadio PG della prima serie (27,2% *Methanosarcinales*), ma in entrambi i casi i *Methanosarcinales* sono costituiti interamente da *Methanosaeta* (i rispettivi valori percentuali non sono significativamente diversi).

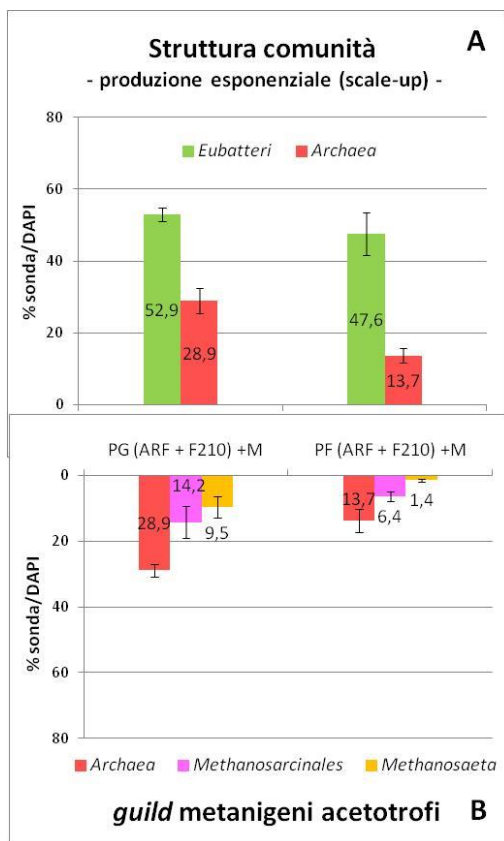


Figura 28. In A) composizione percentuale in Eubacteria ed Archaea stimate mediante tecnica FISH delle comunità microbiche nella fase di produzione esponenziale di metano (Fig. 22), nella seconda serie sperimentale (scale-up). In B) composizione percentuale della relativa guild di metanigeni acetotrofi. La composizione è espressa come percentuale di cellule che hanno risposto positivamente alla sonda rispetto alla colorazione DAPI (percentuale riportata nell’etichetta degli istogrammi). Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni condizione sperimentale in triplicato.

Riguardo le densità cellulari rilevate nella prima serie sperimentale (Fig. 29), nelle prove bistadio PG(ARF+F210)+M e PF(ARF+F210)+M il numero di *Eubacteria* e di *Archaea* è maggiore rispetto alle condizione monostadio prive di bioaugmentazione, e nel passaggio di scala effettuato nella seconda (Fig. 28), sia *Eubacteria* che *Archaea* sono presenti (e dunque attivi) in quantità maggiori su PG piuttosto che su PF, evidenziando ancora una volta come la paglia di grano rappresenti un substrato più idoneo della paglia di fungaia per le produzioni di biogas.

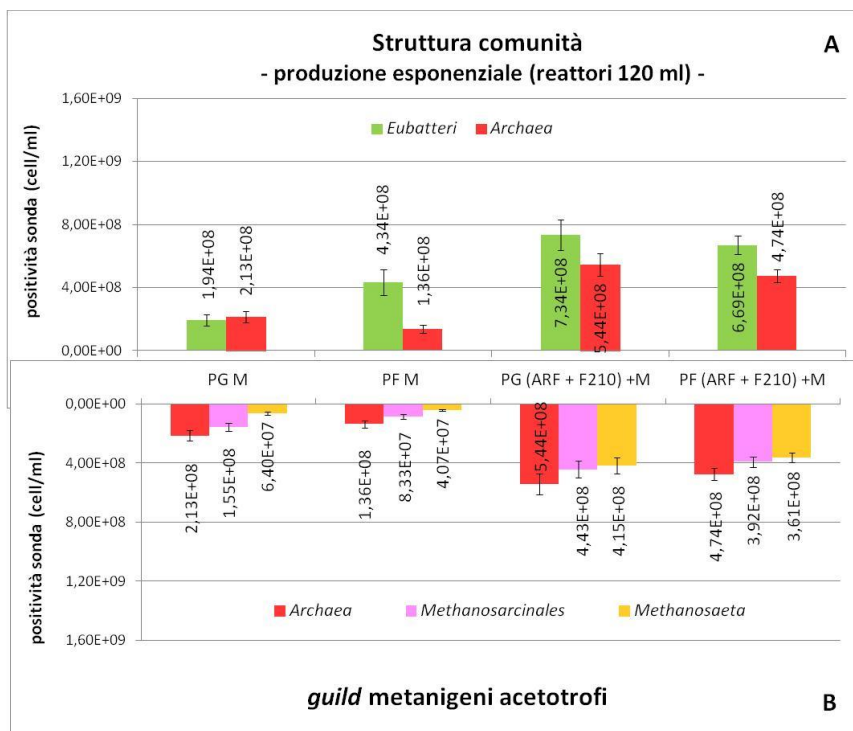


Figura 29. Densità cellulare delle principali componenti della comunità microbica nei reattori della I Serie Sperimentale in corrispondenza della fase di produzione esponenziale di CH₄ (Fig. 21). I valori di densità media sono stati calcolati moltiplicando il valore percentuale di ciascuna componente (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° cell/mL che hanno risposto positivamente alle sonde FISH (riportate anche nelle etichette degli istogrammi). Le barre di errore riportano le deviazioni standard della densità media calcolata su tre repliche. In A, composizione in *Eubacteria* ed *Archaea*; in B, composizione delle rispettive *guild* dei metanigeni acetotrofi.

Nella fase di fine produzione la composizione percentuale in *Eubacteria* ed *Archaea* tende ad uniformarsi per tutte condizioni sperimentali della prima serie sperimentale (Fig. 30): si osserva cioè che i valori relativi a ciascun dominio non sono più significativamente diversi tra le condizioni sperimentali. In particolare in tutti i reattori della prima serie viene raggiunta una percentuale di *Archaea* di circa il 30%, mentre la percentuale di *Eubacteria* si stabilizza intorno al 50%. Per quanto riguarda le *guild* di metanigeni, la percentuale di *Methanosarcinales* si uniforma per tutte le prove al 10÷14%. Il fatto che si osservi questa significativa diminuzione della proporzione di *Methanosarcinales* rispetto alla fase esponenziale (più che altro per le condizioni bistadio), fa supporre che le produzioni di CH₄ al termine del processo siano operate non solo dagli acetotrofi ma in buona parte anche da altre *guild* di *Archaea*. Tali supposizioni si applicano anche alla condizioni bistadio della seconda serie sperimentale: infatti, come rilevato nella la fase esponenziale, in nessuna delle due prove bistadio sono state rilevate frazioni significative di *Methanosarcina* mentre i *Methanosaeta* si attestano tra 2,8% e 2,6% per PG e PF rispettivamente, cioè rappresentano una frequenza bassa rispetto ai *Metanosarcinales* rilevati, rispettivamente all' 11,4% e 15,2%.

E' da sottolineare però che la composizione della comunità nella miglior prova (bistadio su PG) ottenuta in entrambe le serie sperimentali segue andamenti analoghi nei due tempi di campionamento considerati: cioè in entrambe le serie sperimentali mantiene per lo più frequenze e densità dei taxa costanti tra fase di produzione esponenziale e a fine produzione di metano, con un notevole aumento di densità in questa ultima fase della seconda serie sperimentale.

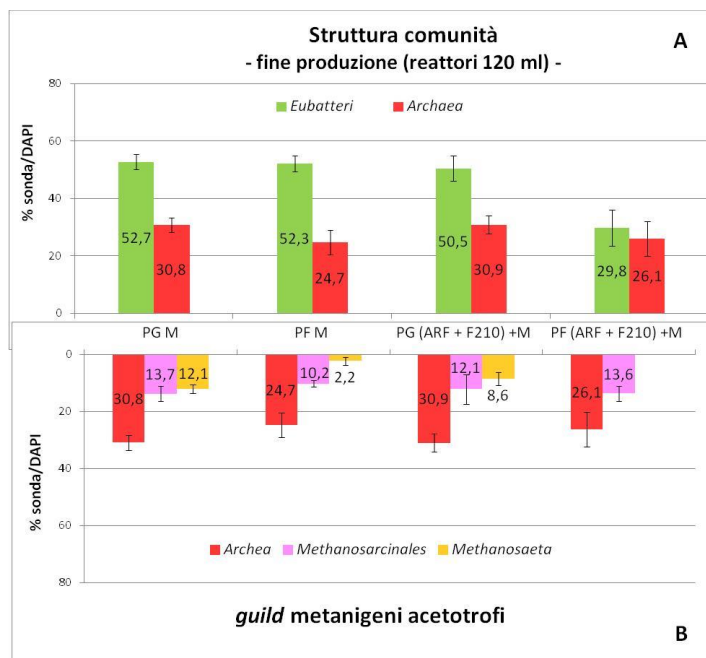


Figura 30. In A) composizione percentuale in *Eubacteria* ed *Archaea* stimate mediante FISH delle comunità microbiche nella fase di fine produzione di CH₄ (Fig. 21), nella prima serie sperimentale. In B) composizione percentuale della relativa guild di metanigeni acetotrofi. La composizione è espressa come percentuale di cellule che hanno risposto positivamente alla sonda rispetto alla colorazione DAPI (percentuale riportata nell’etichetta degli istogrammi). Si riportano le deviazioni standard dei valori medi percentuali calcolati per ogni condizione sperimentale in triplicato.

Nel corso della quantificazione della comunità microbica mediante analisi FISH, in tutte le condizioni sperimentali di entrambe le serie, è stato inoltre riscontrata la presenza di aggregati cellulari (Fig. 31).

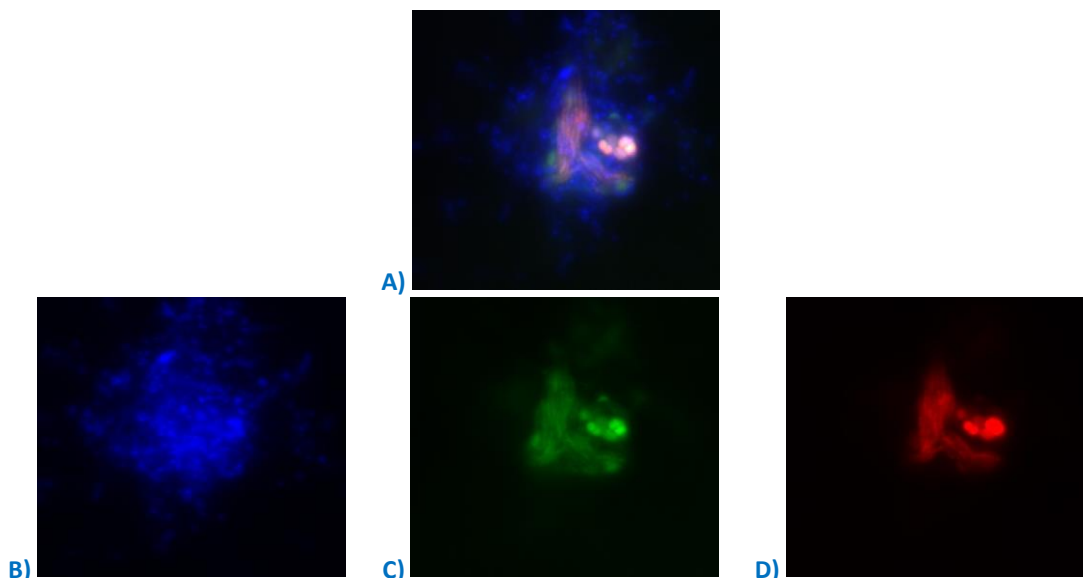


Figura 31. Visualizzazione, in microscopia ad epifluorescenza, di aggregato cellulare mediante tecnica FISH. in A) sovrapposizione di tutte le colorazioni fluorescenti; in B) rilevazione di tutte le cellule del campione mediante colorazione DAPI (blu); in C) rilevazione del dominio Archaea mediante sonda ARC915 marcata con fluorocromo FITC (verde); in D) rilevazione dell’ordine *Methanosarcinales* mediante sonda MSMX860 marcata con fluorocromo CY3 (rosso);. Si noti la posizione centrale degli *Archaea* all’interno dell’agglomerato: morfologia filamentosa tipica del genere *Methanosaeta* e morfologia globulare aggregata tipica del genere *Methanosarcina* (micrografie di G. Dottorini).

Studi recenti [Shen et al., 2015] stanno infatti mettendo in luce l'importanza della disposizione spaziale di batteri appartenenti alle diverse guild. Infatti solo se i microorganismi sono in contatto fisico tra loro, meglio se con disposizioni ben strutturate e organizzate, sono in grado di ottimizzare gli scambi metabolici ed il trasferimento di elettroni. In particolare, la struttura degli aggregati rilevati, è costituita nella porzione centrale dagli *Archaea* metanigeni circondati da *Eubatteri*: questa posizione è anche assunta a causa della elevata sensibilità degli *Archaea*, soprattutto *Methanosaeta*, alle variazioni dell'ambiente circostante. In tal modo risultano maggiormente protetti e al contempo ricevono gli elementi necessari alla loro crescita. Inoltre la presenza di metanigeni positivi alla sonda per gli *Archaea* ma negativi alla sonda degli acetotrofi (*Methanosarcinales*) fa supporre che nei reattori siano presenti altre componenti di metanigeni coinvolte nella produzione di biogas, soprattutto nella fase finale di produzione. In particolare, tramite confronto morfologico con una libreria di micrografie realizzate nel laboratorio ENEA [Report RdS/PAR2014/145] si ipotizza che i microorganismi che rispondo alle analisi FISH nel modo riportato poco sopra, possano essere metanigeni idrogenotrofi mesofili.

Le informazioni a disposizione in letteratura riguardo l'ecologia microbica della DA a livello di comunità sono infatti ancora incomplete, mentre quelle riguardanti la composizione tassonomica a livello di guild funzionali possiamo affermare che sono solo agli inizi: considerando che l'aspetto microbiologico rappresenta un settore di ricerca di recente interesse e sviluppo nella DA, ulteriori indagini sono necessarie per chiarire anche alcuni aspetti messi in luce con il presente studio.

2.3 Risultati ottenuti nello scaling up delle sperimentazioni di bioaugmentation

In questa breve sessione vengono riassunti i dati ottenuti operando lo scale-up 1:10:100 delle sperimentazioni di DA condotte in modalità batch, mesofilia (37 °C) e con paglia di grano fornita come unico substrato e in condizioni di bioaugmentation della comunità metanigena: per tutte le prove sperimentali la comunità microbica è stata arricchita con funghi anaerobi ruminali ARF + il pool batterico fermentante F210. L'analisi dei risultati è ancora in corso.

Di seguito sono elencate le produzioni di idrogeno e metano ottenute nelle prove delle campagne di analisi fatte nel 2015 (Tab. 9a e 9b) e nel 2016 (Tab. 10a e 10b) nei reattori da:

- 120 mL, presso l'Università Federico II, nell'ambito di un accordo di collaborazione [RdS/PAR2014/144] utilizzando sia paglia di grano che paglia sfruttata per la produzione del fungo commestibile *Pleurotus* e pertanto già colonizzata da ife fungine aerobiche;
- 1,2 L, presso i laboratori ENEA, utilizzando la paglia di grano, avendo essa fornito le migliori produzioni;
- 12 L, svolte presso l'Università Federico II ed oggetto delle attività della presente annualità.

ANNUALITA' 2015

Tabella 9a – Produzioni di metano nei reattori da 120 mL (CA2015*) a fine produzione

	Test	CH ₄ %	CH ₄ (mL/L)	CH ₄ (mL/L·gSV ⁻¹)
controllo	a ₁₂₀	33,2±1,7	484,0±34,9	75,6±5,5
monofase	b ₁₂₀	46,1±2,2	775,9±34,2	121,2±5,4
bifase	c ₁₂₀	55,1±5,8	1041,9±142,7	162,8±22,3

*CA2015 = Campagna Analisi 2015

Tabella 9b - Produzioni di metano nei reattori bi-fase da 1,2 L

	Test	CH ₄ %	CH ₄ (mL/L)	CH ₄ (mL/L·gSV ⁻¹)
controllo	a _{1200-A}	46,1±2,4	522,4±26,5	81,6±4,1
bifase	c _{1200-B}	60,2±4,6	949,6±122,8*	148,4±40,8*

ANNUALITA' 2016

Tabella 10a – Produzioni di idrogeno (Fase 1) e metano (Fase 2) nei reattori da 12 L (CA2016*); questa annualità differisce per le caratteristiche dell'inoculo metanigeno che non deriva da digestato di scotta, ma da digestato di reflui bufalini

	Test	H ₂ (mL/L)	H ₂ (mL·gSV ⁻¹)	CH ₄ (mL/L)	CH ₄ (mL·gSV ⁻¹)
controllo	A	1,1±0,1	0,17	1414±11	220,9±1,8
monofase	B	5,7±0,8	0,90	2001±149	312,6±23,2
bifase	C	115,8±14,1	14,5	2072±200	323,7±31,3

*CA2016 = Campagna Analisi 2016

Tabella 10b – Produzioni di idrogeno (Fase 1) e metano (Fase 2) nei reattori da 120 mL senza sterilizzazione del substrato (TNS)

Test	H ₂ (mL/L)	H ₂ (mL·gSV ⁻¹)	CH ₄ (mL/L)	CH ₄ (mL·gSV ⁻¹)
Bb _{monofase}	-	-	1802,0±89,6	296±14,1
Cb _{bifase}	50,9±37,8	9,8±4,7	1632,1±190,4	293±29,8

2.4 Microscopia e microscopia in epifluorescenza per il rilevamento dei funghi anaerobi ruminanti

Questa parte di ricerca è stata finalizzata per la messa a punto di tecniche di colorazione, riguardanti la visualizzazione tramite microscopia ad epifluorescenza, di ceppi fungini anaerobi utilizzati presso i nostri laboratori. Studi recenti stanno mettendo in luce il crescente interesse, da parte della comunità scientifica, verso i funghi anaerobi e i substrati vegetali. Infatti, questi microrganismi giocano un ruolo importante nella digestione enzimatica di substrati cellulosici e lignocellulosici [31. Leis et al., 2014] per questo, si sono dimostrati essere una componente microbica estremamente efficace per potenziare la fase di idrolisi della digestione anaerobica in quanto sono in grado di degradare biomasse complesse come quelle vegetali con i loro rizoidi e i diversi enzimi cellulolitici [18. Dollhofer et al., 2016].

Dunque, ai fini dei prossimi studi sulle comunità microbiche coinvolte nella digestione anaerobica, sono state effettuate diverse prove di colorazione per investigare, identificare e quantificare, la componente fungina anaerobica presente (*Neocallimastix* e *Orpinomyces sp.*). In particolare, per migliorare la visualizzazione finale dei preparati cellulari si è ricorso alla messa a punto di particolari tecniche di colorazione in modo da consentire: un forte contrasto tra le cellule e il fondo, differenziazione di vari tipi morfologici, messa in evidenza e discriminazione di particolari strutture cellulari (zoosporangi, ife, spore, forme di resistenza). Molti di questi coloranti fluorescenti vengono applicati per la visualizzazione di strutture di funghi aerobi in campioni di varia natura. Dunque in questo contesto si è passati, valutandone l'affidabilità, alla loro applicazione per l'individuazione dei funghi anaerobi, all'interno di comunità complesse. In particolare sono stati testati i seguenti coloranti:

- Calcofluor White M2R (CFW)
- Sytox green (Green Nucleic Acid Stain)
- Propidium iodide (PI)
- Dapi (4,6-diamidino-2-fenilindole)
- Live/Dead (kit Live/Dead Bacterial Viability Kit, BacLight™)
- Blu di Lattofenolo (*Lactophenol cotton blue* -LPCB).

Tali coloranti fluorescenti rispondono all'eccitazione della lampada (HXP – 120V), dopo il che il raggio luminoso ha attraversato specifici filtri del di cui è dotato il microscopio (AXIOSKOP 40, Zeiss, Germania) emettendo fluorescenza a diverse lunghezze d'onda. Invece, l'osservazione microscopica dei preparati con il Blu di Lattofenolo si può attuare direttamente in con contrasto di fase e osservazione a fresco dei campioni. Al fine di favorire una migliore valutazione e discriminazione di differenze morfologiche e di composizione di particolari strutture cellulari potrebbero essere impiegate colorazioni combinate che prevedono l'impiego di più coloranti. Come riportato da Gerphagnon et al., 2013 [20] è stato testato il metodo della doppia colorazione basato sull'uso combinato di due coloranti, *Calcofluor white* (CFW) [Rasocniet al., 2009] specifico per cellulosa, ma anche per chitina di cui è costituita la parete cellulare fungina, e *Sytox green* colorante degli acidi nucleici. In questo caso il *Sytox green* non viene utilizzato per identificare le cellule vitali come nella tecnica *Live-Dead* ma per la sua capacità di emettere fluorescenza verde quando legato agli acidi nucleici.

La parte innovativa di questo studio ha riguardato l'efficacia di un terzo colorante, il *Propidium Iodide* (PI) usato in combinazione con i due di cui sopra. *Propidium Iodide* viene utilizzato, come riportato da Games et al., 1980 [19], per evidenziare l'efficienza della vitalità fungina; infatti la molecola si lega non solo alle cellule con membrana cellulare degenerata ma anche ai nuclei delle cellule eucariotiche mostrandone in questo caso la loro vitalità. Colorazioni *Dapi* (4,6-diamidino-2-fenilindole) e *Live/Dead* già testate in passato sono state da supporto per le prove preliminari di identificazione.

La colorazione con Blu di Lattofenolo si è dimostrata particolarmente efficace per i funghi anaerobi in quanto consente di evidenziare anche lo sviluppo delle strutture fungine adese a residui di materiale vegetale. Dunque questa colorazione si è dimostrata la più interessante per visualizzare i funghi sia in campioni ambientali che in campioni provenienti da impianti a biogas.

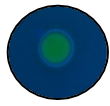

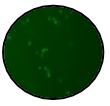
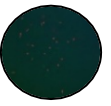
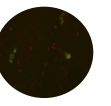
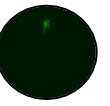
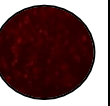
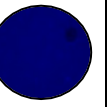
In tabella 11 sono riportate le diverse concentrazioni di coloranti e i differenti tempi di incubazione a cui e sono stati sottoposti i due ceppi di ARF prima di venir osservati con microscopio ad epifluorescenza.

Tabella 11. Coloranti testati per differenti concentrazioni, dosaggi e tempi di incubazione

Coloranti	CFW Sytox green	CFW	Sytox green	CFW Sytox green PI	Syto9 PI	Syto9	PI	Dapi
Concentrazione	2,5% 0,1 µM	2,5%	0,1 µM 0,2 µM	2,5% 0,1 µM 20 mM	33,4 µM 20 mM	33,4 µM	20 mM	1 µg·mL ⁻¹
Tempo di incubazione	5' 55'	60'	55' 55'	5' 55' 55'	15' 60'	15' 60'	15' 60'	15' 60'

Test preliminari (Tabella 12) di colorazione sono stati effettuati su colture di *Orpinomyces* sp. di 40 giorni. Si possono osservare zoosporangi in tre colorazioni diverse (CFW-Sytox green; solo CFW; DAPI); cellule fungine – zoospore - in tutte le altre colorazioni; completa assenza di segnale con il Syto9.

Tabella 12. Micrografie test preliminari di colorazione su *Orpinomyces* sp di 40 giorni.
Legenda: "NT": non testato; "+" : risposta positiva al colorante; "-" mancata penetrazione del colorante

Colorazione	CFW Sytox green	CFW	Sytox green	CFW Sytox green PI	Syto9 PI	Syto9	PI	Dapi
Orpinomyces	+/-	+	+	+/- /+	- /+	-	+	+
Micrografie								
Neocallimastix	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Successivamente, test di colorazione sono stati effettuati, per entrambi i ceppi fungini, su colture attive da 24 ore e dopo 7 giorni (Tab. 13 e 14).

La colorazione con DAPI ha dato esito sempre positivo e le zoospore si mostravano particolarmente fluorescenti, e quindi ben rilevabili, per entrambi i ceppi; la doppia colorazione (CFW-Sytox green) ha consentito la visualizzazione sia degli zoosporangi che delle zoospore per entrambi i ceppi. I risultati ottenuti suggeriscono l'utilizzazione della doppia colorazione CFW+Sytox green come proposto da Gerphagnon et al., 2013 [20] per visualizzare e quantificare tramite conta gli zoosporangi e le zoospore di entrambi i ceppi fungini utilizzati. Va comunque evidenziato che il *Calcofluor* dà una fluorescenza poco rilevante se impiegato da solo, mentre la copresenza del *Sytox green* ne migliora il risultato: ciò è probabilmente dovuto al fatto che il *Calcofluor* si lega alla chitina, di cui è costituita la parete degli zoosporangi mentre il *Sytox green* si lega agli acidi nucleici. La colorazione combinata *Calcofluor-Sytoxgreen-Propidium Iodide* è risultato essere un valido metodo, applicabile per la visualizzazione, il rilevamento e l'enumerazione delle zoospore.

Tabella 13. Micrografie di test di colorazione su colture di 24 ore di *Orpinomyces* sp. e *Neocallimastix* sp.
Legenda: “+” penetrazione del colorante; “-” mancata penetrazione del colorante
(Micrografie effettuate da V. Mazzurco Miritana)



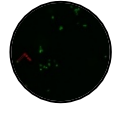
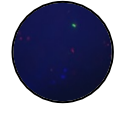
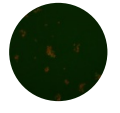
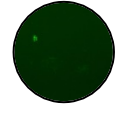




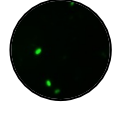
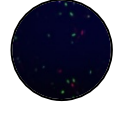
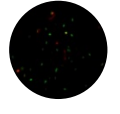
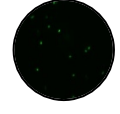




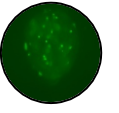

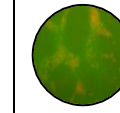
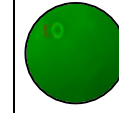
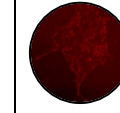
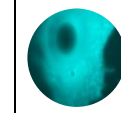


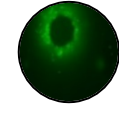
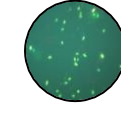
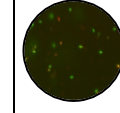
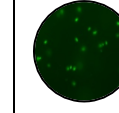
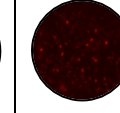
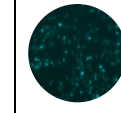
Colorazione	CFW Sytox green	CFW	Sytox green	CFW Sytox green PI	Syto9 PI	Syto9	PI	Dapi
Orpinomyces ≈ 24 h	+/+	-	+	+ / + / +	- / +	-	+	+
Micrografie								
Neocallimastix ≈ 24 h	+/+	+	+	+ / + / +	+ / +	+	+	+
Micrografie								

Tabella 14. Micrografie: test di colorazione su colture di 7 giorni di *Orpinomyces* e *Neocallimastix* sp.
Legenda come Fig. 3 (Micrografie effettuate da V. Mazzurco Miritana)

Colorazione	CFW Sytox green	CFW	Sytox green	CFW Sytoxgreen PI	Syto9 PI	Syto9	PI	Dapi
Orpinomyces 7 giorni	+/+	+	+	- / - / +	- / +	-	+	+
Micrografie								
Neocallimastix 7 giorni	+/+	+	+	+ / + / +	+ / +	+	+	+
Micrografie								

La colorazione con il Blu di Lattafenolo (15 µL di colorante direttamente sul campione posizionato sul vetrino da microscopia) è risultato essere un ottimo metodo in quanto ha permesso l’identificazione dei funghi anaerobi all’interno di filamenti di paglia di grano mettendo così in evidenza le strutture fungine durante la degradazione.

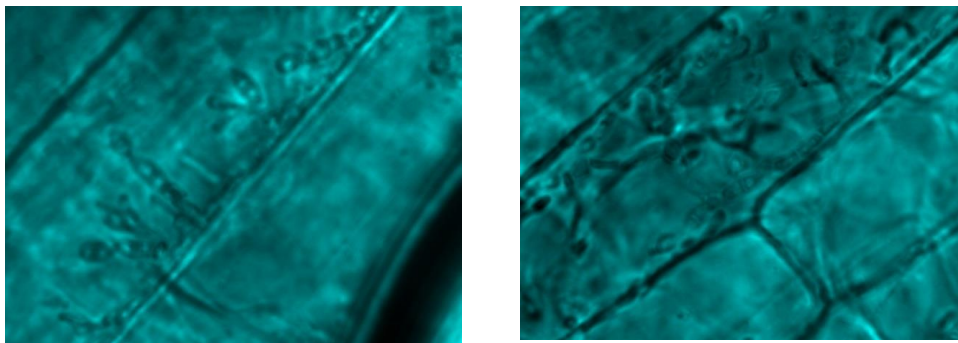


Figura 32. Micrografie ottenute con Blu di Lattafenolo: sono rilevabili le strutture fungine di *Neocallimastix* sp. su residui di paglia di grano (Micrografie effettuate da V. Mazzurco Miritana)

3 Conclusioni

Con le attività sperimentali di questa annualità si è inteso sintetizzare e completare le attività svolte nei precedenti anni. Pertanto sono stati approfonditi gli aspetti relativi al processo di DA utilizzando substrati recalcitranti alla degradazione biologica, di natura lignocellulosica e chitinosa, potenziando la fase idrolitica e fermentativa della DA mediante bioaugmentation con Funghi Anaerobi Ruminanti e il pool batterico F210. Sono stati compiuti studi sulle caratteristiche delle comunità microbiche attive nel processo di Digestione Anaerobica, per approfondire quegli aspetti necessari per compiere il difficile passaggio di scala tra microscopici organismi produttori di metano e le quantità - misurate in m³ - di biogas prodotto nei digestori ed utilizzabile per le produzioni energetiche. Considerati i risultati degli studi, condotti con un approccio di co-trattamento, contestualmente al processo di DA, piuttosto che di pre-trattamento, che complicano la configurazione del processo con fasi aggiuntive a monte della DA hanno fornito interessanti risultati

Considerati i risultati ottenuti, collaborazione con l'Università di Napoli "Federico II" sono state programmate sperimentazioni, poi svolte nei loro laboratori, per un ulteriore passaggio di scala delle prove di potenziamento della comunità microbica (di seguito Bioaugmentation) di paglia grano già svolte negli anni precedenti, utilizzando reattori da 12 L.

Per quanto concerne la produzione di CH₄ da scarti chitinosi mediante bioaugmentation delle comunità microbiche attive nel processo di Digestione Anaerobica con ARF e F210 si può concludere che se da un lato, ai fini delle applicazioni pratiche, resta da migliorare la tempistica della DA di scarti chitinosi, indagando sulle condizioni create nelle prime settimane da un'elevata concentrazione di acetato, dall'altra, proprio i lunghi tempi hanno consentito di evidenziare alcuni aspetti salienti *inter-* ed *intra-guild* della comunità microbica. Anche Ghosh et al. (2016) [21] sottolineano che lo studio delle interazioni delle componenti microbiche, con particolare riguardo ai consorzi microbici di sintesi, cioè assemblati aggiungendo specifiche componenti, richiede monitoraggi continui e protratti delle produzioni di biogas, formazione di metaboliti, nonché dinamiche di popolazione.

I risultati salienti ottenuti con gli studi di questa tesi possono essere così riassunti:

- gli scarti dell'industria ittica, in particolare quelli chitinosi, refrattari alla degradazione per le caratteristiche strutturali delle molecole di cui sono composti, si sono dimostrati di grande interesse per le produzioni energetiche, essendo idonei alla degradazione da parte delle comunità microbiche attive nella produzione di metano;
- all'incremento della quantità di substrato fornito, si rileva una corrispondenza nell'incremento di metano prodotto, come pure un incremento nella densità microbica della comunità;
- a livello di comunità l'arricchimento della fase acidogenica-fermentante con F210 incrementa le produzioni di CH₄, mentre l'arricchimento con ARF deve necessariamente essere combinato con F210 per evitare che il "collo di bottiglia" del processo, che generalmente si verifica nella prima fase della DA a carico dell'idrolisi, sia trasferito alla fase successiva per un eccesso di acidi;
- nel primo esperimento la condizione ARF + F210 + M è la migliore sia in termini di quantità che di qualità di biogas prodotto;
- nell'esperimento di scale-up (10x) la condizione ARF + F210 + M ha mostrato le migliori produzioni in termini di qualità di biogas sia per concentrazione di CH₄, 77% con punte dell'83%, che per le più basse concentrazioni di H₂S nel biogas e di specie di solfuri nel mezzo liquido;
- in concordanza con il fatto che la maggior parte degli acidi intermedi di processo è risultata costituita da acido acetico, e che questo è presente in elevate concentrazioni (fino 0,7 g/L), la guild degli *Archaea* metanigeni acetotrofi è risultata prevalentemente composta da batteri *Methanosarcina*, generalisti nell'uso dell'acetato, mentre non sono stati rilevati gli specialisti *Methanosaeta*, acetotrofi obbligati.
- All'interno della guild degli *Eubacteria* la minore frazione di SRB è risultata coincidere con le minori concentrazioni di specie di solfuri rilevati nel mezzo di coltura, e con le minori concentrazioni di H₂S nel biogas, ottenute per la prova effettuata con entrambi gli inoculi, sia ARF che F210.

Per quanto concerne la produzione di CH₄ da scarti lignocellulosici mediante bioaugmentation delle comunità microbiche attive nel processo di Digestione Anaerobica con ARF e F210, l'analisi delle comunità microbiche ha fornito interessanti informazioni che possono venir così riassunte:

- la densità cellulare delle comunità microbiche è influenzata dalla bioaugmentation in configurazione bistadio ed infatti aumenta già dalla fase di start-up del processo, nella quale si ottengono valori significativamente maggiori rispetto ai reattori in configurazione monostadio;
- la fase esponenziale di produzione di metano, quella di maggior interesse per la gestione degli impianti di DA su scala reale, è costituita, nelle condizioni sperimentali dalle quali si ottengono le maggiori produzioni di CH₄, da una predominanza di metanigeni acetotrofi specialisti del genere *Methanosaeta*, sia come principali rappresentanti dell'ordine *Methanosarcinales* (metanigeni acetotrofi), sia come principali rappresentanti del dominio *Archaea* (metanigeni). Una loro predominanza sui *Methanosarcina*, comunque presenti nell'inoculo a CH₄, fa supporre una maggiore stabilità del processo di DA con conseguente migliore utilizzo del substrato e dunque maggiore resa di produzione CH₄. Capire quindi i parametri che portano a questa stabilità è di cruciale importanza per il buon funzionamento degli impianti industriali di DA: in questo studio la predominanza dei *Methanosaeta* è da porre in relazione alla disponibilità degli acidi, in particolare di quello acetico. Ulteriori studi sono necessari per approfondire in questa fase sia la composizione della comunità;
- in corrispondenza della fine produzione di metano si osserva una maggiore uniformità della comunità in termini di percentuale di *Eubacteria* ed *Archaea* presenti nelle varie condizioni sperimentali. Ulteriori studi sono necessari per approfondire in questa fase la variazione della composizione di comunità funzionali osservata all'interno di *Archaea* e di *Methanosarcinales*;
- la concordanza dei risultati ottenuti nella prima e seconda serie sperimentale (quest'ultima a scala 10X della prima) riguardo produzioni di CH₄ e composizione delle comunità attive, indicano una buona riproducibilità delle prove in bioaugmentation. Tale risultato incoraggia ulteriori studi di aumento di scala di lavoro utilizzando le condizioni sperimentali individuate mirando ad applicazioni utili per il processo a scala reale soprattutto nei casi di malfunzionamento o collasso del processo di digestori di DA. Tale aspetto sarà oggetto di futuri approfondimenti.

I risultati ottenuti nelle diverse serie sperimentali svolte nel corso degli anni, per le stesse condizioni di substrato, cioè per paglia di grano, in presenza di bioaugmentation della comunità microbica, realizzate incrementando la scala dei reattori, 1:10:100 (in collaborazione con l'Università di Napoli Federico II, Dipartimento di Ingegneria civile ed Ambientale) la bioaugmentation ha dimostrato di potenziare sempre la produzione di CH₄.

Infine, dagli studi per la messa a punto di colorazioni delle strutture dei funghi ruminali rilevabili mediante microscopia in epifluorescenza, è emerso che la doppia colorazione CFW+Syttox green come proposto da Gerphagnon et al., 2013 [20] consente di visualizzare e quantificare sia gli zoosporangi che le zoospore di entrambi i ceppi fungini utilizzati.

4 Bibliografia

1. 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.
2. Aliboni A., Lona L., Felici C., Corsaro N., Izzo G., De Luca E. (2015). Analytical protocols for the determination of sulphur compounds characteristic of the metabolism of *Chlorobium limicola*. *Analytical Chem. Research*, 5, 9-13.
3. Amann R., Ludwig W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 555-565.
4. Andrews & Harris. (1986). R- and K-selection and Microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology*, 9: 99-114.
5. Barra Caracciolo A. B., 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.
6. 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.
7. Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. (2013). Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 192-211.
8. 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.
9. Brookman J. L., Mennim G., Trinci A. P. J., Theodorou M. K., Tuckwell D. S. (2000). Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. *Microbiology*, 146(2), 393-403.
10. Čater M., Faneli L., Logar R. M. (2013). Microbial community analyses in biogas reactors by molecular methods. *Acta Chimica Slovenica*, 60(2), 243-255.
11. Choi E., Rim J. M. (1991). Competition and inhibition of sulfate reducers and methane producers in anaerobic treatment. *Water Science & Technology*, 23(7), 1259-1264.
12. Colleran S., Pender S. (2002). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sulphate-containing wastewaters. *Water science and technology*, 45(10), 231-235.
13. Conklin A., Stensel H. D., Ferguson, J. (2006). Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. *Water Environment Research*, 486-496.
14. De Vrieze J., Hennebel T., Boon, N., Verstraete, W. (2012). *Methanosarcina*: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology*, 112, 1-9.
15. 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 Bio/Technology*, 7(2), 173-190.
16. Demirel B., Yenigün O. (2006). Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. *Bioresource technology*, 97(10), 1201-1208.
17. 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 Intern. Publishing.

18. Dollhofer V., Callaghan T. M., Dorn-In S., Bauer J., Lebuhn M. (2016). Development of three specific PCR-based tools to determine quantity, cellulolytic transcriptional activity and phylogeny of anaerobic fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 127 28-40.
19. Games W., Hoekstra E. S., Aptroot A., 1980. *CBS Course of Micology*, Fourth edition.
20. Gerphagnon M., Latour D., Colombet J., Sime-Ngando T. (2013). A double staining method using SYTOX green and calcofluor white for studying fungal parasites of phytoplankton. *Applied and environmental microbiology*, 79 (13), 3943-3951.
21. Ghosh S., Chowdhury R., Bhattacharya P. (2016). Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(10), 4283-4295.
22. 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.
23. 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.
24. Hao O. J., Chen J. M., Huang, L., Buglass R. L. (1996). Sulfate - reducing bacteria. *Critical reviews in environmental science and technology*, 26(2), 155-187.
25. Jiang D, Zhuang DF, Fu JY, Huang YH, Wen KG, (2012). Bioenergy potential from crop residues in China: availability and distribution. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 16: 1377-1382.
26. Kang, H., Freeman, C., & Chun, J. (2005). N-Acetylglucosaminidase activities in wetlands: a global survey. *Hydrobiologia*, 532(1-3), 103-110.
27. Karhadkar P. P., Audic J. M., Faup G. M., Khanna, P. (1987). Sulfide and sulfate inhibition of methanogenesis. *Water Research*, 21(9), 1061-1066.
28. Klockea M., Nettmanna E., Bergmanna I., Mundta K., Soudia K., Mummea J., Linkea (2008). Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 190–205.
29. Koster I. W., Rinzema A., De Vegt A. L., Lettinga G. (1986). Sulfide inhibition of the methanogenic activity of granular sludge at various pH-levels. *Water Research*, 20(12), 1561-1567.
30. Krakat N., Westphal A., Schmidt S., Scherer, P. (2010). Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. *Applied and environmental microbiology*, 76(6), 1842-1850.
31. 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.
32. 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.
33. McCartney D. M., Oleszkiewicz J. A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Research*, 25(2), 203-209.
34. Muyzer G., Stams A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 441-454.
35. 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.

36. O'Flaherty V., Collins G., Mahony T., (2006). The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Environmental Science and Bio/Technology* 5:39–55.
37. Patriarca C., Mazzurco Miritana V., Gorrasi S., Fenice M. Trattamento biologico di biomasse lignocellulosiche e chitinose per la produzione di idrogeno e/o metano. Ricerca di Sistema Elettrico ENEA, Rapporto tecnico RdS/PAR2013/252.
38. Perlack RD, Wright LL, Graham RL, Stokes BJ, 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.
39. 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.
40. Raabe D., Sachs C., Romano P. (2005). The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia*, 53(15), 4281-4292.
41. Rasconi S., Jobard M., Jouve L., Sime-Ngando T. (2009). Use of calcofluor white for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Applied and environmental microbiology*, 75 (8), 2545-2553.
42. 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.
43. Sanderson K. (2011). Lignocellulose: A chewy problem. *Nature*, 474, 12-14.
44. 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.
45. Shahidi F., Arachchi J. K. V., Jeon Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology*, 10(2), 37-51.
46. 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.
47. Shiladitya G., Chowdhury R., Bhattacharya P. (2016). Mixed consortia in bioprocess: role of microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, (100), 4283-4295.
48. Smith K. S., Ingram-Smith C. (2007). Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends in microbiology*, 15(4), 150-155.
49. 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.
50. Stams A. J. M., Elferink S. O., & Westermann P. (2003). Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria. In *Biomethanation I* (pp. 31-56). Springer Berlin Heidelberg.
51. Sun M., Sun W., Barlaz M. A. (2016). A batch assay to measure microbial hydrogen sulfide production from sulfur-containing solid wastes. *Science of The Total Environment*, 551, 23-31.
52. 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.
53. Weijma J., Gubbels F., Pol L. H., Stams A. J. M., Lens P., Lettinga G. (2002). Competition for H₂ between sulfate reducers, methanogens and homoacetogens in a gas-lift reactor. *Water science and technology*, 45(10), 75-80.
54. Zheng Y, Zhao Jia, Xu F, Li Y, (2015). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas

production. Progress in Energy and Combustion Science, 42: 35-53

Report Ricerca di Sistema Elettrico: Precedenti Annualità

- 1) ENEA, RdS/PAR2011/268. 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.
- 2) ENEA, RdS/ PAR2011/304. Aliboni A., De Luca E., De Mei M., De Poli F., Fiocchetti F., Izzo G., Marone A., Massini G., Mentuccia L., Patriarca C., Rosa S., Sau S., Signorini A., Varrone C. Valorizzazione bioenergetica di scarti agro-zootecnici.
- 3) ENEA, RdS/PAR2012/2013/183. Aliboni A., Cinquepalmi S., De Luca E., Felici C., Fiocchetti F., Izzo G., Marone A., Massini G., Mazzurco Miritana V., Mentuccia L., Patriarca C., Palumbo A., Rosa S., Sau S., Sgulò V., Signorini A., Varrone C. Valorizzazione bioenergetica di scarti agro-zootecnici.
- 4) ENEA, RdS/PAR2013/252. Patriarca C., Miritana V. M., Gorrasi S., Fenice M. Trattamento biologico di biomasse lignocellulosiche e chitinose per la produzione di idrogeno e/o metano.
- 5) ENEA, RdS/PAR2014/143. Lembo G., Patriarca C., Barghini P., Gorrasi S. e Fenice M. Studio di un processo fermentativo anaerobico di materiali ad alto contenuto in chitina e acque di vegetazione
- 6) ENEA, RdS/PAR2014/144. D'Alessandro G., Dottorini G., Fabbricino M., Liotta F., Pontoni L. Ottimizzazione delle condizioni di processo per la valorizzazione energetica di substrati di scarto degradabili attraverso decomposizione biologica per via anaerobica.
- 7) ENEA RdS/PAR2014/145. Massini G., Dottorini G., Felici C., Gaetani A., Lembo G., Liberatore R., Mazzurco Miritana V., Mehariya S., Signorini A. Sviluppo di processi di digestione anaerobica di matrici non convenzionali.

Tutti i report sopra elencati e ulteriori informazioni relative alle attività svolte nell'ambito della Ricerca di Sistema Elettrico, Accordo di Programma ENEA-Ministero dello Sviluppo Economico, sono reperibili sul sito WEB:

www.enea.it/it/Ricerca_sviluppo/ricerca-sistema-elettrico/biomasse/report

5 Abbreviazioni ed acronimi

ARF = Funghi Anaerobi Ruminanti (Anaerobic Ruminant Fungi)
DA = Digestione Anaerobica
DS = Deviazioni Standard
F210 = pool batterico fermentante idrogeno-produttore
FISH = Ibridazione Fluorescente in situ (Fluorescence in situ Hybridization)
I-SS = prima Serie Sperimentale
II-SS = seconda Serie Sperimentale
M = comunità metanigena
PF = Paglia di Fungiaia;
PG = Paglia di Grano;
TS = Solidi Totali (Total Solids);
VFA = Acidi Grassi Volatili (Volatile Fatty Acids)
VS = Solidi Volatili (Volatile Solids);
WD = Water Displacement
wv = volume di lavoro (working volume)