



Ricerca di Sistema elettrico

Trattamento biologico di biomasse lignocellulosiche e chitinose per la produzione di idrogeno e/o metano

C. Patriarca, V. Mazzurco Miritana, S. Gorrasi, M. Fenice



TRATTAMENTO BIOLOGICO DI BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE E CHITINOSE PER LA PRODUZIONE DI IDROGENO E/O METANO

C. Patriarca, V. Mazzurco Miritana, S. Gorrasi, M. Fenice (Università degli Studi della Tuscia)

Settembre 2014

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2013

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Sviluppo di sistemi per la produzione di energia elettrica da biomasse e l'upgrading dei biocombustibili

Obiettivo: Sviluppo dei sistemi di produzione di biocombustibili

Responsabile del Progetto: Vito Pignatelli, ENEA

Il presente documento descrive le attività di ricerca svolte all'interno dell'Accordo di collaborazione *“Trattamento biologico di biomasse lignocellulosiche per la produzione di idrogeno e/o metano”*

Responsabile scientifico ENEA: Giulio Izzo

Responsabile scientifico Università della Tuscia: Massimiliano Fenice

Indice

1	INTRODUZIONE	4
2	SCOPO DEL PROGETTO	5
3	MATERIALI E METODI.....	6
3.1	RISULTATI I FASE.....	9
3.2	RISULTATI II FASE.....	10
3.3	RILEVAMENTO DELLA COMUNITÀ FUNGINA TRAMITE FINGERPRINTING MOLECOLARE (PCR-DGGE)	14
4	VERIFICA DELL'ATTIVITÀ CHITINOLITICA DELL'INOCULO F ₂₁₀	17
4.1	RISULTATI I FASE.....	18
5	ANALISI CON TECNICA FISH DELLE COMUNITÀ MICROBICHE.....	21
5.1	METODOLOGIE E RISULTATI OTTENUTI	21
6	BIBLIOGRAFIA.....	24

1 Introduzione

La produzione di biogas mediante digestione anaerobica delle biomasse di scarto è tra i processi più promettenti per la produzione sostenibile di bioenergia sotto forma di bioidrogeno e biometano. Tale processo offre la possibilità di contenere i costi di smaltimento dei rifiuti organici, trasformandoli in risorsa e di massimizzare il riciclo dei materiali che, se non opportunamente trattati, costituiscono un macroscopico fattore di incremento dei gas serra. La maggior parte delle aziende agricole in cui sono dislocati gli impianti a biogas, utilizza biomasse di scarto con bassa degradabilità: il 40-60% del carbonio organico contenuto nella fitomassa infatti rimane inutilizzato. La struttura di questi materiali lignocellulosici composta da lunghe fibre di cellulosa, emicellulosa e ricoperta da lignina rende complessa e difficilmente degradabile la biomassa vegetale, (Prochazka et al., 2012). La digestione anaerobica (DA) consiste in una sequenza di reazioni biochimiche ad opera di diversi microrganismi che, in assenza di ossigeno, trasformano un substrato organico in molecole gassose semplici; i principali stadi di questo processo sono: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi. All'interno della DA proprio lo stadio di idrolisi e in particolare la degradazione del materiale lignocellulosico rappresenta un "collo di bottiglia" dell'intero processo di produzione di bioenergia (Haitjema et al., 2014). I funghi anaerobi scoperti per la prima volta da Colin Orpin nel 1975 nel rumine degli animali, rappresentano un promettente e nuovo settore di ricerca, poiché grazie ai loro enzimi idrolitici (cellulasi, emicellulasi, proteasi, amilasi, amiloglicosidasi, pectinasi etc.) sono considerati gli organismi con le più elevate capacità di idrolisi della cellulosa (Wood and Wilson, 1995). I funghi anaerobi sono presenti all'interno del rumine di molti erbivori e non solo (Griffith et al., 2010) dove costituiscono circa l'8-10% della biomassa microbica (Krause et al., 2013; Nagpal et al) e insieme a batteri e protozoi compongono la comunità dell'ecosistema del rumine. Diversi studi hanno sottolineato l'importanza della cooperazione o simbiosi tra questi microrganismi, sviluppando proprio il concetto di alimentazione incrociata dei nutrienti tra e nelle micronicchie del rumine (Krause et al., 2013). Il ciclo vitale dei funghi anaerobi è molto veloce e si sviluppa dalle 23 alle 32 ore, alternando una fase motile (zoospora) ad una vegetativa (zoosporangio), (Lowe et al., 1987). Recentemente è stato inoltre individuato un terzo stadio di cisti resistenti aerotolleranti capaci di mantenere vitale il fungo oltre 9 mesi, (Haitjema et al., 2014).

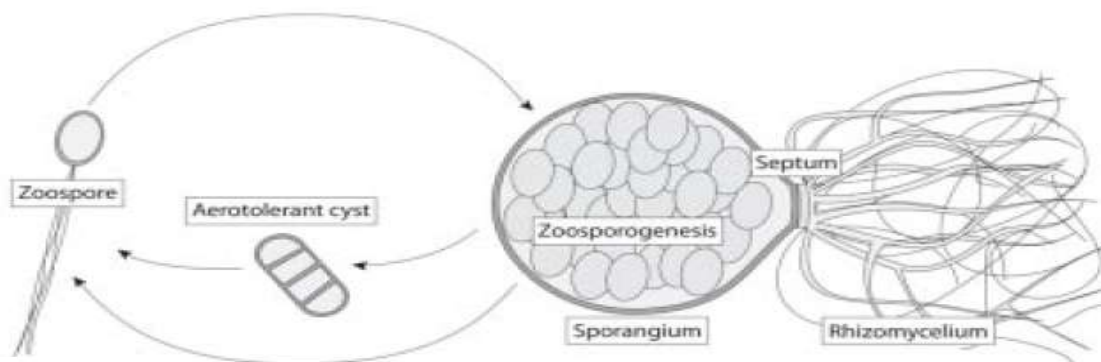


Figura 1. Ciclo vitale funghi (Haitjema et al., 2014)

2 Scopo del progetto

Lo scopo della presente ricerca è quello di verificare le capacità idrolitiche dei funghi anaerobi del rumine ed in particolare di *Neocallimastix* sp. ed *Orpinomyces* sp., su paglia di grano in esperimenti in batch, al fine di potenziare la fase idrolitica della DA ed incrementare le produzioni di idrogeno e metano. Gli esperimenti hanno seguito il processo di digestione anaerobica suddivisa in due stadi:

- I fase – idrolisi e dark fermentation con produzione di H₂
- II fase – digestione anaerobica completa con produzione di CH₄

Nella I fase sono stati inoculati ceppi di funghi idrolitici del rumine e batteri idrogeno-produttori (F₂₁₀), nella II fase è stato inoculato il digestato della scotta selezionatosi da un impianto in continuo (CSTR) volto a produrre metano (Concetti et al., 2013).

Tabella 1. Schema aggiornato del piano sperimentale

I FASE					dopo 9 giorni	II FASE
IDROLISI e DARK FERMENTATION						METANOGENESI
repliche	Batch n°	TEMP.	SUBSTRATO	INOCULO		INOCULO
3	1-2-3	39 °C	Paglia di grano 8 g/L VS)	10% F210 + 10% Orpinomyces	20% CSTR	
3	4-5-6			20% Orpinomyces		
3	7-8-9			20% Neocallimastix		
3	10-11-12			10% F210 + 10% Mix*		
3	13-14-15			10% F210 + 10% Neocallimastix		
3	16-17-18			20% Mix*		
3	19-20-21			20% F210		
1	22			20% Mix (biomassa)		

* Mix = Neocallimastix + Orpinomyces

3 Materiali e Metodi

Tutti i test condotti sono stati effettuati a 39 °C in agitazione, utilizzando paglia di grano (8 g/L VS) come substrato da idrolizzare, in batch da 120 mL con *working volume* di 50 mL. E' stato utilizzato come medium dell'esperimento tampone fosfato 0,1 M a pH 6,61 per mantenere costante il range ottimale di pH per gli idrogeno produttori. La paglia di grano è stata caratterizzata attraverso la determinazione dei solidi totali (TS), volatili (VS), COD (APHA, 2005).

Tabella 2. Caratterizzazione paglia di grano

Caratterizzazione	Paglia di grano	
TS	w/w %	92,64
VS	w/w %	84,38
COD*	gr O ₂ / g di TS	1,32
COD**	gr O ₂ / g di t.q.	1,22
COD**	kJ/g di TS	18,77
COD**	kJ/g t.q.	17,35

L'inoculo F₂₁₀ è stato attivato per 24 ore (come descritto in Marone et al., 2010) ed utilizzato tal quale. L'inoculo fungino è stato utilizzato dopo 6 giorni di coltura nel momento di massima produzione di zoospore (Lowe et al., 1987). I ceppi dei funghi anaerobi *Neocallimastix* sp. ed *Orpinomyces* sp. utilizzati, sono stati ottenuti dalla collezione dell'Università Kahramanmaraş Sütçü İmam della Turchia e riattivati secondo il protocollo fornito e dimostrato dal Prof. Comlekcioglu. I ceppi sono stati attivati in colture liquide, in roll-tubes di Hungate, a cui è stato aggiunto glucosio per favorire la produzione di zoospore. Come atteso le colture hanno sviluppato la quantità massima di zoospore dopo 6 - 8 giorni. Entrambe le colture non hanno presentato alcun inquinamento batterico. Al fine di ottenere un volume sufficiente di inoculo per l'esperimento, le colture sono state ripassate dopo 6 giorni in altri 2 roll-tube per ceppo e dopo altri 6 giorni in 2 batch da 53 mL (*working volume*) per ceppo e incubati in un bagno termostato a 39 °C, con glucosio 5 g/L, paglia 1,5 g e inoculo al 15%. Il digestato del CSTR, invece, poiché mediante analisi all'HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) risultava contenere elevate quantità di acido acetico, è stato utilizzato come inoculo solo dopo essere stato centrifugato due volte e risospeso in PBS (Phosphate Buffered Saline). La quantità di inoculo aggiunta nella I e nella II fase corrisponde al 20% del *working volume* totale

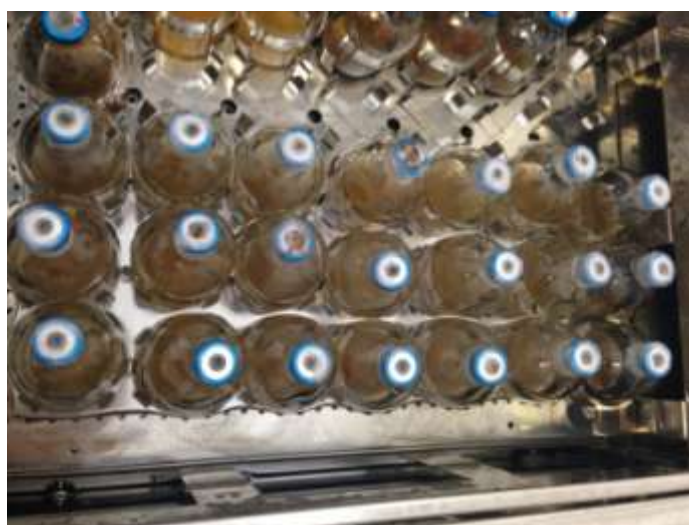


Figura 2. Batch in bagno termostato e agitato

Il microscopio a luce trasmessa con ingrandimento 100x (AXIOSKOP 40, Zeiss, Germania) ha permesso di ottenere immagini relative alle varie fasi del ciclo vitale dei funghi (Axio Vision software, Axio Cam MRm, Zeiss, Germania). Nella Figura 3 relativa a *Neocallimastix* sp., scattata alle 144 ore (6 giorni), si possono vedere bene le spore resistenti, le zoospore flagellate e lo sporangio. La Figura 4 rappresenta invece il momento di adesione della zoospora flagellata di *Neocallimastix* sp. alla fibra di paglia. Le figure 5 e 6 mostrano invece lo zoosporangio e le spore di *Orpinomyces* sp. alle 72 ore (3 giorni).



Figura 3. Stadi vitali di *Neocallimastix* sp.

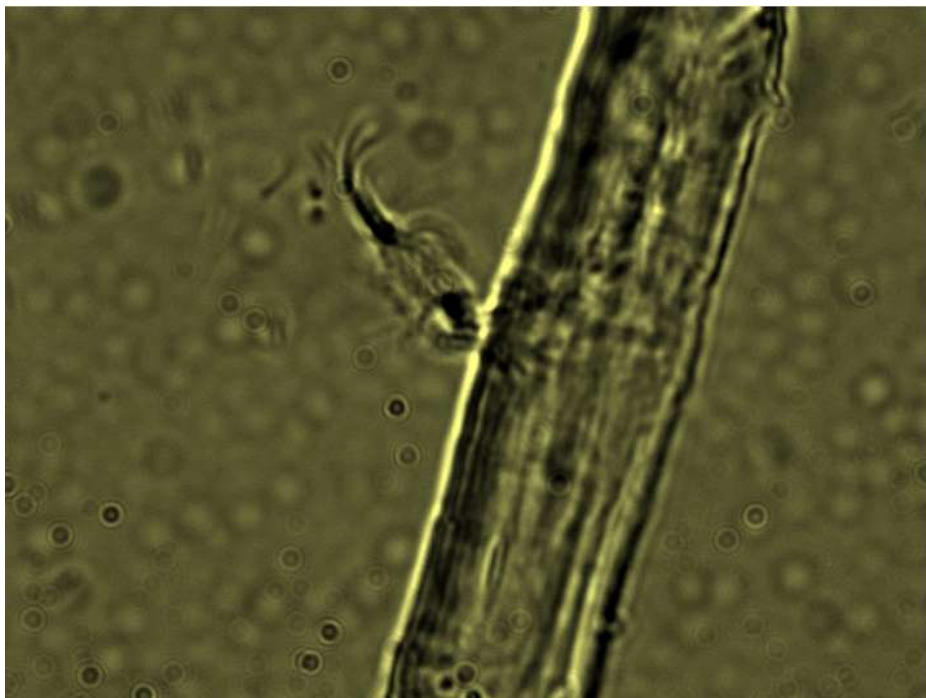


Figura 4. Zoospora flagellata di *Neocallimastix* sp.

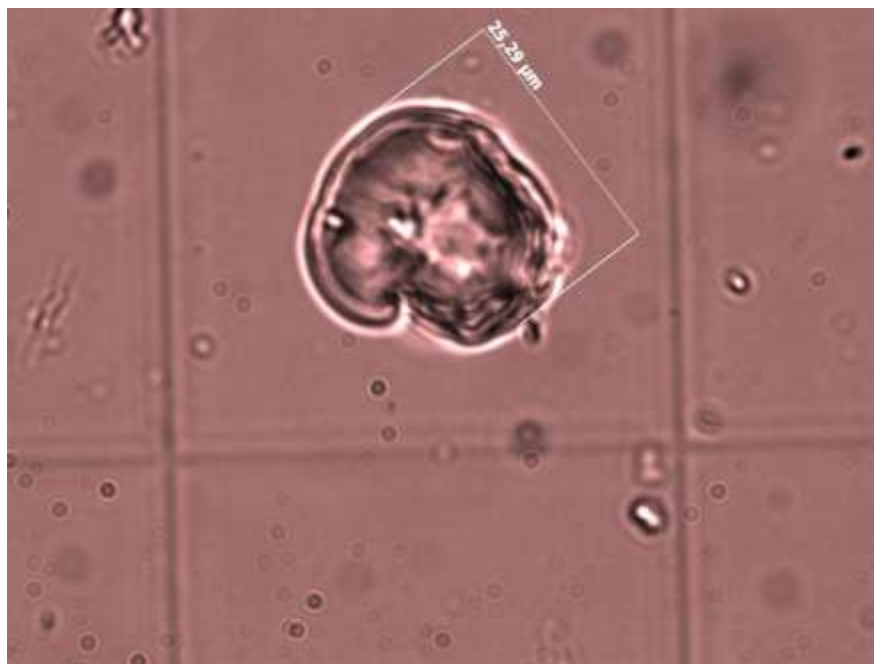


Figura 5. Sporangio di *Orpinomyces* sp.



Figura 6. Zoospora di *Orpinomyces* sp.

Il lavoro di raccolta delle immagini ha consentito di organizzare un database di riferimento per il riconoscimento dei vari stadi del ciclo vitale dei funghi alle differenti condizioni sperimentali. Sono stati anche effettuati durante la raccolta delle immagini dei vetrini con camera Burkner, dotata di piccoli solchi sul vetrino, così da permettere e mantenere la vitalità del campione da analizzare e seguire le dinamiche di alcune fasi di sviluppo delle zoospore. Il microscopio ad epifluorescenza (AXIOSKOP 40, Zeiss, Germania) equipaggiato con lampada a mercurio (HBO 50/AC) ha permesso di evidenziare e quantificare zoospore e zoosporangi utilizzando due coloranti molto efficaci, il Propidium iodide e il DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole). Il Propidium iodide (PI) è stato utilizzato come riportato da letteratura (Games et al.,1980) per evidenziare

l'efficienza della vitalità fungina, infatti il colorante si lega non solo alle cellule con membrana cellulare degenerata ma anche ai nuclei delle cellule eucariotiche mostrandone in questo caso la loro vitalità. La Figura 7 mostra infatti due zoosporangio con zoospore vitali all'interno. Il colorante DAPI è stato utilizzato per poter effettuare le conte totali dei microorganismi presenti negli inoculi nonché nelle fasi sperimentali.

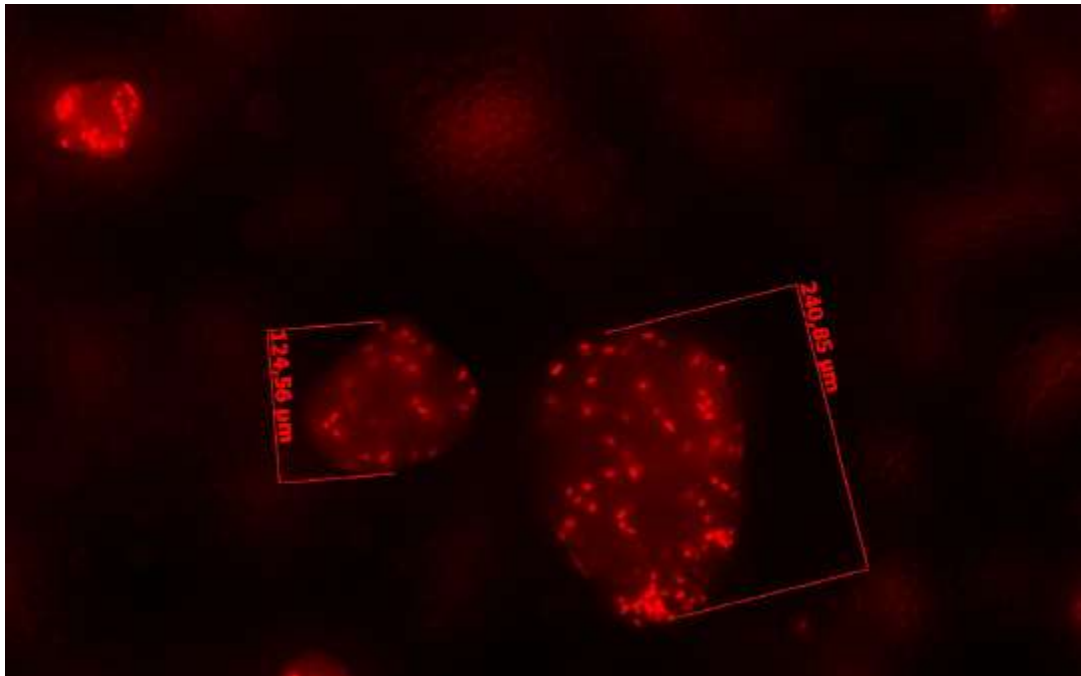


Figura 7. Zoosporangio e zoospore all'interno

3.1 Risultati I FASE

Per tutta la durata dell'esperimento il pH del mezzo di coltura si è mantenuto costante con valori compresi tra 6,5-7. Il pH finale era per tutti i batch 6,5. Non sono state rilevate tracce di metano durante questa fase dell'esperimento a dimostrazione della purezza degli inoculi rispetto alla componente metanigena. In Tabella 3 sono riportate le percentuali di H₂ contenute nel gas, gli mL/L prodotti, le rese di H₂ (g/V_S).

Tabella 3. Confronto dei parametri di processo di produzione di H₂ dei diversi inoculi

inoculo	substrato	pretrattamento	Tempo produzione max. (h)	H ₂ (%)	H ₂ (mL/L)	H ₂ (g/V _S)	pH fin.
10% F210 + 10% Orpinomyces	paglia di grano 8 g/L VS	sterilizzazione e tampone fosfato 0,1 M	24	9,1±1	158,9±11,4	23,4±1,6	6,5
10% F210 + 10% Neocallimastix			24	9,8±0,5	186,8±12,2	27,5±1,8	6,5
10% F210 + 10% Mix*			24	10±0,6	184,9±6,8	27,5±1,8	6,5
20% F210			24	8,6±0,4	158,9±1,5	23,4±0,2	6,5
20% Orpinomyces			168	7,7±0,5	107,4±7,4	15,8±1,1	6,5
20% Neocallimastix			168	0,6±0,2	7,9±2,2	1,2±0,3	6,5
20% Mix*			72	5,7±0	93,5±0	13,7±0	6,5

* Mix = Neocallimastix + Orpinomyces

In Figura 8 è rappresentata la resa di H₂ nel tempo con diversi inoculi. I risultati hanno mostrato che negli esperimenti dove i ceppi fungini sono stati utilizzati singolarmente è stato prodotto idrogeno, seppur in concentrazioni limitate sia a dimostrazione della capacità idrolitica di questi due funghi sia a conferma del fatto che i funghi in questione contengono gli idrogenosomi, organelli, deputati alla conversione degli zuccheri in idrogeno (Haitjema et al., 2014). Le produzioni più elevate di idrogeno nei batch inoculati con ceppi singoli si ottengono con *Orpinomyces* sp. alle 168 ore (107,4 ±7,4 mL/L) rispetto a *Neocallimastix* sp. sempre alle 168 ore (7,9±2,2 mL/L). Le produzioni di idrogeno più elevate invece si ottengono combinando insieme F₂₁₀ e *Neocallimastix* sp. (186,8±12,2 mL/L).

Tra gli idrogeno-produttori F₂₁₀ e i singoli ceppi fungini, in particolare *Neocallimastix* sp, si può supporre che si instauri una cooperazione, forse una simbiosi, come dimostrato dall'incremento di produzione di idrogeno del 15% rispetto al solo inoculo di batteri F₂₁₀.

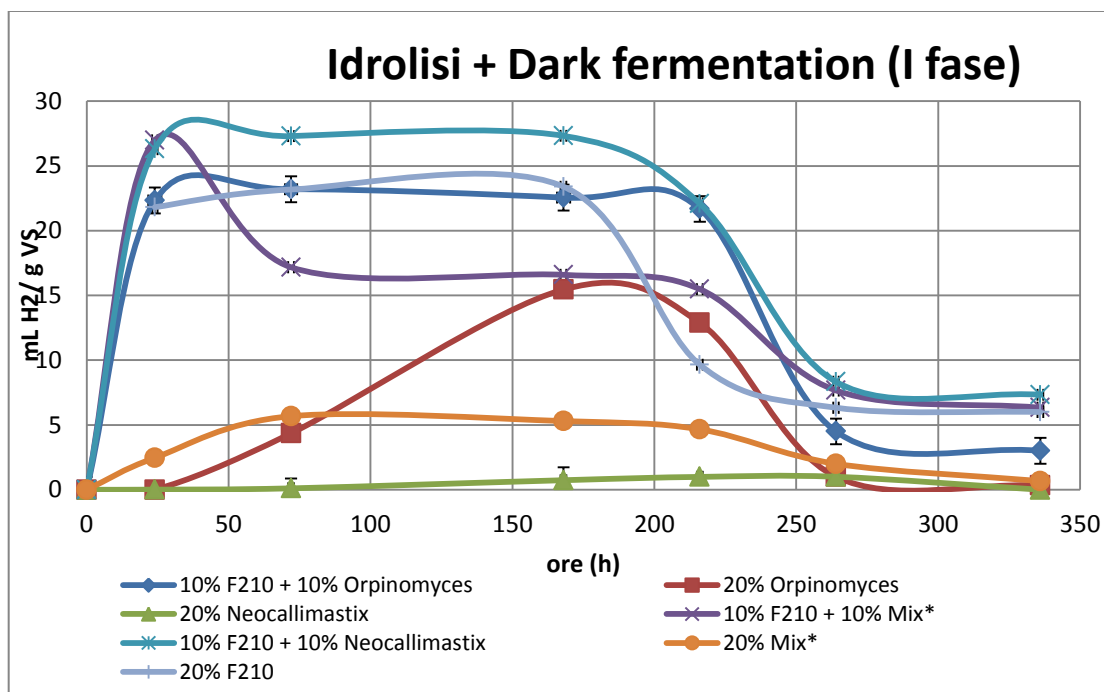


Figura 8. Produzione di H₂ nel tempo con diversi inoculi

3.2 Risultati II FASE

Il pH ad inizio esperimento era 6,5-7 e si è mantenuto tale fino al 77° giorno, ultimo giorno di esperimento. I risultati, al 77° giorno, mostrati nella Figura 9 evidenziano almeno 3 raggruppamenti sulla base delle produzioni cumulative mL/L ottenute fino ad ora: i batch inoculati con i funghi anaerobi e F₂₁₀ (1357,0±140,8 mL/L con *Orpinomyces*, 1279,6±47,9 mL/L con *Neocallimastix*, 1397,2±73,2 mL/L con la mix dei funghi), i batch inoculati solo con F₂₁₀ (988,3±148,2 mL/L), e i batch inoculati solo con i funghi (435,1±194,2 mL/L con *Orpinomyces*, 236,3±27,9 mL/L con *Neocallimastix* e 250,8±14,6 mL/L con la mix). Il ceppo *Orpinomyces* a questo punto dell'esperimento sembra essere più produttivo di *Neocallimastix*. I risultati evidenziano e confermano anche che il pool batterico F₂₁₀ oltre ad essere una comunità di idrogeno produttori, ha capacità idrolitiche in grado di idrolizzare e fermentare substrati recalcitranti quali la paglia di grano essiccata, costituita principalmente da materiali lignocellulosici.

Inoltre i risultati migliori in termini di produzione (mL/L CH₄) si ottengono, in tutti i casi, là dove sono presenti sia F₂₁₀ che ceppi fungini. Si può quindi supporre, come già evidenziato nella prima fase dell'esperimento, che si instauri una cooperazione trofica tra i ceppi fungini e il pool microbico F₂₁₀ determinando attraverso un effetto sinergico incrementi medi nella produzione di metano. Tali incrementi sono del 29% nei batch inoculati

a F_{210} e mix fungina rispetto ai batch inoculati solo ad F_{210} e del 68% rispetto ai batch inoculati solo con *Orpinomyces*.

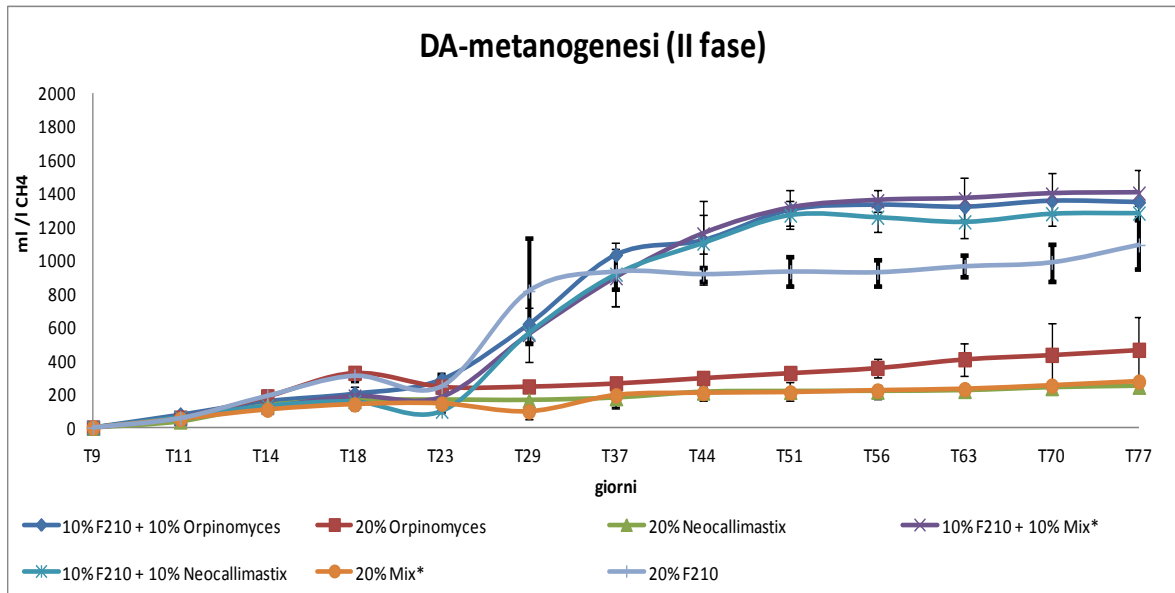


Figura 9. Produzione di CH_4 nel tempo con diversi inoculi, sono riportate le barre delle deviazioni standard. Il T9 corrisponde al T0 della metanogenesi

Tabella 4. Confronto dei parametri di processo di produzione di CH_4 dei diversi inoculi

inoculo	substrato	pretrattamento	Tempo produzione max. (giorni)	CH_4 (%)	CH_4 (mL/L)	CH_4 (g/VS)	pH finale
10% F210 + 10% Orpinomyces	paglia di grano 8 g/L VS	sterilizzazione e tampone fosfato 0,1 M	51	56,4±3,0	1335,7±109,2	196,2±16,0	6,5-6,8
10% F210 + 10% Neocallimastix			51	54,0±1,1	1271,7±91,9	187,0±13,5	6,5-6,8
10% F210 + 10% Mix*			51	57,7±3,7	1338,6±86,3	196,8±12,7	6,5-6,8
20% F210			51	50,5±3,5	952,7±77,3	140,1±11,4	6,5-6,8
20% Orpinomyces			77	29,5±10,8	467,7±214,3	68,8±31,5	6,5-6,8
20% Neocallimastix			77	16,7±1,9	244,7±31,2	35,9±4,6	6,5-6,8
20% Mix*			77	19,3±1,2	275,0±21,8	40,4±3,2	6,5-6,8

* Mix = Neocallimastix + Orpinomyces

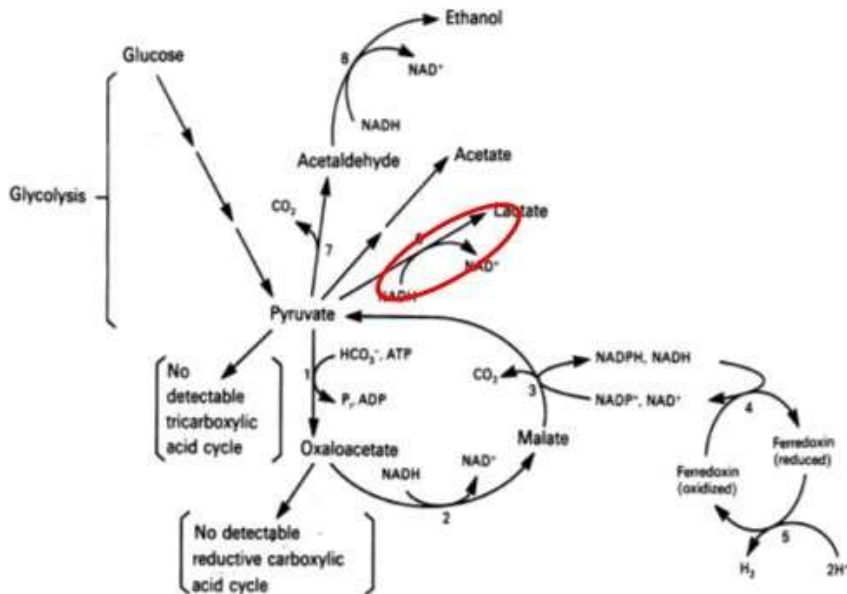
Anche in termini di resa ($mL CH_4/g VS$) i risultati migliori sono stati ottenuti per le condizioni in cui sono presenti sia F_{210} che ceppi fungini ($199,6±20,7 mL CH_4/g VS$ con *Orpinomyces* sp., $188,2±7,0 mL CH_4/g VS$ con *Neocallimastix* sp., $205,5±10,8 mL CH_4/g VS$ con la mix dei funghi) rispetto ai batch inoculati solo con F_{210} ($145,3±21,8 mL CH_4/g VS$) o solo con i ceppi fungini ($64,0±28,6 mL CH_4/g VS$ con *Orpinomyces*, $34,7±4,1 mL CH_4/g VS$ con *Neocallimastix* e $36,9±2,2 mL CH_4/g VS$ con la mix).

In tabella 5 vengono riportati alcuni tra i valori massimi di resa di produzione di metano ($mL CH_4/g VS$) presenti in letteratura e ottenuti in condizioni sperimentali confrontabili con i risultati di questa ricerca.

Tabella 5. Confronto delle rese di produzione di CH₄

substrato	inoculo	massima resa (ML CH ₄ /g VS)	pretrattamenti	T °C	Referenze
paglia di grano	letame	150-190	steam-exploded 210 °C 10 min	37	Risberg et al., 2013
paglia di grano	letame	170-240	-	37	Risberg et al., 2013
paglia di grano	digestato agricolo	234	-	37	Sapci et al., 2013
paglia di grano	reflui municipali	179	-	37	Sapci et al., 2013
paglia di grano	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	275,6	-	37,5	Bauer et al., 2009
paglia di grano	<i>S. cerevisiae</i>	314	steam-exploded 160 °C 10 min	37,5	Bauer et al., 2009
paglia di grano	<i>S. cerevisiae</i>	305,2	steam-exploded 200 °C 10 min	37,5	Bauer et al., 2009
paglia di grano	F ₂₁₀ , CSTR e <i>Orpinomyces</i> sp.	173-208	sterilizzazione 121 °C 20 min	39	Questo lavoro
paglia di grano	F ₂₁₀ , CSTR e <i>Neocallimastix</i> sp.	170-188	sterilizzazione 121 °C 20 min	39	Questo lavoro
paglia di grano	F ₂₁₀ , CSTR, <i>Neocallimastix</i> sp. e <i>Orpinomyces</i> sp.	191-217	Sterilizzazione 121 °C 20 min	39	Questo lavoro
paglia di grano	F ₂₁₀ , CSTR	125-157	Sterilizzazione 121 °C 20 min	39	Questo lavoro

Dall’analisi dei metaboliti sono risultati diversi prodotti di fermentazione. L’analisi è stata effettuata sui maggiori prodotti di fermentazione ottenuti nelle idrolisi fungine da Lwin et al., 2012 e Jin et al., 2011. Sono stati presi in considerazione esclusivamente: acido acetico, acido propionico, acido butirrico, acido formico, acido lattico, acido succinico e etanolo. Alla fine della prima fase, rappresentato dal cerchio rosso nella Figura 10 (O’Fallon et al., 1991), i maggiori prodotti metabolici sono risultati acido acetico e butirrico, relativamente agli inoculi con i funghi si è notata un’elevata produzione di acido lattico come via metabolica preferenziale. E’ noto infatti da letteratura che alcuni funghi, tra cui *Neocallimastix frontalis*, hanno un metabolismo ad acido lattico dovuto alla presenza della lattato deidrogenasi.



Scheme 1. Primary metabolic conversion of glucose into acetate, ethanol and lactate by *N. frontalis* EB188
 Numbers designate the following enzymes: 1, pyruvate carboxylase; 2, malate dehydrogenase; 3, 'malic' enzyme; 4, NADH (NADPH) :ferredoxin oxidoreductases; 5, hydrogenase; 6, lactate dehydrogenase; 7, pyruvate decarboxylase; 8, alcohol dehydrogenase.

Figura 10. Vie metaboliche in *Neocallimastix frontalis* (O’Fallon et al., 1991)

Al T77 (giorno 77°), l'esperimento è terminato e sono stati consumati tutti gli acidi prodotti nei batch inoculati a funghi e F_{210} e la produzione di metano infatti sembra aver raggiunto il *plateau*, mentre nei batch inoculati solo con funghi non sono ancora stati consumati tutti gli acidi, ma la produzione di biogas è terminata. Ciò dimostra che la cooperazione dell'inoculo fungino con il consorzio F_{210} non solo incrementa la produzione di metano ma ne riduce anche i tempi di ritenzione, passando da 77 a 51 giorni.

E' stata inoltre effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) ad un fattore, utilizzando un alfa di 0,01 sia per le produzioni di idrogeno che di metano e i risultati hanno mostrato che le differenze tra i gruppi sono statisticamente significative (Figura 11).

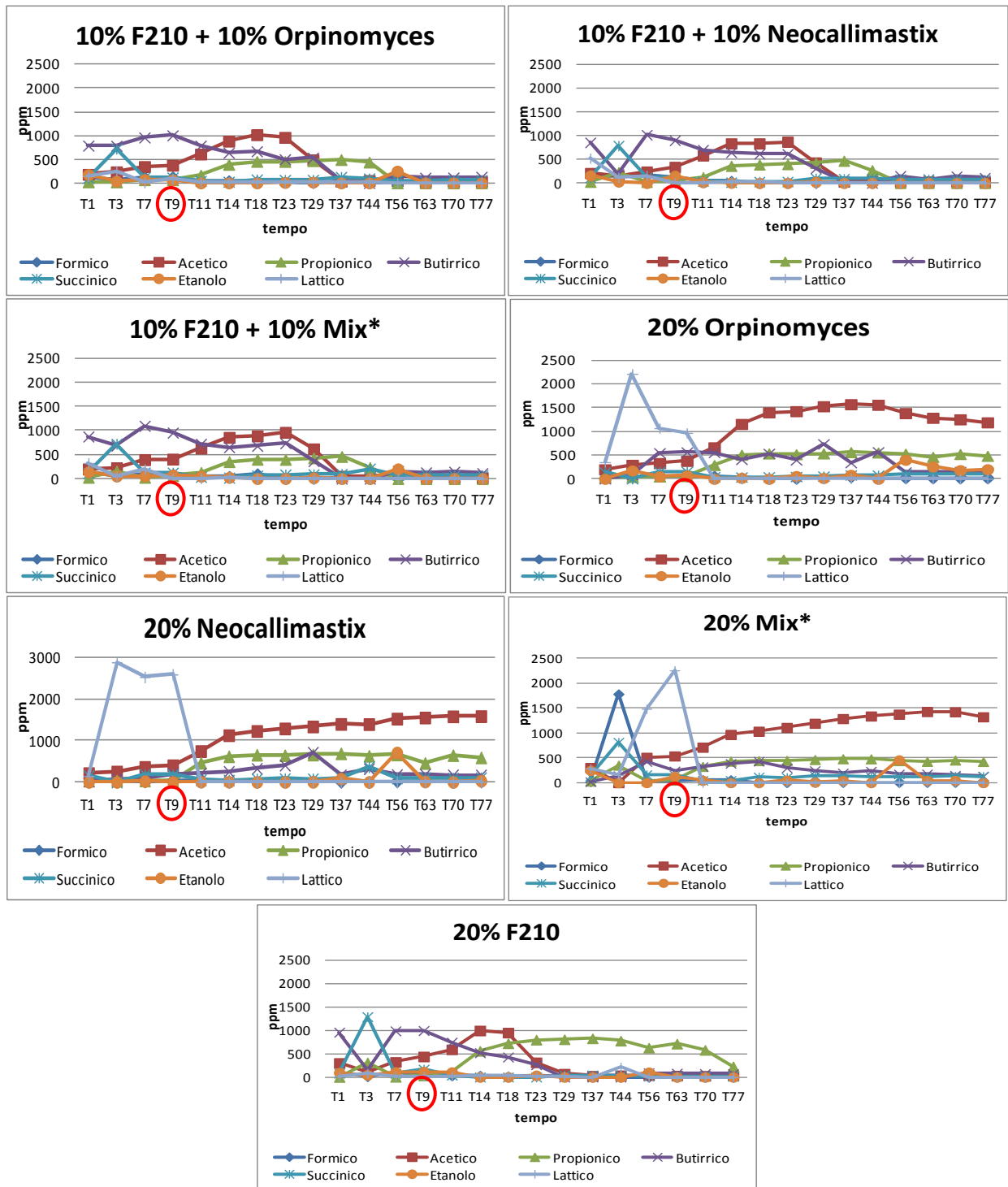


Figura 11. Andamento della concentrazione dei principali metaboliti nel tempo delle fasi I e II (il cerchio rosso indica la conclusione della fase I e il tempo 0 della II fase)

L'esperimento evidenzia l'effetto positivo che l'aggiunta dell'inoculo fungino ha sulla produzione di biogas; l'importanza dei differenti ruoli funzionali assolti dalle componenti della comunità microbica – attività idrolitica, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi, e come la carenza di una delle componenti funzionali riduca l'efficienza del processo di DA: in particolare, la dove i funghi, forti idrolizzatori, sono assenti è ridotta la produzione di metano. Se non viene aggiunto il pool di idrogeno produttori non vengono prodotte molecole utili per i metanigeni rallentando così il processo di produzione di metano. Già nel 1975 Wolin ha identificato questa complessa successione di microorganismi come determinanti nel "catabolismo cooperativo" dei substrati e produzione dei prodotti finali di fermentazione. L'effetto sinergico dei funghi e F_{210} determina un incremento nelle produzioni di idrogeno del 15% e di metano del 29% rispetto agli esperimenti dove è stato inoculato solo F_{210} . La cooperazione dell'inoculo fungino con il consorzio F_{210} non solo incrementa la produzione di metano ma ne riduce anche i tempi di ritenzione, passando da 77 a 51 giorni.

3.3 Rilevamento della comunità fungina tramite fingerprinting molecolare (PCR-DGGE)

I campioni provenienti dai processi di produzione di bio-idrogeno e bio-metano sono stati analizzati tramite la tecnica di fingerprinting molecolare PCR-DGGE (Figura 12) presso il laboratorio di Microbiologia del DEB, Università della Tuscia, Viterbo.

Principio generale di funzionamento: l'elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE) è un metodo di separazione basato sulle differenze di comportamento nella denaturazione di frammenti a doppia elica di DNA. Il principio della DGGE è che, in presenza di un gradiente di sostanze denaturanti, le molecole di DNA a doppio filamento si denaturano in domini distinti. Una volta raggiunto il punto di denaturazione di un dominio, tale porzione del frammento di DNA inizia a denaturare, originando molecole ramificate che hanno una mobilità più ridotta nel gel di poliaccrilammide. In presenza di concentrazioni molto elevate di denaturanti il frammento di DNA sarà completamente denaturato in due molecole a doppio filamento.

Pertanto, teoricamente, frammenti di DNA aventi stessa dimensione, ma con una sequenza differente mostreranno una diversa risposta al gradiente denaturante. L'ambiente denaturante durante la corsa è creato da una soluzione di urea e formammide a temperatura costante che deve situarsi nel range 50-65 °C.

Questa tecnica prevede l'estrazione del DNA totale dal campione prelevato, l'amplificazione selettiva (Nested PCR) di target genici specifici per gli organismi studiati e la corsa su gel in gradiente chimico denaturante. Il pattern di bande identificato è rappresentativo delle varie specie.

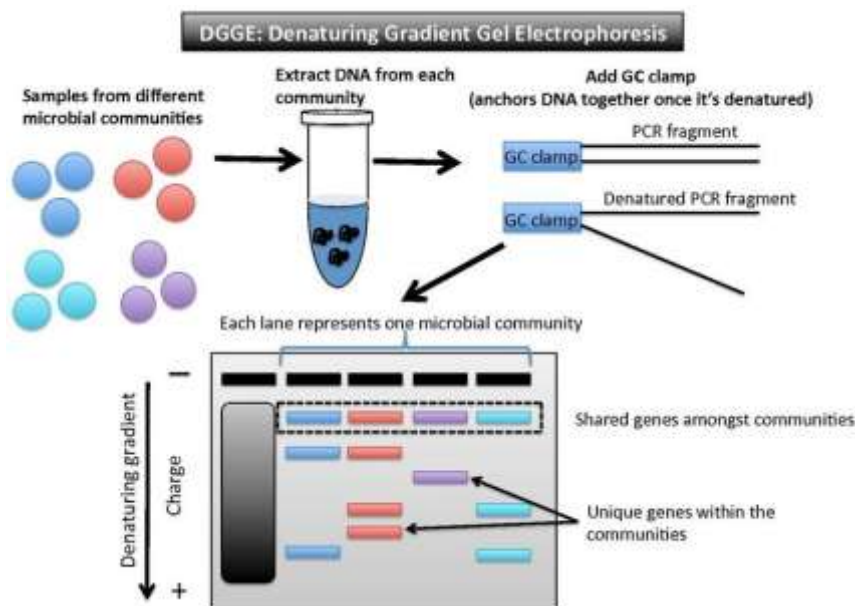


Figura 12. Schema generale della metodica PCR-DGGE

Nel nostro caso, si sono utilizzati i seguenti materiali e strumenti:

- Kit per l'estrazione del DNA totale: "Plant/fungi DNA isolation kit (Norgen Biotek corp., Canada);
- Primers fungini per il frammento ITS1: ITS5f-ITS4Ar;
- Termociclatore: Q-Sat 24 (Hain Life science, U.K.).

Condizioni di PCR:

Prima PCR:

- Primers utilizzati: ITS1f/ITS4;
- programma di amplificazione: 1- 95 °C 3 min; 2, 95 °C 30 sec; 3- 55 °C 30 sec; 4-72 °C 32 sec. Gli step 2,3,4 sono ripetuti per 35 volte. 5- 72 °C 5 min; 6- 4 °C infinito.

Seconda PCR:

- Primers utilizzati: GC-ITS 1f/ ITS2
 - programma di amplificazione: 1- 94 °C 5 min; 2- 94 °C 30 sec; 3- 55 °C 30 sec; 4-72 °C 32 sec. Gli step 2,3,4 sono ripetuti per 35 volte. 5- 72 °C 5 min; 6- 4 °C infinito.
- Apparato DGGE-1 (Elettrofor s.a.s., I)
 - Condizioni di corsa GEL DGGE: Gradiente denaturante DGGE: 20-70%; Corsa gel: 200 V per 5 ore a 60 °C;
 - Colorazione con gelred (67 µL in 200 mL DW) per 30 min.
 - Acquisizione immagine tramite ChemiDoc MP (Biorad, USA)
 - Analisi di immagine e elaborazione dendrogrammi con software "Phoretix 1D PRO" (Totalab, U.K.).

I gel DGGE (Figura 13) mostrano bande specifiche relative ai due funghi utilizzati nella sperimentazione e provenienti da colture pure: *Neocallimastix* sp. e *Orpinomyces* sp.. Inoltre, è possibile rilevare come nell'inoculo prelevato dal reattore CSTR sia evidente la presenza di funghi anaerobici. La diversa distribuzione delle bande riferite all'inoculo CSTR indica presenza anche di funghi anaerobici differenti dalle due specie da noi utilizzate per l'arricchimento. La densità relativa delle bande sembra chiarire che durante il processo ci sia un potenziamento (aumento di concentrazione) di *Orpinomyces* piuttosto che di *Neocallimastix*, ma soprattutto indica un arricchimento delle specie già presenti nell'inoculo CSTR.

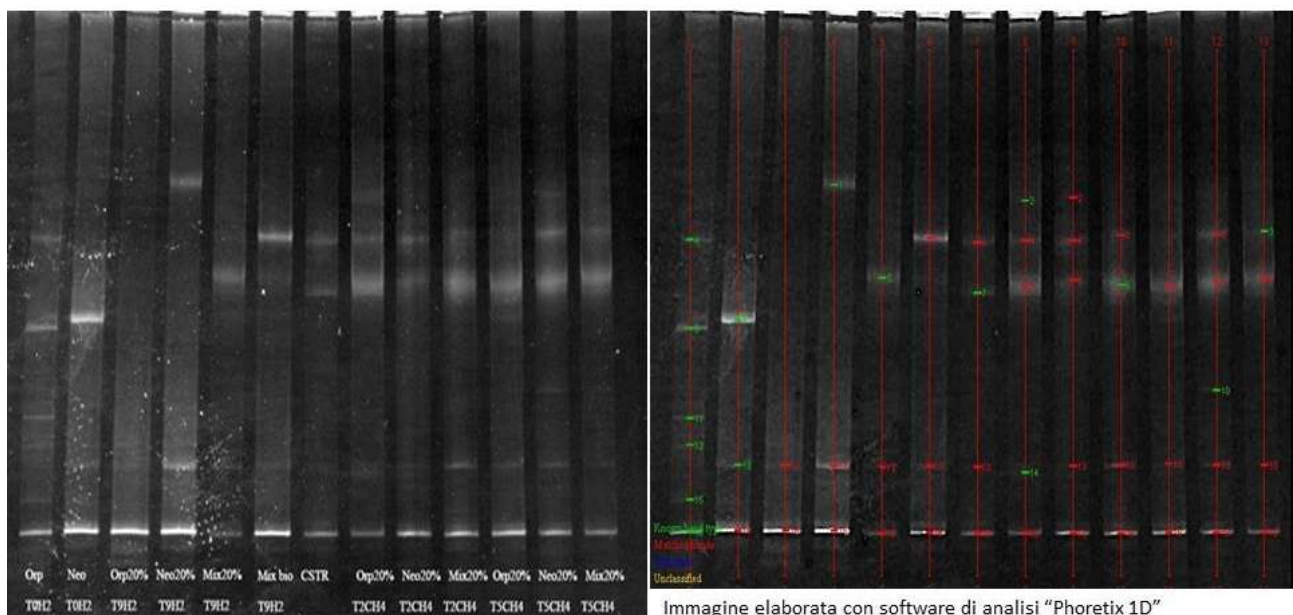


Figura 13. Fingerprinting molecolare dell'evoluzione della comunità microbica fungina nelle varie fasi dell'esperimento di produzione di bio-idrogeno e bio-metano effettuata tramite gel di PCR-DGGE

I dendrogrammi ottenuti e la clusterizzazione effettuata attraverso i coefficienti di Dice e Pearson (Figura 14) mostrano come durante il processo i vari campioni subiscano variazioni nella composizione relativa delle specie fungine considerate.

I risultati ottenuti devono comunque considerarsi preliminari e sono necessari gel di conferma per avere informazioni più precise. Per ragioni logistiche, questi verranno effettuati in una fase successiva.

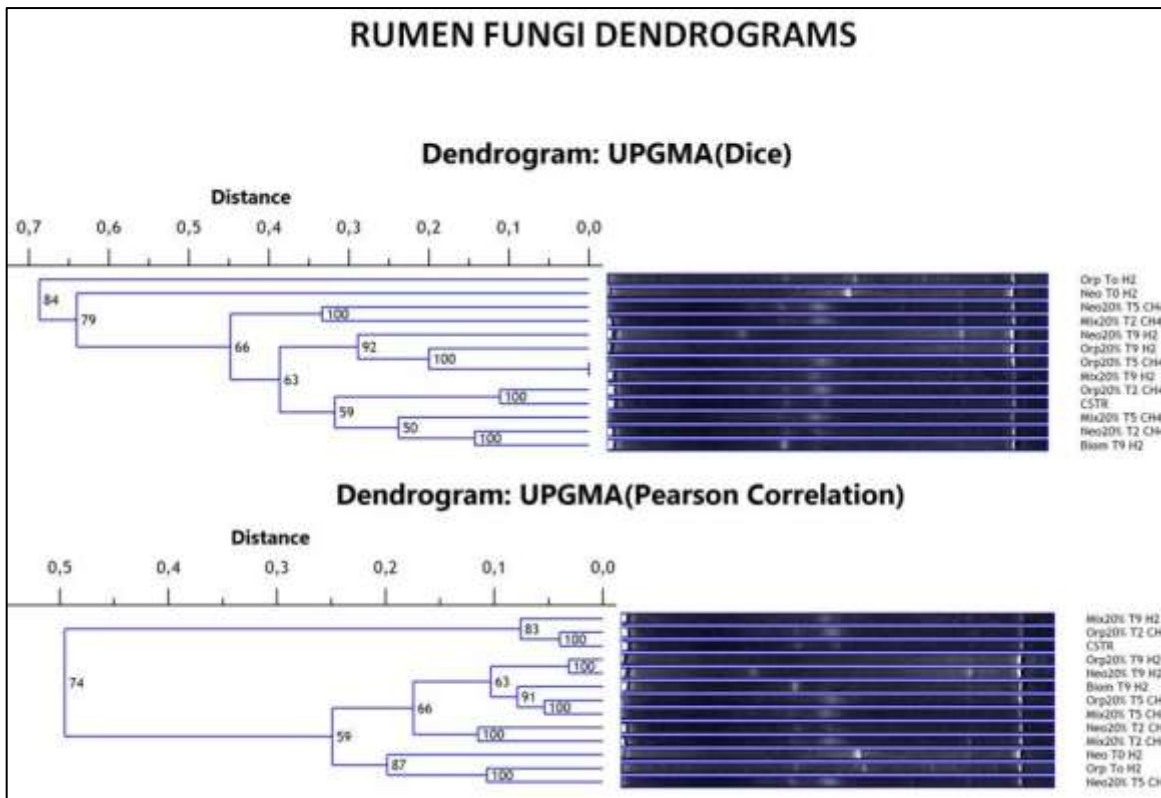


Figura 14. Dendrogrammi relativi all'evoluzione della comunità microbica fungina nei vari campioni analizzati tramite fingerprinting molecolare (PCR-DGGE). La clusterizzazione è stata effettuata sia tramite il coefficiente di DICE che tramite il coefficiente di PEARSON

4 Verifica dell'attività chitinolitica dell'inoculo F₂₁₀

Dopo la cellulosa, la chitina è il più abbondante biopolimero presente in natura. Infatti, è uno dei principali componenti dell'esoscheletro degli insetti e di altri artropodi, della parete cellulare dei funghi, ed è presente anche nella cuticola epidermica o in altre strutture superficiali di molti altri invertebrati. Ogni anno vengono prodotti al mondo circa 3mld di scarti contenenti elevate quantità di chitina provenienti dalla lavorazione dei crostacei. Un'altra fonte importante di materiale ad alto contenuto in chitina è il micelio esausto delle industrie produttrici di metaboliti fungini quali antibiotici, enzimi, acidi organici, ecc.

Scopo dell'esperimento era la verifica delle capacità chitinolitiche dell'inoculo F₂₁₀ ipotizzate nella ricerca precedente effettuata utilizzando chitina purificata (Gorrasi et al., 2014). A tal fine si è utilizzato un materiale chitinoso molto simile a quello ottenibile da scarti realmente prodotti, ad esempio dalla lavorazione industriale di crostacei, con l'idea di trasformarlo in risorsa/substrato da cui ottenere energia sotto forma di bio-idrogeno e/o bio-metano. E' stato allestito un esperimento avvalendosi di un modello disegnato tramite metodologia RSM (Response Surface Methodology) e successiva validazione statistica dello stesso. Nel modello utilizzato le variabili studiate erano:

- concentrazione di chitina (ottenuta da carapaci di gamberetti prelevati da industria del settore, lavati ed essiccati), utilizzata come substrato principale;
- concentrazione di Corn Step Liquor (CSL) utilizzato in concentrazione minimale al fine di promuovere il metabolismo microbico come già riportato per vari processi industriali (Juarez-Jimenez et al., 2010)

Il disegno fattoriale, riportato in Tabella 6, è stato progettato ed analizzato nel laboratorio di Microbiologia coordinato dal Prof. Massimiliano Fenice presso il Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche (DEB) dell'Università della Toscana. Presso lo stesso laboratorio sono stati preparati i materiali ed approntati i terreni di coltura per l'inoculo con l'F₂₁₀.

Tabella 6. Terreni colturali formulati secondo il disegno fattoriale dell'esperimento chitina

N° esperimento	Nome	Chitina, g/L	CSL, g/L
1	N1	5	0
2	N2	20	0
3	N3	5	1
4	N4	20	1
5	N5	5	0,5
6	N6	20	0,5
7	N7	12,5	0
8	N8	12,5	1
9	N9	12,5	0,5
10	N10	12,5	0,5
11	N11	12,5	0,5
12	N12	5	0
13	N13	20	0
14	N14	5	1
15	N15	20	1
16	N16	5	0,5
17	N17	20	0,5
18	N18	12,5	0
19	N19	12,5	1
20	N20	12,5	0,5
21	N21	12,5	0,5
22	N22	12,5	0,5

4.1 Risultati I FASE

L'esperimento è stato dopo aver attivato per 24 ore l'inoculo di batteri idrogeno-produttori F₂₁₀. La quantità di inoculo aggiunta corrispondeva al 20% del volume di lavoro. Per tutta la durata dell'esperimento il pH del mezzo di coltura si è mantenuto costante con valori tra 6,5 e 6,8; il pH finale per tutti i batch è risultato pari a 6,8. I dati in Figura 5 sono stati mediati e raggruppati per repliche. Le analisi hanno mostrato che la produzione di idrogeno raggiungeva le massime concentrazioni tra le 24 e 48 ore. La produzione di idrogeno è stata inizialmente monitorata 2 volte nelle prime 48h. Successivamente, quando questa procede più lentamente, i campionamenti sono stati diradati (cfr Accordo di Programma anno precedente). Le produzioni più elevate si ottengono alle massime concentrazioni di corn steep liquor e alle più basse di chitina (1:5) (242,2±2,7 mL/L), mentre le più basse alle più basse concentrazioni di corn steep liquor e più alte di chitina (0:20) (123,9±23,7 mL/L); ciò dimostra che concentrazioni elevate di chitina rappresentano un fattore limitante per il processo, infatti le rese più alte si ottengono alle più basse concentrazioni di chitina.

In Tabella 7 sono riportate le percentuali massime di H₂ contenute nel gas e gli mL/L prodotti alle diverse concentrazioni di substrato. Come si può dedurre altresì dalle Figura 14 e Figura 15, buona produzione del gas avviene anche in assenza di CSL a basse concentrazioni di chitina confermando che questo substrato non è essenziale, ma utile per migliorare le rese.

Tabella 7. Confronto dei parametri di processo di produzione di H₂ a diverse concentrazioni di substrato

N° esperimento	Chitina (g/L)	CSL (g/L)	T. produz. max (ore)	H ₂ (%)	H ₂ (mL/L)	pH finale
1	5	0	48	11,5	221,4	6,5
2	20	0	24	7,7	107,1	6,5-7
3	5	1	48	13,2	248	6,5
4	20	1	48	8,4	181,1	6,5
5	5	0,5	24	13,1	244	6,5
6	20	0,5	24	9,0	191,7	6,5-7
7	12,5	0	24	7,9	170	6,5
8	12,5	1	24	10,4	208	6,5
9	12,5	0,5	24	9,3	196,1	6,5
10	12,5	0,5	24	8,3	176,8	6,5
11	12,5	0,5	24	9,5	198,4	6,5
12	5	0	24	11,1	224,7	6-6,5
13	20	0	24	9,6	140,7	6,5
14	5	1	24	12,1	250,7	6,5
15	20	1	24	8,1	179,2	6,5
16	5	0,5	24	11,7	244,1	6,5
17	20	0,5	24	8,1	175,6	6,5
18	12,5	0	24	7,8	165	6,5
19	12,5	1	24	9,7	202	6,5
20	12,5	0,5	24	8,8	183,3	6,5
21	12,5	0,5	24	9,1	188,4	6,5
22	12,5	0,5	24	9,8	207,2	6,5

In Figura 15 è riportato l'effetto combinato dei due substrati sulla produzione di idrogeno, mentre i grafici di Figura 16 descrivono gli stessi risultati, ma considerando l'effetto del singolo parametro.

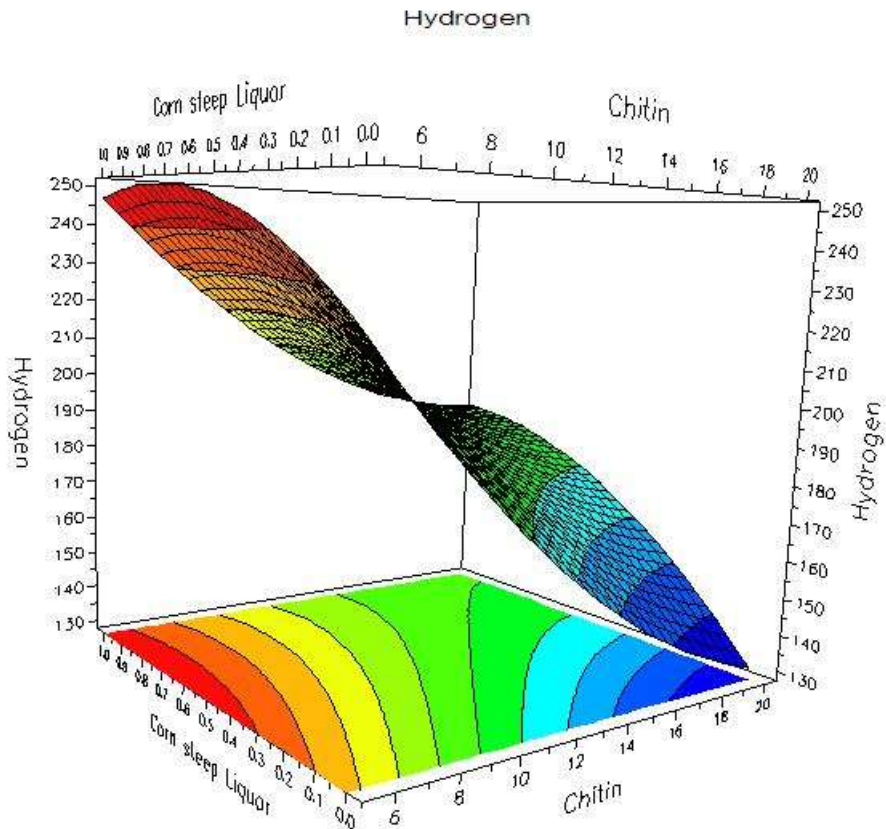


Figura 15. Superficie di risposta della modellizzazione RSM inerente la massima produzione di idrogeno in terreni colturali contenenti diverse concentrazioni di chitina e CSL e sottoposti a DF dopo inoculo con F_{210}

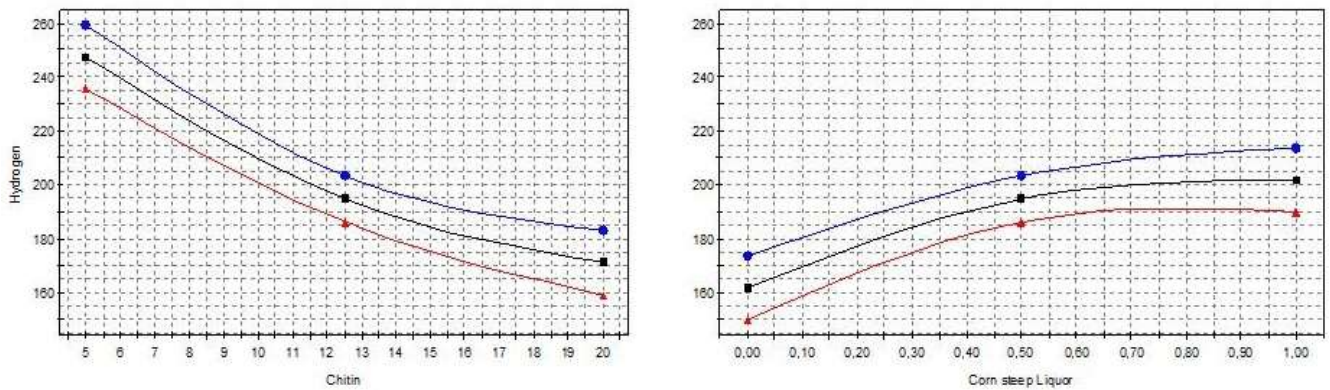


Figura 16. Effetto dei singoli componenti del terreno colturale (chitina e CSL) sulla massima produzione di idrogeno DF dopo inoculo con F_{210}

Il modello RSM elaborato nel presente studio è risultato statisticamente significativo come si può dedurre dai parametri riportati in Figura 17 e Tabella 8.

Investigation: CHITINA CSL H2-1 (PLS, comp.=2)
Summary of Fit

R²
Q²

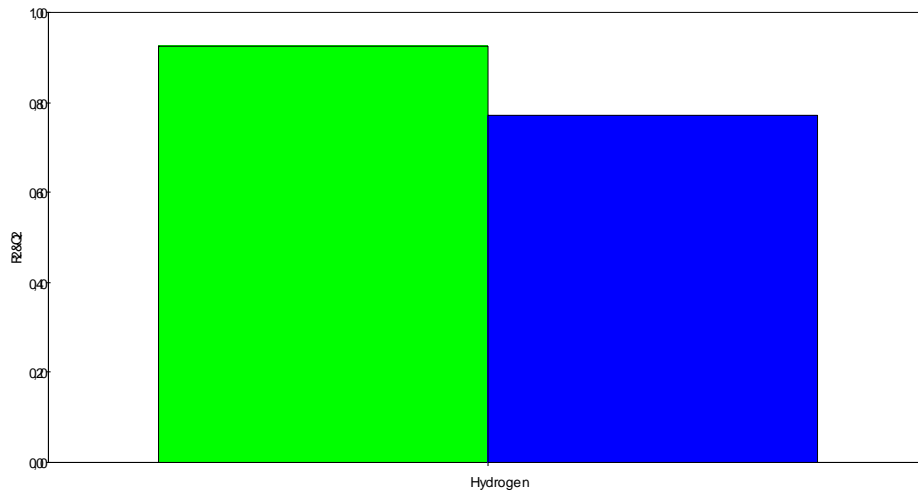


Figura 17. Principali parametri statistici (R² e Q²) del modello RSM

Tabella 8. Parametri statistici del modello RSM (ANOVA Table)

Hydrogen	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
Total	22	868039	39456,3			
Constant	1	841823	841823			
Total Corrected	21	26215,4	1248,35			35,3321
Regression	5	24227,5	4845,49	38,9983	0,000	69,6096
Residual	16	1987,98	124,249			11,1467
Lack of Fit	3	644,537	214,846	2,07898	0,153	14,6576
(Model Error)						
Pure Error	13	1343,44	103,342			10,1657
(Replicate Error)						
N = 22	Q2 =	0,770	Cond. no. =	3,5792		
DF = 16	R2 =	0,924	Y-miss =	0		
Comp. = 2	R2 Adj. =	0,900	RSD =	11,1467		

5 Analisi con tecnica FISH delle comunità microbiche

Sono state avviate le indagini microbiologiche delle comunità microbiche delle differenti condizioni sperimentali (cfr schema del piano sperimentale di Figura 18) mediante la tecnica di microscopia in epifluorescenza FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). La tecnica consente la visualizzazione, l'identificazione, l'enumerazione e la localizzazione di cellule batteriche metabolicamente attive senza dover ricorrere a tecniche colturali. Utilizzando specifiche sonde oligonucleotidiche di DNA (circa 15-20 nucleotidi) complementari alle sequenze dell'rRNA ribosomiale 16S (16S rRNA) e legate covalentemente ad un opportuno fluorocromo all'estremità 5', è stato possibile identificare selettivamente specifici taxa batterici e/ gruppi funzionali. La FISH è utilizzata in accordo al criterio di classificazione filogenetica: partendo dal dominio (Bacteria/Archea).

Per i vantaggi che offre la tecnica FISH viene sempre più frequentemente utilizzata per studiare la composizione quali-quantitativa delle comunità batteriche attive nella DA nonché gli *shift* nelle comunità in risposta alle variazioni dei parametri sperimentali e alle differenti configurazioni di reattore.

5.1 Metodologie e risultati ottenuti

La prima fase d'indagine FISH ha riguardato la caratterizzazione degli inoculi utilizzati, rispettivamente F₂₁₀ e CSTR.

I campioni opportunamente diluiti sono stati filtrati su membrana in policarbonato (0,2 µm) e sottoposti a pretrattamenti enzimatici con Lisozima e Proteinasi-K al fine di aumentare la permeabilizzazione delle pareti cellulari delle cellule Gram+. Solo successivamente i campioni sono stati sottoposti a ibridazione con la sonda oligonucleotidica specifica (Amann, 1995; Pernthaler et al, 2001).

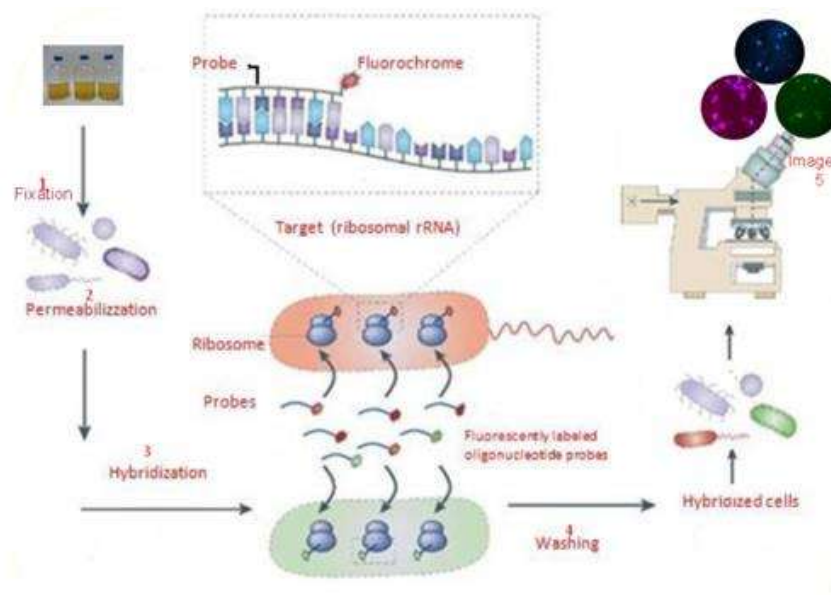


Figura 18. Schema delle fasi per l'analisi delle comunità batteriche tramite tecnica FISH

Le caratteristiche delle principali sonde in corso di utilizzazione sono riportate nella Tabella 9, mentre nella tabella 10 è riportato uno schema riassuntivo delle indagini finora eseguite.

Tabella 9. Principali sonde utilizzate

Inoculo	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
F ₂₁₀	EUB338mix	ALF968 ALF1b	GAM42A	LGC354a,b,c	ARCH915
CSTR	EUB338mix	ARCH915			

Tabella 10. Indagini eseguite

Funzione ecologica principale	Gruppi filogenetici	Sonde	Sequenza (5' -> 3')	Posizione rRNA	Bibliografia
Metanogeni	Archaea	ARCH915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S(915 – 934)	Stahl and Amann, 1991
Metanogeni Acetoclastici	Methanosarcinaceae	MS821	CGCCATGCCTGACACCTAGCGAGC	16S (821-844)	Raskin et al., 1994
Metanogeni Acetoclastici	Methanosaetacea	MX825	TCGCACCGTGCCGACACCTAGC	16S(825-847)	Raskin L.et al., 1994
Eubatteri	Bacteria	EUB338	GCTGCCTCCGTAGGAGT	16S(338-355)	Amann et al., 1990
Eubatteri	Bacteria	EUB338II	GCAGCCACCGTAGGTGT	16S(338-355)	Daims et al., 1999
Eubatteri	Bacteria	EUB338III	GCTGCCACCGTAGGTGT	16S(338-355)	Daims et al., 1999
Idrolitici e Idrogeno produttori	Gram+ - Firmicutes	LGC354a	TGGAAGATTCCCTACTGC	16S(354-371)	Meier et al., 1999
Idrolitici e Idrogeno produttori	Gram+ - Firmicutes	LGC354b	CGGAAGATTCCCTACTGC	16S(354-371)	Meier et al., 1999
Idrolitici e Idrogeno produttori	Gram+ - Firmicutes	LGC354c	CCGAAGATTCCCTACTGC	16S(354-371)	Meier et al., 1999
Idrogeno produttori	α -Proteobacteria	ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S(19-35)	Manz et al.,1992
Idrogeno produttori	α -Proteobacteria	ALF968	GGTAAGGTTCTGCGGTT	16S(968-985)	Neef, 1997
Idrogeno produttori	γ -Proteobacteria	GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	23S(1027-1043)	Manz et al., 1992

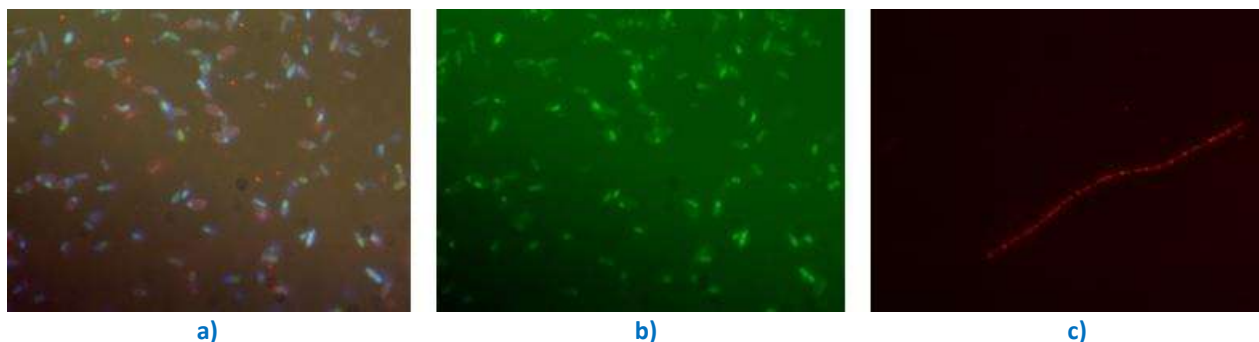


Figura 18. Micrografie relative alle comunità microbiche degli inoculi ottenute mediante tecnica FISH. a) Inoculo F₂₁₀: cellule batteriche marcate contemporaneamente con DAPI e sonde EUB 338, I,II,III marcate con Indocarbocianina Cy3 per il rilevamento degli Eubatteri; b) analoga micrografia che evidenzia le sole cellule di Eubatteri; c) Inoculo CSTR: *Archea* evidenziati mediante sonda Arch915 marcata con Indocarbocianina – CY3.

Le stime ottenute con le sonde di ibridizzazione sono riferite alla abbondanza batterica totale ottenuta con la colorazione in DAPI effettuata tramite il metodo della conta diretta al microscopio ad epifluorescenza (AXIOSKOP 40, Zeiss, Germany) (Figura 18).

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che nell'inoculo F₂₁₀ il 78,8% dei batteri è positivo al dominio dei *Bacteria*, mentre non è stato rilevato nessun segnale positivo per il dominio degli *Archea*. Come si può osservare nel grafico riportato in Figura 19, nell'inoculo F₂₁₀ predominano i batteri del gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* e i LGC. *Firmicutes*, che raggiungono rispettivamente, il 47,4% e il 43,4%.

Il 10,9% dei batteri è risultato positivo per la sonda dei *Gamma-Proteobacteria*. Tutti i gruppi includono batteri con notevoli capacità idrolitiche e in grado di produrre idrogeno. I risultati ottenuti per l'inoculo F₂₁₀ concordano con l'analisi FISH già effettuata e presentata nella Relazione AdP della precedente annualità, in cui si rilevava la predominanza di *Alpha-Proteobacteria* (42%) e *Gamma-Proteobacteria* (20%). Rispetto alla precedente indagine è stato possibile rilevare l'importante componente dei LGC – *Firmicutes* – (43,4%) grazie alla messa a punto del pretrattamento combinato con Lisozima e Proteinasi-K. La loro presenza era stata evidenziata mediante altre tecniche molecolari (Di Bonito et al., 2013 e cfr Relazione AdP precedente annualità).

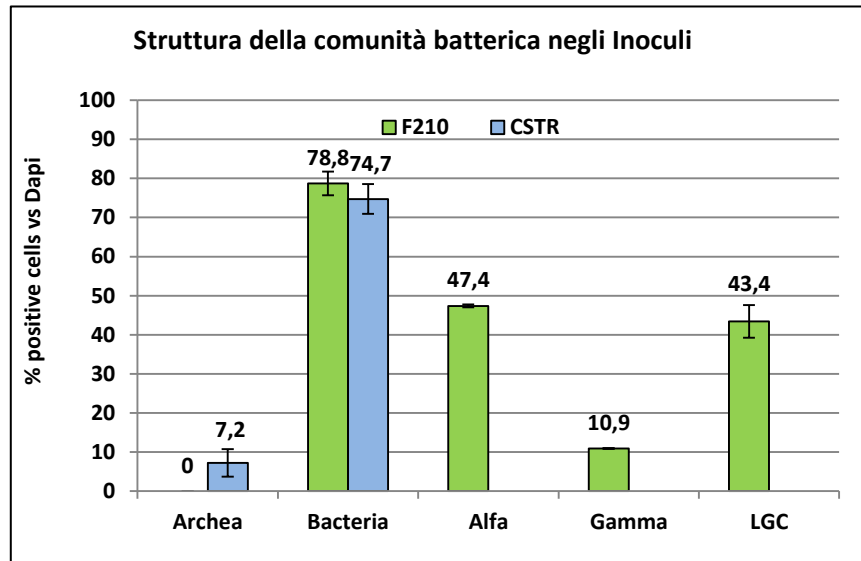


Figura 19. Analisi delle comunità F210 e CSTR utilizzate come inoculi. Alpha = *Alpha-Proteobacteria*; Beta = *Beta-Proteobacteria*; Gamma = *Gamma-Proteobacteria*; LGC = Gram + con basso contenuto di G+C (*Firmicutes*). Le barre verticali riportano le deviazioni standard per tre repliche.

Nell'inoculo CSTR, si rilevano rispettivamente il 74,7% di *Bacteria* e il 7,2% di *Archea*.

In Tabella 11 è riportato infine lo schema delle analisi FISH, attualmente in corso, con un confronto tra condizioni sperimentali e relative sonde utilizzate: si stanno infatti analizzando i campioni riferiti al T9 e al T11, corrispondenti rispettivamente al termine della fase a idrogeno e a 48 ore dall'inizio della fase a metano, dopo l'inoculo con CSTR.

Tabella 11. Analisi FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)										
Sigla	N°Esperimento	Inoculo	Tempo	Probe						
A	(1-2-3)	10% F210 + 10% Orpinomyces	T9	EUB338mix	ALF968	GAM42A	LGC354a,b,c	-	-	-
			T11	EUB338mix	ALF1b	GAM42A	LGC354a,b,c	ARCH915	MS821	MX825
B	(10-11-12)	10% F210 + 10% Mix*	T9	EUB338mix	ALF968	GAM42A	LGC354a,b,c	-	-	-
			T11	EUB338mix	ALF1b	GAM42A	LGC354a,b,c	ARCH915	MS821	MX825
C	(13-14-15)	10% F210 + 10% Neocallimastix	T9	EUB338mix	ALF968	GAM42A	LGC354a,b,c	-	-	-
			T11	EUB338mix	ALF1b	GAM42A	LGC354a,b,c	ARCH915	MS821	MX825
D	(19-20-21)	20% F210	T9	EUB338mix	ALF968	GAM42A	LGC354a,b,c	-	-	-
			T11	EUB338mix	ALF1b	GAM42A	LGC354a,b,c	ARCH915	MS821	MX825
E	(4-5-6)	20% Orpinomyces	T11	EUB338mix	ALF968	GAM42A	LGC354a,b,c	ARCH915	MS821	MX825
F	(7-8-9)	20% Neocallimastix	T11	EUB338mix	ALF968	GAM42A	LGC354a,b,c	ARCH915	MS821	MX825
G	(16-17-18)	20% Mix*	T11	EUB338mix	ALF968	GAM42A	LGC354a,b,c	ARCH915	MS821	MX825

6 Bibliografia

- Amann R.I., In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Akkermans AD, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds) *Molecular microbial ecology manual* 1995. Kluwer, London, pp 3.3.6/1–3.3.6/15
- Di Bonito R., Marone A., Massini G., Patriarca C., Rosa S., Signorini A., Varrone C., Viola C., and Izzo G. 2013. Characterization by length heterogeneity (LH)-PCR of a hydrogen-producing community obtained in dark fermentation using coastal lake sediment as an inoculum. *Energy, Sustainability and Society* 3:3
- Pernthaler J.F., Glockner O., Schonhuer W., Amann R. 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with r-RNA –targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology* 30, 207-26.
- APHA 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21th ed.* Washington, DC: American Public Health Association.
- Bauer A., Bosch P., Friedl A., Amon T., 2009. *Analysis of methane potentials of steam-exploded wheat straw and estimation of energy yields of combined ethanol and methane production.* *Journal of Biotechnology*, 142:50-55.
- Concetti, S., Chiariotti, A., Patriarca, C., Marone, A., Varrone, C., Contò, G., Cali, M., Signorini, A., 2013. *Biohydrogen production from buffalo manure codigested with agroindustrial by-products in an anaerobic reactor.* *Buffalo Bulletin*, 32,(2): 1241-1244.
- Games W., Hoekstra E. S., Aptroot A., 1980. *CBS Course of Micology.* Fourth edition.
- Gorrasi S., Izzo G., Massini G., Signorini A., Barghini P., Fenice M., 2014. *From Polluting Seafood Wastes to Energy. Production of Hydrogen and Methane from Raw Chitin Material by a Two-phase Process.* *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 15:526-536.
- Griffith G. W., Baker S., Filegerova K., Liggenstoffer A., Giezen M., Voigt K., Beakes G., 2010. *Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota.* *Ima Fungus*, volume1-N°2:181-185.
- 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*, Review.
- Jin W., Cheng Y. F., Mao S. Y., Zhu W. Y., 2011. *Isolation of natural cultures of anaerobic fungi and indigenously associated methanogens from herbivores and their bioconversion of lignocellulosic materials to methane.* *Bioresource Technology*, 102: 7925-7931.
- Juarez-Jimenez B., Rodelas B., Martinez_Toledo M.V., Gonzalez-Lopez J., Crognale S., Gallo A.M., Pesciaroli C., and Fenice M. 2008. *Production of chitinolytic enzymes by a strain (BM17) of Paenibacillus pabuli isolated from crab shells samples collected in the East Sector of Central Tyrrhenian.* *Sea. Int. J. Biol. Macr.* 43: 27-31.
- Kiran E. U., Trzicinski A. P., Ng W. J., Liu Y., 2014. *Bioconversion of food waste to energy: A review.* *Fuel*, 134:389-399.
- Krause D. O., Nagaraja T. G., Wright A. D. G., Callaway T. R., 2013. *Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology.* *J. Anim. Sci.*, 91:331-341.
- Lowe S. E., Griffith G. G., Milne A., Theodorou M. K., Trinci P. J., 1987. *The Life Cycle and Growth of an Anaerobic Rumen Fungus.* *Journal of General Microbiology*, 133: 1815-1827.
- Lwin K. O., Kondo M., Ban-Tokuda T., Lapitan M. R., Del-Barrio N. A., Fujihara T., Matsui H., 2012. *Ruminal fermentation and microbial ecology of buffaloes and cattle fed the same diet.* *Animal Science Journal*, 83:767-776.
- Marone A, Rosa S, Signorini A, Massini G, Patriarca C, Varrone C, Izzo G, 2010. *Screening Microbial Diversity from Vegetal Wastes in Aid of Bio-Hydrogen Production.* *Eurac Book.* Trento: Eurac Research, 57: 137-146.
- O'Fallon V. J., Wright W. R., Calza E. Jr and R., 1991. *Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus Neocallimastix frontalis EB188.* *Biochem. J.*, 274:595-599.
- Prochazka J., Mrazek J., Strosova L., Fliegerova K., Zabranska J., Dohanyos M., 2012. *Enhanced biogas yield from energy crops with rumen anaerobic fungi.* *Eng. Life Sci.*, 3:343-351.

- Redwood M. D., Paterson-Beedle M., Macaskie L. E., 2009. *Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: towards the hydrogen economy*. Environmental Science and Biotechnology, 8:149-185.
- Ren N., Wang B., Huang J. C., 1997. *Ethanol type fermentation from Carbohydrate in high rate acidogenic reactor*. Biotechnology and Bioengineering, 5:428-433.
- Risberg K., Sun L., Leven L., Horn S. J., Schnurer A., 2013. *Biogas production from wheat straw and manure-Impact of pretreatment and process operating parameters*. Bioresource Technology, 149:232-237.
- Sapci Z., Morken J., Linjordet R., 2013. *An Investigation of the Enhancement of Biogas Yields from Lignocellulosic Material using Two Pretreatment Methods: Microwave Irradiation and Steam Explosion*. BioResources, 8:1976-1985.
- Wood T. M., Wilson C. A., 1995. *Studies on the capacity of the cellulose of the anaerobic rumen fungus Piromonas communis P to degrade hydrogen bond-ordered cellulose*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 43: 572-578.
- Wolin M. J., 1975. *Interactions between the bacterial species in the rumen*. Digestion and Metabolism in the Ruminant. I. pp.134-138. W. McDonald and A. C. I. Warner, ed Univ. New Eng. Publ. Unit, Armidale, Australia.