



UNIVERSITÀ DI PAVIA

FACOLTÀ DI INGEGNERIA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CIVILE E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

TESI DI LAUREA

TITOLO

OTTIMIZZAZIONE DI UN SISTEMA BIOELETTROCHIMICO (BES) PER LA PRODUZIONE
DI ACETATO E VALORIZZAZIONE COME SUBSTRATO PER LA CRESCITA
MICROALGALE FINALIZZATA ALLA SINTESI LIPIDICA

Candidata: Monica Montalbano

Relatore: prof.Dr.Ing. Andrea G. Capodaglio

Correlatore: Prof.ssa Arianna Callegari

Correlatore esterno: Pablo Benavides Mateos

A.A. 2025/2026

INDICE

ABSTRACT	V
INTRODUZIONE	1
CAPITOLO I	3
IL QUADRO DI RIFERIMENTO GLOBALE: TRANSIZIONE ENERGETICA, CAMBIAMENTI CLIMATICI E STRATEGIE CCU	3
1.1 Contesto climatico ed energetico globale: Emissioni, politiche di decarbonizzazione e ruolo dei biocombustibili avanzati	3
1.2 Microalghe: caratteristiche biologiche, produttività e potenziale per la produzione di biodiesel.	5
1.3 Tecnologie bioelettrochimiche per la valorizzazione della CO ₂ : dai sistemi MFC/MEC/MES alla produzione biologica di composti a valore aggiunto	9
1.4 Integrazione tra sistemi bioelettrochimici e microalghe: potenzialità, limiti e prospettive applicative	15
CAPITOLO II	18
MATERIALI, METODI E CONFIGURAZIONE SPERIMENTALE	18
2.0 Introduzione	18
2.1 Configurazione dei sistemi sperimentali	18
2.1.1 Sistema bioelettrochimico (BES)	18
2.1.1.1 Inoculo del sistema bioelettrochimico (BES)	21
2.1.2 Fotobioreattore	22
2.2 Processi di monitoraggio, analisi chimiche e calcoli nel BES	24
2.2.1 Monitoraggio dei parametri e analisi chimiche	24
2.2.2 Campionamenti liquidi	24
2.2.3 Campionamenti gassosi	25
2.2.4 Procedura di riempimento degli elettrodi e gestione del cloro nell’anodo	27
2.2.5 Elaborazione dei dati e calcolo dei parametri di performance	27
2.2.5.1 Produttività	28
2.2.5.2 Efficienza Coulombica	29
2.2.5.3 Energia elettrica consumata	30
2.2.5.4 Efficienza di conversione del carbonio (%C) in acetato	30
2.3 Processi di monitoraggio, analisi chimiche e calcoli nel fotobioreattore	32
2.3.1 Processi di monitoraggio e analisi chimiche	32

2.3.2 Procedura di riempimento del fotobioreattore	37
2.3.3 Elaborazione dei dati e calcolo dei parametri di performance	40
 CAPITOLO III	 42
 RISULTATI SPERIMENTALI E ANALISI ECONOMICA DEI SISTEMI BIOELETTROCHIMICI (BES)	 42
3.0 Introduzione	42
3.1 Andamento dei parametri elettrochimici e biologici nei due catodi	43
3.1.1 Conducibilità Elettrica (EC)	44
3.1.2 pH	44
3.1.3 Crescita Microbica (OD_{600})	44
3.1.4 Conclusione della sezione andamento dei parametri elettrochimici e biologici nei due catodi	45
3.2 Produzione di Acetato e influenza dell'HRT	45
3.2.1 Produzione di Acetato	46
3.2.2 Effetto dell'HRT (tempo di ritenzione idraulica)	46
3.2.3 Conclusione della sezione produzione di acetato e influenza dell'HRT	47
3.3 Analisi dei gas prodotti: H_2 , CH_4 e CO_2 nei due catodi	47
3.3.1 Idrogeno (H_2)	48
3.3.2 Metano (CH_4)	49
3.3.3 Anidride Carbonica (CO_2)	49
3.3.4 Confronto tra H_2 teorico, H_2 effettivo e CO_2 consumata	50
3.3.5 Conclusione della sezione GAS	51
3.4 Produzione di Acido Butirrico e Acido Propionico	51
3.4.1 Produzione Acido Butirrico	53
3.4.2 Produzione Acido Propionico	53
3.4.3 Conclusione della sessione AGV	54
3.5 Efficienza Coulombica, consumo energetico e produttività dei due catodi	55
3.5.1 Efficienza Coulombica (CE)	55
3.5.2 Consumo energetico specifico (EE)	56
3.5.3 Produttività normalizzata ($mg_{acetato} \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$)	57
3.6 Conclusioni BES	57
3.7 Analisi economica della produzione di acetato nei sistemi BES	58
3.7.1 Valutazione economica generale del processo bioelettrochimico	58

3.7.2 Analisi economica e consumo energetico specifico dell'acetato	59
3.7.3 Confronto con i costi industriali dell'acetato	59
3.7.4 Costo per m ² di elettrodo	60
3.7.5 Integrazione con processi circolari	60
3.7.6 Conclusione Economica	61
 CAPITOLO IV	 62
 VALUTAZIONE SPERIMENTALE DELLA RISPOSTA FISIOLOGICA E METABOLICA DI CHLORELLA SOROKINIANA	 62
4.0 Introduzione ai cicli microalgali	62
4.1 CRESCITA AUTOTROFICA DELLE MICROALGHE	62
4.1.1 Andamento della clorofilla totale nel ciclo autotrofico	63
4.1.2 Crescita cellulare nel ciclo autotrofico	63
4.1.3 Andamento della biomassa secca nel ciclo autotrofico	64
4.1.4 Conclusioni ciclo autotrofico	64
4.2.1 Transizione metabolica: da autotrofico a eterotrofico	65
4.2.2 Studio preliminare sulle concentrazioni di acetato (3 g·L ⁻¹ vs 6 g·L ⁻¹)	65
4.2.3 Conclusione transizione metabolica	66
4.3.1 Ciclo eterotrofico filtrato: crescita, pigmenti e biomassa	67
4.3.2 Crescita cellulare nel ciclo eterotrofico filtrato	67
4.3.3 Andamento della biomassa secca nel ciclo eterotrofico filtrato	68
4.3.4 Clorofilla/biomassa nel ciclo eterotrofico filtrato	68
4.3.5 Conclusione ciclo eterotrofico filtrato	69
4.4.1 Ciclo eterotrofico non filtrato: competizione, stress e instabilità	69
4.4.2 Consumo di acetato nel ciclo non filtrato (R1-R2)	70
4.4.3 Crescita microalgale nel ciclo non filtrato (scala logaritmica)	70
4.4.4 Cellule batteriche medie nel ciclo eterotrofico non filtrato	71
4.4.5 Biomassa secca nel ciclo non filtrato (R1-R2)	72
4.4.6 Andamento dei pigmenti fotosintetici (clorofilla a, b, totale)	72
4.4.7 Carotenoidi nel ciclo non filtrato (R1-R2)	73
4.4.8 Conclusione ciclo eterotrofico non filtrato	74
4.5.1 Confronto sintetico tra ciclo eterotrofico filtrato e non filtrato	74
4.5.2 Consumo di acetato: andamento lineare vs irregolare	75

4.6.1 Confronto dei pigmenti tra ciclo autotrofico e ciclo eterotrofico non filtrato	76
4.6.2 Clorofilla a nei cicli autotrofico ed eterotrofico non filtrato	76
4.6.3 Carotenoidi nei cicli autotrofico ed eterotrofico non filtrato	77
4.6.4 Conclusioni confronto dei pigmenti tra ciclo autotrofico e ciclo eterotrofico non filtrato	78
4.6.5 Confronto sintetico autotrofico vs eterotrofico	78
4.7.1 Integrazione con BES: uso dell'acetato e implicazioni biotecnologiche	79
4.7.2 Ruolo della limitazione di azoto: stress e produzione lipidica	79
 CAPITOLO V	 81
 ANALISI DI PROCESSO INTEGRATO, IMPLICAZIONI ECONOMICHE E SVILUPPI FUTURI	 81
 5.0 Discussione	 81
5.1 Ruolo centrale dell'idrogeno come prodotto limitante	81
5.2 Selettività metabolica e formazione di AGV non acetici	82
5.3 Implicazioni energetiche ed economiche	82
5.4 Integrazione con le colture microalgali	82
5.5 Limiti sperimentali e prospettive di ottimizzazione	83
 CONCLUSIONE	 84
 BIBLIOGRAFIA	 86

ABSTRACT

Contesto e problematica: Il progressivo incremento delle emissioni globali di gas serra e l'urgente necessità di decarbonizzare settori critici come quello dei trasporti hanno spinto la ricerca scientifica verso lo sviluppo di biocombustibili avanzati di terza e quarta generazione. In questo scenario, le microalghe e i sistemi bioelettrochimici (BES) emergono come tecnologie chiave per la cattura e la valorizzazione dell'anidride carbonica (CO₂), evitando al contempo la competizione con il suolo agricolo e le colture alimentari.

Obiettivo dello studio: Questo lavoro di tesi analizza il potenziale sinergico derivante dall'integrazione tra i sistemi di elettrosintesi microbica (MES) e la coltivazione di microalghe. L'obiettivo principale è valutare la fattibilità tecnica di una bioraffineria circolare in cui la CO₂ viene prima convertita biologicamente in acetato tramite batteri acetogeni al catodo di un sistema BES, per poi essere utilizzata come substrato organico per stimolare la crescita eterotrofica/mixotrofica e l'accumulo lipidico di microalghe destinate alla produzione di biodiesel.

Materiali e Metodi: L'attività sperimentale è stata condotta per una durata di sei mesi presso il Laboratorio di Chimica e Ingegneria Ambientale (LEQUIA) dell'Università di Girona (Spagna). Il sistema accoppiato comprende due reattori BES a doppia camera (anodica e catodica) a zero intercapedine, operanti a una densità di corrente costante di 12 A · m⁻² con un *biofilm* elettroattivo maturo ricavato da digestato anaerobico. La somministrazione di CO₂ è stata ottimizzata in modalità semi-continua mediante un controllore di portata massica per massimizzare la ritenzione dei gas e la produzione di acido acetico. L'effluente catodico arricchito in acetato è stato successivamente impiegato come nutrimento in tre fotobioreattori tubolari in acrilico per la coltivazione della microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX2805, monitorando costantemente parametri critici quali pH, temperatura, densità ottica (OD₆₀₀) e conducibilità elettrica.

Risultati e Conclusioni: L'integrazione dei processi permette di superare i limiti intrinseci di entrambe le tecnologie, offrendo una soluzione efficiente per il riciclo del carbonio. La letteratura e le evidenze sperimentali confermano che la plasticità metabolica del genere *Chlorella* consente un efficace utilizzo degli acidi grassi volatili (AGV) prodotti dal BES, reindirizzando il metabolismo fotosintetico verso una robusta sintesi di triacilgliceroli (TAG) utili alla transesterificazione. Il modello integrato proposto non solo contribuisce al sequestro netto di gas climalteranti, ma delinea un percorso promettente per la produzione di biocombustibili conformi agli standard europei, sposando appieno gli obiettivi di sostenibilità del Green Deal e del pacchetto Fit for 55.

INTRODUZIONE

La transizione ecologica e la decarbonizzazione del settore energetico e industriale rappresentano due delle sfide più urgenti e complesse del nostro secolo. L'accumulo antropogenico di anidride carbonica (CO_2) in atmosfera ha ormai superato i livelli critici di sicurezza climatica, spingendo le istituzioni e la ricerca scientifica verso lo sviluppo di tecnologie innovative che superino il concetto di semplice stoccaggio geologico del carbonio (Carbon Capture and Storage - CCS) per muoversi con decisione verso la cattura e la successiva valorizzazione chimica o biologica della molecola (*Carbon Capture and Utilization* - CCU) (IPCC, 2022). In questo scenario globale, le politiche internazionali (come gli obiettivi europei del pacchetto Fit for 55) impongono una drastica accelerazione verso lo sfruttamento di vettori energetici rinnovabili e a impatto zero (European Commission, 2021). In questo panorama di economia circolare si colloca l'integrazione sinergica oggetto del presente lavoro di tesi: l'accoppiamento tra un sistema bioelettrochimico (*Bioelectrochemical System* - BES) e un fotobioreattore per la coltivazione massiva della microalga *Chlorella sorokiniana*. Tale approccio integrato a due stadi (*two-stage process*) punta a risolvere contemporaneamente due limiti tecnologici attuali: l'alto costo energetico e l'impronta ambientale associati alla sintesi chimica tradizionale di composti organici e il basso rendimento fotosintetico della crescita microalgale standard in contesti puramente autotrofi guidati dalla luce ambientale (Wang & Ren, 2013).

Il cuore tecnologico del primo stadio risiede nella capacità di convertire la CO_2 gassosa in un intermedio liquido biodisponibile, l'acetato, sfruttando l'attività di microrganismi acetogeni operanti come biocatalizzatori sulla superficie catodica del BES mediante processi di elettrosintesi microbica (*Microbial Electrosynthesis* - MES) (Rabaey & Rozendal, 2010). Successivamente, l'effluente liquido arricchito in acetato viene convogliato nel secondo stadio del processo per alimentare la coltura di *Chlorella sorokiniana*. La flessibilità metabolica di questo specifico ceppo microalgale le permette di passare efficacemente da un regime fototrofico a uno mixotrofico o eterotrofico, assimilando il carbonio dell'acetato come fonte energetica pronta all'uso (Kutscha & Pflügl, 2021). Questo approccio non solo mitiga i limiti associati all'ombreggiamento cellulare nei fotobioreattori, ma accelera esponenzialmente la generazione di biomassa cellulare e stimola la cellula a deviare il proprio metabolismo verso l'accumulo intracellulare di acidi grassi (lipidi) (Li et al., 2021). Questi ultimi rappresentano la materia prima ideale per la produzione di biodiesel avanzato o biocombustibili di terza generazione attraverso processi di transesterificazione (Wang & Ren, 2013).

L'attività di ricerca e la relativa sperimentazione alla base di questo elaborato sono state interamente sviluppate nell'arco di sei mesi presso i laboratori dell'istituto di ricerca LEQUIA (*Laboratory of Chemical and Environmental Engineering*) dell'Università di Girona, in Spagna, un centro di eccellenza internazionale nello studio delle tecnologie bioelettrochimiche applicate alla

tutela ambientale. Durante questo periodo è stato possibile monitorare e ottimizzare i parametri operativi chiave del sistema integrato, analizzando le dinamiche bioelettrochimiche del reattore MES e le risposte fisiologiche, in termini di produttività in biomassa e profilo lipidico, della *Chlorella sorokiniana*.

Il presente elaborato si articola in cinque capitoli principali. Il **Capitolo I** delinea il contesto climatico ed energetico globale, introducendo le problematiche legate alle emissioni climalteranti e lo stato dell'arte delle strategie di cattura e utilizzo del carbonio (CCU). Successivamente, nel **Capitolo II** vengono descritti i materiali, i metodi e la configurazione sperimentale adottata. I risultati sperimentali ed economici relativi al sistema bioelettrochimico (BES) sono presentati nel **Capitolo III**, mentre il **Capitolo IV** è interamente dedicato alla valutazione sperimentale della crescita della microalga *Chlorella sorokiniana*. Infine, il **Capitolo V** offre una valutazione complessiva dell'integrazione a due stadi, discutendo i bilanci di massa del carbonio, le sinergie di processo riscontrate, i limiti tecnologici emersi e le prospettive di scalabilità industriale del sistema.

CAPITOLO I

IL QUADRO DI RIFERIMENTO GLOBALE: TRANSIZIONE ENERGETICA, CAMBIAMENTI CLIMATICI E STRATEGIE CCU

1.1 Contesto climatico ed energetico globale: Emissioni, politiche di decarbonizzazione e ruolo dei biocombustibili avanzati

L’impiego crescente di combustibili fossili ha determinato un forte aumento delle concentrazioni atmosferiche di CO₂, passate dai 280 ppm del periodo preindustriale agli attuali 380 ppm, con il settore energetico responsabile di due terzi delle emissioni totali di gas serra e dell’80% della CO₂ (Tetzlaff, 2009). Tale incremento è strettamente correlato all’aumento della temperatura media globale, con conseguenze già osservabili quali eventi meteorologici estremi, desertificazione e innalzamento del livello dei mari. In questo contesto, elaborazioni di *Italy for Climate* su dati ISPRA e CNR mostrano che nel 2022 l’Italia ha raggiunto una temperatura media di 14°C, la più alta mai registrata, pari a un aumento di circa 2°C dal 1980. Ciò significa che il Paese ha già superato i limiti di aumento della temperatura fissati dall’Accordo di Parigi, configurandosi come un vero e proprio “hotspot climatico” del Mediterraneo, dove il riscaldamento procede più rapidamente rispetto alla media globale (*Italy for Climate*, 2023). Secondo ISPRA, le emissioni italiane totali di gas serra sono diminuite del 26,4% tra il 1990 e il 2023, ma il settore energetico rimane la principale fonte emissiva, contribuendo per l’80,3% delle emissioni nazionali, come mostrato nella Figura1.1 (ISPRA, 2024).

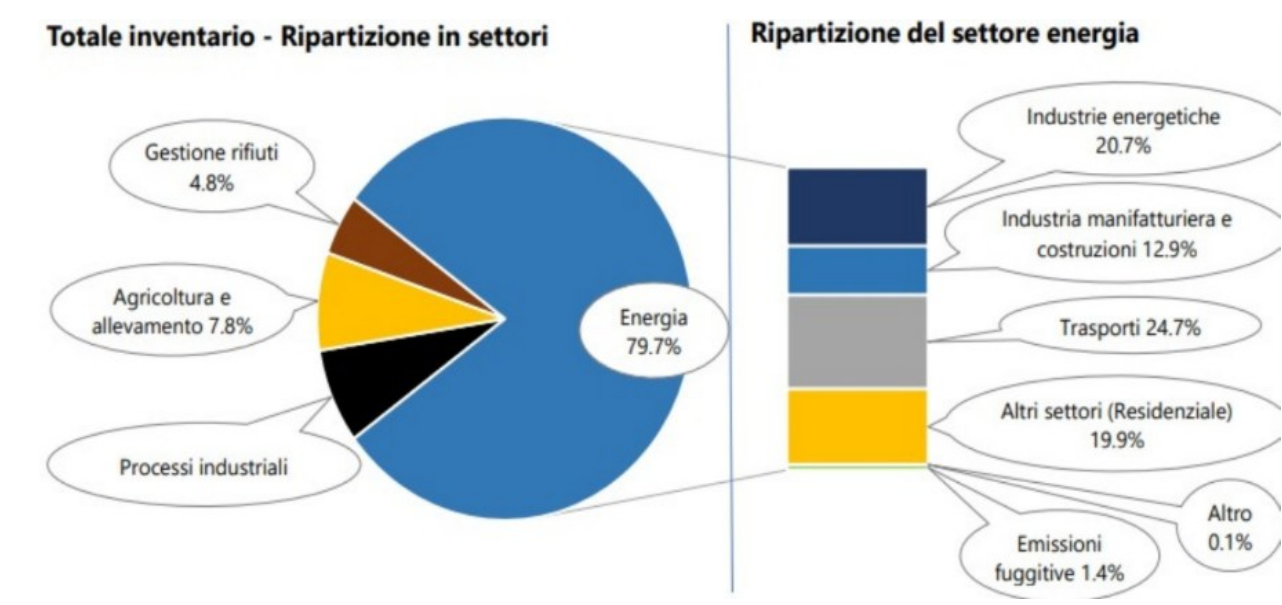


Figura 1.1 - Ripartizione percentuale delle emissioni di gas climalteranti dai diversi macrosettori e dettaglio del macrosettore Energia (ISPRA, 2024).

All’interno di questo quadro, il settore dei trasporti continua a rappresentare una delle criticità maggiori: dal 1990 al 2023 le emissioni dei trasporti sono aumentate del 6,7%, raggiungendo nel

2023 il 28,3% delle emissioni nazionali, con il trasporto stradale responsabile del 92,6% del totale del comparto (ISPRA, 2024).



Figura 1.2 - Gli obiettivi europei e italiani del pacchetto Fit for 55 (ISPRA, 2024).

La crisi energetica recente è stata aggravata da eventi geopolitici, in particolare dalla guerra in Ucraina. La Russia, «uno dei principali *player* mondiali del mercato dei combustibili fossili», ha ridotto le forniture energetiche verso l’Europa, evidenziando la vulnerabilità di un sistema ancora fortemente dipendente da pochi Paesi esportatori (*Italy for Climate*, 2023). Questa situazione ha accelerato l’adozione del Piano REPowerEU, volto a ridurre la dipendenza dal gas russo e a incrementare la produzione di energia rinnovabile e l’espansione delle tecnologie a basse emissioni. In questo scenario, è utile ricordare che i biocarburanti hanno radici storiche profonde: già agli albori dell’industria automobilistica, Rudolph Diesel testò il suo primo motore utilizzando olio di arachidi. I biocarburanti sono combustibili liquidi ottenuti dalla biomassa di diverse colture e dai rifiuti industriali, con applicazioni analoghe ai combustibili fossili ma con un profilo ambientale più favorevole. La letteratura distingue quattro generazioni di biocarburanti, classificate in base alle materie prime e alle tecnologie di produzione; le prime due generazioni, basate su colture alimentari e rifiuti urbani, risultano meno efficienti e meno sostenibili rispetto alle generazioni avanzate (Greenfield, 2023).

In questo contesto, i biocombustibili avanzati assumono un ruolo strategico. REPowerEU non si limita a promuovere le rinnovabili elettriche, ma punta a diversificare l’intero mix energetico europeo, includendo combustibili sostenibili per i settori difficili da elettrificare, come trasporti pesanti, aviazione e industria. Secondo ISPRA, tali settori rappresentano ancora una quota significativa delle emissioni nazionali e richiedono soluzioni alternative ai combustibili fossili tradizionali (ISPRA, 2024). I biocombustibili di terza generazione, basati sulle microalghe, rispondono pienamente agli obiettivi del piano europeo REPowerEU grazie a una serie di vantaggi ecologici e strutturali. In primo luogo, queste matrici non competono con il settore alimentare, evitando così conflitti d’uso del suolo con la produzione agricola tradizionale (EAI, 2022). Inoltre, le microalghe presentano un’elevata flessibilità di coltivazione, potendo svilupparsi in acque dolci, salmastre, marine e reflue; in quest’ultimo caso, integrano i nutrienti già presenti nei reflui contribuendo attivamente al loro trattamento e depurazione (EAI, 2022). Sotto il profilo ambientale, tali organismi fissano efficacemente la CO₂ atmosferica durante la crescita, fornendo

un contributo diretto alla riduzione delle emissioni climalteranti (Cavallini, 2021). Infine, le colture microalgali si distinguono per rese lipidiche estremamente elevate, nettamente superiori rispetto a quelle delle colture oleaginose terrestri (Orofino, 2020).

Queste caratteristiche rendono le microalghe una risorsa strategica per produrre biocarburanti sostenibili senza aumentare la pressione su suolo agricolo e risorse idriche, in linea con gli obiettivi europei di sicurezza energetica e sostenibilità. Parallelamente, i biocombustibili di quarta generazione, che integrano tecnologie di cattura, stoccaggio o utilizzo della CO₂, rappresentano un ulteriore passo verso la neutralità climatica. I *Bio-Electrochemical Systems* (BES), in particolare, si distinguono per la capacità di convertire i rifiuti organici in energia o in composti chimici ad alto valore aggiunto. Al contempo, questi sistemi permettono di ridurre o fissare la CO₂ durante il processo biologico e, parallelamente, di valorizzare i reflui industriali e agricoli, fornendo così un contributo concreto alle dinamiche dell'economia circolare.

Secondo Greenfield, queste tecnologie puntano a combustibili con bilancio carbonico negativo, perfettamente coerenti con gli obiettivi del *Green Deal* e del pacchetto *Fit for 55*, che REPowerEU rafforza ulteriormente (Greenfield, 2023). In questo modo, i biocombustibili avanzati diventano uno degli strumenti più promettenti per raggiungere gli obiettivi europei di decarbonizzazione, sicurezza energetica e indipendenza dai combustibili fossili.

1.2 Microalghe: caratteristiche biologiche, produttività e potenziale per la produzione di biodiesel.

Le alghe costituiscono un ampio gruppo di organismi fotoautotrofi, mixotrofi ed eterotrofi, suddivisi in macroalghe e microalghe. Queste ultime sono organismi unicellulari microscopici presenti negli ambienti di acqua dolce e rappresentano una delle materie prime più promettenti per i biocombustibili avanzati grazie alla loro elevata efficienza fotosintetica e alla capacità di produrre lipidi a partire da carbonio, acqua, luce solare e nutrienti come fosfati e nitrati (Greenfield, 2023). In condizioni controllate, le microalghe possono duplicare la biomassa in 24 ore e risultano da 10 a 20 volte più produttive delle colture tradizionali per biocarburanti, mostrando un potenziale nettamente superiore rispetto alle colture oleaginose terrestri. Le microalghe del genere *Chlorella* presentano una notevole versatilità metabolica, potendo crescere in condizioni autotrofiche, eterotrofiche e mixotrofiche. In modalità autotrofica utilizzano luce e CO₂ attivando i fotosistemi I e II e il ciclo di Calvin, raggiungendo rese di 0,5–1,5 g·L⁻¹·giorno⁻¹, con efficienze fotosintetiche che possono superare il 6% (Richmond, 2004). In condizioni eterotrofiche, invece, *Chlorella* cresce in assenza di luce utilizzando glucosio, acetato o glicerolo, raggiungendo densità cellulari fino a 100 g·L⁻¹, con tassi di crescita 5–10 volte superiori rispetto all'autotrofia (Ogawa & Aiba, 1981) e contenuti lipidici del 40–55% del peso secco (Miao & Wu, 2006). La modalità mixotrofica, che combina luce e carbonio organico, può incrementare la produttività fino al 300% rispetto alla

crescita puramente autotrofica (Perez Garcia et al., 2011). Accanto ai vantaggi, il metabolismo eterotrofico presenta criticità rilevanti. Le colture sono altamente suscettibili a contaminazioni microbiche, poiché batteri e lieviti competono con *Chlorella* per il substrato organico; tali contaminazioni possono portare al collasso della coltura in poche ore (Perez-Garcia et al., 2011). Ciò richiede sterilizzazione dei bioreattori, filtrazione dell'aria e uso di zuccheri purificati, aumentando significativamente i costi operativi. Le fonti organiche di carbonio rappresentano infatti fino al 40–60% dei costi totali di produzione (Miao & Wu, 2006). Inoltre, la crescita eterotrofica prolungata può ridurre la sintesi di clorofilla e la capacità fotosintetica, richiedendo un periodo di riadattamento alla luce (Ogawa & Aiba, 1981). Durante la respirazione eterotrofica possono accumularsi metaboliti tossici come etanolo, acidi organici e CO₂ disciolta, che inibiscono la crescita se non rimossi. Infine, la modalità eterotrofica può alterare il profilo lipidico, proteico e pigmentario della biomassa, un vantaggio per i biocarburanti ma un limite per applicazioni alimentari e nutraceutiche. Un aspetto centrale è la loro capacità di sequestrare CO₂: 1 kg di biomassa algale secca utilizza circa 1,83 kg di CO₂, contribuendo in modo significativo alla riduzione delle emissioni climalteranti e rendendo le microalghe particolarmente adatte a essere integrate con i gas di scarico delle centrali elettriche e di altri impianti industriali. Le microalghe svolgono inoltre un ruolo rilevante nel trattamento delle acque reflue, potendo rimuovere ammonio, nitrati, fosfati e metalli pesanti da scarichi agricoli, industriali e municipali, contribuendo così alla depurazione delle acque (Greenfield, 2023). Il contenuto lipidico delle microalghe varia generalmente tra il 30% e il 50% del peso secco, con specie come *Botryococcus braunii* che raggiungono il 40% di idrocarburi facilmente estraibili. Altre specie, tra cui *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nannochloris* e *Parietochloris* incisa, possono accumulare elevate quantità di lipidi in condizioni favorevoli, come mostrato nella Tabella 1.1.

Tabella 1.1 - Contenuto lipidico per specie microalgale (Chisti, 2007; Ahmad et al., 2011; Demirbas, 2011; Singh & Gu, 2010).

Microalga	Contenuto lipidico (% s.s.)
Ankistrodesmus sp.	24-31
B. braunii	25-75
Botryococcus braunii	16-40
Chaetoceros calcitrans	33
Chaetoceros muelleri	18-57
Chlorella	17-67
Dunaliella sp.	27
Ellipsoidion	25-33
Isochrysis sp.	22
Monallanthus salina	20-56
Nannochloris sp.	12-68
Nannochloropsis sp.	29-65
Neochloris oleabundans	16-47
Nitzschia sp.	35
Pavlova lutheri	31
Pavlova salina	18-57
Phaeodactylum tricornutum	22-38
Prymnesium parvum	16-40
Scenedesmus obliquus	11-55
Schizochytrium sp.	50-77
Skeletonema	13-51
Spirulina	4-9
Stichococcus	33

Le microalghe possono produrre fino a 30 volte più olio per unità di superficie rispetto alle colture oleaginose e possono crescere in ambienti molto diversi, tra cui acque dolci, salmastre e ipersaline, in un ampio intervallo di pH e temperature, senza interferire con la produzione alimentare (Greenfield, 2023). La produzione di biodiesel avviene principalmente tramite transesterificazione, processo in cui i trigliceridi reagiscono con un monoalcol in presenza di catalizzatori acidi, alcalini o enzimatici, generando esteri metilici degli acidi grassi (FAME) e glicerolo

(Greenfield, 2023).

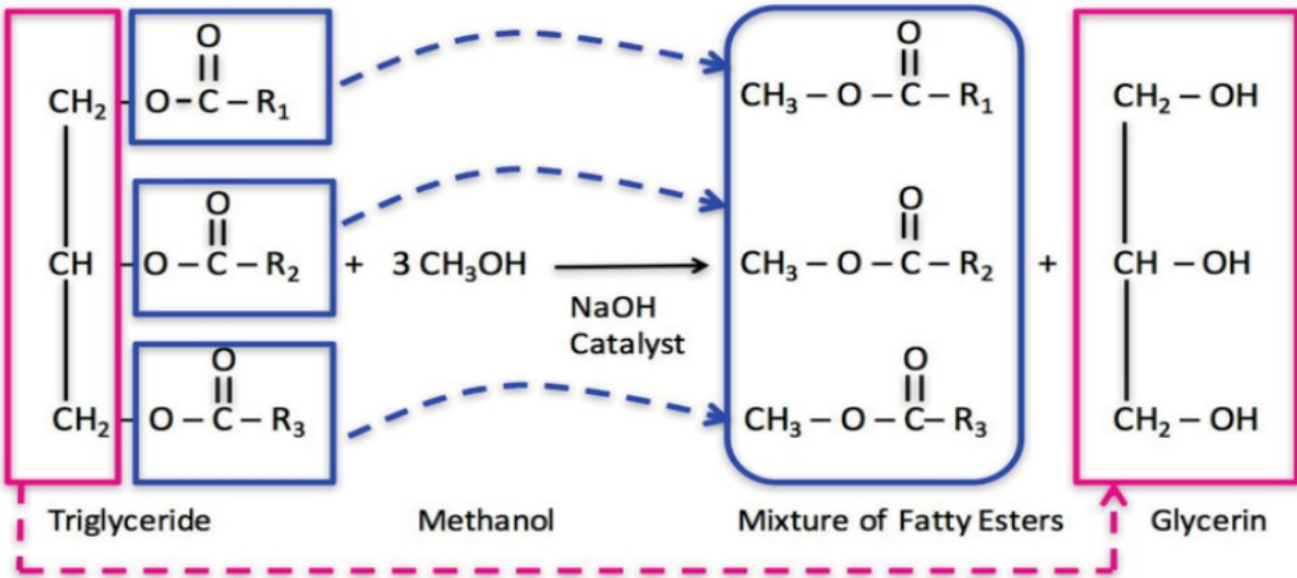


Figura 1.3 - Formazione di biodiesel: reazione di transesterificazione (Greenfield, 2023).

Tutti i processi di produzione del biodiesel da microalghe prevedono una fase di coltivazione della biomassa, una fase di separazione delle cellule dal mezzo di crescita e una fase di estrazione dei lipidi, seguite da passaggi analoghi a quelli utilizzati per altre materie prime oleaginose. La crescita algale richiede luce, acqua, CO₂ e nutrienti come azoto, fosforo e potassio, oltre a oligoelementi quali silice e ferro. Il mantenimento dell'equilibrio tra ossigeno, CO₂, pH, intensità luminosa e rimozione dei sottoprodotti è fondamentale per ottimizzare la produttività. In condizioni favorevoli, le microalghe raddoppiano la biomassa in 24 ore (fino a 3,5 ore nella fase esponenziale), con cicli di raccolta molto brevi (1–10 giorni). La crescita è influenzata da fattori abiotici, biotici e operativi, e può avvenire in sistemi aperti (vasche) o chiusi (fotobioreattori). Questi ultimi consentono un controllo più accurato dei parametri di crescita (pH, temperatura, ossigeno, CO₂), minori perdite di anidride carbonica, una maggiore densità cellulare e una produttività volumetrica superiore oltre ad una riduzione della contaminazione da parte di altri microrganismi, ma presentano costi di investimento più elevati, stimati tra 5 e 25 milioni USD·ha⁻¹, contro 0,5–2,5 milioni USD·ha⁻¹, delle vasche aperte (EAI - Energia, Ambiente e Innovazione, 2022; Chisti, 2007; Lagioia et al., 2011; Mata et al., 2010; Nigam & Singh, 2011; Pfromm et al., 2011; Thurmond, 2011).

La fase di raccolta della biomassa microalgale consiste nella rimozione di grandi quantità di acqua per aumentare la concentrazione cellulare e può essere effettuata attraverso processi fisici, chimici o biologici, a seconda della dimensione delle cellule. I metodi più utilizzati includono sedimentazione, filtrazione, ultrafiltrazione e centrifugazione, spesso supportate da flocculazione con allume o cloruro ferrico e da tecniche di flottazione (Chisti, 2007; Mata et al., 2010; Thurmond, 2011; Amin, 2009).

Tra questi, la centrifugazione è la tecnologia più diffusa grazie alla rapidità e all'elevata efficienza di separazione, nonostante gli elevati costi operativi (circa 0,6 USD·L⁻¹) e il consumo energetico significativo (3 kWh·L⁻¹), con rese limitate dalla bassa concentrazione iniziale della biomassa (1–4 g·L⁻¹) (Lagioia et al., 2011; Schenk et al., 2008). Successivamente alla raccolta, la biomassa viene deidratata e sottoposta a rottura cellulare mediante metodi meccanici (frantumazione, omogeneizzazione, ultrasuoni) o chimici (solventi organici, shock osmotici, trattamenti acidi, basici o enzimatici), necessari per liberare i lipidi intracellulari destinati alla produzione di biodiesel. L'efficienza e i costi di tali tecniche variano in funzione della specie algale e della tecnologia impiegata (EAI - Energia, Ambiente e Innovazione, 2022).

Dal punto di vista biochimico, le microalghe mostrano una straordinaria plasticità metabolica. In condizioni ottimali, il carbonio fotosintetico è destinato alla crescita cellulare, ma in presenza di stress ambientali — come carenza di azoto, fosforo, elevata salinità o eccesso di luce — il metabolismo viene reindirizzato verso la sintesi di lipidi neutri, principalmente triacilgliceroli (TAG). In tali condizioni, fino al 60–70% del carbonio fotosintetico può essere deviato verso la sintesi di acidi grassi in condizioni di stress (Hu et al., 2008). come descritto da Li et al. (2011), secondo cui “la sintesi dei TAG aumenta drasticamente quando la cellula riduce la crescita e

reindirizza NADPH e acetyl-CoA verso la lipogenesi” (Hu et al., 2008). Tra i fattori che maggiormente inducono l’accumulo lipidico, la carenza di azoto è considerata il più efficace. In *Chlorella vulgaris*, il contenuto lipidico può aumentare dal 14% al 40% in condizioni di carenza di azoto (Widjaja et al., 2009).

Nonostante le potenzialità, la produzione di biodiesel algale non è ancora competitiva rispetto ai combustibili fossili: i costi variano tra 2,4–4,5 USD·L⁻¹ per le coltivazioni in vasche e 5,2–10 USD·L⁻¹ per i fotobioreattori, contro circa 1 USD·L⁻¹ del diesel fossile. Tuttavia, la valorizzazione dei co-prodotti (proteine, carboidrati, pigmenti, omega-3) e l’integrazione con processi di cattura della CO₂ e trattamento reflui possono migliorare significativamente la sostenibilità economica della filiera. L’ingegneria genetica offre ulteriori prospettive di miglioramento attraverso l’aumento dell’efficienza fotosintetica, della crescita e del contenuto lipidico (Chisti, 2007; Nigam & Singh, 2011). Nel complesso, le microalghe emergono come una materia prima strategica per i biocombustibili di terza generazione grazie alla loro elevata resa, alla non competizione con il settore alimentare, alla capacità di utilizzare CO₂ e reflui e alla possibilità di produrre una vasta gamma di prodotti energetici e ad alto valore aggiunto. Come evidenziato nel documento, esse «non entrano in competizione con la produzione alimentare, né con i suoli agricoli e le fonti di acqua dolce», rappresentando una delle soluzioni più promettenti per la transizione energetica sostenibile (EAI - Energia, Ambiente e Innovazione, 2022).

1.3 Tecnologie bioelettrochimiche per la valorizzazione della CO₂: dai sistemi MFC/MEC/MES alla produzione biologica di composti a valore aggiunto

Oltre alla sostituzione dei combustibili fossili con energie rinnovabili, la mitigazione delle emissioni climalteranti richiede tecnologie complementari di cattura e stoccaggio del carbonio (CCS), tra cui adsorbimento, separazione a membrana e stoccaggio geologico (Johnson et al., 2014). Tuttavia, l’attenzione si sta progressivamente spostando verso le tecnologie di cattura e utilizzo del carbonio (CCU), che permettono la trasformazione della CO₂ in prodotti ad alto valore aggiunto. Tra gli approcci biologici, un ruolo centrale è svolto dagli acetogeni, microrganismi anaerobi chemoautotrofici in grado di convertire CO₂ e H₂ in acetato attraverso la via di *Wood Ljungdahl* (Ragsdale & Wood, 1985), aprendo la strada alla produzione biologica di acidi grassi a catena corta e media. L’ingegneria metabolica e la biologia sintetica hanno ulteriormente potenziato questi processi, consentendo la progettazione di biocatalizzatori a cellule intere per la produzione di biocarburanti. In questo contesto si inseriscono i sistemi bioelettrochimici (*Bioelectrochemical Systems*, BES), che rappresentano una piattaforma tecnologica innovativa che integra processi microbiologici ed elettrochimici, comprendendo configurazioni come le *Microbial Fuel Cells*, le *Microbial Electrolysis Cells* e i sistemi di *Microbial Electrosynthesis*, tutte basate sull’attività di microrganismi elettroattivi capaci di trasferire elettroni verso o da un elettrodo

(Logan & Rabaey, 2012). Il principio alla base dei sistemi bioelettrochimici ha radici storiche. La capacità dei microrganismi di generare elettricità attraverso il proprio metabolismo fu descritta per la prima volta da M.C. Potter nel 1911. In questo esperimento pionieristico, Potter misurò il potenziale elettrico prodotto da *Saccharomyces cerevisiae* ed *Escherichia coli* utilizzando una cella galvanica con elettrodi di platino, attribuendo la generazione di corrente alla degradazione microbica di composti organici (Potter, 1911). Questo lavoro anticipò il concetto moderno di trasferimento extracellulare di elettroni (EET), oggi alla base dei sistemi bioelettrochimici. Le *Microbial Fuel Cells* (MFC) sfruttano microrganismi elettrogenici per ossidare substrati organici e trasferire elettroni all'anodo, generando elettricità (Dolch et al., 2014; Santoro et al., 2017). Le configurazioni possono essere a camera singola o doppia, separate da membrane a scambio protonico come *Nafion* o *SPEEK* (Shabani et al., 2020). Le MFC a doppia camera possono raggiungere densità di potenza fino a $910 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ (You et al., 2006), mentre quelle a camera singola riducono problemi operativi come l'acidificazione anodica (Min & Logan, 2004). Le prestazioni delle MFC dipendono da molteplici fattori, tra cui la struttura e la porosità del *biofilm*, il trasferimento di protoni, la diffusione dei metaboliti e la cinetica elettrochimica (Katuri et al., 2020; Dessie et al., 2020). Anche la potenza generata è influenzata dalla velocità di trasferimento elettronico dal batterio all'anodo, dalla diffusione del substrato all'interno del *biofilm*, dalla resistenza ohmica dell'elettrolita e dalla resistenza interna complessiva del sistema, che rappresenta uno dei principali limiti alla massima densità di potenza ottenibile (Dessie et al., 2020). Accanto alle MFC, le *Microbial Electrolysis Cells* (MEC) utilizzano un potenziale esterno per favorire reazioni termodinamicamente sfavorevoli, come la produzione di idrogeno o metano (Lim et al., 2017). Tuttavia, le prestazioni del bioanodo possono limitare l'efficienza complessiva del sistema: la corrente generata non è spesso sufficiente a compensare il consumo elettronico del biocattodo, rendendo necessario un sovrapotenziale esterno compreso tra $-1,0 \text{ V}$ e $-0,5 \text{ V}$ per sostenere le reazioni riduttive. In uno studio, un potenziale di $-1,0 \text{ V}$ ha permesso di ottenere una densità di corrente di $0,99 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ al biocattodo, mentre il bioanodo generava solo $0,37 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$ a $0,6 \text{ V}$, evidenziando la necessità di alimentazioni supplementari (Koffi & Okabe, 2020). Particolare interesse rivestono i sistemi di *Microbial Electrosynthesis* (MES), nei quali microrganismi acetogeni o metanogeni riducono la CO_2 a composti organici utilizzando elettroni provenienti da un catodo polarizzato (Choi & Sang, 2016; Ibrahim et al., 2023). I MES impiegano un gruppo specifico di microrganismi noto come batteri elettrochimicamente attivi (EAB), anche definiti esoelettrogeni, elettricigeni o batteri che respirano anodicamente (ARB), capaci di trasferire elettroni all'elettrodo durante la respirazione anaerobica (Torres et al., 2009). Grazie all'impiego di questi biocatalizzatori, i MES possono teoricamente convertire una vasta gamma di substrati biodegradabili in energia elettrica o composti chimici di interesse, ampliando notevolmente le potenzialità applicative dei sistemi bioelettrochimici (Rabaey et al., 2006). Il concetto di elettrosintesi microbica è relativamente recente: i primi risultati risalgono al 2009, quando fu dimostrata la produzione di metano da un biocattodo inoculato con *Methanobacterium* palustre alimentato elettricamente (Cheng et al., 2009). Successivamente, è stato dimostrato che *biofilm* di *Sporomusa ovata* erano in grado di utilizzare elettroni provenienti dal catodo per ridurre la CO_2 in acetato e piccole quantità di 2-ossobutirrato, con oltre l'85% degli elettroni recuperati nei prodotti finali. Ulteriori studi hanno evidenziato che diversi batteri acetogeni, tra cui *Clostridium*

jungdahlii, *Clostridium aceticum*, *Sporomusa sphaeroides* e *Moorella thermoacetica*, possono consumare corrente elettrica e produrre acidi organici (Nevin et al., 2011). È stato inoltre dimostrato che l'etanolo può essere ottenuto riducendo l'acetato al catodo, sebbene in alcuni casi sia necessario l'impiego di mediatori redox come il metil-viologeno (Steinbusch et al., 2010). Infine, colture miste derivate da acque reflue di birrifici hanno mostrato la capacità di generare metano, acetato e idrogeno gassoso da un biocatodo polarizzato a -590 mV (vs SHE) utilizzando CO_2 come unica fonte di carbonio (Marshall et al., 2012). Un aspetto cruciale per l'efficienza dei MES è la disponibilità di CO_2 per i microrganismi. La bassa solubilità della CO_2 in acqua rappresenta infatti un limite significativo, spesso affrontato mediante lo spargimento di elevate quantità di gas nel mezzo di coltura (Bajracharya et al., 2017) o tramite l'aggiunta di bicarbonato come fonte di carbonio inorganico (Zaybak et al., 2013). Tuttavia, questi approcci presentano limiti operativi, come la dispersione della CO_2 nell'atmosfera o la necessità di un continuo controllo del pH. Una soluzione più efficiente è rappresentata dal ricircolo continuo del gas nello spazio di testa, che ha dimostrato di aumentare significativamente la disponibilità di CO_2 e le prestazioni del sistema. In un recente studio, il ricircolo ha incrementato del 44% la produzione media di acetato, raggiungendo un massimo di $261 \text{ mg HAc} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ e un titolo finale di $1957 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, con efficienze catodiche comprese tra il 57% e il 91% e un consumo di CO_2 prossimo al 100% (Mateos et al., 2023). L'analisi metagenomica ha inoltre evidenziato che il ricircolo del gas favorisce la selezione di comunità microbiche catodiche altamente performanti: *Sporomusa*, ad esempio, è passata dal 4–12% senza ricircolo fino al 25–59% con ricircolo, mentre generi come *Desulfovibrio*, *Clostridium*, *Arcobacter*, *Pseudomonas* e *Sulfurospirillum* hanno contribuito alla stabilità e alla resilienza del *biofilm* catodico, confermando l'esistenza di un microbioma centrale tipico dei sistemi MES (Zaybak et al., 2013; Mateos et al., 2023). I biocatodi consentono la produzione di acetato, butirato e altri acidi grassi volatili, rappresentando un'alternativa ecologica alla sintesi chimica. Tuttavia, la competizione tra acetogeni e metanogeni riduce l'efficienza del processo: i metanogeni, più efficienti termodinamicamente, consumano H_2 e acetato producendo metano (Gao et al., 2013). Per questo motivo sono state sviluppate strategie di inibizione della metanogenesi, tra cui l'uso di BESA, il controllo del pH (Chen et al., 2020), il pretrattamento ultrasonico e soprattutto il pretrattamento termico, che inattiva i metanogeni non sporigeni mantenendo attivi gli acetogeni (Tiwari & Ghangrekar, 2015; Zeppilli et al., 2020). Studi recenti mostrano che il trattamento termico può aumentare la produzione di acetato fino a 30 volte superiore rispetto al digestato anaerobico grezzo e che l'uso di membrane AEM consente di separare l'acetato prodotto, evitando il suo consumo da parte dei metanogeni (Cristiani et al., 2024). Oltre alle configurazioni più note, i sistemi bioelettrochimici includono anche le *Microbial Desalination Cells* (MDC), dispositivi in cui microrganismi elettroattivi generano un flusso di corrente capace di rimuovere ioni salini dall'acqua. In questi sistemi, la desalinizzazione avviene grazie al trasferimento di specie ioniche attraverso membrane selettive, in proporzione alla corrente generata o applicata, permettendo la separazione del sale dall'acqua in modo energeticamente efficiente (Sharma et al., 2019). Nella Tabella 1.2 viene riportato il confronto tra i principali sistemi bioelettrochimici (BES).

Tabella 1.2 - Confronto tra i principali sistemi bioelettrochimici (BES).

Caratteristica	MFC-Microbial Fuel Cells	MEC- Microbial Electrolysis Cells	MES- Microbial Electrosynthesis	MDC-Microbial Desalination Cells
Principio di funzionamento	Microrganismi elettrogenici ossidano substrati organici e trasferiscono elettroni all'anodo, generando elettricità(Dolch 2014 Santoro 2017).	Necessitano di un potenziale esterno per favorire reazioni non spontanee, come la produzione di H ₂ o di CH ₄ (Lim 2017).	Microrganismi acetogeni/metanogeni riducono CO ₂ usando elettroni da un catodo polarizzato (Choi & Sang 2016).	La corrente generata dai microrganismi permette la migrazione di ioni attraverso membrane, rimuovendo Sali dall'acqua (Sharma 2019).
Funzione principale	Produzione di elettricità da substrati organici.	Produzione di H ₂ /CH ₄ tramite potenziale esterno.	Riduzione della CO ₂ in composti organici.	Desalinizzazione + produzione di elettricità.
Fonte di elettroni	Ossidazione microbica del substarto all'anodo.	Ossidazione microbica + potenziale esterno.	Catodo polarizzato che fornisce elettroni ai microbi.	Ossidazione microbica all'anodo.
Prodotto principale	Elettricità	H ₂ ,CH ₄ , HCOO ⁻ .	Acetato, butirrato, etanolo, altri composti organici.	Acqua desalinizzata + elettricità.
Necessità di potenziale esterno	No	Sì (-1,0 V/-0,5V tipici) (Koffi & Okabe, 2020).	Sì (catodo polarizzato).	Può funzionare senza potenziale esterno, ma spesso beneficia di un bias.
Microorganismi coinvolti	Batteri elettrogenici (EAB).	Batteri elettrogenici+batteri riduttori al catodo.	Acetogeni (Sporomusa, Clostridium), metanogeni (Methanobacterium) (Nevin et al.,2011).	Comunità miste elettroattive.
Reazioni chiave	Ossidazione del substrato all'anodo, riduzione dell'ossigeno al catodo.	→ Ossidazione anodica+ riduzione protoni → H ₂ .	→ Riduzione CO ₂ → acetato/ etanolo/metano.	Migrazione ionica attraverso membrane selettive.
Configurazioni tipiche	Camera singola o doppia con membrane PEM (Nafion, SPEEK).	Simili alle MFC ma con alimentazione elettrica.	Catodi polarizzati, spesso con membrane AEM.	Configurazioni multicomparto con membrane AEM/CEM.
Prestazioni tipiche	Fino a 910 mW·m ⁻² (You 2006).	Correnti fino a 0,99 A·m ⁻² al catodo (Koffi & Okabe, 2020).	Efficienze catodiche 57-91%, acetato fino a 1957 mh·L ⁻¹ , (Mateos 2023).	Elevata efficienza di desalinizzazione proporzionale alla corrente.
Limiti principali	Resistenza interna, acidificazione anodica.	Necessità di potenziale esterno.	Competizione metanogeni/acetogeni C02 limitante.	Fouling delle membrane.
Applicazioni	Trattamento reflui, sensori, bioenergia.	Produzione di bio-H2 e biometano.	Bioraffinerie, produzioni chimici.	Desalinizzazione sostenibile.

Inoltre, viene riportato il confronto tra anodi, catodi, microrganismi e prodotti nei BES (Tabella 1.3).

Tabella 1.3 - Confronto tra anodi, catodi, microrganismi e prodotti nei BES.

Elemento	MFC	MEC	MES	MDC
Anodo	Bioanodo con batteri elettrogenici che ossidano substrati organici.	Bioanodo simile alle MFC ma con maggiore richiesta di corrente.	Bioanodo opzionale (non sempre necessario).	Bioanodo che genera elettroni e forza ionica
Catodo	Catodo aerato e catalizzato (O ₂ come accettore).	Catodo per produzione H ₂ /CH ₄ .	Biocatodo con acetogeni/metanogeni che riducono CO ₂ .	Catodo che facilita la migrazione ionica.
Microrganismi principali	Geobacter, Shewanella, comunità elettrogeniche.	Elettrogeni + batteri riduttori.	Sporomusa ovata, Clostridium, Methanobacterium.	Comunità miste elettroattive.
Prodotti	Elettricità	H ₂ , CH ₄ .	Acetato, etanolo, butirrato, metano	Acqua desalinizzata + elettricità
Reazioni chiave	→ Ossidazione substrato → elettroni Catodo.	→ Riduzione di protoni → H ₂ .	→ Riduzione CO ₂ → composti organici.	Migrazione ionica attraverso membrane.
Vantaggi	Semplicità, uso reflui.	Produzione gas ad alto valore.	Conversione CO ₂ , alta efficienza microbica.	Desalinizzazione + energia.
Limiti	Bassa densità di potenza.	Richieste energia esterna.	Competizione metanogeni/acetogeni.	Fouling e costi membrane.

Nelle Tabelle 1.2 e 1.3 le frecce hanno un significato descrittivo e sintetico, utile a evidenziare la relazione causa–effetto tra i processi che caratterizzano i diversi sistemi BES.

Il funzionamento dei BES si basa sul trasferimento extracellulare di elettroni (EET), che può avvenire in forma diretta tramite citocromi di tipo c e nanofili conduttivi (Gralnick & Bond, 2023) o in forma mediata tramite molecole *redox* come fenazine prodotte da *Pseudomonas aeruginosa* (Bosire & Rosenbaum, 2017). Le strategie di bioingegneria hanno consentito di ottimizzare in modo significativo i meccanismi di trasferimento elettronico nei microrganismi elettroattivi. Interventi mirati sul metabolismo centrale, come l’aumento delle concentrazioni intracellulari di nicotinammide adenina dinucleotide ossidato (NAD⁺) – cofattore redox essenziale nei processi di ossidoriduzione – oppure il miglioramento della conduttività del biofilm in *Shewanella oneidensis*, hanno dimostrato di incrementare l’efficienza del trasferimento di elettroni verso l’elettrodo e, di conseguenza, le prestazioni dei sistemi bioelettrochimici (Li et al., 2018).

Tuttavia, la scalabilità dei BES rimane limitata da fattori quali la variabilità delle comunità microbiche (Logan et al., 2019), le restrizioni imposte dai materiali degli elettrodi (Li et al., 2016) e la complessità dei meccanismi di EET, ancora non completamente compresi (Kumar et al., 2017). Tecniche diagnostiche avanzate, come la spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS),

rappresentano strumenti fondamentali per monitorare la formazione del *biofilm*, le resistenze interne e le dinamiche del trasferimento elettronico (Kretzschmar & Harnisch, 2021). Le reazioni microbo-elettrodo sono, inoltre, influenzate dalle proprietà superficiali degli elettrodi: materiali con carica negativa possono ostacolare l'adesione microbica a causa della repulsione elettrostatica con le cellule batteriche, aumentando l'impedenza e riducendo l'efficienza del trasferimento elettronico. Per garantire un'interazione efficace tra microrganismi ed elettrodi, i materiali devono possedere ampia superficie specifica, bassa resistenza, elevata conducibilità, ridotta impedenza e stabilità chimica (Roy et al., 2022), oltre a favorire la formazione di *biofilm* elettroattivi. Tra i materiali più utilizzati nei BES, il carbonio rappresenta la scelta più comune grazie alla sua abbondanza, al basso costo e alla buona compatibilità con i microrganismi elettrogenici (Santoro et al., 2017). Le principali forme impiegate includono carta carbone, tessuto di carbonio, barre e reti di carbonio, feltro e spazzole di carbonio (Fan et al., 2021), apprezzate per l'elevata area superficiale e la capacità di supportare l'adesione batterica (Moinee & Sanzida, 2021). Tuttavia, molti materiali carbonacei presentano superfici idrofobe che possono ostacolare l'attacco dei batteri elettroattivi e limitare il trasferimento di elettroni (Chang et al., 2021). In questo contesto, materiali come il tessuto di carbone attivo, caratterizzato da elevata porosità e superficie specifica, possono migliorare l'assorbimento e l'ossidazione delle specie contenenti ossigeno presenti nell'elettrolita, soprattutto a potenziali anodici elevati (Gineys et al., 2017). Il grafene rappresenta un ulteriore materiale di grande interesse grazie alla sua elevata conducibilità elettrica, inerzia chimica e capacità di agire come barriera contro la corrosione dovuta alla diffusione di acqua e ossigeno (Novoselov et al., 2012). L'integrazione di nanocompositi a base di grafene nei catalizzatori delle celle a combustibile microbiche può aumentare la superficie attiva e ridurre l'avvelenamento da metalli (Seselj et al., 2015). Una revisione di Tang et al. (2020) ha inoltre evidenziato come le proprietà del grafene lo rendano particolarmente adatto all'immobilizzazione enzimatica e all'impiego nelle celle a biocombustibile. Nonostante la loro diffusione, i materiali carbonacei possono presentare una resistenza alla corrosione inferiore rispetto ad alternative come il titanio, ampiamente utilizzato nei processi elettrolitici per la sua eccellente stabilità e durabilità. Elettrodi basati su nanotubi di TiO_2 depositati su titanio hanno dimostrato elevate prestazioni e stabilità come bioanodi in MFC (Feng et al., 2016). Dal punto di vista della sostenibilità, i materiali carboniosi derivati da biomassa o da scarti industriali riducono l'impatto ambientale e possono essere biodegradabili, con perdite di massa fino al 49% in 60 giorni nel suolo (Sharma et al., 2024). Al contrario, gli elettrodi metallici, pur offrendo conducibilità fino a $4,99 \times 10^5$ volte superiore e ottime proprietà catalitiche, non sono biodegradabili e comportano impatti ambientali significativi legati all'estrazione e alla lavorazione (Bertaglia et al., 2024; Omid et al., 2024). Una soluzione intermedia è rappresentata dagli elettrodi compositi, che combinano materiali carboniosi con biopolimeri o altri componenti sostenibili, offrendo un equilibrio tra prestazioni elettrochimiche e ridotto impatto ambientale. Questi materiali possono essere progettati per essere biodegradabili e mostrano un potenziale crescente nei sistemi di elettrosintesi microbica e nei BES per la produzione di biometano (Hui et al., 2023). Nel complesso, il BES costituisce una tecnologia chiave per la transizione verso processi biotecnologici sostenibili, grazie alla loro capacità di integrare cattura della CO_2 , produzione di biocombustibili, trattamento delle acque reflue e valorizzazione di substrati organici. Le prospettive future includono l'ottimizzazione dei materiali degli elettrodi, la

selezione mirata delle comunità microbiche e l'integrazione con bioraffinerie algali e sistemi di CCU, delineando un percorso promettente verso la produzione di energia e composti chimici a basso impatto ambientale.

1.4 Integrazione tra sistemi bioelettrochimici e microalghe: potenzialità, limiti e prospettive applicative

L'integrazione tra sistemi bioelettrochimici e colture microalgali rappresenta una delle strategie più promettenti per valorizzare l'effluente catodico dei MES e orientare l'intero processo verso la produzione sostenibile di biocombustibili. L'acetato generato nei MES, spesso in concentrazioni elevate grazie a tecniche come il ricircolo del gas nello spazio di testa che può aumentare la produzione del 44% e portare a titoli fino a $1957 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, costituisce un substrato ideale per la crescita eterotrofa di microalghe come *Auxenochlorella protothecoides* e *Chlorella vulgaris* (Mateos et al., 2023). Queste specie sono in grado di utilizzare direttamente gli AGV prodotti al catodo, convertendoli in biomassa ricca in lipidi, con rese fino a $0,576 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e tassi di crescita di $0,137 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ quando alimentate con $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ di acetato (Zhang et al., 2022). In condizioni eterotrofe, *A. protothecoides* può crescere utilizzando sia ATCC1754 sia BG-11 arricchito con $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ di acetato, raggiungendo il picco massimo di crescita al quinto giorno, mentre la crescita autotrofa è evidente solo in BG-11 a pH 7. Al contrario, *C. vulgaris* mostra una buona crescita in tutte le condizioni autotrofe testate, ma in condizioni eterotrofe la biomassa diminuisce rapidamente dopo il terzo giorno, eccetto quando coltivata in mezzo inorganico a pH 5,5 (Zhang et al., 2022). Queste differenze fisiologiche riflettono profonde modificazioni metaboliche: nel metabolismo eterotrofo di *A. protothecoides*, l'espressione genica associata alla clorofilla, alla fotosintesi e alla biosintesi dei carotenoidi risulta fortemente ridotta, mentre aumentano i *pathway* legati alla glicolisi, al ciclo TCA e alla sintesi degli acidi grassi, favorendo l'accumulo lipidico (Gao et al., 2014; Patel et al., 2018). Questo *shift* metabolico spiega l'elevata efficienza di *A. protothecoides* nella conversione dell'acetato in lipidi, rendendola una delle specie più promettenti per la produzione di biodiesel. In prospettiva, l'ottimizzazione dei cicli di alimentazione potrebbe migliorare ulteriormente le prestazioni: durate di 3–5 giorni permettono di mantenere elevati tassi di crescita, mentre una modulazione mirata della lunghezza del ciclo potrebbe massimizzare il contenuto lipidico più che la biomassa totale. Oltre alla disponibilità di substrati organici, anche i parametri ambientali influenzano fortemente la crescita microalgale e la produttività lipidica. Il tasso di crescita delle microalghe dipende in modo significativo dal fotoperiodo e dalla specie considerata (Wu et al., 2013). Ad esempio, *Thalassiosira nordenskiöldii* mostra una crescita massima con un ciclo luce: buio di 15:9 ore (Durbin, 1974), mentre per *Chlorella vulgaris* il fotoperiodo ottimale è di 16:8 ore (Kendirlioglu et al., 2015). Lo stesso ciclo risulta ideale anche per *Chlorella pyrenoidosa*, che mostra un incremento della crescita e della biofissazione della CO_2 sotto intensità luminose adeguate (Gunawan et al., 2018). Questi risultati evidenziano come la regolazione del fotoperiodo rappresenti un parametro chiave per massimizzare la produttività

algale nei sistemi integrati BES microalghe. Oltre al fotoperiodo, anche la temperatura rappresenta un parametro critico per la produttività lipidica. L'influenza della temperatura sulla sintesi lipidica, evidenziata da incrementi significativi del contenuto di lipidi in *Chlorella vulgaris* in condizioni di stress termico (Ma et al., 2014), sottolinea quanto i parametri ambientali possano modulare non solo la crescita ma anche la qualità degli oli prodotti; proprio per questo, per garantire la qualità del biocombustibile ottenuto, è tuttavia necessaria un'ulteriore caratterizzazione del bio-olio tramite tecniche analitiche come GC-MS o NMR, al fine di identificare il profilo degli acidi grassi a catena lunga, tra cui acido miristico (C14:0), palmitico (C16:0), stearico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolenico (C18:3) e valutare la compatibilità degli oli microalgali con gli standard europei per il biodiesel (Meher et al., 2006; Diehl & Randel, 2007). Questa fase è cruciale per assicurare che il biodiesel ottenuto presenti proprietà fisico-chimiche adeguate, come viscosità, punto di infiammabilità e stabilità ossidativa. L'accoppiamento BES–microalghe consente quindi di trasformare direttamente l'acetato prodotto nei MES in biocombustibili, riducendo i costi di estrazione e purificazione degli AGV e migliorando la sostenibilità complessiva del processo (LaBelle & May, 2017). Studi di bilancio energetico mostrano che 1 kg di acetato prodotto nei MES può generare fino a 1,11 kg di biomassa microalgale secca, da cui è possibile estrarre circa 0,207 kg di lipidi destinabili alla produzione di biodiesel. Dopo l'ottimizzazione dei processi di estrazione e transesterificazione, il biodiesel ottenuto risulta conforme alle specifiche europee sui carburanti, evidenziando la fattibilità tecnica dell'intero sistema. Nel complesso, la combinazione BES–microalghe si configura come una piattaforma integrata capace di unire fissazione della CO₂, produzione di biomassa lipidica, generazione di biodiesel, rimozione di nutrienti e contaminanti, produzione di elettricità e desalinizzazione, aprendo la strada a futuri modelli di bioraffineria circolare ad alta efficienza (Zhang et al., 2013; Kumar et al., 2020; Markou & Nerantzis, 2013). Questa integrazione rappresenta una delle direzioni più promettenti per lo sviluppo di sistemi bioelettrochimici avanzati orientati alla produzione di biocombustibili sostenibili, grazie alla possibilità di valorizzare direttamente l'acetato prodotto nei MES come substrato per la crescita eterotrofa di microalghe ad alto contenuto lipidico. Tuttavia, nonostante il grande potenziale, l'accoppiamento diretto tra BES e microalghe presenta ancora diverse criticità che ne limitano l'applicazione su scala industriale. Una delle principali riguarda i ridotti volumi di effluente catodico ottenibili nei MES, che rendono complessa la conduzione di test eterotrofi su scala significativa e la riproducibilità dei risultati (Xu et al., 2015). A ciò si aggiunge la forte variabilità della composizione dell'effluente, influenzata dal substrato, dal potenziale applicato e dalla comunità microbica, con conseguenti fluttuazioni di pH, salinità e presenza di sottoprodotti elettrochimici che possono compromettere la crescita microalgale (Logan & Rabaey, 2012; Kadier et al., 2016). Inoltre, il BES può generare specie ridotte o ossidate, come nitriti o intermedi organici, che interferiscono con il metabolismo algale e con i processi fotosintetici, come evidenziato da diversi studi sui microalgal microbial fuel cells (Wang & Ren, 2013; Zhou et al., 2013). Dal punto di vista ingegneristico, l'integrazione diretta tra BES e fotobioreattori richiede un bilanciamento accurato dei flussi per evitare diluizioni eccessive, shock osmotici o carenze nutrizionali, una delle principali barriere alla scalabilità secondo le *review* più recenti (Rabaey & Rozendal, 2010; Kumar et al., 2020). Per superare tali limitazioni, la letteratura propone diverse strategie operative e tecnologiche. Una delle più rilevanti è il riutilizzo diretto dell'acetato prodotto

nei MES, che consente di evitare costosi processi di estrazione e purificazione, migliorando il bilancio economico complessivo del sistema (LaBelle & May, 2017). Altre proposte includono il pre-trattamento o l'equalizzazione dell'effluente catodico tramite sistemi tampone o miscelazione controllata, utili per stabilizzare pH, salinità e concentrazione di nutrienti prima dell'ingresso nel fotobioreattore (Gouveia & Oliveira, 2009). Un ruolo chiave è svolto anche dalla selezione di ceppi microalgali tolleranti a effluenti complessi: generi come *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Auxenochlorella* mostrano una buona resistenza a variazioni di pH, salinità e presenza di composti residui, rendendoli particolarmente adatti a sistemi integrati BES–microalghe (Chisti, 2007; Rawat et al., 2011). L'integrazione del processo in un modello di bioraffineria più ampio, che includa recupero di nutrienti, produzione di bioenergia e valorizzazione di co-prodotti ad alto valore aggiunto, è indicata come una delle strategie più efficaci per aumentare la sostenibilità e la redditività del sistema (Markou & Nerantzis, 2013; Kumar et al., 2021). Infine, l'impiego di biocatodi algali può migliorare l'efficienza energetica complessiva, riducendo la necessità di aerazione e facilitando l'integrazione con fotobioreattori (Zhang et al., 2013; Zhou et al., 2012). Nel loro insieme, queste evidenze mostrano come l'accoppiamento BES–microalghe rappresenti una tecnologia estremamente promettente, ma ancora in fase di maturazione. Il superamento delle criticità identificate e l'implementazione delle strategie proposte in letteratura saranno elementi fondamentali per trasformare questa integrazione in una soluzione realmente scalabile e competitiva per la produzione sostenibile di biocombustibili.

CAPITOLO II

MATERIALI, METODI E CONFIGURAZIONE SPERIMENTALE

2.0 Introduzione

Il presente capitolo fornisce una descrizione dettagliata delle apparecchiature, dei materiali e delle procedure sperimentali adottate per lo svolgimento delle attività di ricerca. Vengono illustrati le configurazioni dei sistemi sperimentali, predisposte per riprodurre le condizioni operative necessarie allo svolgimento delle prove; vengono descritte le metodologie operative e le tecniche analitiche adottate, al fine di garantire la validità dei risultati. Le attività sperimentali sono state condotte presso il Laboratorio di Chimica e Ingegneria Ambientale (LEQUIA) dell'Università di Girona (UDG, Spagna), nell'ambito di un periodo di ricerca della durata complessiva di sei mesi (da ottobre 2025 a marzo 2026).

2.1 Configurazione dei sistemi sperimentali

Il sistema oggetto di studio è strutturato in due unità principali collegate in serie. La prima unità comprende due reattori BES, ciascuno dei quali è formato da due camere — anodica e catodica — separate da una membrana a scambio cationico. Questa sezione ha lo scopo specifico di favorire la produzione di acido acetico, il quale viene successivamente convogliato e utilizzato come substrato biologico nella sezione successiva. La seconda unità è invece rappresentata da tre fotobioreattori di tipo tubolare, nei quali viene immesso l'effluente liquido proveniente dal primo stadio, unitamente all'inoculo microalgale e al relativo terreno di coltura. Tale configurazione è progettata per promuovere la crescita massiva delle microalghe, dalle quali verranno infine estratti i lipidi destinati alla produzione di biocombustibile mediante il processo di transesterificazione.

2.1.1 Sistema bioelettrochimico (BES)

La prima unità è costituita da 2 reattori (*Elettro Cell*): ciascuno strutturato esternamente da 2 lastre metalliche rettangolari in acciaio inossidabile contenenti le 2 camere (anodica e catodica) separate da una membrana a scambio cationico ($2 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$, CMI-1875T, *Membranes International*, USA). Il catodo è costituito da un feltro di carbonio (spessore 3,18 mm, purezza 99,0%, *Thermo scientific*, Germania) con una superficie di lavoro di 100 cm^2 . L'anodo è costituito in DSA/O₂.

Le 2 camere, anodica e catodica, sono collegate tramite tubi in PVC a bottiglia di vetro borosilicato (Schott DURAN, Germania) con capacità rispettiva di 1300 mL e 2700 mL, con volume di lavoro effettivamente occupato dal liquido di 500 mL e 1000 mL. Il volume, non occupato dal liquido, occupato dal gas pari a 1700 mL viene utilizzato per effettuare l'analisi dei gas.

Le bottiglie, chiuse con tappi in PVC, sono dotate di 3 raccordi: 2 per il passaggio dei liquidi (IN/OUT); il terzo, per i catodi termina con una valvola in plastica dal quale si effettua l'analisi dei gas, mentre per gli anodi è chiuso con un tappo di plastica.

Inoltre, lungo la linea IN del fluido che va dalla bottiglia all'elettrodo, vi è un'uscita con valvola dal quale si effettuano i campionamenti dei liquidi. Nel catodo, lungo la linea IN, oltre all'uscita per il campionamento vi è un'altra uscita connessa al controllore di portata massica (MFC, *Mass Flow Controller*). Il sistema di alimentazione semi-continua è stato realizzato tramite l'erogazione di CO₂, collegando il cilindro pressurizzato di CO₂ (Figura 2.2) al controllore di portata massica ((*Alicat MC-50SCCM-D, Alicat Scientific, USA*) con valvola di controllo integrata (*Rosemount*), Figura 2.1), quest'ultimo alla linea di ricircolo del catodo, mantenendo una concentrazione di CO₂ disciolta sopra 800 mg/L e massimizzando la ritenzione di idrogeno. Per determinare le condizioni ottimali per la ritenzione del gas e le prestazioni complessive del sistema sono stati testati diversi tempi di erogazione della CO₂ (1,5 h ogni 10,5 h; 1,5 h una volta al giorno; 1 h una volta al giorno; 30 min due volte al giorno) con portata di 10 ml (CO₂) /min.



Figura 2.1 - Portata massica (Alicat).

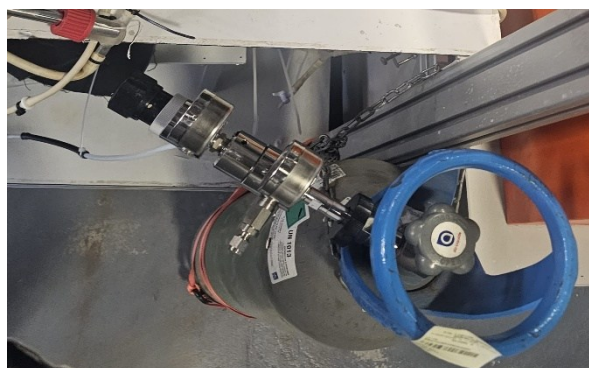


Figura 2.2 - Cilindro pressurizzato di CO₂.

L'alimentazione delle camere dei due reattori è assicurata da pompe peristaltiche con portata pari a $3,3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$: una Shenchen per la pila A (Figura 2.3) e una Watson Marlow 323 per la pila B (Figura 2.4).



Figura 2.3 - Pila A, pompa Shenchen.

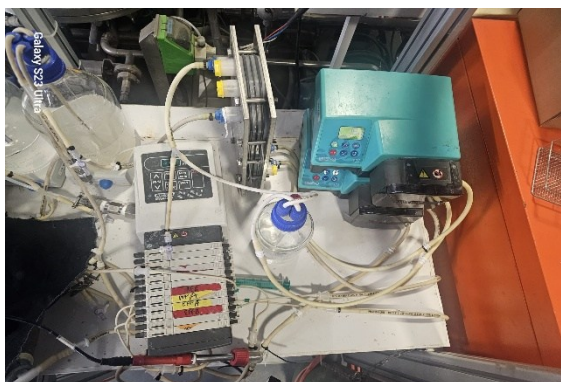


Figura 2.4 - Pila B, pompa Watson Marlow 323.

È stata realizzata una configurazione a 2 elettrodi, catodo e anodo, in modo da minimizzare la distanza tra essi, riducendo la resistenza interna e migliorando l'efficienza del processo (Reattore a zero intercapedine) e collegati ad un circuito elettrico esterno.

Gli elettrodi sono collegati tramite dei connettori a coccodrillo ad un potenziostato (*BioLogic SP-50*, Francia, Figura2.5) in modo da poter monitorare, in continuo, il potenziale del sistema, fornendo un valore fisso di corrente (densità di corrente elettrica $12 \text{ (A} \cdot \text{m}^{-2})$).



Figura 2.5-Potenziostato (BioLogic SP-50).

Di seguito viene riportato in modo schematico il circuito bioelettrochimico (Figura2.6).

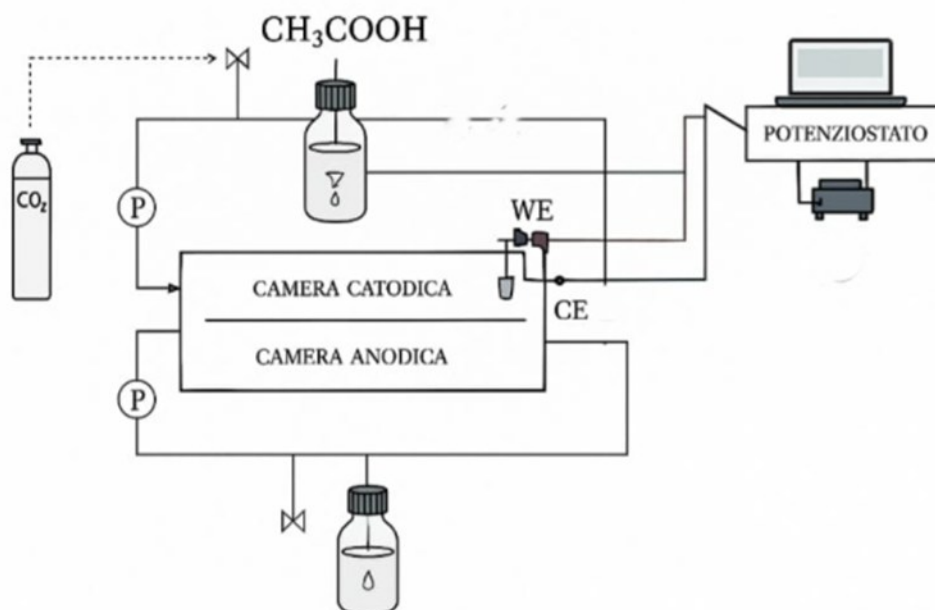


Figura 2.6 - Schema del sistema bioelettrochimico (BES) utilizzato per la produzione di acido acetico. La figura mostra la configurazione del reattore bioelettrochimico a due camere, con separazione tramite membrana a scambio ionico, elettrodi in feltro di carbonio e alimentazione con CO₂. Sono evidenziati i principali flussi di processo, le reazioni anodiche e catodiche e i punti di monitoraggio dei parametri operativi.

2.1.1.1 Inoculo del sistema bioelettrochimico (BES)

Quando è iniziato il periodo di sperimentazione svolto in Spagna per questa tesi (durata 6 mesi), il sistema bioelettrochimico era già operativo da circa un anno. Di conseguenza, non è stato necessario effettuare un nuovo inoculo: il BES presentava infatti un *biofilm* elettroattivo maturo e stabile, già adattato alle condizioni operative del reattore.

Il BES era stato inizialmente avviato mediante l'introduzione, nella camera catodica, di digestato anaerobico non filtrato, utilizzato come inoculo microbico. Questo materiale, ricco di una comunità mista comprendente anche microrganismi acetogeni, era stato scelto per favorire la colonizzazione del feltro di carbonio da parte di batteri capaci di utilizzare CO₂ come substrato e di produrre acetato. L'inoculo veniva mantenuto in condizioni anaerobiche, tramite insufflazione di CO₂, così da preservare la vitalità dei microrganismi anaerobi e facilitare la formazione del *biofilm* elettroattivo necessario al funzionamento del sistema.

Durante la fase di avvio originaria, il potenziostato era stato impostato per applicare una densità di corrente di 3 A·m⁻² per la durata di 4 giorni. Questa condizione iniziale aveva lo specifico scopo di stimolare l'adesione precoce dei microrganismi alla superficie del catodo, favorire la selezione mirata dei ceppi elettrotrofici e acetogenici, stabilizzare il potenziale catodico e, infine, avviare la produzione dei primi metaboliti ridotti.

Al termine dei 4 giorni di acclimatazione, la densità di corrente era stata gradualmente aumentata fino al valore operativo di $12 \text{ A} \cdot \text{m}^{-2}$, mantenuto poi costantemente durante tutto il periodo sperimentale.

2.1.2 Fotobioreattore

Il sistema è costituito da 3 fotobioreattori tubolari in acrilico (Aqualgae, Spagna), aventi diametro di 110 mm e un volume operativo da 3 a 8 L (Figura 2.7). Nel fotobioreattore viene coltivata la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX2805 utilizzando come substrato l'effluente del catodo della prima unità con un terreno di coltura BG-11. Affinché il coltivo possa crescere, è necessario monitorare le condizioni al contorno.

La temperatura viene mantenuta a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ utilizzando un termostato ad immersione (Blue Heater BCF 200W, Spain). Il sistema è mantenuto a pH neutro (circa 7), condizione ottimale per garantire la stabilità del processo e la crescita delle microalghe. Le alghe crescono con un ciclo di illuminazione di 16 ore di luce (ambiente autotrofo) fornita da LED (VALOYA, serie C65W, spettro NS12) e 8 ore di buio (ambiente eterotrofico) caratterizzati da una densità di flusso fotonico controllabile di $0\text{-}200 \mu\text{mol fotoni} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Questo parametro consente di modulare l'intensità luminosa in funzione delle esigenze del processo fotosintetico e rappresenta la quantità di fotoni disponibili per unità di superficie e tempo, influenzando direttamente la crescita e l'attività metabolica delle microalghe. L'agitazione all'interno del fotobioreattore è mantenuta mediante insufflazione continua di aria compressa. L'aria viene fornita attraverso un tubo principale che immette il flusso direttamente nel reattore, garantendo la miscelazione del mezzo e mantenendo le cellule microalgali in sospensione. Il sistema di aerazione è integrato con il controllo automatico del pH. Quando il pH del mezzo scende al di sotto di 7, un'elettrovalvola si attiva e permette l'introduzione di CO_2 nello stesso tubo utilizzato per l'aria compressa. In questo modo la CO_2 viene miscelata al flusso d'aria e distribuita uniformemente nel reattore, consentendo una regolazione rapida del pH e assicurando al tempo stesso un adeguato apporto di carbonio inorganico per la crescita microalgale. Questo approccio permette di ottenere una miscelazione efficace senza l'impiego di parti meccaniche in movimento, riducendo il rischio di contaminazioni e semplificando la gestione del sistema.

Il sistema è gestito tramite un pannello di controllo dotato di *display touchscreen*, la cui interfaccia consente di monitorare e regolare in tempo reale i principali parametri operativi del fotobioreattore. Nello specifico, il sistema permette di gestire il pH delle diverse colonne mediante l'impostazione di *setpoint* dedicati, oltre a controllare la temperatura e la potenza dei riscaldatori. Viene inoltre monitorato il consumo di CO_2 insieme allo stato delle relative valvole. Infine, la regolazione dei LED consente di gestire l'intensità luminosa e il fotoperiodo, garantendo un controllo completo sulle condizioni della coltura.

Il *display* inferiore fornisce un riepilogo immediato dei valori di pH e temperatura per ciascun canale, facilitando il controllo e la gestione del processo.



Figura 2.7 - Bioreattori tubolari in acrilico (Aqualgae, Spagna).

Per una visione complessiva della configurazione sperimentale e dell’interazione tra il sistema bioelettrochimico e il fotobioreattore, si riporta di seguito uno schema a blocchi (Figura 2.8) che sintetizza i principali flussi di processo, le fasi operative e le attività di monitoraggio.

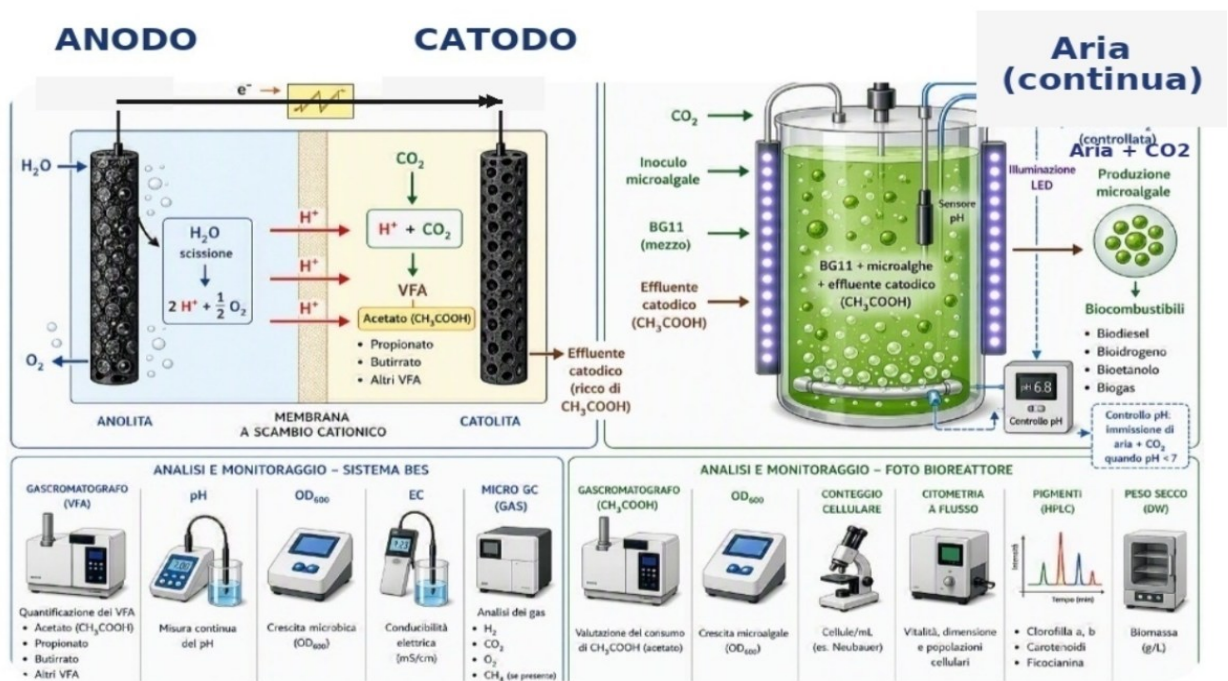


Figura 2.8 – Schema a blocchi del sistema integrato BES–Fotobioreattore. Il diagramma illustra il flusso dei materiali e dei processi tra il sistema bioelettrochimico e il fotobioreattore, con indicazione delle principali fasi di analisi e monitoraggio.

2.2 Processi di monitoraggio, analisi chimiche e calcoli nel BES

Al fine di valutare le prestazioni analitiche e l'efficienza di conversione del sistema bioelettrochimico, è stato sviluppato un protocollo rigoroso per il monitoraggio dei principali parametri operativi. Nelle sezioni seguenti vengono descritte dettagliatamente le procedure di campionamento delle fasi liquida e gassosa, le tecniche analitiche impiegate per la caratterizzazione chimica dei metaboliti e i modelli matematici utilizzati per l'elaborazione dei parametri di performance energetica e cinetica del reattore.

2.2.1 Monitoraggio dei parametri e analisi chimiche

Al fine di caratterizzare e monitorare la produzione di acido acetico nei BES, sono stati effettuati prelievi periodici di campioni liquidi e gassosi. Per ciascun prelievo sono stati registrati la data e l'ora del campionamento. Prima di ogni operazione di campionamento, la pressione interna del sistema è stata determinata mediante un manometro digitale (Testo 512, Spagna), al fine di garantire la corretta acquisizione dei dati.

2.2.2 Campionamenti liquidi

I campionamenti della fase liquida dagli elettrodi sono stati effettuati tre volte a settimana (lunedì, mercoledì e venerdì) utilizzando siringhe in plastica da 5 ml. Al fine di valutare la stabilità e l'efficienza del sistema, il primo parametro monitorato è stato la densità ottica (OD_{600}): un'aliquota di circa 2 ml di liquido campionato è stata analizzata in una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 10,00 mm mediante uno spettrofotometro VIS (HACH, DR3900, Germania) impostato a una lunghezza d'onda di 600 nm. La misura della torbidità ha consentito di stimare indirettamente l'andamento della biomassa sospesa nei comparti catodici, a fronte di comparti anodici mantenuti in condizioni abiotiche. Successivamente, il volume residuo della misura spettrofotometrica è stato filtrato con filtri in nylon da 0,2 μ m per procedere alla determinazione del pH, della conducibilità elettrica e degli acidi grassi volatili.

Il monitoraggio del pH è stato eseguito tramite un pH-metro (HACH sensION+, PH3, Germania) equipaggiato con una sonda a immersione in soluzione elettrolitica di KCl (3 M). Nel comparto catodico, il pH è stato mantenuto all'interno del range ottimale per i batteri acetogeni, idealmente compreso tra 5,0 e 6,5; valori inferiori a 5,0 richiedono la correzione mediante l'aggiunta di 2 ml di NaOH (40%), poiché l'attività acetogenica subisce un forte arresto sotto pH 4,5, virando verso la produzione di etanolo a valori prossimi a 4,8. Al contrario, un pH intorno a 7,0 favorirebbe cineticamente i microrganismi metanogeni competitori, data la maggiore

favorevolezza termodinamica di conversione della CO₂ e dei protoni (H⁺) in CH₄ rispetto alla sintesi di acido acetico. L'imposizione di precise condizioni al contorno operative permette quindi di indirizzare selettivamente il *pathway* metabolico verso l'acetogenesi. Di contro, nel comparto anodico il pH è stato mantenuto tra 1,5 e 2,0 come conseguenza diretta dell'ossidazione dell'acqua e della contestuale generazione di protoni; valori superiori a 2,0 indicano un potenziale malfunzionamento o una ridotta selettività della membrana a scambio protonico. La conducibilità elettrica (EC) è stata parallelamente determinata mediante un conduttivimetro (HACH sensION+, EC7, Germania) dotato di sonda a immersione.

La quantificazione degli acidi grassi volatili (AGV) e dei rispettivi alcoli nella fase liquida (mg · L⁻¹) è stata effettuata tramite un gascromatografo GC (*Agilent 7890, Agilent Technologies, U.S.A.*) equipaggiato con una colonna capillare DB-FFAP e un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). La preparazione dei campioni ha previsto l'impiego di fialette da 2 ml e micropipette regolabili (*Thermo Scientific Finnpiquette Campus 100-1000 µL* e *F1 20-200 µL*) con puntali monouso per il prelievo accurato dei volumi.

Per la caratterizzazione del liquido catodico è stata applicata una diluizione pre-analitica 1:4, strutturando la miscela finale nei seguenti volumi complessivi:

$$V_{tot,catodo}=0,375\text{ mL}_{campione}+1,125\text{ mL}_{H_2O}+0,085\text{ mL}_{acido\text{ crotonico}}+0,100\text{ mL}_{acido\text{ fosforico}}$$

Per il Per il comparto anodico, non necessitando il campione di preventiva diluizione, la soluzione per l'analisi gascromatografica è stata allestita secondo le seguenti proporzioni volumetriche:

$$V_{tot,anodo}=1,500\text{ mL}_{campione}+0,085\text{ mL}_{acido\text{ crotonico}}+0,100\text{ mL}_{acido\text{ fosforico}}$$

Tale scomposizione analitica evidenzia come, a fronte di costi gestionali areali sovrapponibili, l'ottimizzazione delle condizioni operative e chimiche permetta di discriminare accuratamente i profili metabolici dei due sistemi BES.

2.2.3 Campionamenti gassosi

Il campione gassoso è stato prelevato, 5 volte a settimana, dallo spazio di testa nei reattori utilizzando una siringa in vetro da 5000 µL (*Gastight, Hamilton CO., U.S.A.*). L'analisi della composizione gassosa viene fatta tramite un sistema Micro-GC (*Agilent 490 Micro GC system, Agilent Technologies, US*).

Il processo analitico prevede l'iniezione manuale del campione con la siringa all'interno di un condotto che consente il flusso del campione grazie ai gas di trasporto (Elio e Argon). Questi gas

devono avere una conducibilità termica molto diversa da quella dei componenti del campione per garantire sensibilità nel TCD.

Il Micro- GC è dotato di 2 colonne: una CP-Molsieve 5A per l'analisi di metano (CH_4), idrogeno (H_2), ossigeno (O_2) e azoto (N_2), (canale 1, Figura 2.9), e una CP-PoraPlot U per l'analisi dell'anidride carbonica (CO_2), acido solfidrico (H_2S) e molecole composite non identificate, (canale 2, Figura 2.10).

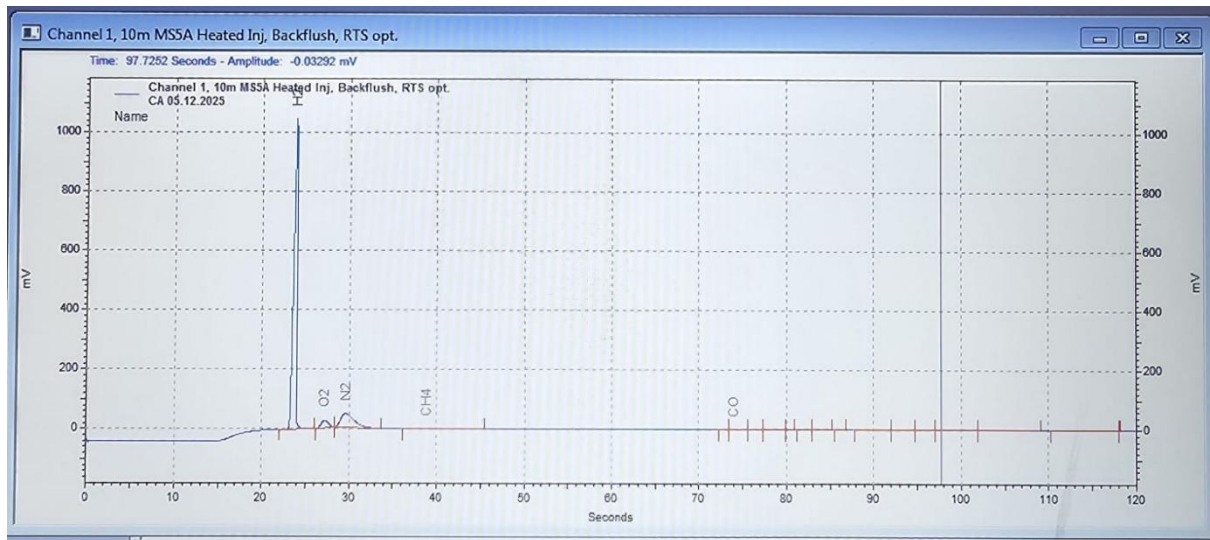


Figura 2.9- Canale 1.

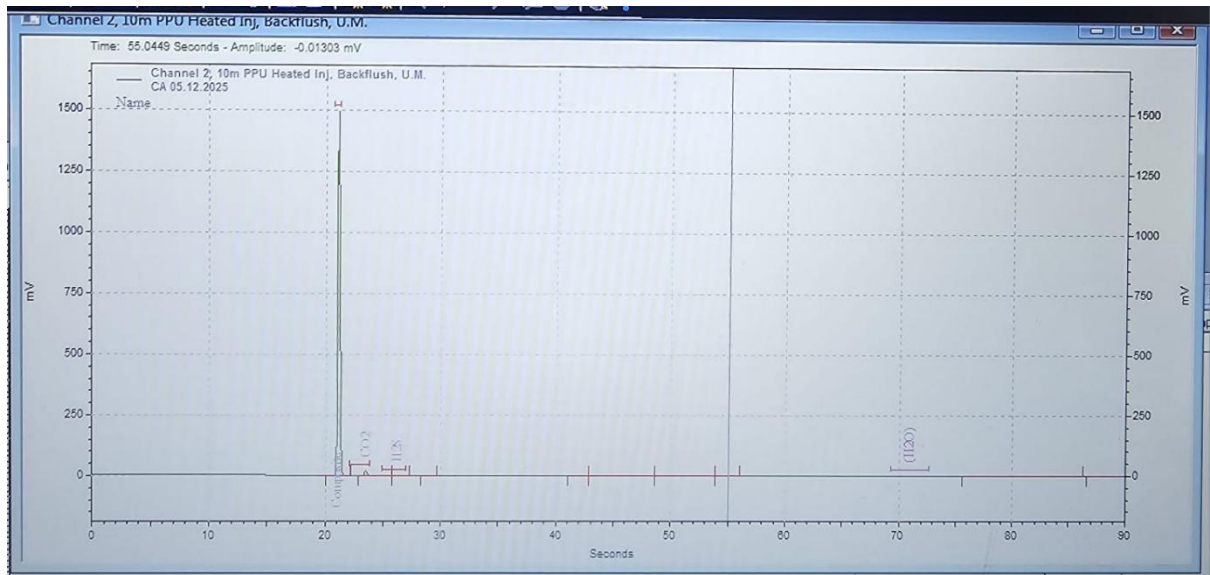


Figura 2.10- Canale 2.

Entrambe le colonne erano collegate a un rivelatore di conducibilità termica (TCD), che permette di ottenere un segnale proporzionale alla quantità di ciascun componente. I dati raccolti vengono elaborati per calcolare le percentuali relative dei gas, fornendo un quadro completo della composizione del biogas. Questa analisi è essenziale non solo per la caratterizzazione del substrato, ma anche per il monitoraggio delle condizioni operative del BES, poiché variazioni nella composizione del gas possono indicare squilibri metabolici o inefficienza nel sistema. Qualora la concentrazione di metano fosse risultata superiore al 5%, si è provveduto all'aggiunta di acido 2-bromoetanosolfonico (BESA) alla concentrazione di $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, con lo scopo di inibire i

microrganismi metanogeni e limitare la metanogenesi, favorendo l’accumulo di acido acetico come prodotto principale.

2.2.4 Procedura di riempimento degli elettrodi e gestione del cloro nell’anodo

Le soluzioni elettrolitiche per anodo e catodo sono state preparate seguendo la formulazione ATCC 1754 PETC modificata, riportata in Tabella 2.1. Tale ricetta è stata adattata per ottimizzare la conducibilità e la stabilità del sistema elettrochimico.

Tabella 2.1 - Formulazione ATCC 1754 PETC modificata.

Composizione del mezzo	g·L ⁻¹	Composizione della soluzione di metalli in tracce	m g·L ⁻¹	Composizione della soluzione di Vitamine	g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,1	Acido Nitritotriacetico	20	Biotina	20
NaCl	0,8	MnSO ₄ ·H ₂ O	10	Acido folico	20
NH ₂ Cl	1,0	Fe(SO ₄) ₂ (NH ₄)·6H ₂ O	8	Vitamina B6	100
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2	CoCl ₂ · 6H ₂ O	2	Cloridrato di Tiamina	50
KCl	0,1	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,002	Vitamina B2	50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,2	Vitamina B3	50
MES	1,95	NiCl ₂ · 2H ₂ O	0,2	Calcio Pantotenato	50
HCl	0,4	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,2	Vitamina B12	1

Inoltre, per prevenire l’accumulo di cloro nell’anodo, è stato implementato un protocollo di manutenzione periodica: ogni venerdì viene eseguito lo spurgo dell’anodo mediante il drenaggio controllato della soluzione, seguito da reintegro con soluzione fresca al fine di mantenere l’efficienza del sistema e ridurre fenomeni di corrosione.

2.2.5 Elaborazione dei dati e calcolo dei parametri di performance

Le prestazioni di un sistema bioelettrochimico (BES) sono fortemente influenzate dai parametri operativi impostati. Per una valutazione accurata del processo e per consentire un confronto rigoroso con altri sistemi descritti in letteratura, è necessario calcolare specifici indicatori energetici e di efficienza chimica.

Tra i parametri chiave presi in esame vi sono la produttività, espressa in g·m⁻²·d⁻¹ o in g·L⁻¹·d⁻¹, la quale può essere valutata sia in funzione della superficie elettrodica sia del volume

utile del catodo, e l'efficienza coulombica (CE%), che indica la frazione di elettroni effettivamente utilizzata per la sintesi del prodotto desiderato, in questo caso l'acido acetico, rispetto alla carica totale trasferita al sistema. A questi si aggiungono l'energia elettrica specifica consumata, che quantifica l'input energetico richiesto per produrre un chilogrammo di acido acetico, e l'efficienza di conversione del carbonio (%C) in acetato.

La determinazione di tali parametri permette di mappare l'andamento del sistema, considerando che essi dipendono strettamente dalle proprietà intrinseche dei materiali elettrodi, dalla selettività della comunità microbica sviluppata sul *biofilm* e dalle condizioni operative globali (Batlle-Vilanova et al. 2019).

2.2.5.1 Produttività

Con i valori della concentrazione di acido acetico totale, calcolata come somma della concentrazione al catodo e di metà della concentrazione all'anodo (in virtù del rapporto volumetrico per cui $V_{\text{catodo}} = 2 V_{\text{anodo}}$), si procede con il calcolo della produttività, espressa generalmente in $\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ oppure in $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. A seconda della modalità operativa adottata nel sistema, il calcolo di questo parametro viene strutturato in maniera differente.

Per un sistema operante in regime *batch*, la produttività volumetrica (P_v), riferita al volume utile del reattore, viene determinata applicando la seguente relazione:

$$P_v = (C_{\text{finale}} - C_{\text{iniziale}}) / \Delta t$$

dove C_{finale} e C_{iniziale} rappresentano le concentrazioni di acido acetico totale rispettivamente alla fine e all'inizio del ciclo, mentre Δt indica la durata complessiva del processo espressa in giorni.

Nel caso di un sistema operante in regime semi-continuo, la produttività deve essere normalizzata rispetto al volume di lavoro e al tempo di alimentazione, prendendo in considerazione i flussi idraulici di ingresso e di uscita. La formula applicata in questo contesto è la seguente:

$$P_v = [(C_{\text{finale}} - C_{\text{iniziale}}) / \Delta t] + F_{\text{U}} \cdot C_{\text{U}}$$

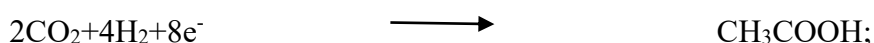
Dove C_{U} è la concentrazione di acido acetico nell'effluente.

Quest'ultimo è determinato misurando la quantità raccolta nella sacca di accumulo, che funge da serbatoio per l'effluente proveniente dal reattore, ogni volta che si esegue il campionamento dei liquidi. In un sistema semicontinuo, la definizione del tempo di ritenzione idraulica (HRT) rappresenta un parametro cruciale per il controllo e l'ottimizzazione del processo. L'HRT influisce

direttamente sulla cinetica di degradazione del substrato e sulla composizione del prodotto finale. Nel presente studio, sono stati adottati valori di HRT pari a 15 e 10 giorni al fine di individuare le condizioni operative più efficienti. I risultati evidenziano che la riduzione dell'HRT comporta una diminuzione della concentrazione di acido acetico, fenomeno attribuibile al minor tempo di permanenza del materiale nel reattore, che limita la formazione e l'accumulo di acidi volatili intermedi.

2.2.5.2 Efficienza Coulombica

L'efficienza coulombica è definita come il rapporto tra l'energia consumata per formare l'acido acetico e l'energia totale fornita dal potenziostato. Nel calcolo di questo parametro si considera innanzitutto il numero di elettroni necessari affinché la reazione avvenga, che in questo caso è pari a 8, come descritto dalla semireazione:



Un altro fattore fondamentale è il numero di moli di acido acetico prodotte (n), il quale viene ricavato moltiplicando il volume per il rapporto tra la produzione temporale di acido acetico (divisa per 1000 e parametrata sull'intervallo di tempo $t_2 - t_1$) e il suo peso molecolare, che corrisponde a 60,052 g/mol. La formula specifica per determinare le moli è:

$$n = \frac{\frac{\text{Produzione di acido acetico}}{1000}(t_2 - t_1)}{\text{peso molecolare } \text{CH}_3\text{COOH}} \cdot \text{Volume}$$

Il calcolo include inoltre la costante di *Faraday* (F), pari a 96485 C mol^{-1} , e la corrente integrata nel tempo $I(t)$, espressa in Coulomb [C]. Quest'ultima rappresenta la carica totale Q che attraversa il mezzo conduttivo nell'intervallo considerato, e viene calcolata semplicemente come il prodotto tra la corrente I misurata dal potenziostato in *Ampère* [C/s] e il tempo t espresso in secondi ($Q = I \cdot t$).

L'efficienza coulombica è data dalla formula:

$$CE = \frac{8nF}{\int_0^t I dt} = \frac{\text{energia consumata per formare l'acido acetico}}{\text{energia fornita dal potenziostato}}$$

2.2.5.3 Energia elettrica consumata

L'energia elettrica specifica necessaria per la produzione di acido acetico è un indicatore fondamentale dell'efficienza energetica del processo, in quanto esprime quanta energia è richiesta per ottenere un singolo chilogrammo di prodotto. Questo parametro viene calcolato come il rapporto tra l'energia totale consumata durante l'elettrolisi e la massa di acido acetico effettivamente prodotta, secondo la seguente relazione:

$$E_{\text{specifica}} = (U \cdot I \cdot t) / m_{\text{acido acetico}}$$

All'interno di questa formula, l'energia consumata al numeratore è determinata dal prodotto tra la tensione applicata U espressa in Volt (V), la corrente I espressa in Ampere (A) e il tempo di funzionamento del processo t calcolato in ore (h). Dividendo questo valore per la massa del prodotto (acido acetico) espressa in chilogrammi (kg), si ottiene il risultato finale espresso in $\text{kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$.

2.2.5.4 Efficienza di conversione del carbonio (%C) in acetato

L'efficienza di conversione del carbonio in acetato è un parametro fondamentale che indica quanto del carbonio presente nel substrato iniziale, come l'anidride carbonica (CO_2) o altri composti organici, viene effettivamente trasformato in acetato durante il processo biologico o elettrochimico. Poiché ogni molecola di acetato (CH_3COO^-) contiene due atomi di carbonio, il calcolo si basa sul rapporto tra il carbonio presente nel prodotto e quello introdotto con la materia prima. L'efficienza percentuale si determina con la formula:

$$\text{Efficienza}(\%) = \frac{\text{moli di C in acetato}}{\text{moli di C introdott}} \cdot 100$$

All'interno di questa relazione, il carbonio introdotto (C_{int}) rappresenta le moli di carbonio totali presenti nella materia prima alimentata (CO_2 o CO), mentre il carbonio nel prodotto (C_{out}) indica le moli di carbonio presenti nell'acetato finale.

Il punto di partenza per stimare l'efficienza di conversione consiste nel determinare la disponibilità di carbonio in soluzione. Questo calcolo si effettua tramite la legge di Henry, che descrive la solubilità di un gas in un liquido come il prodotto tra la costante di Henry (k_H) e la pressione parziale del gas sopra il liquido (P), secondo la relazione $C = k_H \cdot P$. In questa formula, C è la concentrazione del gas disciolto espressa in mol/L , mentre la costante k_H dipende dalla temperatura e dal tipo di gas; nel caso specifico della CO_2 a temperatura ambiente, essa assume un valore pari a $3,3 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$.

Per calcolare il volume totale di CO₂ alimentato al giorno (V_{CO_2}), si moltiplicano tra loro la portata del gas (fissata a 10 mL·min⁻¹), la durata di ciascun insufflaggio (che nel nostro caso può essere di 1,5 ore, 1 ora o 30 minuti) e la frequenza di alimentazione giornaliera, solitamente eseguita 1 o 2 volte al giorno:

$$V_{CO_2} = portata \cdot durata \cdot alimentazione$$

Una volta ottenuto il volume, si determina il numero di moli di gas (n) sfruttando la legge dei gas ideali, assumendo le condizioni standard di 25°C e 1 atm:

$$n = (P \cdot V) / (R \cdot T)$$

In questa equazione si imposta la pressione P a 1 atm, il volume V pari al V_{CO_2} precedentemente calcolato, la costante universale dei gas R pari a 0,08206 L·atm·mol⁻¹·K⁻¹ e la temperatura assoluta T pari a 298 K.

Considerando infine che ogni mole di CO₂ contiene esattamente un atomo di carbonio, le moli di carbonio introdotte equivalgono alle moli di gas calcolate moltiplicate per uno (moli di C introdotto = n · 1). Tuttavia, poiché il campionamento dei liquidi viene eseguito ogni due giorni, per uniformare i dati è necessario moltiplicare il valore giornaliero delle moli di carbonio introdotto per due.

ALTRO METODO

Un metodo alternativo per determinare l'efficienza si basa sull'utilizzo diretto delle concentrazioni (esprese in mol·L⁻¹) dell'acetato e dei vari substrati presenti nel reattore. Per calcolare le moli totali di carbonio nell'acetato si moltiplica la concentrazione dell'acetato per il volume del reattore V (espresso in litri) e successivamente per due, poiché ogni molecola di acetato contiene due atomi di carbonio (moli di C nell'acetato = concentrazione acetato · V · 2).

Allo stesso modo, le moli totali di carbonio introdotte nel sistema si ottengono sommando le moli di carbonio provenienti da tutte le fonti gassose o liquide presenti, come l'anidride carbonica (CO₂), il monossido di carbonio (CO) e altri eventuali substrati. Nello specifico, le moli di carbonio da CO₂ e da CO si calcolano moltiplicando la rispettiva concentrazione nel mezzo per il volume V del reattore e per uno, dato che entrambe le molecole contengono un solo atomo di carbonio.

Nel caso in cui le concentrazioni iniziali siano esprese in mg·L⁻¹ anziché in mol·L⁻¹, è necessario effettuare una conversione preliminare prima di procedere al calcolo delle moli di carbonio. La conversione per ottenere le moli del composto per ogni litro di soluzione si effettua dividendo la concentrazione in mg·L⁻¹ per il prodotto tra il peso molecolare del composto stesso (PM, espresso in g·mol⁻¹) e mille:

$$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} = (\text{concentrazione (mg} \cdot \text{L}^{-1}) / (\text{PM (g} \cdot \text{mol}^{-1}) \cdot 1000)$$

Una volta completata questa conversione, le moli di carbonio derivanti dal singolo composto si determinano semplicemente moltiplicando la concentrazione appena calcolata in $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ per il volume del reattore V e per il numero specifico di atomi di carbonio presenti all'interno di quella determinata molecola ($\text{mol C dal composto} = \text{concentrazione composto (mol} \cdot \text{L}^{-1}) \cdot V \cdot (\text{n. atomi di C})$).

2.3 Processi di monitoraggio, analisi chimiche e calcoli nel fotobioreattore

Nel fotobioreattore, i parametri fondamentali come pH, temperatura e intensità luminosa vengono impostati dall'operatore in base alle esigenze del processo. Tuttavia, è necessario monitorarli costantemente per assicurare che rimangano entro i limiti desiderati e per individuare eventuali variazioni che potrebbero influire sulla crescita delle microalghe. Le analisi chimiche, come la determinazione della concentrazione di nutrienti e della biomassa, forniscono informazioni essenziali sullo stato del sistema, mentre i calcoli ingegneristici consentono di stimare rese, bilanci di massa e performance del processo. L'integrazione di queste attività garantisce il mantenimento delle condizioni ottimali e l'ottimizzazione della produttività.

2.3.1 Processi di monitoraggio e analisi chimiche

Per garantire l'ottimizzazione della coltura algale, vengono effettuati campionamenti giornalieri (5 volte a settimana) dal fondo dei reattori a colonna tramite un contenitore di plastica di circa 50 ml. L'obiettivo è mantenere un rapporto di 3g di acetato per grammo di biomassa in un volume di 3 L. Nella fase iniziale le microalghe necessitano di un periodo di acclimatamento; successivamente, la crescita avviene in modo esponenziale, accompagnata dal consumo progressivo dell'acetato.

Attraverso i campionamenti, si valuta il consumo di acetato e il tempo necessario per il suo esaurimento. Le analisi chimiche sono fondamentali per determinare la quantità di biomassa presente nel reattore, poiché l'obiettivo è raggiungere una concentrazione di $0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Inoltre, viene eseguita l'analisi degli acidi grassi volatili (AGV) per monitorare la concentrazione di acido acetico, che deve mantenersi intorno a $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Densità ottica (OD)

La valutazione della biomassa presente nel reattore viene effettuata attraverso la misura della densità ottica (OD) utilizzando uno spettrofotometro (HACH, DR3900 Spettrofotometro VIS). Tramite le micropipette regolabili *Thermo Scientific Finnpipette Campus* (100-1000 μL), si prelevano circa 3 mL di liquido campionato, trasferendoli in una cuvetta in quarzo (Qs) con un cammino ottico di 10,00 mm. Successivamente, la cuvetta viene inserita nello spettrofotometro per la lettura della densità ottica alle lunghezze d'onda di 750 nm, 600 nm e 680 nm. Nello specifico, i valori a 750 nm e 600 nm vengono impiegati per stimare la torbidità del campione, la quale risulta direttamente correlata alla concentrazione della biomassa. La lettura a 680 nm permette invece di valutare la presenza di clorofilla, un parametro indicativo dell'attività fotosintetica delle microalghe. Questo approccio combinato consente di monitorare in modo accurato sia la crescita cellulare sia lo stato fisiologico complessivo della coltura.

Analisi degli acidi grassi volatili (AGV)

Dopo aver fatto l'analisi (OD), si prosegue prelevando con una siringa, di plastica, circa 2,5 mL di liquido campionato e lo si filtra.

Dal campione filtrato, tramite le micropipette, si prelevano 1,5 mL che vengono trasferiti in una bottiglietta insieme a 0,085 mL di acido crotonico + 0,100 mL di acido fosforico, generando una miscela stabile di campione necessaria per l'analisi AGV. La concentrazione di acido acetico, espressa in ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), è stata determinata mediante un gascromatografo GC (*Agilent 7890°*, *Agilent Technologies, U.S.A*) con colonna DB-FFAP e rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID), in grado di rilevare acidi grassi volatili (AGV) e rispettivi alcoli.

Conteggio cellulare (FC)

Il conteggio cellulare delle microalghe viene effettuato prelevando, tramite micropipette, 10 mL di liquido campionato dai reattori ed effettuando una diluizione 1:5. Dal campione diluito vengono prelevate alcune gocce e depositate su un vetrino portaoggetti per l'osservazione al microscopio ottico *Nikon Eclipse E200*, dotato di fotocamera digitale integrata.

Durante l'analisi, l'immagine osservata al microscopio viene acquisita e salvata tramite il computer collegato allo strumento. Le immagini ottenute vengono successivamente elaborate con il software *Image (ImageJ)*, che consente il conteggio cellulare automatico o semi-automatico e la valutazione della densità di biomassa.

L'osservazione microscopica permette inoltre di analizzare: la morfologia cellulare (forma, dimensione, disposizione); il grado di aggregazione (flocculazione, formazione di colonie); la presenza di organismi predatori (protozoi, rotiferi, altre alghe); eventuali segni di stress fisiologico.

La presenza di esosaccaridi extracellulari (EPS) è un indicatore di stress fisiologico nella coltura di *Chlorella*. Se la crescita delle microalghe rallenta, quest'ultimi investono energia nella sintesi di polisaccaridi extracellulari. Gli EPS si formano in risposta a condizioni avverse come carenza di

nutrienti (soprattutto azoto), variazioni di pH, salinità o temperatura, stress osmotico o accumulo di ossigeno e possono causare aggregazione cellulare e aumento della viscosità del mezzo (problemi di miscelazione e scambio di gas) come mostra la Tabella 2.2.

Tabella 2.2 - fattori di crescita degli EPS degli eventuali effetti.

Fattore	EPS	Effetto
Carenza nutrienti	↑	Aggregazione
Variazioni pH	↑	Instabilità
Stress osmotico	↑	Flocculi/Biofilm
Accumulo O ₂	↑	Viscosità alta
Alta densità	↑	Flocculazione

I risultati ottenuti tramite analisi microscopica vengono infine confrontati con quelli forniti dal citometro a flusso, che permette una quantificazione più precisa della concentrazione cellulare e della distribuzione dimensionale, fornendo una validazione incrociata dei dati raccolti.

Fissazione e preparazione dei campioni per citometria a flusso

La preparazione dei campioni destinati all’analisi in citometria a flusso è stata eseguita seguendo il protocollo PNT FC, che prevede una fase preliminare di quantificazione cellulare mediante camera di Neubauer, al fine di ottenere una stima accurata della concentrazione (cell/mL). Come riportato nel protocollo, “abans de fixar les mostres s’han de quantificar amb càmera de Neubauer per obtenir cèl/mL” (prima di fissare i campioni è necessario quantificarli con la camera di Neubauer per ottenere cell/mL) e la diluizione viene scelta in modo da contare tra 40 e 200 cellule per campo.

Per la fissazione, i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 5 minuti e il pellet è stato risospeso in 1 mL di paraformaldeide al 2,5% disciolta in PBS filtrato, come indicato nel protocollo: “Resuspendre en 1 mL de 2,5% paraformaldehid dissolt en PBS filtrat” (risospendere in 1 mL di paraformaldeide al 2,5% disciolta in PBS filtrato). La soluzione fissativa è stata lasciata agire per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a due ulteriori cicli di centrifugazione (4000 rpm, 5 min) e risospensione in PBS filtrato, per rimuovere completamente il fissativo residuo. I campioni fissati sono stati conservati a 4 °C fino al momento dell’analisi.

Quando necessario, è stata eseguita anche la colorazione con *Sybr Green* (1X), seguendo le indicazioni del protocollo, che prevede l’aggiunta di 10 µL di colorante per ogni mL di campione e un’incubazione di 15–20 minuti al buio prima della lettura al citometro.

Per la determinazione del peso secco delle alghe, espresso in g·L⁻¹, è stato adottato un metodo gravimetrico. In primo luogo, i filtri con porosità di 45 µm sono stati essiccati utilizzando il forno

ventilato da laboratorio Memmert (Figura 2.11) a 105 °C per tutta la notte, al fine di eliminare completamente l'umidità residua. La temperatura di 105 °C è scelta perché consente di rimuovere l'acqua senza provocare la degradazione termica della biomassa o la perdita di composti organici volatili, garantendo così una misura accurata del contenuto solido.

Il giorno successivo, i filtri asciutti sono stati pesati con una bilancia analitica di precisione KERN (modello ABP 200-4M), avente una portata massima di 220 g e una risoluzione di 0,1 mg. Successivamente, un volume di 20 mL di campione liquido proveniente dai reattori a colonna è stato filtrato attraverso i filtri precedentemente preparati, impiegando un sistema di filtrazione sottovuoto (Figura 2.11). Tale sistema è costituito da una pompa per vuoto modello KNF, posizionata sulla destra, che genera la depressione necessaria per aspirare il liquido, e da un kit di filtrazione sulla sinistra. Quest'ultimo include un imbuto con supporto per il filtro in plastica, il filtro a membrana da 45 µm e una beuta di raccolta da 500 mL, di tipo Buchner o con attacco laterale, collegata direttamente alla pompa tramite un tubo in plastica.



Figura 2.11 - Sistema di filtrazione sottovuoto.

Questo sistema è utilizzato per accelerare la filtrazione rispetto alla gravità, soprattutto quando si lavora con volumi piccoli e campioni contenenti particelle fini.

Dopo la filtrazione, i filtri contenenti le alghe sono stati nuovamente posti in forno a 105°C per tutta la notte, in modo da assicurare la completa essiccazione della biomassa.



Figura 2.12 - Forno ventilato da laboratorio Memmert.

Infine, sono stati pesati i filtri per consentire il calcolo del peso secco delle alghe.

Quantificazione dei pigmenti

La quantificazione dei pigmenti fotosintetici è stata effettuata mediante estrazione con dimetilsolfossido (DMSO, 99%, Saarchem). Campioni di coltura (2 mL) sono stati trasferiti in provette Eppendorf e centrifugati a 10.000 rpm per 3 minuti, rimuovendo successivamente il surnatante. Al pellet cellulare sono stati aggiunti 2 mL di DMSO preriscaldato a 60 °C, e le cellule sono state risospese mediante vortex.

I campioni sono stati incubati a 60 °C per 10 minuti, con agitazione occasionale, e centrifugati nuovamente. Il surnatante ottenuto, contenente l'estratto pigmentario, è stato recuperato e diluito con DMSO fino a raggiungere una densità ottica (OD) inferiore a 1. L'assorbanza è stata misurata a 649, 665 e 480 nm, e il contenuto di pigmenti è stato calcolato utilizzando le equazioni proposte da *Wellburn* (1994). Per confrontare gli spettri di assorbanza delle cellule con e senza pigmenti, il pellet algale sbiancato è stato risospeso in 2 mL di acqua distillata (dH₂O). Le cellule sbiancate sono state osservate al microscopio per verificare l'integrità strutturale e la conservazione della morfologia rispetto alle cellule non trattate. Le scansioni di assorbanza nell'intervallo del visibile sono state effettuate su tre tipologie di campione: coltura originale, estratto pigmentario e cellule sbiancate. Ogni campione è stato diluito fino a ottenere un'OD massima inferiore a 1. Tutte le misurazioni sono state eseguite in duplicato per garantire la riproducibilità dei risultati.

2.3.2 Procedura di riempimento del fotobioreattore

Il riempimento del fotobioreattore è stato effettuato seguendo una sequenza controllata per garantire condizioni sterili e omogenee.

In primo luogo, il fotobioreattore è stato accuratamente pulito e sterilizzato con una soluzione di ipoclorito di sodio (NaClO) con concentrazione e tempo di contatto 24 h, che è un agente ossidante comunemente impiegato per la disinfezione in laboratorio. Dopo il trattamento con ipoclorito, il reattore è stato risciacquato più volte con acqua distillata per eliminare eventuali residui chimici che potrebbero interferire con la crescita algale.

Successivamente, nei reattori è stato introdotto il mezzo di coltura BG-11, precedentemente preparato secondo la formulazione standard. Questo mezzo fornisce tutti i nutrienti essenziali per la crescita delle microalghe, inclusi macro- e micronutrienti necessari ai processi fotosintetici e al metabolismo cellulare. La composizione del BG-11 utilizzata negli esperimenti è riportata nelle tabelle 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7. Tutte le soluzioni stock sono state conservate a +4° C e la preparazione del terreno BG-11 è stata effettuata sotto cappa a flusso laminare per garantire condizioni sterili.

Prima dell’inoculo, la biomassa algale del ceppo *Chlorella sorokiniana* UTEX2805 è stata raccolta e sottoposta a centrifugazione a 6000 giri/min per 5 minuti, al fine di concentrare le cellule e rimuovere parte del mezzo precedente. Il pellet ottenuto è stato quindi risospeso e inserito nel fotobioreattore insieme al terreno BG-11, garantendo una distribuzione uniforme della biomassa iniziale.

Durante il riempimento, si è mantenuta una leggera agitazione tramite aria compressa per evitare la sedimentazione e favorire l’omogeneità del sistema. Infine, il fotobioreattore è stato chiuso e collegato ai sistemi di aerazione e illuminazione, impostando i parametri operativi (pH, intensità luminosa, temperatura) secondo le condizioni sperimentali stabilite.

Tabella 2.3 - Soluzione 100× dei macronutrienti BG-11.

Componenti principali (macroelementi)	Formula chimica	g·L ⁻¹	g·(250 mL) ⁻¹	Concentrazione finale in BG11	Note
Nitrato di Sodio	NaNO ₃	149,6	37,4	17,6 mM	Non aggiungere nel BG110
Solfato di Magnesio Eptaidrato	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5	1,9	0,3 mM	Preparare separatamente
Cloruro di Calcio Diidrato	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,6	0,9	245 μM	
Acido citrico monoidratato	C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	0,65	162,5	31 μM	
EDTA Disodico	EDTA Na ₂	0,1	25	2,7 μM	
Sterilizzazione: autoclave					

Tabella 2.4 - Soluzione 1000× degli oligoelementi (*Trace Metal Mix*).

Componente Oligoelementi	Formula chimica	mg·(500 mL) ⁻¹	mg·(250 mL) ⁻¹	Note
Acido Borico	H ₃ BO ₃	1430	715	
Cloruro di Manganese Tetraidrato	MnCl ₂ · 4H ₂ O	905	453	
Soltato di Zinco Eptaidrato	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	111	55,5	
Molibdato di Sodio Diidrato	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	195.5	97,8	
Solfato di Rame Pentaidrato	CuSO ₄ · 5H ₂ O	39,5	19,8	
Nitrato di cobalto esaidrato	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	25	12,5	Alternativa: CoCl ₂ · 6H ₂ O 50 mg
Sterilizzazione: filtrare sterilmente e conservare aliquote a -20 °C.				

Tabella 2.5 - Soluzioni 1000× (Scorte separate).

Componente	Formula chimica	g·L ⁻¹	g·(100 ml) ⁻¹	Concentrazione finale in BG11
Fosfato dipotassico	K ₂ HPO ₄	30	3	1,750 mM
Carbonato di sodio	Na ₂ CO ₃	20	2	0,189 mM
Citrato ferrico ammoniacale (18%)		6	0,6	(Proteggere dalla luce)
Sterilizzazione: filtrare sterilmente				

Tabella 2.6 - Preparazione del terreno liquido BG-11 (1 L).

Componente	Quantità
Acqua ultrapura (MQ H ₂ O)	970 mL
Soluzione 100 x macronutrienti	10 mL
Soluzione 1000 x oligonutrienti	1 mL ciascuno
Soluzioni 1000× (K ₂ HPO ₄ , Na ₂ CO ₃ , Fecitrato)	1 mL ciascuno

Tabella 2.7 - Preparazione delle piastre di Agar.

Componente	Quantità
Agar	3,7 g (autoclavare con 250 mL di acqua)
Soluzione 30% Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	2,5 mL

Il fotobioreattore ha una capacità nominale di 8L e il volume operativo è stato fissato a 3L, corrispondente a circa il 37,5% della capacità totale, al fine di garantire un’adeguata aerazione e miscelazione.

Ciclo sperimentale

Ciascuna prova sperimentale ha avuto una durata complessiva da 3 a 4 settimane, articolandosi in fasi distinte e sequenziali, ognuna delle quali è stata caratterizzata da specifiche condizioni di crescita e finalità metaboliche.

Durante la prima settimana, identificata come fase autotrofica, la coltivazione è stata condotta in condizioni esclusivamente autotrofiche, escludendo l'aggiunta di effluente proveniente dai BES. Questa strategia ha avuto l'obiettivo di stabilizzare la crescita microalgale e garantire l'ottenimento di una biomassa sana e metabolicamente attiva. La seconda settimana ha visto l'introduzione della fase mista autotrofica/eterotrofica, all'inizio della quale l’effluente del sistema BES è stato inserito nel sistema come fonte carbonica organica supplementare; ciò ha permesso alla coltura di sfruttare sinergicamente sia la via fotosintetica sia l'assimilazione del carbonio organico disponibile.

Successivamente, nel corso della terza settimana, è stata implementata una fase mista con effluente diluito. Questa replica della condizione precedente, resa necessaria dal fatto che la produttività volumetrica del sistema BES non consentiva l'ottenimento di volumi massivi di effluente puro, ha permesso di valutare con precisione la risposta cinetica e adattativa della coltura microalgale a concentrazioni ridotte di substrato organico.

Infine, l’ultima settimana è stata dedicata alla fase a disponibilità di azoto ridotta. La coltura è stata intenzionalmente sottoposta a condizioni di limitazione dell’azoto, una strategia biochimica ampiamente consolidata in letteratura per indurre stress metabolico e il conseguente accumulo di lipidi intracellulari nelle microalghe. Questa sotto-fase si è rivelata fondamentale per stimare il reale potenziale biotecnologico della biomassa algale in un'ottica di valorizzazione e produzione lipidica.

2.3.3 Elaborazione dei dati e calcolo dei parametri di performance

Nel fotobioreattore si mantiene fisso il volume operativo a 3 L, costituito da 3 componenti principali:

Substrato organico (V_{acetato}), rappresentato da acido acetico, è utilizzato come fonte di carbonio per il metabolismo delle microalghe. Dall'analisi degli acidi grassi volatili si determina la concentrazione di acetato presente nel reattore, affinché nel reattore vi sia una concentrazione di $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, il volume di substrato organico si calcola:

$$V_i = C_f \cdot V_f / C_i$$

Dove:

C_f = concentrazione finale di acetato nel reattore = $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;

V_f = volume finale = 3 L;

$V_i = V_{\text{acetato}}$ = volume di acetato disciolto che dobbiamo immettere nel reattore;

C_i = concentrazione iniziale di acetato derivato dall'analisi degli acidi grassi di volatili.

Volume algale (V_{biomassa}), corrispondente alla sospensione di biomassa inoculata. Per valutare la biomassa presente nel reattore poiché vogliamo una concentrazione finale di $0,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nel volume di lavoro, bisogna campionare un po' di liquido dai fotobioreattori e per ognuno misurare l'OD (densità ottica). Successivamente si calcola il V_{biomassa} :

$$V_i = C_f \cdot V_f / C_i$$

Dove:

C_i = concentrazione iniziale della biomassa nel reattore, valore di OD ottenuto dal campionamento preso dal reattore colonna;

$V_i = V_{\text{biomassa}}$ = volume di biomassa da inserire nel reattore;

C_f = concentrazione finale di biomassa nel reattore = 0,6;

V_f = volume finale = 3 L.

Terreno di coltura (V_{TC}), contenente i nutrienti necessari per la crescita algale e il mantenimento delle condizioni ottimali di sviluppo, è calcolato come differenza tra il volume che vogliamo mantenere costante nel reattore ($V=3 \text{ L}$) e la somma dei volumi della biomassa

(V_{biomassa}) e del volume di acetato disciolto (V_{acetato}).

$$V_{\text{TC}} = V - (V_{\text{biomassa}} + V_{\text{acetato}})$$

Infine, si calcola il contenuto di sostanza secca.

Contenuto di sostanza secca

Il contenuto di sostanza secca delle alghe indica la percentuale di materiale solido presente rispetto alla massa totale (inclusa l'acqua) delle alghe. È un parametro fondamentale per valutare la qualità e la resa delle biomasse algali, in processi di

produzione di biocombustibili.

$$\text{Peso secco(g/L)} = \text{Peso}_{\text{filtro+alghe}} - \text{Peso}_{\text{filtro}} / \text{Volume campionato(L)}$$

Nel presente caso, il volume campionato è pari a 20 mL (0,020L), pertanto il risultato è espresso in grammi per litro di campione.

Quantificazione dei pigmenti

$$\text{Clorofilla a (ChlA)} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 12,47 (\text{OD}_{665}) - 3,62 (\text{OD}_{649})$$

$$\text{Clorofilla b (ChlB)} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = 25,06 (\text{OD}_{649}) - 6,5 (\text{OD}_{665})$$

$$\text{Carotenoidi totali} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = [1000 (\text{OD}_{480}) - 1,29(\text{ChlA}) - 53,78(\text{ChlB})] / 220$$

$$\text{Pigmenti totali} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = \text{somma dei precedenti.}$$

CAPITOLO III

RISULTATI SPERIMENTALI E ANALISI ECONOMICA DEI SISTEMI BIOELETTROCHIMICI (BES)

3.0 Introduzione

Il presente capitolo riporta e discute in modo sistematico i risultati sperimentali ottenuti durante lo studio integrato dei sistemi bioelettrochimici (BES) e dei fotobioreattori microalgali. L'obiettivo principale è valutare l'efficienza dei processi di riduzione elettrotrofica della CO₂ a acetato, analizzare le dinamiche microbiche e chimico-fisiche che caratterizzano i due catodi testati (Catodo A e Catodo B), e comprendere l'interazione tra la produzione di acetato e la crescita microalgale in condizioni autotrofiche ed eterotrofiche.

I risultati sono presentati attraverso una serie di grafici che illustrano l'andamento dei parametri elettrochimici, biologici e produttivi, tra cui conducibilità elettrica, pH, crescita microbica, produzione di acidi grassi volatili, pressioni parziali dei gas e resa acetogenica. Particolare attenzione è dedicata alla valutazione del ruolo dell'H₂ limitante nel processo acetogenico, al trasferimento di massa della CO₂ e all'influenza del tempo di ritenzione idraulica (HRT) sulla produzione di acetato.

Successivamente, nel capitolo IV si analizzeranno i risultati ottenuti nei fotobioreattori microalgali, con un'analisi dettagliata dell'andamento dei pigmenti fotosintetici, della biomassa, dei tassi di crescita e della transizione metabolica da autotrofia a eterotrofia. Vengono inoltre confrontati i cicli filtrato e non filtrato, evidenziando le differenze in termini di stabilità del sistema, accumulo di biomassa, stress fisiologico e produzione lipidica.

L'insieme dei grafici e delle relative interpretazioni consente di comprendere in modo approfondito le dinamiche bioelettrochimiche e biologiche dei sistemi studiati, mettendo in evidenza i punti di forza, le criticità e le potenzialità applicative dei BES integrati con colture microalgali. I risultati ottenuti costituiscono la base per la successiva discussione, in cui vengono analizzati gli aspetti meccanicistici, energetici ed economici del processo, con particolare riferimento alla produzione di acetato e al potenziale utilizzo della biomassa microalgale per la sintesi di biodiesel.

3.1 Andamento dei parametri elettrochimici e biologici nei due catodi

Per comprendere l'evoluzione del sistema e interpretare correttamente le successive analisi elettrochimiche e metaboliche, il capitolo si apre con l'esame dei principali parametri chimico-fisici monitorati durante l'operatività dei due catodi, ovvero pH, densità ottica (OD₆₀₀) e conducibilità elettrica. Questi parametri non rappresentano cause dirette delle variazioni prestazionali, ma costituiscono indicatori sensibili dello stato del *biofilm*, della stabilità del sistema e delle dinamiche microbiche in atto, fornendo il contesto necessario per interpretare i risultati successivi relativi ai gas prodotti, ai metaboliti secondari e alle prestazioni elettrochimiche.

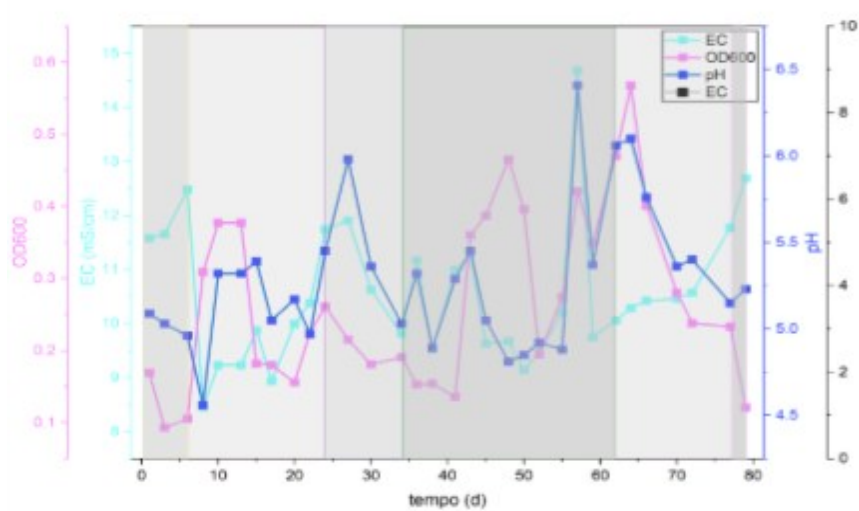


Figura 3.1 - CATODO A.

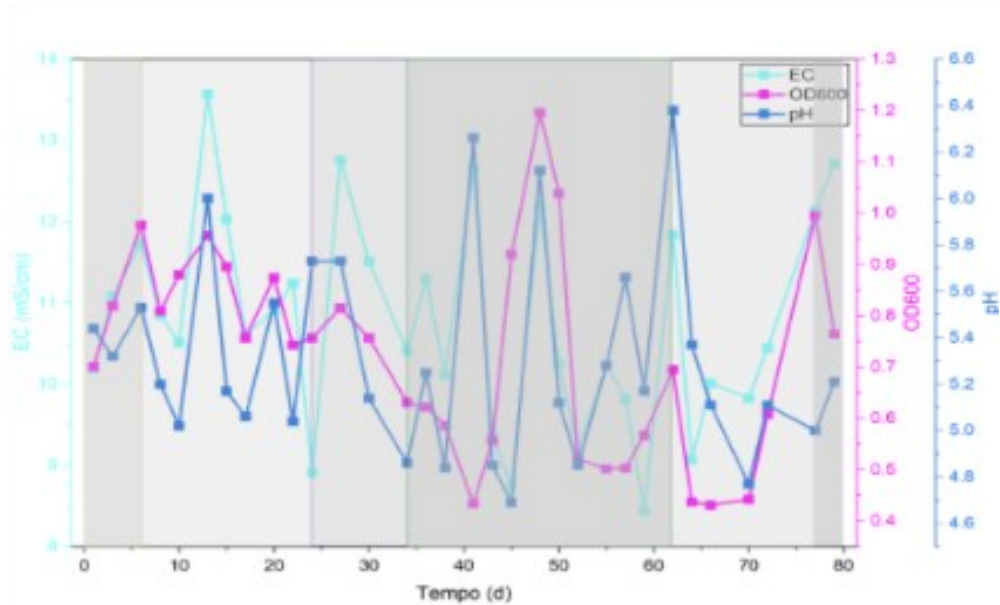


Figura 3.2 - CATODO B.

3.1.1 Conducibilità Elettrica (EC)

L'andamento della conducibilità elettrica (EC) nei due sistemi mostra una progressiva diminuzione nel tempo, indicativa del consumo di ioni in soluzione e del contestuale accumulo di acidi organici prodotti dalle comunità microbiche. Nello specifico, il Catodo A presenta una diminuzione dell'EC più rapida e irregolare, un andamento che suggerisce un metabolismo più aggressivo e meno controllato; tale comportamento risulta coerente con la presenza di fermentazioni laterali e con una maggiore instabilità complessiva del sistema. Al contrario, il Catodo B si distingue per una riduzione dell'EC più graduale e lineare, indice di un metabolismo decisamente più stabile e selettivo. Questa maggiore stabilità del Catodo B suggerisce, in ultima analisi, la presenza di una comunità microbica più orientata verso i *pathway* acetogenici e significativamente meno soggetta a oscillazioni metaboliche.

3.1.2 pH

Il pH diminuisce in entrambi i sistemi, sebbene mostri dinamiche differenti tra i due elettrodi. Nel Catodo A, il pH cala rapidamente fino a raggiungere valori prossimi a 5.5, in perfetta coerenza con un'elevata produzione di acidi volatili e con un'attività fermentativa più intensa. Al contrario, il Catodo B presenta un calo più lento e meno pronunciato, stabilizzandosi su valori compresi tra 5.2 e 5.4. Un profilo di pH più stabile, come quello osservato nel Catodo B, favorisce la crescita dei microrganismi acetogeni e limita la metanogenesi, migliorando sensibilmente la selettività complessiva del processo verso la produzione di acetato.

3.1.3 Crescita Microbica (OD₆₀₀)

L'andamento della densità ottica (OD₆₀₀) evidenzia differenze significative tra i due sistemi in esame. Nello specifico, il Catodo A mostra una crescita microbica più intensa ma marcatamente instabile, caratterizzata da oscillazioni che suggeriscono variazioni rapide sia nella composizione sia nell'attività della biomassa. Al contrario, il Catodo B presenta un incremento più moderato e costante, indice di una comunità microbica più equilibrata e strutturalmente stabile.

Un aspetto rilevante riguarda la relazione tra OD₆₀₀ e il tempo di ritenzione idraulica (HRT). Nei periodi in cui l'HRT è stato aumentato fino a 15 giorni, si osserva un incremento dell'OD₆₀₀: un tempo di ritenzione maggiore favorisce infatti l'accumulo della biomassa, che permane più a lungo nel sistema prima di essere rimossa. Questo fenomeno è particolarmente evidente nel Catodo A,

dove l'eccesso di biomassa può competere con gli acetogeni per nutrienti ed elettroni, riducendo l'efficienza coulombica e favorendo pathway fermentativi indesiderati.

3.1.4 Conclusione della sezione andamento dei parametri elettrochimici e biologici nei due catodi

Le differenze osservate nei parametri chimico-fisici e biologici forniscono quindi il quadro operativo entro cui interpretare la capacità dei due catodi di convertire la CO₂ in acetato. Per valutare in modo quantitativo come tali dinamiche influenzino la resa acetogenica, è necessario analizzare l'andamento della produzione di acetato e il ruolo del tempo di ritenzione idraulica (HRT), che rappresenta uno dei principali fattori operativi in grado di modulare l'efficienza del processo.

3.2 Produzione di Acetato e influenza dell'HRT

In questa sezione vengono presentati i grafici relativi alla produzione di acetato nei due catodi (A e B) e l'effetto del tempo di ritenzione idraulica (HRT) sulla resa acetogenica. L'acetato rappresenta il prodotto principale del processo elettrotrofico e costituisce il parametro più rilevante per valutare l'efficienza del sistema BES.

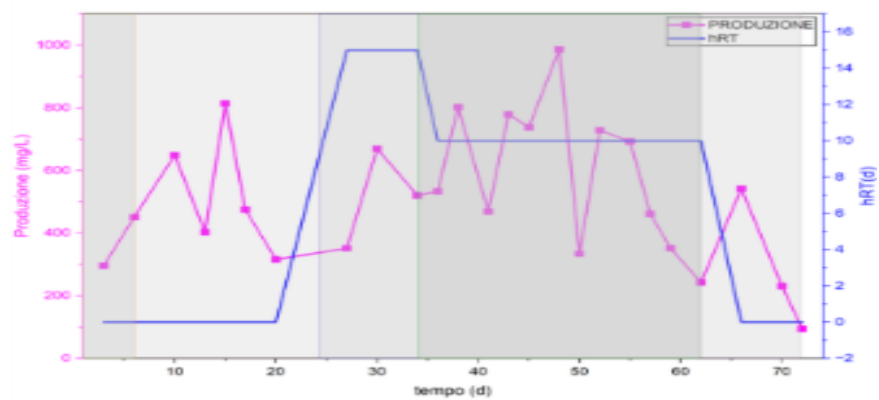


Figura 3.3 - CATODO A

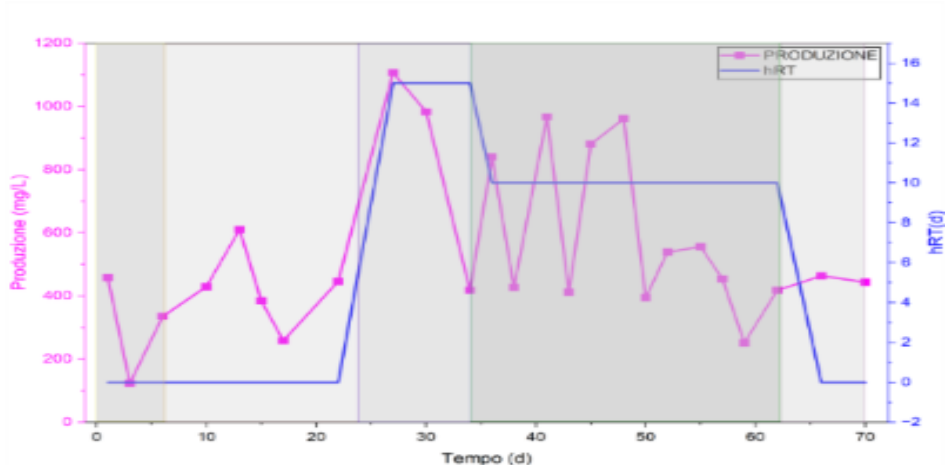


Figura 3.4 - CATODO B.

3.2.1 Produzione di Acetato

Dall'analisi delle figure precedenti emerge una chiara differenza tra i due sistemi in esame. Nel Catodo A, la produzione di acetato si attesta tra 800 e 1000 mg·L⁻¹, mostrando un andamento più irregolare e caratterizzato da oscillazioni che riflettono la maggiore instabilità metabolica già osservata nei parametri di EC, pH e OD₆₀₀. Al contrario, nel Catodo B la produzione raggiunge valori più elevati, compresi tra 1000 e 1200 mg·L⁻¹, con un andamento decisamente più lineare e stabile. Questi risultati confermano la maggiore produttività e selettività del Catodo B, proprietà riconducibili a una comunità microbica più orientata verso i *pathway* acetogenici e significativamente meno soggetta a fermentazioni laterali.

3.2.2 Effetto dell'HRT (tempo di ritenzione idraulica)

L'analisi comparativa mostra che a un tempo di ritenzione idraulica (HRT) pari a 15 giorni la concentrazione di acetato risulta maggiore rispetto a quella ottenuta a HRT pari a 10 giorni, condizione in cui la produzione si rivela inferiore e marcatamente più variabile. Questo comportamento appare perfettamente coerente con la fisiologia degli acetogeni e con la dinamica del *biofilm* catodico. Un HRT più lungo, infatti, non solo aumenta il tempo di contatto tra la CO₂, il *biofilm* e la superficie elettrodica, ma riduce anche il fenomeno del *wash-out* degli acetogeni, favorendone la stabilizzazione. Inoltre, tale condizione permette di stabilizzare il pH, limitando le oscillazioni dovute alla produzione di acidi, e favorisce la conversione completa della CO₂, migliorando sensibilmente la resa acetogenica complessiva.

3.2.3 Conclusione della sezione produzione di acetato e influenza dell’HRT

Nel complesso, l’andamento della produzione di acetato e l’influenza dell’HRT evidenziano una maggiore efficienza e stabilità del Catodo B rispetto al Catodo A, confermando la diversa capacità dei due sistemi di sostenere la via acetogenica. Tuttavia, per comprendere a fondo le ragioni di tali differenze è necessario analizzare il comportamento dei gas prodotti e consumati durante il processo. La gestione dell’idrogeno (H₂), la formazione di metano (CH₄) e il consumo di CO₂ rappresentano infatti i fattori chiave che determinano la selettività del *biofilm* e la resa acetogenica complessiva. Per questo motivo, nella sezione successiva vengono esaminati in dettaglio i profili dei gas nei due catodi, così da chiarire il ruolo dell’H₂ come potenziale prodotto limitante e l’impatto della metanogenesi sulla performance del sistema. Le condizioni operative applicate durante le diverse fasi sperimentali sono sintetizzate nella Tabella 3.1.

Tabella 3.1 - La tabella riassume le condizioni operative applicate durante le diverse fasi sperimentali, includendo densità di corrente, modalità di alimentazione della CO₂, durata dei cicli e regime di funzionamento del reattore.

densità di corrente elettrica ($A \cdot m^{-2}$)	CO ₂	Durata	Regime
12	10 mL·min ⁻¹ per 1,5h ogni 10,5 h	Dall’1/10 al 6/10	Batch
12	10 mL·min ⁻¹ per 1,5h una volta al giorno	Dal 6/10 al 24/10	Batch
12	10 mL·min ⁻¹ per 1 h una volta al giorno	Dal 24/10 al 3/11	semi-continuo
12	10 mL·min ⁻¹ per 30 min due volte al giorno	Dal 3/11 al 18/12	semi-continuo

3.3 Analisi dei gas prodotti: H₂, CH₄ e CO₂ nei due catodi

In questa sezione vengono presentati le figure relative all’andamento dei gas prodotti nei due reattori (Catodo A e Catodo B). L’analisi si concentra con particolare attenzione sull’idrogeno (H₂), inteso come gas chiave per l’acetogenesi ma potenzialmente limitante, sul metano (CH₄), la cui presenza rappresenta un prodotto indesiderato e un chiaro indice di attività metanogenica, e infine sull’anidride carbonica (CO₂), intesa come gas consumato e convertito in acetato.

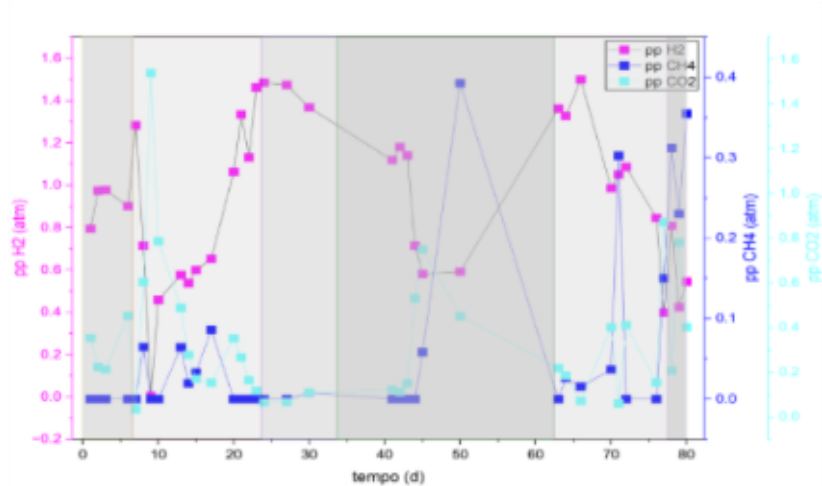


Figura 3.5 – CATODO A.

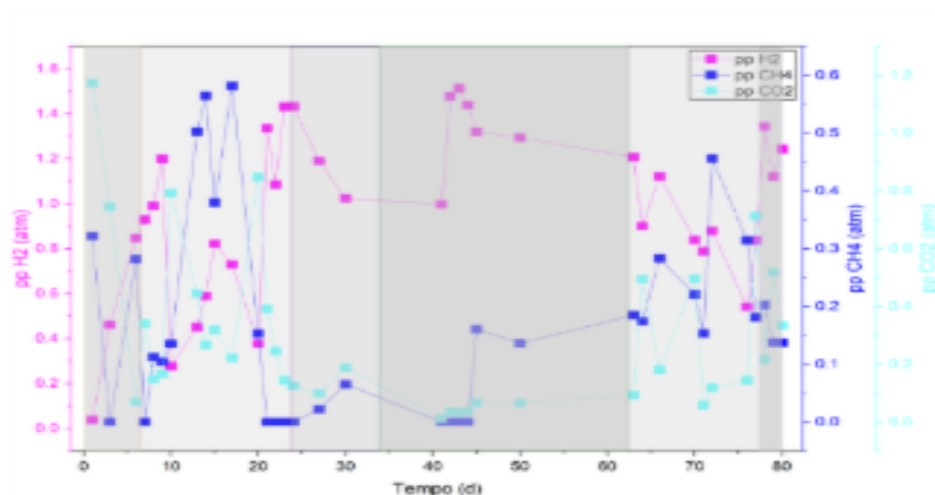


Figura 3.6 - CATODO B.

3.3.1 Idrogeno (H₂)

L'idrogeno rappresenta il donatore di elettroni fondamentale per la riduzione dell'anidride carbonica (CO₂) attraverso la via metabolica di *Wood–Ljungdahl*. Dall'analisi dei grafici emergono differenze significative tra i due sistemi. Nello specifico, il Catodo A presenta valori di H₂ più elevati ma marcatamente instabili, caratterizzati da picchi che indicano un accumulo non utilizzato da parte degli acetogeni, segno di un *biofilm* meno efficiente nel trasferimento elettronico. Al contrario, il Catodo B mostra valori di H₂ leggermente inferiori ma decisamente più costanti, indice di un utilizzo più efficiente da parte delle comunità acetogeniche, con un minore accumulo e una maggiore conversione finale in acetato.

Poiché l'H₂ si configura come il fattore limitante dell'intero processo acetogenico, la maggiore stabilità del *biofilm* nel Catodo B consente di utilizzare più rapidamente l'idrogeno prodotto, riducendo la competizione cinetica con i microrganismi metanogeni e mantenendo una pressione parziale più stabile nel sistema. Il Catodo A, invece, accumula H₂ sia perché gli acetogeni non riescono a consumarlo con sufficiente rapidità, sia a causa di una comunità microbica meno selettiva che devia parte dell'idrogeno stesso verso la via metanogenica.

3.3.2 Metano (CH₄)

Il metano (CH₄) rappresenta un prodotto indesiderato nel processo in esame, in quanto la sua sintesi indica la presenza di comunità metanogene che competono direttamente con gli acetogeni per l'utilizzo dell'H₂. Dall'analisi delle figure, il Catodo A presenta una produzione di CH₄ significativamente più elevata, caratterizzata da picchi che coincidono temporalmente con le oscillazioni di pH e OD₆₀₀, a testimonianza di una metanogenesi attiva e non controllata. Al contrario, il Catodo B mostra valori di CH₄ decisamente più bassi e stabili nel tempo, indice del fatto che il sistema ospita una comunità microbica più selettiva e meno soggetta allo sviluppo di *pathway* competitori.

Questa maggiore produzione di metano riscontrata nel Catodo A conferma, in ultima analisi, la dispersione degli elettroni verso *pathway* metabolici non desiderati, la conseguente riduzione dell'efficienza coulombica e una minore selettività complessiva verso l'acetato. Il Catodo B, invece, riesce a limitare efficacemente il fenomeno della metanogenesi grazie alla combinazione di un profilo di pH più stabile, dello sviluppo di un *biofilm* più maturo e di una migliore gestione complessiva dell'idrogeno.

3.3.3 Anidride Carbonica (CO₂)

L'anidride carbonica (CO₂) si configura come il substrato principale del processo acetogenico. Dall'analisi dei grafici emerge che il Catodo A mostra una riduzione della CO₂ meno marcata, un andamento che risulta coerente con la minore conversione in acetato riscontrata in questo sistema. Al contrario, il Catodo B presenta una diminuzione significativamente più evidente e progressiva della CO₂, ponendosi come un chiaro segno di una maggiore e più efficiente attività acetogenica complessiva.

3.3.4 Confronto tra H₂ teorico, H₂ effettivo e CO₂ consumata

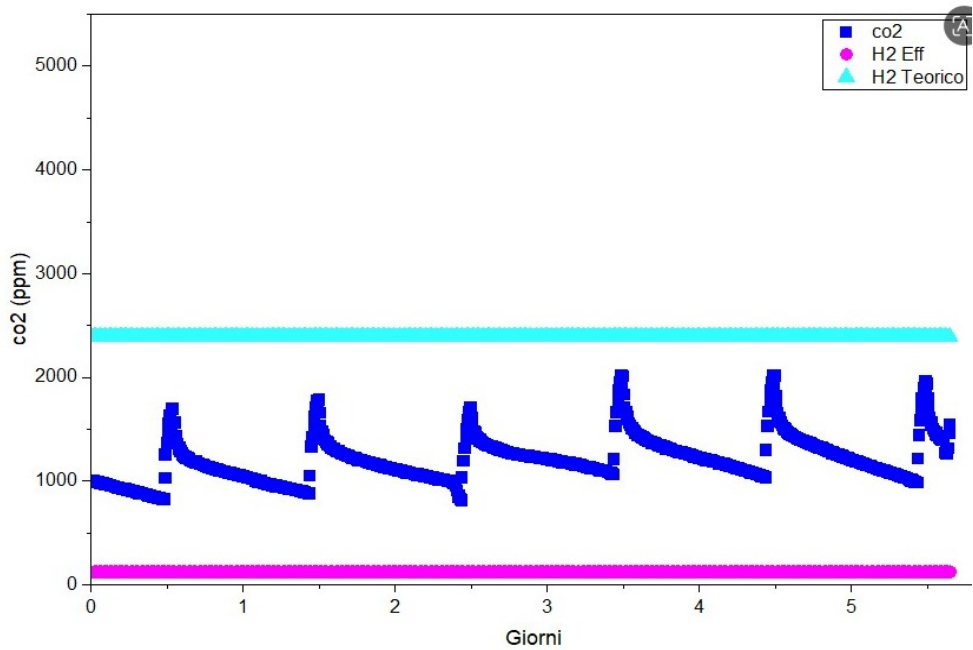


Figura 3.7 - Relazione tra H₂ effettivo, teorico e consumo di CO₂.

La figura 3.7 mette in relazione la produzione teorica di H₂, la produzione effettivamente misurata e il consumo di CO₂ e fornisce un'informazione chiave sul funzionamento del catodo A. La produzione teorica di H₂ è calcolata dall'acetogenesi inversa tramite il rapporto stechiometrico (H₂/CO₂).

I dati sperimentali mettono in evidenza due aspetti principali. In primo luogo, la produzione di H₂ effettiva risulta sistematicamente inferiore rispetto al valore teorico calcolato. In secondo luogo, la CO₂ introdotta nel sistema viene consumata quasi completamente: dopo l'aggiunta fino a saturazione, la concentrazione nel gas di testa ritorna infatti a circa 600 ppm, valore che corrisponde alla concentrazione iniziale prima dell'immissione di CO₂. Questo comportamento indica che la CO₂ aggiunta viene interamente utilizzata durante il processo e che l'immissione controllata serve unicamente a regolare con precisione l'apporto di carbonio.

La CO₂ raggiunge una saturazione pari a 24,5 mol·L⁻¹·d⁻¹, garantendo una disponibilità costante nel mezzo liquido; il consumo misurato, pari a 20,37 ± 10,04 mol·L⁻¹·d⁻¹, conferma che la CO₂ viene effettivamente consumata fino all'esaurimento.

Nel complesso, questi risultati dimostrano che l'anidride carbonica non rappresenta un fattore limitante e che il trasferimento di massa è altamente efficiente. Di conseguenza, la disponibilità di carbonio non ostacola la via acetogenica.

Il confronto tra H₂ teorico ed effettivo mostra che l'H₂ non viene prodotto in quantità sufficiente.

3.3.5 Conclusione della sezione GAS

Il confronto tra H_2 teorico, H_2 effettivo e CO_2 consumata, insieme all'analisi delle pressioni parziali dei gas prodotti, conferma in modo chiaro le differenze operative tra i due catodi. La CO_2 , grazie alla sua elevata saturazione ($24.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e al consumo quasi completo ($20.37 \pm 10.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), non rappresenta un fattore limitante del processo. Al contrario, la discrepanza tra H_2 teorico ed effettivo dimostra che l'idrogeno è il vero prodotto limitante, condizionando direttamente la selettività e l'efficienza del sistema.

In questo contesto, il Catodo B risulta più efficiente e selettivo rispetto al Catodo A. Tale superiorità si deve a un migliore utilizzo dell' H_2 , a una minore produzione di CH_4 e a una maggiore conversione della CO_2 in acetato. Al contrario, il Catodo A mostra prestazioni inferiori a causa dell'accumulo di H_2 non utilizzato, di una tendenza a favorire la metanogenesi e di una minore capacità di convertire la CO_2 in acetato.

La limitazione dell'idrogeno e la diversa gestione dei gas nei due catodi non influenzano soltanto la selettività del processo, ma determinano anche la comparsa di *pathway* metabolici alternativi. Per comprendere come questa limitazione si traduca in una deviazione degli elettroni dalla via acetogenica, è necessario analizzare la formazione di metaboliti secondari, in particolare acido butirrico e acido propionico, che costituiscono indicatori sensibili della dispersione metabolica e della competizione tra comunità microbiche.

Per questo motivo, nella sezione successiva vengono analizzati gli AGV non acetici, così da chiarire il ruolo della competizione metabolica nella resa complessiva dei due catodi e comprendere come tali deviazioni influenzino i parametri prestazionali osservati.

3.4 Produzione di Acido Butirrico e Acido Propionico

In questa sezione vengono analizzati i grafici relativi alla produzione di acido butirrico e acido propionico nei due catodi. Questi metaboliti rappresentano prodotti secondari indesiderati, poiché indicano deviazioni dal *pathway* acetogenico e competizione per elettroni e substrati.

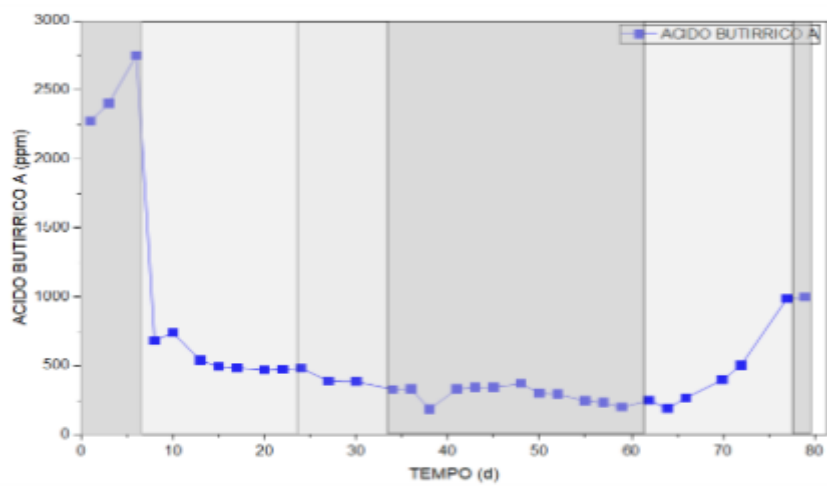


Figura 3.8 - CATODO A.

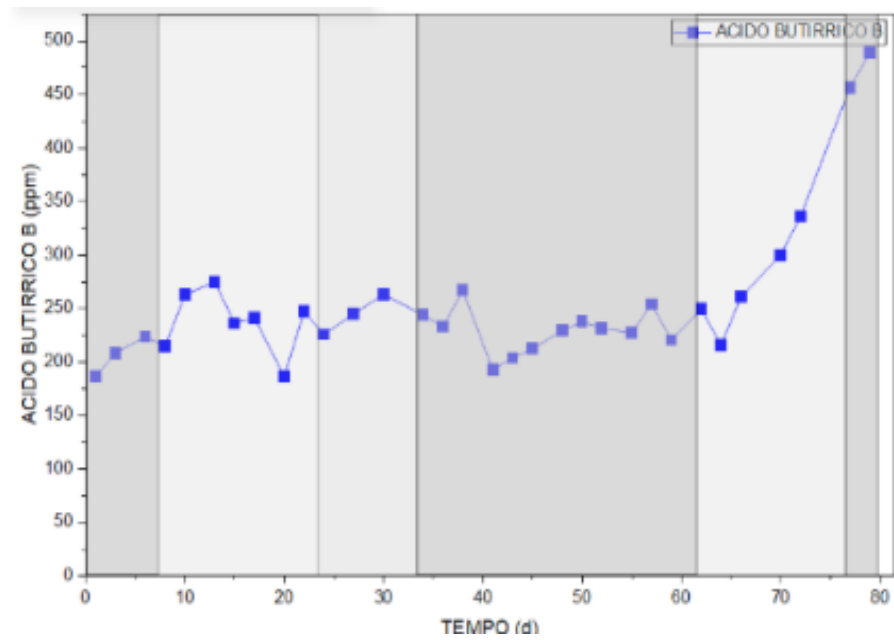


Figura 3.9 - CATODO B.

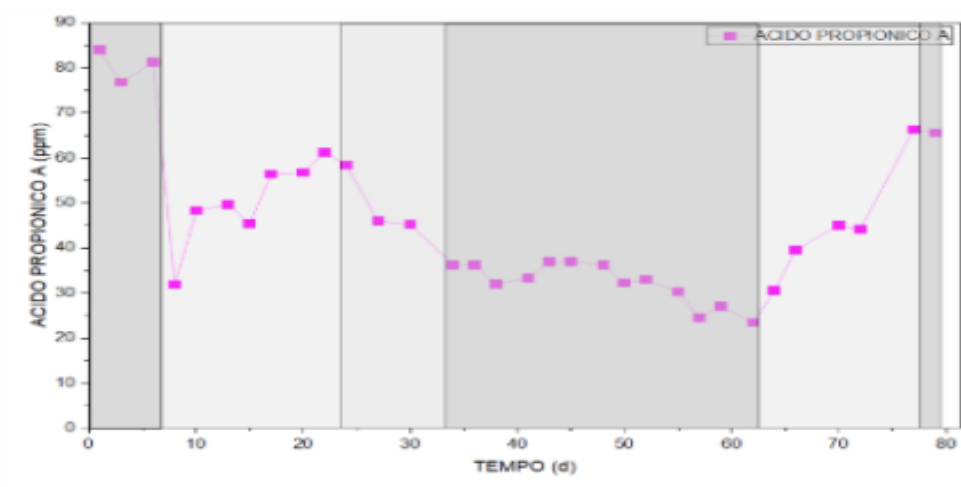


Figura 3.10 - CATODO A.

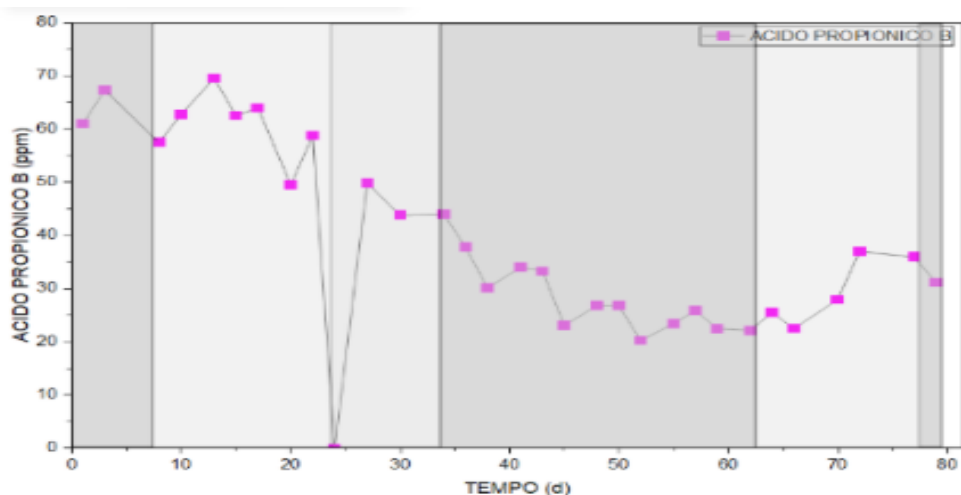


Figura. 3.11 - CATODO B.

3.4.1 Produzione Acido Butirrico

L'acido butirrico rappresenta un indicatore tipico di *pathway* fermentativi non acetogenici. Dall'analisi dei grafici emerge che il Catodo A presenta una produzione di acido butirrico maggiore e più variabile (pari a 2500 ppm), un comportamento coerente con l'instabilità del *biofilm*, le oscillazioni di pH e la competizione cinetica tra batteri fermentativi e acetogeni, che determina una dispersione degli elettroni verso metaboliti indesiderati. Al contrario, il Catodo B mostra una produzione molto più limitata e stabile, vicina ai 450 ppm. Questo andamento suggerisce una maggiore selettività del *biofilm*, una minore attività fermentativa complessiva e un migliore controllo del microambiente catodico. In definitiva, la presenza marcata di acido butirrico nel Catodo A tradotta in una minore efficienza coulombica analizzata successivamente, poiché parte degli elettroni viene inevitabilmente deviata verso tali fermentazioni laterali.

3.4.2 Produzione Acido Propionico

L'acido propionico rappresenta un ulteriore metabolita di natura fermentativa, la cui sintesi è spesso associata a condizioni di stress cellulare o a sbilanciamenti nel rapporto stechiometrico tra H_2 e CO_2 .

Dall'analisi comparativa delle figure emerge che il Catodo A mostra una produzione di acido propionico pari a circa 80 ppm; sebbene tale quantitativo risulti complessivamente limitato, esso si attesta su livelli superiori rispetto a quelli registrati nel Catodo B, dove si osservano invece valori quasi trascurabili, prossimi ai 70 ppm.

Sotto il profilo metabolico, la rilevazione di acido propionico nel sistema del Catodo A evidenzia l'instaurarsi di una competizione cinetica per l'utilizzo dell'idrogeno e la presenza di *pathway* fermentativi attivi, i quali riducono inevitabilmente la selettività complessiva del processo verso l'acetato. Al contrario, la quasi totale assenza di questo metabolita secondario nel Catodo B funge da ulteriore conferma della maggiore stabilità strutturale e della spiccata selettività che caratterizzano l'azione del *biofilm* elettroattivo in tale configurazione.

3.4.3 Conclusione della sessione AGV

La produzione di acidi grassi volatili (AGV) osservata nel sistema di elettrosintesi microbica (MES) evidenzia una distinzione netta tra i percorsi metabolici che conducono alla formazione di acido butirrico e acido propionico. I dati sperimentali mostrano che la generazione di acido butirrico è più ricorrente e metabolicamente favorita rispetto alla produzione di acido propionico, in accordo con quanto riportato in letteratura per sistemi bioelettrochimici operanti in condizioni simili (*Jourdin et al., 2015; Nevin et al., 2010*).

La formazione di acido butirrico avviene principalmente tramite allungamento della catena carboniosa (chain elongation), un processo in cui l'acido acetico viene convertito in composti a catena più lunga attraverso vie riduttive dipendenti dall'attività di microrganismi elettrotrofi o comunità microbiche miste. Tale meccanismo è ben documentato nei sistemi MES, dove l'acetato rappresenta l'intermedio principale derivante dalla riduzione della CO₂ (*Drake, 1994; Jourdin et al., 2015*). La disponibilità costante di acetato nel reattore e le condizioni redox favorevoli contribuiscono a rendere l'allungamento della catena un percorso metabolicamente efficiente, spiegando la maggiore presenza di butirrato nei profili AGV.

Al contrario, la produzione di acido propionico richiede l'attivazione di vie metaboliche più specifiche e meno diffuse nei consorzi microbici tipici dei sistemi di elettrosintesi. Tra queste, la via del succinato e la via dell'acrilato rappresentano i due principali percorsi biochimici, entrambi caratterizzati da rese inferiori e da una minore compatibilità con le condizioni operative dei sistemi MES (*Rozendal et al., 2008; Nevin et al., 2010*). La limitata disponibilità di intermedi necessari (come il succinato) e la competizione metabolica con vie più energeticamente favorevoli contribuiscono a ridurre la formazione di propionato.

Nel complesso, la sessione AGV conferma che, nelle condizioni sperimentali adottate, il sistema microbico tende a privilegiare percorsi orientati verso la produzione di acidi a catena più lunga, in particolare l'acido butirrico, mentre la formazione di acido propionico rimane marginale. Questo comportamento è coerente con i modelli metabolici descritti per i sistemi MES e con le osservazioni sperimentali riportate in letteratura (*Drake, 1994; Jourdin et al., 2015; Rozendal et al., 2008*), fornendo una chiave interpretativa robusta per l'evoluzione dei profili metabolici osservati nel reattore.

3.5 Efficienza Coulombica, consumo energetico e produttività dei due catodi

In questa sezione vengono presentate le figure relative all'efficienza coulombica (CE), al consumo energetico specifico (EE) e alla produzione di acetato normalizzata alla superficie elettrodica per i due sistemi catodici in esame (A e B). Tali parametri rappresentano indicatori fondamentali per valutare quantitativamente la qualità del processo bioelettrochimico, la selettività nel trasferimento degli elettroni e la complessiva sostenibilità energetica del sistema.

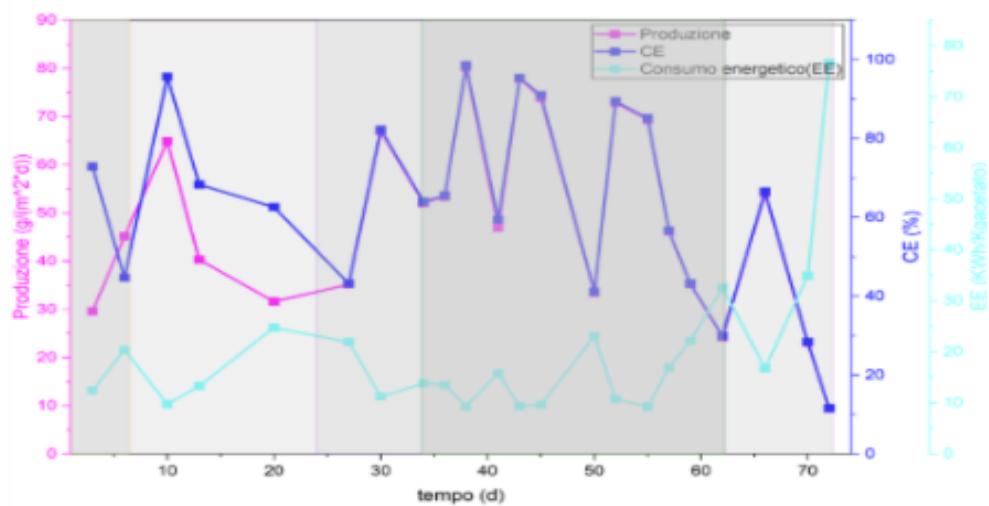


Figura 3.12- CATODO A.

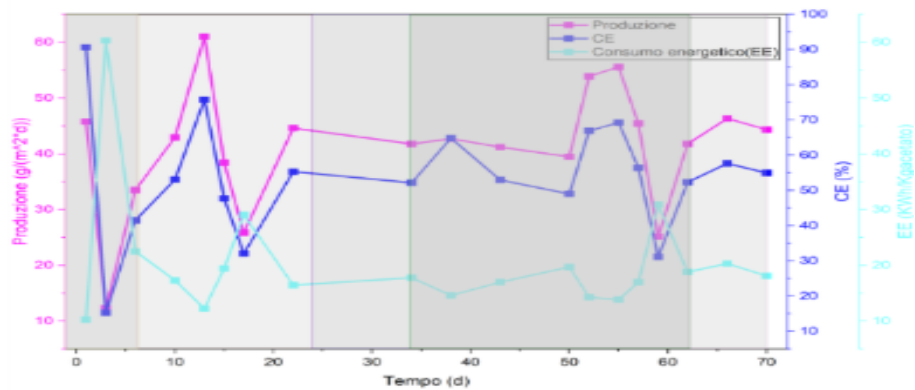


Figura 3.13 – CATODO B.

3.5.1 Efficienza Coulombica (CE)

L'efficienza coulombica (CE) rappresenta la frazione di elettroni immessi nel sistema che viene effettivamente convertita nel prodotto desiderato, ovvero l'acetato. Dall'analisi dei grafici emergono differenze significative tra i due sistemi in esame. Nel Catodo A, la CE si attesta su valori compresi tra il 30% e il 60%, mostrando oscillazioni marcate; questo andamento riflette la presenza di *pathway* metabolici alternativi, quali le fermentazioni laterali e la metanogenesi, che

sottraggono elettroni al processo acetogenico. Al contrario, il Catodo B presenta una CE più elevata, compresa tra il 40% e il 70%, caratterizzata da un andamento decisamente più stabile. Tale regolarità indica lo sviluppo di una comunità microbica più selettiva e un migliore controllo dei processi competitori. Di conseguenza, il Catodo B mostra una più efficiente gestione degli elettroni, con una quota maggiore destinata alla sintesi di acetato, laddove il Catodo A tende a disperdere la carica elettrica verso metaboliti indesiderati, come l'acido butirrico, riducendo l'efficienza complessiva del sistema.

3.5.2 Consumo energetico specifico (EE)

Il consumo energetico specifico (EE, espresso in $\text{kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$ di acetato) si configura come un parametro chiave per valutare la sostenibilità economica e operativa del processo.

L'andamento del consumo energetico specifico (EE, linea azzurra) conferma ulteriormente le differenze osservate tra i due catodi. Nel catodo A, l'EE presenta un comportamento più irregolare, con valori medi intorno a $30 \text{ kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$ di acido acetico prodotto. Inoltre, si osserva una relazione inversa con l'efficienza coulombica: quando la CE raggiunge i valori più elevati, il consumo energetico tende a ridursi, indicando una maggiore efficienza nella conversione dell'energia elettrica in prodotto.

Il maggiore fabbisogno energetico del catodo A può essere attribuito sia a una maggiore resistenza interna del sistema, che aumenta le perdite ohmiche, sia alla presenza di fermentazioni laterali e fenomeni di metanogenesi che sottraggono elettroni alla produzione di acetato. Di conseguenza, risulta necessario fornire una quantità maggiore di energia per ottenere la stessa quantità di prodotto.

Nel catodo B, il consumo energetico specifico è risultato generalmente più contenuto e stabile, attestandosi intorno a $20 \text{ kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$ di acido acetico prodotto. Questo comportamento è coerente con i più elevati valori di efficienza coulombica osservati e indica una più efficace conversione dell'energia elettrica in prodotto target. La migliore canalizzazione degli elettroni verso la sintesi dell'acetato consente infatti di minimizzare le perdite energetiche e di incrementare l'efficienza complessiva del processo bioelettrochimico. Complessivamente, il catodo B si conferma il sistema più performante sia dal punto di vista della resa elettronica sia dal punto di vista energetico.

3.5.3 Produttività normalizzata ($mg_{acetato} \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$)

La produttività normalizzata (linea magenta) rappresenta un indicatore diretto della capacità del sistema di convertire la CO_2 in acido acetico e costituisce quindi un parametro chiave per valutare le prestazioni del biocatodo. Dall'analisi dei risultati emerge che il catodo A ha raggiunto valori di produttività compresi indicativamente tra 40 e 60 $g \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$, mentre il catodo B ha mostrato valori più elevati, nell'intervallo 60–80 $g \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$. Tali risultati evidenziano una maggiore capacità del catodo B di sostenere la sintesi di acetato a partire dalla CO_2 .

La maggiore produttività osservata nel catodo B suggerisce una più efficiente interazione tra il biofilm elettroattivo e la superficie elettrodica, favorendo il trasferimento degli elettroni verso il metabolismo acetogenico. Al contrario, la minore produttività del catodo A può essere attribuita alla competizione con pathway metabolici alternativi, quali la produzione di acido butirrico e possibili fenomeni di metanogenesi, che determinano una parziale deviazione degli elettroni e del carbonio dalla sintesi dell'acetato. L'andamento osservato risulta coerente con i valori più elevati di efficienza coulombica e con il minore consumo energetico specifico riscontrati nel catodo B.

3.6 Conclusioni BES

Poiché i due sistemi BES erano caratterizzati dalla medesima configurazione reattoristica e dagli stessi materiali elettrodici, le differenze osservate non possono essere attribuite a fattori strutturali, bensì all'evoluzione biologica del biofilm durante l'esercizio. I risultati ottenuti indicano che il catodo B ha sviluppato una comunità microbica più stabile e selettiva verso il metabolismo acetogenico. Tale condizione è stata associata a una gestione più efficiente dell'idrogeno, identificato come intermedio chiave del processo, a una ridotta accumulazione di H_2 nel comparto catodico e a una maggiore conversione degli elettroni verso la sintesi dell'acetato. Al contrario, il catodo A ha mostrato una maggiore instabilità metabolica, evidenziata dalle oscillazioni del pH e dall'accumulo di idrogeno non consumato. Questi fenomeni indicano una minore capacità della comunità microbica di utilizzare in modo efficiente gli equivalenti riducenti disponibili e favoriscono l'attivazione di pathway metabolici alternativi rispetto alla via acetogenica di Wood-Ljungdahl. Di conseguenza, una parte del carbonio e degli elettroni viene indirizzata verso la formazione di composti organici indesiderati, quali acido butirrico e acido propionico, oltre che verso processi di metanogenesi. La comparsa di tali metaboliti secondari riduce la selettività del processo nei confronti dell'acetato e determina una diminuzione dell'efficienza complessiva del sistema.

Queste evidenze spiegano coerentemente le differenze osservate nelle prestazioni bioelettrochimiche dei due catodi. La maggiore stabilità del biofilm nel catodo B si riflette infatti in una produttività normalizzata più elevata (60–80 $g \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$), in valori di efficienza coulombica generalmente compresi tra il 40 e il 70% e in un minore consumo energetico specifico, pari a circa

20 kWh · kg⁻¹ di acetato prodotto. Al contrario, l'instabilità del biofilm nel catodo A, associata all'accumulo di H₂, alle oscillazioni del pH e alla formazione di metaboliti secondari, comporta una maggiore dispersione degli elettroni verso processi competitivi, con conseguente riduzione della produttività (40–60 g · m⁻² · d⁻¹), dell'efficienza coulombica (30–60%) e un aumento del consumo energetico specifico fino a circa 30 kWh kg⁻¹ di acetato prodotto.

Le differenze osservate tra i due catodi evidenziano come una maggiore selettività metabolica possa incrementare simultaneamente la produttività dell'acetato, l'efficienza coulombica e l'efficienza energetica del processo. Tali parametri assumono un ruolo fondamentale non solo nella valutazione tecnica del sistema BES, ma anche nelle successive analisi economiche della produzione di acetato. Inoltre, la disponibilità di un flusso di acetato ottenuto mediante conversione elettrobiologica della CO₂ costituisce il presupposto per valutarne l'impiego come fonte di carbonio organico nelle colture microalgali, tema approfondito nel capitolo successivo.

3.7 Analisi economica della produzione di acetato nei sistemi BES

Dopo aver delineato nei paragrafi precedenti le differenze operative tra i due catodi in termini di stabilità del biofilm, selettività metabolica ed efficienza coulombica, questa sezione si propone di tradurre tali evidenze in parametri economici concreti. Il costo energetico rappresenta infatti il principale fattore limitante per la transizione dei sistemi bioelettrochimici (BES) dalla scala di laboratorio a quella industriale. L'analisi economica qui presentata si basa sui valori sperimentali di consumo energetico specifico (EE), produttività normalizzata e resa coulombica dei due catodi.

Attraverso l'analisi che segue, verranno valutati i costi dell'energia elettrica applicati ai consumi reali registrati, lo sfruttamento della superficie elettrodica e i benefici derivanti dall'integrazione del sistema in contesti di economia circolare. Il punto di partenza di tale indagine è costituito da un inquadramento economico complessivo del sistema.

3.7.1 Valutazione economica generale del processo bioelettrochimico

L'analisi economica rappresenta un elemento essenziale per valutare la reale sostenibilità dei sistemi bioelettrochimici (BES) applicati alla produzione di acetato. Sebbene tali sistemi offrano vantaggi ambientali significativi, tra cui l'utilizzo diretto di CO₂ come substrato, l'operatività a temperatura ambiente e la possibilità di integrazione con fonti rinnovabili, il costo energetico rimane il principale fattore limitante per una loro applicazione su scala industriale.

I dati sperimentali ottenuti nei catodi A e B mostrano differenze sostanziali in termini di consumo energetico specifico (EE), efficienza coulombica (CE) e resa produttiva. Tali differenze si riflettono direttamente sul costo finale dell'acetato prodotto, rendendo necessaria una valutazione comparativa tra i due sistemi.

3.7.2 Analisi economica e consumo energetico specifico dell'acetato

Dall'elaborazione dei dati sperimentali emerge che il consumo energetico specifico (EE) si attesta a $30 \text{ kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$ di acetato per il Catodo A, mentre si riduce a $20 \text{ kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$ di acetato per il Catodo B. Tali valori risultano peraltro pienamente coerenti con i dati di letteratura, stimati generalmente in un intervallo compreso tra 30 e $120 \text{ kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$. Al fine di valutare la sostenibilità economica preliminare del processo, è stata condotta un'analisi basata sul costo dell'energia elettrica prendendo in esame tre differenti scenari di mercato: uno scenario ottimistico con una tariffa di $0,12 \text{ euro} \cdot \text{kWh}^{-1}$, uno scenario realistico a $0,20 \text{ euro} \cdot \text{kWh}^{-1}$ e, infine, uno scenario pessimistico ipotizzato a $0,30 \text{ euro} \cdot \text{kWh}^{-1}$. Il calcolo della spesa energetica imputabile alla produzione di acetato è stato eseguito applicando la relazione generale:

$$\text{Costo acetato} = \text{EE} \cdot \text{Costo energia}$$

I risultati del modello evidenziano costi di produzione oscillanti tra $3,6$ e $9 \text{ euro} \cdot \text{kg}^{-1}$ per il Catodo A, a fronte di un intervallo più contenuto e cinematicamente competitivo, pari a $2,4$ e $6 \text{ euro} \cdot \text{kg}^{-1}$, per il Catodo B. Alla luce di queste stime, il Catodo B si dimostra economicamente più vantaggioso, consentendo di contrarre il costo economico complessivo di una quota percentuale stimabile tra il 30% e il 40% rispetto al Catodo A. Sotto il profilo operativo, tale beneficio è strettamente legato alla superiore efficienza coulombica del sistema e alla minore dispersione metabolica verso vie fermentative concorrenziali non desiderate, come la produzione di acido butirrico. In ultima analisi, la maggiore selettività del Catodo B verso l'acetato permette di contrarre il fabbisogno energetico per unità di prodotto, migliorando in modo significativo la sostenibilità e la fattibilità di un futuro scale-up industriale dell'intero processo bioelettrochimico.

3.7.3 Confronto con i costi industriali dell'acetato

Il prezzo dell'acetato prodotto industrialmente tramite processi chimici convenzionali, come la carbonilazione del metanolo, si colloca tipicamente tra $0,8$ e $1,5 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$, evidenziando valori nettamente inferiori a quelli attualmente ottenuti nei sistemi bioelettrochimici (BES). Questo confronto mette in luce come, allo stato attuale, la produzione bioelettrochimica non risulti competitiva dal punto di vista economico se considerata esclusivamente come un processo *stand-alone*.

Tuttavia, tale comparazione diretta rischia di essere parziale, poiché i BES offrono intrinsecamente una serie di benefici ambientali e sistemici del tutto assenti nelle sintesi chimiche tradizionali. La tecnologia bioelettrochimica, infatti, si basa sull'utilizzo dell'anidride carbonica (CO₂) come substrato carbonioso di partenza e si caratterizza per un'operatività a basse temperature e pressioni. Inoltre, questi sistemi presentano la preziosa possibilità di essere alimentati mediante fonti di energia rinnovabile, abilitando così la produzione di acetato in un contesto pienamente *carbon-negative*. L'insieme di questi elementi rende i BES una soluzione di straordinario interesse, in particolar modo se inseriti in applicazioni industriali integrate e in scenari complessi di economia circolare.

3.7.4 Costo per m² di elettrodo

Partendo dai dati sperimentali relativi alla produttività normalizzata alla superficie elettrodica, pari a 40–60 g·m⁻²·d⁻¹ per il Catodo A e a 60–80 g·m⁻²·d⁻¹ per il Catodo B, è possibile proiettare la produzione su base mensile. Assumendo un periodo di 30 giorni, si ottiene per il Catodo A una resa areale compresa tra 1,2 e 1,8 kg·m⁻²·mese⁻¹, mentre per il Catodo B l'intervallo risulta più elevato, pari a 1,8–2,4 kg·m⁻²·mese⁻¹.

Al fine di contestualizzare l'impatto economico di queste rese all'interno dello scenario intermedio (realistico), caratterizzato da un costo dell'energia elettrica pari a 0,20 €·kWh⁻¹ e considerando i consumi energetici medi di ciascun sistema (pari a 30 kWh·kg⁻¹ per il Catodo A e 20 kWh·kg⁻¹ per il Catodo B), la spesa mensile per unità di superficie elettrodica è stata calcolata come segue, assumendo le rese massime:

$$\text{Catodo A: } 30 \text{ kWh} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 1,8 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{mese}^{-1} \cdot 0,20 \text{ €} \cdot \text{kWh}^{-1} = 10,8 \text{ €} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{mese}^{-1}$$

$$\text{Catodo B: } 20 \text{ kWh} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 2,4 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{mese}^{-1} \cdot 0,20 \text{ €} \cdot \text{kWh}^{-1} = 9,6 \text{ €} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{mese}^{-1}$$

L'analisi di questi risultati evidenzia come a parità di superficie il Catodo B garantisca una maggiore produttività di acetato e di conseguenza un costo specifico per unità di prodotto inferiore rispetto al Catodo A, confermandosi la configurazione più efficiente.

3.7.5 Integrazione con processi circolari

Il sistema integrato BES–fotobioreattore mostra il potenziale di valorizzare simultaneamente carbonio, nutrienti e biomassa nell'ambito di una piattaforma circolare. Il processo favorisce il recupero e la valorizzazione della CO₂ attraverso la duplice azione della conversione bioelettrochimica in acetato e della successiva fissazione microalgale. Inoltre, presenta un

potenziale interesse in termini di *carbon credit*, qualora la rimozione di CO₂ venisse certificata secondo i protocolli industriali di monitoraggio, rendicontazione e verifica (MRV).

Sulla base delle condizioni operative testate, l'unità BES, caratterizzata da un volume della camera catodica pari a 1 L e da un tasso di consumo biologico di 24,5 mol·L⁻¹·d⁻¹, garantisce un sequestro diretto di circa 0,393 t CO₂e· anno⁻¹. A questo contributo si somma la cattura teorica stimata per il fotobioreattore da 3 L; assumendo una produttività biologica standard di 1,0 g·L⁻¹·d⁻¹ e un consumo stechiometrico di 1,83 $g_{CO_2} \cdot g_{biomassa}^{-1}$, il secondo stadio contribuisce con un ulteriore sequestro teorico di circa 0,002 tCO₂e· anno⁻¹.

Nel complesso, l'intero sistema integrato su scala pilota permette di rimuovere circa 0,395 tCO₂e· anno⁻¹. Questo valore di sequestro combinato, qualora validato e opportunamente scalato in contesti industriali a pieno regime, potrebbe tradursi in un volume equivalente di crediti di carbonio certificabili sul mercato (un credito per ogni tonnellata di CO₂ equivalente rimossa), abbattendo drasticamente i costi operativi e consolidando la sostenibilità economica complessiva della bioraffineria.

Parallelamente, l'integrazione con il fotobioreattore consente un efficace recupero dei nutrienti, in particolare azoto e fosforo, spesso presenti in concentrazioni significative nelle acque reflue. L'utilizzo di tali reflui come mezzo di coltura permette alla microalga di assimilare direttamente nitrati, ammonio e fosfati, trasformando un potenziale inquinante in risorsa biologica. L'azoto viene incorporato nelle proteine, negli acidi nucleici e nei pigmenti fotosintetici, mentre il fosforo viene convertito in ATP, fosfolipidi e componenti strutturali essenziali. Questo duplice processo di depurazione e valorizzazione riduce il carico nutritivo residuo, limita il rischio di eutrofizzazione e abbassa i costi operativi legati all'aggiunta di nutrienti purificati. Inoltre, la biomassa ottenuta rappresenta una materia prima potenzialmente idonea per ulteriori applicazioni biotecnologiche, inclusa la sintesi lipidica finalizzata alla produzione di biocombustibili avanzati.

Nel complesso, l'integrazione tra BES e fotobioreattore non solo consente di chiudere il ciclo del carbonio, ma trasforma la CO₂ e i nutrienti presenti nei reflui in prodotti ad alto valore aggiunto, delineando un modello di bioraffineria circolare capace di generare benefici ambientali, energetici.

3.7.6 Conclusione Economica

Il Catodo B risulta più competitivo del Catodo A grazie al minor consumo energetico (20 vs 30 kWh·kg⁻¹) e alla maggiore selettività verso la produzione di acetato. Sebbene i costi attuali non consentano una competizione diretta con la produzione chimica tradizionale, i BES mostrano un potenziale significativo in applicazioni integrate e in scenari di economia circolare, dove la valorizzazione della CO₂ e la sostenibilità ambientale assumono un ruolo centrale.

CAPITOLO IV

VALUTAZIONE SPERIMENTALE DELLA RISPOSTA FISIOLOGICA E METABOLICA DI CHLORELLA SOROKINIANA

4.0 Introduzione ai cicli microalgali

Le prove sperimentali condotte sulle microalghe sono state articolate in differenti condizioni operative, con l'obiettivo di valutare la risposta fisiologica delle colture in funzione della disponibilità di luce, nutrienti e carbonio organico. Sono stati analizzati un ciclo autotrofico, basato esclusivamente sull'utilizzo di CO₂ e luce, e un ciclo eterotrofico, in cui l'acetato prodotto dai BES è stato impiegato come fonte di carbonio ridotto. Quest'ultimo è stato ulteriormente suddiviso in due varianti: ciclo filtrato, in cui la coltura è stata separata dai batteri mediante filtrazione, e ciclo non filtrato, in cui microalghe e batteri sono rimasti in co-coltura. Questa sezione ha quindi lo scopo di descrivere in modo sistematico l'andamento della crescita, della produzione di biomassa, della dinamica pigmentaria e del consumo di acetato, al fine di comprendere come le microalghe rispondano ai diversi regimi metabolici e come tali risposte possano essere integrate con i risultati ottenuti nei BES.

4.1 CRESCITA AUTOTROFICA DELLE MICROALGHE

Durante il ciclo autotrofico, le microalghe sono state coltivate in condizioni di luce continua e con CO₂ come unica fonte di carbonio. L'andamento dei parametri monitorati (clorofilla totale, densità cellulare e biomassa secca) mostra una crescita lenta ma stabile, tipica delle colture fotoautotrofe.

4.1.1 Andamento della clorofilla totale nel ciclo autotrofico

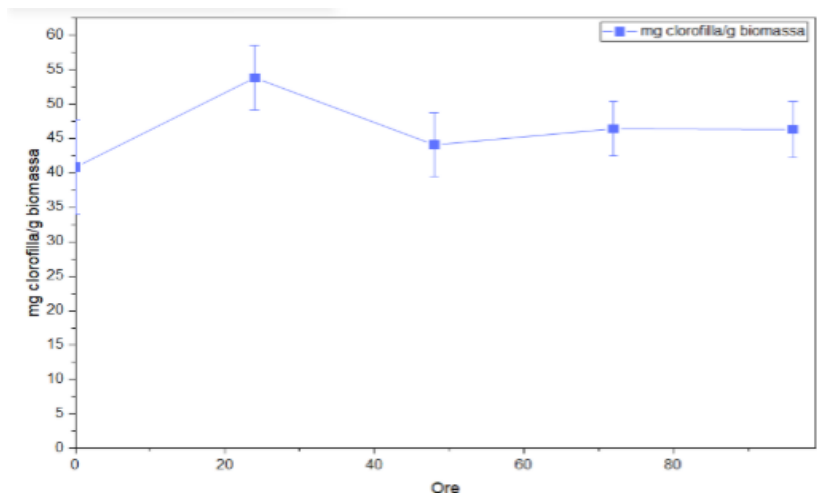


Figura 4.1 - Evoluzione della concentrazione di clorofilla totale rispetto alla biomassa nel ciclo autotrofico.

Come si può osservare dal profilo temporale riportato nella Figura 4.1, la concentrazione di clorofilla totale ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) mostra un incremento progressivo concentrato nelle prime 20 ore, le cellule aumentano il contenuto di pigmenti fotosintetici per migliorare la capacità di intercettare e assorbire la radiazione luminosa disponibile. Successivamente le cellule continuano l’adattamento, ma iniziano a rimodulare il contenuto di pigmenti. La disponibilità della luce porta a ridurre la quantità di clorofilla poiché non è necessario mantenere un’antenna fotosintetica così estesa (20-50 ore). Questo andamento descrive una chiara fase di fotoacclimazione (0-50 ore). Nelle fasi successive del ciclo, dopo 50 ore, la concentrazione del pigmento tende a stabilizzarsi o a subire una lieve flessione negativa, un comportamento fisiologico che testimonia l'avvenuto adattamento della coltura al regime radiativo interno e la concomitante riduzione dell’antenna fotosintetica volta a prevenire potenziali fenomeni di fotoinibizione.

4.1.2 Crescita cellulare nel ciclo autotrofico

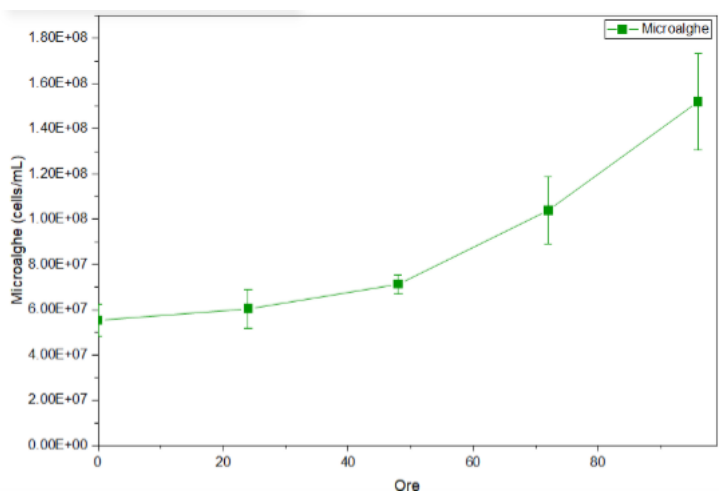


Figura 4.2 - Profilo di crescita e densità cellulare microalgale in condizioni di fotoautotrofia.

L'evoluzione della densità cellulare ($\text{cells} \cdot \text{mL}^{-1}$), illustrata nella Figura 4.2, è contraddistinta da un incremento graduale e continuo per tutta la durata della prova, passando da circa $6 \cdot 10^7 \text{ cellule} \cdot \text{mL}^{-1}$ all'inizio della coltivazione fino a raggiungere valori prossimi a $1,4 \cdot 10^8 \text{ cellule} \cdot \text{mL}^{-1}$ al termine dell'esperimento mostrando un trend perfettamente coerente con i tempi cinetici di un metabolismo basato in via esclusiva sulla fissazione fotosintetica del carbonio inorganico (CO_2). La regolarità di questa cinetica colturale, del tutto priva di fluttuazioni o anomalie macroscopiche, conferma la stabilità del sistema e l'assenza di stress fisiologici di rilievo all'interno delle specifiche condizioni sperimentali adottate.

4.1.3 Andamento della biomassa secca nel ciclo autotrofico

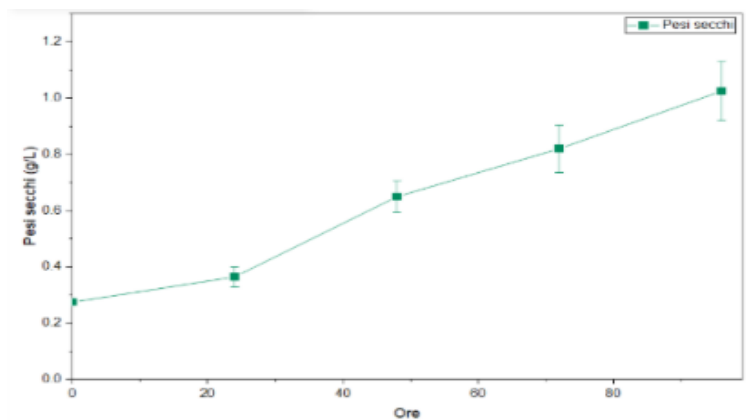


Figura 4.3 - Profilo temporale della biomassa secca microalgale in condizioni di crescita autotrofica.

L'evoluzione dei pesi secchi ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), dettagliata nella Figura 4.3, mostra un incremento progressivo e strettamente proporzionale alla crescita cellulare, da circa $0,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ a circa $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ confermando il regolare accumulo di nuova biomassa nel corso dell'intero ciclo sperimentale. Come ampiamente previsto per le colture condotte in regime di fotoautotrofia, la velocità di crescita specifica si attesta su valori inferiori rispetto a quelli registrati nei successivi cicli eterotrofi; ciononostante, il processo si mantiene costante, stabile e lineare per tutta la durata dell'esperimento.

4.1.4 Conclusioni ciclo autotrofico

Nel complesso, i risultati ottenuti durante il ciclo autotrofico descrivono un sistema biologico solido ed efficiente, caratterizzato da una precisa successione di risposte fisiologiche. Il processo si apre con una chiara fase iniziale di fotoacclimazione cellulare, a cui succede una crescita cinetica più lenta rispetto ai regimi con carbonio organico, ma contraddistinta da uno sviluppo continuo e da un incremento perfettamente costante della biomassa secca. L'estrema regolarità di tutti i

parametri monitorati e la totale assenza di segnali di stress fisiologico confermano l'ottimalità delle condizioni operative applicate. Di conseguenza, questo blocco di dati scientifici assolve l'importante funzione di linea guida sperimentale e di controllo, costituendo il punto di riferimento indispensabile per interpretare e quantificare correttamente le variazioni metaboliche osservate nei successivi cicli eterotrofi.

4.2.1 Transizione metabolica: da autotrofico a eterotrofico

Il passaggio alla coltivazione eterotrofica comporta una profonda riorganizzazione del metabolismo microalgale. L'introduzione dell'acetato come fonte di carbonio ridotto determina una diminuzione progressiva della clorofilla, poiché la cellula non dipende più dalla fotosintesi come principale via energetica. La crescita cellulare diventa più rapida e sostenuta, mentre la composizione pigmentaria si modifica: la clorofilla diminuisce e i carotenoidi tendono ad aumentare, indicando un maggiore livello di stress ossidativo. Questa transizione riflette il passaggio da un metabolismo energeticamente costoso (fotosintesi) a uno più efficiente dal punto di vista energetico (ossidazione dell'acetato), ma anche più suscettibile a squilibri *redox*.

4.2.2 Studio preliminare sulle concentrazioni di acetato (3 g·L⁻¹ vs 6 g·L⁻¹)

Prima di avviare i cicli eterotrofi, è stato condotto uno studio preliminare per valutare la capacità delle microalghe di consumare differenti concentrazioni di acetato. Sono state testate due condizioni: 3 g·L⁻¹ e 6 g·L⁻¹, monitorando il tempo necessario per il completo esaurimento del substrato e la risposta fisiologica della coltura.

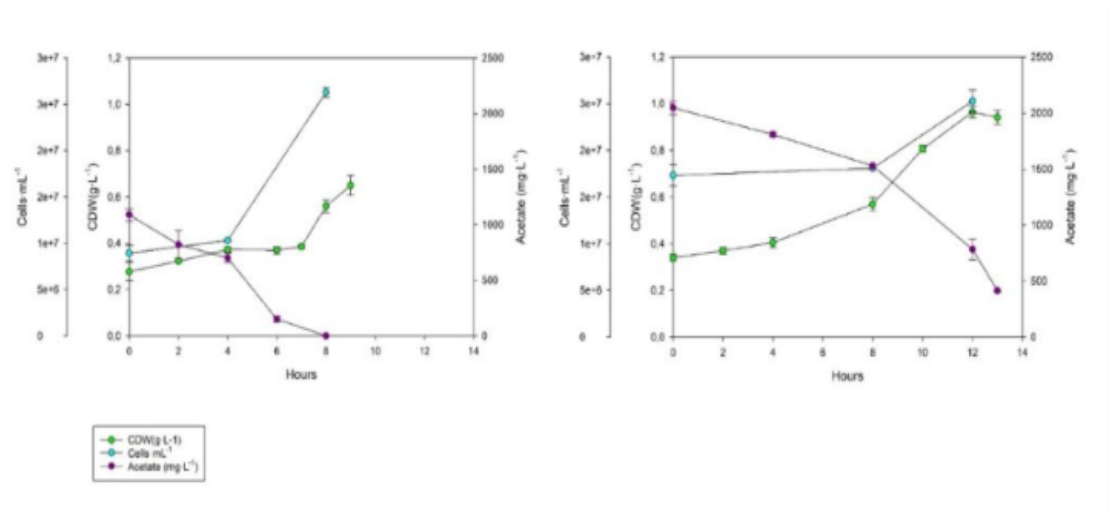


Figura 4.4 - Profili di consumo dell'acetato e cinetiche di crescita microalgale in funzione del tempo.

La Figura 4.4 illustra i profili di consumo dell'acetato e le cinetiche di crescita microalgale nelle due condizioni sperimentali. Nel grafico di sinistra, relativo alla concentrazione iniziale di $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ di acetato, la biomassa microalgale parte da $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e cresce in modo regolare fino a raggiungere circa $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Parallelamente, l'acetato (linea viola), inizialmente misurato a circa $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per effetto della diluizione nel volume totale del fotobioreattore di 3L, viene completamente consumato entro 8 ore, evidenziando una cinetica di utilizzo rapida, lineare e fisiologicamente sostenibile.

Nel grafico di destra, corrispondente alla condizione a $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, la biomassa parte anch'essa da circa $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, ma raggiunge un valore finale più elevato, pari a circa $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, indicando una maggiore disponibilità di carbonio assimilabile. Tuttavia, l'acetato iniziale (circa $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mostra un consumo più lento e irregolare, con un residuo di circa $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dopo 12 ore. Nonostante l'incremento più marcato della biomassa, l'andamento non lineare del consumo del substrato suggerisce un potenziale sovraccarico metabolico, verosimilmente associato all'accumulo di intermedi intracellulari e a fenomeni di stress ossidativo.

Nel complesso, il confronto tra le due condizioni sperimentali evidenzia che la concentrazione di $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ rappresenta il valore ottimale di acetato per il fotobioreattore da 3 L. A questa concentrazione, infatti, il substrato viene consumato completamente e in tempi brevi, la crescita microalgale procede in modo regolare e la biomassa aumenta senza segnali di stress metabolico. La condizione a $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pur generando una biomassa maggiore, risulta meno stabile e meno efficiente dal punto di vista fisiologico. Pertanto, nel sistema sperimentale adottato, $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ costituisce la concentrazione più equilibrata per massimizzare la crescita microalgale garantendo una cinetica di consumo dell'acetato rapida, completa e sostenibile.

4.2.3 Conclusione transizione metabolica

I risultati dello studio preliminare evidenziano che la concentrazione di $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ di acetato viene consumata completamente in circa 8 ore, a testimonianza di un metabolismo microalgale rapido, stabile e perfettamente compatibile con un ciclo giornaliero di alimentazione. Al contrario, la condizione a $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ richiede tempi significativamente più lunghi e mostra una maggiore variabilità nel consumo del substrato, suggerendo un possibile sovraccarico metabolico e un conseguente aumento dello stress cellulare. Sulla base di queste evidenze sperimentali, la concentrazione di $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ è stata selezionata come condizione ottimale per i successivi esperimenti in eterotrofia, in quanto garantisce il miglior equilibrio tra la disponibilità di carbonio, la stabilità fisiologica della coltura e i tempi di consumo necessari per una corretta ed efficiente gestione del fotobioreattore.

4.3.1 Ciclo eterotrofico filtrato: crescita, pigmenti e biomassa

Nel ciclo eterotrofico filtrato, le microalghe sono state coltivate utilizzando acetato ($3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) come unica fonte di carbonio organico, dopo filtrazione dell'effluente con filto $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ per rimuovere la componente batterica. Questa condizione permette di valutare la risposta fisiologica delle microalghe in assenza di competizione microbica, garantendo un metabolismo più stabile e una crescita più regolare rispetto al ciclo non filtrato.

4.3.2 Crescita cellulare nel ciclo eterotrofico filtrato

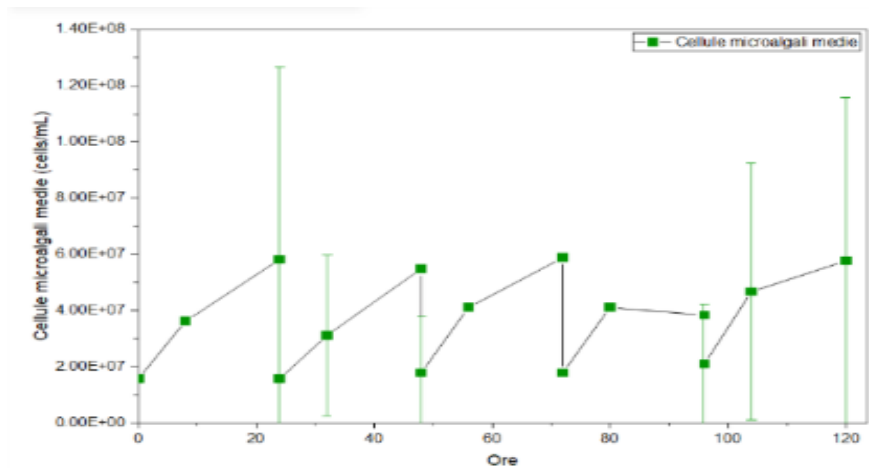


Figura 4.5 - Profilo della densità cellulare microalgale durante il ciclo eterotrofico in terreno filtrato.

Il grafico evidenzia un andamento ciclico della concentrazione cellulare durante l'intero periodo di coltivazione eterotrofica. In ciascun intervallo di 24 ore la densità cellulare aumenta progressivamente fino a raggiungere valori prossimi a 6×10^7 cellule mL^{-1} ; successivamente, l'operazione di diluizione determina una riduzione della concentrazione a valori comparabili a quelli iniziali. Dopo ogni diluizione la coltura riprende rapidamente la crescita, raggiungendo nuovamente elevate densità cellulari prima dell'intervento successivo.

Fanno eccezione le 24 ore comprese tra 72 e 96 ore, durante le quali si osserva un incremento iniziale della densità cellulare fino a circa 80 ore, seguito da una fase di quasi stabilizzazione attorno a 4×10^7 cellule mL^{-1} fino alla successiva diluizione. Tale comportamento potrebbe indicare una temporanea riduzione della velocità di crescita, associabile a una minore disponibilità di nutrienti o al raggiungimento di una condizione di equilibrio fisiologico della coltura.

Ad eccezione di questo intervallo, nei restanti cicli di crescita, compreso quello successivo alla diluizione effettuata a 96 ore, la densità cellulare raggiunge nuovamente valori prossimi a 6×10^7 cellule mL^{-1} . La capacità della coltura di recuperare sistematicamente tali concentrazioni conferma che il mezzo BG11 integrato con effluente catodico filtrato ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$) è in grado di sostenere efficacemente la crescita microalgale per l'intera durata della prova sperimentale.

4.3.3 Andamento della biomassa secca nel ciclo eterotrofico filtrato

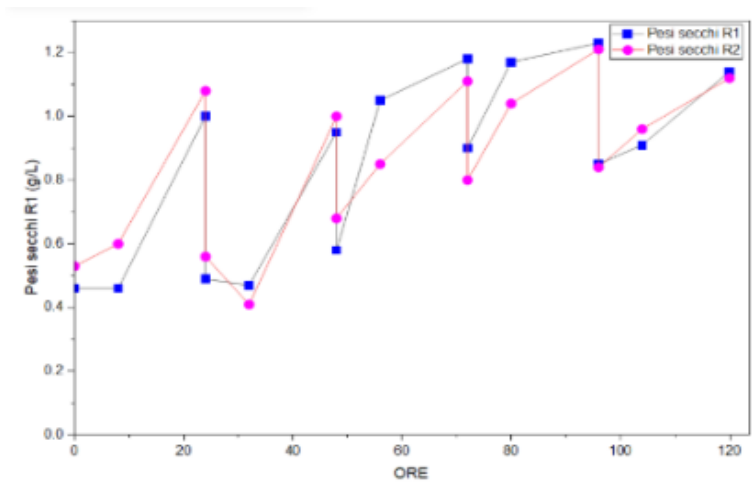


Figura 4.6 - Evoluzione della biomassa secca durante il ciclo eterotrofico in mezzo filtrato (effluente filtrato+BG-11).

I pesi secchi ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) mostrano un incremento da $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a circa $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ alla fine della prova, evidenziando una perfetta coerenza con l’aumento della densità cellulare precedentemente descritto. Questo andamento regolare, riportato in Figura 4.6, indica che il metabolismo eterotrofico si mantiene stabile e non è soggetto a oscillazioni o stress fisiologici significativi. L’efficace conversione dell’acetato in nuova biomassa conferma che la filtrazione preventiva dell’effluente rappresenta un fattore chiave per la stabilità e la riproducibilità dell’intero processo.

4.3.4 Clorofilla/biomassa nel ciclo eterotrofico filtrato

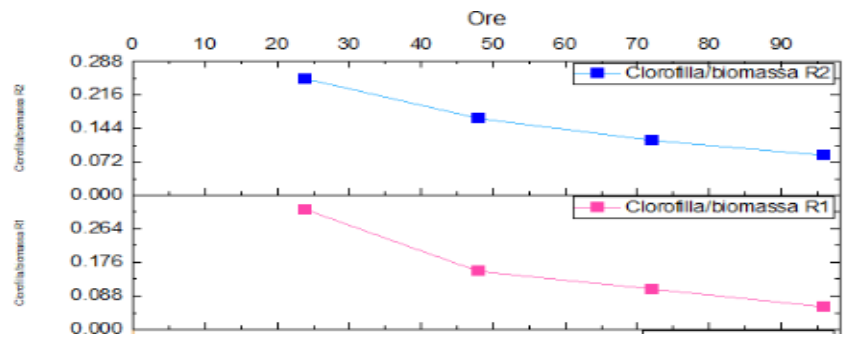


Figura 4.7 - Andamento del rapporto clorofilla/biomassa durante il ciclo eterotrofico in mezzo filtrato (effluente filtrato+BG-11).

Come evidenziato dall'andamento riportato nella Figura 4.7, il rapporto clorofilla/biomassa diminuisce progressivamente nel tempo, un comportamento ampiamente previsto e caratteristico per le colture che crescono in eterotrofia. Questa graduale riduzione dell'apparato fotosintetico riflette l'adattamento cellulare nel passaggio da un metabolismo fotoautotrofico a uno basato sull'ossidazione dell'acetato, una condizione in cui la cellula non ha più la necessità di mantenere un'elevata antenna fotosintetica per la cattura della luce. La regolarità riscontrata in questo decremento indica inoltre che la coltura non manifesta segnali di stress ossidativo rilevanti e che il metabolismo eterotrofico procede in modo stabile ed equilibrato nelle condizioni sperimentali adottate.

4.3.5 Conclusione ciclo eterotrofico filtrato

Il ciclo eterotrofico filtrato evidenzia una crescita cellulare rapida e regolare, accompagnata da un incremento lineare della biomassa secca e da una riduzione progressiva del contenuto di clorofilla, un comportamento quest'ultimo ampiamente coerente con l'attivazione del metabolismo eterotrofico. L'intero processo si sviluppa in totale assenza di stress fisiologico significativo per le cellule, permettendo un consumo dell'acetato stabile e completo entro le prime 8 ore dall'inoculo. Nel loro insieme, questi risultati confermano sperimentalmente che la filtrazione preventiva dell'effluente rappresenta un'operazione essenziale per garantire condizioni ottimali di crescita e per massimizzare l'efficienza complessiva di conversione del carbonio organico in nuova biomassa microalgale.

4.4.1 Ciclo eterotrofico non filtrato: competizione, stress e instabilità

Nel ciclo eterotrofico non filtrato, le microalghe sono state coltivate in presenza della comunità batterica originaria dell'effluente BES. Questa condizione ha permesso di valutare l'effetto della co-presenza microbica sul consumo di acetato, sulla crescita cellulare e sulla stabilità fisiologica della coltura. I risultati mostrano un comportamento significativamente più irregolare rispetto al ciclo filtrato, indicando una forte competizione per il substrato e una maggiore suscettibilità allo stress.

4.4.2 Consumo di acetato nel ciclo non filtrato (R1-R2)

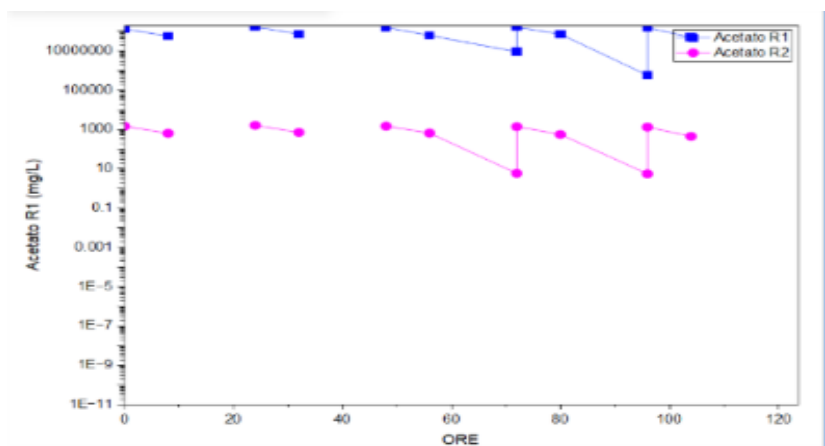


Figura 4.8 - Profilo di consumo dell'acetato nel ciclo eterotrofico in mezzo non filtrato (reattori R1-R2).

L'illustrazione mette in luce un consumo fortemente irregolare, caratterizzato da marcate oscillazioni e dalla persistenza di residui significativi di substrato anche nelle fasi avanzate del processo. Questo andamento non lineare suggerisce l'instaurarsi di una competizione diretta tra la popolazione microalgale e la carica batterica nativa per l'assimilazione del carbonio organico disponibile, con conseguente destabilizzazione e rallentamento del metabolismo culturale complessivo.

4.4.3 Crescita microalgale nel ciclo non filtrato (scala logaritmica)

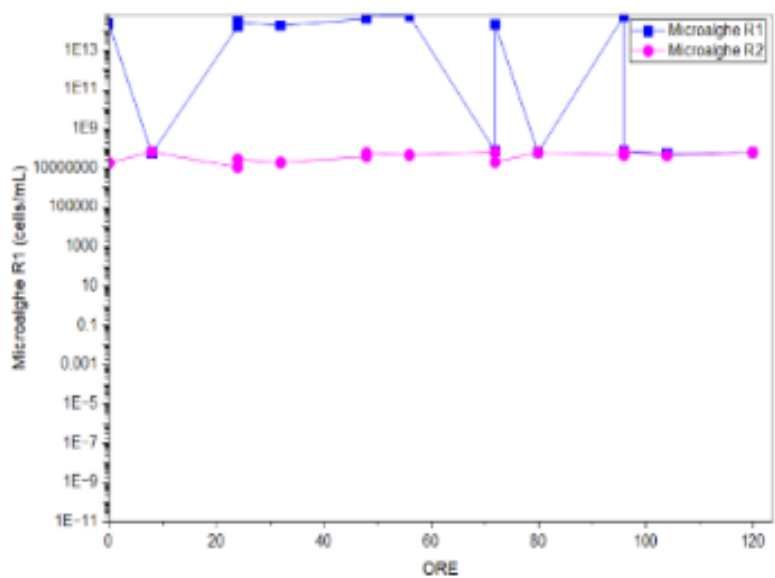


Figura 4.9 - Curve di crescita microalgale in scala logaritmica durante il ciclo eterotrofico in mezzo non filtrato (effluente +BG-11).

I profili temporali evidenziano oscillazioni marcate della densità cellulare, caratterizzate da repentine fasi di incremento seguite da cali improvvisi. Questo andamento non lineare è indicativo di un microambiente fortemente instabile, all'interno del quale la popolazione batterica nativa può

limitare l'accesso al substrato organico o rilasciare metaboliti inibitori in soluzione. Di conseguenza, lo sviluppo colturale complessivo risulta sensibilmente inferiore e meno regolare rispetto a quello osservato nel ciclo a terreno filtrato.

4.4.4 Cellule batteriche medie nel ciclo eterotrofico non filtrato

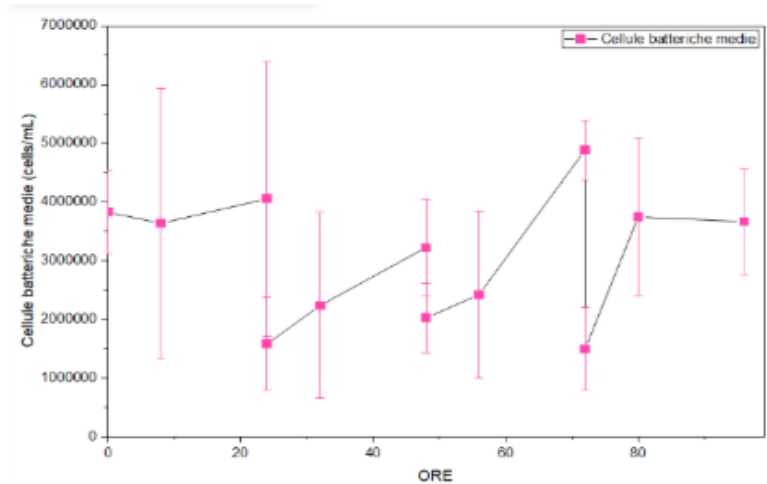


Figura 4.10 - Dinamica del numero medio di cellule batteriche durante il ciclo eterotrofico in mezzo non filtrato (effluente +BG-11).

Nel primo ciclo si osserva un lieve incremento della biomassa batterica, seguito da una diminuzione in corrispondenza della diluizione. Nelle 24 ore successive la biomassa aumenta nuovamente, per poi ridursi ancora dopo la successiva diluizione e infine crescere fino a raggiungere una fase di stabilizzazione, con valori prossimi a quelli iniziali.

Questo andamento suggerisce che i batteri siano in grado di utilizzare l'acetato come fonte di carbonio per la propria crescita. L'aumento della biomassa batterica contribuisce alla competizione diretta per il carbonio organico, riducendo la quota disponibile per le microalghe e spiegando l'andamento irregolare del consumo di acetato osservato in precedenza. Questa presenza microbica può inoltre modificare le condizioni del mezzo attraverso la produzione di metaboliti secondari, variazioni del pH e aumento della torbidità, fattori che contribuiscono alla scarsa stabilità fisiologica evidenziata nella crescita microalgale e nella dinamica dei pigmenti fotosintetici. Il profilo batterico risulta quindi strettamente correlato alle oscillazioni osservate nella crescita microalgale e nella biomassa secca, confermando che la competizione microbica è uno dei principali fattori responsabili dell'instabilità del ciclo non filtrato.

4.4.5 Biomassa secca nel ciclo non filtrato (R1-R2)

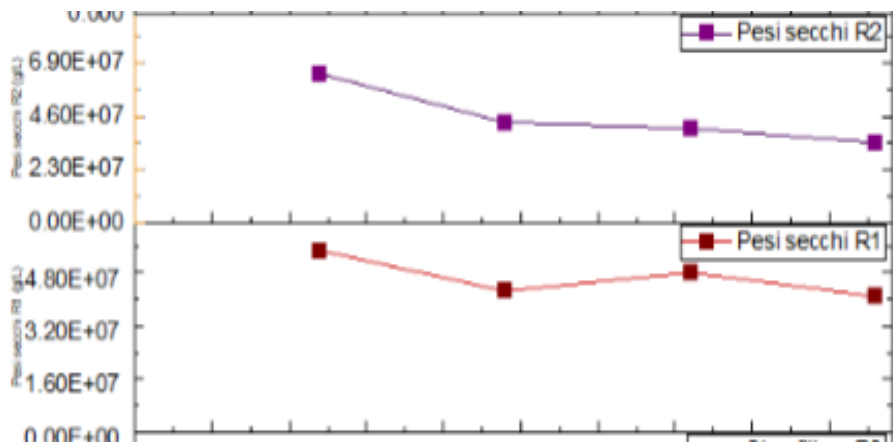


Figura 4.11 - Andamento della biomassa secca durante il ciclo eterotrofico in mezzo non filtrato (reattori R1-R2).

L'evoluzione dei pesi secchi nel sistema non filtrato presenta un andamento irregolare caratterizzato da evidenti oscillazioni nel tempo. Questo comportamento suggerisce condizioni colturali meno stabili rispetto al sistema filtrato, presumibilmente dovute alla presenza di particolato, all'azione dei microrganismi competitori e alla variabilità nella disponibilità dei nutrienti. Le differenze riscontrate tra le due repliche biologiche (R1 e R2) confermano una maggiore eterogeneità complessiva del sistema; nel complesso, i dati indicano un metabolismo eterotrofico non costante e fortemente soggetto alle variazioni ambientali.

4.4.6 Andamento dei pigmenti fotosintetici (clorofilla a, b, totale)

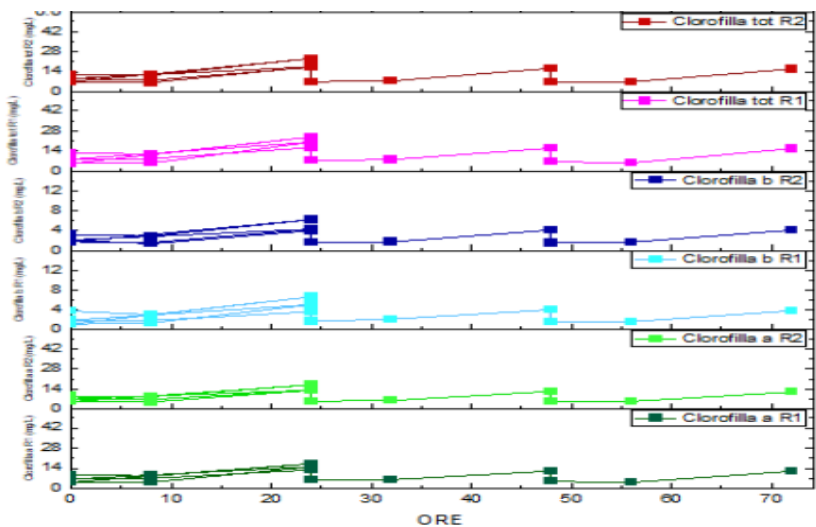


Figura 4.12 - Profili temporali dei pigmenti fotosintetici (clorofilla a, b e totale) nel ciclo eterotrofico non filtrato.

L'andamento della clorofilla totale e delle sue singole componenti evidenzia una diminuzione rapida e irregolare, a testimonianza di una netta contrazione dell'apparato fotosintetico. Questo comportamento è tipico di condizioni di stress fisiologico, in cui la cellula riduce drasticamente l'investimento energetico nella fotosintesi per far fronte a condizioni ambientali sfavorevoli. La marcata variabilità riscontrata tra i due reattori (R1 e R2) conferma ulteriormente la scarsa stabilità e la ridotta riproducibilità del sistema non filtrato.

4.4.7 Carotenoidi nel ciclo non filtrato (R1-R2)

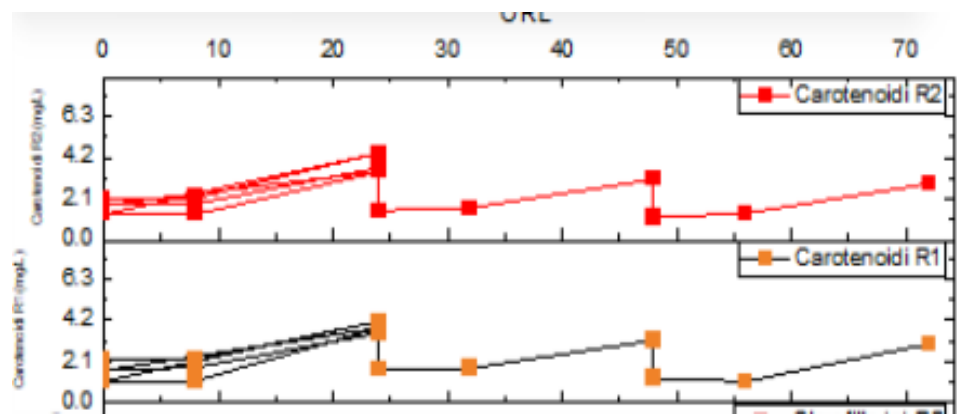


Figura 4.13 - Profilo temporale dei carotenoidi durante il ciclo eterotrofico in mezzo non filtrato (reattori R1-R2).

L'andamento evidenzia una progressiva diminuzione dei carotenoidi nel tempo, caratterizzata da un incremento iniziale a cui segue una fase di stabilizzazione su valori inferiori. Questa cinetica risulta coerente con le condizioni eterotrofiche non filtrate, nelle quali la contrazione dell'attività fotosintetica e la ridotta necessità di protezione foto-ossidativa comportano un minor fabbisogno di pigmenti accessori. Inoltre, la concomitante presenza di particolato, batteri e contaminanti determina un ambiente colturale più torbido e meno controllato; tale incremento della torbidità riduce la penetrazione della luce nel mezzo, rendendo meno necessario il mantenimento di un'elevata quota di carotenoidi, che fisiologicamente cooperano nella difesa da stress luminosi e ossidativi. Il comportamento osservato riflette pertanto sia il disinvestimento nei pigmenti fotosintetici tipico del metabolismo eterotrofico, sia l'influenza dello stress ambientale e della scarsa stabilità del sistema non filtrato, fattori che nel complesso guidano il declino dei carotenoidi.

4.4.8 Conclusione ciclo eterotrofico non filtrato

Nel complesso, il ciclo eterotrofico non filtrato evidenzia un sistema instabile, eterogeneo e fortemente influenzato dalla co-presenza batterica. La cinetica di rimozione dell'acetato risulta infatti irregolare e non lineare, con residui significativi anche dopo molte ore che indicano una chiara competizione diretta tra la popolazione microalgale e quella batterica per il substrato disponibile. Di riflesso, la crescita microalgale mostra oscillazioni marcate, in cui fasi di incremento sono seguite da cali improvvisi, specchio di un ambiente dinamico e poco controllato in cui la disponibilità di nutrienti e le condizioni chimico-fisiche variano nel tempo. Anche l'evoluzione della biomassa secca presenta un andamento disomogeneo, le cui differenze tra le repliche biologiche confermano la maggiore variabilità e la ridotta riproducibilità di questo sistema rispetto al ciclo condotto su terreno filtrato.

Dal punto di vista fisiologico, i pigmenti fotosintetici (clorofilla a, b e totale) diminuiscono rapidamente, a testimonianza di una netta contrazione dell'apparato fotosintetico e di una minore attività complessiva. Parallelamente, i carotenoidi mostrano un incremento iniziale seguito da una fase di stabilizzazione, un comportamento coerente con la ridotta necessità di protezione foto-ossidativa in un ambiente che, a causa di batteri, particolato e contaminanti, risulta più torbido, opaco e meno controllato, limitando così la penetrazione della luce.

Nel loro insieme, questi risultati dimostrano che il ciclo eterotrofico non filtrato è strutturalmente penalizzato dalla competizione microbica, dallo stress fisiologico e da una scarsa stabilità colturale, fattori che determinano una drastica riduzione sia nell'efficienza di conversione dell'acetato sia nella produttività complessiva della coltura microalgale.

4.5.1 Confronto sintetico tra ciclo eterotrofico filtrato e non filtrato

Per completare il quadro comparativo tra i due cicli eterotrofi, è stato inserito un confronto diretto del profilo di consumo dell'acetato, rappresentando l'ultimo parametro non ancora analizzato in parallelo. Questa sovrapposizione permette di evidenziare in modo immediato l'impatto cruciale esercitato dalla filtrazione sulla disponibilità del substrato in soluzione e, di conseguenza, sulla stabilità complessiva del metabolismo microalgale.

4.5.2 Consumo di acetato: andamento lineare vs irregolare

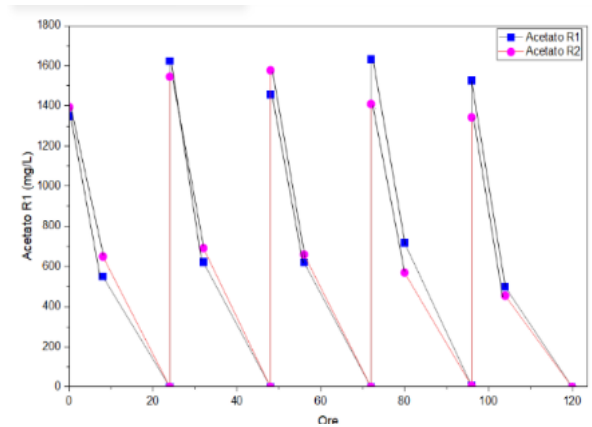


Figura 4.14 - Profilo di consumo dell’acetato durante il ciclo eterotrofico in mezzo filtrato (effluente filtrato+BG-11).

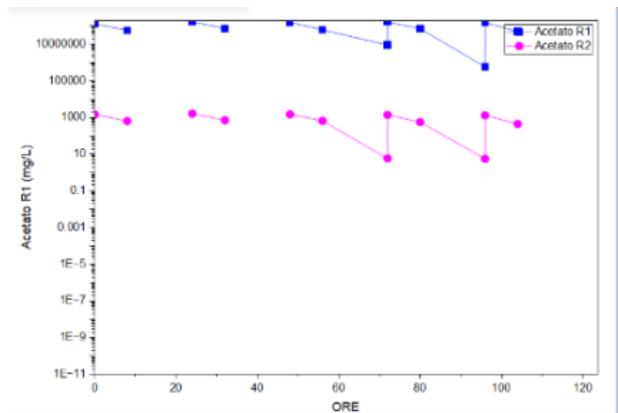


Figura 4.15 - Profilo di consumo dell’acetato durante il ciclo eterotrofico in mezzo non filtrato (effluente+BG-11).

Nel ciclo condotto su mezzo filtrato (effluente filtrato+BG-11), l'andamento riportato nella Figura 4.14 evidenzia una cinetica di rimozione dell'acetato estremamente regolare, lineare e completa, che porta al totale esaurimento del substrato ogni 24 ore. Questo comportamento riflette lo sviluppo della coltura in un microambiente ottimale e privo di competizione microbica, in cui la sorgente di carbonio organico rimane interamente a disposizione del metabolismo microalgale, garantendo una conversione energetica efficiente e altamente riproducibile.

Al contrario, prendendo in esame il ciclo non filtrato mostrato nella Figura 4.15, il consumo di acetato si rivela fortemente irregolare e disomogeneo, contrassegnato da marcate oscillazioni e dalla persistenza di residui significativi di nutriente anche a distanza di molte ore. Tale dinamica fluttuante risulta coerente con la massiccia presenza della comunità batterica nativa, la quale compete in modo diretto con le microalghe per l'assimilazione della medesima risorsa e introduce elementi di forte variabilità chimico-fisica nel mezzo.

Il confronto diretto tra i due profili di consumo solleva quindi una chiara evidenza sperimentale: la filtrazione preventiva dell’effluente rappresenta il fattore determinante per la stabilità del processo eterotrofico. Questa operazione unitaria garantisce infatti un utilizzo decisamente più efficiente del carbonio organico e riduce la competizione microbica interspecifica, stabilizzando di riflesso la crescita cellulare e la produzione di biomassa, e permettendo al contempo un controllo più accurato e prevedibile dei tempi di alimentazione del fotobioreattore. Questo importante riscontro integra e conferma definitivamente quanto osservato nei singoli paragrafi dedicati ai due cicli, fornendo una visione d'insieme sintetica sull’effetto della filtrazione nella fisiologia delle microalghe.

4.6.1 Confronto dei pigmenti tra ciclo autotrofico e ciclo eterotrofico non filtrato

Per valutare l’effetto del regime di crescita sulla fisiologia microalgale, sono stati confrontati i profili dei pigmenti fotosintetici (clorofilla a e carotenoidi) nei due fotobioreattori (R1–R2) durante il ciclo autotrofico e durante il ciclo eterotrofico non filtrato, quest’ultimo caratterizzato dalla presenza della comunità batterica e da condizioni ambientali meno stabili.

4.6.2 Clorofilla a nei cicli autotrofico ed eterotrofico non filtrato

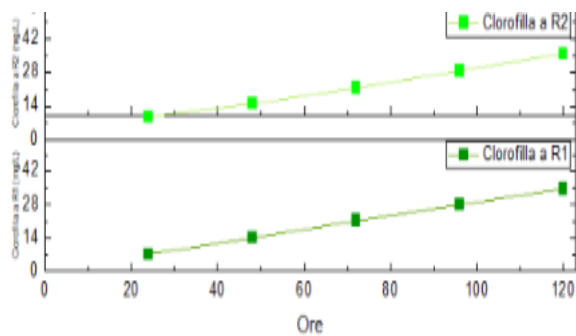


Figura 4.16 - Andamento della concentrazione di clorofilla a nel corso del ciclo autotrofico per i reattori R1 e R2.

Questa figura mostra la risposta biologica classica della *Chlorella sorokiniana* in presenza di luce e in assenza di substrato organico. La stabilità o il progressivo incremento dei valori testimoniano l'adattamento ottimale delle microalghe alle condizioni di illuminazione e la piena efficienza del loro apparato fotosintetico, che rimane la via principale per l'assimilazione del carbonio e il mantenimento dell'omeostasi cellulare nei due reattori.

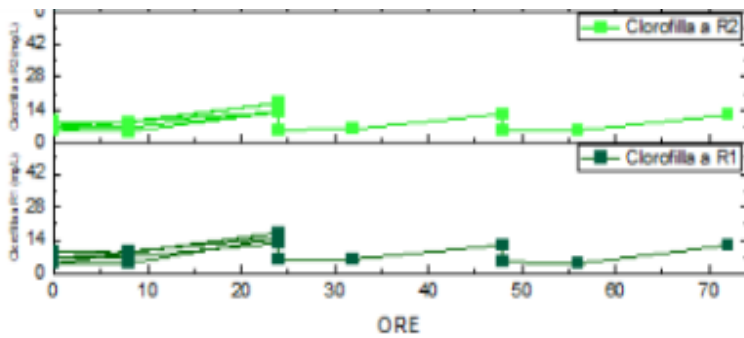


Figura 4.17 - Evoluzione temporale della concentrazione di clorofilla a durante il ciclo eterotrofico non filtrato nei reattori R1 e R2.

Nella Figura 4.17 si può osservare un crollo repentino e fluttuante dei pigmenti fotosintetici, dovuto al fatto che l'alga, trovandosi al buio e in presenza di acetato, disattiva i meccanismi della fotosintesi per passare a un metabolismo puramente eterotrofico. Il trend fortemente irregolare è esacerbato dalla massiccia proliferazione della flora batterica nativa non filtrata, che compete aggressivamente per i nutrienti e l'ossigeno, destabilizzando la coltura algale e accelerando la degradazione della clorofilla stessa.

4.6.3 Carotenoidi nei cicli autotrofico ed eterotrofico non filtrato

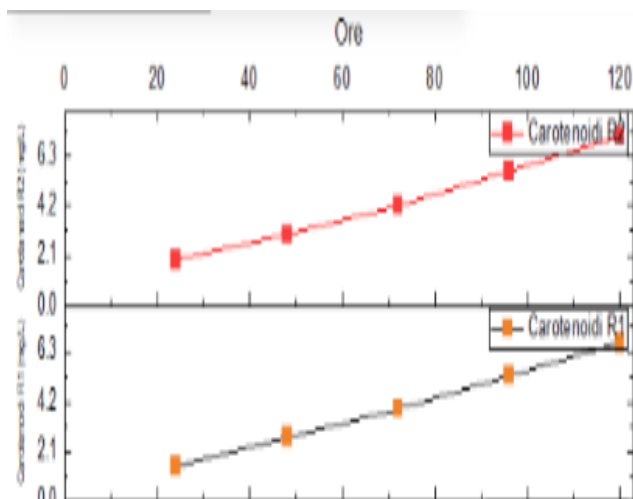


Figura 4.18 - Andamento della concentrazione di carotenoidi totali nel corso del ciclo autotrofico per i reattori R1 e R2

Nel contesto della crescita autotrofica, l'incremento progressivo e controllato di questi pigmenti accessori riflette la risposta fisiologica della *Chlorella sorokiniana* all'irraggiamento luminoso. I carotenoidi svolgono qui un ruolo biologico fondamentale di fotoprotezione, agendo come scudi molecolari per dissipare l'energia in eccesso e proteggere i fotosistemi dallo stress foto-ossidativo, garantendo così la stabilità dell'apparato fotosintetico in entrambi i duplicati.

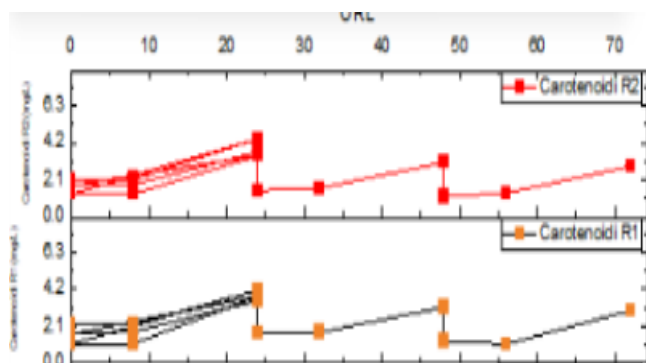


Figura 4.19 - Evoluzione temporale della concentrazione di carotenoidi totali durante il ciclo eterotrofico non filtrato nei reattori R1 e R2, in presenza di torbidità e carica batterica

In questo scenario si osserva un profilo radicalmente opposto, caratterizzato da una rapida flessione iniziale seguita da un assestamento su livelli significativamente più bassi. Questa dinamica è legata alle condizioni ambientali del mezzo, dove l'assenza di stimolo luminoso diretto e l'elevata torbidità indotta dal particolato e dalla sospensione batterica riducono drasticamente la necessità di una difesa fotoprotettiva da parte della microalga.

4.6.4 Conclusioni confronto dei pigmenti tra ciclo autotrofico e ciclo eterotrofico non filtrato

L'analisi comparativa del profilo pigmentario mette in luce differenze macroscopiche tra i due regimi operativi testati. Mentre il ciclo autotrofico si dimostra capace di preservare un apparato fotosintetico strutturalmente attivo, funzionale e stabile nel tempo, la transizione al ciclo eterotrofico non filtrato determina una degradazione rapida, marcata e profondamente irregolare sia delle clorofille che dei carotenoidi. Tale fenomeno è strettamente correlato alle condizioni ecologiche del sistema, in cui la massiccia proliferazione batterica e il drastico aumento della torbidità del mezzo operano in sinergia, amplificando l'instabilità fisiologica della coltura algale. In definitiva, lo studio dei pigmenti conferma che il regime di crescita imposto e la purezza microbiologica dell'effluente esercitano un impatto determinante sullo stato di salute e sulla risposta metabolica della *Chlorella sorokiniana*.

4.6.5 Confronto sintetico autotrofico vs eterotrofico

La valutazione incrociata tra i due modelli metabolici evidenzia un chiaro compromesso ingegneristico e biologico tra stabilità del sistema e velocità di sintesi della biomassa. Il regime autotrofico si caratterizza per una cinetica di crescita più contenuta e lineare, associata a un contenuto di pigmenti elevato e costante che testimonia l'assenza di perturbazioni o stress cellulari

significativi, configurandosi come la strategia più idonea per conduzioni a lungo termine e produzioni altamente standardizzate. Al contrario, il regime eterotrofico stimola una crescita cellulare decisamente più rapida e vigorosa, accompagnata però da una forte contrazione dell'apparato fotosintetico e da un marcato stato di stress che, se opportunamente veicolato, favorisce l'accumulo di lipidi intracellulari di interesse industriale. Sebbene la via eterotrofica offra una produttività potenziale nettamente superiore, la sua implementazione richiede un monitoraggio estremamente rigoroso e un controllo fine delle variabili operative, al fine di mitigare i fenomeni di instabilità e i crolli colturali a cui questo sistema è intrinsecamente esposto.

4.7.1 Integrazione con BES: uso dell'acetato e implicazioni biotecnologiche

I risultati sperimentali ottenuti confermano che l'acetato biosintetizzato nel sistema bioelettrochimico (BES) può essere efficacemente metabolizzato dalle microalghe come fonte primaria di carbonio organico per sostenere la crescita eterotrofica. Tra le diverse strategie operative testate, il ciclo condotto su mezzo filtrato si è rivelato la configurazione più efficiente e performante, mostrando un profilo di consumo dell'acetato estremamente regolare associato a una crescita cineticamente stabile. Questo schema di integrazione BES-microalghe dimostra la fattibilità tecnologica del processo, consentendo di valorizzare un intermedio chimico solubile direttamente all'interno della filiera, minimizzando gli sprechi e incrementando in modo significativo la sostenibilità globale del sistema. Sotto il profilo biotecnologico, inoltre, la combinazione sinergica tra l'abbondante disponibilità di acetato e una contestuale condizione di limitazione dell'azoto instaura un preciso assetto metabolico che orienta il flusso di carbonio verso la biosintesi dei lipidi, delineando prospettive applicative di grande rilievo per la produzione di biocombustibili di origine microalgale.

4.7.2 Ruolo della limitazione di azoto: stress e produzione lipidica

Composizione dell'effluente BES e integrazione di nutrienti

L'analisi chimica dell'effluente in uscita dal sistema BES e destinato all'alimentazione dei fotobioreattori eterotrofi ha evidenziato una totale assenza di fonti azotate e una concentrazione di fosforo estremamente esigua. Al fine di sopperire a tali carenze e garantire i requisiti nutrizionali minimi necessari alla sopravvivenza e alla replicazione cellulare della *Chlorella sorokiniana*, si è resa indispensabile una fase di integrazione mirata, formulata per fornire una concentrazione di azoto pari a $247 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e di fosforo pari a $7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. L'originaria e severa deprivazione di azoto che caratterizza l'effluente del BES giustifica la marcata tendenza delle microalghe a manifestare severi segnali di stress fisiologico; tali risposte, riscontrabili nella contrazione della clorofilla a e nel

contestuale declino dei carotenoidi, emergono in modo drammatico soprattutto all'interno del ciclo eterotrofico non filtrato. Di conseguenza, il dosaggio controllato e stechiometricamente bilanciato di azoto e fosforo si configura come un fattore operativo imprescindibile per stabilizzare l'omeostasi metabolica e assicurare una crescita biologica coerente con i target prefissati dal piano sperimentale.

Discussione fisiologica

I profili cinetici di riduzione della clorofilla a e dei carotenoidi totali osservati durante le fasi di conduzione eterotrofica, con particolare enfasi nel sistema non filtrato, risultano biologicamente coerenti con i tipici meccanismi cellulari indotti dallo stress da limitazione di azoto. In condizioni di carenza azotata, la cellula microalgale si trova nell'impossibilità di sostenere il ricambio e la sintesi delle macrostrutture proteiche necessarie all'integrità e al mantenimento dell'apparato fotosintetico, innescando così una contrazione dei pigmenti clorofilliani. Parallelamente, la concomitante flessione dei livelli di carotenoidi riflette la minore esigenza di attivare difese contro lo stress foto-ossidativo all'interno di un ambiente caratterizzato da un'elevata torbidità e da una scarsa penetrazione della radiazione luminosa, come si verifica appunto nel ciclo non filtrato. Sotto il profilo biochimico, questa complessa transizione fisiologica induce la cellula a deviare lo scheletro carbonioso derivante dall'assimilazione dell'acetato lontano dalle consuete vie della crescita, incanalandolo verso vie anaboliche alternative focalizzate sulla sintesi di lipidi di riserva. Nel loro insieme, i segnali fisiologici raccolti dimostrano come la convergenza tra metabolismo eterotrofico, disponibilità di acetato e limitazione di azoto agisca come un potente innesco metabolico capace di favorire l'accumulo lipidico intracellulare, delineando un aspetto di eccezionale interesse per le applicazioni industriali nel settore dei biocombustibili microalgali.

CAPITOLO V

ANALISI DI PROCESSO INTEGRATO, IMPLICAZIONI ECONOMICHE E SVILUPPI FUTURI

5.0 Discussione

La discussione critica dei risultati sperimentali ottenuti attraverso l'accoppiamento dei sistemi bioelettrochimici e dei fotobioreattori microalgali permette di interpretare in modo approfondito le dinamiche che governano la selettività chimica, le efficienze di conversione e la sostenibilità complessiva di questo innovativo processo integrato. Il quadro d'insieme emerso dalle evidenze di laboratorio mostra chiaramente come la stabilità strutturale del *biofilm* elettroattivo, la disponibilità stechiometrica di idrogeno molecolare gassoso (H_2) e i complessi fenomeni di competizione cinetica tra i differenti *pathway* microbici rappresentino i principali fattori determinanti nel modulare e governare la resa e l'efficienza della reazione acetogenica all'interno dei BES.

5.1 Ruolo centrale dell'idrogeno come prodotto limitante

La discrepanza tra l'idrogeno molecolare teorico ed effettivo, riscontrata in entrambi i catodi analizzati, conferma che la disponibilità di H_2 costituisce il reale collo di bottiglia dell'intero processo bioelettrochimico. Nel Catodo B, la maggiore stabilità del *biofilm* elettroattivo consente un utilizzo significativamente più rapido ed efficiente dell'idrogeno, riducendo le finestre di competizione cinetica con i microrganismi metanogeni e favorendo in modo selettivo la via *Wood–Ljungdahl* per la sintesi di acetato. Al contrario, nel Catodo A si osserva un fenomeno opposto, in cui l'accumulo di idrogeno non utilizzato e la contestuale maggiore produzione di metano (CH_4) indicano una parziale dispersione del flusso di elettroni verso *pathway* metabolici competitori, determinando una conseguente e netta riduzione dell'efficienza coulombica complessiva del sistema.

5.2 Selettività metabolica e formazione di AGV non acetici

La rilevazione di acidi grassi volatili a catena più lunga, quali l'acido butirrico e l'acido propionico nel Catodo A, evidenzia una deviazione biosintetica significativa rispetto alla via acetogenica principale, un fenomeno che risulta coerente con le oscillazioni registrate nei valori di pH e con l'instabilità strutturale del *biofilm* catodico. Il Catodo B, invece, si distingue per una produzione pressoché minima di AGV non acetici, a conferma di una robusta e superiore selettività metabolica della comunità microbica residente. Tali evidenze sperimentali suggeriscono che il mantenimento e la stabilità chimico-fisica del microambiente catodico rappresentano un prerequisito essenziale per preservare la predominanza ecologica dei batteri acetogeni, limitando così la proliferazione competitiva dei ceppi batterici fermentativi e dei metanogeni.

5.3 Implicazioni energetiche ed economiche

I parametri relativi al consumo energetico specifico e al costo finale di produzione dell'acetato riflettono in modo diretto il grado di selettività metabolica espresso dalle due diverse configurazioni catodiche. Il Catodo B, potendo beneficiare di una superiore efficienza coulombica, richiede un minor input energetico per unità di prodotto chimico sintetizzato, traducendosi in costi operativi stimati sensibilmente inferiori rispetto alla controparte. Sebbene, allo stato attuale dello sviluppo tecnologico, i sistemi BES non risultino ancora economicamente competitivi se confrontati con i processi chimici industriali di tipo convenzionale, la loro elevata sostenibilità ambientale e la flessibilità intrinseca di integrazione con fonti energetiche rinnovabili li rendono soluzioni biotecnologiche particolarmente promettenti all'interno di futuri scenari di economia circolare e decarbonizzazione.

5.4 Integrazione con le colture microalgali

L'impiego diretto dell'acetato biosintetizzato nei sistemi BES come fonte di carbonio organico esogeno per il nutrimento delle microalghe dimostra la concreta fattibilità ingegneristica di una piattaforma integrata di tipo bioelettrochimico-biologico. Le colture microalgali hanno mostrato risposte fisiologiche nettamente distinte in funzione dei diversi regimi metabolici applicati, evidenziando una cinetica di crescita decisamente più rapida e una superiore produttività in termini di biomassa complessiva durante le fasi condotte in condizioni eterotrofiche. Inoltre, il divario prestazionale rilevato tra il ciclo a mezzo filtrato e quello non filtrato mette in luce il ruolo determinante esercitato dalla co-cultura batterica nativa, la quale agisce come un potente modulatore della fisiologia e dello stato di stress della *Chlorella sorokiniana*.

5.5 Limiti sperimentali e prospettive di ottimizzazione

Nonostante i riscontri promettenti forniti dall'attività di laboratorio, il sistema integrato presenta alcune limitazioni intrinseche che richiedono un'attenta analisi in un'ottica di scale-up. Sotto il profilo operativo, la produzione interna di idrogeno molecolare si attesta ancora su livelli insufficienti rispetto al reale fabbisogno stechiometrico richiesto dal *pathway* acetogenico, mentre la stabilità a lungo termine del *biofilm* si è dimostrata fortemente dipendente e sensibile alla specifica geometria e configurazione dell'architettura catodica. A queste criticità si aggiunge la persistenza della metanogenesi, che si configura come una via metabolica competitiva estremamente complessa da eradicare in modo totale, mantenendo i costi energetici complessivi del processo ancora elevati rispetto agli standard della chimica industriale tradizionale.

In risposta a tali vincoli, le prospettive di ricerca futura dovranno necessariamente orientarsi verso lo sviluppo e l'ottimizzazione di nuovi materiali avanzati per gli elettrodi catodici, accoppiati a soluzioni ingegneristiche volte a incrementare il coefficiente di trasferimento di massa dell'idrogeno in fase liquida. Parallelamente, risulterà fondamentale implementare strategie mirate di inibizione chimica o fisica selettiva per contrastare lo sviluppo delle comunità archeali metanogene. Sul piano della sostenibilità globale, il consolidamento tecnologico del processo beneficerà dell'integrazione diretta con fonti di energia rinnovabile intermittente e con sistemi industriali di cattura della CO₂, ponendo le basi per la valorizzazione su larga scala della biomassa microalgale prodotta all'interno di schemi di bioraffineria ibrida ad alto valore aggiunto.

CONCLUSIONE

Il lavoro svolto ha permesso di sviluppare e analizzare in modo integrato un sistema bioelettrochimico–biologico finalizzato alla riduzione elettrotrofica della CO₂ e alla successiva valorizzazione dell’acetato prodotto tramite colture microalgali. L’approccio multidisciplinare adottato, comprendente aspetti microbiologici, elettrochimici, metabolici, energetici ed economici, ha consentito di delineare un quadro completo delle potenzialità e delle criticità dei processi studiati, evidenziando le condizioni operative e i meccanismi che ne determinano l’efficienza complessiva.

L’analisi dei sistemi bioelettrochimici ha mostrato come la configurazione catodica, la stabilità del biofilm e la gestione dell’idrogeno rappresentino i fattori determinanti per la selettività della via *Wood–Ljungdahl*. Il confronto tra i due catodi ha evidenziato differenze strutturali e funzionali marcate: il Catodo B si è dimostrato più stabile, selettivo ed efficiente, con una migliore utilizzazione dell’H₂ e una minore competizione metabolica, mentre il Catodo A ha mostrato una fisiologia più instabile, caratterizzata da oscillazioni di pH, accumulo di H₂ non utilizzato, maggiore produzione di CH₄ e formazione di AGV non acetici. Questi risultati confermano che la stabilità del microambiente catodico è essenziale per massimizzare la resa acetogenica e minimizzare la dispersione degli elettroni verso *pathway* indesiderati.

L’analisi energetica ed economica ha ulteriormente rafforzato tali evidenze, mostrando come il Catodo B richieda un minor input elettrico per unità di acetato prodotto e presenti costi di produzione inferiori. Sebbene la tecnologia BES non sia ancora competitiva rispetto ai processi chimici convenzionali, la loro capacità di operare a basse condizioni operative, utilizzare CO₂ come substrato e integrarsi con fonti rinnovabili li rende tecnologie promettenti in scenari di economia circolare e di cattura e valorizzazione del carbonio.

L’integrazione con i fotobioreattori microalgali ha dimostrato la possibilità di utilizzare l’acetato prodotto nei BES come fonte di carbonio ridotto per sostenere la crescita microalgale in condizioni eterotrofiche. Le microalghe hanno mostrato una risposta fisiologica modulabile in funzione della disponibilità di acetato e della presenza o assenza di batteri, evidenziando un incremento della biomassa e una variazione della composizione pigmentaria e metabolica. Tali caratteristiche rendono la biomassa microalgale un substrato di interesse per applicazioni biotecnologiche ad alto valore aggiunto.

In particolare, l’elevato contenuto lipidico ottenibile nei cicli eterotrofi apre prospettive concrete per la produzione di biodiesel. I lipidi microalgali possono essere convertiti in FAME mediante transesterificazione, processo chimico centrale nella filiera dei biocarburanti avanzati. L’integrazione BES–microalghe configura quindi una bioraffineria ibrida, in cui l’acetato funge da

vettore di carbonio per la sintesi di biocarburanti sostenibili, contribuendo alla transizione verso sistemi energetici a basse emissioni.

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che l'accoppiamento tra sistemi bioelettrochimici e colture microalgali costituisce una piattaforma sinergica, capace di coniugare la fissazione della CO₂, la produzione di composti organici e la generazione di biomassa ad alto valore aggiunto. Le evidenze sperimentali raccolte forniscono una base solida per futuri sviluppi, orientati all'ottimizzazione dei materiali elettrodici, al miglioramento del trasferimento di massa dell'H₂, alla riduzione della metanogenesi e alla valorizzazione della biomassa microalgale in bioraffinerie integrate.

Questa tesi dimostra che l'integrazione tra processi bioelettrochimici e colture microalgali non rappresenta soltanto un avanzamento scientifico, ma una prospettiva concreta per la realizzazione di sistemi sostenibili di produzione e valorizzazione del carbonio, con ricadute significative in ambito energetico, ambientale e industriale.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, A.L., Yasin, N.M.H., Derek, C.J.C. & Lim, J.K. (2011). *Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15(1), 584–593. DOI: 10.1016/j.rser.2010.09.018
- Amin, S. (2009). *Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae*. Energy Conversion and Management, 50(7), 1834–1840. DOI: 10.1016/j.enconman.2009.04.005
- Aqualgae (2023). *Acrylic tubular photobioreactor systems: Technical specifications and integrated software user guide*. Viana do Castelo: Aqualgae.
- ATCC (2024). *ATCC Medium 1754: PETC Medium formulation and preparation guidelines*. Manassas, VA: ATCC.
- Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Dominguez Benneton, X., Strik, D.P.B.T.B. & Sarma, P.M. (2017). *Carbon dioxide recycling with microbial electrosynthesis (MES): a review*. Journal of Cleaner Production, 148, 92–107. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.01.010
- Bertaglia, M., Gandiglio, M., Lanzini, A., Santoro, C. & Colombo, E. (2024). *Environmental lifecycle assessment of metallic vs. carbon electrodes in bioelectrochemical systems*. Resources, Conservation and Recycling, 201, 107312. DOI: 10.1016/j.resconrec.2023.107312
- Bosire, E.M. & Rosenbaum, M.A. (2017). *Electrochemical potential influences phenazine production and electron transfer in Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Microbiology, 8, 892. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00892
- Cavallini, C. (2021). *Coltivazione di microalghe per la biofissazione della CO₂*. Rassegna delle Energie Rinnovabili, 14(2), 45–58. DOI: 10.36253/rer-142-2021-05
- Chang, J., Li, W., Zhang, H., Liu, H. & Wang, J. (2021). *Surface modification strategies to overcome hydrophobicity of carbonaceous materials in microbial fuel cells*. Chemosphere, 274, 129910. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129910
- Chen, Y., Feng, Y., Wang, X., Wang, Y. & Quan, X. (2020). *pH driven selective inhibition of methanogenesis for enhanced acetate accumulation in microbial electrosynthesis*. Bioresource Technology, 312, 123567. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123567
- Cheng, S., Xing, D., Call, D.F. & Logan, B.E. (2009). *Direct growth of methanogens on a cathode for electromethanogenesis*. Environmental Science & Technology, 43(10), 3953–3958. DOI: 10.1021/es803531g
- Chisti, Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Advances, 25(3), 294–306. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Choi, O. & Sang, B.I. (2016). *Microbial electrosynthesis: sustainable platform for CO₂ conversion*. Biotechnology for Biofuels, 9, 74. DOI: 10.1186/s13068-016-0485-4
- Chojnacka, K. & Marquez Rocha, F.J. (2004). *Energy and carbon metabolism in Chlorella vulgaris grown on acetic acid*. Electronic Journal of Biotechnology, 7(1), 40–49. DOI: 10.2225/vol7-issue1-fulltext-7
- Christodoulou, X., Velasquez Orta, S.B., Parry, S., McAdam, E. & Graham, D.W. (2021). *Economic viability of microbial electrosynthesis*. Frontiers in Energy Research, 9, 670154. DOI: 10.3389/fenrg.2021.670154
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P. & Del Borghi, M. (2009). *Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 48(6), 1146–1151. DOI: 10.1016/j.cep.2009.06.003

- Cristiani, L., Frattini, A., Villa, M., Colombo, A., Zeppilli, A. & Majone, M. (2024). *Membrane assisted separation of volatile fatty acids from thermally pre-treated bioelectrochemical effluents*. Separation and Purification Technology, 330, 125432. DOI: 10.1016/j.seppur.2023.125432
- Dai, L., Li, Y., Zhang, X., Liu, J. & Wang, Y. (2021). *Advances in microbial electrosynthesis: cathode materials and reactor design*. Chemical Engineering Journal, 418, 129382. DOI: 10.1016/j.cej.2021.129382
- Demirbas (2011) Demirbas, A. (2011). *Biodiesel from oilgae*. Energy Conversion and Management, 52(4), 1621–1633. DOI: 10.1016/j.enconman.2010.09.027
- Dessie, W., Alam, M.Z., Sattar, M.A., Hossain, M.A. & Rahman, M.M. (2020). *Internal resistance in microbial fuel cells*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 134, 110382. DOI: 10.1016/j.rser.2020.110382
- Deutz, S., Bardow, J., Fröhling, M.B., Schultmann, F. & Bardow, A. (2018). *Microbial electrosynthesis: towards sustainable production of chemicals from carbon dioxide*. Current Opinion in Biotechnology, 50, 121–128. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.12.003
- Diehl, K. & Randel, G. (2007). *Fatty acid methyl ester characterization via gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) for biodiesel compliance*. Journal of Chromatographic Science, 45(6), 312–320. DOI: 10.1093/chromsci/45.6.312
- Ding, Y., Li, X., Li, Y., Wang, J. & Liu, H. (2020). *Enhanced acetate production from carbon dioxide by microbial electrosynthesis with a novel cathode*. Bioresource Technology, 310, 123439. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123439
- Dolch, K., Danilov, A., Plotnikov, A., Seibold, M. & Schröder, U. (2014). *Microbial fuel cells: fundamentals and recent developments in electrogenic biofilm applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 98(16), 6911–6921. DOI: 10.1007/s00253-014-5866-9
- Drake, H.L. (1994). *Acetogenesis*. Springer-Verlag, New York.
- EAI – Energia, Ambiente e Innovazione (2022). *Focus Microalghe: biocarburanti avanzati*. ENEA, Roma.
- Ebrahim, A., Brileya, K., Keller, K., Wallace, A., Fields, M.W. & Schröder, U. (2016). *Microbial electrosynthesis: a review of recent developments and future perspectives*. Biotechnology Advances, 34(7), 1125–1139. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.002
- ElMekawy, A., Hassan, S., Kim, K., Hegab, H. & Pant, D. (2018). *Microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide: effects of cathode potential and carbon source*. Electrochimica Acta, 260, 111–118. DOI: 10.1016/j.electacta.2017.12.052
- European Commission (2021). *Fit for 55: delivering the EU's 2030 climate target*. Communication from the Commission, COM(2021) 550 final, Brussels.
- Fan, Y., Zhang, H., Li, Y., Wang, J. & Liu, H. (2021). *Carbon based materials for electrodes in bioelectrochemical systems: structure, performance, and future perspectives*. Journal of Materials Chemistry A, 9(15), 9412–9435. DOI: 10.1039/D0TA11763A
- Fan, Y., Zhang, H., Li, Y., Wang, J. & Liu, H. (2022). *Microbial electrosynthesis of acetate from CO₂: a review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 160, 112280. DOI: 10.1016/j.rser.2020.112280
- Fei, Q., Fu, Y., Li, J., Wang, Y. & Liu, Y. (2015). *Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by Auxenochlorella protothecoides for biodiesel production*. Process Biochemistry, 50(12), 2145–2152. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.09.013
- Feng, H., Lee, H., Li, X., Liu, J. & Zhang, Y. (2016). *TiO₂ nanotube arrays on titanium as high performance bioanodes for microbial fuel cells*. Electrochimica Acta, 190, 643–650. DOI: 10.1016/j.electacta.2015.12.105
- Feng, Y., Gao, Y., Li, X., Wang, J. & Liu, H. (2021). *Effects of cathode potential and carbon source on microbial electrosynthesis of acetate from CO₂*. Electrochimica Acta, 367, 137423. DOI: 10.1016/j.electacta.2020.137423

- Formighieri, C. & Bassi, R. (2014). *Mechanisms of photoacclimation and photoinhibition in microalgae*. *Photosynthesis Research*, 121(2), 243–254. DOI: 10.1007/s11120-014-0046-0
- Gao, C., Wang, Y., Shen, Y., Tong, X., Liu, J. & Li, Y. (2014). *Metabolic shifts in the heterotrophic culture of *Auxenochlorella protothecoides* using volatile fatty acids as carbon sources*. *BMC Biotechnology*, 14, 63. DOI: 10.1186/1472-6750-14-63
- Gao, D., Zhai, Y., Ding, Y., Feng, Y., Liu, H. & Wang, J. (2020). *Enhanced microbial electrosynthesis of acetate from carbon dioxide using a novel cathode material*. *Chemical Engineering Journal*, 389, 124340. DOI: 10.1016/j.cej.2020.124340
- Gao, Y., Wang, J., Liu, H., Feng, Y., Li, Y. & Zhang, H. (2013). *Competition between acetogens and methanogens under different cathode potentials in microbial electrosynthesis systems*. *Bioresource Technology*, 142, 118–124. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.016
- Gineys, M., Bazin, C., Ayral, A., Cretin, M. & Innocent, C. (2017). *Activated carbon cloth electrodes for microbial fuel cells: influence of surface functionalities*. *Electrochemistry Communications*, 78, 12–16. DOI: 10.1016/j.elecom.2017.03.010
- Gouveia, L. & Oliveira, N.M. (2009). *Microalgae for biofuels*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 269–278. DOI: 10.1007/s10295-008-0495-6
- Gouveia, L., Marques, A.E., da Silva, T.L. & Reis, A. (2014). *High value compounds from microalgae: pathways, extraction and applications*. *Journal of Biotechnology*, 185(Suppl.), S45–S46. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.034
- Gralnick, J.A. & Bond, D.R. (2023). *Direct electron transfer via cytochromes*. *Current Opinion in Biotechnology*, 79, 102845. DOI: 10.1016/j.copbio.2023.102845
- Greenfield, E. (2023). *Advanced Biofuels and Fourth Generation Biorefineries*. Academic Press.
- Gunawan, C., Teo, T., Chew, K.W., Yap, Y.J., Ling, T.C. & Show, P.L. (2018). *Effects of light intensity on the growth and phytoremediation performance of *Chlorella vulgaris**. *International Journal of Phytoremediation*, 20(8), 811–817. DOI: 10.1080/15226514.2018.1438357
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. (2008). *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*. *The Plant Journal*, 54(4), 621–639. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x
- Hui, X., Zhang, L., Chen, Y., Wang, S., Li, J. & Zhao, F. (2023). *Biodegradable composite electrodes for sustainable bioelectrochemical systems*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 11(14), 5412–5423. DOI: 10.1021/acssuschemeng.2c07052
- Ibrahim, A., Zhang, Y., Chen, X., Li, J., Wang, S. & Zhao, F. (2023). *Advances in biocatalysts for microbial electrosynthesis: current progress and future perspectives*. *Chemical Engineering Journal*, 452, 139210. DOI: 10.1016/j.cej.2022.139210
- IPCC (2022). *Climate Change 2022: Mitigation of Climate Change*. Cambridge University Press.
- ISPRA (2024). *Rapporto Stato dell'Ambiente*. Roma: ISPRA.
- Italy for Climate (2023). *Roadmap per la neutralità climatica*. Roma.
- Italy for Climate (2025). *Rapporto annuale sul clima*. Roma.
- Johnson, M., Smith, R., Patel, A., Nguyen, T. & Brown, L. (2014). *Carbon capture and storage (CCS) vs. utilization (CCU): technological readiness and environmental impact assessment*. *Environmental Science & Policy*, 42, 115–128. DOI: 10.1016/j.envsci.2014.05.003
- Jourdin, L., Freguia, S., Donose, B.C. & Keller, J. (2016). *Modifying carbon brick electrodes to enhance microbial electrosynthesis of acetate from CO₂*. *Bioresource Technology*, 200, 125–133. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.09.091
- Kadier, A., Simayi, Y., Abdeslahian, P., Azman, N.F., Hamid, A.A., Kalil, M.S. & Mohamad, M. (2016). *Scalability of microbial electrolysis cells and microbial electrosynthesis systems: challenges and perspectives*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(30), 12901–12920. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2016.05.256
- Katuri, K.P., Kalathil, S., Ragab, A., Bian, X., Alqahtani, M.F., Wang, L. & Saikaly, P.E. (2020). *3D porous electrodes for enhanced biofilm development in bioelectrochemical systems*. *Current Opinion in Electrochemistry*, 22, 114–122. DOI: 10.1016/j.coelec.2020.05.009
- Kendirlioglu, G., Yildiz, G., Eroglu, E. & Oktem, H.A. (2015). *Effects of photoperiod on the growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris**. *Journal of Applied Phycology*, 27(6), 2231–2238. DOI: 10.1007/s10811-014-0491-8
- Kimura, R. & Okabe, S. (2013). *Acetate utilization in MFC anodes*. *Water Research*, 47(14), 4911–4920. DOI: 10.1016/j.watres.2013.05.043

- Koffi, K. & Okabe, S. (2020). *Current imbalances in MECs*. Bioelectrochemistry, 135, 107543. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107543
- Koltysheva, E., Zolotova, E., Kolesnikova, A., Gribovskaya, I. & Plekhanov, V. (2020). *Heavy metal removal using algal biocathodes in bioelectrochemical systems*. Water Science and Technology, 82(9), 1823–1834. DOI: 10.2166/wst.2020.369
- Kretzschmar, J. & Harnisch, F. (2021). *EIS for biofilm characterization*. ChemElectroChem, 8(1), 12–25. DOI: 10.1002/celec.202001230
- Kumar, A., Hsu, L., Katuri, K.P., Chen, W., Leung, K.M.Y. & Venkata Mohan, S. (2017). *Extracellular electron transfer mechanisms in bioelectrochemical systems: a review*. Bioresource Technology, 244, 1302–1313. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.070
- Kumar, G., Bakonyi, P., Kobayashi, T., Xu, K., Tóth, G. & Nemestóthy, N. (2020). *Integration of bioelectrochemical systems with photobioreactors: recent advances and future perspectives*. Trends in Biotechnology, 38(11), 1245–1260. DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.04.007
- Kumar, G., Park, J.H., Kim, S.H., Pandey, A. & Thakur, I.S. (2021). *Integrated biorefineries from microalgae: current status and future prospects*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 145, 111102. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111102
- Kutscha, J. & Pflügl, S. (2021). *Microbial electrosynthesis of acetate*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 96(4), 841–857. DOI: 10.1002/jctb.6634
- LaBelle, E.V. & May, H.D. (2017). *Direct use of BES effluents*. Biotechnology and Bioengineering, 114(8), 1622–1631. DOI: 10.1002/bit.26294
- Lagioia, G., Calabrò, V., Curcio, S. & Iorio, G. (2011). *Microalgae for biodiesel production: an economic assessment*. Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy, 6(4), 345–353. DOI: 10.1080/15567240903436252
- Li, F., Wang, L., Liu, X., Chen, Y., Zhang, Y. & Zhao, F. (2018). *Enhancing extracellular electron transfer in Shewanella oneidensis MR-1 through synthetic biology approaches*. ACS Synthetic Biology, 7(5), 1312–1320. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00423
- Li, S., Chen, G., Zhang, Y., Wang, L., Liu, X. & Zhao, F. (2016). *Electrode material constraints and performance limitations in bioelectrochemical systems*. Journal of Power Sources, 324, 412–425. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2016.05.089
- Li, W., Yu, H., He, Z., Liu, X., Wang, L. & Zhang, Y. (2020). *Electron transfer mechanisms in microbial fuel cells: recent advances and future challenges*. Biosensors and Bioelectronics, 150, 111912. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111912
- Li, X., Chen, Y., Wang, L., Liu, X., Zhang, Y. & Zhao, F. (2021). *Enhancing lipid productivity in microalgae using effluents from bioelectrochemical systems*. Bioresource Technology, 332, 125112. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125112
- Li, Y., Han, D., Hu, G., Sommerfeld, M. & Hu, Q. (2011). *Overexpression of a type 2 diacylglycerol acyltransferase leads to lipid overaccumulation in Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnology and Bioengineering, 108(1), 47–56. DOI: 10.1002/bit.22918
- Lim, S.S., Kim, B.H., Park, J.H., Lee, J., Kim, S.H. & Venkata Mohan, S. (2017). *Microbial electrolysis cells for hydrogen production: recent advances and future perspectives*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 61, 548–567. DOI: 10.1016/j.rser.2016.12.056
- Logan, B.E. & Rabaey, K. (2012). *Conversion of wastes in BES*. Science, 337(6095), 686–690. DOI: 10.1126/science.1217412
- Logan, B.E., Rossi, R., Ragab, A., Saikaly, P.E. & Yu, H. (2019). *Microbial fuel cells: scale-up challenges and opportunities*. Environmental Science & Technology, 53(14), 7912–7925. DOI: 10.1021/acs.est.9b01109
- Logan, B.E., Rossi, R., Ragab, A., Saikaly, P.E. & Yu, H. (2019). *Electroactive microorganisms in bioelectrochemical systems*. Nature Reviews Microbiology, 17, 307–319. DOI: 10.1038/s41579-019-0189-3
- Louis, P. & Flint, H.J. (2017). *Formation of propionate and butyrate*. Environmental Microbiology, 19(1), 29–41. DOI: 10.1111/1462-2920.13589
- Lovley, D.R. & Nevin, K.P. (2011). *Review of microbial electrosynthesis*. Current Opinion in Biotechnology, 22(3), 441–448. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.01.009
- Ma, R., Zhang, X., Li, Y., Wang, L., Liu, X. & Chen, Y. (2014). *Temperature stress induced lipid accumulation in microalgae: physiological and biochemical responses*. Bioresource Technology, 154, 120–126. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.049
- Mahmoud, M., El Sayed, M., Hassan, H., El Shafai, S., El Sayed, S. & El Sayed, A. (2022). *Eggshell powder as a catalytic support for bioenergy applications: performance and characterization*. Biomass and Bioenergy, 159, 106412. DOI: 10.1016/j.biombioe.2022.106412

- Markou, G. & Nerantzis, E. (2013). *Microalgae for high value compounds*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 20, 410–422. DOI: 10.1016/j.rser.2012.12.029
- Marshall, C.W., Ross, D.E., Fichot, E.B., Norman, R.S. & May, H.D. (2012). *Sustainable biofuel production from carbon dioxide using microbial electrosynthesis*. Bioresource Technology, 120, 1–6. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.06.144
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. (2010). *Microalgae for biodiesel production: a review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(1), 217–232. DOI: 10.1016/j.rser.2009.07.020
- Mateos, R., Zepilli, M., Cristiani, P., Schievano, A. & Rago, L. (2023). *Headspace gas recirculation enhances carbon capture and conversion in microbial electrosynthesis*. Chemical Engineering Journal, 461, 141912. DOI: 10.1016/j.cej.2023.141912
- Meher, L.C., Vidya Sagar, D. & Naik, S.N. (2006). *Technical aspects of biodiesel production by transesterification — a review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 10(3), 248–268. DOI: 10.1016/j.rser.2004.09.002
- Miao, X. & Wu, Q. (2006). *Biodiesel from heterotrophic microalgae*. Bioresource Technology, 97(6), 841–846. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.05.003
- Min, B. & Logan, B.E. (2004). *Electricity generation from wastewater*. Environmental Science & Technology, 38(21), 5809–5814. DOI: 10.1021/es0491026
- Mohan, S.V., Velvizhi, G., Annie Modestra, J. & Srikanth, S. (2014). *Photosynthetic microbial electrochemical systems: mechanisms, design and applications*. Bioresource Technology, 156, 341–352. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.025
- Moinee, A. & Sanzida, S. (2021). *Carbon brushes for bioelectrochemical devices*. Journal of Applied Electrochemistry, 51(8), 1121–1135. DOI: 10.1007/s10800-021-01592-4
- Nevin, K.P., Woodard, T.L., Franks, A.E., Summers, Z.M. & Lovley, D.R. (2011). *Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide into fuels and chemicals*. mBio, 2(2), e00052-11. DOI: 10.1128/mBio.00052-11
- Nigam, P.S. & Singh, A. (2011). *Liquid biofuels from renewable resources*. Progress in Energy and Combustion Science, 37(1), 52–68. DOI: 10.1016/j.pecs.2010.01.003
- Novoselov, K.S., Fal'ko, V.I., Colombo, L., Gellert, P.R., Schwab, M.G. & Kim, K. (2012). *A roadmap for graphene*. Nature, 490(7419), 192–200. DOI: 10.1038/nature11458
- Ogawa, T. & Aiba, S. (1981). *Mixotrophic growth in Chlorella vulgaris*. Biotechnology and Bioengineering, 23(5), 1121–1132. DOI: 10.1002/bit.260230521
- Omidi, M., Rahimnejad, M., Najafpour, G.D., Ismail, M., Ghoreyshi, A.A. & Younesi, H. (2024). *Life cycle assessment and resource extraction impacts of precious and non-precious metal catalysts in bioelectrochemical systems*. Journal of Environmental Management, 351, 119842. DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.119842
- Orofino, F. (2020). *Sistemi colturali microalgali avanzati*. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, 97(3), 165–174.
- Patel, A., Li, Y., Wang, J., Zhang, H. & Liu, H. (2018). *Transcriptomic analysis of metabolic pathways associated with lipid lipogenesis during heterotrophic growth of microalgae*. Algal Research, 35, 411–423. DOI: 10.1016/j.algal.2018.09.003
- Perez Garcia, O., Escalante, F.M., de Bashan, L.E. & Bashan, Y. (2011). *Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential applications*. Water Research, 45(11), 3409–3436. DOI: 10.1016/j.watres.2011.04.012
- Pfromm, P.H., Amanor-Boadu, V., Nelson, R., Vadlani, P. & Madl, R. (2011). *Bio-butanol vs. bio-ethanol: a technical and economic assessment for corn and switchgrass*. Biomass and Bioenergy, 35(1), 326–336. DOI: 10.1016/j.biombioe.2010.08.030
- Potter, M.C. (1911). *Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, 84(571), 260–276.
- Rabaey, K. & Rozendal, R.A. (2010). *Microbial electrosynthesis — revisiting the electrical route for microbial production*. Nature Reviews Microbiology, 8(10), 706–716. DOI: 10.1038/nrmicro2422
- Rabaey, K., Verstraete, W., Keller, J. & Freguia, S. (2006). *Microbial fuel cells for wastewater treatment and energy recovery: broadening the application spectrum*. Biotechnology Letters, 28(19), 1531–1540. DOI: 10.1007/s10529-006-9156-6
- Ragsdale, S.W. (2008). *Enzymology of the Wood–Ljungdahl pathway of acetogenesis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1125, 129–136. DOI: 10.1196/annals.1419.015
- Ragsdale, S.W. & Wood, H.G. (1985). *Acetate synthesis by Clostridium thermoaceticum: pathway of acetyl-CoA synthesis*. Journal of Biological Chemistry, 260(7), 3970–3977.

- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T. & Bux, F. (2011). *Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production*. *Applied Energy*, 88(10), 3411–3424. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.03.017
- Reichardt, N., Deppenmeier, U. & Wiegel, J. (2014). *Phylogenetic and functional analysis of propionate-producing bacteria in anaerobic ecosystems*. *ISME Journal*, 8, 1323–1337. DOI: 10.1038/ismej.2014.15
- Richmond, A. (ed.) (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science, Oxford.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y. (1979). *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria*. *Journal of General Microbiology*, 111(1), 1–61. DOI: 10.1099/00221287-111-1-1
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. & Tredici, M.R. (2009). *Microalgae for oil production and lipid accumulation under nutrient limitation*. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112. DOI: 10.1002/bit.22033
- Rosemount (2024). *Integrated control valves for precision gas delivery systems: Reference guide*. Emerson Automation Solutions.
- Roy, S., Das, A., Ghosh, S., Banerjee, S. & Mukherjee, A. (2022). *Critical review on material properties of electrodes*. *Materials Today Sustainability*, 18, 100122. DOI: 10.1016/j.mtsust.2022.100122
- Sander, R. (2015). *Compilation of Henry's law constants (version 4.0)*. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15(8), 4399–4439. DOI: 10.5194/acp-15-4399-2015
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B. & Ieropoulos, I. (2017). *Microbial fuel cells: from fundamentals to applications*. *Journal of Power Sources*, 356, 225–244. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2017.03.109
- Saratale, R.G., Kumar, G., Banu, R., Xia, A., Periyasamy, S. & Dattatray Saratale, G. (2017). *Algal biocathodes in photo-bioelectrochemical systems*. *Chemical Engineering Journal*, 322, 512–524. DOI: 10.1016/j.cej.2017.04.048
- Schenk, P.M., Thomas Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussnug, J.H., Posten, C., Kruse, O. & Hankamer, B. (2008). *Second generation biofuels: high efficiency microalgae*. *BioEnergy Research*, 1(1), 20–43. DOI: 10.1007/s12155-008-9008-8
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. (2012). *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089
- Schoen, D.D., de Jaeger, L., Eggink, G., Wijffels, R.H. & Martens, D.E. (2019). *Kinetic model for lipid accumulation in Chlorella sorokiniana*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–15. DOI: 10.1186/s13068-019-1385-8
- Seselj, N., Gajda, I., Stamatini, I., Hnát, J., Paidar, M. & Bouzek, K. (2015). *Graphene-based nanocomposites as electrocatalysts*. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 1035–1041. DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.018
- Shabani, M., Ghasemi, M., Dastgheib, S.M.M., Alavi, S.M. & Zarei, M. (2020). *Nafion vs. SPEEK membranes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(21), 12110–12122. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2020.02.137
- Sharma, P., Ghosh, S., Venkatesh, K. & Mohan, S.V. (2019). *Microbial desalination cells*. *Desalination*, 462, 45–62. DOI: 10.1016/j.desal.2019.05.004
- Sharma, R., Gupta, A., Singh, S. & Kumar, P. (2024). *Biodegradability of biomass-derived carbon electrodes*. *Science of The Total Environment*, 906, 167412. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.167412
- Shetty, P., Varjani, S., Kim, S.H., Rene, E.R. & Wong, J.W.C. (2019). *Salinity and nutrient stress induced lipid accumulation*. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100214. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.100214
- Singh, J. & Gu, S. (2010). *Commercialization potential of microalgae*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), 2596–2610. DOI: 10.1016/j.rser.2010.06.014
- Solovchenko, A.E. (2012). *Photoprotective function of microalgal lipids*. *Phycologia*, 51(4), 461–470. DOI: 10.2216/11-106.1
- Steinbusch, L.W., Hamelers, H.V.M., Schaap, J.D., Kampman, C. & Buisman, C.J.N. (2010). *Bioelectrochemical ethanol production*. *Environmental Science & Technology*, 44(1), 513–517. DOI: 10.1021/es903183w
- Sun, D., Li, Y., Wang, J., Zhang, H. & Liu, H. (2019). *Electricity generation and nutrient removal*. *Bioelectrochemistry*, 129, 88–95. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2019.06.004
- Sustainable Energy & Fuels (2022). *Two-stage coupling of MES effluents with heterotrophic microalgae*. *Sustainable Energy & Fuels*, 6(8), 1912–1925. DOI: 10.1039/D2SE00290A
- Takagi, M., Karseno & Yoshida, T. (2006). *Salt concentration effects on Dunaliella*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(3), 223–226. DOI: 10.1263/jbb.101.223

- Tang, H., Zhang, H., Li, Y., Wang, J. & Liu, H. (2020). *Graphene-based materials for enzyme immobilization*. *Biomaterials*, 240, 119852. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.119852
- Tetzlaff, G. (2009). *Global energy systems and climate consequences*. *Meteorologische Zeitschrift*, 18(2), 123–131. DOI: 10.1127/0941-2948/2009/0379
- Thermo Scientific (2023). *High purity carbon felt (99.0%): MSDS and specifications*.
- Thurmond, W. (2011). *Algae Biofuels: International Market Forecasts and Technologies to 2030*. Emerging Markets Online.
- Tiwari, B.R. & Ghangrekar, M.M. (2015). *Pretreatment strategies to suppress methanogenesis*. *International Journal of Green Energy*, 12(8), 811–818. DOI: 10.1080/15435075.2014.880147
- Torres, C.I., Krajmalnik-Brown, R., Parameswaran, P., Marcus, A.K., Wanger, G., Gorby, Y.A. & Rittmann, B.E. (2009). *Kinetic framework for electroactive biofilms*. *Environmental Science & Technology*, 43(24), 9519–9524. DOI: 10.1021/es902367e
- UTEX (2025). *Culture Collection of Algae: Chlorella sorokiniana UTEX 2805*. University of Texas at Austin.
- Vitova, M., Bisova, K., Kawano, S., Zachleder, V. & Cizkova, M. (2014). *Transesterification pathways and biodiesel properties*. *Fuel*, 130, 110–116. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.04.048
- Wang, H. & Ren, Z.J. (2013). *Cyber-physical features and security challenges in BES*. *Trends in Biotechnology*, 31(10), 564–572. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.06.009
- Wellburn, A.R. (1994). *Spectral determination of chlorophylls and carotenoids*. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2
- Widjaja, A., Chien, C.C. & Ju, Y.H. (2009). *Increasing lipid production in Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13–20. DOI: 10.1016/j.jtice.2008.07.002
- Wu, L., Zhang, H., Li, Y., Wang, J. & Liu, H. (2013). *Light quality and photoperiod effects*. *Bioresource Technology*, 140, 420–425. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.04.077
- Xin, L., Hong Ying, H., Ke, G. & Ying Xue, S. (2010). *Nitrogen and phosphorus effects on Scenedesmus*. *Bioresource Technology*, 101(14), 5494–5500. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.123
- Xu, J., Li, Y., Wang, J., Zhang, H. & Liu, H. (2015). *Engineering limitations in MES*. *Biotechnology Letters*, 37(9), 1721–1730. DOI: 10.1007/s10529-015-1864-4
- Yadav, G., Kumar, G., Gupta, S., Dattatray Saratale, G. & Banu, R. (2020). *Carotenoid and astaxanthin production strategies*. *Bioresource Technology*, 310, 123415. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123415
- You, S., Zhao, Q., Zhang, J., Jiang, J. & Zhao, S. (2006). *Graphite granule membrane-less MFC*. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(7), 1511–1517. DOI: 10.1016/j.bios.2006.06.024
- Zhang, X., Li, Y., Wang, Z., Chen, G. & Zhao, H. (2022). *Two-stage coupling of MES effluents with heterotrophic microalgae*. *Sustainable Energy & Fuels*, 6(8), 1912–1925. DOI: 10.1039/D2SE00290A
- Zaybak, Z., Logroño, W., Harnisch, F. & Holtmann, D. (2013). *Growth of Sporomusa ovata on cathode with bicarbonate*. *Environmental Science & Technology Letters*, 1(1), 101–105. DOI: 10.1021/ez4001033
- Zeppilli, M., Paiano, P., Majone, M. & Santoro, C. (2020). *Thermal shock pretreatment to select acetogenic consortia*. *Bioresource Technology*, 314, 123720. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123720