



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

Scienze biologiche

*«Pila a combustibile microbica fotosintetica (PMFC):  
sinergia tra batteri e alghe per il trattamento delle acque  
reflue e bioraffineria»*

*«Photosynthetic microbial fuel cell (PMFC): synergy between  
bacteria and algae for wastewater removal and biorefinery»*

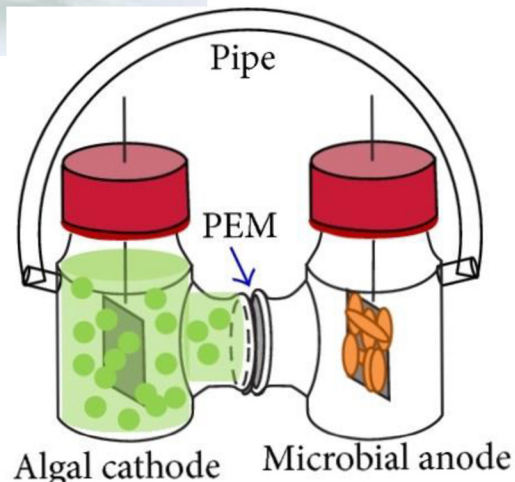
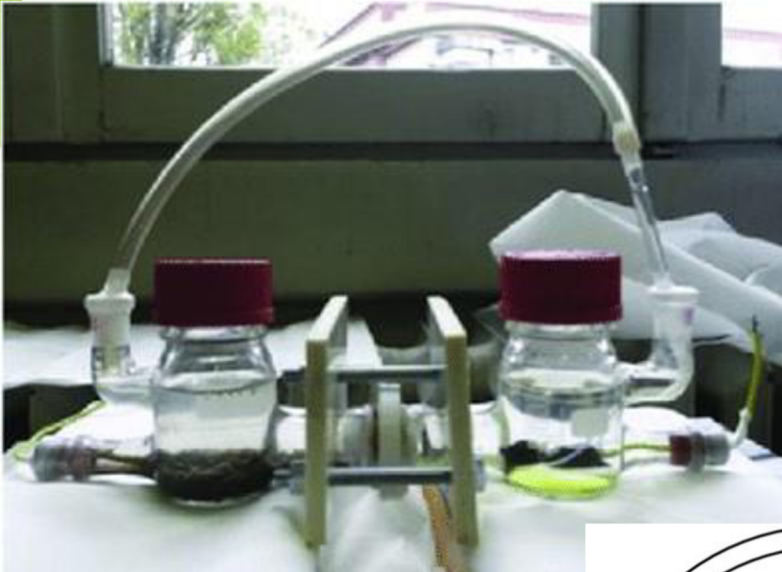
Tesi di Laurea di:  
Vernelli Silvia

Docente Referente  
Chiar.mo Prof.  
Norici Alessandra

**Sessione Straordinaria supplementare Maggio 2023  
Anno Accademico 2022/2023**

# Pila a combustibile microbica

## Photosynthetic microbial fuel cell



## Vantaggi nell'utilizzo delle alghe nelle PMFC:

- eliminazione di un macchinario per la produzione di ossigeno
- produzione di biomassa algale e prodotti di valore derivanti da essa (carotenoidi e lipidi)

## Perché le alghe?

- sostenibili dal punto di vista economico (CO<sub>2</sub> e luce)
- sostenibili dal punto di vista ambientale (CO<sub>2</sub>)
- eccellente efficienza fotosintetica
- necessitano di meno acqua delle colture terrestri
- alcuni ceppi hanno alto contenuto lipidico
- possono accumulare metaboliti secondari di valore

# Come funziona una PMFC

Ceppo di microalghe usato:  
*Scenedesmus acutus* PVUW12  
I batteri all'anodo producono CO<sub>2</sub> come prodotto ossidato di un substrato organico (acqua reflua)

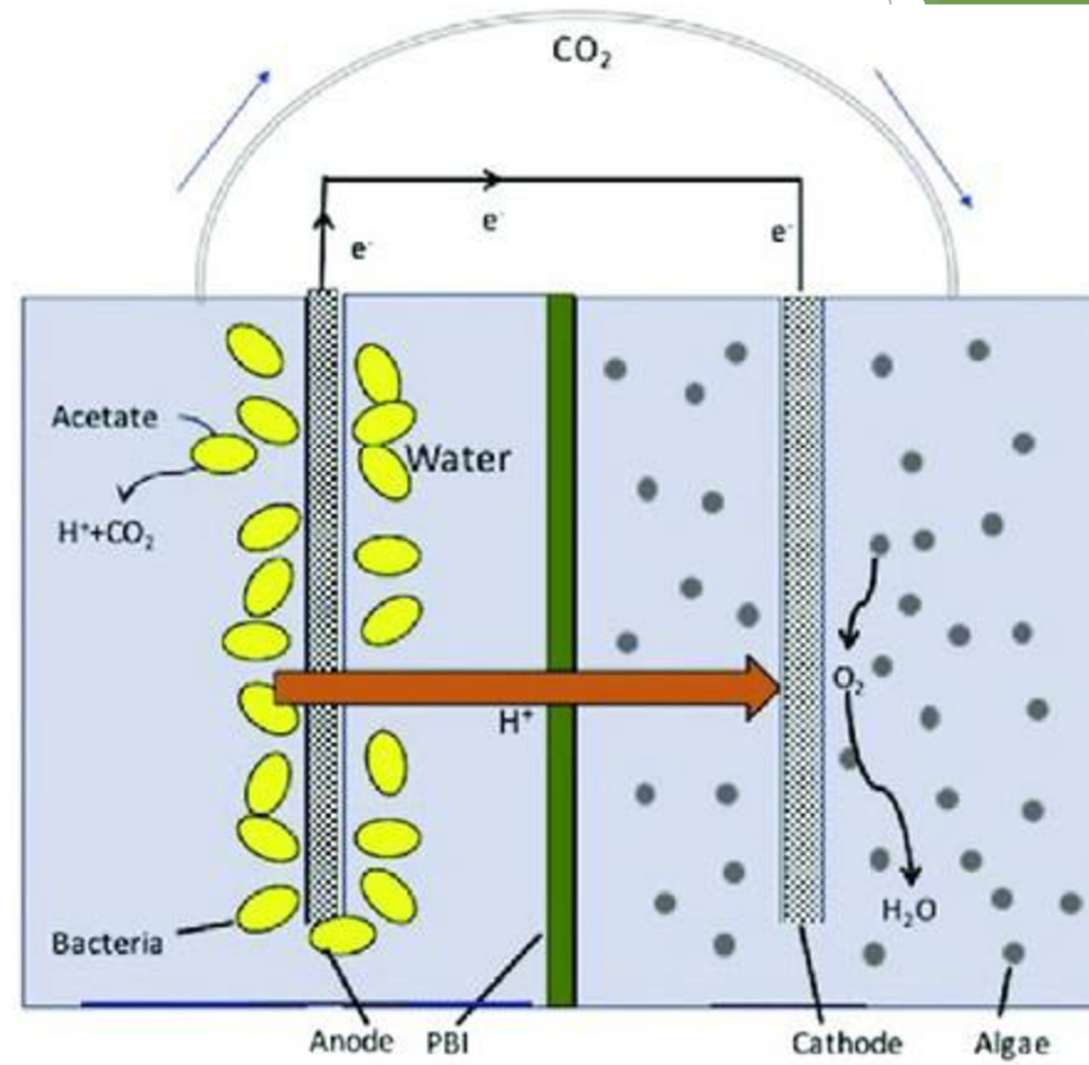
Organico → CO<sub>2</sub> + H<sup>+</sup> + e<sup>-</sup>

Al catodo le microalghe usano la CO<sub>2</sub> per fare la fotosintesi e producono O<sub>2</sub>

CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + luce → biomassa + O<sub>2</sub>

L'ossigeno funge da accettore degli elettroni e dei protoni

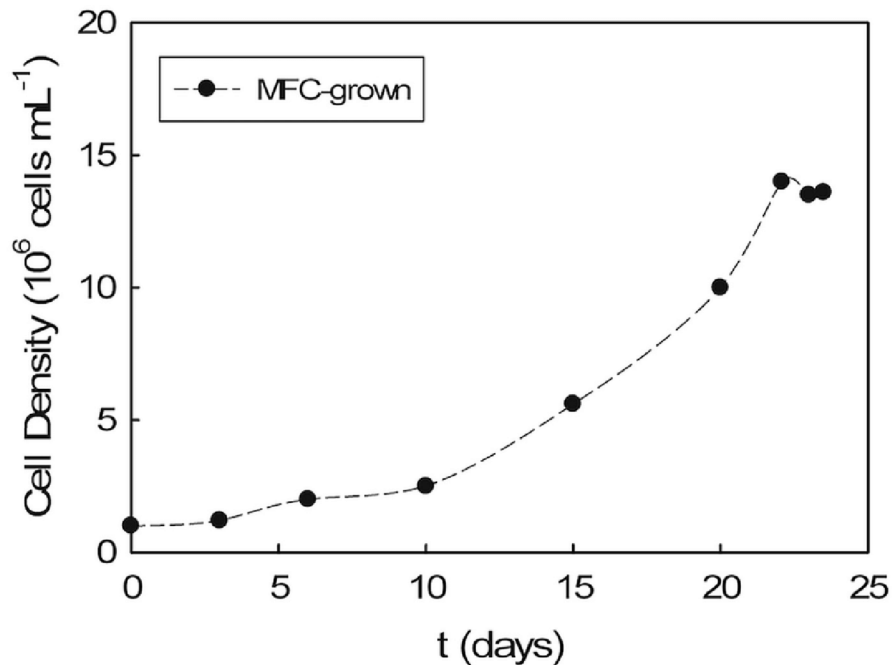
2O<sub>2</sub> + 4H<sup>+</sup> + 4e<sup>-</sup> → 2H<sub>2</sub>O



# Biomassa e prodotti di valore

Alge cresciute sotto continua illuminazione e nutrite con la CO<sub>2</sub> prodotta dai batteri.

La popolazione cresce secondo il grafico



Processo di crescita quasi esponenziale.

Dopo circa 22 giorni decresce a causa delle condizioni ambientali limitanti (stress ossidativo e carenza di nutrienti)

Alto tasso di crescita di 0.17 cellule/mL giorno dovuto all'abbondante CO<sub>2</sub> prodotta dai batteri che sostiene sia la crescita che l'accumulo di sostanze di valore.

Quando la popolazione decresce le alge vengono raccolte, separate dall'acqua per centrifugazione e un nuovo inoculo viene posto nella camera catodica.



## Come vengono estratti i carotenoidi e i lipidi

I campioni vengono centrifugati a 3000rpm x 10 minuti e il pellet risultante viene seccato a 50° C per 48 h.

La biomassa secca viene pesata e macinata finissima usando azoto liquido in un mortaio.

Aggiunta di 3,5 mL di una soluzione 2:2:1 v/v/v di cloroformio/metanolo/dietil estere, scossa per 5 minuti e sonicata per 10 minuti.

La soluzione ottenuta viene trasferita in imbuti separatori e vengono aggiunti 3mL di una soluzione di cloroformio e metanolo 2:1 v/v che opera come estrattore di lipidi. Vengono poi aggiunti 3mL di cloruro di sodio 5% v/v e gli imbuti vengono scossi prima di lasciare per 15 minuti le fasi a separare.

Lo strato inferiore viene collocato in una provetta e lasciato evaporare a secchezza usando un vuoto di velocità.

Il campione viene sospeso con 1mL di esano.

## Analisi quantitativa dei pigmenti

Analizzati tramite HPLC perché poco volatili.  
Fase mobile A: soluzione metanolo/acetato di ammonio 1 M (80/20 v/v)  
Fase mobile B: soluzione di metanolo/acetone (80/20 v/v)  
La portata era di 1.0mL/min

## Analisi qualitativa acidi grassi

Utilizzo della cromatografia su strato sottile (TLC)  
Fatta su gel di silice prerivestito e con l'uso di un solvente di esano/dietil etere/acido acetico (170:30:2, v/v/v). Lo strato è stato fatto con 0.20mm di gel di silice con un indicatore fluorescente.

## Analisi quantitativa acidi grassi

Analizzati tramite cromatografia a gas (GC) e spettrometria di massa (MS).  
Reazione di transesterificazione che converte gli acidi grassi in acidi grassi metilati.

Le condizioni imposte per la GC sono:

- Colonna capillare Restek. Rtx-5MS 30m x 0.25mm x 0.25µm spessore del film
- Temperatura forno 45°C x 4min; 13°C/min fino a 175°C x 27min; 4°C/min fino a 215°C x 35min
- Iniettore PTV: CT split di 250°C, flusso diviso 10mL/min
- Linea di trasferimento: 250°C
- Carrier gas: He, 1mL/min a flusso costante

Lo spettrometro di massa utilizzava:

- Sorgente di ioni a 250°C
- Modalità di ionizzazione EI di 70 eV
- Modalità scanner in full scan
- Range di massa 35-650Da
- Frequenza di scansione di 803.7amu/sec

Per valutare l'efficienza nella produzione, i risultati sono comparati con quelli ottenuti coltivando lo stesso ceppo in un fotobioreattore alle stesse condizioni di luce, temperatura e pH.

### CAROTENOIDI

Molto rilevanti i valori di luteina(3.8 mg/g<sub>dw</sub>), significanti di astaxantina, violaxantina e cantaxantina.

Nel fotobioreattore si trova solo la luteina in quantità pari a quasi la metà di quelle presenti nella PMFC.



Le condizioni di grande stress ossidativo della PMFC stimolano le alghe a:

- produrre i carotenoidi, che hanno un importante ruolo antiossidante per proteggere i fotosistemi dallo stress ossidativo
- Accumulare lipidi come sostanze di riserva

### LIPIDI

Contenuto totale maggiore che nel fotobioreattore (49% del peso secco contro i 6%) e concentrazione di acidi grassi maggiore anche di quella ottenuta in un fotobioreattore con ambiente N-stressante(32% del peso secco). Perlopiù nel range di C16-C18 con alcuni C14 e C20-C22.

La predominanza di C16 e C18 è un indice del potenziale uso di *Scenedesmus acutus* coltivato in PMFC per la produzione di materia prima per biocarburanti.

# Generazione di bioenergia

Differenze tra le prestazioni di PMFC che utilizzano catodi di carbonio privi di metalli preziosi e catodi rivestiti tramite una diffusione di gas a base di platino.

Il platino infatti funge da catalizzatore per la reazione di ossido riduzione che avviene al catodo e conseguentemente aumenta la densità di energia (PD) prodotta dalla cella.

Le celle Pt-free generano un massimo di  $170\text{mW/m}^3$  e poi si stabilizzano sui  $108\text{mW/m}^3$   
Quelle basate sul Pt hanno un massimo di  $1200\text{mW/m}^3$  e si stabilizzano sui  $400\text{mW/m}^3$

Anche la tensione a circuito aperto risulta maggiore nelle celle aventi la copertura di platino con valori di  $0.6\text{V}-0.8\text{V}$  contro i  $0.35\text{V}-0.5\text{V}$  delle celle prive.

La cella con il Pt presenta però un problema per quanto riguarda la formazione e accumulo di cristalli o agglomerati sulla superficie elettroattiva del catodo che vanno a influire sulle performance della cella che tendono a diminuire durante il tempo più velocemente rispetto alla cella con il catodo di carbonio.



# Trattamento delle acque reflue

L'efficienza del trattamento delle acque reflue è misurata tramite la misurazione della domanda chimica di ossigeno (COD)

Entrambe le celle presentano una rilevante efficienza nel trattare le acque, mostrando una riduzione del COD superiore all'87% nei primi 19 giorni

MA

la cella che presenta il Pt sul catodo raggiunge una energia normalizzata raccolta (NER) maggiore.

$$\text{NER} = \frac{\text{PD} \times t}{\Delta \text{COD}t}$$

dove PD è la densità di energia

e  $\Delta \text{COD}t$  è la COD rimossa durante il tempo t

L'efficienza della cella risulta maggiore e ciò può mitigare il costo della presenza del metallo prezioso.

La PMFC osservata presenta quindi una significativa efficienza nella crescita della biomassa algale e nella produzione di prodotti di valore e la presenza del biocatalizzatore porta a una notevole differenza nelle performance elettrochimiche della cella. In conclusione i risultati ottenuti fanno della PMFC osservata un dispositivo per una più sostenibile generazione di bioenergia, produzione di biocarburante e accumulazione di prodotti dal valore aggiunto.

# Riassunto

Le microalghe, recentemente utilizzate per produrre biodiesel e considerate un'importante fonte di bioenergia sostenibile, sono state qui utilizzate insieme ai batteri per cooperare in una PMFC finalizzata allo smaltimento di acque reflue, produzione di bioenergia e di biomassa.

La PMFC utilizzata è un reattore bicamerale con due camere: l'anodica contenente i batteri e le acque reflue e la catodica contenente le microalghe. Nella prima i batteri utilizzano come substrato per il loro metabolismo le acque reflue e producono CO<sub>2</sub>, protoni e elettroni che vengono trasferiti nella camera catodica attraverso rispettivamente un tubo, una PEM che separa le due camere e un circuito esterno che genera energia. La CO<sub>2</sub> viene usata dalle microalghe per la fotosintesi e si ottiene O<sub>2</sub> come prodotto di scarto che fungerà come accettore finale di elettroni e protoni. La cella è sotto continua illuminazione e la CO<sub>2</sub> fornita dai batteri è sufficiente a sostenere la crescita delle microalghe che raggiunto un massimo, a causa delle condizioni ambientali stressanti presenti nella PMFC,

inizieranno a smettere di crescere e accumulare metaboliti secondari e prodotti di riserva quali carotenoidi e lipidi. Dalla biomassa raccolta vengono isolati i prodotti di valore di interesse e la produzione totale di questi ultimi risulta molto significativa. Per quanto riguarda invece la produzione di bioenergia, sono state considerate due PMFC che differenziano per il catodo: uno in puro carbonio, uno a base di platino. Si riscontra lo stesso andamento in entrambe le celle ma quella con il metallo prezioso presenta dei valori di densità di energia raggiunti molto superiori a quella che ne è priva; ciò è dovuto alla funzione di catalizzatore che ha il platino nella reazione di ossido riduzione che avviene al catodo. Di questo fenomeno risente anche la pulizia delle acque reflue che risulta in totale più efficiente.

La presenza del platino porta però alla formazione di cristalli che si accumulano sul catodo e ciò comporta una progressiva perdita di efficienza della PMFC.