

Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Biologia  
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Valutazione di *Synechocystis* sp. B12 per l'upgrading  
fotosintetico di biogas in un contesto di  
economia circolare**

Relatore: Prof. Tomas Morosinotto  
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dr.ssa Anna Santin  
Dipartimento di Biologia

Controrelatore: Prof.ssa Elisabetta Bergantino  
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Laura Verdesca

Anno Accademico 2022/2023



## Abstract

L'impatto ecologico dei rifiuti generati dall'attività umana continua ad essere un problema di grande rilevanza. Un sistema per valorizzare i rifiuti organici trasformandoli in risorse sostenibili consiste nel sottoporli a digestione anaerobica batterica, ottenendo biogas costituito principalmente da anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>). Questo, tuttavia, non può essere utilizzato direttamente, ma deve essere sottoposto ad un processo di upgrading, ossia di rimozione della CO<sub>2</sub>, al fine di ottenere biometano (CH<sub>4</sub> ≥ 95%) come fonte di energia rinnovabile. L'upgrading del biogas può essere svolto sfruttando microorganismi fotosintetici, in grado di utilizzare la luce per catturare e fissare la CO<sub>2</sub>, convertendola in bioprodotto ad alto valore aggiunto e rendendo questo processo più competitivo ed economicamente sostenibile a livello industriale. I cianobatteri sono particolarmente interessanti nell'upgrading del biogas per via della loro elevata efficienza nella fissazione della CO<sub>2</sub> durante la fotosintesi, ma lo stress causato dalle alte luci coinvolte in processi industriali su larga scala ne limita l'impiego. In questo lavoro è stato esplorato l'utilizzo del cianobatterio *Synechocystis* sp. B12 in un processo di upgrading fotosintetico del biogas. Quest'organismo è stato isolato da un'area contaminata localizzata a Santos (Brasile) e si distingue per la sua resistenza ad alta luce e per la sua capacità di accumulare interessanti quantità di biopolimeri.

Allo scopo di valutare la sua applicabilità su larga scala, è stata analizzata la crescita di B12 in semicontinuo a diverse intensità luminose in confronto a *Synechocystis* sp. PCC 6803. B12 è stato inoltre fatto crescere in presenza di biogas per verificare la capacità effettiva dell'organismo di fissare le alte concentrazioni di CO<sub>2</sub> presenti e la sua tolleranza al CH<sub>4</sub>. Infine, sono stati effettuati dei test preliminari su co-culture di B12 e del batterio *Cupriavidus necator* DSM 545, con l'obiettivo di sfruttare il metabolismo eterotrofo di *C. necator* per minimizzare la quantità di ossigeno, risultante dalla fotosintesi, immesso nel biometano ottenuto.

# Sommario

1. Introduzione .....	1
1.1 Inquinamento ambientale ed economia circolare.....	1
1.2 Produzione e smaltimento di rifiuti solidi .....	1
1.2.1 Digestione anaerobica di rifiuti solidi organici .....	3
1.3 Sistemi di Carbon capture, utilization and storage.....	5
1.3.1 Cattura e Conversione di CO <sub>2</sub> mediante fotosintesi .....	8
1.3.2 Upgrading biologico del biogas prodotto da digestione anaerobica.....	11
1.4 Utilizzo di cianobatteri in prospettiva industriale .....	15
1.4.1 <i>Synechocystis</i> sp. B12 .....	16
1.4.2 Produzione di PHB nell'ottica di sostenibilità economica .....	17
1.4.3. Altri microorganismi produttori di PHB.....	18
2. Scopo della tesi .....	20
3. Materiali e metodi .....	21
3.1 Inoculi e mezzi di coltura.....	21
3.1.1 <i>Synechocystis</i> sp. B12 e PCC 6803 .....	21
3.1.2 <i>Cupriavidus necator</i> .....	21
3.2 Sistemi di crescita in semicontinuo .....	23
3.2.1 Crescita di <i>Synechocystis</i> sp. B12 in semicontinuo.....	23
3.2.2 Produttività di biomassa .....	24
3.2.3 Estrazione di pigmenti fotosintetici con N,N-dimetilformammide (DMF).....	24
3.2.4 Quantificazione di pigmenti fotosintetici estratti .....	24
3.3 Simulazione di upgrading del biogas in bottiglie sigillate con composizione gasosa controllata.....	25
3.3.1 Preparazione delle bottiglie sigillate .....	25
3.3.2 Misure al gascromatografo.....	26
3.3.3 Condizioni sperimentali di simulazione di upgrading del biogas.....	26
3.3.4 Concentrazione finale della biomassa .....	27
3.4 Co-culture di <i>Synechocystis</i> sp. B12 e <i>Cupriavidus necator</i> .....	28
3.4.1 Misura della concentrazione cellulare tramite citofluorimetria.....	28
3.4.2 Misura della concentrazione cellulare tramite camere di conta Neubauer.....	28
3.4.3 Correlazione tra la fluorescenza della clorofilla <i>a</i> e l'OD <sub>750</sub> di <i>Synechocystis</i> sp. B12 .....	29
3.4.4 Test su terreno di coltura comune.....	31
3.4.5 Colture separate da membrane di dialisi .....	31
3.4.6 Co-culture in beute .....	32
3.4.7 Co-culture in bottiglie sigillate.....	33

4. Risultati .....	34
4.1 Crescita in semicontinuo a diverse intensità luminose con CO <sub>2</sub> atmosferica .....	34
4.2 Crescita di <i>Synechocystis</i> sp. B12 in condizioni di biogas upgrading .....	38
4.3 Test preliminari per co-culture di <i>Synechocystis</i> sp. B12 e <i>C. necator</i> .....	42
4.3.1 Setting delle modalità di misura delle crescite dei due organismi: citofluorimetro, conta cellulare e fluorescenza della clorofilla <i>a</i> .....	42
4.3.2 Curve di crescita di co-culture in diversi terreni.....	47
4.3.3 Valutazione delle crescite di <i>C. necator</i> e <i>Synechocystis</i> sp. B12 in colture separate da membrana di dialisi .....	49
4.3.4 Curve di crescita di co-culture in beuta con e senza glucosio.....	52
4.3.5 Curve di crescita di co-culture in bottiglie sigillate ad alta CO <sub>2</sub> .....	55
5. Discussione .....	61
5.1 La crescita in semicontinuo di <i>Synechocystis</i> sp. B12 ad alta luce mostra potenziale per lo scale-up industriale .....	61
5.2 <i>Synechocystis</i> sp. B12 mostra ottima crescita ad alte concentrazioni di CO <sub>2</sub> e non risulta inibito dalle alte concentrazioni di CH <sub>4</sub> presenti nel biogas .....	63
5.3 L'utilizzo di co-culture di <i>Synechocystis</i> sp. B12 e <i>C. necator</i> ha potenzialità per la riduzione di O <sub>2</sub> immesso nel biogas.....	65
6. Conclusioni .....	68
7. Bibliografia .....	69
8. Sitografia.....	77

## **Abbreviazioni**

3HB 3-idrossibutirrato

CCM CO<sub>2</sub> Concentration Mechanisms

CCS Carbon Capture and Storage

CCU Carbon Capture and Utilization

CCUS Carbon Capture, Utilization, and Storage

CO<sub>2</sub>-EGR CO<sub>2</sub> Enhanced Gas Recovery

CO<sub>2</sub>-EOR CO<sub>2</sub> Enhanced Oil Recovery

GHG Greenhouse Gases

HRAP High Rate Algal Pond

MSW Municipal Solid Waste

OFMSW Organic Fraction of Municipal Solid Waste

PBR Photobioreactors

PHA Poli-idrossialcanoati

PHB Poli- $\beta$ -idrossibutirrato

# **1. Introduzione**

## **1.1 Inquinamento ambientale ed economia circolare**

L'inquinamento ambientale causato dalle attività umane continua ad essere ad oggi un problema di carattere globale per il quale è necessario prendere urgenti provvedimenti. Le emissioni di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) hanno un ruolo centrale in questa crisi, soprattutto a causa dell'utilizzo di carburanti fossili non rinnovabili (petrolio, carbone, gas) e allo sfruttamento del suolo: nel 2020 queste attività causato l'emissione record di 36,6 miliardi di tonnellate di CO<sub>2</sub>, arrivando a concentrazioni globali di 417,2 parti per milione (ppm) (Hausfather & Friedlingstein, 2022). Per contrastare questo progressivo incremento sono state emanate negli ultimi anni una serie di normative sia a livello globale che europeo. Tra queste vi è il Green Deal europeo, che ha tra i suoi obiettivi principali il raggiungimento della neutralità climatica nel 2050, e la riduzione delle emissioni di gas serra (Greenhouse Gases o GHG) di almeno il 50-55% rispetto ai livelli del 1990 entro il 2030, promuovendo fonti energetiche rinnovabili e pratiche e prodotti sostenibili (European Commission, 2019). Un punto chiave di questo processo è la transizione da un modello economico lineare tradizionale a un sistema di economia circolare. L'economia tradizionale è basata sul concetto di "take-make-dispose", ossia acquisire le risorse, creare prodotti e smaltirli a fine uso. Nell'economia circolare invece si mira a creare sistemi chiusi in cui i flussi di energia e materiali vengono reindirizzati in modo da massimizzare la valorizzazione delle risorse disponibili: ciò che rappresenta lo scarto di un processo produttivo viene utilizzato un altro, andando a ridurre al minimo gli sprechi e, conseguentemente, l'impatto ambientale delle attività economiche e industriali. Questo obiettivo viene raggiunto mediante un approccio interdisciplinare che integra conoscenze di ambito economico, scientifico e industriale (Sariatli, 2017).

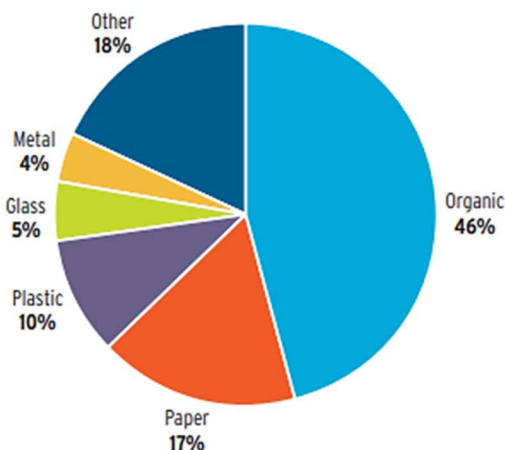
## **1.2 Produzione e smaltimento di rifiuti solidi**

Una componente sostanziale dei rifiuti solidi prodotti dall'attività umana sono quelli municipali (Municipal Solid Waste o MSW), che sono raccolti e trattati dai

comuni: includono quelli domestici (anche ingombranti) e quelli di natura simile ai domestici, provenienti da attività commerciali, uffici, istituzioni e piccole imprese, nonché dalla pulizia stradale (OECD, 2023).

Nel 2012 era stato stimato che a livello mondiale siano prodotti annualmente circa 1.3 miliardi di tonnellate di MSW (Hoornweg et al., 2012). Questa cifra è aumentata considerevolmente nel corso dell'ultimo decennio arrivando a 2.24 miliardi di tonnellate nel 2020, e si stima che possa arrivare a 3.88 miliardi di tonnellate nel 2050 (Kaza et al., 2021).

Approssimativamente il 46% dei MSW prodotti a livello mondiale è costituito da frazione organica (Figura 1) biodegradabile (Organic Fraction of Municipal Solid Waste o OFMSW).



**Figura 1: Composizione dei rifiuti solidi municipali prodotti a livello mondiale nel 2009.** I rifiuti di natura organica costituiscono quasi metà dei rifiuti municipali prodotti, seguiti da rifiuti di varia natura, carta, plastica, vetro e metalli. Immagine adattata da Hoornweg et al., 2012.

I MSW hanno quattro possibili destinazioni principali, che possono essere classificate dalla più dannosa a livello ambientale alla meno dannosa come: smaltimento in discariche, incenerimento (con o senza recupero di energia), compostaggio e riciclo (Eurostat, 2023). È stato stimato che le emissioni di GHG dovute allo smaltimento di rifiuti solidi nel 2016 fossero pari a 1,6 miliardi di tonnellate di CO<sub>2</sub> equivalente, indice che descrive il potenziale impatto di un GHG sul riscaldamento globale, esprimendolo in termini di CO<sub>2</sub>. Questo valore rappresentava circa il 5% delle emissioni globali, ed è possibile che nel 2050 si



arrivi a 2,6 miliardi di tonnellate di CO<sub>2</sub> equivalente (Kaza et al., 2018; Eurostat, 2023).

### **1.2.1 Digestione anaerobica di rifiuti solidi organici**

La degradazione naturale di rifiuti organici in discariche non porta solo all'emissione di gas tra cui GHG, ma causa anche diverse problematiche derivanti dai limiti di terreno disponibile, cattivi odori e inquinamento sia dei terreni che delle acque dovuto all'infiltrazione del percolato. (Zhu et al., 2009)

Un approccio che può essere impiegato per arginare l'impatto ecologico dei rifiuti solidi è quello di valorizzare la frazione organica attraverso digestione anaerobica, associando lo smaltimento ecosostenibile alla produzione di energia rinnovabile. Il processo di digestione anaerobica prevede la degradazione di materia organica da parte di microorganismi in assenza di ossigeno (O<sub>2</sub>), con conseguente formazione di biogas e digestato. Il biogas, costituito principalmente da CO<sub>2</sub> e metano (CH<sub>4</sub>), rappresenta una preziosa risorsa energetica, mentre il digestato può essere impiegato come fertilizzante (Bajpai, 2017). Il processo di digestione anaerobica è applicabile a rifiuti di varia natura, non solo OFMSW ma anche rifiuti di natura agricola e industriale, ad esempio dell'industria alimentare (Khalid et al., 2011). Il processo si articola in quattro fasi principali sequenziali:

- Idrolisi di materia organica (con composizione polisaccaridica, proteica e lipidica) in molecole più semplici
- Acidogenesi, in cui i prodotti idrolizzati vengono convertiti in acidi grassi volatili (VFA) come acido acetico, propionico e butirrico
- Acetogenesi, in cui i VFA più complessi sono convertiti in acido acetico con produzione di CO<sub>2</sub> e idrogeno (H<sub>2</sub>)
- Metanogenesi, in cui si ha la produzione di CH<sub>4</sub> mediante ossidazione di acido acetico (pathway acetoclastico) o riduzione di CO<sub>2</sub> (pathway idrogenotropico)

Il pathway acetoclastico porta alla formazione del 70% del CH<sub>4</sub> complessivo, mentre il restante 30% proviene dal pathway idrogenotropico (Yadav et al., 2022).

L'insieme di questi processi è a carico di un *consortium* variabile di diversi organismi specializzati, che può essere costituito da organismi già presenti nel materiale in entrata o organismi selezionati e inoculati nel reattore.

Il processo di digestione anaerobica permette la riduzione di emissioni inquinanti su facendo sì che il CH<sub>4</sub> emesso naturalmente durante la degradazione dei rifiuti organici sia in un ambiente sigillato costituito dal reattore in cui si svolge la reazione (generalmente batch o fed-batch), che ne permette il recupero senza che sia emesso nell'atmosfera.

Le percentuali finali di CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> nel biogas risultante sono rispettivamente 50-75% e 25-50%, ma sono presenti altri gas in tracce come azoto (0-10%), acido solfidrico (0-3%) e idrogeno (0-1%) (Goswami et al., 2016).

Questa composizione così variabile del biogas è legata alla natura dei substrati in entrata e alla conseguente efficienza di conversione del materiale organico dei microorganismi (Tabella 1). Spesso, è consigliabile optare per una co-digestione di scarti di diversa natura per migliorare la resa del processo, per esempio combinando OFMSW con una percentuale molto alta di carboidrati, e scarti di natura animale che sono invece ricchi in proteine. Questo permette di avere una migliore disponibilità di macro- e micro-nutrienti per i microorganismi, con conseguente aumento di biodiversità microbica coinvolta, ma permette anche di diluire composti tossici o inibitori per il processo e di avere un miglior controllo di parametri come umidità e pH (Tyagi et al., 2018).

Composizione	Reazione metanogenica	Biogas (lg <sup>-1</sup> )	CH <sub>4</sub> (%)
Lipidi	$C_{50}H_{90}O_6 + 24.5H_2O \rightarrow 34.75CH_4 + 15.25CO_2$	1.425	69.5
Carboidrati	$C_6H_{10}O_5 + H_2O \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2$	0.830	50.0
Proteine	$C_{16}H_{24}O_5N_4 + 14 \cdot 5H_2O \rightarrow 8.25CH_4 + 3.75CO_2 + 4NH_4^+ + 4HCO_3^-$	0.921	68.8

**Tabella 1. Produzione potenziale di biogas a partire da diversi substrati con relativa percentuale teorica di CH<sub>4</sub>.** I substrati di natura lipidica portano ad una maggiore resa di biogas (espressa in litri di biogas per grammo di substrato) con una percentuale di CH<sub>4</sub> più alta rispetto quanto ottenuto da proteine e, soprattutto, carboidrati. Tabella adattata da Alves et al., 2009.

Per poter utilizzare il CH<sub>4</sub> così prodotto nelle reti convenzionali di distribuzione del gas deve rispettare dei precisi parametri stabiliti. Le regolamentazioni europee al

riguardo prevedono che il biometano debba avere una percentuale di CH<sub>4</sub> superiore al 95%, CO<sub>2</sub> inferiore al 2,5-4%, O<sub>2</sub> inferiore allo 0,001-1%, composti dello zolfo come acido solfidrico (H<sub>2</sub>S) inferiori a 5 mg Nm<sup>-3</sup> e composti azotati inferiori a 10 mg Nm<sup>-3</sup> (Toledo-Cervantes et al., 2017). Il biometano che rispetta queste condizioni presenta un potere calorifero superiore pari a 50-55 MJ/m<sup>3</sup> e un potere calorifero inferiore pari a 30-35 MJ/m<sup>3</sup> (entrambi parametri che indicano l'energia liberata dalla combustione), analogamente al metano di derivazione fossile (Yadav et al., 2022). Tuttavia, il biogas prodotto per digestione anaerobica contiene, come descritto in precedenza, percentuali molto superiori di CO<sub>2</sub> e altri gas oltre CH<sub>4</sub>. Per questo motivo può quindi essere solo utilizzato in processi di generazione di energia tramite combustione. Perché il prodotto della digestione anaerobica rispetti gli standard definiti, è necessario che vada incontro a un processo di arricchimento del contenuto di metano attraverso quello che viene definito upgrading del biogas. La principale impurità del biogas è proprio la CO<sub>2</sub>, che diminuisce il potere calorifico e le proprietà antidetonanti del biometano, oltre a creare problemi di corrosione. La rimozione di CO<sub>2</sub> porta alla riduzione della densità relativa del gas, e il miglioramento del valore calorifero ne permette l'utilizzo anche come carburante per mezzi di trasporto (Garlapati et al., 2021).

### **1.3 Sistemi di Carbon capture, utilization and storage**

Un approccio relativamente recente impiegato per la riduzione dei GHG prevede l'utilizzo di una serie di tecnologie e metodi definiti come Carbon Capture, Utilization, and Storage (CCUS), volti a catturare la CO<sub>2</sub> da diverse fonti di emissione, per poi immagazzinarla o utilizzarla per creare prodotti o servizi di valore (Cherepovitsyn et al., 2020). Attualmente i maggiori campi di applicazione industriale di queste tecnologie sono in ambito di produzione di energia, processamento di gas naturale, industria chimica, produzione di idrogeno e produzione di etanolo, ma sono considerevolmente applicati anche nella produzione di fertilizzanti e nell'industria del cemento, quindi in molti dei settori produttivi che producono le maggiori quantità di CO<sub>2</sub> (Dziejarski et al., 2023). La cattura di CO<sub>2</sub> può essere effettuata in diversi modi, tra i quali vi è l'impiego di solventi fisici e chimici (generalmente a base di ammine), adsorbimento su solidi e distillazione

criogenica, che sono attualmente gli unici sviluppati su larga scala. Possono anche essere impiegate membrane, materiali ibridi organici di nanoparticelle e liquidi ionici (Lisbona et al., 2020).

I metodi CCUS includono processi di Carbon Capture and Storage (CCS) e processi di Carbon Capture and Utilization (CCU). I processi di CCS sono stati i primi ad essere introdotti e si riferiscono strettamente allo stoccaggio della CO<sub>2</sub>. I principali metodi di cattura della CO<sub>2</sub> sono assorbimento mediante processi fisici o chimici, adsorbimento su materiali di varia natura (a base di carbonio o silicio, di natura polimerica, zeoliti etc.) e utilizzo di membrane organiche e inorganiche, soprattutto di natura polimerica. Tra questi l'assorbimento utilizzando solventi amminici risulta l'approccio dominante perché ha costi più bassi ed è di facile scale-up (Daneshvar, 2022). La CO<sub>2</sub> raccolta viene così compressa e trasportata, generalmente tramite gasdotti, per essere stoccata, iniettandola in formazioni geologiche profonde appropriate in grado di trattenerla, come giacimenti esauriti di petrolio e gas, falde acquifere saline e caverne sotterranee (Callas et al., 2022). L'implementazione di tecniche di CCS ha incontrato diversi ostacoli, in particolare legati all'accettazione da parte della popolazione e agli alti costi. È quindi successivamente stato introdotto il concetto di utilizzo e valorizzazione della CO<sub>2</sub> catturata mediante sistemi di CCU, per cui si ottiene un processo non solo più ecologico ma anche più sostenibile da un punto di vista economico (Meylan et al., 2015). Il processo di CCU si presenta come un sistema ciclico, ripartibile in quattro stadi: emissione, cattura, utilizzo e ottenimento dei prodotti (Figura 2) (Dziejarski et al., 2023).

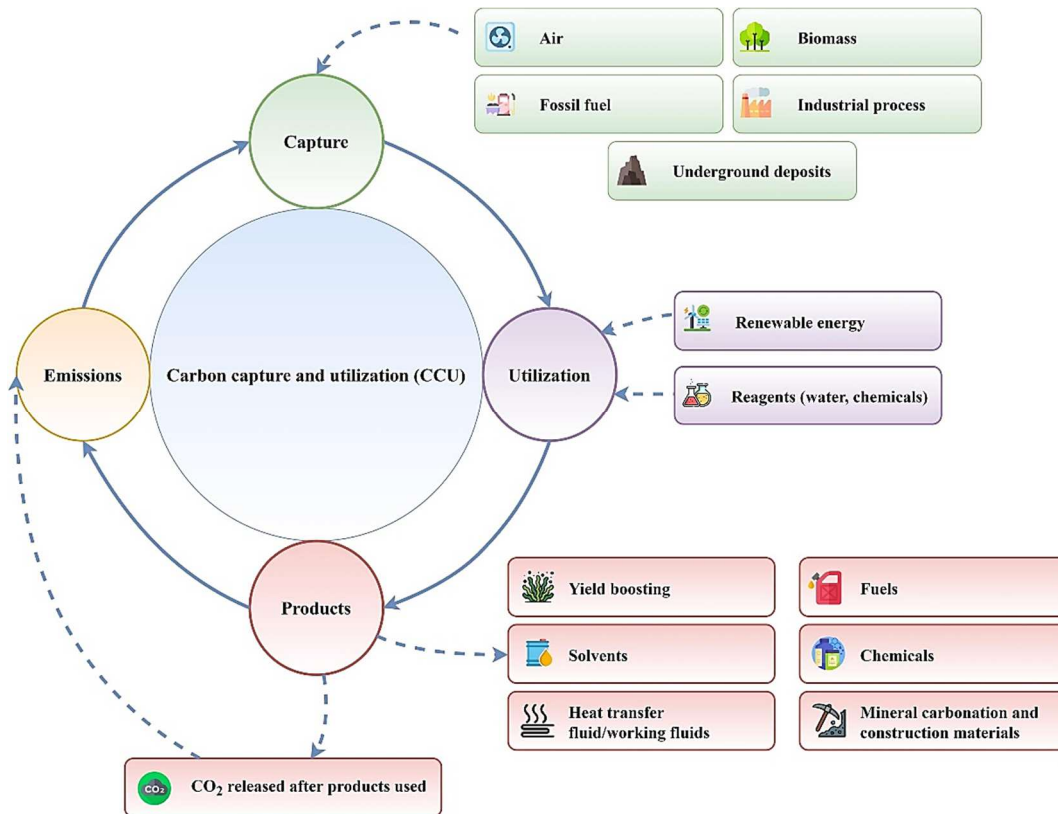


Figura 2: Schema riassuntivo del processo di CCU. Adattato da Dziejarski et al., 2023.

La CO<sub>2</sub> estratta può essere utilizzata senza essere convertita: nell'ambito dell'industria petrolifera si parla di sistemi CCU definiti CO<sub>2</sub>-EOR (Enhanced Oil Recovery) e CO<sub>2</sub>-EGR (Enhanced Gas Recovery), in cui la CO<sub>2</sub> viene immessa in giacimenti di petrolio o gas naturale al fine di facilitarne l'estrazione e migliorarne le caratteristiche (Hou et al., 2023). Tra le applicazioni di natura energetica è di grande interesse l'utilizzo di CO<sub>2</sub> per legare chimicamente idrogeno prodotto da idrolisi dell'acqua al fine di renderlo più facilmente stoccabile (Alakurtti et al., 2019; Iyer et al., 2017). Questi processi però, sebbene economicamente sostenibili, non sono ideali da un punto di vista ambientale in quanto contribuiscono a creare ulteriore domanda per combustibili fossili. La CO<sub>2</sub> non convertita può anche essere utilizzata in processi di desalinizzazione delle acque (assieme ad ammoniaca) per ottenere acqua potabile da utilizzare in zone in cui questa è carente (Al-Mamoori et al., 2017).

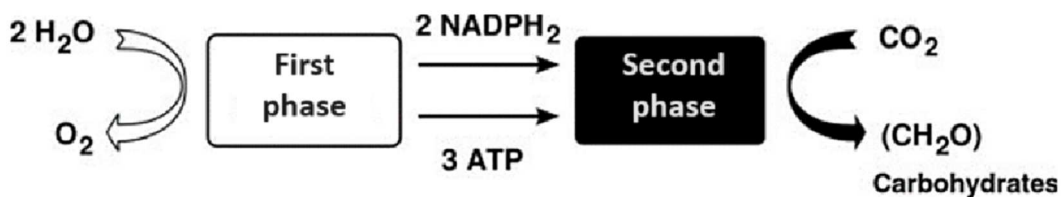
I sistemi CCU più interessanti sono quelli che prevedono la conversione di CO<sub>2</sub> in altri composti. In ambito edile, ad esempio, la CO<sub>2</sub> viene usata in processi di

carbonatazione di materiali cementizi per renderli più resistenti (Thonemann et al., 2022), ma l'applicazione più importante è la possibilità di utilizzare CO<sub>2</sub> per la produzione di composti chimici di interesse o biocarburanti. La sua conversione chimica e catalitica viene sfruttata per ottenere prodotti come urea, carbonati e metanolo, ma si sta attualmente investendo anche in policarbonati, polioli e poliuretani. Complessivamente, quindi, i sistemi CCU si inseriscono perfettamente nella visione di economia circolare ecologicamente sostenibile a cui ci si vuole approcciare.

### 1.3.1 Cattura e Conversione di CO<sub>2</sub> mediante fotosintesi

I metodi classici di CCUS attualmente impiegati presentano una serie di problematiche. Per esempio, nei processi di adsorbimento chimico l'utilizzo di solventi amminici richiede elevate quantità di energia per la rigenerazione del solvente e le ammine tendono a degradarsi e avere un effetto corrosivo, d'altra parte l'adsorbimento fisico ha bassa efficienza, mentre l'utilizzo di membrane su larga scala è ancora allo stato pilota (Daneshvar, 2022). Un nuovo approccio che si vuole esplorare è l'impiego di sistemi di CCU biologici, sfruttando microorganismi in grado di fissare la CO<sub>2</sub>. Tra i più efficienti ad effettuare questa conversione ci sono i microrganismi fotosintetici.

La fotosintesi è il processo attraverso il quale piante, alghe eucariotiche e cianobatteri producono composti organici a partire da materie prime inorganiche (CO<sub>2</sub>) convertendo energia luminosa in energia chimica. Il processo è diviso in due fasi (Figura 3). La prima fase è luce-dipendente e comporta la fotolisi dell'acqua e l'utilizzo di elettroni derivanti dall'eccitazione luminosa per la formazione di molecole ad alta energia quali NADPH e ATP, con conseguente liberazione di O<sub>2</sub>. NADPH e ATP vengono utilizzati nella seconda fase, detta metabolica, che prevede l'assimilazione di CO<sub>2</sub> in composti organici (A. Lal et al., 2018).



**Figura 3. Principali prodotti delle due fasi della fotosintesi.** Le reazioni della fase luce dipendente (first phase) portano alla formazione di NADPH<sub>2</sub> e ATP, utilizzati nelle reazioni della fase metabolica (second phase) per la fissazione della CO<sub>2</sub> in composti organici. Immagine adattata da Masojídek et al., 2013.

Questi processi negli organismi eucarioti avvengono in organelli specializzati definiti cloroplasti, assenti in organismi procarioti quali i cianobatteri dove il processo ha luogo a livello di regioni specializzate ma non distinte dal resto del citoplasma. In particolare, la fase luminosa avviene a livello delle membrane tilacoidali, dove sono presenti due grandi complessi pigmento-proteina definiti fotosistema II e I, che ricevono la luce e la convertono in energia chimica sotto forma di ATP e NADPH. Le classi principali di pigmenti fotosintetici sono clorofille e carotenoidi, con l'aggiunta di ficobiline in cianobatteri e alghe rosse (Masojídek et al., 2013).

Durante la seconda fase, che avviene nello stroma dei cloroplasti negli organismi eucarioti e nel citoplasma nei cianobatteri, la CO<sub>2</sub> viene convertita in carboidrati in quello che viene definito ciclo di Calvin-Benson, ripartito in tre fasi:

- Condensazione di CO<sub>2</sub> con ribulosio 1,5-bisfosfato (zucchero a 5 C) grazie all'attività carbossilica dell'enzima RuBisCO con produzione di un intermedio instabile che si divide in due molecole di 3-fosfoglicerato;
- Fosforilazione e riduzione di 3-fosfoglicerato con consumo di ATP e NADPH per ottenere gliceraldeide 3-fosfato (6 molecole ogni 3 molecole di CO<sub>2</sub>);
- Rigenerazione di ribulosio 1,5-bisfosfato da 5 molecole di gliceraldeide 3-fosfato con consumo di ATP.

Alla fine di ogni ciclo viene così ottenuta una molecola di gliceraldeide 3-fosfato che può essere rapidamente convertita da una serie di vie metaboliche in amminoacidi, lipidi o zuccheri (Johnson, 2016).

L'acquisizione di CO<sub>2</sub> per la fotosintesi da parte delle microalghe può avvenire seguendo tre principali strategie: direttamente come CO<sub>2</sub> attraverso la membrana plasmatica, mediante assimilazione di bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) per trasporto attivo attraverso la membrana o sfruttando anidrasi carboniche extracellulari (esterne alla membrana) che convertono HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in CO<sub>2</sub> aumentando la concentrazione intracellulare di quest'ultima (Bose et al., 2019).

L'enzima RuBisCO, oltre a presentare attività carbossilica, è anche in grado di agire da ossigenasi, utilizzando O<sub>2</sub> invece che CO<sub>2</sub> come substrato: questo porta alla produzione di 2-fosfoglicolato, un composto dannoso per la cellula che deve essere detossificato in una serie di reazioni metaboliche energeticamente dispendiose che coinvolgono diversi organelli cellulari. Questo processo alternativo alla fotosintesi, definito fotorespirazione, è favorito da alte temperature e da un alto rapporto O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, e porta ad una perdita di efficienza nella fissazione fotosintetica del carbonio. Per prevenirlo, microrganismi fotosintetici come microalghe e cianobatteri hanno sviluppato meccanismi di concentrazione della CO<sub>2</sub> intracellulare (CCM): HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> viene pompato nel citoplasma cellulare attraverso specifici trasportatori di membrana, e successivamente riconvertito in CO<sub>2</sub> grazie all'enzima anidraasi carbonica, in modo da aumentare la CO<sub>2</sub> disponibile e favorire la fotosintesi. Questo processo può avvenire a livello del pirenoide in molte alghe o nel carbossisoma dei cianobatteri (Ruiz-Ruiz et al., 2020). Ciò che rende microalghe e cianobatteri particolarmente attraenti per l'applicazione in sistemi CCUS è la possibilità di utilizzarli come 'bioraffinerie', ossia sistemi in cui la biomassa ottenuta dalla fissazione della CO<sub>2</sub> viene processata in modo sostenibile in uno spettro di prodotti commerciali ed energia. Questo è possibile data la loro capacità di produrre un'ampia gamma di prodotti ad alto valore aggiunto (Cherubini et al., 2009), cioè che acquisiscono un grosso valore di mercato rispetto al materiale di partenza una volta processati (Taifouris et al., 2022). Microalghe e cianobatteri possono contenere alte percentuali di proteine, lipidi e zuccheri complessi, oltre che essere in grado di produrre una notevole varietà di metaboliti secondari interessanti generalmente non ritrovabili in altri organismi.

Composti quali proteine, amminoacidi essenziali, vitamine e minerali possono essere impiegati nell'industria alimentare e in campo farmaceutico, nutraceutico o cosmetico. Ad esempio, alcune proteine provenienti da microalghe come *Chlorella vulgaris* trovano impiego come agenti emulsionanti per cibi, mentre altre sono utilizzate in prodotti cosmetici per stimolare la produzione di collagene. I pigmenti fotosintetici trovano anch'essi utilizzo, soprattutto nel campo alimentare e nutraceutico. Il β-carotene, ad esempio, è usato come colorante naturale e antiossidante, ed è attualmente il pigmento più richiesto sul mercato assieme ad astaxantina, un altro carotenoide (Bhattacharya et al., 2020; Levasseur et al., 2020).



Questi organismi sono anche di interesse nel campo dei biocarburanti in quanto i lipidi (trigliceridi) che producono possono essere convertiti in biodiesel mediante transesterificazione, mentre carboidrati complessi quali amido possono essere sfruttati per la produzione di bioetanolo mediante fermentazione, ma anche potenzialmente per ottenere bioidrogeno (Naghshbandi et al., 2020). Alcune microalghe e cianobatteri sono in grado di produrre composti bioattivi con applicazioni farmaceutiche e terapeutiche, tra cui antibiotici, antinfiammatori e addirittura antitumorali, che spesso non sono facili da sintetizzare chimicamente (Khavari et al., 2021). La biomassa stessa può inoltre trovare impiego come biofertilizzante o mangime per animali data la sua ricca composizione in macro e micronutrienti (Dagnaisser et al., 2022).

### **1.3.2 Upgrading biologico del biogas prodotto da digestione anaerobica**

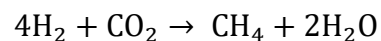
Un'interessante applicazione del processo di bio-CCU riguarda l'upgrading del biogas. Come descritto precedentemente nel paragrafo 1.2.1, per poter utilizzare il biometano in impianti di distribuzione del gas, esso deve avere una percentuale di purezza superiore al 95% (Toledo-Cervantes et al., 2017). Di conseguenza il biogas prodotto attraverso la digestione anaerobica deve essere sottoposto ad un processo di upgrading, che permetta la rimozione dell'elevata percentuale di CO<sub>2</sub> presente.

I metodi tradizionali di rimozione della CO<sub>2</sub> corrispondono in buona parte ai metodi di CCS introdotti precedentemente. Tra i più comuni vi sono water scrubbing, Pressure Swing Adsorption (PSA), separazione con membrane, separazione criogenica e adsorbimento chimico (Garlapati et al., 2021; Ahmed et al., 2021).

Nel water scrubbing viene sfruttata la minore solubilità di CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> in acqua, usandola come solvente. con questo metodo si ottiene biometano con percentuale di CH<sub>4</sub> molto variabile (tra 80 e 99%) e perdite di CH<sub>4</sub> fino al 5%. Usando membrane basate su composti acetati o poliimmidi, si ottiene biogas ad alta purezza ma con grandi perdite di CH<sub>4</sub>. Un problema analogo lo si ha sfruttando l'adsorbimento chimico con ammine. La separazione criogenica separa CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> con grande efficienza mediante condensazione e distillazione, ma anche con grande dispendio energetico. I processi PSA infine sfruttano le maggiori dimensioni della molecola CH<sub>4</sub> rispetto agli altri gas presenti, che ne permettono l'adsorbimento

selettivo su superfici solide. Questi processi sono però inattivati irrimediabilmente anche da piccole quantità di H<sub>2</sub>S, che possono essere presenti nel biogas grezzo (Sun et al., 2015). In generale quindi i sistemi di upgrading attuali richiedono alte quantità di energia e sono associati ai costi di acquisizione dei prodotti chimici necessari, limitando la competitività economica del biogas prodotto (Garlapati et al., 2021).

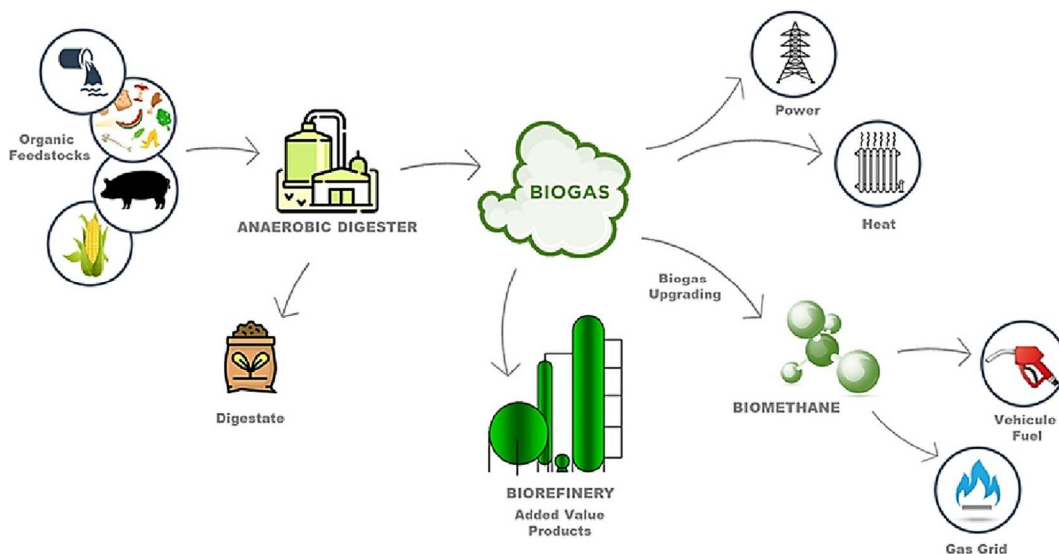
In questo contesto, un'alternativa che sta acquistando sempre maggiore attenzione è rappresentata dall'upgrading del biogas attraverso processi di bio-CCU, distinguibili in due approcci principali: bioconversione di CO<sub>2</sub> in presenza di H<sub>2</sub> o fissazione di CO<sub>2</sub> tramite microrganismi. Il primo approccio prevede la conversione chemioautotrofa di CO<sub>2</sub> in CH<sub>4</sub> tramite microrganismi metanotrofi idrogenotrofici, secondo la seguente reazione:



$$\Delta G_0 = -131 \text{ KJ}$$

Questi microrganismi sono quindi in grado di convertire CO<sub>2</sub> in CH<sub>4</sub> in presenza di H<sub>2</sub> che viene iniettato nel reattore dove avviene il processo, talvolta riuscendo anche ad eliminare tracce di H<sub>2</sub>S incorporandole nella biomassa risultante. Il limite principale di questo processo è dovuto alla bassa solubilità dell'H<sub>2</sub> gasoso in una coltura liquida, che ne limita la possibilità di utilizzo da parte dei microrganismi. Ciò risulta in una riduzione nell'efficienza di conversione e una composizione finale del biometano inquinata da idrogeno. L'utilizzo di H<sub>2</sub>, inoltre, comporta la necessità di implementare misure di sicurezza elevate a causa della sua infiammabilità (Muñoz et al., 2015), oltre a necessitare di un idrolizzatore per essere prodotto, cosa che lo rende molto costoso (Laude et al., 2010).

Una possibilità potenzialmente molto più economica e pulita è rappresentata dagli organismi fotosintetici: come descritto nel paragrafo 1.3.1, essi sono in grado di fissare la CO<sub>2</sub> in modo molto più efficiente rispetto alla maggior parte degli organismi metanotrofi, rendendo il processo di upgrading del biogas più veloce. Inoltre, non richiedono gas o risorse aggiuntive, rendendo il processo più pulito ma anche meno costoso dal punto di vista energetico. Questo può essere presentato come un processo in due step, dove il primo corrisponde alla rimozione della CO<sub>2</sub> e il secondo dall'acquisizione di prodotti di interesse dalla biomassa (Figura 4).



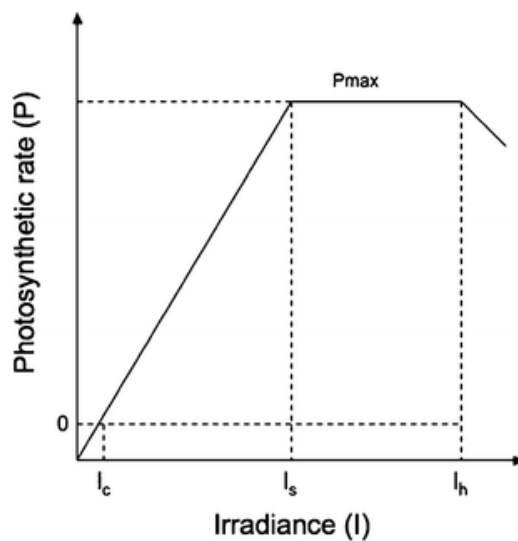
**Figura 4. Schema riassuntivo del processo di digestione anaerobica e biogas upgrading biologico.** Immagine adattata da Comesaña-Gándara et al., 2022

Per ottenere un processo efficiente di upgrading del biogas attraverso la coltivazione di organismi fotosintetici è necessario ottimizzare le condizioni in cui questo avviene, considerando diverse variabili. Ogni microrganismo ha un certo range di parametri ottimali di crescita, come luce, nutrienti, pH e temperatura.

Mantenere la luce e la temperatura adeguate favoriscono un maggiore accumulo della biomassa più che influire sul processo di upgrading in sé. Tuttavia, è stato osservato che il processo di upgrading tende ad essere favorito da un pH alcalino (nei limiti tollerati dal microrganismo) sulla base di studi effettuati utilizzando *Chlorella* sp., *Spirulina* sp., e *Arthrospira platensis*. Questo perché a pH alcalino il carbonio inorganico per la fotosintesi è disponibile sotto forma di bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), più facilmente solubile nel medium (Garlapati et al., 2021). Il pH necessita di un controllo accurato soprattutto date le alte percentuali di  $\text{CO}_2$  coinvolte nel processo, che causano acidificazione del medium di coltura (Meier et al., 2022). Flusso gassoso e mescolamento adeguato sono anch'essi importanti parametri per garantire l'adeguato apporto di  $\text{CO}_2$  alla coltura (Garlapati et al., 2021).

Tra i vari parametri spicca per importanza l'intensità luminosa, dato che è alla base del processo di fotosintesi e influisce anche sull'accumulo di bioprodotto di interesse. Colture microalgali utilizzate a fini industriali (incluso biogas upgrading) possono crescere ad intensità luminose relativamente basse come  $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Meier et al., 2015) fino a intensità luminose di  $1800 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o

superiori, generalmente raggiunte nelle zone esterne di alcuni PBR (Chuka-ogwude et al., 2021; González-Camejo et al., 2019). Una luce incidente troppo bassa o troppo alta crea problemi nel processo. La risposta di microalghe e cianobatteri all'intensità luminosa può essere descritta da una curva P/I, che indica il rapporto tra il tasso fotosintetico e l'intensità luminosa incidente ed è ripartibile in tre zone: una di luce limitante in cui la maggior parte dei fotoni incidenti è impiegata per la fotosintesi e questa aumenta con l'aumentare dell'irraggiamento; una zona di saturazione in cui si raggiunge la massima capacità dell'apparato fotosintetico e la fotosintesi non è più dipendente dall'incremento dell'irraggiamento, e una zona di fotoinibizione in cui l'incremento luminoso ha un effetto dannoso sul fotosistema II e si assiste ad un conseguente calo della produttività di biomassa (Figura 5). Nella maggior parte dei casi si osserva che microalghe e cianobatteri crescono in modo ottimale fino a intensità luminose di circa  $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Carvalho et al., 2011).



**Figura 5. Rappresentazione della curva P/I.** Vi si distinguono la zona di luce limitante delineata da  $I_c$  (intensità luminosa alla quale le cellule iniziano a crescere) e  $I_s$  (intensità luminosa alla quale si raggiunge la saturazione dell'apparato fotosintetico), la zona di saturazione tra  $I_s$  e  $I_h$  (intensità luminosa alla quale si ha fotoinibizione) e la zona di fotoinibizione oltre  $I_h$ . Figura adattata da Carvalho et al., 2011

Per contro, utilizzare intensità luminose troppo basse porta a favorire il fenomeno di self-shading di una coltura, legato al calo dell'intensità luminosa lungo lo spessore del reattore secondo la legge di Lambert-Beer, che correla l'assorbimento di luce da parte di una sostanza allo spessore e alla concentrazione della sostanza

stessa. Questo crea un gradiente luminoso e la formazione di zone oscurate in cui la fotosintesi è limitata (Kumar et al., 2013; Abu-Ghosh et al., 2016).

Bisogna inoltre considerare che nel biogas possono essere presenti tracce di composti tossici o inibitori della crescita, in particolare composti dello zolfo o metalli pesanti, in base alla natura del materiale usato nel processo di digestione (Lam et al., 2012). La scelta dell'organismo adatto da usare risulta quindi di fondamentale importanza.

Bisogna inoltre notare che l'O<sub>2</sub> prodotto dalla fotosintesi, se non controllato, può arrivare a percentuali superiori del 20% nel biometano risultante (Meier et al., 2015). Questo fa sì che siano necessarie strategie da mettere in atto per la sua rimozione, dato che, oltre a peggiorare la qualità del biometano, può risultare in una miscela esplosiva. Similmente ai metodi tradizionali di rimozione della CO<sub>2</sub>, l'O<sub>2</sub> prodotto può essere rimosso mediante setacci molecolari, con l'utilizzo di particolari membrane o mediante approcci criogenici, oltre che per adsorbimento chimico basato sull'impiego di mercurio o cromo. Inoltre, è possibile consumarlo in processi di ossidazione (Ortloff et al., 2014). Anche qui però è possibile esplorare un approccio biologico, co-coltivando organismi fotosintetici e organismi in grado di utilizzare l'ossigeno prodotto. Finora l'attenzione in questo senso è stata focalizzata sullo sfruttamento di consorzi batterici presenti in digestato al fine di ottenere una rimozione parallela di CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S e livelli più bassi di O<sub>2</sub> (Posadas et al., 2015).

#### **1.4 Utilizzo di cianobatteri in prospettiva industriale**

I cianobatteri sono batteri gram-negativi fotosintetici e rappresentano una delle forme di vita più antiche sulla terra, risalenti a 3.5 miliardi di anni fa. Sono caratterizzati dalla presenza di clorofilla *a* come principale pigmento fotosintetico e da ficobiline come ficocianina che aumentano le capacità di cattura della luce. A causa delle ficocianine, sono stati anche chiamati in passato alghe verdi-azzurre. Sono diffusi in diverse nicchie ecologiche, sia sulla terraferma che nelle acque, per cui mostrano grande capacità di adattamento a diversi habitat (Wiltbank et al., 2019). Sono spesso utilizzati in progetti di biorisanamento delle acque per la rimozione di composti azotati, fosfati e metalli pesanti da acque reflue e sono

considerati tra i microrganismi più promettenti nel campo della produzione di biocarburanti (Garlapati et al., 2019). In particolare, grazie alla presenza di CCM, i cianobatteri sono in grado di fissare CO<sub>2</sub> molto più efficientemente rispetto alle piante, ma anche rispetto a molte alghe eucariotiche: è stato infatti osservato che ad alte concentrazioni di CO<sub>2</sub> (fino al 20%) alcuni cianobatteri sono in grado di raggiungere densità di biomassa maggiori rispetto alle microalghe, che invece risultano più competitive a concentrazioni di CO<sub>2</sub> paragonabili a quella atmosferica (Ji et al., 2017). Questa maggior tolleranza dei cianobatteri ad alte concentrazioni di CO<sub>2</sub> conferisce un enorme vantaggio in un processo di upgrading del biogas in cui, come detto nel paragrafo 1.2.1, la percentuale di CO<sub>2</sub> arriva ad essere superiore al 25%.

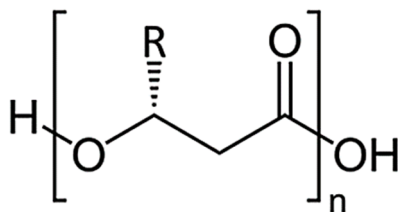
#### **1.4.1 *Synechocystis* sp. B12**

Tra i cianobatteri di interesse spicca il genere *Synechocystis*. Recentemente è stato scoperto un nuovo ceppo di *Synechocystis* definito B12. Questo è stato recentemente isolato da una foresta di mangrovie in Santos, Brasile, in una zona fortemente contaminata da metalli pesanti (rame, cadmio, cobalto nichel ed altri), mercurio e composti aromatici tossici. È stato visto che B12 è in grado di crescere a intensità luminose più alte rispetto a quelle normalmente sono tollerate da altri ceppi di *Synechocystis* dato che cresce senza fotoinibizione ad intensità luminose di 300  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Gracioso et al., 2021). Queste intensità luminose possono creare problemi in altre specie di cianobatteri (de Chazal et al., 1992) o ceppi dello stesso genere come *Synechocystis* sp. PCC 6803, che costituisce un organismo modello molto studiato e viene cresciuto in condizioni ottimali di 30-50  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Lopo et al., 2012; Dann et al., 2021). Questa particolare tolleranza alle alte intensità luminose conferisce a questo cianobatterio un ulteriore vantaggio in un processo di upgrading del biogas progettato su scala industriale, in quanto può far fronte alle alte intensità luminose raggiunte nei fotobioreattori outdoor, oltre a presentare i vantaggi dei cianobatteri già descritti. Tutto questo rende *Synechocystis* sp. B12 uno dei migliori candidati a tale applicazione. Come altri ceppi del genere *Synechocystis*, B12 è in grado di crescere in mixotrofia in presenza di luce e fonti

di carbonio organico come glucosio o acetato, aspetto di interesse per aumentare la produttività a livello industriale (Gracioso et al., 2021).

#### 1.4.2 Produzione di PHB nell'ottica di sostenibilità economica

L'obiettivo dell'upgrading del biogas attraverso cianobatteri consiste nella cattura della CO<sub>2</sub>, ottenendo così CH<sub>4</sub> in forma più pura, e nella conversione di tale CO<sub>2</sub> in molecole ad alto valore aggiunto. Il genere *Synechocystis* è in grado di produrre diversi composti di interesse biotecnologico, e in particolare è in grado di accumulare poliidrossialcanoati (PHA) in condizioni di stress nutrizionale, accumulandoli in granuli come riserva energetica (Koch et al., 2020). I PHA sono dei poliesteri caratterizzati da un'unità monomerica ripetuta (Figura 6) in cui è presente un gruppo R che determina il tipo di PHA. Il monomero generalmente prodotto da *Synechocystis* è il 3-idrossibutirrato (3HB), caratterizzato da un gruppo R metilico, che va a costituire il poli-β-idrossibutirrato (PHB) (McAdam et al., 2020).



**Figura 6. Struttura generale dei PHA.** Figura adattata da Koch & Forchhammer (2021).

Le proprietà chimico-fisiche dei PHB sono simili a quelle del polipropilene, per cui li si vuole sfruttare come suo sostituto, ottenendo un materiale plastico biodegradabile. Questo si propone come alternativa alle attuali plastiche prodotte per via petrolchimica, non biodegradabili, che costituiscono circa il 12% della richiesta mondiale di olio fossile, contribuiscono all'emissione di GHG e causano grossi problemi di inquinamento. Nonostante i PHB si presentino come un'alternativa sostenibile e biodegradabile alle comuni plastiche, ci sono ancora alcune limitazioni, come i costi di produzione, che per il 50% sono legati alla fonte di carbonio usata per produrli. Sfruttare un organismo principalmente fotosintetico

come *Synechocystis* risulta essere un approccio interessante su questo fronte (Koch & Forchhammer, 2021; McAdam et al., 2020).

*Synechocystis* produce PHB in assenza di azoto a partire da acetil-CoA, grazie alla presenza di enzimi specifici quali acetil-CoA acetiltransferasi (PhaA), acetoacetyl-CoA reductasi (PhaB) e PHB sintasi (PhaE-C), ed è stato osservato in ceppi wild type un accumulo di PHB fino al 27% del peso secco cellulare in specifiche condizioni di crescita. Un accumulo maggiore è stato visto in condizioni mixotrofiche aggiungendo fonti di carbonio organico quali acetato e fruttosio (Koch et al., 2020).

Anche *Synechocystis* sp. B12 è in grado di produrre e accumulare PHB, soprattutto se in condizioni di alta luce, arrivando ad un accumulo del 31.5% del peso secco cellulare con un'illuminazione di  $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , in terreno privo di azoto e arricchito con 0.4% di acetato (Gracioso et al., 2021). In questo modo si può sviluppare un processo in due fasi: la prima in condizioni ottimali di crescita per favorire l'accumulo di biomassa, seguita da una crescita in assenza di azoto al fine di stimolare la produzione di PHB (Gracioso et al., 2021).

### **1.4.3. Altri microorganismi produttori di PHB**

Come descritto in precedenza (paragrafo 1.3.2), utilizzare cianobatteri per effettuare l'upgrading del biogas ha numerosi vantaggi, ma ha anche alcune limitazioni. In particolare, attraverso la fotosintesi i cianobatteri sono in grado di fissare alte concentrazioni di CO<sub>2</sub>, producendo tuttavia O<sub>2</sub>, che a sua volta diminuisce la purezza del biometano finale. Tra le possibili soluzioni a questo problema, la più interessante è rappresentata da sistemi di co-culturing, ovvero coltivazione di due microorganismi, dei quali uno (autotrofo - cianobatterio) fissa la CO<sub>2</sub> presente nel biogas e l'altro (eterotrofo) consuma l'O<sub>2</sub> prodotto dalla fotosintesi. In questo contesto, in cui lo scopo finale è la bioconversione di CO<sub>2</sub> in PHB, tra batteri con metabolismo eterotrofo eventualmente co-coltivabili con *Synechocystis* vi è *Cupriavidus necator* (precedentemente definito *Ralstonia eutropha*). *C. necator* è un batterio del suolo Gram-negativo appartenente alla classe dei Betaproteobacteria che presenta un metabolismo complesso (Percy et al., 2022). Si tratta di un organismo chemiolitoautotrofico facoltativo, in grado di crescere sia in autotrofia



consumando CO<sub>2</sub>, sia in eterotrofia con fonti di carbonio organico. Perché *C. necator* cresca in autotrofia, è necessario che gli sia fornito H<sub>2</sub> come donatore di elettroni, che sono utilizzati nella catena di trasporto degli elettroni per la generazione di energia sotto forma di ATP grazie alla presenza di idrogenasi di membrana. Per la crescita eterotrofica le fonti di carbonio organico includono intermedi del ciclo di Krebs, acidi grassi, amminoacidi, alcoli e composti aromatici e alcuni zuccheri: *C. necator* H16 (il ceppo più studiato) può utilizzare solo fruttosio ed N-acetilglucosamina (Cramm, 2009), mentre il ceppo mutante DSM 545 può anche utilizzare il glucosio (Brojanigo, 2022). In questo modo l'organismo è in grado di generare ATP mediante la catena di trasporto degli elettroni in cui O<sub>2</sub> funge da accettore finale. Questo avviene quindi in condizioni di aerobiosi. Ciò può essere interessante nell'ottica di un processo completo di biogas upgrading associato alla produzione di composti ad alto valore aggiunto, in quanto l'associazione del processo di bio-CCU mediato da un organismo fotosintetico come *Synechocystis* ad un processo di rimozione di O<sub>2</sub> mediato da *C. necator* può potenzialmente portare ad avere biometano purificato sia da CO<sub>2</sub> che da O<sub>2</sub>, con una produzione di PHB maggiorata.

## 2. Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è esplorare le potenzialità di *Synechocystis* sp. B12 nel processo di upgrading biologico del biogas, in virtù della sua capacità di fissare efficacemente la CO<sub>2</sub> e di resistere ad alte luci. Il progetto si è articolato su tre diversi punti.

Per stabilire le sue condizioni ottimali di crescita in prospettiva di un futuro scale-up industriale, *Synechocystis* sp. B12 è stato cresciuto in un sistema semicontinuo in piccola scala verificandone la produttività in diverse condizioni luminose (150, 350 e 700) e confrontandola con quella del più comune ceppo *Synechocystis* PCC 6803.

Successivamente, è stata valutata la capacità di *Synechocystis* sp. B12 di crescere e fissare CO<sub>2</sub> mediante fotosintesi in condizioni di alta CO<sub>2</sub> ed è stato testato il suo comportamento in presenza di CH<sub>4</sub> in un contesto di upgrading del biogas derivante da digestione aerobica.

Infine, è stata esplorata la possibilità di co-coltivare *Synechocystis* sp. B12 con *Cupriavidus necator* DSM 545 al fine di ridurre la quantità di O<sub>2</sub> immessa nel biometano risultante dall'upgrading fotosintetico. A tale scopo sono stati proposti dei possibili metodi per distinguere i due microrganismi in colture mescolate.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Inoculi e mezzi di coltura

##### 3.1.1 *Synechocystis* sp. B12 e PCC 6803

*Synechocystis* sp. B12 è stato isolato da un sito mangroviare in Santos (Brasile) (Gracioso et al., 2021), mentre *Synechocystis* sp. PCC 6803 è stato acquisito dalla Pasteur Culture Collection (PCC). I due ceppi di sono stati cresciuti su piastre di terreno BG-11 (Tabella 2) solido con 1% agar, usate per avviare inoculi da singola cellula in beute con 40 mL di terreno BG-11 liquido. Gli inoculi sono stati cresciuti a 30°C con agitazione di 120 rpm e luce bassa continua di 35  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e diluiti con nuovo terreno ogni 7 giorni. L'assenza di contaminazioni negli inoculi è stata controllata utilizzando un microscopio a contrasto di fase (Zeiss) munito di lente 40X.

Componente	Concentrazione (mg/L)
Na <sub>2</sub> MG EDTA	1
Citrato ferrico di ammonio	6
Acido citrico.1H <sub>2</sub> O	6
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079
COCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,050
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,391
(oppure MoO <sub>4</sub> 85%)	(0,018)
NaHCO <sub>3</sub>	20
NaNO <sub>3</sub>	1500

**Tabella 2. Composizione del medium BG-11.** Al terreno così costituito è stato aggiunto come tampone HEPES 1M con concentrazione finale 10 mM, ed è stato portato a pH 7,5 con alcune gocce di HCl prima di essere autoclavato.

##### 3.1.2 *Cupriavidus necator*

Il ceppo di *Cupriavidus necator* DSM 545 è stato ottenuto dal DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) cresciuto su piastre di LB solido (Tabella 3).

Componente	Concentrazione (g/L)
Estratto di lievito	5
Tryptone	10
NaCl	10
Agar	15

**Tabella 3. Composizione del medium LB solido.** Per la crescita dell'inoculo di *C. necator* al terreno così costituito è stato aggiunto glucosio 5 mM.

Le piastre sono state utilizzate per avviare inoculi liquidi in medium di coltura DMSZ-81 (medium 81) (Tabella 4), con aggiunta di glucosio in concentrazione 5 mM per garantire la crescita in eterotrofia.

Componente	Concentrazione (mg/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2300
NaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2900
NH <sub>4</sub> Cl	1000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	500
CaCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	5
NaVO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O	5
Citrato ferrico di ammonio	50
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,15
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5
COCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,15
Riboflavina	0,05
Tiamina-HCl.2H <sub>2</sub> O	0,25
Acido nicotinico	0,25
Piridossina-HCl	0,25
Ca-pantotenato	0,25
Biotina	0,0005
Acido folico	0,001
Vitamina B <sub>12</sub>	0,005

**Tabella 4. Composizione del medium 81.** Per la crescita dell'inoculo di *C. necator* al terreno così costituito è stato aggiunto glucosio 5 mM.

Un nuovo inoculo è stato preparato 3-4 giorni prima dell'avvio di ogni nuovo esperimento in cui necessario, e cresciuto a 30 °C con agitazione di 120 rpm per garantire il raggiungimento di una concentrazione cellulare sufficiente.

Per gli esperimenti in cui è stato utilizzato un terreno diverso dal medium 81, l'inoculo ottenuto è stato centrifugato per 5 minuti a 4000 g e il pellet risospeso nel terreno scelto.

## **3.2 Sistemi di crescita in semicontinuo**

### **3.2.1 Crescita di *Synechocystis* sp. B12 in semicontinuo**

Per la crescita in regime semicontinuo di *Synechocystis* sp. B12 e PCC 6803 sono state utilizzate bottiglie Drechsel da 250 mL, chiuse con un tappo costituito da garza e cotone. L'aria è stata insufflata attraverso filtri a porosità 0,2 µm, e le colture sono state mantenute in continuo mescolamento mediante uno stirrer magnetico in una camera a temperatura costante di 30 °C. L'OD<sub>750</sub> delle colture è stato misurato mediante uno spettrofotometro Cary 100 UV-VIS (Agilent) a singolo raggio utilizzando cuvette in plastica da 3 mL in cui il campione prelevato è stato misurato in diluizione 1:5. Per il valore di bianco è stata utilizzata acqua deionizzata, dato che presenta lo stesso valore di assorbanza del terreno BG-11. L'OD<sub>750</sub> è stato misurato e la coltura è stata diluita a OD<sub>750</sub> pari a 1 ogni 2-3 giorni. L'intensità luminosa è stata mantenuta a 150, 350 e 700 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, rispettivamente nei diversi esperimenti, utilizzando lampade a luce bianca, per un periodo di tempo tra 14 e 32 giorni. Per impostare l'intensità luminosa desiderata è stato usato un luminometro LI-250A (LI-COR Biosciences) e le colture sono state adattate alla luce per una settimana prima di iniziare a raccogliere i dati sperimentali. Il livello di contaminazione è stato controllato con il microscopio a contrasto di fase. Le crescite medie basate sull'OD<sub>750</sub> sono state misurate come  $([OD_{750 f}] - [OD_{750 i}])/(t_f - t_i)$ , dove OD<sub>750 f</sub> e OD<sub>750 i</sub> rappresentano l'OD<sub>750</sub> rispettivamente al giorno t<sub>f</sub> e t<sub>i</sub>. La rilevanza statistica della crescita media nei diversi ceppi e a diverse luci è stata valutata mediante 2-way ANOVA, considerando rilevanti le statistiche con  $p < 0,05$ .

### 3.2.2 Produttività di biomassa

Per misurare la produttività giornaliera di biomassa (g/[L·day]), ogni 2-3 giorni sono stati prelevati 5 o 10 mL di coltura in base alla disponibilità e portati a 50 mL con acqua deionizzata. I campioni così diluiti sono stati filtrati mediante una pompa da vuoto su filtri di nitrocellulosa con pori da 0,45 µm in grado di trattenere la biomassa cellulare. Prima e dopo l'utilizzo i filtri sono stati lasciati seccare a 60 °C per almeno 12 ore e pesati, in modo da determinarne la tara e il peso lordo. La concentrazione g/L della coltura è stata quindi calcolata dividendo il peso della biomassa (g) per il volume (L) prelevato per effettuare il peso secco. La produttività giornaliera è stata quindi calcolata come  $([C_f] - [C_i]) / (t_f - t_i)$ , dove  $C_f$  e  $C_i$  rappresentano la concentrazione della biomassa rispettivamente al giorno  $t_f$  e  $t_i$ .

La rilevanza statistica delle medie di produttività giornaliera, dati i due fattori intensità luminosa e ceppo di *Synechocystis*, è stata valutata mediante 2-way ANOVA, utilizzando il test Tukey per il confronto e considerando rilevanti le statistiche con  $p < 0,05$ .

### 3.2.3 Estrazione di pigmenti fotosintetici con N,N-dimetilformammide (DMF)

Per estrarre clorofille (Chl *a*) e carotenoidi (Car) dalle colture in semicontinuo a  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  è stato prelevato 1 mL dalla coltura ogni 2-3 giorni coltura e centrifugato a 10000 g per 10 minuti a temperatura ambiente, con successiva rimozione del surnatante. Il pellet è stato poi nuovamente centrifugato a 10000 g per 5 minuti a temperatura ambiente, rimuovendo il surnatante residuo. A questo punto è stato aggiunto 1 mL di DMF (SIGMA) per permettere l'estrazione dei pigmenti. Tutto il procedimento è stato eseguito al buio per evitare la degradazione dei pigmenti fotosensibili. I campioni sono quindi stati conservati al buio a 4°C.

### 3.2.4 Quantificazione di pigmenti fotosintetici estratti

Per la quantificazione dei pigmenti precedentemente estratti, i campioni sono stati centrifugati a 20000 g per 3 minuti, estraendo il surnatante contenente i pigmenti. Il surnatante è stato nuovamente centrifugato delle stesse condizioni per rimuovere tutti i possibili residui cellulari. Il campione così ottenuto è stato quantificato con

uno spettrofotometro Cary 100 UV-VIS (Agilent) a doppio raggio, in cuvette di quarzo da 1 mL, utilizzando DMF come bianco per la baseline. Per la quantificazione sono state utilizzate le seguenti formule (Wellburn, 1994):

$$\text{Chl } a \text{ [ } \mu \text{ g/ml]} = (11.92 * \text{OD}_{664})$$

$$\text{Car [ } \mu \text{ g/ml]} = [\text{OD}_{461} - (0,046 * \text{OD}_{664})] * 4$$

I valori sono stato normalizzati sulla base dell'OD<sub>750</sub> della coltura al momento dell'estrazione.

La rilevanza statistica tra i valori dei pigmenti nei due ceppi è stata valutata mediante 1-way ANOVA, utilizzando il test Tukey per il confronto e considerando rilevanti le statistiche con  $p < 0,05$ .

### **3.3 Simulazione di upgrading del biogas in bottiglie sigillate con composizione gasosa controllata**

#### **3.3.1 Preparazione delle bottiglie sigillate**

Per misurare i gas emessi e consumati dagli organismi in coltura sono state utilizzate bottiglie di volume totale pari a 120 mL. Dopo l'aggiunta di 40 mL di coltura liquida le bottiglie sono poi state chiuse con un tappo in gomma e rese ermetiche con un sigillo metallico applicato mediante pressa manuale. Tranne nel caso di controlli cresciuti in aria (vedi paragrafo 3.3.3), l'aria è stata sostituita con N<sub>2</sub> attraverso flushing per eliminare l'aria atmosferica e quindi l'ossigeno. Ciò è stato effettuato inserendo due aghi: il primo collegato al tubo del flusso di N<sub>2</sub> e posizionato in modo da essere inserito nella coltura liquida all'interno della bottiglia, mentre il secondo posizionato in modo da non toccare il liquido per permettere la fuoriuscita dell'aria all'interno. Una volta aperto il flusso di N<sub>2</sub>, il flushing è durato 7 minuti, al termine dei quali è stato rimosso prima l'ago collegato al flusso e dopo circa 10 secondi il secondo, in modo da rimuovere la sovrappressione all'interno della bottiglia.

### 3.3.2 Misure al gascromatografo

Per misurare la composizione gasosa nelle bottiglie sigillate è stato utilizzato gas cromatografo GC Agilent 8860, tarato in modo da riconoscere le quantità di H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ed N<sub>2</sub> in percentuale nel campione immesso. Per effettuare la misura è stata utilizzata una siringa per prelevare dalla bottiglia una quantità di gas di 0,6-0,8 mL e iniettarla nello strumento. Prima di ogni misura, la pressione interna alla bottiglia in atmosfere (atm) è stata misurata utilizzando un manometro HD 2124.2 (Delta OHM) per poter convertire il valore percentuale di gas ottenuto (legato al volume variabile del campione immesso nello strumento) in mL. Questo è stato effettuato sfruttando la legge dei gas perfetti descritta dalla seguente formula:

$$PV=nRT$$

dove

P = pressione (atm)

V = volume totale occupato da gas nella bottiglia (L)

n = numero moli di gas (mol)

R = costante universale dei gas 0,0821 (L\*atm)/(mol\*K)

T = temperatura (K)

Considerando T pari a 303 K (pari a 30 °C) e conoscendo la pressione nelle bottiglie, è stato calcolato il numero di moli totale (n) presente nella bottiglia. Ottenuto questo, è stato calcolato il volume effettivamente occupato da gas nel seguente modo:

$$\text{volume totale gas (mL)} = n \text{ (mol)} * 22400 \text{ (mL/mol)}$$

dove 22400 mL/mol rappresenta il volume molare di un gas in condizioni standard.

Il volume in mL occupato dallo specifico gas di interesse è stato poi calcolato come:

$$\text{volume gas X (mL)} = \% \text{ gas X} * \text{volume totale gas (mL)} / 100$$

### 3.3.3 Condizioni sperimentali di simulazione di upgrading del biogas

La crescita di *Synechocystis* sp. B12 è stata misurata in bottiglie chiuse ermeticamente e sottoposte a flushing con N<sub>2</sub>, in cui sono stati aggiunti 40 mL di



coltura e 80 mL di atmosfera variabile: 5% di CO<sub>2</sub> iniziale, 15% di CO<sub>2</sub> iniziale e biogas reale. Il biogas utilizzato, prodotto per digestione anaerobica, è stato fornito dall'azienda BTS Biogas (Verona). L'esperimento è stato effettuato in duplicato tecnico e duplicato biologico. Le bottiglie con CO<sub>2</sub> arricchita al 5% e 15% sono state ottenute iniettando mediante una siringa rispettivamente 10 e 20 mL di CO<sub>2</sub> pura. Le bottiglie con 5% CO<sub>2</sub> sono state sottoposte a refill giornaliero di CO<sub>2</sub> per mantenere questa percentuale di gas. Parallelamente a queste condizioni, è stata misurata come controllo dell'esperimento la crescita di *Synechocystis* sp. B12 in aria atmosferica non arricchita, ma con l'aggiunta di bicarbonato 6 mM nel mezzo di coltura in modo da mantenere la crescita anche quando consumata la CO<sub>2</sub> atmosferica.

La coltura di partenza con OD<sub>750</sub> pari a 0,2 è stata ottenuta tramite diluizione di un inoculo in beuta che cresceva a 30°C con agitazione di 120 rpm e luce bassa costante (35 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Le stesse condizioni sono state mantenute anche per la durata dell'esperimento in bottiglia di 8 giorni. L'OD<sub>750</sub> è stato misurato mediante plate-reader Tecan SPARK utilizzando piastre multiwell trasparenti con 96 pozzetti da 200 μL ciascuno, sia per la diluizione iniziale che per il monitoraggio giornaliero delle colture in bottiglia.

### **3.3.4 Concentrazione finale della biomassa**

Per misurare concentrazione di biomassa (g/L) ottenuta a fine esperimento nelle diverse condizioni, sono stati prelevati 5 mL di coltura al giorno 8 e portati a 50 mL con acqua deionizzata. I campioni così diluiti sono stati filtrati su filtri di nitrocellulosa con pori da 0,45 μm, precedentemente lasciati over-night in stufa a 60 °C e poi pesati. Dopo la filtrazione i filtri sono stati di nuovo lasciati in stufa a 60 °C per almeno 12 ore e pesati. Dal peso netto della biomassa è quindi stata ricavata la concentrazione g/L della coltura.

La rilevanza statistica delle concentrazioni finali di biomassa stata valutata mediante 1-way ANOVA, utilizzando il test Tukey per il confronto e considerando rilevanti le statistiche con  $p < 0,05$ .

### 3.4 Co-culture di *Synechocystis* sp. B12 e *Cupriavidus necator*

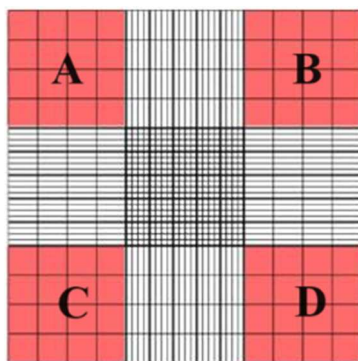
#### 3.4.1 Misura della concentrazione cellulare tramite citofluorimetria

Per misurare il numero di cellule di *Synechocystis* sp. B12 e *Cupriavidus necator* in co-culture mescolate è stato utilizzato il citofluorimetro BD LSRFortessa X-20 (BD Biosciences). Il campione da analizzare è stato diluito in 1 mL con fattore di diluizione (FD) 10, e misurato utilizzando un flusso medio (35  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) per 1 minuto. Le cellule nel campione (registrate come numero di eventi) sono state classificate in base a dimensione cellulare (FSC-A), complessità cellulare (SSC-A) e fluorescenza associata alla clorofilla *a* di *Synechocystis* sp. B12 (PerCP-Cy5-5-A). Il numero di eventi associato a ciascuna coltura è stato calcolato in questo modo:

$$\text{cellule/ml} = [\text{numero eventi} / (35 \mu\text{L}/\text{min})] * 1000 * \text{FD}$$

#### 3.4.2 Misura della concentrazione cellulare tramite camere di conta Neubauer

Per effettuare conte cellulari è stata utilizzata una camera di conta Neubauer (Precicolor HBG Germany) con profondità 0,1 mm, costituita da 4 quadrati grandi delimitati da linee triple, ognuno dei quali formato a sua volta da 16 quadrati più piccoli (Figura 7).



**Figura 7.** Schema della camera di Neubauer utilizzata. I quadrati grandi (in rosso) sono indicati come A, B, C e D.

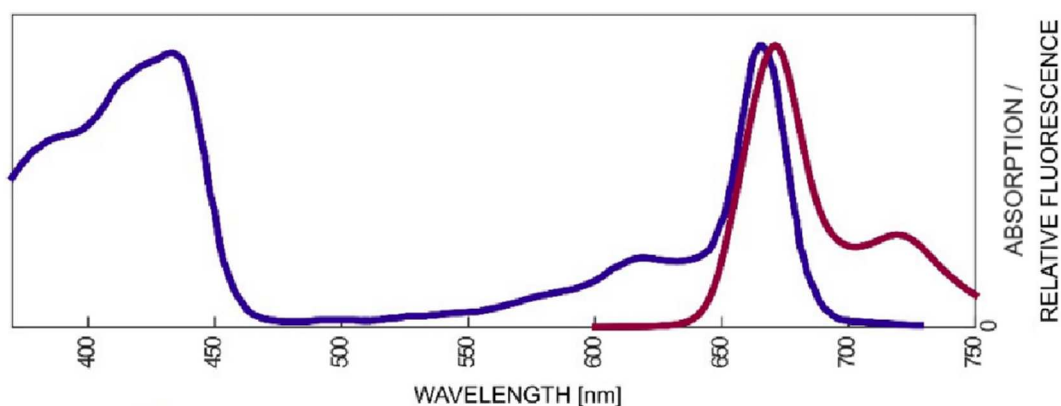
Il campione da misurare è stato diluito 1:100 in 1 mL, di cui 20  $\mu\text{L}$  sono stati posti nella camera di conta e coperti da un coprivetrino. È stato quindi utilizzato il microscopio a contrasto di fase (Zeiss) per contare il numero di cellule di *Synechocystis* sp. B12 e/o *Cupriavidus necator* presenti in ogni quadrato grande,

pari alla somma delle cellule in ogni quadrato piccolo che lo compone. È stata poi calcolata la concentrazione cellulare (cellule/mL) mediante la formula riportata di seguito. I valori finali sono stati riportati in  $10^6$  di cellule/mL.

$$\text{cellule/mL} = [(A+B+C+D)/4] * 10^4 * FD$$

### 3.4.3 Correlazione tra la fluorescenza della clorofilla *a* e l'OD<sub>750</sub> di *Synechocystis* sp. B12

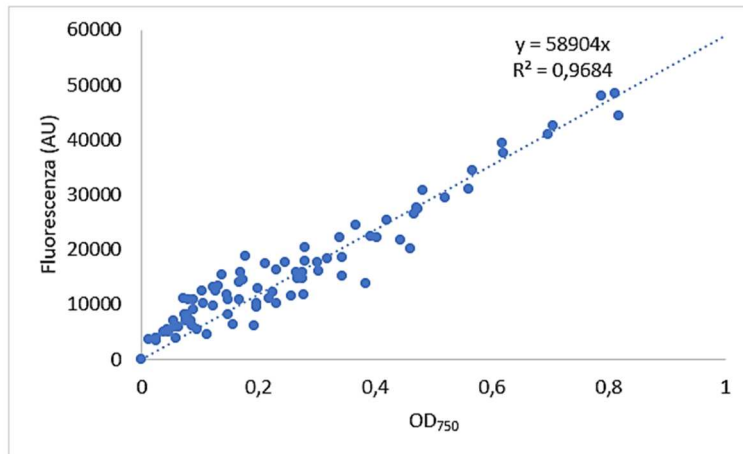
Per misurare l'intensità di fluorescenza della clorofilla *a* e correlarla all'OD<sub>750</sub> di *Synechocystis* sp. B12 è stato sfruttato lo plate-reader Tecan SPARK, effettuando le misure di OD<sub>750</sub> e fluorescenza in piastre multi-well trasparenti da 96 pozzetti. Sulla base delle caratteristiche dello spettro di assorbimento ed emissione di fluorescenza della clorofilla *a* (Figura 8), e successivamente a misure preliminari, per determinare l'intensità di fluorescenza è stata usata come lunghezza d'onda di eccitazione  $\lambda_{\text{ex}}$  535 nm e come lunghezza d'onda di emissione  $\lambda_{\text{em}}$  680 nm.



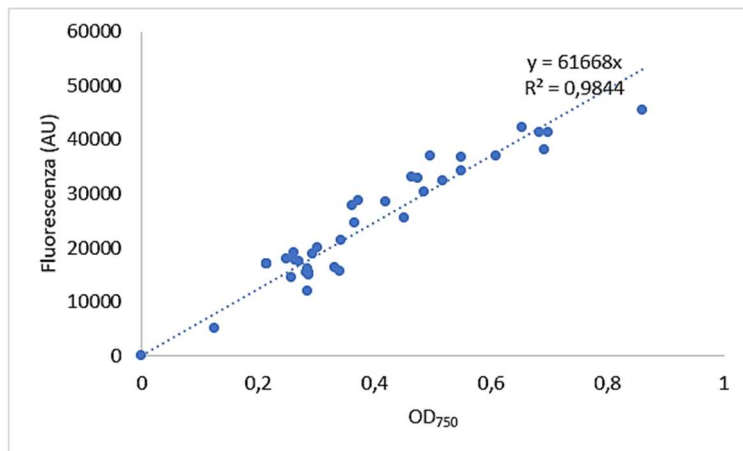
**Figura 8. Spettro di assorbimento (blu) e fluorescenza (rosso) della clorofilla *a*.** Lo spettro di emissione di fluorescenza presenta un picco a 680 nm, fissata come  $\lambda_{\text{em}}$ . Immagine adattata da Lamb et al., 2018.

Per ottenere la correlazione tra OD<sub>750</sub> di *Synechocystis* sp. B12 e intensità di fluorescenza sono stati prelevati e misurati campioni di *Synechocystis* sp. B12 in diverse fasi della crescita e in diverse diluizioni. La correlazione matematica tra le due variabili è risultata lineare. Dato che le co-culture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* sono state effettuate sia in beuta che in bottiglia, sono state generate due rette separate (Figura 9).

A)



B)



**Figura 9. Rette di correlazione tra OD<sub>750</sub> di *Synechocystis* sp. B12 e fluorescenza della clorofilla *a*.** La correlazione matematica tra fluorescenza (y) e OD<sub>750</sub> (x) è stata evidenziata separatamente nel caso di colture in beuta Erlenmeyer (A) o bottiglie sigillate (B). Il punto all'origine degli assi (0,0) non è un dato sperimentale ma è stato introdotto perché corrispondente alla misura di un pozzetto vuoto.

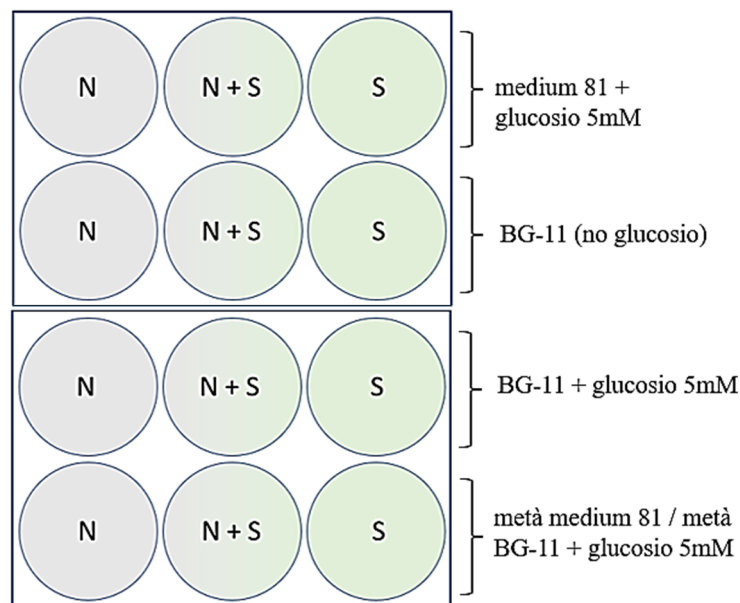
Il coefficiente di correlazione lineare (CC) tra fluorescenza (y) e OD<sub>750</sub> (x) è stato utilizzato per separare il contributo di OD<sub>750</sub> di *Synechocystis* sp. B12 in co-colture mescolate da quello di *C. necator* utilizzando i seguenti calcoli:

$$\text{OD}_{750} \text{ *Synechocystis* calcolato} = \text{intensità di fluorescenza misurata} / \text{CC}$$

$$\text{OD}_{750} \text{ *C. necator* calcolato} = \text{OD}_{750} \text{ totale misurato} - \text{OD}_{750} \text{ *Synechocystis* calcolato}$$

### 3.4.4 Test su terreno di coltura comune

La crescita di *Synechocystis* sp. B12 isolato, *C. necator* isolato e co-culture in rapporto 1:1 è stata verificata in piastre multi-well trasparenti da 6 pozzetti, utilizzando come terreno di coltura medium 81, BG-11 e un terreno misto di entrambi in uguale proporzione. Il medium 81 e il terreno misto (composto dal 50% di BG-11 e dal 50% di medium 81) sono stati testati con l'aggiunta di glucosio 5 mM, mentre BG-11 è stato testato con e senza l'aggiunta di glucosio (Figura 10). Le colture sono state fatte partire in un volume di 4 mL da OD<sub>750</sub> 0,2 (OD<sub>750</sub> totale pari a 0,4 nelle co-culture: contributo di 0.2 di Synecho e 0.2 nec) misurato mediante plate-reader Tecan SPARK, e sono state lasciate crescere per 4 giorni a 30 °C, a luce bassa continua (35  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con agitazione 120 rpm. L'OD<sub>750</sub> è stato misurato giornalmente.

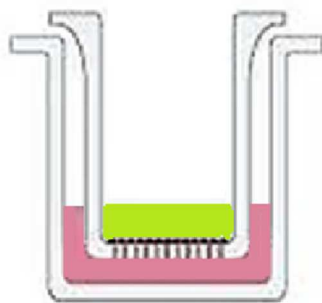


**Figura 10. Schema dell'esperimento.** Tre diversi terreni sono stati testati per la crescita di *Synechocystis* sp. B12 isolato (S), *Cupriavidus necator* isolato (N) e co-culture in rapporto 1:1 (N+S) con e senza glucosio.

### 3.4.5 Colture separate da membrane di dialisi

*Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* sono stati coltivati in piastre multi-well trasparenti con 6 pozzetti da 6 mL utilizzando BG11 come terreno. Per verificare la crescita dei due organismi in uno stesso pozzetto ma separati sono state utilizzate membrane di dialisi Slide-A-Lyzer MINI (Thermo Fisher). Sono state misurate

colture separate di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* in rapporto 1:1 e 2:1, e per ognuna di queste condizioni è stata verificata la crescita di ciascun organismo sopra e sotto alla membrana di dialisi. In due pozzetti sono stati cresciuti controlli isolati di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator*. Le colture sono state fatte partire da OD<sub>750</sub> 0,2 misurato mediante plate-reader Tecan SPARK, utilizzato anche per le successive misure giornaliere, in un volume di 4 mL ripartito in 2 mL sopra e 2 mL sotto la membrana di dialisi nel caso delle colture separate (Figura 11) Le colture sono state fatte crescere per 6 giorni a luce bassa costante ( $35 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), con agitazione 120 rpm a 30 °C.



**Figura 11. Schema delle colture separate da membrana.** All'interno di uno stesso pozzetto i due organismi crescono separatamente sopra (in verde) e sotto (in rosa) alla membrana di dialisi, che lascia passare il terreno ma non le cellule.

### 3.4.6 Co-colture in beute

Co-colture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* in rapporto 1:1, 2:1 e 4:1 sono state cresciute in beute con e senza l'aggiunta di glucosio 5 mM per 4 giorni in BG-11, assieme a controlli isolati dei due organismi. Per *Synechocystis* sp. B12 isolato, *C. necator* isolato e le co-colture sono state utilizzate beute con 40 mL di coltura. I controlli sono stati fatti partire entrambi da OD<sub>750</sub> 0,2. Nelle co-colture, *Synechocystis* sp. B12 è stato fatto partire sempre da OD<sub>750</sub> 0,2 mentre *C. necator* da OD<sub>750</sub> 0,2/0,1/0,05 in base al rapporto desiderato. Tutte le misure di OD<sub>750</sub> sono state effettuate mediante plate-reader Tecan SPARK. Le colture sono state lasciate crescere per 4 giorni a 30 °C, a luce continua di  $35 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con agitazione di 120 rpm. Le misure di OD<sub>750</sub> e fluorescenza sono state prese giornalmente. L'esperimento è stato effettuato in duplicato.

### 3.4.7 Co-culture in bottiglie sigillate

Co-culture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* in rapporto 1:1 e 1:3 sono state cresciute in bottigliette chiuse ermeticamente per 4 giorni in BG-11 senza glucosio, assieme a controlli isolati dei due organismi, al fine di verificare i livelli di produzione e consumo di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Similmente sono state testate co-culture in rapporto 1:1 in BG-11 con glucosio 5 mM. A tale scopo sono state utilizzate bottiglie sigillate con dentro 40 mL di *Synechocystis* sp. B12 a OD<sub>750</sub> 0,15. Queste sono poi state sottoposte a flushing con N<sub>2</sub> e arricchite con 15% CO<sub>2</sub>, *C. necator* è stato aggiunto al giorno 1 nelle bottiglie delle co-culture, con OD<sub>750</sub> corrispondente a quello di *Synechocystis* sp. B12 già presente nel caso delle co-culture 1:1 e triplo in quelle 1:3. Ciò è stato fatto per garantire la presenza di O<sub>2</sub>, prodotto da *Synechocystis* sp. B12 a partire dal giorno precedente e necessario per la crescita di *C. necator*. Anche il controllo di *C. necator* è stato quindi fatto partire al giorno 1, con OD<sub>750</sub> pari a *Synechocystis*. Le colture sono state lasciate crescere per 4 giorni a 30 °C e a luce bassa costante (35 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), con agitazione di 120 rpm. Le misure di OD<sub>750</sub> e fluorescenza sono state prese giornalmente mediante plate-reader Tecan SPARK, assieme alle misure di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> mediante gas cromatografo GC Agilent 8860 (vedi paragrafo 3.3.2 per dettagli misura). Per ogni condizione sono state utilizzate due repliche tecniche. L'esperimento senza glucosio è stato ripetuto in triplicato biologico, mentre quello con glucosio in duplicato biologico. La rilevanza statistica dei valori finali di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> al giorno 4 è stata valutata mediante 1-way ANOVA, utilizzando il test Tukey per il confronto e considerando rilevanti le statistiche con  $p < 0,05$ .

## 4. Risultati

### 4.1 Crescita in semicontinuo a diverse intensità luminose con CO<sub>2</sub> atmosferica

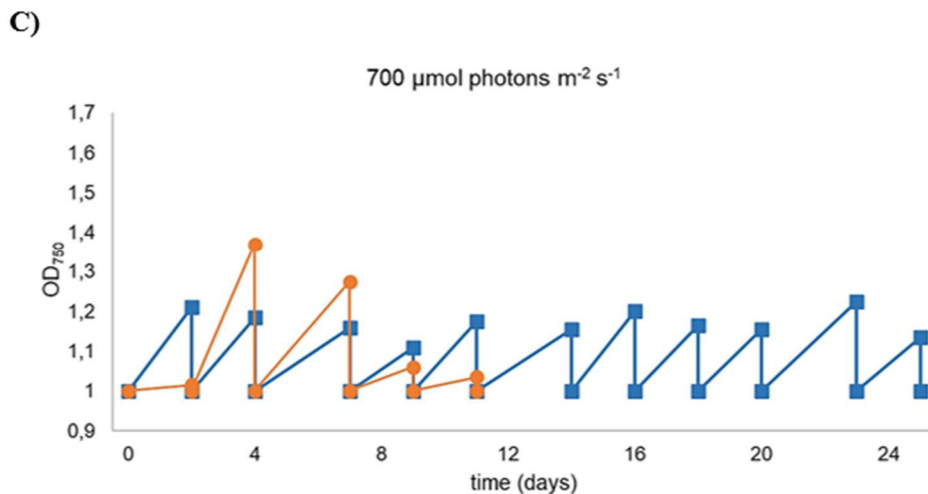
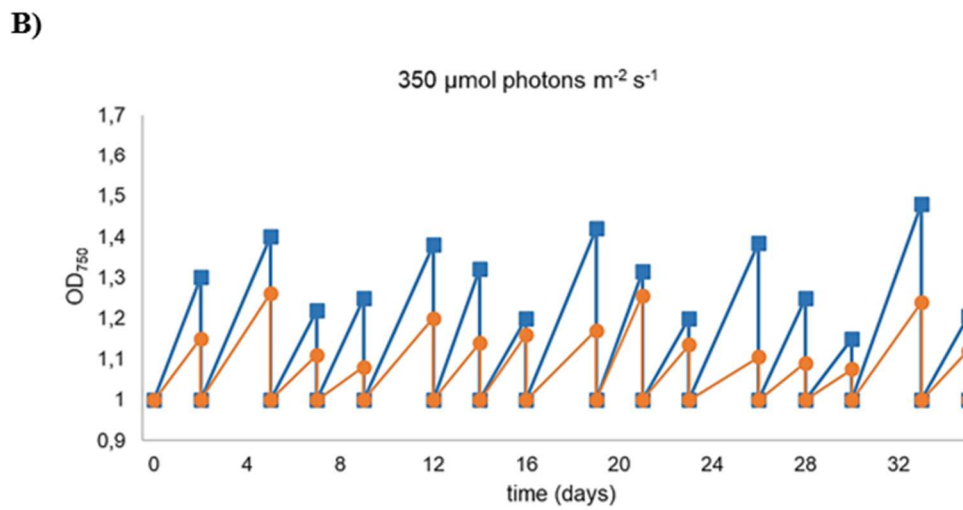
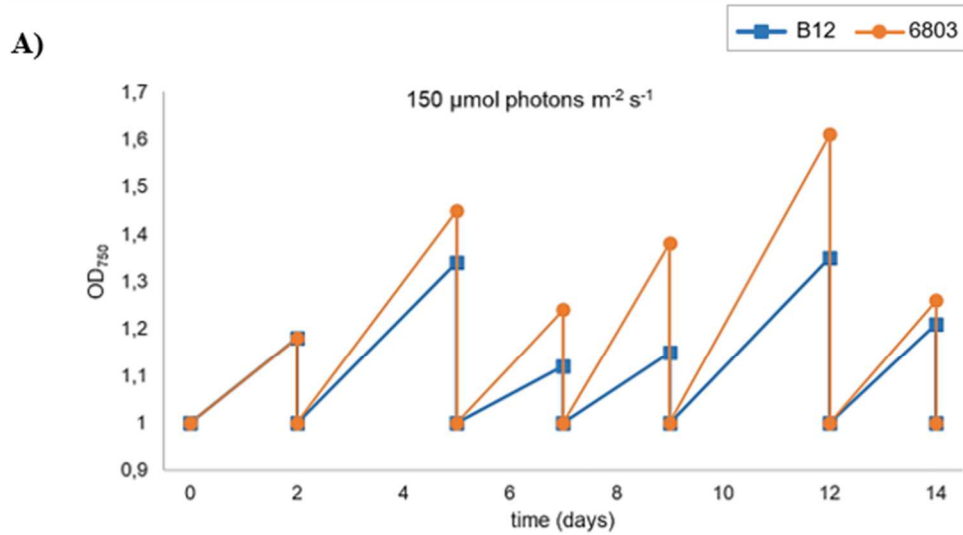
Per lo scale-up dei processi di produzione di biomolecole a partire da microrganismi fotosintetici è necessario muoversi da coltivazioni in batch a bottiglie in regime semi-continuo fino ad arrivare infine ai fotobioreattori chiusi (PBR). Qui si raggiungono livelli di produttività molto elevati, in quanto sono strutturati per ottimizzare l'efficienza fotosintetica e presentano un mescolamento ottimale, oltre che una distribuzione quanto più omogenea della luce (González-Camejo et al., 2019). Per studiare le condizioni ottimali da riprodurre in PBR, un passaggio obbligato è quello delle bottiglie che riproducono la struttura geometrica del bioreattore, mantenendo un regime semi-continuo in cui la coltura viene periodicamente rinfrescata con nuovo terreno in modo da garantire una produttività più elevata (Perin et al., 2017). Per verificare il potenziale utilizzo di *Synechocystis* sp. B12 in un processo di biogas upgrading nell'ottica dello scale-up industriale è stata valutata la sua crescita in semi-continuo, confrontata a quella di *Synechocystis* sp. PCC 6803, sottoponendo entrambi a diverse intensità luminose. Per la crescita sono state utilizzate bottiglie Drechsel da 250 mL, insufflate con un flusso continuo di aria ed è stata mantenuta la temperatura ottimale di crescita riferita a *Synechocystis* sp. PCC 6803, cioè 30 °C (Kłodawska et al., 2015).

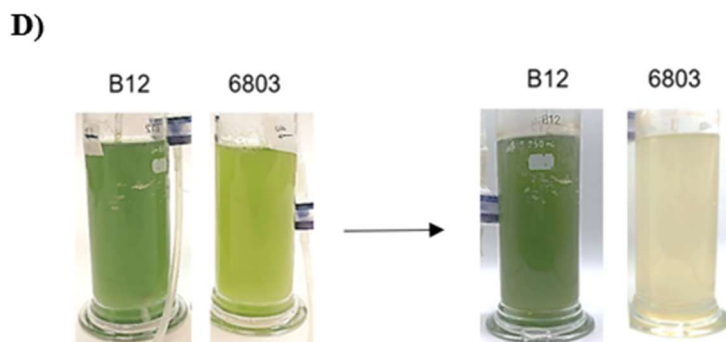
L'OD<sub>750</sub> del sistema è stato misurato ogni 2-3 giorni, per cui le cellule si trovavano in fase di crescita esponenziale (Gracioso et al., 2021), e dopo ogni misura la coltura è stata diluita a OD<sub>750</sub> 1 con nuovo terreno. Le intensità luminose prese in esame sono state 150, 300 e 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , previo adattamento delle colture.

Dall'analisi degli andamenti di OD<sub>750</sub> in semi-continuo è risultato che a 150  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  *Synechocystis* sp. PCC 6803 presenta una crescita maggiore rispetto a *Synechocystis* sp. B12 (Figura 12A), ma questo trend si inverte alzando l'intensità luminosa già a 350  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 12B). La differenza maggiore è stata però osservata ad alta luce, a 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 12C), dove *Synechocystis* sp. PCC 6803 ha iniziato a presentare una crescita irregolare dopo pochi giorni dall'inizio delle misure per arrestare la duplicazione dopo 10 giorni



(Figura 12D). Questo comportamento è stato osservato in tre inoculi indipendenti, suggerendo quindi che il ceppo non riesca a duplicarsi se esposto a quelle intensità di luce. Si può invece notare come la crescita di *Synechocystis* sp. B12 ad alta luce abbia continuato a presentare un andamento costante.



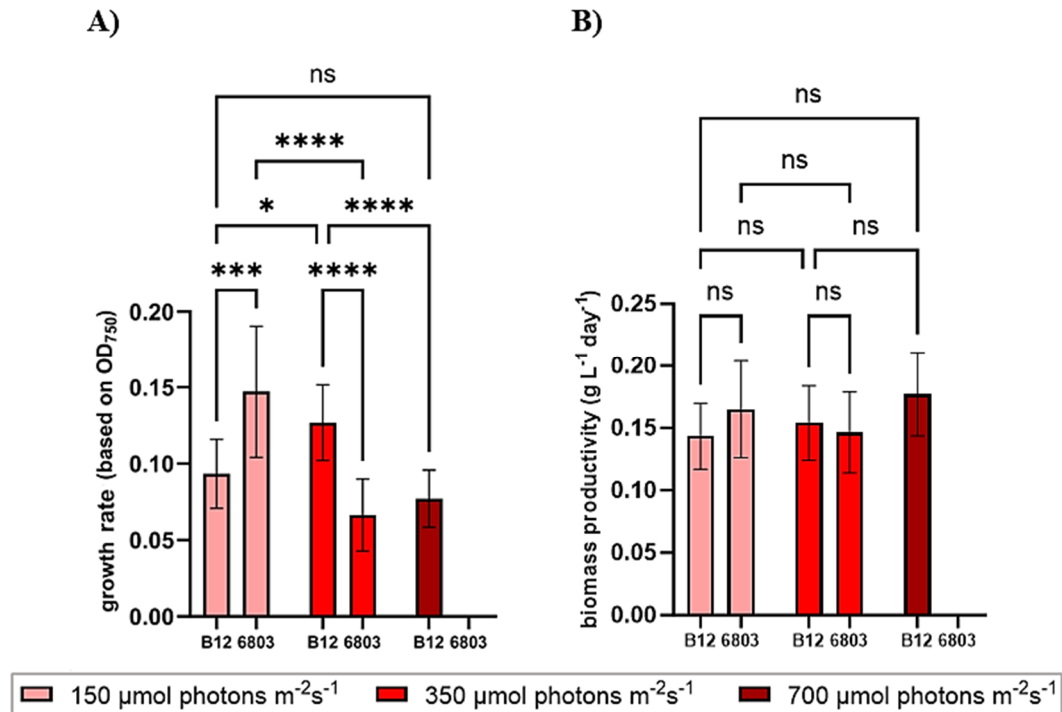


**Figura 12. Analisi della crescita in semi-continuo di *Synechocystis* sp. B12 e *Synechocystis* sp. PCC 6803.** Viene mostrato l'andamento della crescita in semi-continuo a  $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (A),  $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B) e  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (C). A  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  *Synechocystis* sp. PCC 6803 presenta un cambio nella colorazione dopo pochi giorni di acclimatazione, per poi morire circa al decimo giorno dall'inizio delle misure (D).

Per esaminare al meglio il diverso comportamento di *Synechocystis* sp. PCC 6803 e sp. B12 nelle tre diverse condizioni luminose esaminate, sono state sottoposte ad analisi statistica le loro crescite medie, basate sui valori di  $\text{OD}_{750}$  misurati (Figura 13A). La stessa analisi è stata effettuata sulla produttività giornaliera media di biomassa (Figura 13B), trattandosi di un parametro di fondamentale importanza per la coltivazione industriale in bioreattori (Chisti et al., 2003). I valori di  $\text{OD}_{750}$  e produttività giornaliera di *Synechocystis* sp. PCC 6803 a  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sono stati esclusi dall'analisi, in quanto irregolari e in numero limitato a causa della morte dell'organismo dopo pochi giorni.

Dall'analisi è risultato che, alla stessa intensità luminosa, vi è una differenza significativa nelle crescite medie dei due ceppi, osservando che a  $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  *Synechocystis* sp. PCC 6803 presenta una crescita maggiore rispetto a *Synechocystis* sp. B12. Questa tendenza però si inverte già a  $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , per poi risultare evidente a  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , dove *Synechocystis* sp. PCC 6803 muore dopo pochi giorni (Figura 13A). Si può inoltre osservare come la crescita di *Synechocystis* sp. B12 risenta dell'incremento dell'intensità luminosa meno significativamente rispetto a *Synechocystis* sp. PCC 6803, la cui crescita decresce significativamente già passando da  $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $350 \mu\text{mol photons m}^{-2}$  (Figura 13A). La stessa analisi applicata alla produttività giornaliera di biomassa non è invece risultata in una differenza statisticamente significativa (Figura 13B), quindi il risultato preliminare principale che si ottiene da questi dati

è che *Synechocystis* sp. B12 riesce a mantenere la stessa produttività a luci diverse, fino a intensità di 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Figura 13. Valori medi di OD<sub>750</sub> e produttività giornaliera di biomassa di *Synechocystis* sp. B12 e *Synechocystis* sp. PCC 6803 in semi-continuo.** Sono riportate le crescite medie basate sull'OD<sub>750</sub> (A) e la produttività giornaliera in g L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (B) alle tre intensità luminose utilizzate (150  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 350  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). La rilevanza statistica dei risultati è stata valutata mediante 2-way ANOVA utilizzando il test Tukey per il confronto, e il risultato riportato in base al p-value come non significativo (ns) dove  $p > 0.05$ , \* dove  $p \leq 0.05$ , \*\* dove  $p \leq 0.01$  e \*\*\*\* dove  $p \leq 0.0001$ .

Entrando nello specifico della situazione a 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , *Synechocystis* sp. PCC 6803 ha iniziato a presentare un cambiamento nella colorazione già nel periodo di adattamento. È stata quindi effettuata una estrazione e quantificazione dei pigmenti fotosintetici quali clorofilla *a* e carotenoidi di entrambi i ceppi a questa intensità luminosa, per verificare se questo cambiamento fenotipico potesse essere dovuto a fotodanno e quindi a una degradazione dei pigmenti fotosintetici. Per poter confrontare i valori nei diversi casi, la concentrazione di pigmenti quantificata è stata normalizzata sull'OD<sub>750</sub> della coltura al momento dell'estrazione. Si è così potuta rilevare una differenza significativa nella concentrazione di clorofilla *a* tra i due ceppi, risultando molto minore in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Figura 14A).

Non è invece risultata una differenza significativa nella concentrazione di carotenoidi, coinvolti nella fotoprotezione (Figura 14B).

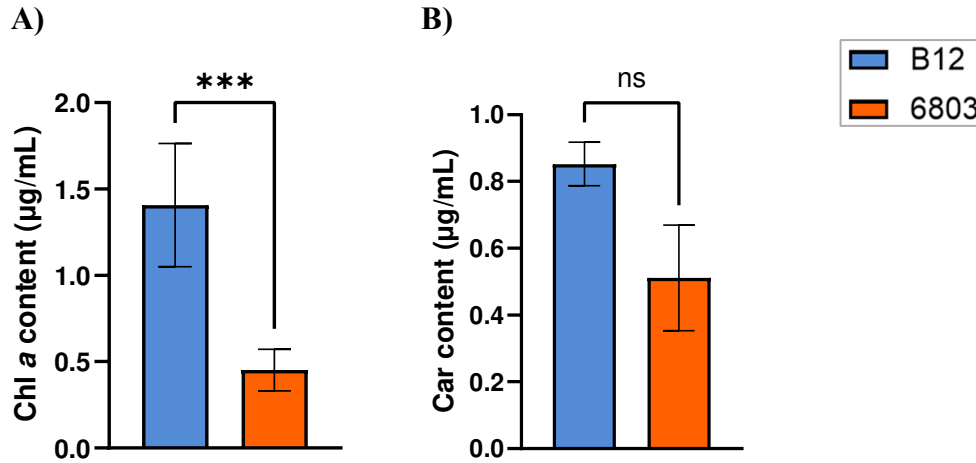


Figura 14. Contenuto di clorofilla *a* e carotenoidi in *Synechocystis* sp. B12 e *Synechocystis* sp. PCC 6803 nei primi 10 giorni a  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  normalizzato su OD<sub>750</sub> giornaliero. La concentrazione in µg/mL di clorofilla *a* (A) e carotenoidi (B) è stata ottenuta mediante estrazione con DMF e successiva quantificazione allo spettrofotometro. La rilevanza statistica dei risultati è stata valutata mediante 1-way ANOVA utilizzando il test Tukey per il confronto, e il risultato riportato in base al p-value come non significativo (ns) dove  $p > 0.05$  e \*\*\* dove  $p \leq 0.001$ .

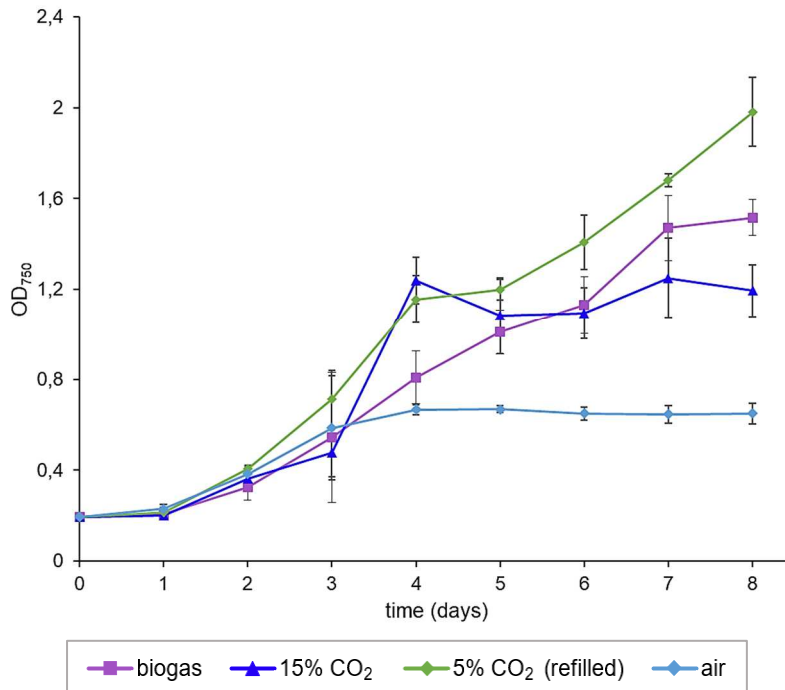
## 4.2 Crescita di *Synechocystis* sp. B12 in condizioni di biogas upgrading

Al fine di testare l'effettiva possibilità di utilizzare *Synechocystis* sp. B12 in applicazioni di biogas upgrading, è stato necessario osservare la sua risposta ad alte concentrazioni di CO<sub>2</sub> e verificare che il CH<sub>4</sub> non avesse un effetto inibitorio sulla crescita, sapendo che nel biogas questo arriva a concentrazioni del 75% come riportato nel paragrafo 1.2.1. Ciò è stato effettuato facendolo crescere in bottiglie sigillate con la composizione atmosferica di partenza desiderata. Nel corso dell'esperimento, durato 8 giorni, è stato misurato giornalmente l'OD<sub>750</sub> della coltura e la composizione gasosa all'interno della bottiglia, particolarmente in termini di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Come confronto è stata misurata anche la crescita in aria

atmosferica in presenza di bicarbonato 6 mM nel mezzo di coltura perché continuasse a crescere anche una volta esaurita la CO<sub>2</sub> atmosferica.

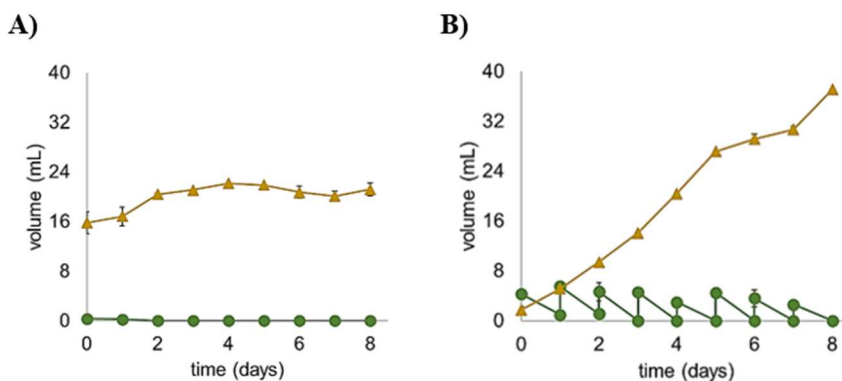
Sono state testate concentrazioni crescenti di CO<sub>2</sub> (5%-15%), fino ad arrivare all'utilizzo di biogas reale prodotto per digestione anaerobica. Il volume di biogas immesso nelle bottiglie sigillate è stato tale da non causare un eccessivo innalzamento della pressione interna, per cui sono state raggiunte concentrazioni di CO<sub>2</sub> circa del 20% e di CH<sub>4</sub> circa del 22%. Questi valori di CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> sono inferiori a quelli che verrebbero riscontrati crescendo l'organismo in biogas puro, ma sono comunque abbastanza alti da avere dei risultati preliminari sulla risposta dell'organismo a condizioni analoghe a quelle del biogas upgrading. Le colture con il 5% di CO<sub>2</sub> sono state sottoposte a refill giornaliero di CO<sub>2</sub>, dato il suo alto tasso di consumo da parte di *Synechocystis* sp. B12. In questo modo si è anche potuto osservare la crescita dell'organismo in un'atmosfera arricchita di CO<sub>2</sub> per tutta la durata dell'esperimento.

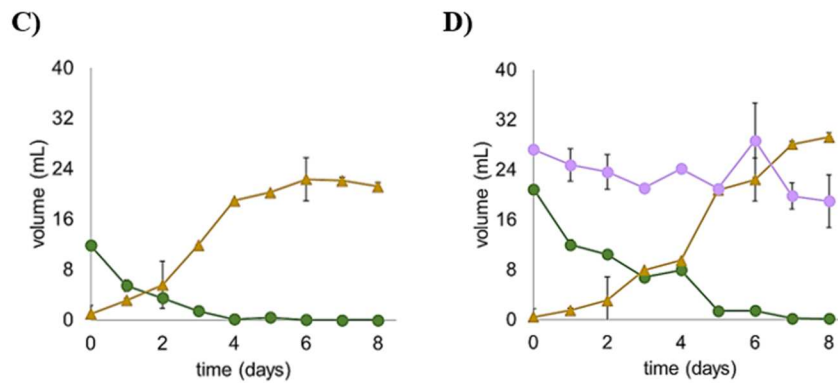
Dalle curve di OD<sub>750</sub> risultanti si osserva una maggiore crescita nelle colture sottoposte ad elevata CO<sub>2</sub> rispetto alla condizione di controllo, con allungamento della durata della fase di crescita esponenziale (Figura 15). Il controllo in atmosfera raggiunge la fase di plateau dopo circa 3 giorni, subito dopo l'esaurimento della CO<sub>2</sub> atmosferica, cosa che invece non avviene nelle tre condizioni sperimentali. La crescita con 5% di CO<sub>2</sub> e refill giornaliero presenta valori di OD<sub>750</sub> più alti rispetto alla condizione con 15% di CO<sub>2</sub> iniziale (Figura 15). Grazie al refill, infatti, la CO<sub>2</sub> non si trova mai in condizioni limitanti per la crescita, per cui anche al giorno 8 l'organismo si mantiene in crescita esponenziale. La curva di crescita di *Synechocystis* sp. B12 in biogas mostra che CH<sub>4</sub> non ha un effetto inibitorio, presentando un andamento di crescita molto simile a quello ottenuto con CO<sub>2</sub> iniziale del 15%: si osserva il raggiungimento di un OD<sub>750</sub> maggiore a fine esperimento, spiegato dalla percentuale più alta di CO<sub>2</sub> iniziale nel biogas (Figura 15). Questo rappresenta un dato preliminare importante per confermare la possibilità di effettuare biogas upgrading.



**Figura 15. Curve di crescita di *Synechocystis* sp. B12 a diverse concentrazioni di CO<sub>2</sub> e in biogas.** In tutti i casi è stato usato OD<sub>750</sub> di partenza pari a 0,2. I valori medi di OD<sub>750</sub> giornalieri sono ottenuti da 4 repliche complessive (duplicato tecnico e duplicato biologico).

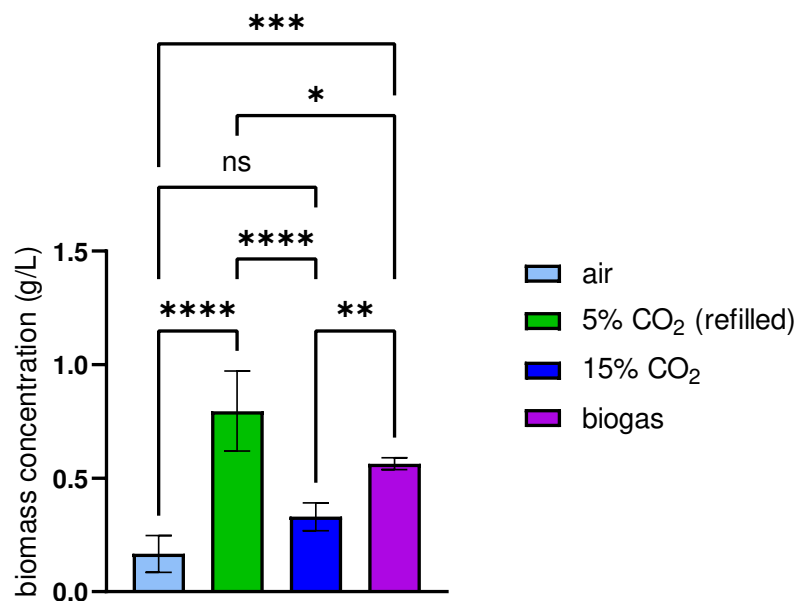
L'analisi giornaliera dei gas mostra come *Synechocystis* sp. B12 sia in grado di fissare CO<sub>2</sub> ad un tasso molto rapido, consumando tutta la CO<sub>2</sub> presente nella bottiglia dopo un giorno se presente al 5% (Figura 16B), 4 giorni se al 15% (Figura 16C) e circa 5 giorni se al 20% nel biogas (Figura 16D). Parallelamente si osserva come l'O<sub>2</sub> prodotto incrementi arrivando circa al 27% finale nella condizione di crescita in biogas. Questo numero aumenta se si considera la condizione con refill giornaliero, in cui si arriva ad una percentuale finale di O<sub>2</sub> del 31%.





**Figura 16. Andamento di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> in colture di *Synechocystis sp. B12* a diverse concentrazioni iniziali di CO<sub>2</sub> e in biogas.** La quantità di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> misurata giornalmente nelle bottiglie è riportata in volume (mL) di gas. Oltre al controllo in aria (A), le condizioni analizzate sono 5% di CO<sub>2</sub> iniziale con refill giornaliero (B), 15% di CO<sub>2</sub> iniziale (C) e biogas reale (D).

A fine esperimento è stata anche verificata la concentrazione di biomassa (g/L) ottenuta nelle diverse condizioni (Figura 17). Si può osservare come le concentrazioni finali ottenute presentino differenze significative, che confermano quanto osservato negli andamenti di OD<sub>750</sub>, cioè che in generale aumentando la CO<sub>2</sub> aumenta la produttività, in particolare osservando le condizioni di crescita con 15% e 20% CO<sub>2</sub>. Nel caso di CO<sub>2</sub> al 5%, dato che è stato effettuato un refill giornaliero, la produttività è risultata molto maggiore rispetto a tutte le altre condizioni.



**Figura 17. Concentrazione finale di biomassa di *Synechocystis sp. B12*.** La rilevanza statistica dei risultati è stata valutata mediante 1-way ANOVA utilizzando il test Tukey per il confronto, e il risultato riportato in base al p-value come non

significativo (ns) dove  $p > 0.05$ , \* dove  $p \leq 0.05$ , \*\* dove  $p \leq 0.01$ , \*\*\* dove  $p \leq 0.001$  e \*\*\*\* dove  $p \leq 0.0001$ .

### **4.3 Test preliminari per co-culture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator***

Le alte quantità di O<sub>2</sub> risultanti dalla simulazione di un sistema di biogas upgrading implicano la necessità di un sistema di rimozione di questo gas parallelamente al processo di upgrading fotosintetico. A tale scopo si è voluta accoppiare la fissazione della CO<sub>2</sub> da parte di *Synechocystis* alla crescita eterotrofica di *C. necator* DSM 545, che consuma O<sub>2</sub> attraverso la respirazione.

#### **4.3.1 Setting delle modalità di misura delle crescite dei due organismi: citofluorimetro, conta cellulare e fluorescenza della clorofilla *a***

Volendo lavorare con co-culture miste, il primo passo è definire un sistema per distinguere la crescita dei due microrganismi. Il metodo più consolidato a tal proposito per misurare la densità cellulare dei due organismi a livello di laboratorio è l'impiego di camerette di conta (Hoffman, 2006), che però prevede l'impiego di una conta manuale effettuata al microscopio, soggetta a grande errore da parte dell'operatore e dispendiosa in termini di tempo.

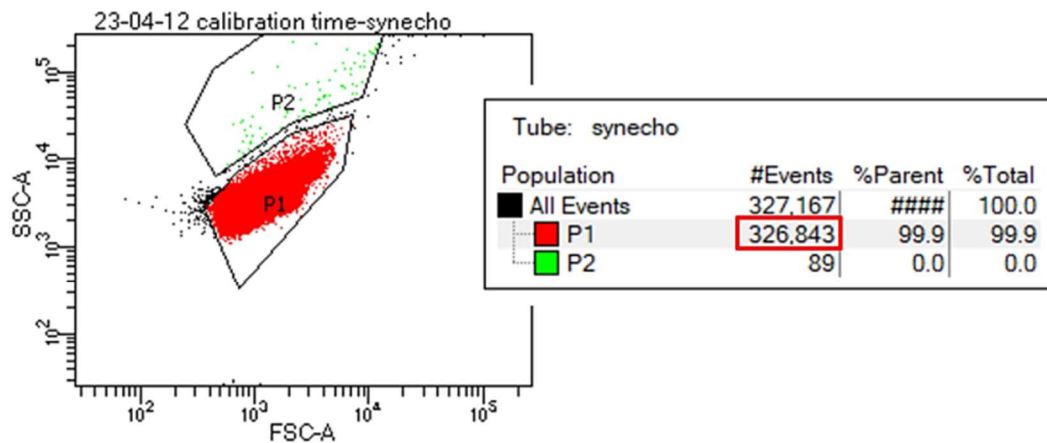
Un metodo alternativo e high-throughput che si può sfruttare è l'impiego di un citofluorimetro. Questo, infatti, può misurare il numero di cellule in un campione diluito di co-cultura sotto forma di numero di eventi, classificandoli in popolazioni distinte sulla base di diametro cellulare (definito dal parametro FSC-A), complessità cellulare (definita dal parametro SSC-A) e, addizionalmente, emissione di fluorescenza. Data la presenza di clorofilla *a* in *Synechocystis* sp. B12 ma non in *C. necator*, nelle analisi con il citofluorimetro è stato utilizzato il filtro per la fluorescenza del fluorocromo PerCP-Cy5-5-A per registrare la fluorescenza emessa dalla clorofilla *a*.

Prima di analizzare co-culture al citofluorimetro, sono state analizzate colture dei due organismi isolati, in modo da verificare che le aree corrispondenti a ciascun



organismo (popolazione) nel grafico FSC-A/SSC-A fossero ben distinte. Definendo *Synechocystis* sp. B12 come popolazione 1 (Figura 18A) e *C. necator* come popolazione 2 (Figura 18B), si è osservato che le aree corrispondenti sul grafico non sono sovrapposte, mostrandosi risolte in termini di SSC-A. Inoltre, per entrambi gli organismi, si osserva che il numero di eventi effettivamente riconducibili alla specifica popolazione è quasi coincidente al numero di eventi totali, rappresentando il 99,9% nel caso di *Synechocystis* sp. B12 e il 96,8% nel caso di *C. necator*.

A)



B)

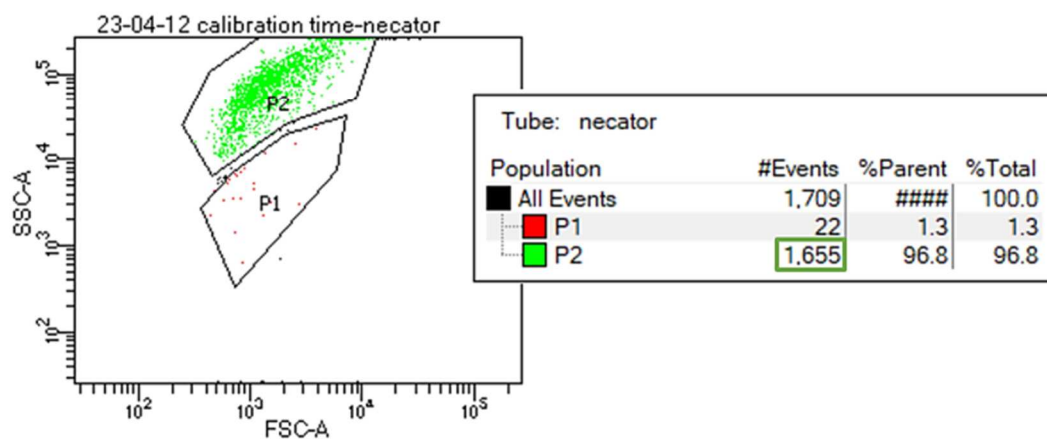


Figura 18. Analisi al citofluorimetro di colture axeniche di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* per settaggio dell'analisi di co-culture. Gli eventi cellulari registrati dallo strumento sono mostrati in un grafico in base a FSC-A (forward scatter) che è correlato al diametro cellulare e SSC-A (side scatter) che è invece correlato alla complessità cellulare. Definendo *Synechocystis* sp. B12 come P1 (A) e *C. necator* come P2 (B) è possibile definire le due aree del grafico corrispondenti. Le tabelle corrispondenti indicano il numero di eventi totali e quello incluso nell'area di grafico corrispondente ad una specifica popolazione.

Sulla base di questi risultati promettenti, è stata effettuata una analisi di co-culture in rapporto 1:1 di OD<sub>750</sub>. I risultati, graficati sia in termini di FSC-A e SSC-A (Figura 19A) che di SSC-A e fluorescenza (Figura 19B), hanno mostrato però che la popolazione 2 corrispondente a *C. necator* è fortemente sottostimata rispetto a quella di *Synechocystis*, nonostante l'OD<sub>750</sub> uguale. Il numero di eventi delle due popolazioni P1 e P2 risulta infatti essere circa in rapporto 100:1 (Figura 19C).

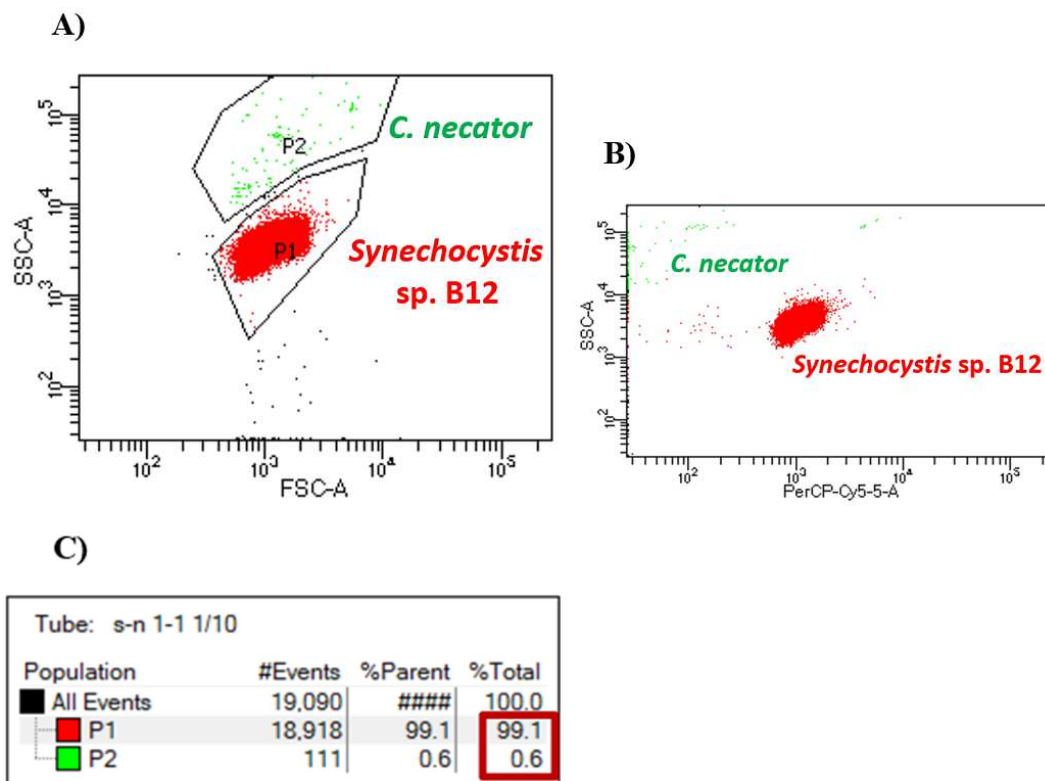
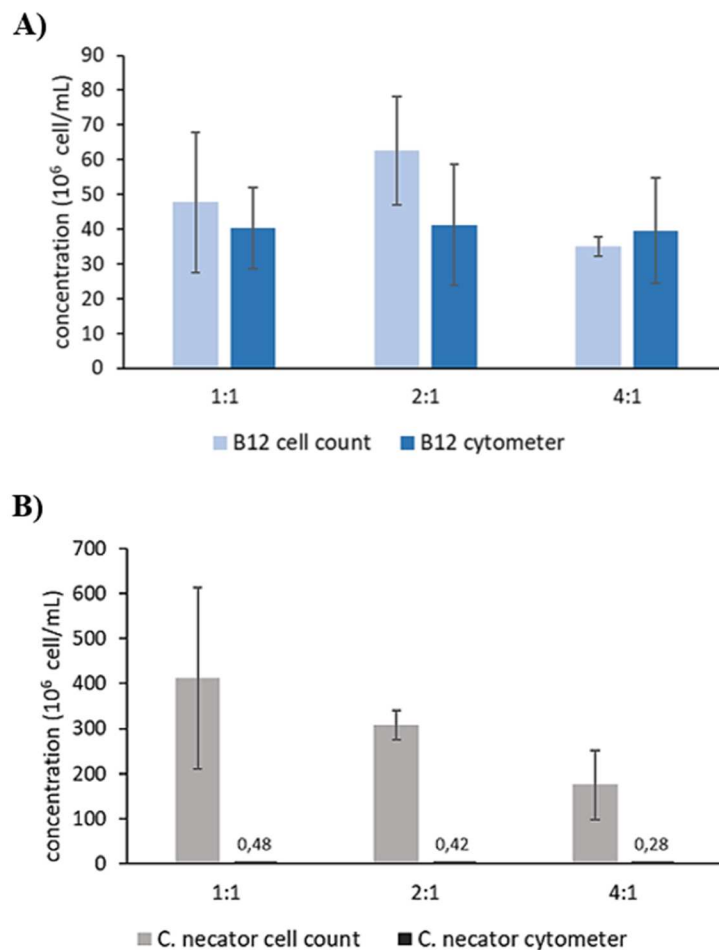


Figura 19. Analisi al citofluorimetro di co-culture *Synechocystis* sp. B12 : *C. necator* in rapporto di OD<sub>750</sub> 1:1. Il grafico FSC-A/SSC-A risultante dall'analisi della co-cultura (A) mostra una buona distinzione delle due popolazioni P1 (*Synechocystis* sp. B12) e P2 (*C. necator*). Questa distinzione è ancora più evidente nel grafico PerCP-Cy5-5-A/SSC-A (B), dove il filtro PerCP-Cy5-5-A mette in evidenza la fluorescenza della clorofilla *a* presente in *Synechocystis* sp. B12 e assente in *C. necator*. Tuttavia, dal report complessivo sulla suddivisione delle due popolazioni nel campione (C) risulta che la percentuale di *C. necator* presente è molto bassa, e il rapporto P1:P2 risulta circa 100:1.

Nonostante la corrispondenza tra OD<sub>750</sub> e numero di cellule non sia univoca in organismi morfologicamente diversi, questa discrepanza così elevata suggerisce un problema nella rilevazione delle cellule di *C. necator*. Questa è probabilmente riconducibile al limite di rilevamento del citofluorimetro utilizzato (BD

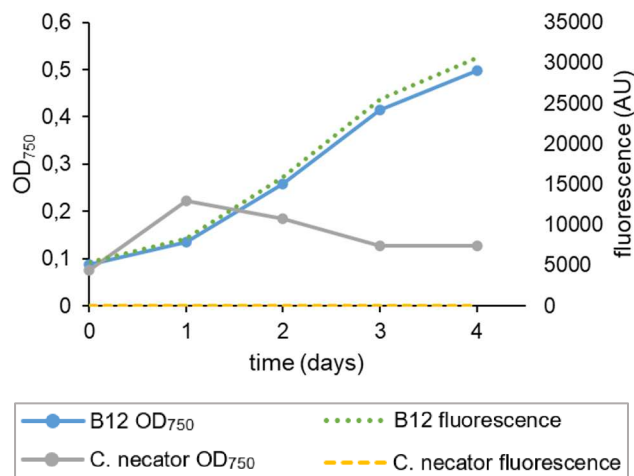
LSRFortessa X-20) che, da manuale, ha un limite di rilevamento di 0,5  $\mu\text{m}$ . Dato che il diametro di *Synechocystis* sp. è circa 1,5-3  $\mu\text{m}$  (van de Meene et al., 2006) e quello di *C. necator* 0,5 -1,5  $\mu\text{m}$  (Finkler et al., 2007), lo strumento molto probabilmente non è in grado di rilevare tutte le cellule di *C. necator* per cui il numero totale risulta sottostimato.

Per avere conferma di questo è stata effettuata una conta cellulare mediante camera di Neubauer su co-culture *Synechocystis* sp. B12 : *Cuprividus necator* in diversi rapporti quali 1:1, 2:1 e 4:1 (con OD<sub>750</sub> di partenza 0,2 fisso per *Synechocystis* sp. B12). La concentrazione cellulare risultante dei due organismi ( $10^6$  cellule/mL) è stata confrontata a quella determinata dai dati di acquisizione del citofluorimetro. Si è così osservato che la concentrazione cellulare di *Synechocystis* sp. B12 misurata in entrambi i modi risulta confrontabile (Figura 20A), mentre la concentrazione cellulare di *C. necator* misurata tramite conta cellulare è almeno 500 volte maggiore rispetto a quella determinata con il citofluorimetro (Figura 20B).



**Figura 20. Confronto tra il numero di cellule di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* misurate mediante conta cellulare in camera di Neubauer e mediante citofluorimetro.** Sono state analizzate co-culture *Synechocystis* sp. B12 : *C. necator* in rapporto di OD<sub>750</sub> 1:1, 2:1 e 4:1 (in cui il valore di OD<sub>750</sub> di *Synechocystis* sp. B12 è stato mantenuto fisso). Il numero di cellule di *Synechocystis* sp. B12 (A) e *C. necator* (B) è stato misurato sia mediante conta cellulare che sulla base del numero di eventi misurati con il citofluorimetro.

Visti i limiti dell'analisi con il citofluorimetro, un approccio alternativo testato è stato l'utilizzo della fluorescenza. Come descritto precedentemente, la clorofilla *a* in *Synechocystis* è in grado di emettere fluorescenza, segnale assente in *C. necator* non mostra emissione di fluorescenza quando stimolato (Figura 21B). Questo è stato confermato misurando l'andamento di OD<sub>750</sub> due organismi isolati parallelamente alla loro emissione di fluorescenza (dati  $\lambda_{ex}$  535 nm e  $\lambda_{em}$  680 nm) con un plate-reader (Figura 21). Da questa misura viene confermato che l'andamento di fluorescenza di *Synechocystis* segue quello del suo OD<sub>750</sub>, e che *C. necator* presenta sempre un'emissione di fluorescenza trascurabile.

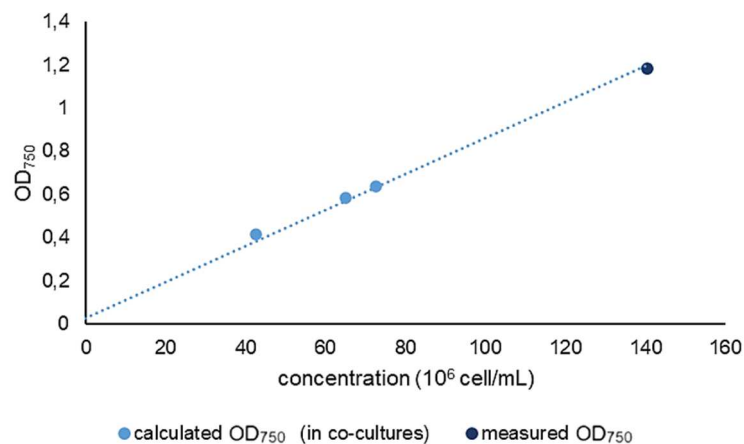


**Figura 21. Misura di OD<sub>750</sub> e fluorescenza di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* isolati nel tempo.**

Alla luce di ciò sono state effettuate delle rette di taratura per correlare l'OD<sub>750</sub> di *Synechocystis* sp. B12 alla fluorescenza (Figura 9): utilizzando queste rette è stato quindi possibile convertire matematicamente il valore di fluorescenza registrato nelle co-culture testate in OD<sub>750</sub> calcolato di *Synechocystis* sp. B12. Sottraendo

questo valore all'OD<sub>750</sub> totale misurato è stato poi possibile stimare anche l'OD<sub>750</sub> di *C. necator*.

Per confermare la validità dell'OD<sub>750</sub> di *Synechocystis* sp. B12 calcolato mediante queste rette di taratura, sono state effettuate delle conte cellulari di *Synechocystis* sp. B12 isolato e in co-cultura con *C. necator* in vari rapporti. È stata quindi ricavata una correlazione tra la concentrazione cellulare ricavata dalla conta e l'OD<sub>750</sub> corrispondente di *Synechocystis* sp. B12, misurato se in coltura isolata e calcolato se in co-cultura (Figura 22). la correlazione lineare ottenuta dimostra che i valori di OD<sub>750</sub> calcolati sono coerenti con l'OD<sub>750</sub> misurato.



**Figura 22. Correlazione tra OD<sub>750</sub> (calcolato e misurato) di *Synechocystis* sp. B12 e concentrazione cellulare ricavata da conta cellulare.**

#### 4.3.2 Curve di crescita di co-culture in diversi terreni

Una volta determinato il metodo per definire la crescita dei due organismi in co-cultura, si è però posto il problema di determinare quale terreno di crescita fosse quello più adatto. A tale scopo, considerando il medium 81 come medium ottimale per *C. necator*, e BG11 come ottimale per la crescita di *Synechocystis* sp. B12, sono stati effettuati dei test di crescita in piastra da 6 mL utilizzando medium 81, BG-11 e un terreno misto di entrambi al 50%. Per la crescita di *C. necator* in eterotrofia, a tutti i terreni è stato aggiunto glucosio 5 mM. Solo BG-11 è stato testato con e senza l'aggiunta di glucosio. Le co-culture sono state testate solo in rapporto 1:1, assieme ai rispettivi controlli isolati, partendo da OD<sub>750</sub> 0,2 (Figura 23). Le curve di crescita di 4 giorni sono state ottenute mediante misure giornaliere di OD<sub>750</sub> e fluorescenza.

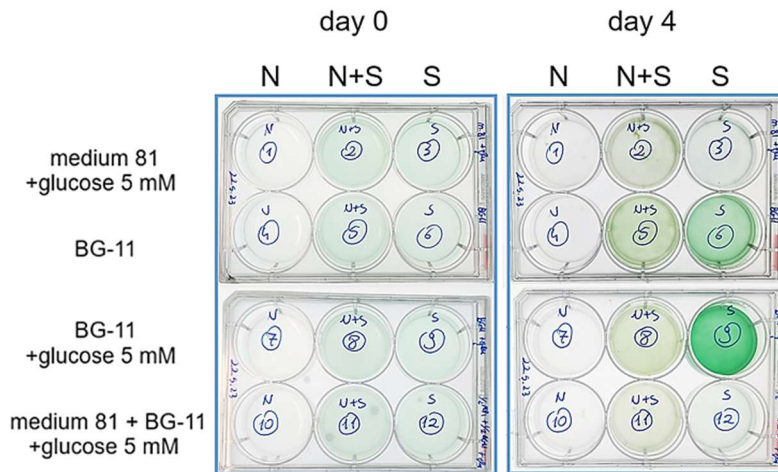


Figura 23. Immagine delle co-culture a inizio e fine esperimento. I pozzetti sono indicati con N (solo *C. necator*), S (solo *Synechocystis*) o N+S (co-culture).

Osservando le crescite dei controlli isolati (Figura 24A-B), si è potuto osservare che *C. necator* ha una crescita comparabile in tutti i terreni purchè sia presente glucosio. Al contrario, *Synechocystis* cresce normalmente in BG-11 (con un tasso di crescita maggiore in presenza di glucosio), mentre presenta crescite ridotte sia in medium-81 che in mezzo misto a BG-11.

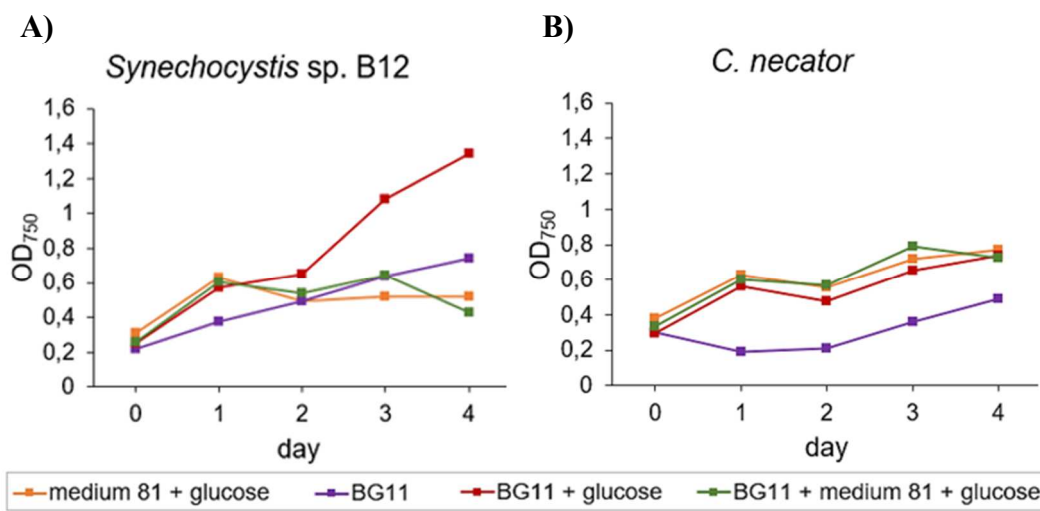


Figura 24. Curve di crescita di *Synechocystis* sp. B12 (A) e *C. necator* (B) isolati nei diversi terreni di coltura testati.

Questo trend di crescita si riflette anche nelle co-culture cresciute nei diversi terreni (Figura 25A-B-C-D), soprattutto nei primi 3 giorni. Si può osservare che a fine esperimento i valori di OD<sub>750</sub> calcolato di *C. necator* risultano più alti del previsto,

ma questo può essere spiegato dal fatto che, un sistema di coltura in piastra è facilmente sottoposto a contaminazione e non è detto che il contributo batterico qui osservato sia dovuto esclusivamente a *C. necator*.

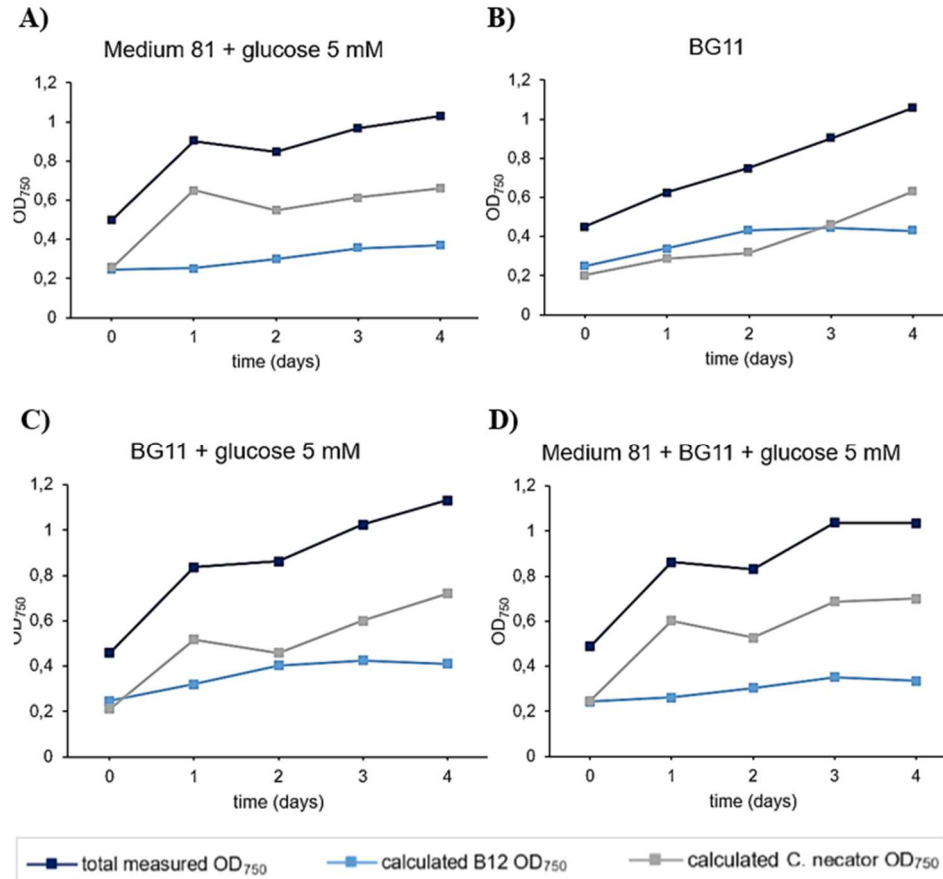


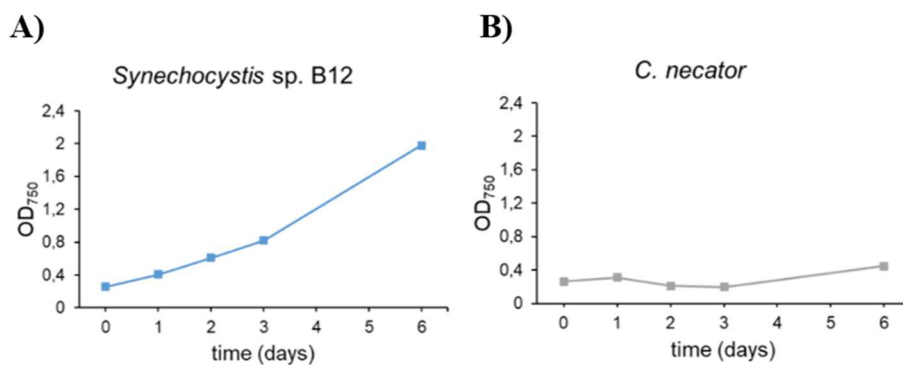
Figura 25. Curve di crescita in diversi terreni di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* in co-culture in rapporto 1:1. Sono stati testati medium 81 con glucosio (A), BG-11 senza (B) e con (C) glucosio e un terreno misto con glucosio (D). Il contributo all'OD<sub>750</sub> totale (blu scuro) di è ripartito in OD<sub>750</sub> calcolato di *Synechocystis* sp. B12 (azzurro) e OD<sub>750</sub> calcolato di *C. necator* (grigio).

Sulla base di quanto osservato è stata confermato l'utilizzo di BG-11 come terreno per tutti i successivi esperimenti in modo da permettere la crescita ottimale di *Synechocystis* sp. B12 senza compromettere quella di *C. necator*.

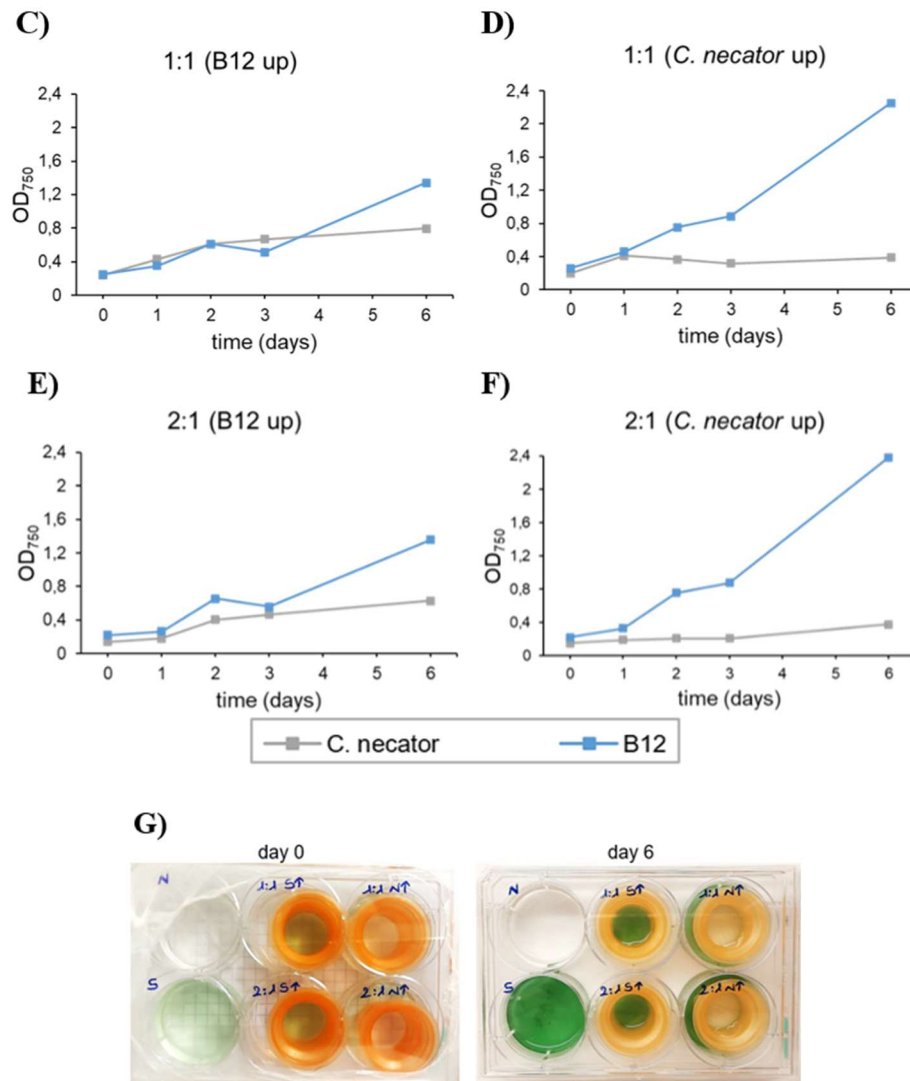
#### 4.3.3 Valutazione delle crescite di *C. necator* e *Synechocystis* sp. B12 in colture separate da membrana di dialisi



Un primo test effettuato è stato osservare la crescita dei due organismi in uno spazio comune ma mantenendo la separazione cellulare in modo da permettere una misurazione precisa delle rispettive crescite. Questo test di crescita separata è stato effettuato in piccola scala in piastre multi-well da 6 mL, sfruttando piccole membrane di dialisi in grado di lasciar passare il terreno di coltura ma non le cellule. Sono quindi state misurate le crescite separate di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* in rapporto 1:1 e 2:1, avendo in entrambi i casi OD<sub>750</sub> di partenza 0,2 per *Synechocystis* sp. B12. L'esperimento è stato effettuato senza glucosio aggiunto. Per ognuna di queste condizioni è stata testata la crescita di ciascun organismo sopra e sotto alla membrana di dialisi, dato che il volume occupato dalla coltura in un caso o nell'altro si distribuisce diversamente (Figura 11) e questo implica che le due condizioni non sono totalmente equivalenti. Come controllo, in due pozzetti sono stati cresciuti controlli isolati di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* senza utilizzare le membrane di dialisi. Le colture sono state fatte crescere per 6 giorni a luce bassa costante e in agitazione. Dalle crescite risultanti si è visto nei controlli isolati (Figura 26A-B) che i due organismi seguono la tendenza di crescita aspettata, con *Synechocystis* sp. B12 che presenta crescita esponenziale mentre *C. necator* mantiene un OD<sub>750</sub> più o meno costante data l'assenza di glucosio in coltura per la crescita in eterotrofia. Questa tendenza risulta simile nelle colture separate da membrana (Figura 26C-D-E-F), dove si può anche osservare come la crescita di *Synechocystis* al di sotto della membrana di dialisi (Figura 26D-F) sia quella che presenta la crescita più simile al controllo isolato (Figura 26A): si può ipotizzare che ciò sia dovuto a un migliore mescolamento in questa condizione e a un maggiore rapporto superficie/volume.



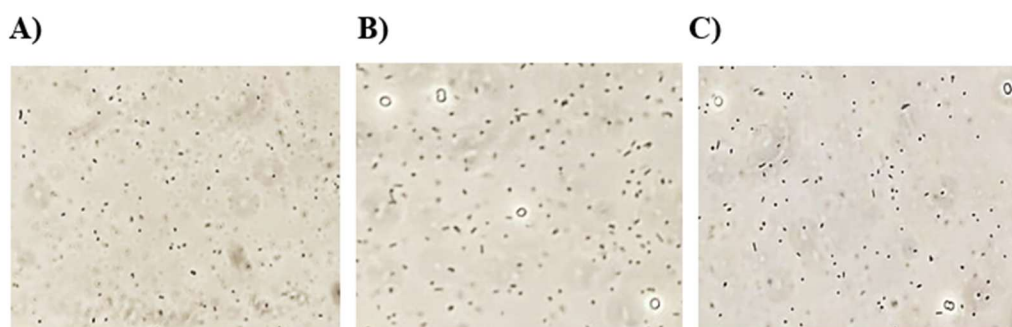




**Figura 26.** Curve di crescita di colture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* in rapporto 1:1 e 2:1 separate da membrana. Oltre ai controlli isolati di *Synechocystis* (A) e *C. necator* (B), sono state verificate le crescite di co-culture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* nelle seguenti condizioni: rapporto 1:1 con B12 sopra (C) e sotto (D) alla membrana di dialisi, rapporto 2:1 con B12 sopra (E) e sotto (F) alla membrana di dialisi. Si può osservare la crescita separata degli organismi al giorno 0 e al giorno 6 (G).

Nonostante la tendenza di OD<sub>750</sub> risultasse coerente con quanto aspettato e gli organismi risultassero visivamente distinti (Figura 26G), per valutare l'effettiva separazione delle due colture in uno stesso pozzetto, queste sono state osservate al microscopio a contrasto di fase, che permette di visualizzare cellule batteriche. I due organismi sono infatti facilmente distinguibili dato che le cellule di *Synechocystis* sono tondeggianti e di dimensioni maggiori rispetto a quelle di *C. necator*, più piccole e allungate. Nelle colture di *C. necator* non è stata rilevata

nessuna contaminazione da parte di cianobatteri (Figura 27A), mentre nelle colture di *Synechocystis*, è stata osservata una forte contaminazione batterica sia al di sotto (Figura 27B) che al di sopra (Figura 27C) della membrana di dialisi. Tale contaminazione è probabilmente non dovuta a *C. necator*, ma a batteri esterni, dato che un sistema di questo tipo è facilmente esposto a contaminazione durante il maneggiamento da parte dell'operatore. Nelle colture di *C. necator* non è possibile determinare al microscopio se parte dei batteri osservati siano contaminanti dato che presentano una morfologia analoga.



**Figura 27. Immagini al microscopio a contrasto di fase di *Synechocystis* sp. B12 in colture separate da *C. necator*.** Dalle immagini si vede che, nonostante la presenza della membrana di dialisi, *Synechocystis* sp. B12 (visibile nell'immagine come cellule bilobate) è esposto a facile contaminazione da parte di *C. necator* o altri batteri (visibili nell'immagine come cellule allungate e scure di minori dimensioni rispetto a *Synechocystis* sp. B12). Questo è stato osservato sia se *Synechocystis* sp. B12 è al di sotto della membrana di dialisi (A) che al di sopra (B).

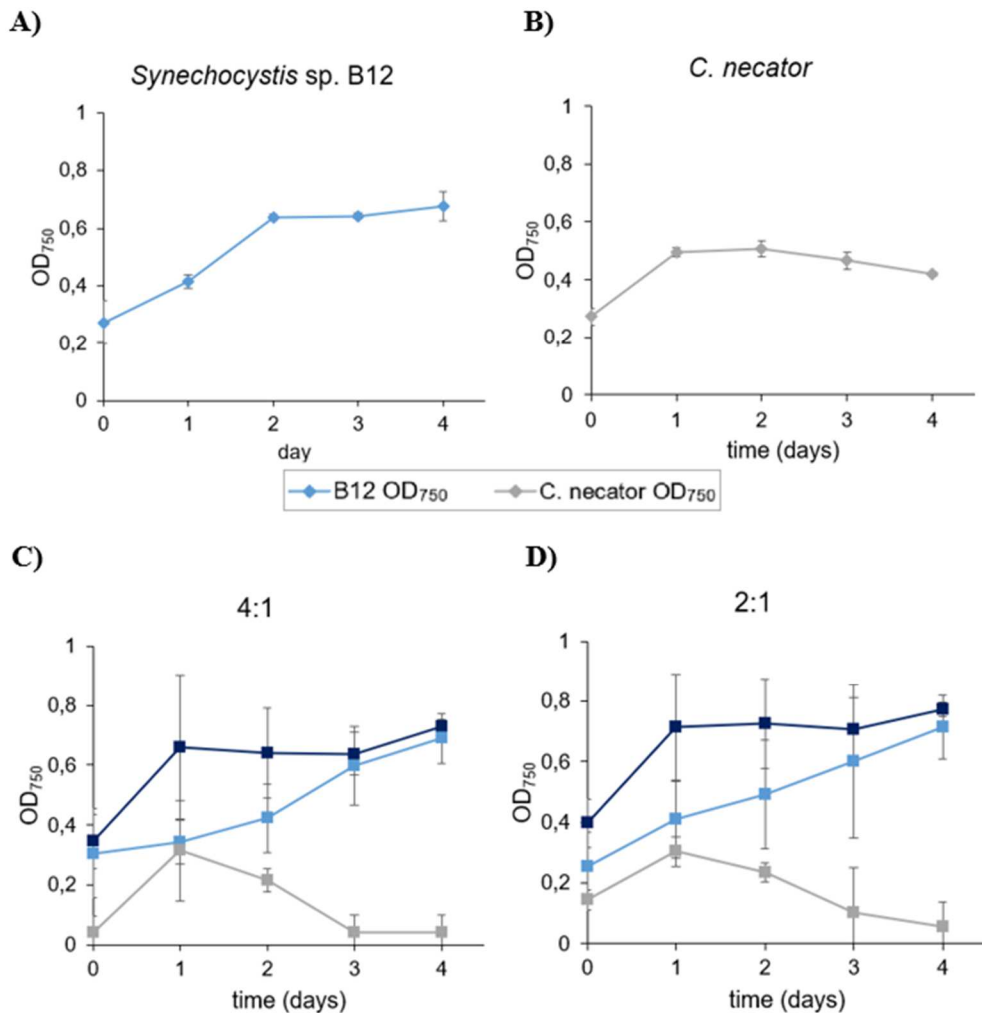
Bisogna tenere conto del fatto che questo sistema a colture separate è difficilmente sottoponibile a scale-up. Inoltre, non trovando evidenti benefici nel suo utilizzo rispetto alle colture miste, per gli esperimenti successivi si è deciso di lavorare con co-culture *Synechocystis* sp. B12: *C. necator*.

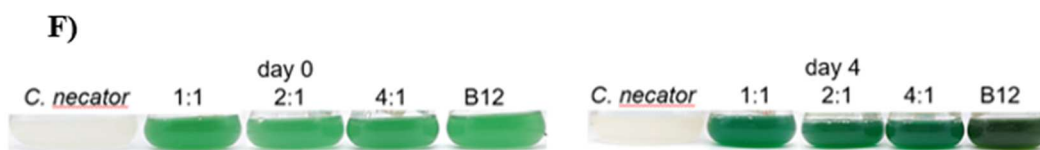
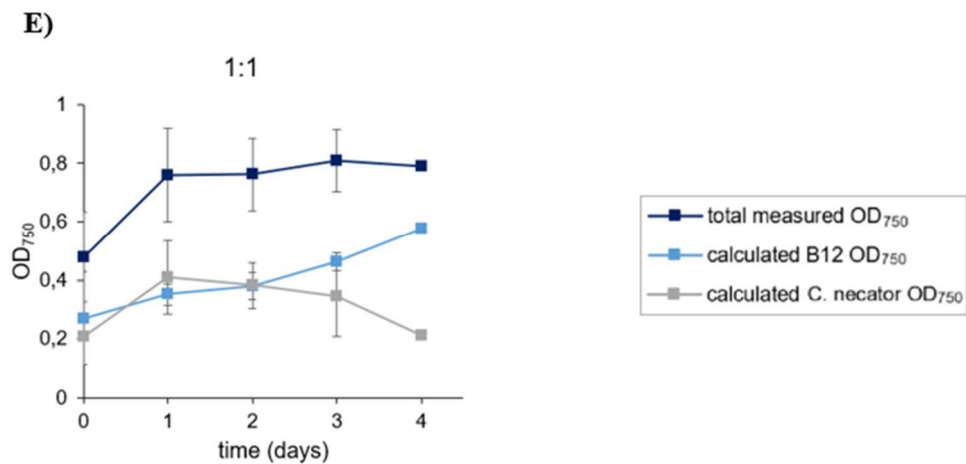
#### **4.3.4 Curve di crescita di co-culture in beuta con e senza glucosio**

Dato che lavorare in piastra presenta problemi di contaminazione, oltre che essere un sistema in scala troppo piccola, si è passato al sistema immediatamente più grande, cioè crescita in beuta. Dopo aver testato il metodo di monitoraggio delle colture, il mezzo più adatto e il sistema di coltura misto, è stata così testata la crescita di co-culture *Synechocystis* sp. B12 : *C. necator* in diversi rapporti: 1:1, 2:1

e 4:1 (con OD<sub>750</sub> di partenza 0,2 fisso per *Synechocystis* sp. B12) e la presenza o meno di glucosio nella co-cultura.

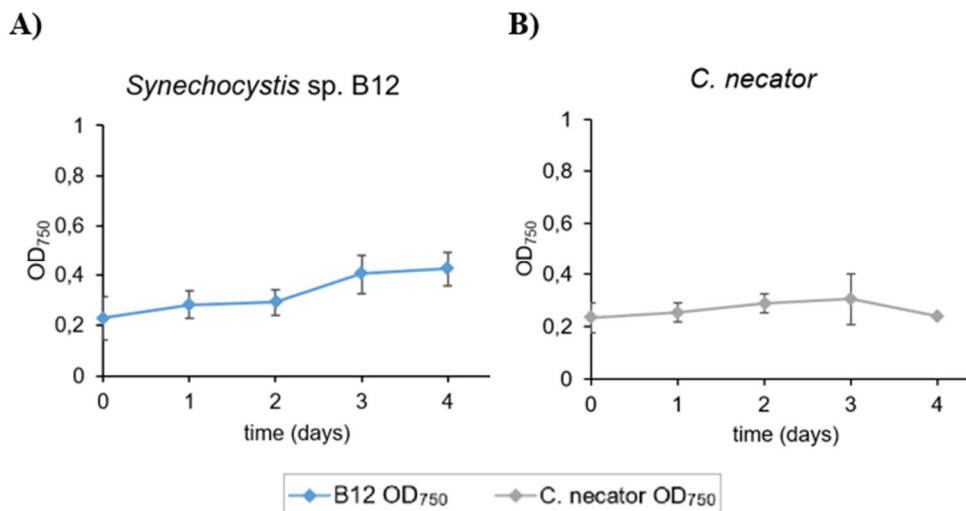
Dalle curve di crescita con glucosio si osserva che entrambi gli organismi isolati hanno un picco di crescita iniziale (Figura 28A-B), con raggiungimento del plateau dopo 2 (*Synechocystis*) o 1 giorno (*C. necator*). *C. necator* in particolare sembra consumare subito il glucosio disponibile per poi calare in concentrazione cellulare. La stessa tendenza può essere osservata nelle co-culture (Figura 28C-D-E), dove il calo di OD<sub>750</sub> calcolato di *C. necator* è apparentemente anche più evidente. Questo potrebbe essere dovuto alla competizione con *Synechocystis* o ad una leggera sovrastima dell'OD<sub>750</sub> calcolato di *Synechocystis*.

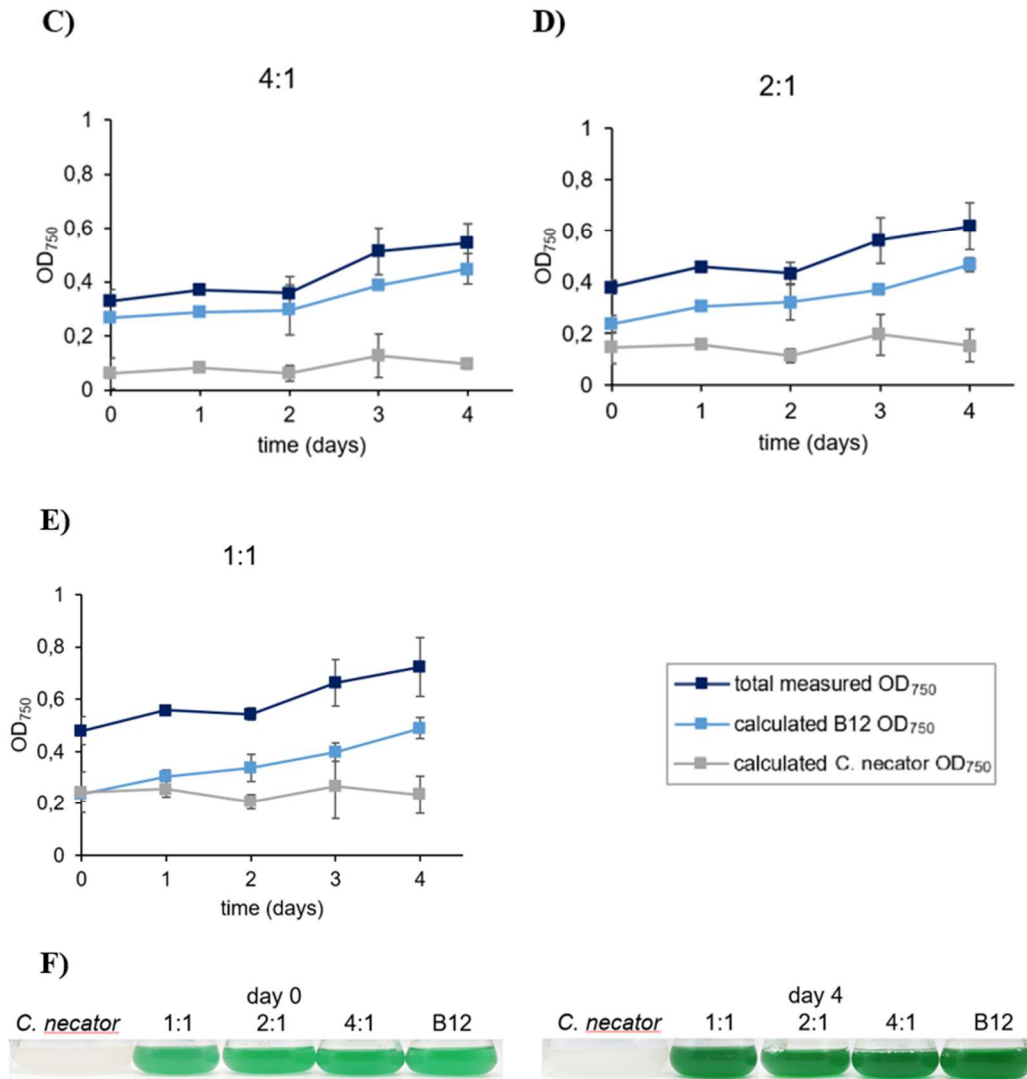




**Figura 28.** Curve di crescita in beuta con glucosio 5 mM di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* isolati e in co-culture in rapporto 4:1, 2:1 e 1:1. Come controlli sono state misurate le crescite di *Synechocystis* sp. B12 isolato (A) e *C. necator* isolato (B). Nelle curve di crescita delle co-culture in rapporto 4:1 (C), 2:1 (D) e 1:1 (E), il contributo all'OD<sub>750</sub> totale (blu scuro) di è ripartito in OD<sub>750</sub> calcolato di *Synechocystis* sp. B12 (azzurro) e OD<sub>750</sub> calcolato di *C. necator* (grigio). In figura (F) si può osservare l'aspetto delle colture al giorno 0 e al giorno 4.

Nelle curve di crescita senza glucosio, *Synechocystis* isolato presenta una crescita lenta ma costante (Figura 29A), mentre *C. necator* isolato sembra mantenere lo stesso OD<sub>750</sub> di partenza (Figura 29B). Lo stesso comportamento viene osservato nelle co-culture (Figura 29C-D-E).





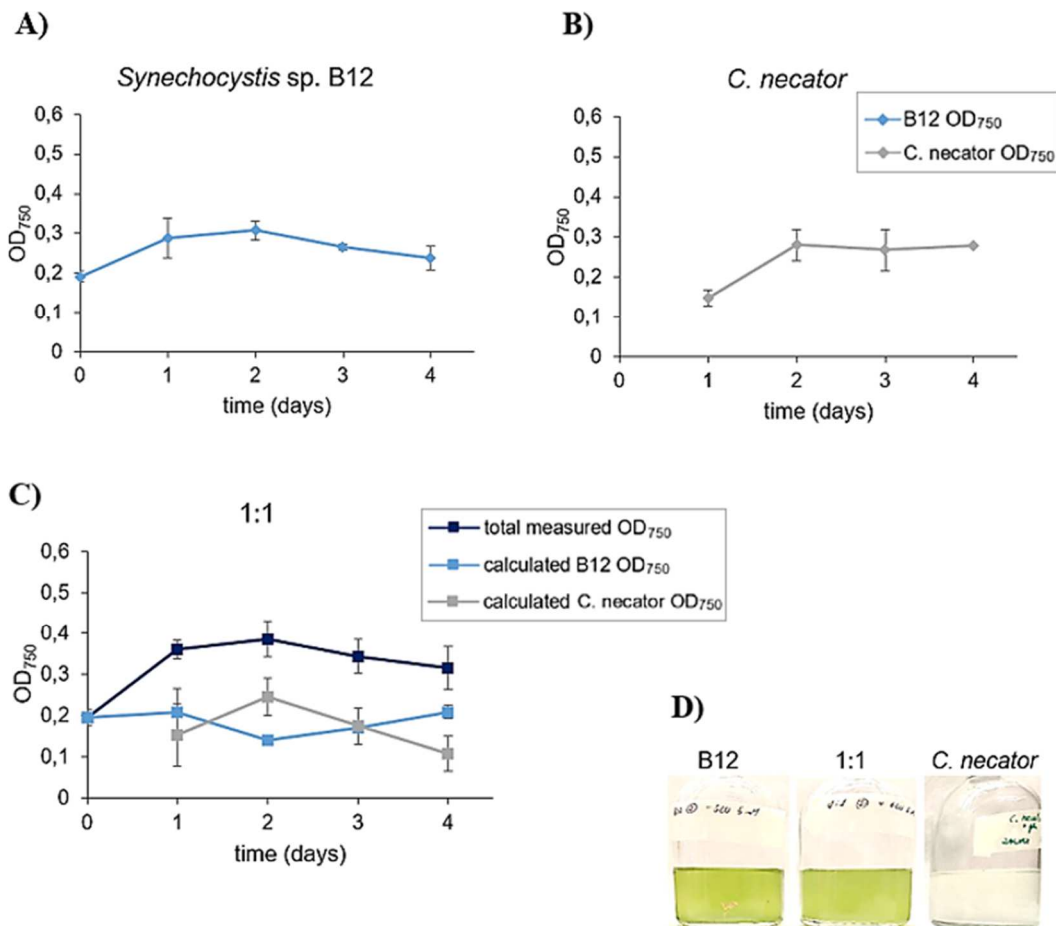
**Figura 29.** Curve di crescita in beuta senza glucosio di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* isolati e in co-culture in rapporto 1:1, 2:1 e 4:1. Come controlli sono state misurate le crescite di *Synechocystis* sp. B12 isolato (A) e *C. necator* isolato (B). Nelle curve di crescita delle co-culture in rapporto 4:1 (C), 2:1 (D) e 1:1 (E), il contributo all'OD<sub>750</sub> totale (blu scuro) di è ripartito in OD<sub>750</sub> calcolato di *Synechocystis* sp. B12 (azzurro) e OD<sub>750</sub> calcolato di *C. necator* (grigio). In figura (F) si può osservare l'aspetto delle colture al giorno 0 e al giorno 4.

#### 4.3.5 Curve di crescita di co-culture in bottiglie sigillate ad alta CO<sub>2</sub>

Dato l'obiettivo finale delle co-culture di ridurre l'O<sub>2</sub> in coltura, il sistema testato in beuta è stato riprodotto in bottiglie sigillate in modo da monitorare non solo la crescita ma anche l'andamento di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> risultante nelle diverse condizioni. Si è inizialmente testata solo la co-cultura 1:1 (con i rispettivi controlli), sia con glucosio che senza, e la crescita è stata effettuata in bottiglie con CO<sub>2</sub> iniziale 15%. Dato che

tutte le bottiglie sono state sottoposte a flushing con N<sub>2</sub> per rimuovere O<sub>2</sub> atmosferico, nelle co-culture *C. necator* è stato aggiunto al giorno 1, in modo da assicurare la presenza di O<sub>2</sub> per la sua crescita prodotto da *Synechocystis*.

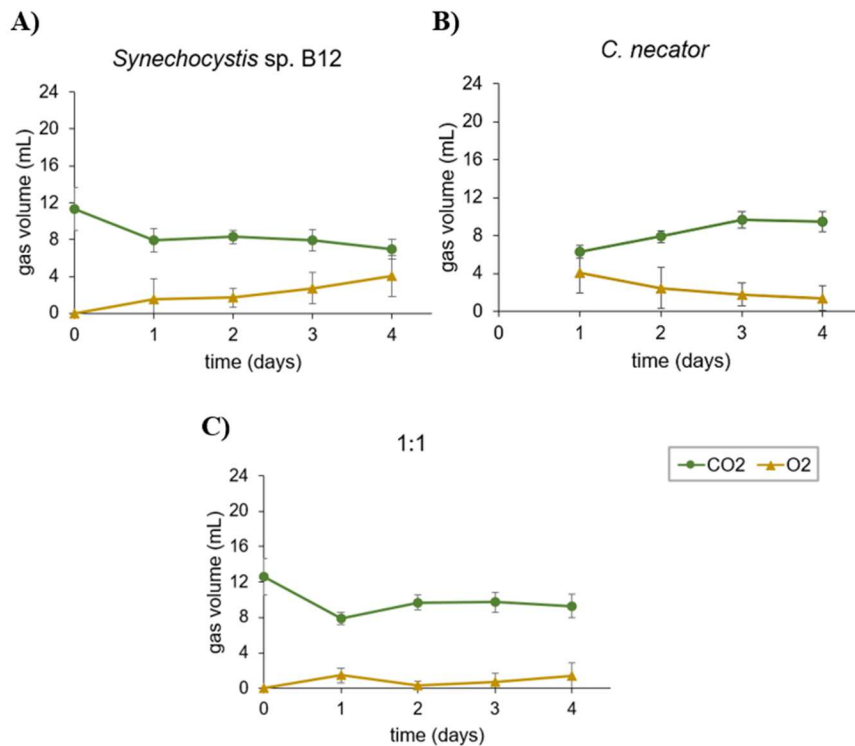
Nelle colture con glucosio, *C. necator* ha mostrato una crescita paragonabile a quella osservata in beuta (Figura 30B). Diversamente, *Synechocystis* sp. B12 non ha mostrato una buona crescita in glucosio, né come controllo isolato (Figura 30A) né in co-cultura (Figura 30C). Questo si è manifestato anche in un cambiamento fenotipico dell'organismo, che ha assunto un colore tendente al giallo dopo 1-2 giorni dall'avvio dell'esperimento (Figura 30D).



**Figura 30.** Curve di crescita di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* isolati e in co-cultura in rapporto 1:1 in bottiglie sigillate con glucosio 5 mM e 15% di CO<sub>2</sub> iniziale. Come controlli sono state misurate le crescite di *Synechocystis* sp. B12 isolato (A) e *C. necator* isolato (B). Nelle curve di crescita delle co-culture in rapporto 1:1 (C) il contributo all'OD<sub>750</sub> totale (blu scuro) di è ripartito in OD<sub>750</sub>

calcolato di *Synechocystis* sp. B12 (azzurro) e OD<sub>750</sub> calcolato di *C. necator* (grigio). In figura (D) si può osservare l'aspetto delle colture al giorno 4.

L'andamento dei gas in bottiglia conferma quanto osservato nelle curve di crescita. La percentuale di O<sub>2</sub> in *C. necator* isolato decresce in modo costante parallelamente all'aumento di CO<sub>2</sub>, dato che l'organismo è in attiva crescita eterotrofa (Figura 31B). Il controllo di *Synechocystis* invece presenta un iniziale calo di CO<sub>2</sub>, che però rimane poi relativamente costante dato che smette di crescere (Figura 31A). Nella co-coltura la tendenza è simile al controllo isolato di *Synechocystis*, ma si vede il contributo di *C. necator* in attiva crescita nei volumi finali rispettivamente poco più alti e poco più bassi di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (Figura 31C).

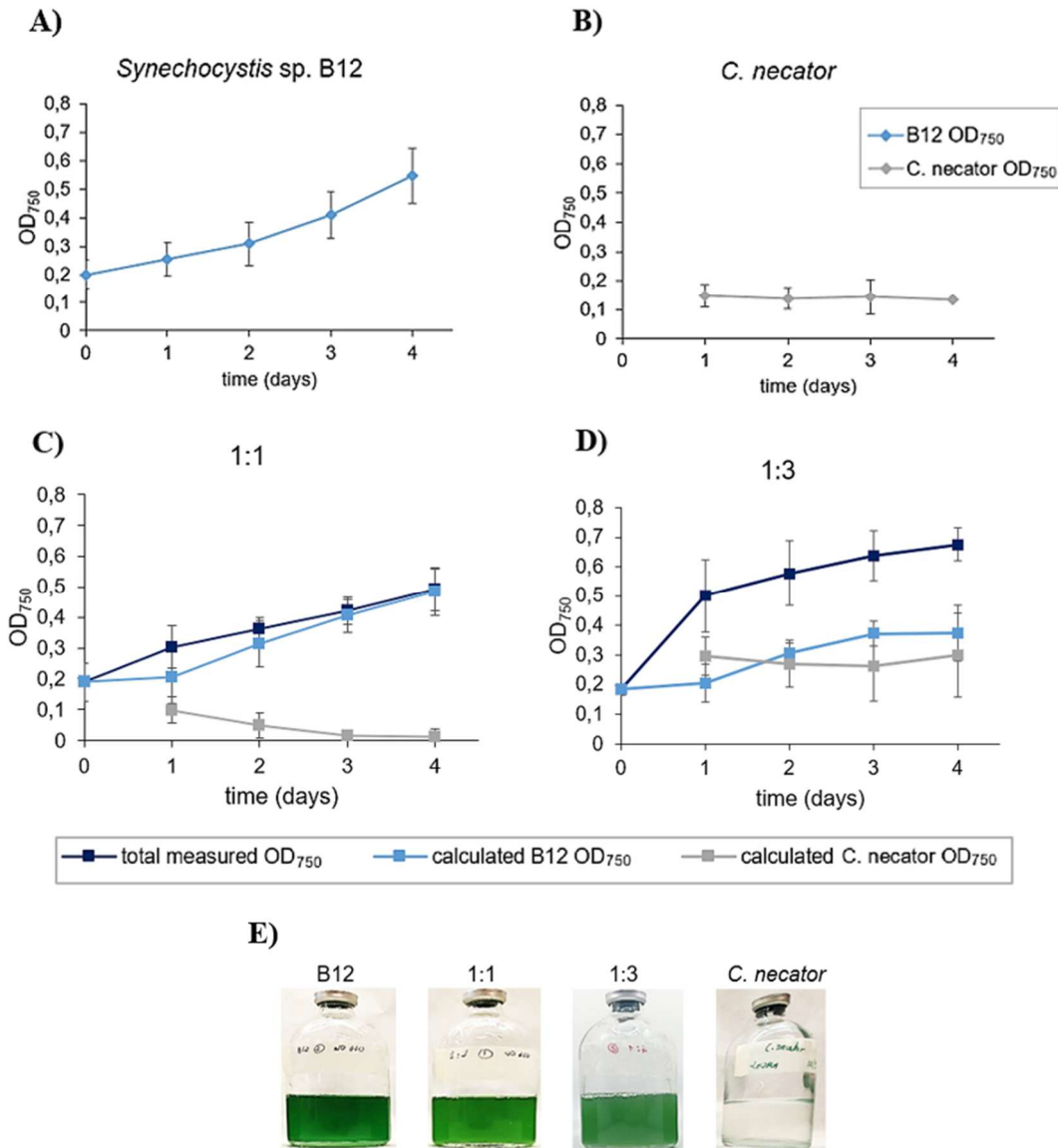


**Figura 31.** Andamento di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> in colture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* isolati e in co-coltura in rapporto 1:1 in bottiglie sigillate con glucosio 5 mM e 15% di CO<sub>2</sub> iniziale. La quantità di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> misurata giornalmente nelle bottiglie con i controlli *Synechocystis* sp. B12 isolato (A), *C. necator* isolato (B) e con le co-culture 1:1 (C) è riportata in volume (mL) di gas.

Nelle colture senza glucosio, *Synechocystis* sp. B12 non ha avuto problemi di crescita (Figura 32A) e *C. necator* si è mantenuto allo stesso OD<sub>750</sub> di partenza come osservato in beuta (Figura 32B). Dato che *C. necator* si mantiene stabile in



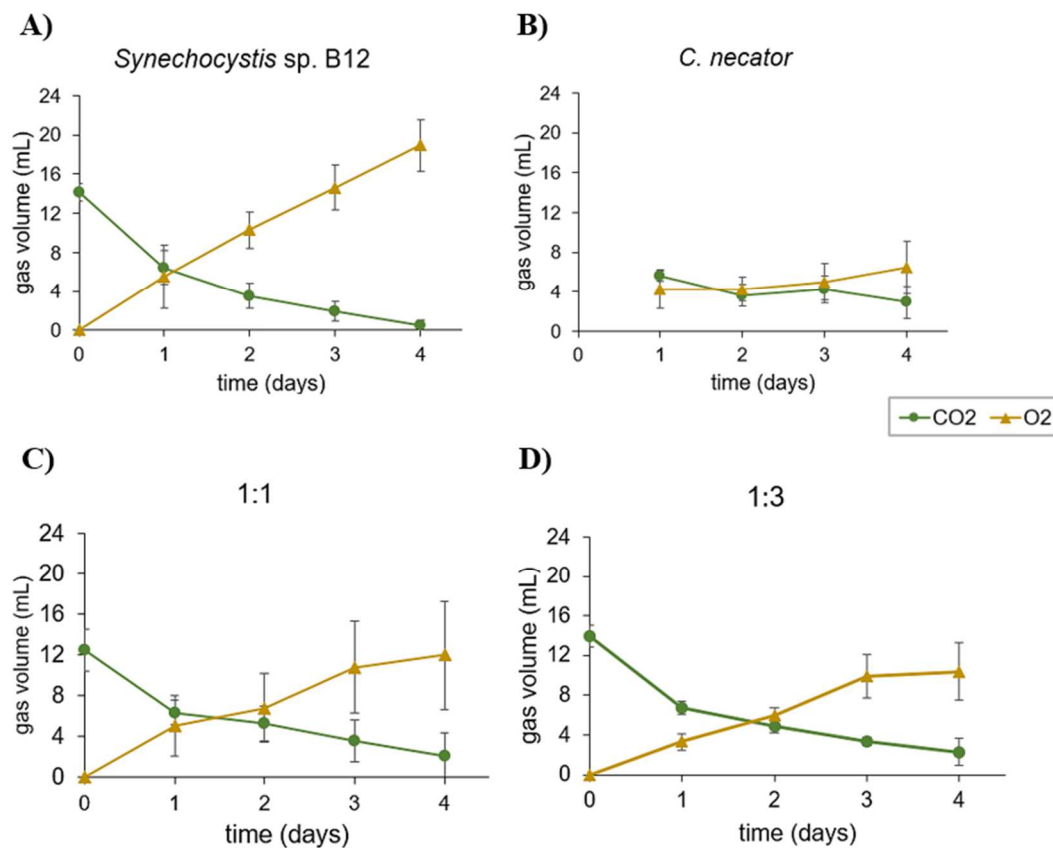
assenza di glucosio, sono state testate due co-culture *Synechocystis* sp. B12 : *C. necator* in rapporto 1:1 (Figura 32C) e 1:3 (Figura 32D), per verificare se *C. necator* possedesse un'attività metabolica residua a causa del glucosio presente nell'inoculo cresciuto per l'esperimento e che impatto questa potesse avere sull'andamento dei gas.



**Figura 32.** Curve di crescita di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* isolati e in co-cultura in rapporto 1:1 e 1:3 in bottiglie sigillate senza glucosio e con 15% di CO<sub>2</sub> iniziale. Come controlli sono state misurate le crescite di *Synechocystis* sp. B12 isolato (A) e *C. necator* isolato (B). Nelle curve di crescita delle co-culture in rapporto 1:1 (C) e 1:3 (D), il contributo all'OD<sub>750</sub> totale (blu scuro) di è ripartito in OD<sub>750</sub> calcolato di *Synechocystis* sp. B12 (azzurro) e OD<sub>750</sub> calcolato di *C. necator* (grigio). In figura (E) si può osservare l'aspetto delle colture al giorno 4.

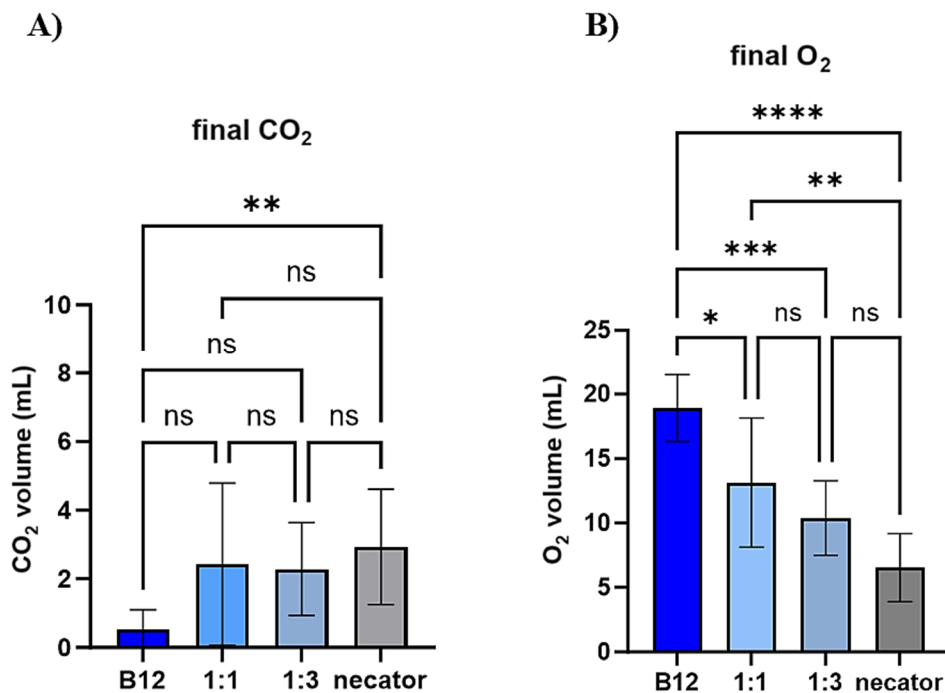


Dall'analisi dei gas si osserva che gli andamenti di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> nei controlli di *Synechocystis* sp. B12 (Figura 33A) e *C. necator* (Figura 33B) sono in accordo con quanto osservato dalle curve di crescita. L'andamento dei gas nel controllo di *Synechocystis* presenta valori confrontabili a quelli ottenuti precedentemente nelle stesse condizioni (vedi paragrafo 4.2, Figura 16C), mentre la minima variazione della composizione gasosa osservabile nel controllo di *C. necator* riflette la sua assenza di crescita attiva. In entrambe le co-culture si osserva un calo del volume di O<sub>2</sub> finale rispetto al controllo di *Synechocystis* isolato (Figura 33C-D) quindi il loro impiego risulta essere effettivamente funzionale all'abbassamento dei livelli di O<sub>2</sub> immessi nel biometano con il biogas upgrading fotosintetico.



**Figura 33.** Andamento di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> in colture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* isolati e in co-cultura in rapporto 1:1 e 1:3 in bottiglie sigillate senza glucosio e con il 15% di CO<sub>2</sub> iniziale. La quantità di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> misurata giornalmente nelle bottiglie con i controlli *Synechocystis* sp. B12 isolato (A), *C. necator* isolato (B) e con le co-culture 1:1 (C) e 1:3 (D) è riportata in volume (mL) di gas.

Per verificare quanto significativa sia la variazione di ossigeno finale ottenuta nelle co-culture senza glucosio, è stata effettuata un'analisi statistica sulle medie dei valori al giorno 4, sia per CO<sub>2</sub> (Figura 34A) che per O<sub>2</sub> (Figura 34B). Da questa è risultato che non vi è una differenza significativa nei valori finali di O<sub>2</sub> misurati nelle co-culture 1:1 e 1:3, ma vi è in entrambi i casi una riduzione rilevante rispetto ai valori finali di O<sub>2</sub> nel controllo isolato di *Synechocystis* (Figura 34A). È interessante notare che questa riduzione dei valori di O<sub>2</sub> nelle co-culture non è accompagnata da un incremento statisticamente rilevante dei valori finali di CO<sub>2</sub> (Figura 34B). Questo promette bene per l'impiego di co-culture per lo scopo prefissato, dato che è necessario che sia i valori di CO<sub>2</sub> che quelli O<sub>2</sub> siano mantenuti nei limiti accettabili alla fine del processo di upgrading.



**Figura 34. Confronto tra i valori medi di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> finali in colture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* isolati e in co-cultura in rapporto 1:1 e 1:3 in bottiglie sigillate senza glucosio e con il 15% di CO<sub>2</sub> iniziale. Sono riportate le medie dei volumi in mL di CO<sub>2</sub> (A) e O<sub>2</sub> (B) al giorno 4 dell'esperienza. La rilevanza statistica delle differenze è stata valutata mediante 1-way ANOVA utilizzando il test Tukey per il confronto, e il risultato riportato in base al p-value come non significativo (ns) dove  $p > 0.05$ , \* dove  $p \leq 0.05$ , \*\* dove  $p \leq 0.01$ , \*\*\* dove  $p \leq 0.001$  e \*\*\*\* dove  $p \leq 0.0001$ .**

## 5. Discussione

La possibilità di utilizzare microrganismi fotosintetici in processi industriali di biogas upgrading rappresenta uno degli approcci più ecologici ed economici a tale scopo, accoppiando la rimozione di alte quantità di CO<sub>2</sub> dal biogas alla possibilità di ottenere prodotti ad alto valore aggiunto. Tuttavia questo processo presenta ancora delle criticità che ne limitano l'implementazione. Tra questi uno è la possibilità di fare scale-up. Infatti, in coltivazioni di livello industriale è necessario raggiungere alte concentrazioni di biomassa, che necessitano dell'impiego di alte intensità luminose per evitare il self-shading che ne consegue, oltre che per stimolare il processo di fotosintesi. La seconda limitazione riguarda nello specifico il processo di biogas upgrading, in particolare la necessità di utilizzare organismi resistenti alle alte concentrazioni di CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> presenti nel biogas. Infine, risulta di fondamentale importanza far sì che l'O<sub>2</sub> risultante dalla fotosintesi non sia presente nel prodotto finale.

Il cianobatterio *Synechocystis* sp. B12 presenta caratteristiche peculiari che lo rendono particolarmente adatto allo scopo. La sua coltivazione in regime di semi-continuo ha mostrato che l'innalzamento dell'intensità luminosa non ha un effetto negativo sul suo tasso di crescita e la sua prestazione in un contesto di simulazione di biogas upgrading non è risultata inibita da alte concentrazioni di CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>. Inoltre, esplorando la possibilità di coltivare *Synechocystis* sp. B12 in co-coltura con *C. necator*, è stato visto che è possibile sfruttare la fluorescenza della clorofilla *a* per monitorare la crescita degli organismi e questo sistema misto ha le potenzialità per ridurre la quantità di O<sub>2</sub> immessa nel biogas.

### 5.1 La crescita in semicontinuo di *Synechocystis* sp. B12 ad alta luce mostra potenziale per lo scale-up industriale

Per la crescita in semi-continuo *Synechocystis* sp. B12 e *Synechocystis* sp. PCC 6803 sono stati mantenuti alla temperatura di crescita ottimale conosciuta per *Synechocystis* sp. PCC 6803, 30 °C (Tasaka et al., 1996), e insufflati con aria atmosferica non arricchita di CO<sub>2</sub> in modo da verificare la crescita dei due ceppi

solo in base alla variabile costituita dall'intensità luminosa. In PBR industriali la concentrazione di CO<sub>2</sub> fornita alla coltura di un organismo fotosintetico è un parametro di fondamentale importanza e questa viene insufflata nella coltura in percentuali più alte rispetto a quelle atmosferiche (fino al 5%) in modo da non risultare limitante per la crescita e raggiungere produttività più elevate (Fu et al., 2019). Nonostante ciò, i valori di produttività di biomassa rilevate nel sistema in semi-continuo sperimentato in questo progetto possono essere confrontati a quelli raggiunti in PBR di maggiori dimensioni. In un PBR da 16 L operato in semicontinuo utilizzando un ciclo luce-buio (4-961  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), è stata ottenuta una produttività di biomassa giornaliera di *Synechocystis* PCC 6803 di 0,17 g/L/day, in aria arricchita di CO<sub>2</sub> al 2,5% (Kim et al., 2010). Questa produttività è confrontabile a quelle ottenute nel sistema in semi-continuo utilizzato in laboratorio, dove la massima produttività giornaliera media di 6803 registrata è stata 0,19 g/L/day a 150  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ed è andata decrescendo con l'aumentare dell'intensità luminosa, arrivando a 0,14 g/L/day a 350  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  per poi mostrarsi fotosensibile a 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Ciò ha senso in quanto la crescita di *Synechocystis* in aria arricchita di CO<sub>2</sub> solo al 2,5% avviene comunque in condizioni limitanti di CO<sub>2</sub>, per cui i valori da noi ottenuti sono coerenti con quanto aspettato. Per contro *Synechocystis* sp. B12 ha mostrato la tendenza opposta, aumentando la sua produttività media da 0,15 g/L/day a 150  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 0,18 g/L/day 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nonostante le differenze tra questi valori di produttività non siano risultati statisticamente rilevanti nel sistema in semi-continuo preso in esame, potrebbero risulterlo riproducendo il sistema con l'utilizzo di aria arricchita di CO<sub>2</sub>, in condizioni non limitanti che favorirebbero l'accumulo di biomassa amplificando le differenze di produttività (e crescita generale) tra i due ceppi sottoposti alle diverse intensità luminose.

In un esperimento di coltivazione di *Synechocystis* PCC 6803 in PBR è stato osservato che, passando da un'intensità luminosa media di 208  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a una di 479  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la produttività di biomassa inizia a calare (Hwang & Rittmann, 2017). Questo è coerente con il calo di produttività di *Synechocystis* PCC 6803 osservato all'aumentare dell'intensità luminosa nel sistema preso in esame in questo lavoro, fino alla morte dell'organismo a 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Hwang & Rittmann (2017) hanno osservato che, dopo 18 giorni a

479  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , la coltura ha iniziato a presentare un colore giallo. Questo è stato osservato anche nel nostro sistema a 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  dopo solo pochi giorni (probabilmente a causa della maggiore intensità luminosa) già durante l'adattamento delle colture a questa intensità luminosa, e potrebbe essere spiegato da un incremento di carotenoidi coinvolti nella riduzione di specie radicaliche dannose che possono formarsi in eccesso di luce. In particolare, in letteratura risulta che mixoxantofilla,  $\beta$ -carotene e zeaxantina sono carotenoidi particolarmente up-regolati in seguito al passaggio di colture di *Synechocystis* PCC 6803 da una condizione a bassa luce a intensità luminose di 500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Steiger et al., 1999). Nonostante ciò, nel sistema preso in esame in questo lavoro, non risulta una differenza significativa tra le concentrazioni di carotenoidi in *Synechocystis* PCC 6803 e B12 a 700  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Per quanto riguarda invece la concentrazione di clorofilla, questa risulta significativamente inferiore in *Synechocystis* PCC 6803 rispetto a B12. Ciò risulta coerente con una parallela down-regolazione del fotosistema I ad alte luci, che in letteratura è stata riscontrata già a 250  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Muramatsu et al., 2009). In questa tesi è stato effettuato un confronto di clorofilla *a* e carotenoidi tra i due strain di *Synechocystis* alla stessa condizione di alta luce. Per avere un'idea migliore dell'effettivo andamento di questi pigmenti nei due organismi in risposta all'intensità luminosa potrebbe, quindi, opportuno effettuare questa analisi su entrambi i ceppi a tutte le intensità luminose sperimentate, anche parallelamente ad una replica dell'esperimento con  $\text{CO}_2$  arricchita o bicarbonato.

## **5.2 *Synechocystis* sp. B12 mostra ottima crescita ad alte concentrazioni di $\text{CO}_2$ e non risulta inibito dalle alte concentrazioni di $\text{CH}_4$ presenti nel biogas**

Nell'esplorare la possibilità dell'upgrading biologico del biogas sono state proposte ad oggi diverse specie di microrganismi fotosintetici, tra cui le microalghe *Botryococcus braunii* (Ge et al., 2011), *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella* sp. (Tang et al., 2011; Kao et al., 2012), e i cianobatteri *Synechococcus* sp. e *Arthrospira platensis* (Bose et al., 2019; Converti et al., 2009). Volendo inserire in tale contesto

quanto osservato in questa tesi, si può innanzitutto sottolineare come, crescendo *Synechocystis* sp. B12 in condizioni crescenti di CO<sub>2</sub>, è stata osservata una crescita in aumento proporzionale alle percentuali di CO<sub>2</sub> impiegate, non essendo più una condizione limitante. La maggiore percentuale di CO<sub>2</sub> testata con *Synechocystis* sp. B12 è stata del 20% (nel biogas), consumata dall'organismo nell'arco di un esperimento di 8 giorni, ottenendo una concentrazione media di biomassa finale pari a 0,56 g/L. Questo risultato può essere confrontato alle concentrazioni di biomassa raggiunte nelle stesse tempistiche e con la stessa percentuale di CO<sub>2</sub> da altri microrganismi fotosintetici proposti per processi di Carbon Capture, per verificare la competitività di *Synechocystis* sp. B12 rispetto ad essi. Tang et al., 2011 hanno riportato la crescita in beuta di *S. obliquus* e *Chlorella pyrenoidosa* una produttività di circa 1 g/L in *S. obliquus* e di circa 0,8 g/L in *C. pyrenoidosa*, mentre Ge et al., 2011 hanno ottenuto in PBR di piccole dimensioni (3 L) una concentrazione di *Botryococcus braunii* pari a circa 0,6 g/L. In tutti questi lavori descritti però la CO<sub>2</sub> è stata fornita con flusso costante alle colture con l'obiettivo principale di verificarne la crescita ad alte percentuali di CO<sub>2</sub>. In questa tesi, invece, sono state utilizzate bottiglie sigillate, dove la percentuale iniziale di CO<sub>2</sub> è stata consumata nel corso dell'esperimento, per simulare la condizione di biogas upgrading in PBR e non fornita costantemente. Ciononostante, i nostri risultati presentano delle concentrazioni confrontabili, il che mostra che *Synechocystis* sp. B12 ha ottima capacità di accumulare biomassa. Ciò può essere visto dal risultato ottenuto impiegando il 5% di CO<sub>2</sub> con refill giornaliero, che possiamo considerare come la condizione più vicina all'avere un flusso costante di CO<sub>2</sub> disponibile per la crescita: nonostante la percentuale di CO<sub>2</sub> relativamente bassa, è stata infatti raggiunta una concentrazione di biomassa pari a circa 0,8 g/L. Dato che le concentrazioni di CO<sub>2</sub> nel biogas derivante da digestione anaerobica possono arrivare fino al 50% (vedi paragrafo 1.2.1), in futuro verrà testata la crescita di *Synechocystis* sp. B12 a percentuali più alte, per confermare la sua capacità di poter svolgere upgrading del biogas in queste condizioni.

Altro punto fondamentale confermato dai nostri risultati è stata la capacità di *Synechocystis* sp. B12 di crescere in presenza di CH<sub>4</sub>. In letteratura risulta che in generale microalghe e cianobatteri abbiano alta tolleranza al CH<sub>4</sub> (Malla et al., 2023), ma che la produttività tenda a calare con l'aumento della percentuale di CH<sub>4</sub>.

Ad esempio, è stato osservato che *Chlorella* sp. cresciuta in concentrazioni crescenti di CH<sub>4</sub> dal 20% all'80%, mostra una diminuzione della crescita all'aumentare di CH<sub>4</sub> (Kao et al., 2012).

Nel sistema preso da noi in esame *Synechocystis* sp. B12 non risulta inibito da CH<sub>4</sub>, sebbene le percentuali di CH<sub>4</sub> raggiunte non siano state così elevate come quelle che ci si aspetta di raggiungere durante il processo di upgrading biologico. Questi risultati preliminari sono comunque promettenti e necessitano di conferma con esperimenti successivi a percentuali più elevate di CH<sub>4</sub>.

Un aspetto che non è stato esplorato appieno in questo lavoro è stata la resistenza di *Synechocystis* sp. B12 a composti potenzialmente inibitori presenti nel biogas, primo tra tutti H<sub>2</sub>S, che è presente in percentuali variabili in base alla fase del processo di digestione anaerobica e in base ai substrati utilizzati. In particolare, il biogas fornito per svolgere questi esperimenti presentava tracce di H<sub>2</sub>S estremamente basse, per cui non è possibile determinare con certezza se abbia un effetto negativo sulla crescita dell'organismo, che ci si aspetta essere però resistente in quanto isolato da un sito contaminato.

### **5.3 L'utilizzo di co-culture di *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* ha potenzialità per la riduzione di O<sub>2</sub> immesso nel biogas**

Dalla crescita di *Synechocystis* sp. B12 in condizioni simulanti biogas upgrading, è risultata una percentuale finale di O<sub>2</sub> pari a circa il 27% del volume gassoso totale in bottiglia. Questo risultato è coerente con quanto osservato in processi di upgrading del biogas con organismi fotosintetici, in cui la percentuale di O<sub>2</sub> arriva a valori del 10-24% (Meier et al., 2015; Converti et al., 2009).

La strategia di rimozione di questo O<sub>2</sub> immesso nel sistema mediante co-culture è un approccio ancora poco sviluppato, ma che ha già visto alcuni tentativi di applicazione. Attualmente questo tipo di strategia nel campo del biogas upgrading è principalmente focalizzato sull'impiego di microalghe in associazione a consorzi batterici in grado di ossidare H<sub>2</sub>S a solfuro usando l'O<sub>2</sub> prodotto durante la fotosintesi, al fine di promuovere una rimozione parallela di CO<sub>2</sub> ed H<sub>2</sub>S. Questo approccio è stato testato in PBR sfruttando il digestato residuo del processo di produzione del biogas come additivo al medium di coltura, in modo da associare il

processo di biogas upgrading all'impoverimento nutritivo del digestato, che può portare a eutrofizzazione delle acque reflue (Sun et al., 2016). Inoltre, questo tipo di co-culture è stato impiegato in sistemi HRAP (vasche) collegati a colonne esterne di assorbimento di CO<sub>2</sub> ed H<sub>2</sub>S, associando il processo di upgrading del biogas a processi di trattamento di acque reflue per aumentarne la competitività (Posadas et al., 2015; Toledo-Cervantes et al., 2016). Sebbene questi sistemi presentino un approccio interessante, rimane il problema della competitività economica del processo: ottenere un prodotto ad alto valore aggiunto come PHB presenta infatti un grosso vantaggio rispetto al trattamento di acque reflue se si vogliono aumentare la produttività e la sostenibilità del processo a livello industriale. Ad oggi sono state sviluppate co-culture tra organismi produttori di PHB al fine di massimizzare la produzione di questo biopolimero (Smith et al., 2016; Kratzl et al., 2023), ma nessuna di queste è stata applicata in un contesto di upgrading del biogas ottimizzato come visto in questa tesi. Sono stati testati diversi metodi per la distinzione e la misura della crescita dei due organismi in co-cultura, ed è emerso che la correlazione tra fluorescenza della clorofilla *a* e densità ottica può servire allo scopo. Osservando i rapporti di OD<sub>750</sub> dei due organismi al giorno 0, si è infatti osservato che *C. necator* tende a essere in alcuni casi sottostimato, ma la tendenza generale di crescita dei due organismi nelle co-culture viene mostrata adeguatamente. Soprattutto se ulteriormente ottimizzato, questo metodo può continuare essere sfruttato in esperimenti successivi e anche in co-culture con organismi diversi. Dai risultati ottenuti in questi esperimenti, è risultata una diminuzione significativa di O<sub>2</sub> attraverso l'utilizzo di co-culture senza glucosio tra *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator*, cosa che dovrebbe risultare ancora più evidente coltivando il sistema in tempi più lunghi. Il tentativo di sfruttare la crescita mixotrofica in glucosio di *Synechocystis* sp. B12 non ha ottenuto buoni risultati a concentrazioni di CO<sub>2</sub> del 15%. Questo è probabilmente dovuto al fatto che la crescita in CO<sub>2</sub> arricchita può interferire con la crescita mixotrofica dell'organismo (Trentin et al., 2019). Ciononostante, potrebbe essere valido effettuare un'ulteriore prova di crescita mixotrofica utilizzando acetato, per verificare se questo stesso comportamento si verifica con una fonte di carbonio organico differente, e anche perché *Synechocystis* B12 presenta un accumulo di PHB superiore se cresciuto in BG-11 supplementato con lo 0,4% di acetato e in carenza di azoto (Gracioso et al.,



2021). Il principio alla base dell'impiego di queste co-culture è l'idea che, parallelamente alla rimozione di  $O_2$ , la  $CO_2$  catturata nel processo di biogas upgrading sia convertita in PHB. Sarebbe quindi interessante in futuro ripetere gli esperimenti qui effettuati in carenza di azoto, per verificare questo accumulo.

## 6. Conclusioni

*Synechocystis* sp. B12 è stato presentato come un potenziale candidato allo sviluppo di un sistema di upgrading del biogas accompagnato alla produzione di PHB, permettendo la sostenibilità del processo in un contesto di economia circolare. In questa tesi l'attenzione è stata focalizzata innanzitutto sull'ottimizzazione delle condizioni di crescita di *Synechocystis* sp. B12, confermando che presenta una maggiore resistenza ad alta luce rispetto a *Synechocystis* PCC 6803, mostrando un andamento stabile di crescita fino a intensità luminose di  $700 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Questo dimostra che è particolarmente adatto ad essere impiegato in processi di coltivazione a livello industriale, dove possono essere raggiunte intensità luminose elevate. Per valutare la sua capacità di svolgere il processo di upgrading del biogas è stata poi testata con successo la sua capacità di crescere ad alte concentrazioni di  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ , almeno fino a percentuali rispettivamente del 20% e 22%. Infine, sono stati effettuati con successo test preliminari per lo sviluppo un sistema co-culturale tra *Synechocystis* sp. B12 e *C. necator* al fine di minimizzare la quantità di  $\text{O}_2$  nel biogas risultante e potenzialmente aumentare la produzione dei PHB che rendono il processo economicamente sostenibile.

I risultati presi in esame in questa tesi dimostrano quindi le grandi potenzialità dell'utilizzo di *Synechocystis* sp. B12 in processi di biogas upgrading, il cui sviluppo è necessario per abbattere le difficoltà nell'impiego di biometano ottenuto in modo economicamente e ambientalmente sostenibile.

## 7. Bibliografia

- Abu-Ghosh, S.; Fixler, D.; Dubinsky, Z.; Iluz, D. Flashing Light in Microalgae Biotechnology. *Bioresource Technology* **2016**, *203*, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.057>.
- Ahmed, S. F.; Mofijur, M.; Tarannum, K.; Chowdhury, A. T.; Raza, N.; Nuzhat, S.; Kumar, P. S.; Vo, D.-V. N.; Lichtfouse, E.; Mahlia, T. M. I. Biogas Upgrading, Economy and Utilization: A Review. *Environ Chem Lett* **2021**, *19* (6), 4137–4164. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01292-x>.
- Alakurtti, S.; Arasto, A.; Hannula, I.; Harlin, A.; Koljonen, T.; Lantto, R.; Lienemann, M.; Onarheim, K.; Pitkänen, J.-P.; Tähtinen, M. *The Carbon Reuse Economy: Transforming CO2 from a Pollutant into a Resource*; Lehtonen, J., Järnefelt, V., Series Eds.; VTT Technical Research Centre of Finland, **2019**. <https://doi.org/10.32040/2019.978-951-38-8709-4>.
- Al-Mamoori, A., Krishnamurthy, A., Rownaghi, A. A., & Rezaei, F. (2017). Carbon capture and utilization update. *Energy Technology*, *5*(6), 834-849.
- Alves, M. M.; Pereira, M. A.; Sousa, D. Z.; Cavaleiro, A. J.; Picavet, M.; Smidt, H.; Stams, A. J. M. Waste Lipids to Energy: How to Optimize Methane Production from Long-Chain Fatty Acids (LCFA). *Microbial Biotechnology* **2009**, *2* (5), 538–550. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00100.x>.
- Bajpai, P. Basics of Anaerobic Digestion Process. In *Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry*; Bajpai, P., Ed.; SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology; Springer: Singapore, **2017**; pp 7–12. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4130-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4130-3_2).
- Bhattacharya, M.; Goswami, S. Microalgae – A Green Multi-Product Biorefinery for Future Industrial Prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2020**, *25*, 101580. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101580>.
- Bose, A.; Lin, R.; Rajendran, K.; O’Shea, R.; Xia, A.; Murphy, J. D. How to Optimise Photosynthetic Biogas Upgrading: A Perspective on System Design and Microalgae Selection. *Biotechnology Advances* **2019**, *37* (8), 107444. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107444>.
- Brojanigo, S.; Gronchi, N.; Cazzorla, T.; Wong, T. S.; Basaglia, M.; Favaro, L.; Casella, S. Engineering *Cupriavidus Necator* DSM 545 for the One-Step Conversion of Starchy Waste into Polyhydroxyalkanoates. *Bioresource Technology* **2022**, *347*, 126383. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126383>.
- Callas, C.; Saltzer, S. D.; Steve Davis, J.; Hashemi, S. S.; Kovscek, A. R.; Okoroafor, E. R.; Wen, G.; Zoback, M. D.; Benson, S. M. Criteria and Workflow for Selecting Depleted Hydrocarbon Reservoirs for Carbon Storage. *Applied Energy* **2022**, *324*, 119668. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2022.119668>.
- Carvalho, A. P.; Silva, S. O.; Baptista, J. M.; Malcata, F. X. Light Requirements in Microalgal Photobioreactors: An Overview of Biophotonic Aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* **2011**, *89* (5), 1275–1288. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8>.
- Cherepovitsyn, A.; Chvileva, T.; Fedoseev, S. Popularization of Carbon Capture and Storage Technology in Society: Principles and Methods. *Int J Environ Res Public Health* **2020**, *17* (22), 8368. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228368>.
- Cherubini, F.; Jungmeier, G.; Wellisch, M.; Willke, T.; Skiadas, I.; Van Ree, R.; de Jong, E. Toward a Common Classification Approach for Biorefinery

- Systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **2009**, 3 (5), 534–546. <https://doi.org/10.1002/bbb.172>.
- Chisti, Y.; Moo-Young, M. Bioreactors. In *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)*; Meyers, R. A., Ed.; Academic Press: New York, 2003; pp 247–271. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00067-3>.
  - Chuka-ogwude, D.; Ogbonna, J. C.; Moheimani, N. R. Depth Optimization of Inclined Thin Layer Photobioreactor for Efficient Microalgae Cultivation in High Turbidity Digestate. *Algal Research* **2021**, 60, 102509. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102509>.
  - Comesaña-Gándara B.; García-Depraect O.; Santos-Beneit F.; Bordel S.; Lebrero R.; Muñoz R. Recent Trends and Advances in Biogas Upgrading and Methanotrophs-Based Valorization. *Chemical Engineering Journal Advances* **2022**, 11, 100325. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2022.100325>.
  - Converti, A.; Oliveira, R. P. S.; Torres, B. R.; Lodi, A.; Zilli, M. Biogas Production and Valorization by Means of a Two-Step Biological Process. *Bioresource Technology* **2009**, 100 (23), 5771–5776. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.072>.
  - Cramm, R. Genomic View of Energy Metabolism in *Ralstonia Eutropha* H16. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **2009**, 16 (1–2). <https://doi.org/10.1159/000142893>.
  - Dagnaisser, L. S.; dos Santos, M. G. B.; Rita, A. V. S.; Chaves Cardoso, J.; de Carvalho, D. F.; de Mendonça, H. V. Microalgae as Bio-Fertilizer: A New Strategy for Advancing Modern Agriculture, Wastewater Bioremediation, and Atmospheric Carbon Mitigation. *Water Air Soil Pollut* **2022**, 233 (11), 477. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05917-x>.
  - Daneshvar, E.; Wicker, R. J.; Show, P.-L.; Bhatnagar, A. Biologically-Mediated Carbon Capture and Utilization by Microalgae towards Sustainable CO<sub>2</sub> Biofixation and Biomass Valorization – A Review. *Chemical Engineering Journal* **2022**, 427, 130884. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130884>.
  - Dann, M.; Ortiz, E. M.; Thomas, M.; Guljamow, A.; Lehmann, M.; Schaefer, H.; Leister, D. Enhancing Photosynthesis at High Light Levels by Adaptive Laboratory Evolution. *Nat. Plants* **2021**, 7 (5), 681–695. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00904-2>.
  - de Chazal, N. M.; Smaglinski, S.; Smith, G. D. Methods Involving Light Variation for Isolation of Cyanobacteria: Characterization of Isolates from Central Australia. *Appl Environ Microbiol* **1992**, 58 (11), 3561–3566. <https://doi.org/10.1128/aem.58.11.3561-3566.1992>.
  - Dziejarski, B.; Krzyżyńska, R.; Andersson, K. Current Status of Carbon Capture, Utilization, and Storage Technologies in the Global Economy: A Survey of Technical Assessment. *Fuel* **2023**, 342, 127776. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.127776>.
  - Finkler, L., Ginoris, Y.P., Luna, C.L. *et al.* Morphological characterization of *Cupriavidus necator* DSM 545 flocs through image analysis. *World J Microbiol Biotechnol* **2007**, 23, 801–808. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9300-8>
  - Fu, J.; Huang, Y.; Liao, Q.; Xia, A.; Fu, Q.; Zhu, X. Photo-Bioreactor Design for Microalgae: A Review from the Aspect of CO<sub>2</sub> Transfer and Conversion.

*Bioresource Technology* **2019**, 292, 121947.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121947>.

- Garlapati, D.; Chandrasekaran, M.; Devanesan, A.; Mathimani, T.; Pugazhendhi, A. Role of Cyanobacteria in Agricultural and Industrial Sectors: An Outlook on Economically Important Byproducts. *Appl Microbiol Biotechnol* **2019**, 103 (12), 4709–4721. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09811-1>.
- Garlapati, V. K.; Sharma, S.; Sevda, S. Chapter 14 - Photosynthetic Biogas Upgrading: An Attractive Biological Technology for Biogas Upgrading. In *Emerging Technologies and Biological Systems for Biogas Upgrading*; Aryal, N., Mørck Ottosen, L. D., Wegener Kofoed, M. V., Pant, D., Eds.; Academic Press, 2021; pp 383–409. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822808-1.00014-3>.
- Ge, Y.; Liu, J.; Tian, G. Growth Characteristics of *Botryococcus Braunii* 765 under High CO<sub>2</sub> Concentration in Photobioreactor. *Bioresour Technol* **2011**, 102 (1), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.051>.
- González-Camejo, J.; Viruela, A.; Ruano, M. V.; Barat, R.; Seco, A.; Ferrer, J. Effect of Light Intensity, Light Duration and Photoperiods in the Performance of an Outdoor Photobioreactor for Urban Wastewater Treatment. *Algal Research* **2019**, 40, 101511. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101511>.
- Goswami, R.; Chattopadhyay, P.; Shome, A.; Banerjee, S. N.; Chakraborty, A. K.; Mathew, A. K.; Chaudhury, S. An Overview of Physico-Chemical Mechanisms of Biogas Production by Microbial Communities: A Step towards Sustainable Waste Management. *3 Biotech* **2016**, 6 (1), 72. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0395-9>.
- Gracioso, L. H.; Bellan, A.; Karolski, B.; Cardoso, L. O. B.; Perpetuo, E. A.; Nascimento, C. A. O. do; Giudici, R.; Pizzocchero, V.; Basaglia, M.; Morosinotto, T. Light Excess Stimulates Poly-Beta-Hydroxybutyrate Yield in a Mangrove-Isolated Strain of *Synechocystis* Sp. *Bioresource Technology* **2021**, 320, 124379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124379>.
- Hausfather, Z.; Friedlingstein, P. Analysis: Global CO<sub>2</sub> Emissions from Fossil Fuels Hit Record High in 2022. *World Economic Forum* **2022**. <https://www.weforum.org/agenda/2022/11/global-co2-emissions-fossil-fuels-hit-record-2022>.
- Hoffman, T. L. Chapter 3 - Counting Cells. In *Cell Biology (Third Edition)*; Celis, J. E., Ed.; Academic Press: Burlington, **2006**; pp 21–24. <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50004-6>.
- Hoorweg, Daniel; Bhada-Tata, Perinaz. **2012**. What a Waste : A Global Review of Solid Waste Management. Urban development series;knowledge papers no. 15. © World Bank, Washington, DC. <http://hdl.handle.net/10986/17388> License: CC BY 3.0 IGO.
- Hou, Z.; Luo, J.; Xie, Y.; Wu, L.; Huang, L.; Xiong, Y. Carbon Circular Utilization and Partially Geological Sequestration: Potentialities, Challenges, and Trends. *Energies* **2023**, 16 (1), 324. <https://doi.org/10.3390/en16010324>.
- Hwang, J.-H.; Rittmann, B. E. Effect of Permeate Recycling and Light Intensity on Growth Kinetics of *Synechocystis* Sp. PCC 6803. *Algal Research* **2017**, 27, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.008>.
- Iyer, S. S.; Bajaj, I.; Balasubramanian, P.; Hasan, M. M. F. Integrated Carbon Capture and Conversion To Produce Syngas: Novel Process Design,

- Intensification, and Optimization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, *56* (30), 8622–8648. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b01688>.
- Ji, X.; Verspagen, J. M. H.; Stomp, M.; Huisman, J. Competition between Cyanobacteria and Green Algae at Low versus Elevated CO<sub>2</sub>: Who Will Win, and Why? *J Exp Bot* **2017**, *68* (14), 3815–3828. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx027>.
  - Johnson, M. P. Photosynthesis. *Essays In Biochemistry* **2016**, *60*, 255–273. <https://doi.org/10.1042/EBC20160016>.
  - Kao, C.-Y.; Chiu, S.-Y.; Huang, T.-T.; Dai, L.; Hsu, L.-K.; Lin, C.-S. Ability of a Mutant Strain of the Microalga *Chlorella* Sp. to Capture Carbon Dioxide for Biogas Upgrading. *Applied Energy* **2012**, *93*, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.12.082>.
  - Kaza, Silpa; Shrikanth, Siddarth; Chaudhary, Sarur. **2021**. More Growth, Less Garbage. Urban Development Series. © World Bank, Washington, DC. <http://hdl.handle.net/10986/35998> License: CC BY 3.0 IGO.
  - Kaza, Silpa; Yao, Lisa C.; Bhada-Tata, Perinaz; Van Woerden, Frank. **2018**. What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. Urban Development; © Washington, DC: World Bank. <http://hdl.handle.net/10986/30317> License: CC BY 3.0 IGO.
  - Khalid, A.; Arshad, M.; Anjum, M.; Mahmood, T.; Dawson, L. The Anaerobic Digestion of Solid Organic Waste. *Waste Management* **2011**, *31* (8), 1737–1744. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.021>.
  - Khavari, F.; Saidijam, M.; Taheri, M.; Nouri, F. Microalgae: Therapeutic Potentials and Applications. *Mol Biol Rep* **2021**, *48* (5), 4757–4765. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06422-w>.
  - Kim, H. W.; Vannela, R.; Zhou, C.; Harto, C.; Rittmann, B. E. Photoautotrophic Nutrient Utilization and Limitation during Semi-Continuous Growth of *Synechocystis* Sp. PCC6803. *Biotechnol Bioeng* **2010**, *106* (4), 553–563. <https://doi.org/10.1002/bit.22724>.
  - Kłodawska, K.; Kovács, L.; Várkonyi, Z.; Kis, M.; Sozer, Ö.; Laczko-Dobos, H.; Kóbori, O.; Domonkos, I.; Strzałka, K.; Gombos, Z.; Malec, P. Elevated Growth Temperature Can Enhance Photosystem I Trimer Formation and Affects Xanthophyll Biosynthesis in *Cyanobacterium Synechocystis* Sp. PCC6803 Cells. *Plant and Cell Physiology* **2015**, *56* (3), 558–571. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu199>.
    - Koch, M.; Bruckmoser, J.; Scholl, J.; Hauf, W.; Rieger, B.; Forchhammer, K. Maximizing PHB Content in *Synechocystis* Sp. PCC 6803: A New Metabolic Engineering Strategy Based on the Regulator PirC. *Microbial Cell Factories* **2020**, *19* (1), 231. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01491-1>.
  - Koch, M.; Forchhammer, K. Polyhydroxybutyrate: A Useful Product of Chlorotic Cyanobacteria. *Microb Physiol* **2021**, *31* (2), 67–77. <https://doi.org/10.1159/000515617>.
  - Kratzl, F.; Kremling, A.; Pflüger-Grau, K. Streamlining of a Synthetic Co-Culture towards an Individually Controllable One-Pot Process for Polyhydroxyalkanoate Production from Light and CO<sub>2</sub>. *Eng Life Sci* **2023**, *23* (1), e2100156. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100156>.



- Kumar, K.; Sirasale, A.; Das, D. Use of Image Analysis Tool for the Development of Light Distribution Pattern inside the Photobioreactor for the Algal Cultivation. *Bioresource Technology* **2013**, *143*, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.117>.
- Lal, M. Photosynthesis. In *Plant Physiology, Development and Metabolism*; Bhatla, S. C., A. Lal, M., Eds.; Springer: Singapore, **2018**; pp 159–226. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_5).
- Lam, M. K.; Lee, K. T.; Mohamed, A. R. Current Status and Challenges on Microalgae-Based Carbon Capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control* **2012**, *10*, 456–469. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2012.07.010>.
- Lamb, J. J.; Røkke, G.; Hohmann-Marriott, M. F. Chlorophyll Fluorescence Emission Spectroscopy of Oxygenic Organisms at 77 K. *Photosynthetica* **2018**, *56* (1), 105–124. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0791-y>.
- Laude, T.; Kobayashi, T.; Sato, Y. Electrolysis of LiOH for Hydrogen Supply. *International Journal of Hydrogen Energy* **2010**, *35* (2), 585–588. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.028>.
- Levasseur, W.; Perré, P.; Pozzobon, V. A Review of High Value-Added Molecules Production by Microalgae in Light of the Classification. *Biotechnology Advances* **2020**, *41*, 107545. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>.
- Lisbona, P.; Bailera, M.; Peña, B.; Romeo, L. M. Chapter 22 - Integration of CO<sub>2</sub> Capture and Conversion. In *Advances in Carbon Capture*; Rahimpour, M. R., Farsi, M., Makarem, M. A., Eds.; Woodhead Publishing, **2020**; pp 503–522. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819657-1.00022-0>.
- Lopo, M.; Montagud, A.; Navarro, E.; Cunha, I.; Zille, A.; de Córdoba, P. F.; Moradas-Ferreira, P.; Tamagnini, P.; Urchueguía, J. F. Experimental and Modeling Analysis of *Synechocystis* Sp. PCC 6803 Growth. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2012**, *22* (2), 71–82. <https://doi.org/10.1159/000336850>.
- Malla, F. A.; Sofi, N. A.; Gupta, N.; Bandh, S. A. Chapter 14 - Valorization of Microalgae for Biogas Methane Enhancement. In *Valorization of Microalgal Biomass and Wastewater Treatment*; Bandh, S. A., Malla, F. A., Eds.; Elsevier, **2023**; pp 317–332. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91869-5.00015-6>.
- Masojídek, J.; Torzillo, G.; Koblížek, M. Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture*; John Wiley & Sons, Ltd, **2013**; pp 21–36. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>.
- McAdam, B.; Brennan Fournet, M.; McDonald, P.; Mojicevic, M. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers (Basel)* **2020**, *12* (12), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>.
- Meier, L.; Pérez, R.; Azócar, L.; Rivas, M.; Jeison, D. Photosynthetic CO<sub>2</sub> Uptake by Microalgae: An Attractive Tool for Biogas Upgrading. *Biomass and Bioenergy* **2015**, *73*, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.10.032>.
- Meier, L.; Vilchez, C.; Cuaresma, M.; Torres-Aravena, Á.; Jeison, D. Effect of pH Change on the Microalgae-Based Biogas Upgrading Process. *Applied Sciences* **2022**, *12* (23), 12194. <https://doi.org/10.3390/app122312194>.

- Meylan, F. D.; Moreau, V.; Erkman, S. CO<sub>2</sub> Utilization in the Perspective of Industrial Ecology, an Overview. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization* **2015**, *12*, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2015.05.003>.
- Muñoz, R.; Meier, L.; Diaz, I.; Jeison, D. A Review on the State-of-the-Art of Physical/Chemical and Biological Technologies for Biogas Upgrading. *Rev Environ Sci Biotechnol* **2015**, *14* (4), 727–759. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9379-1>.
- Muramatsu, M.; Sonoike, K.; Hihara, Y. Mechanism of Downregulation of Photosystem I Content under High-Light Conditions in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC 6803. *Microbiology* **2009**, *155* (3), 989–996. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024018-0>.
- Naghshbandi, M. P.; Tabatabaei, M.; Aghbashlo, M.; Aftab, M. N.; Iqbal, I. Metabolic Engineering of Microalgae for Biofuel Production. In *Biofuels from Algae: Methods and Protocols*; Spilling, K., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, **2020**; pp 153–172. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2018\\_205](https://doi.org/10.1007/7651_2018_205).
- Ortloff, F.; Graf, F.; Kolb, T. Removal of Oxygen from Biogas via Catalytic Oxidation of Methane. **3. 2014**.
- Percy, N.; Garavaglia, M.; Millat, T.; Gilbert, J. P.; Song, Y.; Hartman, H.; Woods, C.; Tomi-Andrino, C.; Bommareddy, R. R.; Cho, B.-K.; Fell, D. A.; Poolman, M.; King, J. R.; Winzer, K.; Twycross, J.; Minton, N. P. A Genome-Scale Metabolic Model of *Cupriavidus Necator* H16 Integrated with TraDIS and Transcriptomic Data Reveals Metabolic Insights for Biotechnological Applications. *PLoS Computational Biology* **2022**, *18* (5), e1010106. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010106>.
- Perin, G.; Simionato, D.; Bellan, A.; Carone, M.; Occhipinti, A.; Maffei, M. E.; Morosinotto, T. Cultivation in Industrially Relevant Conditions Has a Strong Influence on Biological Properties and Performances of *Nannochloropsis Gaditana* Genetically Modified Strains. *Algal Research* **2017**, *28*, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.013>.
- Posadas, E.; Serejo, M. L.; Blanco, S.; Pérez, R.; García-Encina, P. A.; Muñoz, R. Minimization of Biomethane Oxygen Concentration during Biogas Upgrading in Algal–Bacterial Photobioreactors. *Algal Research* **2015**, *12*, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.002>.
- Pronina, N. A.; Kupriyanova, E. V.; Igamberdiev, A. U. Photosynthetic Carbon Metabolism and CO<sub>2</sub>-Concentrating Mechanism of Cyanobacteria. In *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Metabolism, Bioenergetics, and Omics*; Hallenbeck, P. C., Ed.; Springer International Publishing: Cham, **2017**; pp 271–303. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-51365-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51365-2_8).
- Ruiz-Ruiz, P.; Estrada, A.; Morales, M. Chapter 8 - Carbon Dioxide Capture and Utilization Using Microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*; Jacob-Lopes, E., Maroneze, M. M., Queiroz, M. I., Zepka, L. Q., Eds.; Academic Press, **2020**; pp 185–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00008-7>.
- Sariatli, F. Linear Economy Versus Circular Economy: A Comparative and Analyzer Study for Optimization of Economy for Sustainability. *Visegrad Journal on Bioeconomy and Sustainable Development* **2017**, *6* (1), 31–34. <https://doi.org/10.1515/vjbsd-2017-0005>.



- Smith, M. J.; Francis, M. B. A Designed A. Vinelandii–S. Elongatus Coculture for Chemical Photoproduction from Air, Water, Phosphate, and Trace Metals. *ACS Synth. Biol.* **2016**, *5* (9), 955–961. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00107>.
- Steiger, S.; Schäfer, L.; Sandmann, G. High-Light-Dependent Upregulation of Carotenoids and Their Antioxidative Properties in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1999**, *52* (1), 14–18. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(99\)00094-9](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(99)00094-9).
- Sun, Q.; Li, H.; Yan, J.; Liu, L.; Yu, Z.; Yu, X. Selection of Appropriate Biogas Upgrading Technology—a Review of Biogas Cleaning, Upgrading and Utilisation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, *51*, 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.029>.
- Sun, S.; Ge, Z.; Zhao, Y.; Hu, C.; Zhang, H.; Ping, L. Performance of CO<sub>2</sub> Concentrations on Nutrient Removal and Biogas Upgrading by Integrating Microalgal Strains Cultivation with Activated Sludge. *Energy* **2016**, *97*, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.12.126>.
- Taifouris, M.; Martín, M. Chapter 8 - Added-Value Products. In *Sustainable Design for Renewable Processes*; Martín, M., Ed.; Elsevier, **2022**; pp 323–351. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824324-4.00006-8>.
- Tang, D.; Han, W.; Li, P.; Miao, X.; Zhong, J. CO<sub>2</sub> Biofixation and Fatty Acid Composition of *Scenedesmus Obliquus* and *Chlorella Pyrenoidosa* in Response to Different CO<sub>2</sub> Levels. *Bioresour Technol* **2011**, *102* (3), 3071–3076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.047>.
- Tasaka, Y.; Gombos, Z.; Nishiyama, Y.; Mohanty, P.; Ohba, T.; Ohki, K.; Murata, N. Targeted Mutagenesis of Acyl-Lipid Desaturases in *Synechocystis*: Evidence for the Important Roles of Polyunsaturated Membrane Lipids in Growth, Respiration and Photosynthesis. *The EMBO Journal* **1996**, *15* (23), 6416–6425. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01033.x>.
- Thonemann, N.; Zacharopoulos, L.; Fromme, F.; Nühlen, J. Environmental Impacts of Carbon Capture and Utilization by Mineral Carbonation: A Systematic Literature Review and Meta Life Cycle Assessment. *Journal of Cleaner Production* **2022**, *332*, 130067. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130067>.
- Toledo-Cervantes, A.; Estrada, J. M.; Lebrero, R.; Muñoz, R. A Comparative Analysis of Biogas Upgrading Technologies: Photosynthetic vs Physical/Chemical Processes. *Algal Research* **2017**, *25*, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.006>.
- Toledo-Cervantes, A.; Serejo, M. L.; Blanco, S.; Pérez, R.; Lebrero, R.; Muñoz, R. Photosynthetic Biogas Upgrading to Bio-Methane: Boosting Nutrient Recovery via Biomass Productivity Control. *Algal Research* **2016**, *17*, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.017>.
- Trentin, G.; Bertucco, A.; Sforza, E. Mixotrophy in *Synechocystis* Sp. for the Treatment of Wastewater with High Nutrient Content: Effect of CO<sub>2</sub> and Light. *Bioprocess Biosyst Eng* **2019**, *42* (10), 1661–1669. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02162-1>.
- Tyagi, V. K.; Fdez-Güelfo, L. A.; Zhou, Y.; Álvarez-Gallego, C. J.; Garcia, L. I. R.; Ng, W. J. Anaerobic Co-Digestion of Organic Fraction of Municipal Solid Waste (OFMSW): Progress and Challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2018**, *93*, 380–399. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.051>.

- van de Meene, A. M. L.; Hohmann-Marriott, M. F.; Vermaas, W. F. J.; Roberson, R. W. The Three-Dimensional Structure of the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC 6803. *Arch Microbiol* **2006**, *184* (5), 259–270. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0027-y>.
- Wang, P.; Wang, H.; Qiu, Y.; Ren, L.; Jiang, B. Microbial Characteristics in Anaerobic Digestion Process of Food Waste for Methane Production—A Review. *Bioresource Technology* **2018**, *248*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152>.
- Wellburn, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as Well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology* **1994**, *144* (3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
- Wiltbank, L. B.; Kehoe, D. M. Diverse Light Responses of Cyanobacteria Mediated by Phytochrome Superfamily Photoreceptors. *Nat Rev Microbiol* **2019**, *17* (1), 37–50. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0110-4>.
- Yadav, M.; Joshi, C.; Paritosh, K.; Thakur, J.; Pareek, N.; Masakapalli, S. K.; Vivekanand, V. Organic Waste Conversion through Anaerobic Digestion: A Critical Insight into the Metabolic Pathways and Microbial Interactions. *Metabolic Engineering* **2022**, *69*, 323–337. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.11.014>.
- Zhu, B.; Gikas, P.; Zhang, R.; James, L.; Jenkins, B.; Li, X. Characteristics and Biogas Production Potential of Municipal Solid Wastes Pretreated with a Rotary Drum Reactor. *Bioresource Technology* **2009**, *100* (3), 1122–1129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.024>.

## 8. Sitografia

- European Commission. (2019). Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: The European Green Deal. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52019DC0640> (Accessed on 28 July 2023).
- EUROSTAT (2023), [Statistics Explained \(europa.eu\)](#) (Accessed on 28 July October 2023).
- OECD (2023), Municipal waste (indicator). doi: 10.1787/89d5679a-en, [Waste - Municipal waste - OECD Data](#) (Accessed on 28 July 2023).