

TRATTAMENTO DI INQUINANTI EMERGENTI IN ACQUE DA DIGESTIONE ANAEROBICA DI LIQUAMI SUINICOLI MEDIANTE MICROALGHE

Alessandro Alberto Casazza*, Attilio Converti, Mauro Rovatti

Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale, Università degli Studi di Genova.

Sommario – I liquami suinicoli post digestione anaerobica, ancora ricchi in ammonio, possono causare fenomeni di eutrofizzazione delle acque. Inoltre, per l'eccessivo uso di antibiotici negli allevamenti, significative quantità non metabolizzate di questi farmaci possono essere ritrovate nei liquami e quindi nelle acque dopo trattamento anaerobico. Crescendo in modo eterotrofico, le microalghie potrebbero offrire diversi vantaggi, essendo in grado di usare il carbonio organico così come nutrienti inorganici quali azoto e fosforo presenti nelle acque di scarico. Lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare l'effetto di inquinanti emergenti aggiunti al digestato da liquami suinicoli sulla crescita della microalga *Chlorella vulgaris*. A tale scopo *C. vulgaris* è stata fatta crescere in terreno con differenti quantità di digestato al fine di ottenere concentrazioni iniziali di azoto ammoniacale pari a 60, 120 e 170 mg_N/L. A fini comparativi, colture addizionali sono state eseguite sia in acqua arricchita con ammonio puro alle stesse concentrazioni sopra riportate, sia nel terreno classico di crescita per questa microalga (Bold Basal Medium). Alla coltura con 60 mg_N/L di ammonio da liquami, dopo il raggiungimento della fase stazionaria sono stati aggiunti 14.0 mg/L di Micospectone, consistente in una miscela al 33.3 e 66.6% degli antibiotici Lincomicina e Spectinomycin. Studi preliminari hanno evidenziato che concentrazioni superiori di antibiotico (56-112 mg/L) possono portare ad un'inibizione della crescita microalgale. La concentrazione della biomassa microalgale è stata quantificata giornalmente per via spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda pari a 625 nm, mentre quelle di ammonio totale e di fosfati periodicamente. La biomassa fresca ed essiccata al termine della crescita è stata osservata mediante microscopia ottica ed elettronica a scansione. In presenza di digestato e antibiotico, *C. vulgaris* ha raggiunto concentrazioni finali di circa 1.3 g di biomassa secca per litro di terreno. L'ammonio è stato rimosso efficacemente con velocità di rimozione pari a 5.6 and 3.4 mg_N/Lgiorno partendo rispettivamente da concentrazioni iniziali di ammonio di 60 e 120 mg_N/L, mentre concentrazioni superiori di ammonio (170 mg_N/L) hanno comportato inibizione sia della crescita sia della sua propria rimozione.

Parole chiave: *Chlorella vulgaris*, Micospectone, lincomicina, spectinomycin, azoto ammoniacale.

TREATMENT BY MICROALGAE OF EMERGING POLLUTANTS IN WATER FROM ANAEROBIC DIGESTION OF PIG MANURE

* Per contatti: Via Opera Pia 15, 16145 Genova. Tel. 010.3532584; fax 010.3532586, alessandro.casazza@unige.it

Abstract – Anaerobically digested pig manure are effluents still rich in ammonium, with high chemical oxygen demand, which contribute to the phenomenon of water eutrophication. Moreover, due to excess use of antibiotics in animal husbandry, unmetabolized drugs can still be found in manure and then in anaerobic digestion effluents, thus requiring further treatment. Microalgae could potentially offer many advantages in this treatment, being able to use the organic carbon as well as inorganic nutrients such as nitrogen and phosphorus from wastewater for their heterotrophic growth. The aim of this research was to investigate the effect of emerging pollutants added to digested swine manure on the growth of the microalga *Chlorella vulgaris*. *C. vulgaris* cultures were performed with different amounts of digested pig manure to achieve ammonium concentrations of 60, 120 and 170 mg_N/L in the medium. Additional runs were performed in water enriched with pure ammonium at the same concentrations as above. These runs were compared with those carried out in classic Bold Basal Medium taken as a control. Moreover, after reaching the stationary phase of cultures with 60 mg_N/L ammonium from manure we added 14.0 mg/L of Micospectone, an antibiotic mixture containing 33.3% Lincomycin and 66.6% Spectinomycin. Preliminary studies evidenced that higher antibiotic concentrations (56-112 mg/L) in medium lead to microalga growth inhibition. Biomass concentration was daily quantified spectrophotometrically by optical density measurements at 625 nm wavelength, while total ammonium and phosphate concentrations were monitored periodically. Optical and Scansion Electronic Microscopies were used to observe fresh and dried biomass, respectively. In the presence of digested manure and the antibiotic, *C. vulgaris* biomass reached concentrations around 1.3 g_{DB}/L. Ammonium was removed efficiently, at rates of 5.6 and 3.4 mg/Ld when present in initial concentrations of 60 and 120 mg_N/L, respectively, whereas higher ammonium level (170 mg_N/L) strongly inhibited microalgal growth and almost suppressed its own removal.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, Micospectone, lincomycin, spectinomycin, ammonia nitrogen.

Ricevuto il 3-10-2016; Modifiche sostanziali richieste il 3-12-2016; Accettazione finale il 13-6-2017.

1. INTRODUZIONE

La digestione anaerobica è un processo noto e ben consolidato nel trattamento di reflui di animali da allevamento e può essere usata con il duplice scopo di diminuire l'impatto ambientale stabilizzando i reflui stessi e di ottenere bioenergia attraverso

l'impiego del biogas prodotto durante la digestione (Fredriksson et al., 2006).

In generale bisogna tenere in considerazione che le acque provenienti dalla digestione anaerobica di liquami suinicoli sono effluenti ancora ricchi in ammonio, che presentano un'elevata domanda chimica di ossigeno. Pertanto, tali reflui possono essere in parte responsabili di fenomeni di eutrofizzazione delle acque (de la Noüe e Bassères, 1989). Inoltre, negli allevamenti vengono impiegati svariati farmaci per controllare le infezioni e promuovere la crescita del bestiame, ed è quindi possibile trovare spesso alte concentrazioni di farmaci non metabolizzati nelle urine e nelle feci (Arikan et al., 2009). Winckler e Grafe (2001) riportano ad esempio che il 72 % del principio attivo di farmaci a base di tetracicline viene escreto dagli animali da allevamento tal quale. Tali molecole vengono poi ritrovate nel suolo e nelle acque creando svariati problemi ambientali. Quindi, in seguito a trattamenti con antibiotici negli allevamenti, è possibile trovare farmaci non metabolizzati non solo nei liquami ma anche nel digestato da essi proveniente (Pansieri et al., 2013). Per questi motivi, per l'alto carico di azoto e per la possibile presenza di zoonofarmaci, le acque da digestione di liquami suinicoli necessitano di opportuni trattamenti per il successivo scarico in acque superficiali (de la Noüe e Bassères, 1989).

Con la crescita mixotrofica (Wan et al., 2011), potenzialmente alcune microalghe possono offrire una soluzione al problema, essendo in grado sia di fissare l'anidride carbonica impiegando la luce come fonte energetica (Converti et al., 2009) sia di metabolizzare il carbonio organico presente nel terreno di crescita (Burrell et al., 1984).

Le microalghe e tra queste *Chlorella vulgaris* sono organismi unicellulari fotosintetici in grado di usare l'energia luminosa e l'anidride carbonica per la crescita. Rispetto alle piante superiori presentano un'elevata efficienza fotosintetica con conseguente rapida produzione di biomassa (Benemann, 1997; Miao e Wu, 2006).

C. vulgaris può essere destinata a differenti applicazioni, fra cui l'impiego in acquacoltura come fonte alimentare per la crescita di rotiferi per l'allevamento di pesci, molluschi e crostacei; la produzione di microalghe per acquacoltura ha raggiunto le 1000 tonnellate di biomassa secca per anno (Muller, 2000). *C. vulgaris* viene sempre più frequentemente utilizzata come integratore alimentare in quanto ricca in proteine e acidi grassi essenziali. Infine, tale microorganismo, ricco in li-

pidi, viene studiato da diversi anni a scopi energetici (Gouveia e Oliveira, 2009). La biomassa secca, dopo estrazione dei lipidi e di altri principi attivi, può inoltre essere utilizzata come adsorbente per la depurazione di acque inquinate (Rashid et al. 2009).

Nel presente studio, *C. vulgaris* è stata impiegata per la riduzione del contenuto di azoto ammoniacale di liquami suinicoli dopo digestione anaerobica. Inoltre è stata valutata la sua capacità di crescere in presenza di differenti concentrazioni dell'antibiotico Micospectone (miscela di Lincomicina e Spectinomina).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Microalga e reagenti

Il ceppo di *Chlorella vulgaris* CCAP 211 (Culture Collection of Algae and Protozoa, Argyll, UK) usato nel presente lavoro è stato mantenuto insufflando costantemente aria in beute da 1.5 L, impiegando come terreno di crescita Bold Basal Medium (BBM) (Bischoff and Bold, 1963) con qualche modifica, la cui composizione è riportata in Tabella 1. Il pH finale è stato aggiustato a 7.5 mediante l'aggiunta di HCl 1.0 M. Tutti i sali, il cloroformio, l'esano e gli standard (metil miristato, metil palmitato, metil stearato, metil oleato e metil linoleato) per l'analisi gas cromatografica degli esteri metilici degli acidi grassi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). I liquami suinicoli post digestione anaerobica e centrifugazione, im-

Tabella 1 – Composizione del Bold Basal Medium impiegato per la crescita di *C. vulgaris* CCAP 211

Componente	Concentrazione (mg/L)
NaNO ₃	1500
MgSO ₄ 7H ₂ O	450
NaCl	25
K ₂ HPO ₄	1050
KH ₂ PO ₄ 3H ₂ O	450
CaCl ₂ 2H ₂ O	150
Vitamina B1	3
Vitamina B8	7.5 x 10 ⁻³
Vitamina B12	7.5 x 10 ⁻³
(P-IV*)	(6 mL)

P-IV: soluzione stock di microelementi (11.42 mg H₃BO₃, 8.82 mg ZnSO₄ 7H₂O, 1.44 mg MnCl₂ 4H₂O, 0.71 mg MoO₃, 1.57 mg CuSO₄ 5H₂O, 0.49 mg Co(NO₃)₂ 6H₂O, 50 mg Na₂EDTA 2H₂O, 31 mg KOH, 4.98 mg FeSO₄ 7H₂O e 1.84 mg H₂SO₄)

Tabella 2 – Caratterizzazione chimico-fisica dei liquami suinicoli post digestione e filtrazione

Parametro (unità di misura)	Valore
COD (mg _{O2} /L)	1900
pH	8,44
Conducibilità (mS/cm)	7,14
N-NH ₄ ⁺ (mg _N /L)	1060
N-NO ₃ ⁻ (mg _N /L)	54
N-NO ₂ ⁻ (mg _N /L)	3
P-PO ₄ ³⁻ (mg _P /L)	20
Solidi sospesi (g/L)	0,42
Solidi volatili (g/L)	2,23
Solidi totali (g/L)	4,62

piegati nel presente lavoro, sono stati gentilmente forniti dal Dipartimento di Ingegneria Civile ed Ambientale (DICA) del Politecnico di Milano.

2.2. Preparazione del terreno e condizioni di crescita

I liquami suinicoli dopo digestione anaerobica sono stati conservati a 4 °C fino al momento dell'utilizzo. Parte del campione è stato filtrato mediante una membrana tubolare in ceramica a flusso tangenziale con porosità ≤ 20 µm, in modo da rimuovere la maggior parte dei residui. Successivamente, sul campione filtrato sono state eseguite le seguenti analisi: pH, solidi sospesi, solidi volatili e totali, COD, fosfati, azoto ammoniacale, nitrati, nitriti e conduttività, i cui risultati sono riportati in Tabella 2.

2.2.1. Prove preliminari di crescita microalgale in Bold's Basal Medium in presenza di Micospectone

In primo luogo, è stato eseguito uno studio preliminare sulla capacità di *C. vulgaris* di crescere in presenza di antibiotici. A tale scopo è stata impiegata un'associazione di Lincomicina (33.3%) e Spectinomicina (66.6 %) (Micospectone, FATRO s.p.a., Ozzano dell'Emilia, BO, Italia), farmaci che si possono ritrovare in considerevoli concentrazioni non metabolizzati nei liquami da allevamento. Tale antibiotico è stato saggiato a tre differenti concentrazioni (14, 56 e 112 mg/L) che, come riportato da Pansieri et al. (2013), si possono ritrovare nei liquami suinicoli di animali trattati. Per lo studio, il Micospectone è stato solubilizzato direttamente in BBM e le crescite, della durata di 10 giorni, a

concentrazione iniziale di microalga pari a 0.1 g/L, sono state confrontate con una crescita controllo eseguita nelle stesse condizioni ma senza antibiotico. Le colture sono state realizzate in Erlenmeyer (1 L) a 25 °C con cicli di luce, fornita da 2 lampade a fluorescenza da 36 W in grado di erogare una radiazione fotosinteticamente attiva di 40 µmol fotoni m⁻² s⁻¹, da 12 ore.

2.2.2. Prove preliminari di crescita microalgale in reflui da digestione anaerobica in presenza di Micospectone

Le crescite di *C. vulgaris* in reflui diluiti da digestione anaerobica di liquami suinicoli sono state eseguite in fotobioreattori cilindrici verticali da 1.5 L, con cicli di luce-buio di 12 ore. La temperatura è stata mantenuta a 25 °C mediante camera termostata. Il refluo suinicolo è stato diluito con acqua deionizzata in modo da avere una concentrazione iniziale di azoto ammoniacale pari a 60, 120 e 170 mg_N/L. Durante la crescita l'azoto ammoniacale è stato monitorato periodicamente e riportato al livello iniziale dopo il raggiungimento di 20 mg_N/L. In parallelo sono state eseguite colture addizionali alle stesse concentrazioni di azoto ammoniacale impiegando ammonio opportunamente diluito. Tutte le crescite sono state confrontate con quella di *C. vulgaris* in BBM nelle stesse condizioni di luce e temperatura sopra descritte. Inoltre, per la crescita in presenza di 60 mg_N/L di azoto ammoniacale, il farmaco (14 mg/L) è stato aggiunto dopo il raggiungimento della fase stazionaria, mantenuta per altri 5 giorni, al fine di valutare la resistenza della microalga.

2.3. Metodi analitici

2.3.1. Analisi di azoto ammoniacale, nitriti, nitrati, fosfati e COD

L'azoto ammoniacale è stato analizzato periodicamente durante le colture microalgali. Per l'analisi, un'aliquota di terreno è stata filtrata e successivamente analizzata mediante kit per ammonio (Nanocolor, Macherey-Nagel, Duren, Germania). I fosfati, i nitrati, i nitriti e il COD sono stati analizzati nel liquame suinicolo dopo digestione anaerobica mediante i rispettivi kit per nitrati, nitriti, ortofosfati e COD (Nanocolor).

2.3.2. Determinazione della concentrazione di biomassa

La concentrazione di biomassa microalgale (C , g_{BS}/L) è stata determinata giornalmente come densità ottica (OD) ad una lunghezza d'onda di

625 nm, usando uno spettrofotometro UV-Vis (Lambda 25, Perkin Elmer, Milano, Italia). Per il calcolo della concentrazione è stata usata la correlazione: $OD_{625} = 4,203 C$.

2.3.3. Analisi elementare, analisi del contenuto in clorofilla e osservazioni microscopiche della biomassa

Al raggiungimento dello stato stazionario, la biomassa microalgale è stata osservata mediante microscopia ottica, raccolta tramite centrifugazione a $5000 \times g$ per 10 min (modello 42426, ALC, Milano, Italia), lavata con acqua deionizzata, congelata a $-25^\circ C$ e infine liofilizzata (liofilizzatore alpha 1-2 plus, Christ, Germania). Per le prove eseguite in presenza di $60 \text{ mg}_N/L$ di azoto ammoniacale e per il controllo, la biomassa liofilizzata è stata impiegata per l'analisi della composizione elementare (CHNS) (FLASH EA1112, ThermoQuest, Cleveland, USA), per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) (modello SEM 515, Philips, Olanda) e per l'analisi della frazione lipidica. Le percentuali di azoto, carbonio, idrogeno e zolfo sono state determinate contemporaneamente bruciando il campione in condizioni prestabilite ($950^\circ C$) seguendo la metodologia descritta da Galvagno et al. (2001), mentre quella di ossigeno per differenza tenendo anche conto delle percentuali di umidità residua ($110^\circ C$ per 12 h) e di ceneri. Queste ultime sono state quantificate ponendo un'aliquota di biomassa secca in crogiuolo precedentemente pesato a $650^\circ C$ per 3 h. Per l'analisi al microscopio elettronico, una piccola quantità di campione è stata polverizzata, ricoperta con un sottile strato d'oro (30 nm) e osservata come elettroni secondari (5.0 kV).

La clorofilla totale è stata quantificata al termine delle crescite di controllo e di quelle eseguite con $60 \text{ mg}_N/L$ da liquami suinicoli, mediante il metodo descritto da Ortiz Montoya et al. (2014), i pigmenti sono stati espressi come g di clorofilla per 100 g di biomassa secca.

2.3.4. Estrazione e analisi della frazione lipidica

La restante biomassa è stata estratta mediante il metodo Folch modificato come descritto da Casazza et al. (2015) con qualche modifica. In breve, 0.5 g di biomassa secca sono stati estratti con 20 mL di una soluzione cloroformio/metanolo 2:1 (v/v); l'estratto è poi stato sonicato per 30 min a 40 kHz (UTA 90, FALC, Treviglio, Italia) e quindi posto in palloncino di vetro pirex a $80^\circ C$ a ricadere per 5 h. In seguito sono stati aggiunti 20 mL di ac-

qua al fine di separare le due frazioni (polare e apolare). I lipidi presenti nella frazione apolare sono stati separati dalla biomassa e dalla frazione metanolo/acqua mediante centrifugazione e successiva filtrazione. La resa in lipidi è stata quantificata per via gravimetrica dopo aver allontanato il solvente ed espressa come g di lipidi per 100 g di biomassa secca ($g_L/100g_{BS}$). I trigliceridi sono stati quantificati mediante gascromatografia, quantificando gli acidi grassi in seguito a transesterificazione come descritto da Zunin et al. (2006). Per l'analisi 40 mg di lipidi sono stati risospesi in esano (8 mL) e a questi sono stati poi aggiunti 0,8 mL di una soluzione metanolica di KOH 2M. Il campione è stato agitato mediante vortex per 2 minuti e centrifugato a $3000 \times g$ per 2 min. Quindi, il surnatante (esano con esteri metilici degli acidi grassi) è stato analizzato mediante un gascromatografo con detector FID (1000, Dani Instruments, Milano).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Crescite preliminari di *C. vulgaris* in presenza di Micospectone

Al fine di valutare la resistenza di *C. vulgaris* a diverse concentrazioni di Micospectone (33,3% Lincomicina e 66,6% Spectinomina), 14, 56 e 112 mg/L di farmaco sono stati aggiunti al terreno di crescita.

Come si può vedere in Figura 1, la crescita con 14 mg/L di antibiotico ha fornito risultati comparabili a quelli del controllo raggiungendo, dopo 10 giorni, concentrazioni di biomassa rispettivamente di 0.32 e 0.38 g_{BS}/L , con velocità specifica di crescita (μ) pari a 0.116 e 0.124 d^{-1} . Concentrazioni superiori di Micospectone ($\geq 56 \text{ mg}/L$), invece, sono risultate tossiche per la coltura.

A conferma di ciò, le immagini ottenute mediante microscopia ottica mostrano la formazione di aggregati cellulari e una parziale lisi cellulare con fuoriuscita di citoplasma nel caso delle crescite in presenza di 56 (Figura 2C) e 112 (Figura 2D) mg/L di antibiotico, a conferma della tossicità suggerita dalle colture di cui sopra, mentre non si osserva una sostanziale differenza tra crescite di controllo e crescite con 14 mg/L di Micospectone (Figura 2A e B).

3.2. Crescite di *C. vulgaris* in liquami suinicoli da digestione anaerobica

In Figura 3 sono riportate a titolo d'esempio le curve di crescita di *C. vulgaris* in fotobioreattore

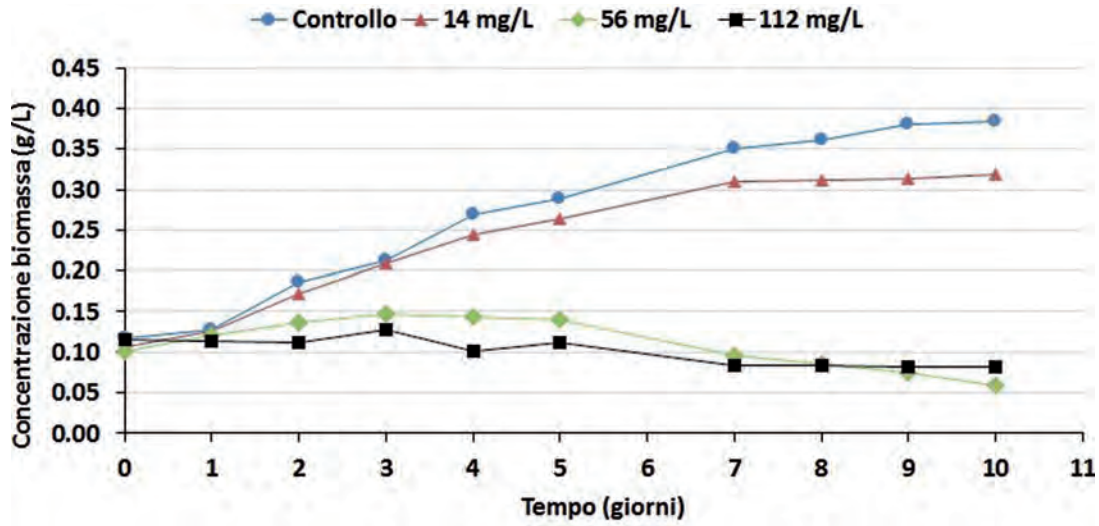


Figura 1 – Colture di *C. vulgaris* in BBM in presenza di differenti concentrazioni di antibiotico (*Micospectone*)

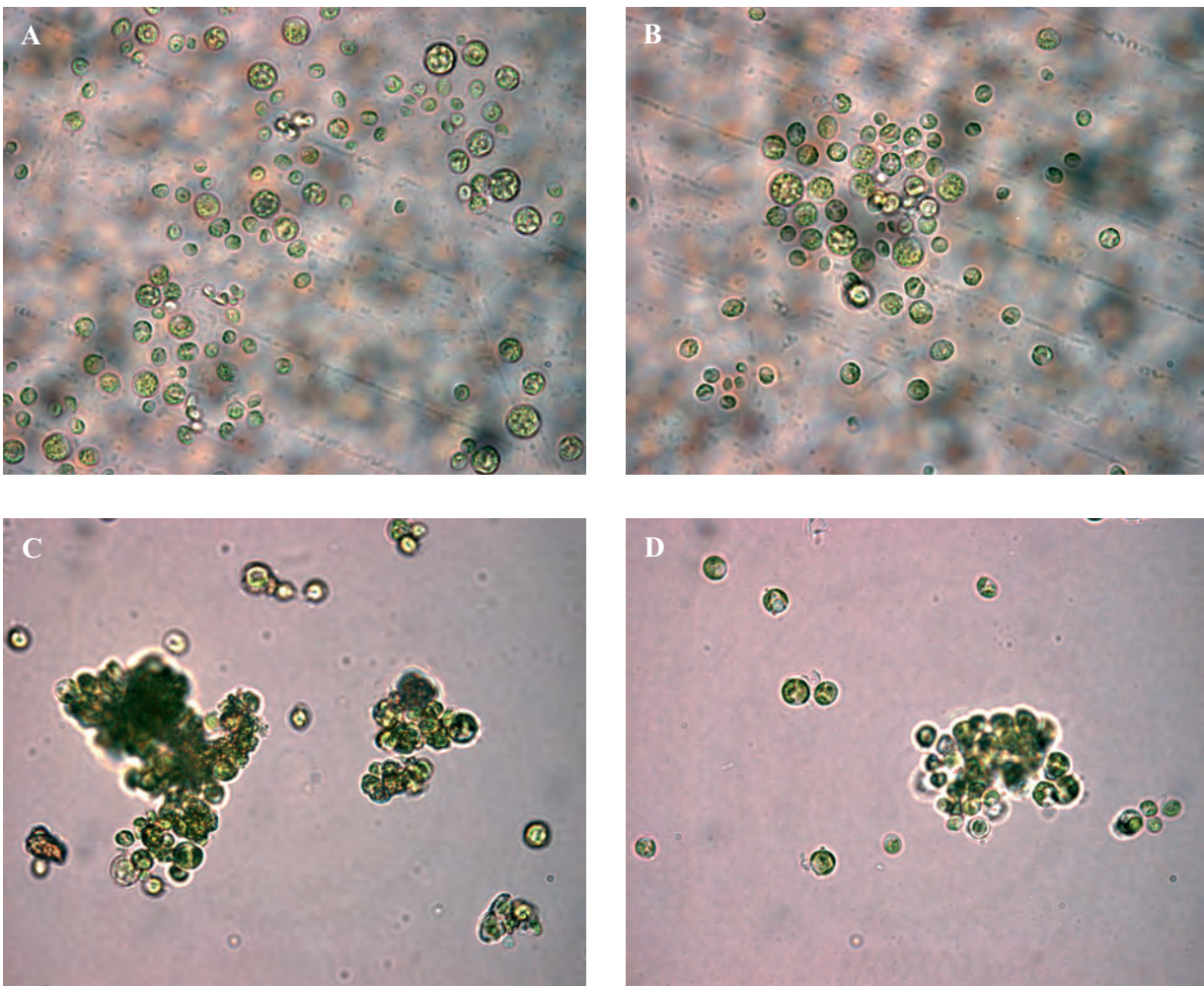


Figura 2 – Immagini al microscopio ottico (100 x) di *C. vulgaris* cresciuta in presenza di 14 (B), 56 (C) e 112 (D) mg/L di *Micospectone* confrontate con la crescita di controllo (A)

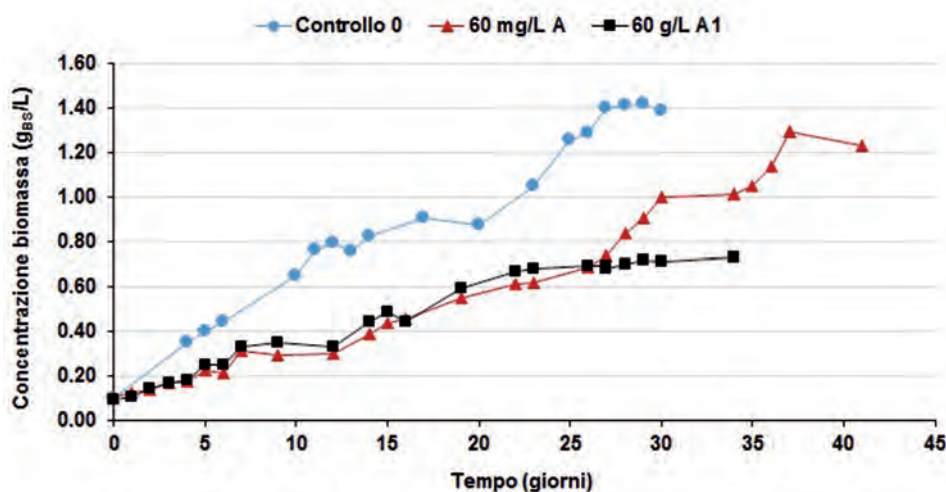


Figura 3 – Crescite di *C. vulgaris* in acqua contenente 60 mg_N/L di azoto ammoniacale puro (A1) o fornito da liquami suinicoli (A); controllo in Bold Basal Medium (0)

(1.5 L) in acqua contenente 60 mg_N/L di azoto ammoniacale puro (A1) o fornito da liquami suinicoli (A), confrontate con quella di controllo in BBM (0). Nonostante la sostanziale differenza della composizione in sali dei due terreni di crescita, dalla figura si evince come la presenza di liquami abbia garantito una crescita microalgale confrontabile con quella del controllo (circa 1,3 g_{BS}/L). Probabilmente i sali e la componente organica in soluzione nei liquami hanno consentito a *C. vulgaris* di sfruttare sia la crescita autotrofa, durante le 12 ore di luce, sia quella mixotrofa, durante il periodo di buio (Liang et al., 2009). Come era prevedibile, vista l'assenza dei principali micronutrienti, le crescite con il solo azoto ammoniacale non hanno raggiunto concentrazioni finali di biomassa paragonabili al controllo e alle crescite con liquami. In Tabella 3 sono riportati i parametri di crescita

per le colture eseguite in presenza di 60, 120 e 170 mg_N/L di azoto ammoniacale da liquami e da ammonio puro.

Come si può osservare, la velocità di rimozione di azoto media nell'arco di tutta la crescita è stata maggiore (5,6 mg/L d) nelle colture a concentrazione di azoto ammoniacale pari a 60 mg_N/L.

C. vulgaris ha mostrato velocità specifica di crescita e produttività di biomassa confrontabili con il controllo nelle colture a concentrazione di azoto ammoniacale di 60 e 120 mg_N/L, mentre concentrazioni superiori hanno comportato un'inibizione della crescita evidenziata da valori molto bassi di μ (≤ 0.02 1/d).

Per quanto riguarda il consumo di azoto giornaliero, considerando la crescita a regime (1 g_{BS}/L) dopo 30 giorni di crescita, è stata osservata una velocità di rimozione decisamente superiore a quella

Tabella 3 – Parametri di crescita di *C. vulgaris* in varie condizioni

Campione	μ (1/d)	P (mg _{BS} /L d)	t_{SP} (d)	$NH_4^+_{REM}$ (mg _N /L d)	$NH_4^+_{RER}$ (mg _N /L d)
0 (crescita di controllo in BBM)	0,09	40	30	-*	-*
A (60 mg _N /L di N-NH ₄ ⁺ da LS)	0,06	27	41	5,6	23,3
B (120 mg _N /L di N-NH ₄ ⁺ da LS)	0,08	39	31	3,4	15,6
C (170 mg _N /L di N-NH ₄ ⁺ da LS)	0,02	18	14	0,3	0,3
A1 (60 mg _N /L di N-NH ₄ ⁺ puro)	0,06	20	34	1,9	10
B1 (120 mg _N /L di N-NH ₄ ⁺ puro)	0,07	30	31	2,2	2,5
C1 (170 mg _N /L di N-NH ₄ ⁺ puro)	0,01	8	14	2,9	2,9

μ , velocità specifica di crescita; p , produttività di biomassa; t_{SP} tempo necessario al raggiungimento della fase stazionaria; $NH_4^+_{REM}$, velocità media di rimozione di N-ammoniacale. $NH_4^+_{RER}$, velocità di rimozione di N-ammoniacale a regime. LS, liquami suinicoli post digestione-filtrazione. *non presente nel BBM.

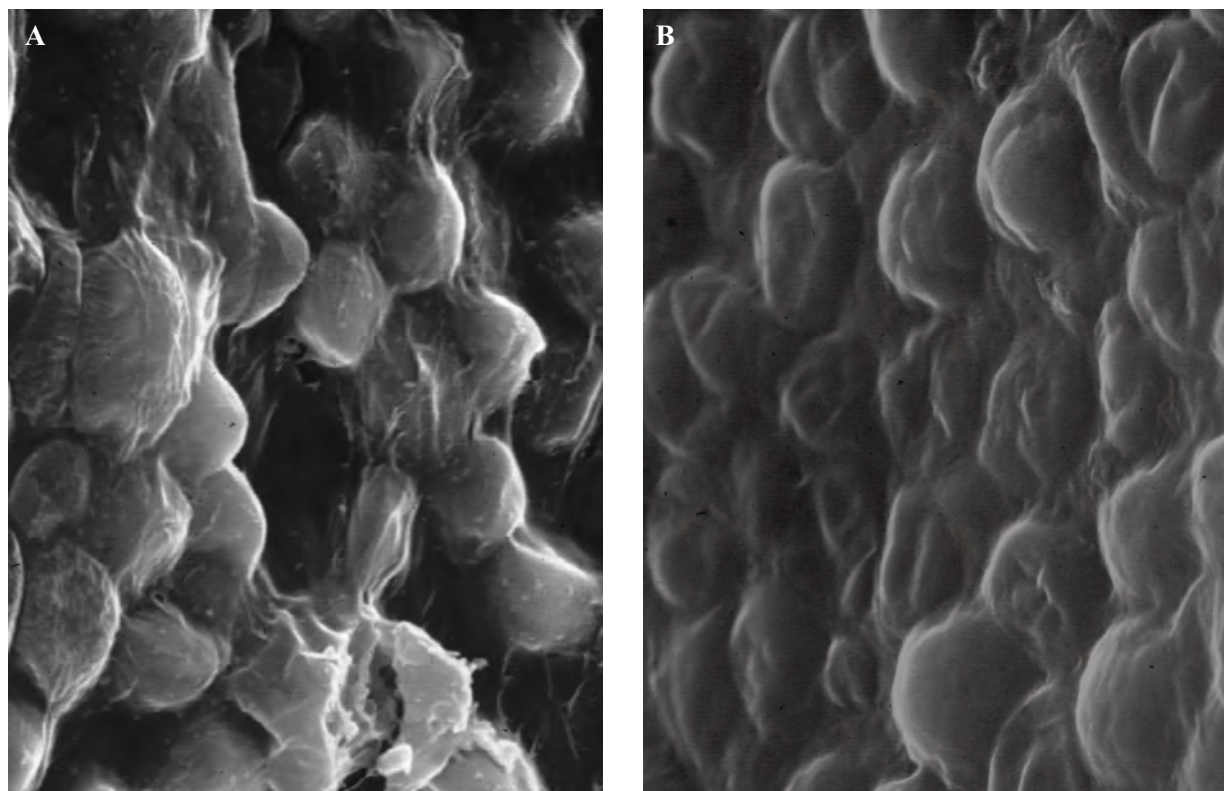


Figura 4 – Immagini al SEM di *C. vulgaris* cresciuta in Bold Basal Medium (A) e in presenza di liquami (60 mg_N/L di azoto ammoniacale da liquami suinicoli) e 14 mg/L di Micospectone (B)

media, con valori che, per la crescita con 60 mg_N/L, hanno superato i 20 mg_N/L d.

Come descritto nel capitolo Materiali e Metodi, nelle colture con 60 mg_N/L di azoto ammoniacale dopo il raggiungimento della fase stazionaria è stato aggiunto l'antibiotico (Micospectone) in concentrazione non tossica per il microorganismo (14 mg/L) (Figura 1) e dopo 5 giorni la biomassa è stata recuperata, essiccata e caratterizzata mediante osservazione al SEM e analisi della composizione elementare (CHNS). I lipidi e i trigliceridi sono stati inoltre quantificati mediante analisi gascromatografica dopo transesterificazione. I risultati sono stati confrontati con quelli della crescita di controllo.

Le immagini ottenute al SEM e riportate in Figura 4 non mostrano sostanziali differenze tra cellule cresciute in presenza di liquami e antibiotici (Figura 4B) e in BBM (Figura 4A).

In Tabella 4 sono riportati i risultati relativi alla composizione elementare e alle concentrazioni in lipidi e trigliceridi di *C. vulgaris*.

Il contenuto di carbonio e di idrogeno sono diminuiti nella biomassa cresciuta con liquami e antibiotico, mentre quello dell'ossigeno è significativamente aumentato. Poiché la microalga ha significativamente accumulato lipidi e trigliceridi (rispetti-

Tabella 4 – Analisi elementare e contenuto in clorofilla totale, lipidi totali e trigliceridi della biomassa secca di *C. vulgaris* cresciuta in (0) BBM e (A) in terreno contenente 60 mg_N/L di azoto ammoniacale da liquami suinicoli e Micospectone

	0 (Crescita di controllo in BBM)	A (60 mg _N /L di N-NH ₄ ⁺ da liquami suinicoli e Micospectone)
C (%)	50,2	44,1
H (%)	12,3	8,2
N (%)	8,9	8,3
S (%)	NR	NR
O (%)	24,8	35,5
Clorofilla totale (g/100g _{BS})	6,1	5,4
Lipidi totali (g/100g _{BS})	8,1	15,2
Trigliceridi (g/100g _{lipidi})	25,2	35,3
NR: non rilevato		

vamente 88 e 40 % in più rispetto al controllo), che notoriamente hanno un contenuto di ossigeno inferiore a quello medio della biomassa, la cui composizione elementare è pari a CH_{1,83}N_{0,048}O_{0,48}P_{0,01}, ci si sarebbe aspettato un trend opposto, ossia un

incremento di C e H e un decremento di ossigeno. Essendo la percentuale di azoto pressoché confrontabile, si può ipotizzare che la frazione proteica sia rimasta pressoché invariata, pertanto la diminuzione di carbonio e di idrogeno può essere spiegata con una perdita progressiva di clorofilla ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$), responsabile indirettamente dell'incremento osservato nei contenuti di ossigeno della biomassa. Tale ipotesi è confermata dalla diminuzione del contenuto di clorofilla totale.

4. CONCLUSIONI

Lo scopo del lavoro è stato quello di investigare l'effetto di inquinanti emergenti (antibiotici) in acque da digestione anaerobica di liquami suinicoli sulla crescita di *Chlorella vulgaris*. Lo studio ha mostrato come *C. vulgaris* sia in grado di proliferare in presenza di Micospectone (miscela di Lincomicina e Spectinomina) con concentrazioni fino a 14 mg/L.

C. vulgaris è stata inoltre in grado di rimuovere efficacemente l'azoto ammoniacale da acque di liquami suinicoli post digestione anaerobica con concentrazioni iniziali pari a 60 e 120 mg_N/L, mentre concentrazioni superiori di azoto ammoniacale hanno comportato morte cellulare. Da ciò ne consegue che il digestato suinicolo deve essere diluito almeno 10-15 volte prima di essere trattato in fotobioreattore. Studi futuri vedranno l'impiego di tale microalga per l'abbattimento dei principali fitofarmaci presenti nei liquami da allevamento.

L'analisi elementare ha evidenziato una diminuzione di carbonio e idrogeno ed un aumento dell'ossigeno nella biomassa cresciuta con antibiotico e azoto ammoniacale da liquami, probabilmente legato ad un decremento di clorofilla. La concentrazione di lipidi nella biomassa cresciuta in presenza di acque reflue è risultata quasi doppia rispetto a quella della biomassa cresciuta in Bold Basal Medium con evidente beneficio in termini di recupero energetico.

5. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Arikan O.A., Mulbry W. e Rice C. (2009) Management of antibiotic residues from agricultural sources: use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals. *J. Hazard. Mat.* 164: 483-489.
- Benemann J.R. (1997) CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy Convers. Manage.* 38: 475-479.

- Bischoff H.W. e Bold H.C. (1963). *Phycological studies IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species.* Austin, TX, USA: Texas Publ.
- Burrell R.E., Innis W.E. e Mayfield C.I. (1984) Development of an optimal heterotrophic growth medium for *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 281-283.
- Casazza A.A., Ferrari P.F., Aliakbarian B. et al. (2015) Effect of UV radiation or titanium dioxide on polyphenol and lipid contents of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Algal Res.* 12: 308-315.
- Converti A., Oliveira R.P.S., Torres B.R. et al. (2009) Biogas production and valorization by means of a two-step biological process. *Bioresour. Technol.* 100: 5771-5776.
- de la Noüe J. e Bassères A. (1989) Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. *Biol. Waste* 29: 17-31.
- Fredriksson H., Baky A., Bernesson S. et al. (2006) Use of on-farm produced biofuels on organic farms-evaluation of energy balances and environmental loads for three possible fuels. *Agric. Syst.* 89: 184-203.
- Gouveia L. e Oliveira A.C. (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 269-274.
- Liang Y., Sarkany N. e Cui Y. (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* 31(7): 1043-1049.
- Miao X. e Wu, Q. (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* 97: 841-846.
- Muller F.A. (2000) The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* 12: 527-534.
- Ortiz Montoya E.Y., Casazza A.A., Aliakbarian B. et al. (2014) Production of *Chlorella vulgaris* as a source of essential fatty acids in a tubular photobioreactor continuously fed with air enriched with CO₂ at different concentrations. *Biotechnol. Prog.* 30: 916-922.
- Panseri L., D'Imporzano G., Pognani M. et al. (2013) Effect of veterinary antibiotics on biogas and bio-methane production. *Int. Biodeter. Biodegr.* 85: 205-209.
- Rashid N., Rehman M.S.U. e Han J.I. (2013) Recycling and reuse of spent microalgal biomass for sustainable biofuels. *Biochem. Eng. J.* 75: 101-107.
- Wan M., Xia J., Rosenberg J.N. et al. (2011) The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Microbiol. Biotechnol.* 91: 835-844.
- Winckler C. e Grafe A. (2001) Use of veterinary drugs in intensive animal production. *J. Soil Sedim.* 1: 66-70.
- Zunin P., Salvadeo P., Boggia R. et al. (2006) Sterol oxidation in meat – and fishbased homogenized baby foods containing vegetable oils. *J. AOAC Int.* 89: 441-446.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) per il supporto finanziario (PRIN, prot. 2010WLNFY2). Questo articolo riprende parte di un contributo presentato a SiCon2016.



INGEGNERIA DELL'AMBIENTE

per il 2017 è sostenuta da:

