



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

Dipartimento per l'Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF)

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

Scienze Ambientali XXIV Ciclo

Relazione tra microbiota del fango attivo ed efficienza depurativa di un impianto industriale con reattori a cascata per il trattamento di reflui caseari.

(BIO/19)

Coordinatore e Tutor: Prof. Maurizio Petruccioli

Firma.....*Maurizio Petruccioli*.....

CoTutor: Ing. Mauro Giorni

Firma.....*Mauro Giorni*.....

Dottorando: Carlo Tocchi

Firma.....*Carlo Tocchi*.....

INDICE

INTRODUZIONE:

CAPITOLO I: LAVORAZIONE CASEARIA E COMPOSIZIONE DEI REFLUI PRODOTTI

1.1 Fasi di produzione del formaggio	Pag 6
1.2 Caratteristiche ed origine del refluo	Pag 9
1.3 Aspetti legislativi	Pag 11

CAPITOLO II: IL TRATTAMENTO DEI REFLUI LATTIERO-CASEARI

2.1 Il trattamento del siero	Pag...15
2.2 Trattamento dei reflui caseari	Pag...22

CAPITOLO III: IL MICROBIOTA DEL FANGO ATTIVO

3.1. Processi di rimozione della sostanza organica da parte del fango attivo	Pag...33
3.2. Microbiologia del fango attivo	Pag...36
3.3. I batteri nel fango attivo	Pag...39
3.4. I Protozoi	Pag...43
3.5. Caratterizzazione del fango attivo	Pag...53
3.6. Caratteristiche di sedimentabilità	Pag...53
3.7. Osservazione al microscopio	Pag...55
3.8. Valutazione della popolazione dei protozoi	Pag...61
3.9. Analisi molecolare del fango attivo	Pag...65

SCOPO DEL LAVORO	Pag...70
------------------	----------

CAPITOLO IV: MATERIALI & METODI

4.1. Attività del caseificio	Pag...74
4.2. Caratteristiche dell'impianto	Pag...76

4.3. Modalità di campionamento e parametri analizzati	Pag...78
4.4. Conta ed identificazione dei protozoi del fango attivo	Pag...84
4.5. Analisi molecolare della popolazione batterica del fango attivo	Pag...85
4.6. Variazione dei regimi di aerazione	Pag...86
4.7. Analisi Statistica	Pag...87
 CAPITOLO V: RISULTATI E DISCUSSIONE	
5.1. Caratteristiche del refluo e condizioni operative dell'impianto	Pag...89
5.2. Efficienza di rimozione dei tre reattori a cascata	Pag...91
5.3 Caratterizzazione del microbiota del fango attivo nei tre reattori a cascata e sua evoluzione nel tempo	Pag...105
5.4. Interazione tra la popolazione dei protozoi e la comunità batterica	Pag...118
5.5. Interazione tra il microbiota del fango attivo e le performance di rimozione dei reattori a cascata	Pag...120
5.6. Utilizzo dell'analisi P.C.A. (Principal Component Analysis) per la definizione delle variabili più importanti all'interno del processo depurativo e delle possibili loro interazioni.	Pag...123
5.7 Applicazione dell'indice SBI su reattori a cascata per reflui caseari	Pag...127
5.8. Effetto della variazione dei regimi di ossigenazione sulle performance ed il microbiota del fango attivo	Pag...129
5.9 Effetto del regime di aerazione sulla popolazione dei protozoi	Pag...134
5.10 Effetto dei regimi di aerazione sulla comunità batterica	Pag...138
CONCLUSIONI	Pag...143
BIBLIOGRAFIA	Pag...145

CAPITOLO I

INTRODUZIONE: LAVORAZIONE CASEARIA E COMPOSIZIONE DEI REFLUI PRODOTTI

Per formaggio si intende il *prodotto ottenuto da latte intero, parzialmente scremato, scremato oppure dalla crema, crema di siero o di latticello, soli o in combinazione tra loro, in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti o cloruro di sodio*. Gli unici ingredienti ammessi per la produzione del formaggio sono il latte, il caglio, i fermenti ed il sale. Con questi ingredienti sono prodotti moltissime varietà di formaggi con caratteristiche sensoriali, aspetto esteriore e consistenza della pasta diversi l'uno dall'altro. La composizione chimica del formaggio rispecchia quella del latte di partenza, in particolare riguardo al contenuto di grassi e proteine, ma allo stesso modo dipende da numerosi altri fattori tra cui: qualità della flora microbica, procedimenti di lavorazione, grado di stagionatura. Più in dettaglio il formaggio è il prodotto derivante da due trasformazioni operate sul latte: una enzimatica (da parte del caglio) e una fermentativa da parte dei microrganismi lattici. Il latte destinato alla caseificazione deve rispondere a ben determinati requisiti microbiologici. Il Regolamento (CE) n. 853/2004 riporta i criteri per il latte crudo di vacca destinato alla produzione di prodotti lattiero-caseari:

1. Gli operatori del settore alimentare che fabbricano prodotti lattiero-caseari devono porre in atto procedure intese a garantire che, immediatamente prima della trasformazione:

- a) il latte crudo di vacca utilizzato per fabbricare i prodotti lattiero-caseari abbia un tenore di germi a 30 °C inferiore a 300.000 cfu per ml;
- b) il latte di vacca trasformato utilizzato per fabbricare i prodotti lattiero-caseari abbia un tenore di germi a 30°C inferiore a 100.000 cfu per ml.

2. Se il latte non risponde ai criteri di cui al punto 1, gli operatori del settore alimentare devono informare l'autorità competente e prendere misure volte a correggere la situazione. Il latte deve essere inoltre privo di antibiotici e deve avere caratteristiche sensoriali normali. La fermentazione del latte è il risultato dell'azione di enzimi apportati con il caglio o naturalmente presenti nel latte e dell'attività metabolica esercitata dai microrganismi. I microrganismi possono essere naturali contaminanti del latte ovvero aggiunti deliberatamente sotto forma di colture starter (Alais, 2000).

1.1 Fasi di produzione del formaggio

Anche se la varietà di formaggi sono numerosissime, il principio di caseificazione è comune alle diverse tipologie e comprende diverse fasi:

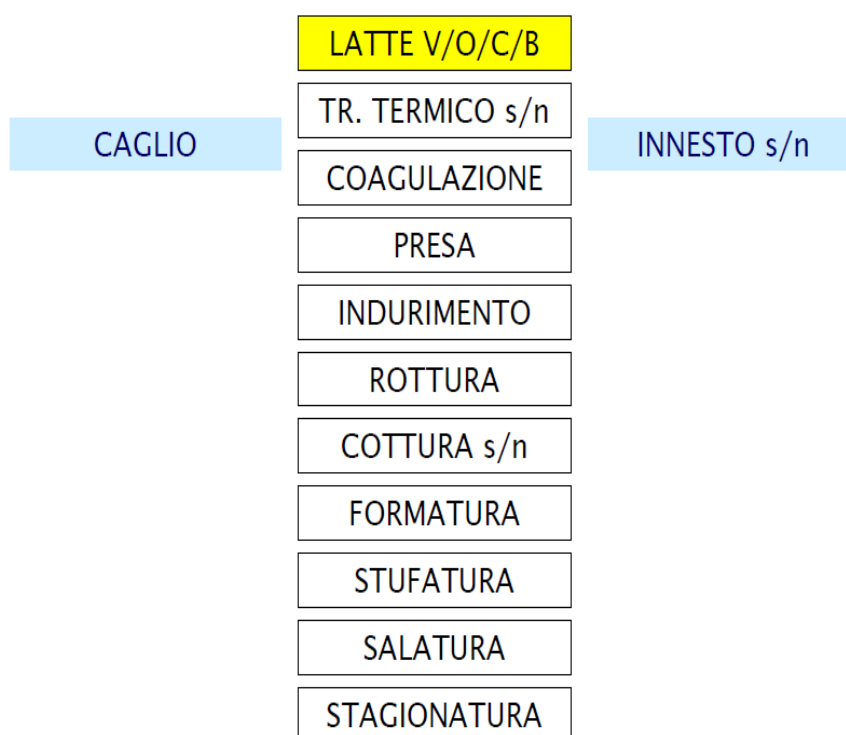


Fig. 1.1: Fasi di produzione del formaggio.

1.1.1 Preparazione del latte

Il formaggio si può ottenere da specie diverse di latte (pecora, capra, vacca, bufala) e la sua tipologia ne influenza la composizione chimica ed i caratteri organolettici.

1.1.2 Trattamento Termico

In alcuni casi il latte subisce il trattamento termico mediante il processo di termizzazione o pastorizzazione. Il trattamento termico del latte si rende necessario soprattutto per i formaggi freschi, mentre per quelli a lunga stagionatura possono essere sufficienti mungitura, raccolta e

trasporto rigorosamente igienici, in quanto eventuali germi patogeni non sopravvivono alle condizioni chimico-fisiche della maturazione (pH acido, NaCl, presenza di antibiotici naturali e metabolici inibenti).

1.1.3 Innesto

Nella quasi totalità dei formaggi vengono aggiunte al latte colture microbiche specifiche che modificano la composizione del latte fornendo enzimi in grado di caratterizzare la maturazione del formaggio. I fermenti lattici selezionati, o starter, sono delle colture pure di fermenti lattici, selezionati per le loro caratteristiche, riprodotte in purezza su substrati o terreni di coltura particolari ed in condizioni ideali che vengono inoculate nel latte per agire come microflora dominante nei processi di caseificazione.

1.1.4 Coagulazione

Il formaggio è prodotto facendo coagulare le proteine e i grassi del latte, ovvero facendoli passare dallo stato liquido di sospensione colloidale a uno stato semisolido, di gel, detto cagliata. La coagulazione del latte è un processo che interessa principalmente la sua componente proteica sottoposta a processi di denaturazione e di destabilizzazione. L'aliquota di liquido che rimane dopo il processo di coagulazione viene definito siero.

1.1.5 Trattamento della cagliata

Per facilitare lo spurgo del siero (che deve essere completamente allontanato) la massa gelatinosa viene rotta in frammenti più o meno piccoli, con notevole aumento della superficie attraverso cui il siero fuoriesce. Il tempo di presa è il tempo compreso tra l'aggiunta del caglio e la comparsa dei primi fiocchi caseosi, mentre il tempo di indurimento è l'intervallo compreso tra la presa e l'inizio della rottura della cagliata con l'aumento di legami tra le micelle.

1.1.6 Cottura

A seconda del tipo di formaggio, la cagliata viene riscaldata a temperature variabili da 38° a 60° C (formaggi cotti e semicotti), per tempi variabili da 15 a 90 minuti. I formaggi crudi non subiscono alcun riscaldamento.

1.1.7 Formatura

La cagliata viene estratta dal siero e riposta in stampi o fascere di forma e dimensioni tipiche del formaggio da produrre. Prosegue lo spurgo dal siero, che può essere facilitato dalla pressatura che conferisce inoltre al formaggio la compattezza e la forma propria. I granuli di cagliata caldi, con temperature diverse a seconda della tecnologia, si aggregano e fondono insieme.

1.1.8 Salagione

La salagione può essere a secco (si sparge più volte il sale grosso sulla superficie esterna delle forme) o per immersione (immergendo le forme in salamoia). La salatura preserva la superficie esterna del formaggio dallo sviluppo di muffe, ne accentua il sapore e contribuisce alla formazione della crosta.

1.1.9 Maturazione

La maturazione è lo stadio durante il quale ogni formaggio assume specifiche caratteristiche organolettiche (aspetto, colore, consistenza, sapore ed aroma). Nel corso della maturazione si completano la trasformazione dei glucidi (lattosio), delle proteine e dei lipidi, per azione di enzimi (microbici e del latte). Queste modificazioni sono condizionate dalla quantità di acqua e sale, dal grado di acidità della pasta casearia, dalla temperatura e dall'umidità dell'ambiente, dalla forma e dalle dimensioni del formaggio (Vizzardi & Maffei, 1999).

1.1.10 Altri prodotti caseari

Altre lavorazioni dell'attività casearia possono riguardare la produzione di burro, gelato, yogurt. Il burro viene ottenuto dalla lavorazione della panna. Durante il processo di zangolature viene separato in burro e latticello. Il latticello una volta seccato può essere ridotto in polvere, raffreddato ed imballato per la distribuzione, oppure scaricato come rifiuto. Il gelato è ottenuto dalla miscela di acqua, burro, latte e siero in polvere. I gelati industriali vengono detti anche soffiati, perché prodotti con l'introduzione di aria, durante la fase di gelatura, fino al 100-130 per cento, per cui diventano molto soffici e leggeri. Poiché vengono distribuiti anche in zone lontane dal luogo di produzione, i gelati industriali necessitano il supporto di una efficace catena del freddo. Lo yogurt viene prodotto utilizzando un latte standardizzato in termine di contenuto in grassi e fortificato con l'aggiunta di latte solido. Zuccheri e stabilizzatori sono aggiunti e la miscela scaldata a 60°C, omogeneizzata, e scaldata

di nuovo a 90°C per 3-5 minuti. Il prodotto viene raffreddato a 30-45 °C ed inoculato con una cultura starter (Mucchetti & Neviani, 2006).

1.2 Caratteristiche ed origine del refluo

Il volume, la concentrazione e la composizione dei reflui derivanti dall'industria casearia dipendono dal tipo di prodotto lavorato, il programma di produzione, la linea di lavorazione impiegata ed il quantitativo di acqua utilizzato (Janczukowicz et al., 2008). Il refluo caseario può provenire sostanzialmente da tre fonti:

- *Acque di processo:* includono le acque utilizzate nei processi di raffreddamento e riscaldamento. Questi effluenti sono normalmente liberi da inquinanti e possono, con un minimo trattamento, essere riutilizzati nel ciclo produttivo oppure scaricati direttamente nella sistema di scolo delle acque piovane (Wang et al., 2006).
- *Acque di lavaggio:* includono prevalentemente le acque utilizzate nella pulizia della linea di processo, dell'attrezzatura impiegata durante il ciclo di lavorazione, delle cisterne, dei silos e della pavimentazione nonché reflui generati da sversamenti accidentali (Kasapgil et al., 1994; Danalewich et al., 1998). Il refluo potrebbe contenere quindi residui di ogni genere provenienti da latte, formaggio, siero e panna (Vidal et al., 2000; Rico Gutierrez et al., 1991).
- *Acque domestiche:* includono prevalentemente le acque provenienti da servizi igienici e dalle cucine.

Le acqua di lavaggio possono contenere agenti sterilizzanti, acidi vari e detergenti alcalini. Il pH dei reflui può quindi variare in maniera significativa a seconda del tipo di pulizia adottata (Demirel et al., 2003). I prodotti più comunemente usati nel lavaggio e sanitizzazione di cisterne sono: soda caustica, acido nitrico, acido fosforico e ipoclorito di sodio (Danalewich et al., 1998). Tutti questi prodotti presentano un significativo impatto sul pH visto la loro componente fortemente basica o acida. Altri problemi inerenti al lavaggio e procedure di sanitizzazione includono un aumento nel refluo della componente di BOD e COD ed un aumento di fosfati, risultanti dall'utilizzo di acido fosforico e detergenti contenenti fosforo (Wang et al., 2006). Inoltre l'elevato volume di acqua usato per la pulizia e la sanitizzazione, così come le problematiche riguardanti il potenziale impatto di detergenti biodegradabili e

tossici si riflettono sia sull'efficienza di trattamento di questa tipologia di reflui, sia sull'ambiente in generale (Bakka, 1992).

1.2.1 Caratteristiche chimico-fisiche

La produzione lattiero-casearia genera effluenti in maniera intermittente, per cui la portata in ingresso all'impianto di trattamento può essere estremamente variabile. Elevate variazioni stagionali sono frequenti e dipendono dal volume di latte utilizzato per la produzione, che in genere risulta alto in estate e basso nei mesi invernali (Kolarski & Nyhuis, 1995). Inoltre, poiché il settore lattiero-caseario produce diversi prodotti, come latte, burro, yogurt, gelato, vari tipi di dolci e formaggi, le caratteristiche di questi effluenti possono anche variare notevolmente, a seconda del tipo di sistema e le modalità di operazione utilizzate (Vidal et al., 2000). I reflui prodotti sono caratterizzati generalmente da un'elevata concentrazione di nutrienti, organici ed inorganici. Gli autori riportano significative variazioni di COD (da 80 a 95000 mg l⁻¹) e BOD (da 40 a 48000 mg l⁻¹) su questa tipologia di refluo (Tab.1.1) (Kushwaha et al., 2011). Il refluo è composto prevalentemente da carboidrati facilmente biodegradabili, principalmente lattosio, ma anche da lipidi e proteine meno biodegradabili (Fang & Yu, 2000). Nei reflui provenienti dalla lavorazione del formaggio, il 97,7% del COD totale è costituito infatti da lattosio, lattato, proteine e grassi (Hwang & Hansen, 1998). Per questa ragione il refluo caseario può tranquillamente definirsi come un complesso tipo di substrato (Fang & Yu, 2000; Yu & Fang 2000). Il COD totale dei reflui caseari è da attribuirsi ed è influenzato principalmente da latte, panna, o siero (Wildbrett, 1988). Il siero presenta un valore di BOD pari a 30-50 g l⁻¹ ed un COD pari a 60-80 g l⁻¹. Il lattosio è in larga parte responsabile dell'elevato valore del carico organico (Guimarães et al., 2010). L'eventuale versamento di elevate quote di siero nelle acque di processo causano grandi variazioni nella qualità dell'effluente. Il pH varia nel range di 4,7–11 (Passeggi et al., 2009), mentre la concentrazione in solidi sospesi (SS) varia nel range 0,024-4,5 g l⁻¹. Tra i nutrienti quantitativamente più significativi di questa tipologia di refluo sono l'azoto totale (14-830 mg l⁻¹) (Rico Gutierrez et al., 1991) e il fosforo totale (9-280 mg l⁻¹) (Gavala et al., 1999). Nei reflui caseari, l'azoto ha origine principalmente dalle proteine del latte, ed è presente nella forma organica come proteine, urea e acidi nucleici oppure come NH₄, NO₂ ed NO₃. Il fosforo si trova principalmente in forma inorganica come orto fosfato e polifosfato più che in forma organica (Demirel et al., 2005). Detergenti ed additivi sono presenti inoltre in piccola quantità in questa tipologia di refluo, la loro natura può essere acida o alcalina e spesso possono contenere additivi come fosfati, agenti sequestranti e surfactanti (Grasshoff, 1997). Sono

inoltre presenti nei reflui caseari significativi quantitativi di Na, Cl, K, Ca, Mg, Fe, CO, Ni e Mn. L'elevato quantitativo di Na e Cl può dipendere dall'elevata quantità di detergente alcalino impiegato per la pulizia nel caseificio (Demirel et al., 2005).

1.3 Aspetti legislativi

Il decreto legislativo n°152 del 3 Aprile 2006 tratta le norme in materia ambientale, in particolare l'allegato 5 stabilisce i limiti di emissione degli scarichi idrici. Le acque reflue industriali sono definite come qualsiasi tipo di acque reflue scaricate da edifici od impianti in cui si svolgono attività commerciali o di produzione di beni, diverse dalle acque reflue domestiche e dalle acque meteoriche di dilavamento (*art. 2, comma 1, D.Lgs. n. 4/2008*).

Per scarico si intende invece qualsiasi immissione effettuata esclusivamente tramite un sistema stabile di collettamento che collega senza soluzione di continuità il ciclo di produzione del refluo con il corpo ricettore (acque superficiali, suolo, sottosuolo e rete fognaria) indipendentemente dalla loro natura inquinante, anche sottoposte a preventivo trattamento di depurazione. In particolare l'Art. 101, che detta i criteri generali, prevede che tutti gli scarichi siano autorizzati e che rispettino i valori limite previsti nell'Allegato 5, salvo deroghe rilasciate dalle regioni.

L'Art. 107 prevede che scarichi in reti fognarie di acque reflue industriali siano sottoposti alle norme tecniche, alle prescrizioni regolamentari e ai valori limite adottati dall'Autorità d'Ambito competente in base alle caratteristiche dell'impianto, e in modo che sia assicurata la tutela del corpo idrico ricettore. L'Art. 108 detta le disposizioni riguardanti gli scarichi di sostanze pericolose. Per il raggiungimento e/o mantenimento degli standard di qualità fissati all'allegato A del presente regolamento l'autorità competente obbliga le imprese, i cui scarichi contengono le sostanze individuate all'allegato A, all'adozione delle migliori tecniche disponibili ai fini della riduzione o eliminazione delle sostanze pericolose negli scarichi e definiscono comunque, per le sostanze di cui allo stesso allegato A, valori limite di emissione più restrittivi di quelli previsti alla tabella 3 dell'allegato 5 del decreto legislativo n. 152 del 2006.

Tab.1.1: Caratteristiche chimico-fisiche di varie tipologie di refluo dell'industria lattiero-casearia (Kushwaha et al., 2011). C=Lavorazione casearia ; Y=Lavorazione Yogurt

Tipo di refluo	COD	BOD	pH	TSS	TN	TP	Cl	Grassi	Referenze
C	80-95000	40-48000	4,5-9,4	24-4500	15-180	12-132	48-599		Rico Gutierrez et al. (1991)
C	4000	2600	8-11		55	35		400	Kasapgil et al. (1994)
C	4500	2300		800	60	50		350	Koyuncu et al. (2000)
C	4000	2000		800	60				Koyuncu et al. (2000)
Y	1500	1000	7,2	191	63				Koyuncu et al. (2000)
C	4430	3000	7,32	1100	18	14			Monroy et al. (1994)
C	1745			400	75	9.1			Koyuncu et al. (2000)
C	980-7500	680-4500		300					Kolarski and Nyhuis (1995)
C			4,7	2500	830	280			Gavala et al. (1999)
C	18045	8239		7175	329		593	4890	Arbeli et al. (2006)
C	2000-6000	1200-4000	8-11	350-1000	50-60				Ince (1998)
C	430-15200	650-6240	4,7-11	250-2750	14-90			160-1760	Passeggi et al. (2009)
C	2800	1600			140	30			Schwarzenbeck et al. (2005)

Tab. 1.2: Limiti di emissione allo scarico secondo il Dgls.152/2006 Tab.3 All.5

4 METODI DI CAMPIONAMENTO ED ANALISI

Fatto salvo quanto diversamente specificato nelle tabelle 1, 2, 3, 4 circa i metodi analitici di riferimento, rimangono valide le procedure di controllo, campionamento e misura definite dalle normative in essere prima dell'entrata in vigore del presente decreto. Le metodiche di campionamento ed analisi saranno aggiornate con apposito decreto ministeriale su proposta dell'APAT.

Tabella 3. Valori limiti di emissione in acque superficiali e in fognatura.

Numero parametro	PARAMETRO	unità di misura	Scarico in acque superficiali	Scarico in rete fognaria (*)
1	pH		5,5-9,5	5,5-9,5
2	Temperatura	°C	(1)	(1)
3	colore		non perettibile con diluizione 1:20	non perettibile con diluizione 1:40
4	odore		non deve essere causa di molestie	non deve essere causa di molestie
5	materiali grossolani		assenti	assenti
6	Solidi sospesi totali (2)	mg/L	≤ 80	≤ 200
7	BOD5 (come O2) (2)	mg/L	≤ 40	≤ 250
8	COD (come O2) (2)	mg/L	≤ 160	≤ 500
9	Alluminio	mg/L	≤ 1	≤ 2,0
10	Arsenico	mg/L	≤ 0,5	≤ 0,5
11	Bario	mg/L	≤ 20	-
12	Boro	mg/L	≤ 2	≤ 4
13	Cadmio	mg/L	≤ 0,02	≤ 0,02
14	Cromo totale	mg/L	≤ 2	≤ 4
15	Cromo VI	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,20
16	Ferro	mg/L	≤ 2	≤ 4
17	Manganese	mg/L	≤ 2	≤ 4
18	Mercurio	mg/L	≤ 0,005	≤ 0,005
19	Nichel	mg/L	≤ 2	≤ 4
20	Piombo	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,3
21	Rame	mg/L	≤ 0,1	≤ 0,4
22	Selenio	mg/L	≤ 0,03	≤ 0,03
23	Stagno	mg/L	≤ 10	-
24	Zinco	mg/L	≤ 0,5	≤ 1,0

25	Cianuri totali (come CN)	mg/L	≤ 0,5	≤ 1,0
26	Cloro attivo libero	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,3
27	Solfuri (come H2S)	mg/L	≤ 1	≤ 2
28	Solfati (come SO4)	mg/L	≤ 1	≤ 2
29	Solfati (come SO4) (3)	mg/L	≤ 1000	≤ 1000
30	Cloruri (3)	mg/L	≤ 1200	≤ 1200
31	Fluoruri	mg/L	≤ 6	≤ 12
32	Fosforo totale (come P) (2)	mg/L	≤ 10	≤ 10
33	Azoto ammoniacale (come NH4) (2)	mg/L	≤ 15	≤ 30
34	Azoto nitroso (come N) (2)	mg/L	≤ 0,6	≤ 0,6
35	Azoto nitrico (come N) (2)	mg/L	≤ 20	≤ 30
36	Grassi e olii animali/vegetali	mg/L	≤ 20	≤ 40
37	Idrocarburi totali	mg/L	≤ 5	≤ 10
38	Fenoli	mg/L	≤ 0,5	≤ 1
39	Aldeidi	mg/L	≤ 1	≤ 2
40	Solventi organici aromatici	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,4
41	Solventi organici alifatici (4)	mg/L	≤ 0,1	≤ 0,2
42	Tensioattivi totali	mg/L	≤ 2	≤ 4

CAPITOLO II

INTRODUZIONE: IL TRATTAMENTO DEI REFLUI LATTIERO- CASEARI

I reflui caseari, vista l'elevata biodegradabilità, si prestano molto bene ad un trattamento di tipo biologico (Burton, 1997). Il trattamento biologico aerobico comporta la degradazione microbica e l'ossidazione dei reflui in presenza di ossigeno. Il trattamento convenzionale dei reflui caseari mediante processi aerobici include sistemi come i fanghi attivi, filtri percolatori, lagune areate o una combinazione di questi (Carta-Escobar et al., 2004). Il maggior carico inquinante viene prodotto comunque dal siero che costituisce circa l'85% del latte trattato (Panesar et al., 2007). Visto l'elevatissimo carico organico del siero il suo smaltimento risulta molto complesso da trattare mediante un sistema biologico, visto che l'elevato carico di BOD e COD porta ad un sovraccarico del sistema (Kosikowski, 1979; Smithers, 2008). Il siero tuttavia è un sottoprodotto molto ricco in proteine, lattosio e sali minerali, che lo rendono un substrato riutilizzabile in molti settori. Nella pratica della lavorazione casearia quindi si preferisce generalmente cercare di differenziare le acque di processo dal siero, che viene trattato separatamente con altri sistemi.

2.1 Il trattamento del siero

Le metodologie per il trattamento e riutilizzo del siero sono molteplici e riguardano vari campi inerenti al settore zootecnico, al settore farmaceutico ed alle energie pulite. I metodi di riutilizzo più comuni sono i seguenti: *compostaggio, produzione di proteine, produzione di acido lattico, produzione di biofuel, digestione anaerobica e integratore dell'alimentazione del bestiame*.

2.1.1 Compostaggio

Il compostaggio consiste nella decomposizione aerobica e nella stabilizzazione del substrato organico. Il processo avviene sotto condizioni che portano a temperature termofile a causa del calore sviluppato dalla reazione biologica. Dal substrato organico si ottiene un prodotto finale stabile, libero da patogeni e che può essere utilizzato come concime per il suolo (Goluke, 1982; Haug, 1993). Il processo di compostaggio è costituito da tre fasi ognuna associata ad una determinata temperatura: fase mesofilica, termofila e fredda.

Nella fase mesofila la temperatura nella miscela da compostare aumenta dalla temperatura ambiente fino ai 40°C, cominciano così a comparire funghi e batteri acidofili. La massima degradazione e stabilizzazione della materia organica si raggiunge nella fase termofila. La temperatura del compost passa da 40° a 70°C gradi ed i microrganismi presenti nella precedente fase vengono rimpiazzati da batteri termofili, attinomiceti e funghi termofili. La

fase fredda è caratterizzata dalla riduzione dell'attività microbica e la sostituzione di microrganismi termofili con batteri mesofilici e funghi. Durante la fase fredda inoltre c'è un'ulteriore evaporazione dell'acqua, una stabilizzazione del pH e formazione di acido umico. L'ossigeno è un importante parametro da considerare durante il procedimento, il compost si può formare sia sotto condizioni aerobiche che anaerobiche. Il processo aerobico è più veloce e non lascia cattivi odori. Le condizioni aerobiche possono essere ottenute da periodici ribaltamenti della biomassa o da insufflazioni di aria. La percentuale di saturazione dell'ossigeno è un parametro fondamentale da tenere sotto controllo. Se scende sotto il 5% ci troviamo in condizioni anaerobiche con produzione di cattivi odori, se sale sopra il 15%, oltre ai maggiori costi, si ha perdita di calore, lenta decomposizione e minore distruzione di patogeni; l'intervallo ideale nel quale lavorare è quindi quello compreso tra il 5 e 15% (Ferrer et al., 2001). Il livello di umidità durante il compostaggio varia tra il 50 e 60%; solitamente sopra il 60% si verificano condizioni anaerobiche, mentre sotto il 40% il processo risulta più lento. Un'altra misura da esaminare è il rapporto tra carbonio e azoto, il cui valore ideale oscilla tra il 25 e 30%. Il siero può trovare un importante utilizzo nel processo di compostaggio in quanto è in grado di aumentare la concentrazione di carbonio, azoto e fosforo rispetto al compost normale; è comunque in genere utilizzato per ridurre il rapporto C/N quando si utilizzano prevalentemente residui lignocellulosici che sono a basso tenore di azoto e la sua aggiunta limita l'uso di acqua necessaria ad al raggiungimento del tenore di umidità iniziale (Chandrasekara et al., 2000).

2.1.2 Produzione di proteine

Il sistema più semplice per la valorizzazione del siero di latte è la concentrazione della sostanza secca fino a raggiungere un liquido denso e cremoso oppure una polvere igroscopica. Per l'ottenimento di tali sostanze è indispensabile eliminare l'acqua di cui il siero è costituito per il 94%. Il sistema più antico è quello dell'evaporazione termica dell'acqua che fa uso dei cosiddetti evaporatori. Le proteine e le sostanze termosensibili presenti nel siero di latte verrebbero però denaturate se concentrate a temperature di ebollizione corrispondenti alla pressione atmosferica (100 °C), riducendo la solubilità del prodotto ottenuto e quindi il suo valore di mercato. In realtà nei moderni evaporatori si opera con pressioni massime di circa 0,4 bar assoluti fino a raggiungere valori tendenti al vuoto assoluto che corrispondono a temperature di ebollizione di circa 80 °C. Altro parametro che viene considerato nel dimensionamento e nell'utilizzo degli evaporatori è costituito dal tempo di permanenza del liquido nel sistema di concentrazione. I più comuni evaporatori utilizzati per la

concentrazione del siero sono l'evaporatore discontinuo, evaporatore a tubi lunghi verticali, evaporatori a piastre ed evaporatori a compressione termica del vapore. L'evaporatore a lunghi tubi verticali è il tipo di concentratore più utilizzato nell'industria di trasformazione del siero. Il suo funzionamento abbina elevati coefficienti di scambio termico (superiori anche a $2000 \text{ Wm}^2 \text{ K}^{-1}$) a bassi tempi di permanenza del liquido bollente nell'apparecchio. Questa tipologia di evaporatore è costituita da un cilindro verticale (mantello) all'interno del quale e parallelamente ad esso sono disposti una serie di tubi nei quali fluisce il siero da concentrare. Il mezzo riscaldante (solitamente vapore) viene iniettato tra la superficie esterna dei tubi e l'interno del mantello (1). Le proteine del latte, ottenute dal processo di essiccamento, trovano utilizzi in vari settori. Gli isolati di idrolisati sono usati nei cibi per bambini (Damodaran & Paraf, 1997). I derivati del siero sono inoltre usati nelle tecniche di produzione farmaceutica come pigmenti, nelle colle e nella produzione di cosmetici (Audic, 2003). Gli effetti medicinali delle proteine denaturate, ottenute a regime di basse temperature, sono conosciute per la loro capacità di stimolare antiossidanti e immunoregolatori attivi nel trattamento del cancro (Kennedy et al., 1995) ed per gli effetti benefici nella prevenzione del cancro (Hakkak et al., 2001). Le proteine del latte hanno inoltre effetti ormonali nell'osteoporosi (Takada et al., 1996) e nell'ipertensione (Pihlanto-Lepala, 2000). Oltre questo, il siero ha rapporto bilanciato tra Ca:P e Na:K, un elevato contenuto di vitamina B (Renner, 1983), ed un elevato contenuto di cisteina ed amminoacidi essenziali (Kapdan & Kargi, 2006).

2.1.3 Produzione di acido lattico

Fra i diversi prodotti che si possono ottenere dalla fermentazione del lattosio presente nel siero uno dei più interessanti, per l'ampio numero di possibili applicazioni, è senza dubbio l'acido lattico (Panesara et al., 2007). L'acido lattico ed i suoi derivati trovano frequente utilizzo nei settori agroalimentari, tessile, farmaceutico e concerie (Buchta, 1983; Vick Roy, 1985). Di recente c'è stato un crescente interesse per la produzione di acido lattico, visto che può essere utilizzato come materia prima per la produzione di acido polilattico, un polimero molto utilizzato in chirurgia plastica e facilmente biodegradabile (Datta et al., 1995). Delle 80000 tonnellate prodotte su scala mondiale ogni anno, circa il 90% deriva dal processo di fermentazione LAB (lactic acid bacteria) ed il resto è prodotto sinteticamente dall'idrolisi del lattonitrile (Hofvendahl & Hahn-Hagerdal, 2000). La fermentazione microbica ha un significativo vantaggio dato che la scelta di un determinato ceppo LAB produce un solo enantiometro che genera un prodotto otticamente puro, viceversa la produzione mediante sintesi origina una miscela racemica di acido DL-lattico. Le proprietà fisiche del polilattato

dipendono dalla composizione enantiomerica dell'acido lattico, così risulta di fondamentale importanza ottenere una miscela otticamente pura (Litchfield, 1996; Lunt, 1998).

L-(+)-acido lattico otticamente puro, per esempio, viene utilizzato per ottenere un polimero a cristalli che trova impiego nella produzione di fibre e film orientabili adottati nella lavorazione dei cristalli liquidi (Amass et al., 1998).

2.1.4 Produzione di biofuel

L'interesse per i biocarburanti nasce quando il costo per la produzione di tali prodotti è concorrenziale con il prezzo dei combustibili di natura fossile. La produzione di biocarburanti per via biologica, presuppone l'utilizzo di uno zucchero semplice e fermentescibile come substrato per il metabolismo di adeguati microrganismi. Tali microrganismi, consumando lo zucchero, producono bioalcol in quantità dipendente da diversi fattori quali: tipo di zucchero, tipo di lievito e condizioni di coltura (pH, temperatura, presenza di nutrienti, salinità, ecc). La reazione è la seguente, in condizioni di anaerobiosi: $\text{zucchero} + \text{nutrienti} + \text{lievito} = \text{alcol} + \text{CO}_2 + \text{lievito}$.

Storicamente la produzione di bioetanolo mediante processi di fermentazione parte da prodotti zuccherini di scarto quali il melasso dell'industria saccarifera o da piantagioni dedicate, tutte sostanze comunque aventi un prezzo di mercato. Il costo di produzione del bioetanolo dipende per più del 50% dal costo della materia prima. L'idea di produrre bioetanolo da rifiuti è allettante perché si evita il costo di acquisto del substrato di partenza (Ling, 2008). In realtà si dovrebbe tener conto nel processo produttivo dell'energia spesa per portare la concentrazione dei substrati zuccherini presenti nel rifiuto a valori idonei alla fermentazione e del costo necessario allo smaltimento dei residui. Il primo brevetto per la trasformazione del siero in etanolo (U.S Patent no. 2,183,141) fu depositato nel 1939 (Murtagh, 1985). Nel siero e nella scotta di latte è presente infatti uno zucchero, il lattosio, normalmente non metabolizzabile dalla maggior parte dei lieviti. Il siero in ingresso viene filtrato e concentrato mediante membrane di UF (Ultrafiltrazione), NF (Nanofiltrazione), OI (Osmosi inversa) oppure con evaporatori a recupero energetico. La concentrazione finale del prodotto si aggira intorno a 15-20% per limitare la pressione osmotica degli zuccheri e dei sali in esso contenuti, viene inoltre ridotto il volume di partenza di circa 3 volte producendo in questo stadio acqua demineralizzata se si utilizzano membrane di OI o concentratori termici. Il liquido concentrato passa in un reattore di idrolisi del lattosio e simultanea fermentazione. Con metodi biochimici (idrolisi enzimatica) è possibile trasformare infatti questo disaccaride nei due zuccheri semplici, α -glucosio e β -galattosio. La fermentazione tuttavia non può essere effettuata da

Saccharomyces cerevisiae, che è comunemente usato per la fermentazione alcolica, perché questo ceppo di lievito manca dell'attività β -galattosidasi; può tuttavia fermentare i prodotti dell'idrolisi del lattosio: glucosio e galattosio. Purtroppo, l'idrolisi acida può dar vita ad alcuni sottoprodotti che sono in grado di inibire la fermentazione, ed inoltre l'idrolisi enzimatica aggiungerà spese per il processo. Un'altra opzione consiste nell' utilizzo di un diverso ceppo di lievito, il *Kluyveromyces marxianus*, che è in grado di fermentare il lattosio direttamente ad etanolo (Christensen et al., 2010). La temperatura del processo viene mantenuta intorno a 35°C ed il pH al di sotto di 4 per evitare contaminazioni batteriche e il conseguente innesco di reazioni secondarie quali fermentazioni butirriche che ridurrebbero la quantità e la qualità il prodotto finale. Il brodo fermentato, passa in una colonna di distillazione continua che estrae alcol etilico ad una gradazione di minimo 90° GL. Dal fondo della colonna si produce il residuo chiamato borlanda contenente siero proteine coagulate e sali minerali, esso viene filtrato e concentrato in un evaporatore annesso e in sinergia con la colonna di distillazione (Gibson, 2006). Le borlande concentrate insieme ai lieviti di supero e alle proteine denaturate possono essere vendute come mangime ad allevamenti, tal quali, o dopo essere state essiccate. L'etanolo ottenuto (alcol grezzo) può infine essere purificato dal metanolo per distillazione in una seconda colonna e concentrato ulteriormente, ottenendo bioetanolo con filtri di zeoliti o setacci molecolari (2). Ci sono alcuni stabilimenti industriali, siti in Nuova Zelanda, Stati Uniti, Danimarca ed Irlanda che producono etanolo a partire da siero (Pesta et al., 2007; Siso, 1996). In particolare in Nuova Zelanda, Anchor Ethanol, una sussidiaria del gruppo alimentare Fonterra Cooperative Group, opera con tre impianti per la produzione di etanolo da siero per la produzione di circa 17 milioni di litri di etanolo per anno (Thiele, 2005). La Anchor produce otto differenti tipi di etanolo, dall'etanolo potabile per bevande fino all'alcool anidro per i carburanti.

2.1.5 Digestione anaerobica e produzione di biogas

La digestione anaerobica è uno dei più vecchi procedimenti di trattamento dei rifiuti. Consiste nella decomposizione di materiale organico ed inorganico in assenza di ossigeno. Le maggiori applicazioni sono nella stabilizzazione dei fanghi prodotti dal trattamento dei reflui e di molti altri rifiuti provenienti dalla lavorazione industriale. È stato dimostrato sperimentalmente infatti che la digestione anaerobica è particolarmente adatta per trattare i reflui con alto contenuto di carbonio (Davila-Vazquez et al., 2009). L'industria casearia, così come molti reflui agroindustriali, visto l'elevato carico organico, si presta bene a questo tipo di trattamento. Il trattamento anaerobico tuttavia risulta di solito inadeguato per rispettare i limiti

imposti allo scarico, così si preferisce abbinare un processo aerobico come ulteriore trattamento (Demirel, 2005). La digestione anaerobica è un processo multifase nel quale la sostanza organica è trasformata in una miscela gassosa di CO_2 e CH_4 . Il processo riduce efficientemente i livelli di COD, consente di ottenere anche una fonte alternativa di energia sviluppando biogas contenente metano ed evita i costi energetici per l'aerazione. Inoltre i residui della digestione possono essere utilizzati in agricoltura come fertilizzanti secondari. I reattori anaerobici sono utilizzati per il trattamento di reflui caseari per almeno due decenni. Esistono varie configurazioni per quanto riguarda i sistemi anaerobici, i più comuni sono: UASB (Upflow anaerobic sludge blande), UAF (Upflow anerobic filter) e reattore anaerobico a doppio stadio. Il reattore UASB consiste in un separatore di fase gas-solido (per trattenere il fango anaerobico all'interno del reattore), un sistema di ripartizione dell'influente ed un sistema di drenaggio per l'effluente (Medhat & Saleh, 2004). Il trattamento UASB di reflui caseari mediante un impianto pilota che trattava una concentrazione di COD compresa tra 12 g l^{-1} e 60 g l^{-1} (Gavala et al., 1999), ha presentato un tasso di rimozione di COD tra l'85% ed il 99% a fronte di un carico organico compreso tra i $2\text{-}7,3 \text{ g COD g}^{-1}$ con un tempo di ritenzione di 6 giorni. Un altro studio su impianto pilota asserisce che si può ottenere una riduzione del 97% del COD, mediante un reattore UASB, durante il trattamento anaerobico del siero (Yan et al., 1989). Tuttavia diversi autori hanno riportato la riduzione di efficienza nei reattori UASB a causa della crescita di sostanza organica all'interno del reattore (Morgan et al., 1991; Motta-Marques et al., 1990). Il digestore anaerobico con filtro UAF contiene un sistema filtrante posto nel centro dove si favorisce la crescita della popolazione microbiologica anaerobica. Impianti pilota con la tecnologia UAF hanno mostrato rese di rimozione del 85% di COD e 90% di BOD_5 , con un carico organico di 6 KgCOD g^{-1} ed un tempo di ritenzione di 20 ore. La produzione di metano è nell'ordine del 75-85% con una corrispondente produzione di $0,32\text{-}0,34 \text{ m}^3\text{CH}_4 \text{ KgCOD}^{-1}$ rimosso. Il sistema produce circa 770 litri di $\text{CH}_4 \text{ g}^{-1}$ (Ince, 1998). Il trattamento del siero mediante degradazione anaerobica presenta tuttavia dei problemi dovuti all'abbassamento del pH che inibisce la conversione degli acidi in metano. La situazione può essere migliorata ponendo due reattori anerobici in serie. Il primo reattore predispone un substrato più adatto per il secondo reattore per svolgere la fase di produzione del metano (Alexiou et al., 1994). In uno studio è stata valutata la digestione anaerobica di tre differenti reflui caseari (produzione formaggio, lavorazione latte fresco, burrificio) utilizzando un impianto pilota con un sistema a doppia fase (Strydom et al., 1997). Per il refluo proveniente dalla produzione di formaggio, il COD è stato abbattuto del 97% utilizzando un carico organico di $2,82 \text{ KgCOD g}^{-1}$, mentre con un carico organico di

2,44 KgCOD g⁻¹, è stato misurato un abbattimento del 94% per il refluo proveniente dalla lavorazione del latte fresco. Per il refluo proveniente dalla lavorazione del burro è stato ottenuta una rimozione del 91% di COD con un carico organico di 0,97 KgCOD g⁻¹. Altri studi pongono l'accento sulla produzione di biogas utilizzando processi anaerobici. Esperimenti in batch condotti da Ferchichi et al. (2005) studiano l'influenza del pH iniziale sulla produzione di idrogeno utilizzando come substrato il siero ed una cultura pura di *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. L'autore riporta una produzione massima a pH 6 con 28,3 ml h⁻¹ di idrogeno prodotto e 7,89 mmol g⁻¹ di lattosio. Nei casi pratici la produzione di biogas da solo siero risulta difficoltosa a causa dell'acidità del prodotto si preferisce mescolarlo quindi con altri scarti.

2.1.6 Integratore dell'alimentazione del bestiame

Le proteine del siero rappresentano circa il 20% delle proteine del latte, e presentano un elevato potere nutrizionale (Beaulieu et al., 2006; Yalçın, 2006; Smithers, 2008).

Molto diffusa fino a pochi decenni fa l'alimentazione del siero permetteva ad ogni caseificio di poter alimentare suini in grasso in situ. Il siero (come la scotta) è utilizzato come integratore miscelandolo direttamente con altri prodotti (mais, sfarinati vari etc.). Integrando i prodotti del latte, come il siero, nella dieta si migliora lo svezzamento dei suini rispetto ad un'alimentazione composta da mais-farina di soia (Pope & Allee, 1982; Mahan, 1983). Altra possibilità relativa all'utilizzo del siero tal quale per l'alimentazione zootecnica è quella dell'abbeveraggio dei bovini e dei vitelli. Alternativamente il siero può essere utilizzato per inumidire diverse tipologie di prodotti per l'alimentazione bovina. Questo tipo di utilizzo non è allo stato attuale diffuso benché abbia dato risultati soddisfacenti laddove sperimentato in Italia e all'estero (soprattutto in Francia).

L'utilizzo del siero per l'alimentazione animale rappresenta in assoluto il sistema più ecologico in quanto permette di recuperare l'intero quantitativo di siero minimizzando gli impatti ambientali che si limitano a quelli prodotti dal trasporto dal caseificio all'allevamento. A causa delle difficoltà di conservazione e trasporto, che deve essere effettuato nell'arco di tempo di poche ore dalla produzione per evitarne la fermentazione che ne comprometterebbe irrimediabilmente l'utilizzo, l'impiego diretto per l'alimentazione zootecnica è però una pratica conveniente solo per situazioni in cui l'allevamento sia nelle vicinanze al caseificio stesso. Inoltre proprio le difficoltà legate alla gestione di liquidi di veloce degradazione ha portato molti allevatori di suini a sostituire l'alimentazione liquida a favore di quella solida con conseguente riduzione della domanda di siero.

Per ovviare a queste problematiche diverse sono state le proposte per la trasformazione del siero sempre finalizzato alla produzione di integratore di mangimi zootecnici. Tra queste si ricorda in particolare la produzione di siero concentrato.

2.2 Trattamento dei reflui caseari

I reflui lattiero-caseari derivano essenzialmente dal lavaggio dei macchinari e pavimentazione. Presentano un carico inquinante molto più basso del siero ma un volume generalmente superiore. I processi applicabili per un efficace trattamento di questa tipologia di refluo sono quelli classici utilizzati anche per la depurazione dei reflui civili e prevedono: *fanghi attivi a biomassa sospesa o adesa, lagunaggio, fitodepurazione*.

2.2.1 Processi aerobici

Il trattamento aerobico è riconosciuto come un ottimo metodo per la degradazione dei reflui con un elevato carico inquinante, come quelli provenienti dall'industria agroalimentare (Benitez et al., 1999). I processi aerobici si distinguono in processi a biomassa fissa e processi a biomassa sospesa. Tra i primi, i più utilizzati sono i *letti percolatori* e i *biodischi*, mentre per quanto riguarda i processi a biomassa sospesa abbiamo il trattamento a *fanghi attivi*.

2.2.2 Fanghi attivi

Il sistema a fanghi permette di ossidare, in condizioni di aerobiosi, le sostanze organiche biologicamente degradabili (sia solubili che colloidali) presenti in acque inquinate, utilizzando la flora microbica mantenuta in sospensione mediante un'opportuna agitazione (Vismara, 1998). La flora microbica aerobica esistente nelle acque di scarico contenenti inquinanti organici biodegradabili, se sottoposta ad agitazione e ad opportuna ossigenazione aggredisce i solidi disciolti e colloidali, formando ammassi di natura fioccosa che, in condizioni di quiete, possono essere estratti per semplice decantazione, mentre l'effluente così depurato può essere smaltito dopo essere stato sottoposto ad eventuali ulteriori trattamenti (trattamenti terziari). I fiocchi di fango attivo sono aggregati gelatinosi della grandezza di qualche millimetro, costituiti da numerosissimi organismi e da particelle organiche ed inorganiche, frequentemente allo stato colloidale (Baggi et al., 1998; Seviour & Nilsen, 2010). Per attuare la depurazione biologica a fanghi attivi è necessario che il substrato sia costituito da un'alta quantità di materiale organico e sia biodegradabile in tempi sufficientemente brevi. Un tipico

impianto a fanghi attivi deve prevedere a monte del trattamento biologico, tutta una serie di operazioni al fine di eliminare i materiali grossolani e ridurre le sostanze eventualmente tossiche. I reflui così trattati passano in una vasca di aerazione dove vengono mantenuti, in ambiente aerobico, a contatto con la popolazione batterica. Successivamente i fiocchi di fango vengono fatti precipitare in una vasca di sedimentazione. Dopo la separazione fra refluo depurato e fango, gran parte di quest'ultimo deve essere ricircolato per sfruttare la sua attività biologica sul refluo in arrivo nella vasca di aerazione: soltanto il fango in eccesso (fango di supero) viene periodicamente scaricato, per evitare un'eccessiva concentrazione nella vasca di aerazione, ed avviato allo smaltimento (Masotti, 1993). Molti sono i fattori che influenzano il rendimento degli impianti a fanghi attivi:

- *Temperatura, pH, presenza di sostanze tossiche*: influiscono sull'attività dei microrganismi deputati alla depurazione. In particolare il processo di nitrificazione presenta velocità ottimali con un pH tra 7,5-8 e temperature superiori ai 15°C (Antoniou et al., 1990). I fanghi attivi hanno comunque una buona capacità di tamponare brevi flussi di pH estremamente acidi o basici senza che il valore di pH nelle vasche vari di molto (Eusebio, 2004).
- *Sostanze nutritive*: sono indispensabili per la riproduzione batterica e devono essere presenti in opportuni rapporti. Una carenza di elementi nutritivi (fosforo e azoto), un eccesso di materiali carboniosi (specie zuccheri), una scarsa concentrazione di ossigeno disciolto possono provocare la comparsa di abnormi concentrazioni di batteri filamentosi che formano colonie filamentose: si hanno così fiocchi filamentosi, rigonfi di acqua, di basso peso specifico, che non sedimentano facilmente (bulking) (Jenkins et al., 2004)
- *Fattore di carico (F/M)*: misura la disponibilità delle sostanze nutritive per la flora batterica ed è dato dal rapporto fra la quantità di sostanza organica biodegradabile, convogliata nel sistema e messa a disposizione della massa di microrganismi presenti, e il tempo in cui rimane a contatto con i microrganismi stessi; cioè il tempo medio di permanenza nella vasca di aerazione, espresso come $\text{KgBOD}_5 \text{ KgMLVS}^{-1} \text{ g}^{-1}$, dove MLVS (solidi sospesi volatili) rappresenta una frazione di tutti i solidi sospesi (SS) presenti nella miscela areata, cioè il peso dei microrganismi contenuti nella vasca di aerazione. In base al fattore di carico si possono suddividere gli impianti in: basso carico (0,2-0,3), medio carico (0,3-0,5) ed alto carico (0,5->0,8). Le maggiori performance di

rimozione sul BOD si ottengono con impianti a basso carico (Sigmund, 2005). L'utilizzo di impianti ad alto carico trova impiego per contenere gravi casi di bulking filamentoso, in quanto una bassa età del fango inibisce la crescita di batteri filamentosi (Eikelboom, 2000).

- *Aerazione*: deve fornire l'ossigeno necessario ai processi ossidativi, fornisce la miscelazione ed un buon contatto tra l'effluente e la microflora batterica, impedisce la sedimentazione del fango. Il quantitativo minimo di ossigeno disciolto per garantire il corretto funzionamento dell'impianto deve essere almeno di 1,5-2 mg l⁻¹ per la rimozione del substrato carbonioso, e 4 mg l⁻¹ per la rimozione della frazione azotata (Metcalf & Eddy, 2003). Da studi condotti su impianti pilota a fanghi attivi (Carta-Escobar et al., 2004; Sirianuntapiboon et al., 2005) su questa tipologia di refluo si sono trovati eccellenti valori di abbattimento sulla frazione organica.

2.2.3 Letti percolatori

I letti percolatori (Fig.2.2) si basano sullo stesso principio dei fanghi attivi ma in questo caso la flora aerobica si sviluppa su di un supporto solido lambito dal refluo. Facendo percolare il refluo attraverso uno strato di materiale inerte dell'altezza di qualche metro si ha un notevole sviluppo di microrganismi aerobi che formano una pellicola gelatinosa attiva (membrana biologica) attorno ai vari elementi filtranti; l'ossigeno occorrente viene fornito dall'aria che circola negli spazi vuoti del letto stesso (Sigmund, 2005). Le sostanze organiche, disciolte o in sospensione, sono adsorbite su questa membrana biologica attiva e sono sottoposte, da parte dei microrganismi che le utilizzano per i processi di accrescimento e di moltiplicazione, a processi di demolizione biochimica, con formazione di nuove cellule batteriche, anidride carbonica, acqua. Per potere essere ammessi ai filtri percolatori i reflui debbono essere innanzitutto sottoposti ai trattamenti preliminari di grigliatura e dissabbiatura, in quanto l'apporto di materiale inerte rischierebbe di intasare il letto e per il fatto che in questi impianti il fango di supero è normalmente sottoposto a stabilizzazione anaerobica che avviene in vasche chiuse, nelle quali la sabbia creerebbe notevoli inconvenienti, oltre ad essere complicata da estrarre. Rispetto ai fanghi attivi i letti percolatori hanno lo svantaggio di avere una maggiore ingombro, un elevato costo di installazione, l'esalazione di odori molesti e una minore efficienza depurativa; a favore incidono un basso costo di esercizio per la minore energia consumata e la possibilità di essere efficienti anche ad una distribuzione discontinua degli scarichi da trattare (Metcalf & Eddy, 2003). Uno studio condotto sull'utilizzo dei letti

percolatori per il trattamento di reflui caseari ha dimostrato una discreta rimozione del carico in fosfati utilizzando questa tecnologia (Audic & Faup, 1987). Il letto percolatore rimuoveva infatti il 75% dei fosfati in ingresso.

2.2.4 Dischi biologici

Sono uno sviluppo dei letti percolatori, in cui il supporto non è statico ed è costituito da una serie di dischi, generalmente di materiale plastico o polistirolo espanso, che ruotano a bassa velocità immergendosi nel refluo ed emergendone continuamente, l'impianto è generalmente costituito a più stadi ed è adatto per carichi organici elevati (Fig. 2.3). Dopo un certo tempo di esercizio si forma sulla superficie dei dischi una membrana biologica, dello spessore di 1-3 mm, del tutto analoga a quella che aderisce al materiale di supporto dei letti percolatori, che alternativamente, durante il moto di rotazione, si carica di ossigeno nella fase di esposizione all'aria per poi immergersi ed adsorbire e metabolizzare le sostanze organiche disciolte e colloidali presenti nei reflui. La pellicola biologica continua a svilupparsi finché non ha raggiunto spessori massimi dell'ordine di 2-5 mm, quindi si distacca autonomamente dalla superficie del disco, facilitata dall'azione di "taglio" indotta dalla resistenza all'avanzamento del disco stesso nella miscela liquida. La miscela liquida in cui si immergono i dischi viene mantenuta in agitazione dallo stesso movimento dei dischi e viene così impedita la sedimentazione dei solidi sospesi; nel contempo, la miscelazione consente la distribuzione dell'ossigeno "accumulato" dai dischi nella fase di emersione in tutta la massa liquida della vasca. Il trattamento viene, realizzato in più stadi successivi, costituiti da singoli gruppi di dischi in parallelo disposti ciascuno in una porzione separata, tramite un setto, dalla porzione successiva, con un'impostazione che precede più reattori successivi, ciascuno con un funzionamento a miscelazione completa più elevato quanto più alto è il numero di stadi (Metcalf & Eddy, 2003). Sono un miglioramento rispetto ai letti percolatori in quanto:

- si richiedono dislivelli minimi, circa 30 cm, per il trattamento nella fase ossidativa, mentre per i letti percolatori i carichi idraulici sono notevoli;
- la fase ossidativa avviene in ambiente chiuso per cui i problemi legati a cattivi odori, insetti e basse temperature invernali sono superati;
- con la semplice variazione della velocità di rotazione dei dischi si possono modificare le caratteristiche operative dell'impianto e quindi si può realizzare una regolazione migliore rispetto ai letti percolatori;
- nel caso di arrivo all'impianto di scarichi tossici si ha nella maggioranza dei casi un danneggiamento solo superficiale della membrana biologica, con un distacco parziale,

e comunque non si hanno gli intasamenti che tendono invece a verificarsi nei letti percolatori.

Uno studio condotto per valutare l'utilizzo di questa tecnologia nel trattamento dei reflui caseari ha fatto registrare un abbattimento complessivo per quanto riguarda il COD pari al 67,4 %, a fronte di un ingresso medio di 460 mgCOD l^{-1} (Surampalli et al., 1992).

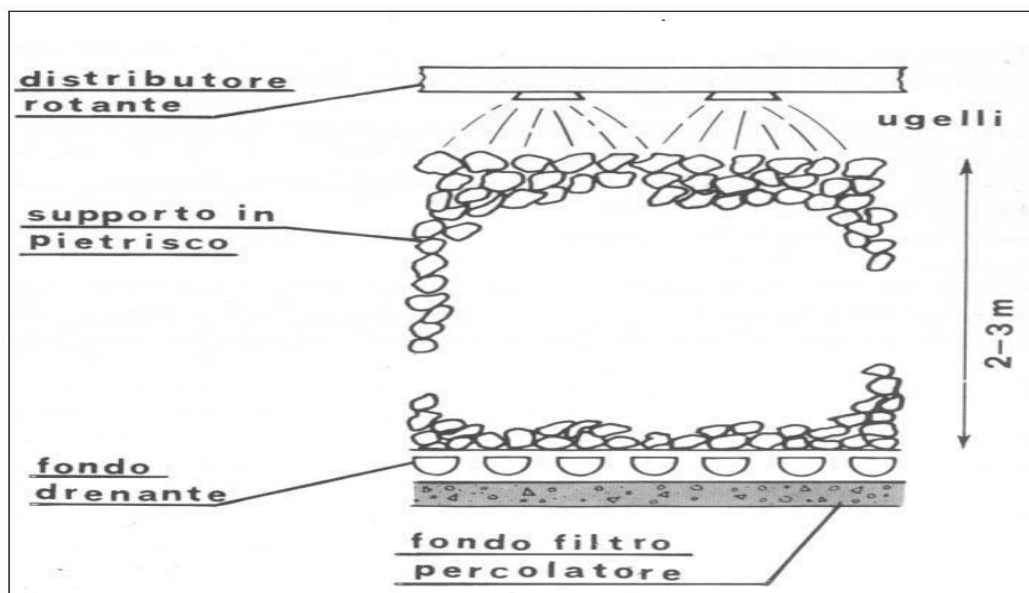


Fig. 2.1: Schema di un letto percolatore

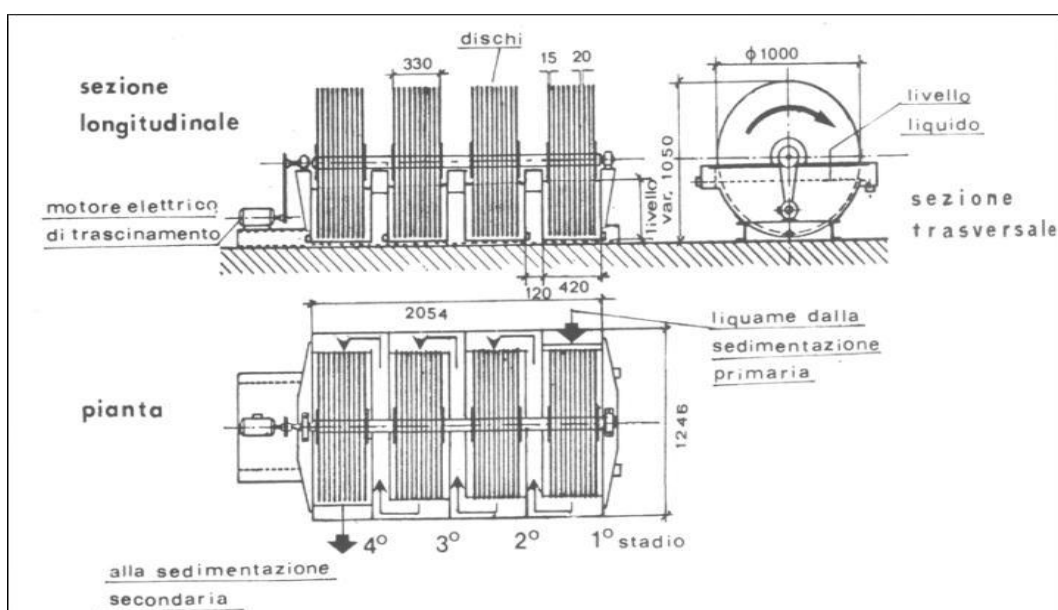


Fig.2.2: Schema di un impianto a biodischi

2.2.5 Reattore Batch in sequenza (SBR)

Il reattore batch si basa sullo stesso principio del processo a fanghi attivi. La differenza fondamentale è che nei depuratori classici a fanghi attivi i processi di ossidazione e sedimentazione avvengono in due compartimenti separati, mentre nel reattore batch le operazioni avvengono nello stesso compartimento. Le ricerche sul reattore batch in sequenza cominciarono nel 1970, insieme allo sviluppo di altri processi discontinui (Mace & Mata-Alvarez, 2002). Questa tecnologia è divenuta molto popolare per i seguenti vantaggi; un costo minore rispetto ai processi con fanghi attivi, meno spazio richiesto, possibilità di trattamento con larghe oscillazioni nel carico idraulico e organico, facilità di manutenzione, controllo più semplice della crescita della biomassa filamentosa, le regolazioni non ottimali possono essere più facilmente individuate e corrette ed inoltre la biomassa non subisce fenomeni di wash out. Tutti i sistemi SBR hanno in comune i seguenti passaggi: aerazione, sedimentazione/chiarificazione e decantazione. I passaggi che avvengono consistono in aerazione ed agitazione continue del refluo e successiva decantazione della miscela areata. Dopo che il fango ha sedimentato, l'acqua chiarificata viene pompata via e sostituita con nuovo refluo (Wilderer et al., 2001). Una peculiarità dei reattori SBR è data dal fatto che non è necessario provvedere al ricircolo del fango attivo. Infatti, dal momento che le fasi di aerazione e di sedimentazione hanno luogo nella stessa vasca, non è necessario effettuare il ricircolo al fine di assicurare il mantenimento di una quantità sufficiente di solidi nella fase di reazione. Questa tecnologia presenta tuttavia alcuni svantaggi come rischi di sversamenti di refluo o fango durante la fase di pompaggio o decantazione e la richiesta di equalizzazione della portata alla fine del processo. Uno studio effettuato utilizzando un impianto SBR con fango granulare per il trattamento di reflui caseari ha evidenziato valori di abbattimento del 90% di COD, 80% di Azoto Totale e 67% di Fosforo Totale mediante uno scambio volumetrico del 50% ed una durata del ciclo di 8 ore. La concentrazione di COD nell'effluente presentava un valore medio di circa 125 mg l⁻¹ (Schwarzenbeck et al., 2005). Un altro studio riguardante l'utilizzo di 2 reattori SBR posti in serie ha evidenziato come rispetto all'utilizzo di un singolo stadio Batch, i reattori SBR sequenziali migliorano l'abbattimento dell'ione ammonio (Li & Zhang, 2002).

2.2.6 *Lagunaggio (o stagni biologici)*

In generale le lagune possono essere di due tipi:

- lagune aerate;
- lagune non aerate.

Le prime, a causa dei bassi valori di solidi sospesi totali e della conseguente bassa attività biologica per unità di volume, hanno bisogno di energia per ottenere una sufficiente miscelazione dei liquami. Tale consumo energetico spesso prevale su quello necessario al trasferimento dell'ossigeno per i processi biologici. Nelle seconde, la biodegradazione può avvenire sia aerobicamente tramite l'ossigeno atmosferico trasferito dalla superficie aria-acqua e/o tramite quello prodotto dalla fotosintesi algale, che attraverso processi anaerobici. Inoltre, in ragione delle varie condizioni che si possono instaurare all'interno delle lagune non aerate, queste possono essere suddivise in tre gruppi:

- aerobiche;
- aerobiche-anaerobiche o facoltative;
- anaerobiche.

Le lagune aerobiche hanno una profondità di circa $0.7 \div 1$ m, tale da permettere la presenza di ossigeno disciolto su tutto il volume della laguna, il liquame deve essere però continuamente miscelato con pompe o agitatori superficiali. Nelle lagune facoltative, profonde $1 \div 2$ m, si possono distinguere tre zone:

- una zona superficiale aerobica dove sono presenti e si sviluppano batteri ed alghe;
- una zona anaerobica nei pressi del fondo dove i batteri anaerobici decompongono i solidi sedimentabili depositati;
- una zona intermedia dove sono presenti i batteri facoltativi, ossia batteri in grado di adattarsi a condizioni sia aerobiche che anaerobiche.

Le lagune anaerobiche sono profonde $2 \div 5$ m e vengono utilizzate per trattare reflui con carichi organici elevato. In ambienti di questo tipo, data la notevole torbidità dell'acqua, sia l'ossigeno che la luce si estinguono rapidamente con la profondità per cui si sviluppano solo fermentazioni anaerobiche (Metcalf & Eddy, 2003). In questi stagni non c'è produzione algale, sia per la scarsa trasparenza sia per la consistente crosta superficiale che si forma progressivamente con l'affioramento delle bolle di gas. In uno studio condotto in Nuova Zelanda i reflui caseari sono stati trattati mediante lagunaggio (26000 m^3). Il refluo presentava

un carico di 40000 KgCOD g⁻¹ ed un pH 6,2-7,2, il tempo ritenzione adottato era pari a 1-2 giorni. Il carico organico misurato nell'effluente era risultato pari a 1,5 kgCOD g⁻¹. L'effluente veniva poi successivamente trattato attraverso un ulteriore stadio di lagunaggio pari a 18000 m³. L'efficienza totale del processo era del 99% sul COD.

2.2.7 Fitodepurazione

La fitodepurazione è un processo per depurare le acque reflue civili, che utilizza le piante come filtri biologici in grado di ridurre le sostanze inquinanti in esse presenti. Tale processo viene realizzato coltivando piante acquatiche sulle acque di scarico. I trattamenti di fitodepurazione sono quindi trattamenti di tipo biologico che sfruttano la capacità di autodepurazione degli ambienti acquatici, stagni e paludi, in cui si sviluppano particolari tipi di piante, come la canna palustre, che favoriscono la crescita dei microrganismi preposti alla depurazione. Nei sistemi di fitodepurazione si ricostruiscono artificialmente gli habitat naturali in cui si sviluppano le piante idonee alla depurazione delle acque reflue. Sistemi con macrofite emergenti a flusso superficiale sono utilizzati in Europa da oltre 30 anni. I sistemi di fitodepurazione si suddividono, a seconda del cammino idraulico delle acque reflue, in:

- sistemi a flusso superficiale o libero (FWS - Free Water Surface);
- sistemi a flusso sub-superficiale o sommerso (SFS: Subsurface Flow Sistem) a sua volta suddivisi in:
 - a) sistemi a flusso sommerso orizzontale (SFS-h o HF: Subsurface Flow System - horizontal);
 - b) sistema a flusso sommerso verticale (SFS-v o VF: Subsurface Flow System - vertical).

I sistemi FWS consistono in vasche o canali dove la superficie dell'acqua è esposta all'atmosfera ed il suolo, costantemente sommerso, costituisce il supporto per le radici delle piante emergenti; il flusso è orizzontale e l'altezza delle vasche generalmente limitata a poche decine di centimetri. In questi sistemi i meccanismi di abbattimento riproducono esattamente tutti i fattori in gioco nel potere autodepurativo delle zone umide. I bacini o canali in cui vengono realizzati tali sistemi sono opportunamente impermeabilizzati mediante materiale sintetico o idoneo materiale inerte, in cui viene immesso il terreno di crescita per la vegetazione.

Le essenze comunemente utilizzate appartengono alle specie:

- *Phragmites*;

- *Typha*;

- *Scirpus*.

Il livello del refluo da depurare viene mantenuto a un'altezza pari a circa 30-60 cm. La velocità di scorrimento all'interno delle vasche è bassa al fine di assicurare un adeguato tempo di ritenzione, che dovrebbe essere mantenuto tra un minimo di 7 e un massimo di 14 giorni (Wang et al., 2010). Le vasche sono caratterizzate da un elevato rapporto lunghezza/larghezza (superiore a 10) allo scopo di ottenere una condizione plug-flow e minimizzare i rischi di corto circuito nei reflui da trattare. La depurazione si attua grazie al lungo tempo di contatto tra acqua, piante e medium (lettiera). Questi ultimi assicurano un substrato di crescita per la flora microbica adesa, principale responsabile della depurazione. I dati disponibili sull'applicazione di questi impianti in Europa sono abbastanza scarsi e riguardano prevalentemente gli impianti più grandi, mentre ben poco risulta in letteratura sulle applicazioni in piccola scala (come il trattamento dei reflui domestici per case isolate o piccole comunità) che sono invece abbastanza diffuse in alcuni paesi (Francia, Paesi Bassi, etc.). I sistemi di fitodepurazione SFS-h o HF (flusso sommerso orizzontale) sono stati sviluppati per la prima volta nella Germania Occidentale nel 1970 dal Max Planck Institute e successivamente adottati in altri paesi europei e negli Stati Uniti. Questi sistemi sono costituiti da vasche contenenti materiale inerte con granulometria prescelta al fine di assicurare una adeguata conducibilità idraulica. I letti sono scavati per una profondità pari a circa 70-80 cm. Il fondo delle vasche deve essere opportunamente impermeabilizzato, al fine di evitare indesiderate percolazioni nel sottosuolo, facendo uso di uno strato di argilla, possibilmente reperibile in loco, in idonee condizioni idrogeologiche, o, come più comunemente accade, di membrane sintetiche (HDPE o LDPE 2mm di spessore). Come mezzi di riempimento possono essere utilizzati principalmente due tipi di substrati: materiale inerte (sabbia, ghiaia, pietrisco) e terreno vegetale. Generalmente, viene preferito il materiale inerte tipo pietrisco calcareo, in quanto comporta minori problemi idraulici per il sistema poiché, essendo caratterizzato da una conducibilità idraulica più elevata (superiore a 0.001 m s^{-1}), riduce il pericolo di intasamento del letto provocato dai solidi sospesi. Ancora oggi, tuttavia, non esiste certezza su quale sia il materiale più adatto per la composizione del letto, per quanto riguarda sia la composizione, sia per la granulometria. I mezzi di riempimento costituiscono il supporto su cui si sviluppano le radici delle piante emergenti. L'essenza più comunemente utilizzata è la *Phragmites*, ma possono essere impiegate anche le altre elofite citate precedentemente (*Scirpus*, *Typha*, *Iris*).

Durante il passaggio dei reflui attraverso la rizosfera delle macrofite, la materia organica viene decomposta dall'azione microbica, l'azoto viene denitrificato, se in presenza di sufficiente contenuto organico, il fosforo e i metalli pesanti vengono fissati per adsorbimento sul materiale di riempimento (Sigmund, 2005). I contributi della vegetazione al processo depurativo possono essere ricondotti sia allo sviluppo di una efficiente popolazione microbica aerobica (Ottova et al., 1997) nella rizosfera sia all'azione di pompaggio di ossigeno atmosferico dalla parte emersa all'apparato radicale e quindi alla porzione di suolo circostante, con conseguente migliore ossidazione del refluo e creazione di una alternanza di zone aerobiche, anossiche ed anaerobiche con conseguente sviluppo di diverse famiglie di microrganismi specializzati e scomparsa pressoché totale dei patogeni, particolarmente sensibili ai rapidi cambiamenti nel tenore di ossigeno disciolto. Da uno studio condotto su due caseifici sul trattamento dei reflui mediante questa tecnologia i risultati sono stati un abbattimento del 97% del COD e del 62 % per il TKN a fronte di un ingresso di $10,5 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1}$ per il primo caseificio, ed anche nel secondo caseificio con una portata in ingresso pari a $70 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1}$ si registravano valori di abbattimento simili (Mantovi et al., 2006). Un' altro studio effettuato in Australia su un impianto con due lettiere di fitodepurazione per il trattamento di reflui caseari ha mostrato un abbattimento, per quanto riguarda il BOD_5 , pari al 61%, mentre percentuali più basse sono state misurate per quanto riguarda lo ione ammonio (26%) ed il fosforo (28%) (Geary & Moore, 1999).

CAPITOLO III

INTRODUZIONE: IL MICROBIOTA DEL FANGO ATTIVO

Il processo di depurazione biologica delle acque reflue avviene ad opera di comunità microbiche che utilizzano le sostanze in esse contenute per le proprie esigenze metaboliche.

Durante la loro esistenza danno origine a nuovi organismi (biomassa che costituisce il “fango attivo dell’impianto”) e prodotti del catabolismo: acqua ed anidride carbonica per i processi aerobici, metano ed anidride carbonica per i processi anaerobici. Il processo di biodegradazione biologica è svolto prevalentemente da batteri che possono utilizzare un’ampia gamma di substrati ed hanno un tempo di duplicazione molto ridotto, sebbene protozoi e metazoi possano contribuire a determinare la qualità del processo. La natura delle popolazioni microbiche coinvolte nell’azione biodegradante varia a seconda della tipologia del processo: aerobico oppure anaerobico. Nel processo aerobico operano prevalentemente batteri aerobi ed anaerobi facoltativi, mentre nel processo anaerobico batteri anaerobi facoltativi ed anaerobi obbligati. Nel caso di impianti di depurazione delle acque reflue a più stadi che prevedono la rimozione di nutrienti inorganici convivono oltre ai batteri aerobi anche i facoltativi che hanno la possibilità di respirare in condizioni anaerobiche: sono i batteri denitrificanti che in condizioni anossiche riducono i nitrati ad azoto gassoso. Recentemente si sono individuati altri gruppi di batteri che esibiscono un particolare metabolismo legato all’alternanza di condizioni aerobiche ed anaerobiche. L’attività dei batteri dipende da molti fattori: dal tipo di metabolismo, dalla disponibilità e natura del substrato carbonioso e dalle condizioni fisiche (pH, temperatura, ossigeno disciolto, modalità di agitazione, configurazione impiantistica). I batteri si aggregano in strutture a forma di fiocco costituite dai batteri stessi e da sostanze organiche ed inorganiche, e quindi anche la resistenza di tali strutture incide sulla loro attività. Inoltre vanno considerati fattori come la predazione, il commensalismo e la competizione alimentare.

3.1. Processi di rimozione della sostanza organica da parte del fango attivo

L’acqua reflua civile, ed anche molte acque industriali rappresentano una miscela di sostanze organiche in varie forme. La rimozione dell’inquinamento organico quindi non può essere fatto attraverso un processo ad un unico stadio. In realtà esso è costituito da una sequenza di processi fisici, chimici e biochimici. Quando il fango attivo viene miscelato con l’acqua reflua avviene un processo molto rapido di rimozione di una parte della sostanza organica. Questo processo avviene principalmente a scapito del substrato organico biodegradabile particellato presente nell’acqua reflua. Il trasferimento del substrato particellato dal volume liquido ai fiocchi di fango avviene con i seguenti passaggi:

- inglobamento delle particelle nella struttura del fiocco di fango;
- intrappolamento ed adsorbimento del materiale colloidale;
- adsorbimento dei composti solubili ad alto peso molecolare.

In letteratura l'insieme dei processi di rimozione rapida della sostanza organica fino qui descritti viene chiamato: bioflocculazione. La bioflocculazione dipende dalla particolare composizione microbica del fango attivo, il grado di rimozione della sostanza organica è maggiore per fanghi attivi che hanno buone proprietà di sedimentazione (Seviour & Nielsen, 2010). L'accumulo dei composti organici con molecole piccole (substrato velocemente biodegradabile) avviene contemporaneamente a tale processo. L'accumulo nelle cellule batteriche è estremamente veloce cosicché i composti accumulati non sono metabolizzati simultaneamente e rimangono per un certo periodo all'interno delle cellule. La capacità di accumulo è limitata dalla quantità di energia che le cellule possono spendere per tenere i composti accumulati nelle zone di accumulo con un'elevata pressione osmotica. L'accumulo avviene solamente in presenza di una elevata concentrazione esterna di substrato velocemente biodegradabile.

3.1.1. Idrolisi del substrato da parte del fango attivo

La maggior parte della sostanza organica trattenuta dal fango attivo immediatamente dopo il contatto con l'acqua reflua (bioflocculazione) non è in forma immediatamente disponibile al metabolismo intracellulare (Li & Yang, 2007). Le molecole organiche adsorbite sono troppo grandi per poter penetrare la membrana cellulare. Dal punto di vista chimico questo substrato che rimane flocculato sui fiocchi di fango è costituito da polimeri organici. Polisaccaridi, lipidi e proteine sono la maggior parte dei composti organici ad alto peso molecolare nell'acqua reflua. Questi prima del trasporto attraverso la membrana cellulare devono essere degradati in strutture con solo pochi monomeri o direttamente a monomeri (Dignac et al., 2000) (Fig. 3.1). In biochimica questo processo viene chiamato idrolisi e viene effettuato da enzimi specializzati chiamati idrolasi. I polisaccaridi che vengono utilizzati sia come fonte energetica che di carbonio sono depolimerizzati enzimaticamente in due stadi:

- da polisaccaridi ad oligosaccaridi;
- da oligosaccaridi a semplici monosaccaridi come, ad esempio, glucosio e fruttosio.

I grassi sono polimeri organici composti da glicerolo e lunghe catene di acidi grassi. I grassi sono una importante fonte energetica (substrato) per tutti gli organismi viventi per il loro contenuto energetico specifico molto elevato. In più i grassi apportano al metabolismo indispensabili acidi grassi e composti lipofilici. Prima che i lipidi possano essere utilizzati

come fonte energetica essi vengono idrolizzati da enzimi chiamati lipasi. Le molecole polimeriche dei lipidi vengono spezzate in glicerolo e lunghe catene di acidi grassi. In questo processo le molecole di acidi grassi vengono accorciate ciclicamente in 2 frammenti che entrano nel ciclo di Krebs. Si possono presentare alcune barriere metaboliche per gli acidi grassi non saturi (acido oleico) poiché gli enzimi che risultano dalla loro degradazione non possono entrare direttamente nel ciclo di Krebs. Il ruolo principale delle proteine nel metabolismo degli organismi organotrofici è di fornire la materia prima per la sintesi della nuova biomassa, mentre il ruolo energetico non è così importante come quello dei carboidrati e lipidi. Quindi le proteine si possono considerare più come fonte di carbonio e azoto che come fonte energetica (substrato), infatti circa il 90% degli aminoacidi rilasciati dai polimeri proteici vengono usati per la sintesi della nuova biomassa. L'idrolisi delle proteine viene fatta da enzimi specifici detti proteasi o peptidasi o enzimi proteolitici.

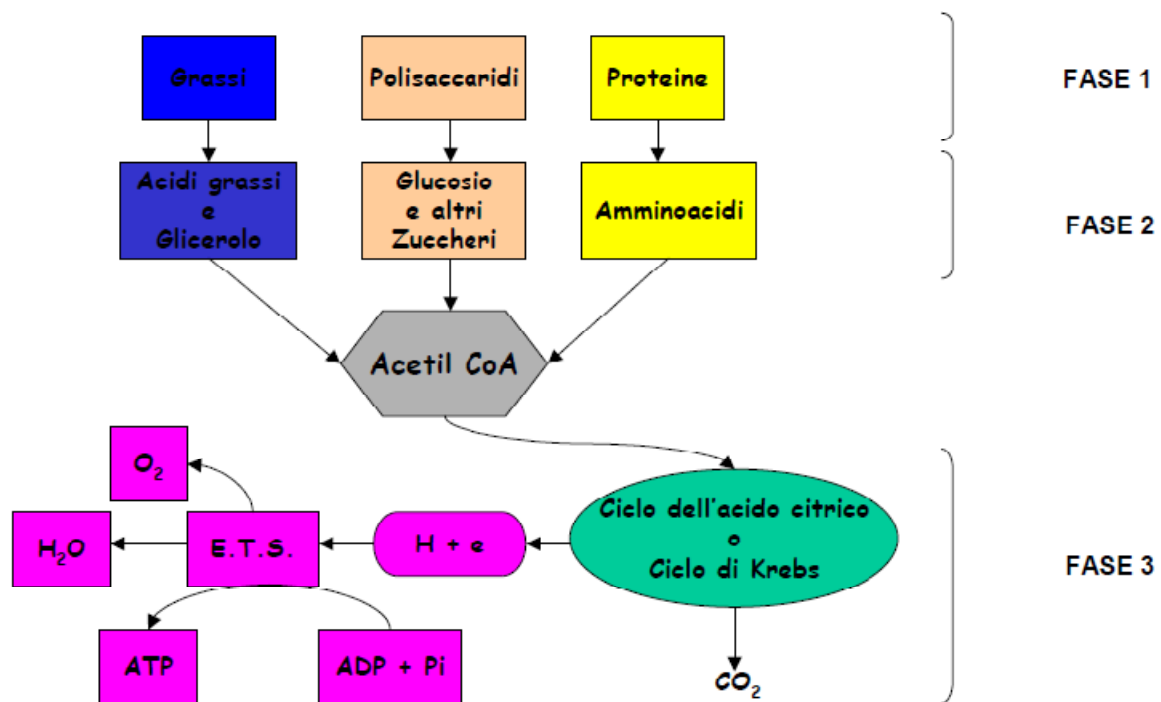


Fig. 3.1: Diagramma schematico del catabolismo

3.1.2. Metabolismo intracellulare dei composti carboniosi

Dopo l'idrolisi extracellulare dei polimeri organici, i frammenti dei polimeri e delle singole molecole vengono trasferite alle cellule dove vengono metabolizzate dall'apparato enzimatico interno. Il metabolismo consiste in due processi simultanei:

- catabolismo: insieme dei processi distruttivi che consiste nella scissione chimica di molecole complesse in molecole più semplici con liberazione di energia;
- anabolismo: sintesi di nuova biomassa.

Il catabolismo si può dividere in tre fasi: nella prima fase vengono terminati i processi di rottura delle molecole complesse in composti semplici a basso peso molecolare (monomeri). Nella seconda fase i numerosi prodotti dell'idrolisi cellulare vengono trasformati in pochi composti che poi entreranno nella terza fase di produzione di energia. La terza fase del metabolismo aerobico dei composti carboniosi consiste nell'ottenere ATP mediante il ciclo di Krebs. L'ATP creato durante la fase catabolica viene poi utilizzato dalla cellula nella fase di anabolismo per la sintesi di composti chimici che servono per crescere e replicarsi.

3.2. Microbiologia del fango attivo

Per fango attivo si intende un ecosistema artificiale condizionato continuamente da fattori biotici e non biotici. Questo perché il fango attivo è una coltura di microrganismi dove le basse concentrazioni di substrato organico e di elementi nutrienti inorganici sono fattori limitanti. La competizione alimentare tra i microrganismi rende questo ecosistema non costante ma riflette tutti i fattori a cui esso è sottoposto. Un'altra caratteristica del fango attivo è che le singole cellule microbiche non sono separate ma crescono in aggregati denominati fiocchi. Tali aggregati esibiscono dal punto di vista tecnologico una accettabile velocità di sedimentazione, considerando la sedimentazione per gravità l'unica forma economica di separazione della biomassa negli impianti di trattamento delle acque reflue. I microrganismi che si legano in fiocchi presentano due importanti vantaggi selettivi rispetto alle cellule che crescono liberamente:

- i microrganismi nei fiocchi vengono trattenuti nel sistema fango attivo, mentre le cellule disperse ne vengono allontanate;
- la crescita in fiocchi protegge la maggior parte delle cellule dai predatori.

I microrganismi presenti nel fango attivo dal punto di vista microbiologico si possono classificare in due gruppi principali:

- i decompositori che sono responsabili della degradazione biochimica delle sostanze inquinanti nell'acqua reflua. Questo gruppo è rappresentato da batteri, funghi ed alghe;
- i consumatori che utilizzano come substrato batteri ed altre cellule microbiche: sono un gruppo che appartiene alla microfauna del fango attivo costituito da protozoi e metazoi.

Tra decompositori e consumatori si viene a creare una rete trofica che prevede il consumo di substrato biodegradabile da parte di batteri dispersi e flocculanti. A loro volta i batteri subiscono la predazione da parte di ciliati filtratori e flagellati. In cima alla catena alimentare sono presenti i ciliati carnivori che si nutrono di ciliati filtratori e flagellati (Madoni, 2003) (Fig. 3.2).

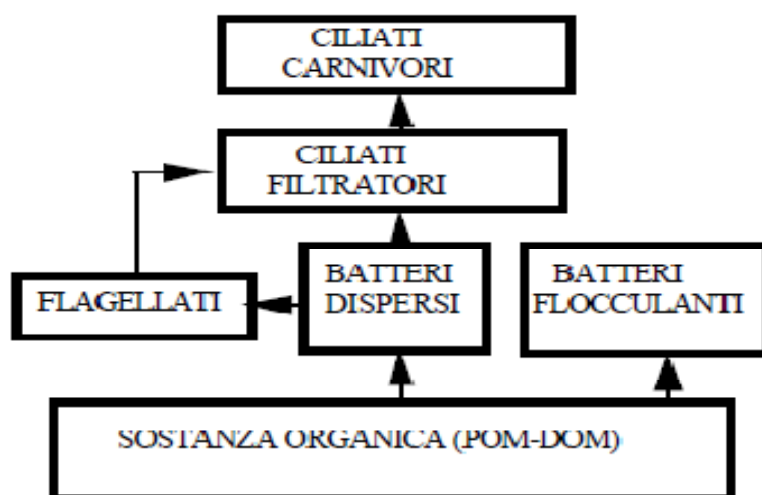


Fig. 3.2: Rete trofica nei fanghi attivi. Le frecce indicano il flusso di materia ed energia

3.2.1. Formazione dei fiocchi

La capacità di formare fiocchi di fango è una delle caratteristiche più importanti su cui si basa la tecnologia dei processi a fanghi attivi. La formazione del fiocco di fango avviene attraverso due processi:

- flocculazione delle cellule batteriche (fioccoformatori) attraverso la quale si formano piccoli aggregati che inglobano anche particelle inorganiche (microstruttura). La flocculazione è resa possibile dalla produzione da parte dei batteri di uno specifico materiale extracellulare viscoso, che funziona in modo analogo ad un polielettrolita sintetico;

- formazione di uno scheletro filamentoso attraverso il quale i fiocchi possono aumentare di dimensione e la resistenza alle sollecitazioni meccaniche (macrostruttura). La forma del fiocco tende a seguire la forma del filamento e questo spiega la non sfericità dei fiocchi.

I batteri che formano la microstruttura dei fiocchi di fango sono detti fioccoformatori e sono rappresentati dai seguenti generi: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Citromonas*, *Flavobacterium*, e *Zooglea*. Questi batteri sono in grado di trasformare il substrato organico in uno specifico materiale extracellulare. Questo materiale ha le stesse proprietà di un polimero organico, aumenta la viscosità dell'acqua che aiuta le singole cellule a formare un microambiente necessario all'attività degli enzimi extracellulari. Il polimero viscoso fa sì che le singole cellule si aggregino tra loro, o si attacchino alla superficie dei solidi presenti, oppure si attacchino ad altri grossi aggregati. Il fenomeno della bioflocculazione può essere descritto come un'interazione tra polimeri extracellulari di singole cellule che formano una matrice tridimensionale. Il legame tra le cellule è basato sulla riduzione della carica elettrostatica superficiale: il meccanismo è simile alla flocculazione con polielettroliti sintetici. In questa matrice tridimensionale vengono intrappolate particelle inorganiche oltre che cellule batteriche. Questa è una caratteristica importante della bioflocculazione perché determina il peso dei fiocchi e quindi le sue caratteristiche di sedimentabilità. La concentrazione di biopolimero è minore nei fanghi ad alto carico ($0,8-1 \text{ KgBOD}_5 \text{ KgMLSS}^{-1}$) rispetto ai fanghi a basso carico, dimostrando così che il polimero extracellulare viene prodotto maggiormente durante il metabolismo endogeno. La microstruttura dei fiocchi è piccola (circa $75\mu\text{m}$) di forma sferica e compatta capace di resistere da sola alle condizioni turbolente della vasca aerata. La macrostruttura è costituita da uno scheletro formato dai batteri filamentosi sui quali sono fermamente attaccati i fioccoformatori per mezzo dei loro biopolimeri. La presenza di uno scheletro permette la formazione di fiocchi grandi con buone caratteristiche di sedimentazione. I fiocchi hanno una forma che segue quella dello scheletro della macrostruttura per questo motivo non è sferica ma irregolare (Sanin et al., 2009).

3.2.2. Il Bulking filamentoso

Il fenomeno del bulking filamentoso è dovuto alla presenza di un numero eccessivo di batteri filamentosi nel fango che si protendono al di fuori dei fiocchi dando origine a ponti tra i fiocchi stessi oppure a strutture a maglia larga, leggere con ampi spazi vuoti e forma irregolare che sedimentano con difficoltà. In un certo senso il fango affetto da bulking filamentoso ha una macrostruttura sovrabbondante. Tale disfunzione porta al deterioramento delle caratteristiche di sedimentazione dei fanghi attivi al punto che essi non si separano adeguatamente nelle vasche di sedimentazione secondarie e cominciano a uscire copiosamente con l'effluente trattato. I danni sono immediati e comportano un marcato peggioramento delle caratteristiche dell'effluente sia per il notevole contributo in termini di COD e BOD₅ dovuti ai solidi sospesi, sia per la concomitante perdita di efficacia del depauperamento della biomassa attiva.

Mentre un tempo si riteneva che un solo microrganismo filamentoso, *Sphaerotilus natans*, fosse l'unico responsabile del fenomeno, il lavoro svolto tra il finire degli anni 70' e i primi anni 80' ha evidenziato come il numero di batteri filamentosi all'origine del fenomeno sia decisamente maggiore. Tali batteri sono però generalmente caratterizzati da una scarsa coltivabilità e le sole tecniche microbiologiche (coltura-dipendenti) allora disponibili non hanno permesso di ottenere adeguate informazioni riguardo la loro biodiversità e le loro caratteristiche di crescita (Tandoi et al., 2006).

3.3. I batteri nel fango attivo

I batteri presenti all'interno del fango attivo possono essere suddivisi in base alla loro funzioni metaboliche. Di seguito si riportano in Tab. 3.1 vari tipi di batteri presenti nel fango attivo che svolgono differenti funzioni nella degradazione del substrato suddivisibili in base al tipo di metabolismo, alla fonte di nutrizione, al tipo di accettore di elettroni ed alla forma di crescita.

Tab. 3.1: Microrganismi presenti nei fanghi attivi suddivisi per gruppi metabolici.

Metabolismo	Forma di carbonio richiesta	Fonte energetica	Accettore di elettroni	Forma di crescita
Organotrofi	Organico	Ossidazione aerobica	O ₂	Fiocco formatori; Filamentosi
Anaerobici facoltativi	Organico	Fermentazione	Carbonio organico	Fiocco formatori (?)
Denitrificanti	Organico	Ossidazione anossica	N-NO ₃	Fiocco formatori; Filamentosi (?)
Nitrificanti	Inorganico	Ossidazione aerobica di N-NH ₀	O ₂	Attaccati ad altri batteri
Poli-P	Organico	PP e PHB	O ₂	A gruppi; Filamentosi (?)
Solfoossidatori	Inorganico	Ossidazione aerobica	O ₂	Filamentosi; Fiocco formatori (?)
Solforiduttori	Organico	Ossidazione anaerobica	S-SO ₂	Fiocco formatori (?)

3.3.1. Batteri organotrofi aerobi

I batteri organotrofi aerobi sono responsabili della completa rimozione della sostanza organica dall'acqua reflua. Hanno un apparato enzimatico che li rende capaci di utilizzare anche il substrato organico lentamente biodegradabile. I generi *Baccillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, e *Flavobacterium* vengono descritti come capaci degradare il substrato organico lentamente biodegradabile particellato attraverso il loro sistema enzimatico (Tandoi et al., 2006). Accanto a questi batteri universali si possono concentrare dei batteri specializzati nella rimozione di uno specifico substrato attraverso un opportuno adattamento del fango attivo al determinato tipo di acqua reflua. Le condizioni di coltura rendono possibile il mantenimento dei batteri specializzati che spesso è funzione del tempo di ritenzione della biomassa negli impianti a fanghi attivi. Alcuni batteri specializzati sono: *Proteus*, specializzato nella rimozione del materiale proteico, e *Achromobacter*, specializzato nella rimozione di grassi. I batteri organotrofi sono presenti sia come fioccoformatori che come filamentosi. *Zooglea* (Sanin et al., 2009) è un tipico batterio fioccoformatore, mentre, alcuni organismi filamentosi si possono classificare come *Actinomyces*. Essi esibiscono caratteristiche metaboliche simile a quelle dei funghi: essi sono capaci di utilizzare il substrato lentamente biodegradabile ed i loro filamenti formano miceli. Tipici *Actinomyces* acquatici sono: *Streptomyces*, *Micromonospora* e *Nocardia*.

3.3.2. Batteri fermentativi

Il processo di conversione fermentativo dei composti organici in acidi grassi volatili (specialmente acido acetico) è estremamente importante nel processo di rimozione biologica del fosforo in eccesso (sistemi EPBR). In tal senso la letteratura considera un prerequisito essenziale per il successo del processo la presenza di *Aeromonas punctata* (Brodisch, 1985) e del genere *Pasteurella* (Jorgensen & Pauli, 1995) e *Alcaligenes* (Bao et al., 2007). Gli altri microrganismi fermentativi che producono acidi grassi volatili ed alcoli a basso peso molecolare sono *Acetobacter*, *Clostridium*, micromiceti e batteri solforiduttori. Il processo fermentativo è anaerobico, avviene in assenza di ossigeno molecolare e nitrati, si verifica nelle zone anaerobiche degli impianti in cui è prevista la rimozione biologica del fosforo in eccesso (sistemi EPBR). Negli impianti convenzionali completamente areati che operano a basso carico, la fermentazione è indesiderabile. Negli impianti tipo plug-flow oppure in impianti con una zona di premiscelazione si possono verificare condizioni anaerobiche nel nucleo dei fiocchi di fango a causa della iniziale velocità di rimozione dell'ossigeno dopo il

contatto del fango di ricircolo con il refluo fresco e della resistenza diffusionale nel trasporto dell'ossigeno (nitrati) all'interno del fiocco.

3.3.3. Batteri Denitrificanti

La capacità di utilizzare i nitrati come accettori finali di elettroni è molto diffusa tra i microrganismi dei fanghi attivi. Almeno quaranta specie di microrganismi possono denitrificare. I generi *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella* e *Pseudomonas* includono tipici batteri organotrofi denitrificanti normalmente in un sistema a fanghi attivi (Tandoi et al., 2006).

3.3.4. Batteri Nitrificanti

In ambiente acquatico i seguenti generi sono considerati nitrificanti:

- *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* e *Nitrosocystis* per l'ossidazione dello ione ammonio;
- *Nitrobacter*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* per l'ossidazione finale dei nitriti in nitrati.

Nel processo a fanghi attivi i batteri chemolitotrofi *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* sono considerati i principali nitrificanti. La nitrificazione eterotrofa si può attribuire principalmente ai micromiceti che non sono importanti negli impianti a fanghi attivi.

3.3.5. Microrganismi fosforo accumulanti

La capacità di rimuovere fosfati dalle acque reflue è generalmente attribuita alle specie *Acinetobacter* (Bond et al., 1999) che può accumulare polifosfati sotto forma di granuli. Altri microrganismi che contribuiscono alla rimozione del fosforo appartengono ai generi *Acromonas*, *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Moraxella* e *Pseudomonas*.

3.3.6. Microrganismi solfo-ossidatori

Nei sistemi a fanghi attivi la maggior parte dei composti dello zolfo vengono ossidati da batteri chemolitotrofi, soprattutto dal genere *Thiobacillus* (Fox & Venkatasubbiah, 1996). Si possono considerare solfo-ossidatori anche *Thiobacillus*, il filamentoso *Beggiatoa*, *Thioloa* e specialmente *Thiothrix*.

3.3.7. Batteri Solfo-riduttori

I batteri solforiduttori più rappresentativi nel fango attivo sono il *Desulfovibrio* e il *Desulfobacter*, che differiscono per il metabolismo dei composti organici. Nella letteratura microbiologica i batteri solforiduttori vengono descritti come strettamente anaerobi, ma questo viene in parte contraddetto dalla loro presenza nei sistemi a fanghi attivi dove esiste l'alternanza di zone aerobiche, anaerobiche e anossiche. Questa contraddizione è spiegabile con l'esistenza all'interno dei fiocchi di fango di un nucleo anaerobico che garantisce la sopravvivenza dei batteri solfo riduttori (Schramm et al., 1999).

3.4. I Protozoi

Con il termine Protozoi si indicano degli organismi eucariotici unicellulari che, sulla base a sistematica classica, sono divisi in 4 gruppi principali: *Flagellati*, *Sarcodini*, *Sporozoi*, *Ciliati* (Ricci, 1989). I protozoi, essendo organismi unicellulari, sono generalmente di piccole dimensioni, e la taglia tra 10 e 100 μm può essere considerata una delle dimensioni che di solito si osserva più comunemente. In molti flagellati e nei ciliati il corpo è rivestito da una cuticola resistente, che costituisce la membrana cellulare. Inoltre vi sono degli organelli (organiti) di movimento che sono i flagelli nel caso dei flagellati e le ciglia nel caso dei ciliati. Queste ciglia possono essere presenti durante tutta la vita o sparire nell'adulto (Acineti). I flagelli sono lunghi e mobili prolungamenti protoplasmatici con movimenti paragonabili a quelli di una frusta quando viene agitata; di regola sono uno o pochi sul corpo di ciascun flagellato. Le ciglia sono invece delle corte appendici protoplasmatiche che sporgono come sottili setole sul corpo dei ciliati e che si muovono come tanti piccoli remi. Alcuni protozoi come i sarcodini, presentano il corpo nudo che può emettere e retrarre degli speciali prolungamenti citoplasmatici che servono alla locomozione e che prendono il nome di pseudopodi. I protozoi di regola si riproducono agamicamente per scissione; tuttavia esistono per molti protozoi, soprattutto per i ciliati, fenomeni sessuali. Sono organismi la cui cellula è dotata di uno o più nuclei; tuttavia, mentre nei flagellati e nei sarcodini i nuclei sono di un solo tipo, nei ciliati si osservano macronuclei e micronuclei. I macronuclei hanno notevole importanza nei processi metabolici, mentre i micronuclei sono in rapporto alla riproduzione. La maggior parte dei protozoi svolge attività eterotrofica, predando altri organismi o alimentandosi di sostanze organiche disciolte o particellate; tuttavia, vi sono diversi flagellati (fitoflagellati) nel cui citoplasma si trovano numerosi plastidi che consentono loro di svolgere attività autotrofica. I protozoi eterotrofici si nutrono per osmosi (molti flagellati), per mezzo

di pseudopodi (amebe) o per mezzo di una apertura nella membrana cellulare (ciliati) che consente loro di catturare altri organismi.

3.4.1. I ciliati

I ciliati sono un gruppo di protozoi microconsumatori che colonizzano la maggior parte degli ambienti acquatici e terrestri. Le loro dimensioni, relativamente grandi rispetto agli altri protozoi (mediamente 20-200µm), i loro veloci movimenti, e la loro varietà di forme, li rendono particolarmente evidenti all'osservazione microscopica. Le ciglia di cui sono dotati, sono strutturalmente identiche ai flagelli, ma sono più corte in rapporto alla lunghezza della cellula. Le ciglia possono essere arrangiate in gruppi (cirri) come nei ciliati Ipotrichi, e in tal caso, questi aggregati diventano essenziali per la locomozione. Nei ciliati, generalmente, si distinguono le ciglia disposte lungo il corpo (ciliatura somatica) da quelle situate intorno la bocca (ciliatura orale) che sono usate per la cattura del cibo. I principali gruppi di ciliati (Tab. 3.2) (*Oligohymenophora* e *Polyhymenophora*) utilizzano la ciliatura orale per filtrare l'acqua circostante e trattenerne le particelle sospese (soprattutto batteri dispersi). Per poter fare questo, gli *Oligohymenophora* hanno 3 membranelle intorno alla bocca (non ben distinguibili all'osservazione microscopica), mentre i *Polyhymenophora* hanno la ciliatura orale formata da una serie di membrane (zona adorale di membranelle: AZM) che si estende dalla parte anteriore della cellula sino al punto di ingestione del cibo (citostoma). Il gruppo dei *Kinetofragminophora*, raccoglie, invece, i ciliati in cui la ciliatura somatica e quella orale non sono ben distinguibili. Alcune specie di questo gruppo sono in grado di ingerire grosse particelle di cibo (alghe, filamenti), e vi sono anche molte altre specie predatrici di altri ciliati o di piccoli metazoi. La bocca nei ciliati è assai variabile da gruppo a gruppo sia per quanto riguarda forma e dimensione che la sua collocazione. La bocca dei ciliati che si nutrono di alghe o detrito è generalmente dotata di un tubo di rigidi stecche (nematodesmi) che consente loro di introdurre il cibo dentro la cellula. Alcuni ciliati come i Suttori, non hanno un citostoma vero e proprio. Essi sono dotati però di una serie di lunghi e rigidi tentacoli provvisti di ventosa terminale con cui catturano altri ciliati. Questi ciliati, inoltre, sono prevalentemente sessili e non hanno ciliatura visibile tranne che durante lo stadio mobile 'larvale' in cui la ciliatura è presente per consentire la locomozione (Lynn, 2008).

I ciliati batteriofagi dei fanghi attivi possono essere suddivisi in tre gruppi funzionali sulla base del loro comportamento (Madoni, 2003):

- **natanti:** nuotano nella frazione liquida e rimangono in sospensione nella vasca di sedimentazione;

- **mobili:** abitano la superficie del fiocco di fango;
- **sessili:** sono stabilmente fissati, mediante un peduncolo, al fiocco di fango e quindi precipitano con esso durante la sedimentazione.

Il processo a fanghi attivi si basa sulla formazione di aggregati batterici (fiocchi di fango) su cui altri microrganismi possono svilupparsi. Perciò una popolazione di organismi con la capacità di attaccarsi (o di rimanere strettamente associata) al fango ha un distinto vantaggio su altre popolazioni di organismi che nuotano liberamente nella frazione liquida e che sono quindi soggetti ad essere dilavati fuori dal sistema attraverso l'effluente. Altra importante caratteristica dei ciliati nei fanghi attivi è il loro comportamento alimentare. Mentre ciliati natanti e sessili entrano in competizione per i batteri dispersi nella frazione liquida, i mobili, che sono in stretta prossimità della superficie del fiocco di fango occupano una differente nicchia ecologica nutrendosi di particelle che sono solo lievemente adagiate sul fiocco e che vengono asportate facilmente attraverso le correnti ciliari.

3.4.2. *Ciliati mobili di fondo*

I ciliati mobili di fondo (Fig. 3.3) normalmente dominano la microfauna del fango attivo maturo (Madoni, 2003). I mobili diminuiscono la loro presenza all'aumentare del carico organico, tanto che oltre i $0,6 \text{ kgBOD}_5 \text{ kgMLSS}^{-1}$ per giorno, molte specie di questo gruppo scompaiono (Curds & Cockburn, 1970; Klimowicz, 1970). I ciliati mobili risultano essere inversamente correlati anche allo SVI. Alte densità di questi ciliati ($>2.000 \text{ cell.l}^{-1}$) sono spesso associate a valori di SVI minori di 200; in occasione di valori di SVI più alti di 400, i mobili riducono drasticamente la loro presenza (Pagnotta & Tommasi, 1979).

3.4.3. *Ciliati sessili*

I ciliati peritrichi (Fig. 3.4) sono normalmente codominanti nei fanghi attivi insieme ai ciliati mobili. Tuttavia, in occasione di condizioni transitorie dello impianto che riducono l'efficienza depurativa, questi ciliati possono incrementare repentinamente la loro densità numerica e costituire oltre l' 80% dell'intera microfauna (Drakides, 1978; Madoni, 1981). Tali condizioni transitorie sono 1) il rapido aumento del carico del fango dovuto a perdite o ad estrazioni di fango e 2) il carico organico immesso in modo molto discontinuo. Curds & Cockburn (1970) hanno trovato che i ciliati sessili sono in grado di svilupparsi entro un largo spettro di valori di carico del fango; tuttavia a valori compresi tra $0,3$ e $0,6 \text{ kgBOD kgMLSS}^{-1}$ per giorno, questi ciliati spesso dominano la microfauna e in occasione di carichi del fango di $0,6-0,9$ essi co-dominano insieme ai piccoli flagellati. Altra evidenza è stata segnalata da

Bedogni et al. (1991) i quali suggeriscono che il rapporto di abbondanza tra ciliati mobili e sessili è associato alla efficienza dell'impianto. La migliore qualità dello effluente finale era infatti ottenuta in occasione di valori del rapporto ciliati mobili/sessili superiore a 0,5. Tra i ciliati sessili vi sono alcune specie come *Vorticella microstoma* e *Opercularia spp.*, che possono sopravvivere e crescere in fanghi attivi sottoposti a condizioni ambientali critiche (carenza di aerazione, immissione di sostanze tossiche, ecc.) (Madoni, 1994b; Dubber & Gray, 2011).

3.4.4. Ciliati natanti

I ciliati batteriofagi natanti (Fig. 3.5) sono normalmente molto abbondanti nel liquame e colonizzano la vasca di aerazione durante la fase iniziale di messa in funzione dell'impianto, quando i batteri fiocco formatori sono ancora scarsamente presenti e, conseguentemente, i ciliati sessili sono ancora assenti. Tuttavia, essi sono presto sostituiti dalle forme sessili con le quali entrano in competizione per la predazione dei batteri dispersi nella fase liquida. I ciliati sessili, infatti, sono dei filtratori molto più efficienti dei ciliati natanti nel convogliare i batteri dispersi nella regione orale per mezzo delle correnti ciliari. Curds (1971), simulando la dinamica delle popolazioni microbiche mediante un modello matematico, ha concluso che un impianto a fanghi attivi produce un effluente di alta qualità quando il fango è dominato dalle forme sessili e mobili; quando dominano i ciliati natanti, tuttavia, la qualità dell'effluente è scarsa, e diventa pessima quando i ciliati sono del tutto assenti. Piccoli ciliati natanti (come *Colpidium*, *Cyclidium*, *Tetrahymena*, e *Uronema*) talvolta dominano la microfauna di impianti che operano ad età del fango troppo breve oppure ad alti carichi del fango in carenza di ossigenazione. Questi ciliati batteriofagi richiedono alte concentrazioni di batteri dispersi per sopravvivere ma resistono meglio di altri componenti della microfauna agli affluenti tossici ed alla carenza di ossigenazione. I piccoli ciliati natanti si osservano sempre insieme ai piccoli flagellati e talvolta questi due gruppi dominano la microfauna. Curds & Cockburn (1970) trovarono che i ciliati natanti dominavano ad alti valori del carico del fango (0,6-0,9 kgBOD₅ kg MLSS⁻¹ per giorno).

3.4.5. Amebe con teca

Nei fanghi attivi le amebe con teca (Fig. 3.6) sono presenti normalmente con tre generi: *Arcella*, *Centropyxix* e *Euglypha*. Questi protozoi colonizzano il fango di impianti funzionanti a basso carico del fango, in particolare essi caratterizzano normalmente il fango delle vasche di aerazione di impianti che operano la rimozione dell'azoto (Poole, 1984). Le amebe con teca

sono molto abbondanti o dominanti nei fanghi caratterizzati da basso carico del fango, lunga età del fango e alta concentrazione di ossigeno disciolto in vasca di aerazione, condizioni che permettono di ottenere una completa nitrificazione (Drakides, 1978; Zhou et al., 2008). Al verificarsi di tali condizioni, la qualità dell'effluente è eccellente e la efficienza biologica dell'impianto raggiunge i massimi valori. Sasahara & Ogawa (1983) hanno osservato che *Euglypha* e *Diffflugia* erano sempre molto abbondanti in impianti per il trattamento di reflui da birrerie in occasione di basso carico del fango e buona qualità dell'effluente. In occasione di alto carico del fango ($> 1 \text{ kgBOD}_5 \text{ kgMLSS}^{-1}$ per giorno) e alti valori di COD nell'effluente, queste specie erano sostituite dal ciliato sessile *Opercularia* e da ciliati natanti. Madoni et al. (1993) hanno potuto dimostrare l'esistenza di alti coefficienti di correlazione tra presenza e abbondanza di amebe con teca e alcuni parametri gestionali, ivi compresi quelli caratterizzanti la nitrificazione. Queste specie infatti erano associate a bassi valori di ammoniaca, alte concentrazioni di ossigeno disciolto, basso carico del fango e modesti valori di SVI.

3.4.6. Flagellati

I piccoli flagellati eterotrofici come *Bodo*, *Polytoma*, e *Tetramitus*, normalmente dominano la microfauna durante la fase di avvio dell'impianto quando i batteri fiocco formatori sono ancora scarsamente presenti. Essi si nutrono di batteri dispersi e, nel tempo, sono sostituiti dai ciliati batteriofagi. Al contrario, la massiccia presenza di questi protozoi in un fango maturo, è associata ad una cattiva efficienza biologica dello impianto, dovuta a: (a) fango poco aerato, (b) carico troppo alto, (c) ingresso di sostanze in fermentazione (Drakides, 1978; Madoni, 1986). I flagellati risultano essere i protozoi dominanti (Aescht & Foissner, 1992) o i soli presenti (Curds & Cockburn, 1970) nei fanghi fortemente caricati ($>0,9 \text{ kgBOD}_5 \text{ kgMLSS}^{-1}$ per giorno). I piccoli flagellati entrano continuamente nell'impianto attraverso il liquame in cui essi si trovano in elevate quantità. Normalmente nei fanghi attivi questi protozoi subiscono la competizione da parte dei ciliati batteriofagi, inoltre sono fortemente sottoposti a predazione da parte di altri ciliati; così la loro presenza nei fanghi attivi è limitata a pochi individui (<10 ind. contati lungo la diagonale nella camera di Fuchs-Rosenthal). In caso di disfunzioni dell'impianto, il loro numero può aumentare (>10 ind. contati) e, di conseguenza, ciò indica un abbassamento di efficienza depurativa. La dominanza di flagellati diventa evidente quando essi raggiungono la densità di oltre 100 individui lungo la diagonale della camera di Fuchs-Rosenthal. In quest'ultimo caso essi devono essere considerati come il gruppo dominante della microfauna. I flagellati di taglia più larga come *Euglena* e *Peranema*, si osservano con minor frequenza nei fanghi attivi dove essi raggiungono difficilmente,

inoltre, alte densità di popolazione. La loro presenza è associata a liquami caratterizzati da sostanza organica molto diluita (Madoni, 2003).

Tab 3.2. Quadro sistematico dei protozoi presenti nei fanghi attivi (Madoni, 2003).

Phylum SARCOMASTIGOPHORA		Generi:	<i>Chilodonella</i>
Subphylum 1 MASTIGOPHORA (FLAGELLATI)			<i>Trithigmastoma</i>
			<i>Trochilia</i>
			<i>Drepanomonas</i>
Classe 1 PHYTOMASTIGOPHOREA		S.classe	Suctorina
Generi:		Generi:	<i>Acineta</i>
			<i>Podophrya</i>
			<i>Tokophrya</i>
Classe 2 ZOOMASTIGOPHOREA		Classe	OLIGOHYMENOPHOREA
Generi:		S.classe	Hymenostomatia
		Generi:	<i>Colpidium</i>
			<i>Glaucoma</i>
			<i>Tetrahymena</i>
			<i>Cinetochilum</i>
			<i>Paramecium</i>
			<i>Sathrophilus</i>
			<i>Pseudocohnilembus</i>
			<i>Uronema</i>
			<i>Cyclidium</i>
Subphylum 2 SARCODINA (AMEBE)		S.classe	Peritricha
Superclasse RHIZOPODA		Generi:	<i>Vorticella</i>
Classe LOBOSEA			<i>Carchesium</i>
S.classe Gymnoamoeba (amebe nude)			<i>Zoothamnium</i>
Generi:			<i>Epistylis</i>
			<i>Opercularia</i>
			<i>Vaginicola</i>
			<i>Chaos</i>
			<i>Mayorella</i>
			<i>Vahlkampfia</i>
			<i>Thecamoeba</i>
S.classe Testacea (amebe con teca)		Classe	POLYHYMENOPHOREA
Generi:		Ordine	Heterotrichida
		Generi:	<i>Blepharisma</i>
			<i>Spirostomum</i>
			<i>Stentor</i>
		Ordine	Hypotrichida
		Generi:	<i>Aspidisca</i>
			<i>Euplotes</i>
			<i>Oxytricha</i>
			<i>Stylonychia</i>
Phylum CILIOPHORA			
Classe KINETOFRAGMINOPHOREA			
S.classe Gymnostomatia			
Generi:			
			<i>Prorodon</i>
			<i>Coleps</i>
			<i>Plagiocampa</i>
			<i>Spathidium</i>
			<i>Amphileptus</i>
			<i>Litonotus</i>
			<i>Acinertia</i>
S.classe Hypostomatia			

3.4.7. Ruolo dei protozoi nel processo a fanghi attivi

Il processo a fanghi attivi ha lo scopo di raggiungere la massima riduzione di BOD e di nutrienti dai liquami trattati, con la minima produzione di fanghi biologici. I protozoi sono importanti costituenti delle comunità implicate nella rimozione di sostanza organica biodegradabile e di batteri dispersi nella miscela aerata in questo tipo di processo di trattamento dei liquami. I trattamenti biologici, infatti, si basano sul processo di autodepurazione tipico dei corsi d'acqua quale risultato dell'attività delle comunità microbiche. Il processo di trattamento a fanghi attivi, tuttavia, differisce dai corsi d'acqua per le seguenti caratteristiche:

- elevato flusso di sostanza organica all'interno del sistema;
- accelerata attività dei processi di decomposizione;
- prevalenza di organismi eterotrofi e, quindi, della catena trofica del detrito;
- breve turnover della biomassa.

Queste caratteristiche influenzano profondamente gli organismi in grado di vivere in questi sistemi artificiali, tanto che tra gli organismi eterotrofici solo i protisti e i piccoli metazoi con cicli vitali più corti del tempo di residenza del fango possono colonizzare il fango attivo. Gli impianti biologici per il trattamento dei liquami possono essere considerati come ecosistemi artificiali sottoposti a condizioni estreme. Come in ogni altro sistema biologico, la biocenosi che si sviluppa nella vasca di aerazione di un impianto a fanghi attivi, ha una peculiare struttura (componenti e fattori) e segue esatte dinamiche (nel tempo e nello spazio). I protozoi costituiscono circa il 9% dei solidi sospesi nel mixed-liquor (Madoni, 1994a). Sebbene siano state segnalate oltre 230 specie di protozoi (di cui 33 flagellati, 25 rizopodi, 6 actinopodi e 160 ciliati) nei vari tipi di trattamento aerobico, solo un limitato numero di esse ricorre frequentemente (Curds & Cockburn, 1970; Madoni & Ghetti, 1981).

E' stato dimostrato che i protozoi ciliati migliorano la qualità dell'effluente attraverso la predazione della maggior parte di batteri dispersi nella miscela aerata che continuamente entrano nel sistema con il liquame (Curds et al., 1968; Salvado et al. 1995; Lee et al., 2004). In assenza di ciliati, infatti, l'effluente del sistema è caratterizzato da BOD più elevato e da alta torbidità per la presenza di molti batteri dispersi. I ciliati, inoltre, predano anche i batteri patogeni e quelli fecali. Negli effluenti di impianti a fanghi attivi in cui non vi erano ciliati la presenza di *Escherichia coli* risultava essere, in media, il 50% di quella osservata nel liquame in ingresso alla vasca di aerazione. In presenza di ciliati tale percentuale scendeva però al 5% (Curds & Fey, 1969). Tuttavia, alcune condizioni operative dell'impianto possono condizionare pesantemente sulla struttura in specie della microfauna. Un veloce passaggio del liquame (o una breve età del fango) attraverso il sistema può rimuovere diversi organismi della comunità microbica e alcune specie che non possono riprodursi abbastanza velocemente da compensare tale perdita potranno essere perse dal sistema. Quindi, i fanghi attivi con tempi di contatto troppo veloci tenderanno a favorire specie con rapidi tassi di riproduzione, generalmente i protozoi più piccoli come i flagellati eterotrofici e i piccoli ciliati (< 30 µm). Gli impianti a fanghi attivi con lenti flussi idraulici e alta età del fango ospiteranno la più alta diversità di organismi comprendendo anche i piccoli metazoi che, contrariamente alla maggior parte dei protozoi, hanno lunghi tempi di generazione. I sistemi ad alto carico organico richiedono una più alta quantità di ossigeno, e in caso di carenza di ossigenazione,

saranno favoriti gli organismi quali flagellati eterotrofici, amebe nude e piccoli ciliati natanti che normalmente si trovano in habitat inquinati da sostanza organica. Al diminuire del carico organico, la diversità degli organismi che possono colonizzare la miscela aerata nella vasca di aerazione aumenta. Negli impianti a basso carico del fango (ad esempio gli impianti ad ossidazione totale) si osserva un numero più alto di specie ma il numero degli individui è generalmente basso. La struttura della microfauna è quindi un valido indicatore di efficienza biologica dell'impianto. In sintesi, un efficace fango attivo presenta le seguenti caratteristiche:

- alta densità della microfauna ($\geq 10^6$ organismi per litro); quando il loro numero scende al di sotto di 10^4 per litro, esso indica insufficiente depurazione (Curds, 1975; Drakides, 1980; Madoni, 2003). In questo caso si osserva una intensa proliferazione di batteri dispersi che provocano un aumento di BOD e di torbidità nell'effluente. Un alto numero di ciliati ($>10^7$ per litro) indica, al contrario, una buona depurazione ed un'ottima efficienza;
- microfauna composta principalmente da forme mobili e sessili, con piccoli flagellati e ciliati natanti praticamente assenti;
- comunità altamente diversificata, dove nessun gruppo o specie domina numericamente sugli altri oltre un fattore (Madoni, 2003).



Fig. 3.3: Immagine di un ciliato mobile: *Euplotes*



Fig. 3.4: Immagine di un ciliato sessile: *Opercularia*



Fig. 3.5: Immagine di un ciliato natante: *Paramecium*



Fig. 3.6: Immagine di una teca ameba: *Arcella*

3.5. Caratterizzazione del fango attivo

Gli strumenti utilizzati per determinare la qualità del fango attivo prevedono:

- valutazione delle capacità di sedimentabilità;
- analisi al microscopio per definire la struttura dei fiocchi, i batteri filamentosi presenti e la popolazione dei ciliati;
- analisi di tipo molecolare.

3.6. Caratteristiche di sedimentabilità

Si tratta di un aspetto fondamentale per la realizzazione ed il controllo di un'efficace depurazione delle acque. I fanghi devono infatti possedere caratteristiche di sedimentabilità tali da:

- permetterne la separazione dal liquame depurato ed evitarne la fuoriuscita dall'impianto;
- garantire un adeguato addensamento dei fango separato prima del rinvio al processo biologico o dell'avvio al trattamento fanghi.

Un aumento della concentrazione di solidi sospesi in uscita dal sedimentatore si traduce nella potenziale vanificazione di tutto il processo di depurazione a causa del peggioramento della qualità dell'effluente finale che ne deriva. Analogamente, tralasciando tutte le possibili implicazioni sulla linea fanghi, la riduzione della concentrazione del fango di ricircolo può determinare una minor efficienza del processo biologico per effetto dell'aumento di carico che ne consegue. Il controllo delle caratteristiche di sedimentabilità dei fanghi può essere effettuato mediante tre parametri:

- velocità di sedimentazione;
- volume dei fango;
- indice di Mohman, SVI (Sludge Volume Index).

3.6.1. Velocità di sedimentazione

E' definita come la pendenza del tratto rettilineo della curva di sedimentazione ricavata riportando su carta i valori dell'altezza del fango sedimentato in un cono cilindrico (cm) in funzione del tempo.

$$v_s = 0,6 \cdot \frac{\Delta cm}{\Delta min} (m/h)$$

La velocità di sedimentazione di un certo fango dipende essenzialmente dalla sua concentrazione. In generale si può affermare che quanto più è elevata la concentrazione di fango tanto più lenta sarà la velocità di sedimentazione relativa. Per un fango che sedimenta bene dopo cinque minuti si evidenzia una netta separazione fra strato del fango sedimentato e il liquido surnatante, dopo dieci minuti la linea di separazione subisce un abbassamento di almeno la metà rispetto al livello raggiungibile alla fine della prova fissata in mezz'ora.

3.6.2. Volume del fango e volume del fango di ricircolo

Rappresenta il volume (cc o ml) occupato da un campione di fango attivo o di ricircolo dopo sedimentazione statica in cono Imhoff (o cilindro da 1 litro) per 30'. E' possibile calcolare approssimativamente il corretto valore di rapporto di ricircolo, R, da mantenere, sulla base del volume di fango rilevato su un campione di fango attivo, mediante la formula:

$$R = \frac{Q_r}{Q_i} = \frac{V_a}{V_r - V_a}$$

dove:

V_a : volume (l) occupato da un litro di fango attivo dopo sedimentazione statica di 30' in cono Imhoff ;

V_r : volume (l) occupato da un litro di fango di ricircolo dopo sedimentazione statica di 30' in cono Imhoff .

Dopo 30' di sedimentazione in cono o cilindro da un litro del fango di ricircolo non si dovrebbe separare più di 50 - 100 cc di surnatante, diversamente significa che vi è un forte trascinamento di acqua.

3.6.3. Sludge Volume Index (SVI)

Il parametro che consente di stimare, seppur a livello macroscopico, le caratteristiche di sedimentabilità dei fanghi è rappresentato dallo SVI o Indice di Volume del fango, espresso in ml gr^{-1} , che indica il volume occupato da un grammo di fango dopo 30' di sedimentazione in cono Imhoff o cilindro.

$$SVI = \frac{V_a (\text{cc/l})}{MLSS (\text{g/l})}$$

In generale si considerano accettabili valori di SVI che variano fra 40 e 150 cc g^{-1} . Un incremento di questo indice fino ed oltre 200 evidenzia un cattivo funzionamento dell'impianto che genera un effluente torbido e un depauperamento della biomassa attiva per

dilavamento. L'andamento generale denota un aumento di SVI all'aumentare del carico del fango e quindi al diminuire dell'età del fango. Per ridurre la variabilità dello SVI in funzione del contenuto dei solidi nella miscela areata si determina lo SVI diluito; ciò consente, non solo di poter distinguere fra fanghi concentrati e fanghi che sedimentano male, ma anche di poter valutare lo SVI per fanghi con pessime caratteristiche di sedimentabilità e con contenuto di filamentosi molto elevato. SVI diluito viene effettuato su un campione di fango con valori stimanti al di sopra di 200 cc g⁻¹, diluendo opportunamente il fango in modo da ottenere un valore, appunto, minore di 200.

$$SVI_{dil} = \frac{V_a(cc/l)}{MLSS(g/l)} \cdot 2^n$$

dove:

V_a: volume occupato dal fango, opportunamente diluito, dopo 30' di sedimentazione statica (cc l⁻¹)

MLSS: concentrazione di MLSS del campione originale (g l⁻¹)

n: numero di successive diluizioni 1:2 necessarie per ottenere al massimo un valore pari a circa 200 cc l⁻¹.

3.7. Osservazione al microscopio

Mediante l'osservazione al microscopio di una piccola aliquota di fango attivo è possibile ottenere informazioni fondamentali per capire eventuali disfunzioni nell'impianto di trattamento ed adottare strategie atte a ripristinare la funzionalità del processo. Le caratteristiche del fango attivo che è possibile osservare riguardano la morfologia del fiocco, l'abbondanza e la tipologia dei batteri filamentosi presenti, la popolazione dei protozoi.

3.7.1. *Morfologia del fiocco*

La morfologia del fiocco si osserva a 100x in contrasto di fase spaziando per tutto il vetrino e fissando in particolare alcuni aspetti:

- Forma e dimensione del fiocco: Il fiocco di fango è presentato, idealmente, con una forma regolare e tondeggiante, tuttavia nella realtà i fiocchi si presentano con forme molto diverse, ad esempio allungate o irregolari. Il fiocco può mostrare zone vuote (fiocco a maglia larga), oppure avere un centro pieno e compatto, così come può apparire poco sfruttato o addirittura frantumato. Il diametro prevalente dei fiocchi può essere di piccole dimensioni (diametro $<150\ \mu\text{m}$), di medie dimensioni (diametro compreso tra 150 e $500\ \mu\text{m}$), di grandi dimensioni (diametro $>500\ \mu\text{m}$). La taglia del fiocco di fango dipende in larga misura dal carico del fango, dalla qualità dell'effluente e dalla turbolenza nella vasca di aerazione. La valutazione delle dimensioni medie del fiocco si effettua con l'ausilio del micrometro oculare, contando almeno una decina di fiocchi.
- Presenza di cellule libere nella soluzione: Può accadere di osservare molte cellule libere (batteri, protozoi) tra i fiocchi di fango, oppure più o meno numerosi filamenti liberi.
- Presenza di particelle organiche o inorganiche: Nei fiocchi di fango attivo, oltre le cellule batteriche, possono essere presenti materiali organici ed inorganici provenienti dall'affluente. Le particelle organiche possono essere riconosciute perché presentano per lo più una forma fibrosa (es. frammenti di fibra vegetali), oppure si presentano in strutture organizzate (es. cisti, uova, pollini o altro). Le particelle inorganiche possiedono un indice di rifrazione più alto ed appaiono perciò molto luminose e brillanti. Un notevole contenuto di queste ultime è in genere legato ad impianti privi della dissabbiatura e/o della sedimentazione primaria.

L'osservazione al microscopio permette inoltre di identificare la struttura ed il tipo di batteri filamentosi presenti nel fiocco di fango, che ne determinano le caratteristiche di sedimentabilità. In base al numero dei filamentosi presenti si possono distinguere generalmente 3 tipi di strutture del fiocco (Fig. 3.7):

- Fiocco ideale: il fiocco è grande, compatto e forte. La forma è irregolare. Vi è equilibrio fra batteri filamentosi e gli altri. Più in particolare i batteri filamentosi si trovano prevalentemente all'interno del fiocco (macrostruttura) e solo pochi si protendono verso l'esterno. Un fango di questo tipo sarà caratterizzato da uno SVI

compreso fra 80-120 ml gr⁻¹ e presenterà un surnatante limpido, povero di solidi sospesi (Fig. 3.7 A).

- Fiocco pin-point: il fiocco è più piccolo, di forma sferica e debole. Tende a rompersi in fiocchetti più piccoli per effetto dell'agitazione. I batteri filamentosi presenti sono pochissimi (microstruttura). Un fango di questo tipo sarà caratterizzato da bassi valori di SVI < 70 ml gr⁻¹ ma presenterà un surnatante molto torbido e ricco di solidi (Fig. 3.7 B).

- Fiocco in bulking: il fiocco è molto grande e molto ricco in batteri filamentosi. Si possono evidenziare 2 forme tipiche: forma cilindreggiante quando i filamentosi seppur eccessivamente presenti sono prevalentemente all'interno dei fiocchi; forma diffusa o aperta quando l'abbondanza di filamenti che fuoriescono dal fiocco porta alla formazione di ponti e legami fra più fiocchi. Un fango di questo tipo sarà caratterizzato da uno SVI > 150 ml gr⁻¹ e presenterà un surnatante limpido e povero di solidi sospesi grazie al ben noto effetto filtro (Fig. 3.7 C).

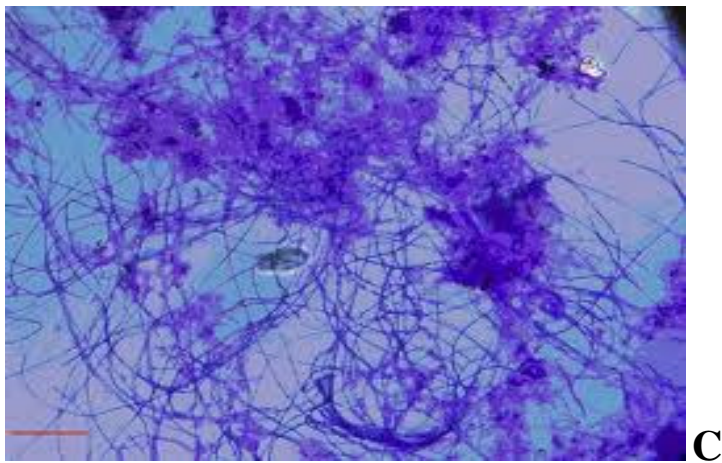
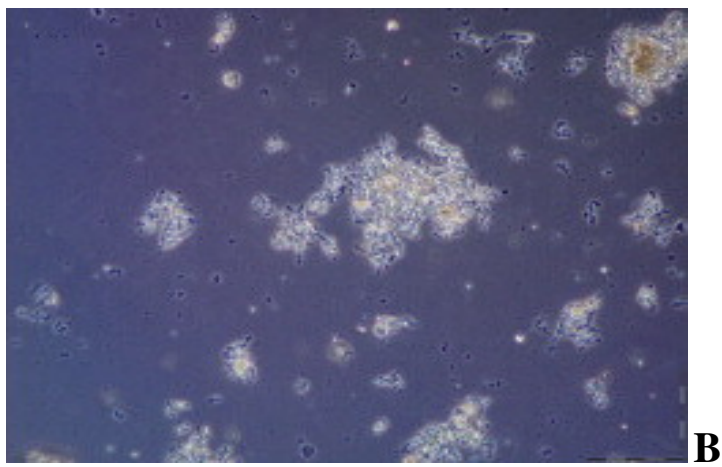
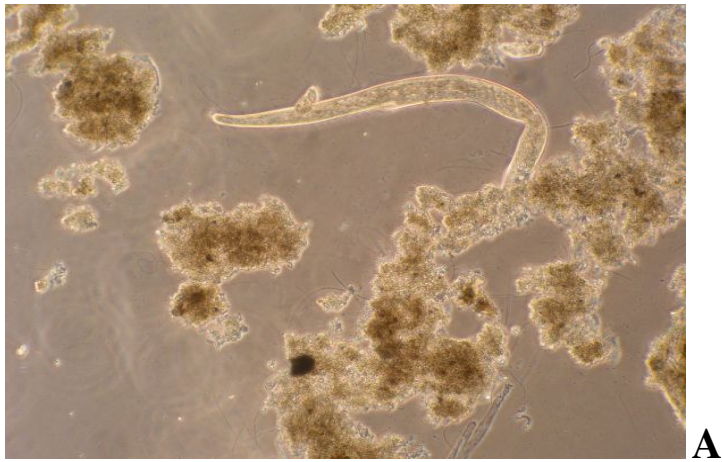


Fig. 3.7: Diverse tipologie di fango attivo: Fiocco ideale (A), Fiocco pin-point (B), Fiocco in bulking (C).

3.7.2. Valutazione dei microrganismi filamentosi

Esistono diversi metodi per la quantificazione dei microrganismi filamentosi. La caratteristica comune è che tutti prevedono l'osservazione microscopica di un campione di fango. I principali metodi di misurazione sono:

- la lunghezza totale dei filamenti o *total extended filament lenght* (TEFL) [$\mu\text{m ml}^{-1}$];
- il conteggio dei filamenti o *filament count* [n intersezioni μm^{-1}];
- determinazione soggettiva dell'abbondanza secondo la scala di Jenkins et al. (1993).

3.7.3. Lunghezza totale dei filamenti (TEFL)

Questo metodo è basato sull'ipotesi che i filamenti che escono dai fiocchi sono responsabili dei problemi di sedimentabilità dei fanghi. Sezgin et al. (1978) propose una misura della lunghezza dei filamenti.

Il metodo prevede la sospensione verrà osservata su un vetrino micrometrico a 100X per valutare le dimensioni dei filamenti che vengono classificati e contati sulla base delle seguenti dimensioni:

0-10 μm	100-200 μm
10-25 μm	200-400 μm
25-50 μm	400-800 μm
50-100 μm	>800 μm

Il risultato si esprime come lunghezza totale del filamento per grammo di solidi sospesi totali: $\text{TEFL} = (\text{Lunghezza totale dei filamenti nel campione di 1 ml}) \times (\text{fattore di diluizione: 500}) / (\text{concentrazione dei solidi sospesi totali, g l}^{-1})$. Il parametro TEFL è correlato con i parametri SSVI e DSVI. Da letteratura il valore di $107 \mu\text{m ml}^{-1}$ rappresenta il valore limite tra bulking e non bulking.

3.7.4. Conteggio dei filamenti

Il conteggio dei filamenti è stato proposto da Jenkins (2004) per la quantificazione di filamenti con ramificazioni e forma irregolare (es. *Nocardia*). Un campione di fango attivo di volume noto viene collocato su un vetrino e coperto. L'area coperta viene divisa in campi.

L'oculare del microscopio è dotato di una linea singola che divide il campo visivo in due parti. Muovendo l'obiettivo da un angolo all'altro del vetrino, si osservano consecutivamente i tutti i campi. Per ogni campo viene contato il numero di intersezioni dei filamenti con la linea dell'oculare. Il risultato viene espresso come numero di filamenti per unità di volume di fango attivo. Sempre Jenkins (2004) ha proposto una tecnica per il conteggio di filamenti caratterizzati da diramazioni e forma irregolare come *Nocardia*. Il conteggio viene fatto in un campione sottoposto a colorazione di Gram, nel quale i filamenti Gram positivi di *Nocardia* sono ben visibili.

3.7.5. Determinazione soggettiva dell'abbondanza dei filamenti

Per la valutazione di routine dell'abbondanza dei microrganismi filamentosi Jenkins e al. (2004) ha elaborato un metodo che si basa sull'osservazione microscopica del fango, e sul confronto con una scala di abbondanza. L'analisi microscopica deve essere fatta con un ingrandimento 100X ed in contrasto di fase. La scala messa a punto da Jenkins si riporta in Tab. 3.4.

Tab 3.4: Categorie di abbondanza degli organismi filamentosi nel fango attivo

Valore Numerico	Abbondanza	Descrizione del quadro microscopico
0	Nessuno	Completa assenza di filamenti
1	Pochi	Filamenti osservati solo in qualche fiocco occasionale
2	Alcuni	Filamenti presenti, ma non in tutti i fiocchi
3	Frequenti	Filamenti osservati in tutti i fiocchi ma con bassa densità (da 1 a 5 filamenti per fiocco)
4	Molto frequenti	Filamenti osservati in tutti i fiocchi con media densità (da 5 a 20 filamenti per fiocco)
5	Abbondanti	Filamenti osservati in tutti i fiocchi con alta densità (almeno 20 filamenti per fiocco)
6	Eccessivi	Filamenti presenti in tutti i fiocchi: appaiono più filamenti che fiocchi oppure i filamenti invadono pressoché completamente lo spazio tra i fiocchi

3.8. Valutazione della popolazione dei protozoi

La microfauna è stata utilizzata per elaborare valutazioni di efficienza di specifici impianti (Al-Shahwani & Horan, 1991; Esteban et al., 1991; Lee et al. 2004); tuttavia tali metodi non possono essere applicati direttamente ad altri impianti, anche se appartenenti alla stessa tipologia. Altri metodi basati sulla analisi microscopica, al contrario, possono essere applicati a tutti gli impianti per stimare sia la qualità dell'effluente (Curds & Cockburn, 1970) sia la efficienza biologica degli impianti (Drakides, 1978; Madoni, 1981; Madoni 2003). Molti di questi metodi, tuttavia, sono soggettivi perché non sono basati su rigidi calcoli, bensì su interpretazioni soggettive della microfauna che colonizza il fango in esame, da parte dell'analista. Gli indici obiettivi, invece, hanno il grande vantaggio rispetto agli indici soggettivi, in quanto i valori determinati dai differenti operatori sono completamente comparabili. L'indice S.B.I. (Sludge Biotic Index) è stato concepito con lo scopo di attribuire, mediante un preciso protocollo, un valore oggettivo riguardante le performance depurative del fango attivo.

3.8.1. L'indice biotico del fango (S.B.I.)

L'Indice Biotico del Fango (Madoni, 1994b), illustrato nella tabella 3.2, è stato messo a punto sulla base dei risultati ottenuti nelle numerose ricerche condotte sulla microfauna dei fanghi attivi durante gli ultimi venti anni dall'autore, come è stato anche ampiamente illustrato nei capitoli precedenti. La sensibilità del metodo è stata saggiata sulla base delle condizioni fisiche, chimiche e operative degli impianti. Questo metodo è basato sia sulla differente sensibilità mostrata da alcuni gruppi della microfauna ai principali parametri fisici, chimici e gestionali, sia sulla abbondanza e diversità in specie della microfauna: questo consente di definire la qualità biologica del fango mediante valori numerici convenzionali (indice biotico). Lo SBI tiene in considerazione anche i seguenti punti:

- la ricchezza in specie tende a cambiare normalmente con il carico del fango. Il più alto numero di specie è stato osservato a carichi del fango compresi tra 0,2 e 0,3 kgBOD₅ kgMLSS⁻¹ per giorno (Curds & Cockburn, 1970); la densità della microfauna diminuisce con il decrescere del carico del fango. Nella vasca di aerazione di impianti che attuano la nitrificazione, è attesa una microfauna meno abbondante rispetto ai fanghi attivi convenzionali. L'indice da assegnare al fango attivo in esame si ottiene mediante l'uso di una tabella a due entrate (Tab. 3.5). In orizzontale, vengono presi in considerazione i gruppi dominanti o prevalenti che, a partire dalla parte alta della tabella, sono associati ad una qualità

biologica del fango via via decrescente. Nella parte alta delle colonne viene considerata, invece, la diversità della microfauna in cui il numero delle unità sistematiche è raggruppato in quattro differenti classi. La tabella a due entrate inoltre considera l'abbondanza della microfauna (esclusi i flagellati) e dei flagellati. Per la determinazione dei valori di SBI è necessario selezionare l'ingresso orizzontale in tabella scegliendo prima la riga corrispondente al gruppo dominante e poi tenendo in considerazione la densità totale della microfauna (minore o maggiore di 10^6 ind. l^{-1}). In caso di due o più gruppi dominanti, la scelta cadrà sul gruppo che occupa la posizione più bassa. L'ingresso verticale in tabella è determinato dal numero totale delle unità sistematiche di cui è composta la microfauna e dalla densità dei piccoli flagellati. Il valore dell'Indice Biotico del Fango (SBI) può così essere determinato all'intersezione della riga e della colonna selezionati. La tabella a due entrate permette di assegnare valori da 0 a 10 alla qualità biologica del fango, sulla base di due criteri: la differente sensibilità mostrata dai gruppi della microfauna alle condizioni ambientali, e l'effetto che tali condizioni producono sia sulla densità che sulla ricchezza in specie della microfauna. Infine i valori di SBI sono raggruppati in 4 classi di qualità evidenziate da numeri romani (Tab. 3.5). Queste classi permettono di rappresentare la qualità biologica del fango attivo mediante 4 classi di giudizi piuttosto ampie e, quindi, di valore attendibile.

3.8.2. Protocollo d'uso dello SBI

Il metodo si basa sulla diversità e sulla densità della microfauna, deve essere quindi posta una particolare attenzione sia alla identificazione che al conteggio degli organismi che la compongono. Sebbene molti organismi possano più o meno frequentemente essere osservati nei fanghi attivi, alcune forme come le amebe nude e gli organismi di drift (alghe, crostacei, insetti), non sono considerati in questo metodo. Gli organismi che devono essere inclusi nella microfauna sono: piccoli e grandi flagellati, ciliati, amebe con teca, rotiferi, nematodi e altri piccoli metazoi come gastrotrichi e tardigradi. Tutte le specie di protozoi ciliati e di amebe con teca contribuiscono alla determinazione della diversità della microfauna (ingresso verticale nella tabella SBI). Dato che l'identificazione a livello di specie di flagellati, rotiferi, nematodi e altri piccoli metazoi è difficoltosa, questi gruppi contribuiscono ciascuno con una sola unità sistematica. Per quanto riguarda i gruppi dominanti (entrata orizzontale nella tabella SBI), deve essere ricordato che solo i ciliati batteriofagi contribuiscono a formare i tre gruppi funzionali (natanti, mobili, sessili). Ogni specie di ciliati carnivori contribuisce solamente alla densità e diversità totale della microfauna.

Ciliati natanti predatori come *Litonotus*, *Amphileptus* e *Spathidium*, devono secondo Madoni (2003) essere esclusi dal gruppo funzionale "natanti"; allo stesso modo i ciliati sessili predatori come i suttori (*Podophrya*, *Tokophrya*, e *Acineta*) devono essere esclusi dal gruppo funzionale "sessili". L'identificazione delle varie specie di protozoi è molto importante al fine di ottenere un accurato valore di SBI; a questo proposito, sono disponibili alcune chiavi di classificazione dei protozoi messe a punto specificamente per i fanghi attivi e gli ambienti saprobici (Curds, 1969; Madoni, 1981; Madoni, 1994c; Streble & Krauter, 1981; Foissner, 1991). Nel predisporre la lista delle specie presenti nel fango in osservazione, si suggerisce di eseguire la procedura entro 5 ore dal prelievo. I campioni di miscela aerata destinati alle osservazioni microscopiche devono essere aerati e mescolati sufficientemente in modo che tutti i solidi rimangano in sospensione durante il trasporto e il periodo di analisi. Le osservazioni effettuate su piccole gocce (50-100 µl) di miscela aerata dovrebbero utilizzare vetrini coprioggetto delle dimensioni di 24x24 mm o 24x32 mm che sono i più indicati per questo tipo di osservazione. Infine, per rendere la determinazione più riproducibile nella lista dovrebbero essere inserite solo le specie di cui si sono osservati almeno 2 individui.

3.8.3. Considerazioni finali

Lo Sludge Biotic Index si basa sia sulla struttura che sull'abbondanza della microfauna che colonizza il fango attivo. Come i precedenti metodi, anche lo SBI è stato costruito sulla base delle relazioni esistenti tra efficienza biologica dell'impianto e condizioni operative da una parte, e struttura della microfauna all'interno della vasca di aerazione dall'altra. Il metodo è stato formulato e semplificato tenendo presente le necessità e le esigenze degli operatori e gestori degli impianti; così, sia il livello di identificazione tassonomica che la procedura di conteggio sono stati semplificati al massimo senza nulla togliere alla sensibilità del metodo. Un ulteriore vantaggio di questo metodo è quello di esprimere giudizi numerici che permettono all'operatore di comparare giorno per giorno le condizioni operative dell'impianto. Deve essere sottolineato tuttavia, che lo SBI è stato messo a punto specificamente per la valutazione della efficienza biologica nel reattore (vasca di aerazione). Questo indice, quindi, non è in grado di rivelare alcuna disfunzione che avvenga a valle nella vasca di sedimentazione secondaria (per es.: bulking, rising), anche se alcuni di questi problemi come la perdita di fango può causare, nel tempo, variazioni nella struttura della microfauna. L'indice biotico del fango è stato messo a punto per essere usato in tutti i tipi di impianti a fango attivo (contatto stabilizzazione, tradizionale, aerazione prolungata). La microfauna utilizzata per la

determinazione dell'indice SBI ha una distribuzione cosmopolita; è ragionevole asserire, quindi, che l'indice è applicabile ai fanghi attivi di tutti i continenti.

Tab 3.5: Tabella a due entrate per il calcolo dell'indice SBI del fango attivo.

Gruppi della microfauna e sua densità che determinano l'ingresso orizzontale in tabella		Numero totale di specie che costituiscono la microfauna (esclusi i flagellati) del fango e densità dei flagellati (F) contati nella diagonale della camera di Fuchs-Rosenthal (A= F< 10; B= 10<F<100)							
GRUPPO DOMINANTE O PREVALENTE	DENSITA' (ind./l)	> 10		8 - 10		5 - 7		< 5	
		A	B	A	B	A	B	A	B
CILIATI MOBILI +SESSILI * e/o AMEBE CON TECA	$\geq 10^6$	10	8	9	7	8	6	7	5
	$< 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	4
CILIATI SESSILI * > 80 %	$\geq 10^6$	9	7	8	6	7	5	6	4
	$< 10^6$	8	6	7	5	6	4	5	3
<i>Opercularia</i> spp	$\geq 10^6$	7	5	6	4	5	3	4	2
	$< 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	1
<i>Vorticella microstoma</i> e/o <i>V. infusionum</i>	$\geq 10^6$	6	4	5	3	4	2	3	1
	$< 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	0
CILIATI NATANTI	$\geq 10^6$	5	3	4	2	3	1	2	0
	$< 10^6$	4	2	3	1	2	0	1	0
PICCOLI FLAGELLATI (> 100) ¥	$\geq 10^6$	4		3		2		1	
	$< 10^6$	3		2		1		0	

* *Opercularia* e *Vorticella microstoma* non abbondanti ; ¥ numero di flagellati nella diagonale della camera di Fuchs-Rosenthal

Conversione dei valori di SBI in classi di qualità del fango con relativo giudizio

Valore SBI	Classe	Giudizio
8 - 10	I	Fango ben colonizzato e stabile, ottima attività biologica; alta efficienza depurativa.
6 - 7	II	Fango ben colonizzato e stabile, attività biologica sub-ottimale; discreta efficienza depurativa.
4 - 5	III	Insufficiente depurazione biologica dell'impianto; mediocre efficienza depurativa.
0 - 3	IV	Cattiva depurazione biologica dell'impianto; bassa efficienza depurativa.

3.9. Analisi molecolare del fango attivo

Mentre per lo studio della struttura di popolazione dei protozoi che costituiscono il fango attivo le tecniche di identificazione tradizionale basate sul riconoscimento mediante microscopia è a tutt'oggi riconosciuto, nel caso degli studi relativi alla popolazione batterica del fango attivo gli approcci di identificazione tradizionale risultano inadeguati perché basati su metodi dipendenti dalla coltivazione. Nei metodi tradizionali di identificazione, infatti, è indispensabile poter isolare e coltivare i microrganismi in esame e questo, come è ormai noto (Marzorati et al., 2008), è il maggior collo di bottiglia considerando che solo una piccola percentuale dei batteri presenti negli ambienti (dallo 0,1 al 5% circa) rientrano nell'ambito dei cosiddetti coltivabili. Ad esempio se ci si riferisce al suolo, si calcola che un grammo di suolo contenga almeno 4000 specie batteriche, ma solamente una percentuale molto bassa, circa l'1%, è coltivabile in condizioni standard (Amann et al., 1995). Conseguentemente, qualunque metodo di analisi che preveda la coltivazione dei microrganismi opera di fatto una selezione e pertanto permette di analizzare solo quella frazione in grado di svilupparsi nelle condizioni adottate. Per questo motivo negli ultimi 15 anni sono stati introdotti numerosi metodi molecolari, principalmente indipendenti dalla coltivazione dei microrganismi, per lo studio della diversità delle comunità microbiche ambientali. Questi nuovi metodi hanno affiancato le metodologie più tradizionali, quali la coltivazione su piastra e l'analisi delle caratteristiche metaboliche dei ceppi microbici in coltura consentendo così di superare i limiti imposti dalla coltivazione dei microrganismi. In generale, quindi, i metodi di recente concezione per l'analisi delle comunità microbiche e quindi anche della popolazione del fango attivo possono rientrare nei cosiddetti metodi molecolari, che permettono di analizzare le caratteristiche biochimiche e metaboliche (SIP, PLFA) o genetiche (*Random Sequencing in clone libraries*, ARDRA, RISA, ARISA, RFLP, T-RFLP, DGGE, TGGE, Microarray, SSCP, RAPD, FISH, DNA *re-association*) delle popolazioni costituenti le comunità prese in esame (Fig. 3.8). In particolare, nel caso degli studi genetici, si ricorre all'analisi di appositi geni "marcatori" che consentono di distinguere tassonomicamente i membri delle comunità stesse, o ancora, di evidenziare la presenza di particolari attività metaboliche. In tal caso, è possibile inoltre dividere tutte queste tecniche in due grandi gruppi, ossia:

- tecniche basate sull'amplificazione PCR;
- tecniche biochimiche, indipendenti dall'amplificazione PCR.

Un problema di difficile soluzione quando si studia le popolazioni microbiche in un ambiente, oltre alla non coltivabilità della maggior parte dei microrganismi che costituiscono le

comunità, è rappresentato dall'eterogeneità della matrice analizzata. Le cellule batteriche possono infatti non essere distribuite omogeneamente sui fiocchi di fango e tra fiocco e fiocco. È perciò intuitivo che gli studi di diversità microbica devono essere effettuati su numerosi replicati del campione in esame prelevati generalmente in punti diversi al fine di raggiungere il maggior grado possibile di rappresentatività (Franklin & Mills, 2003).

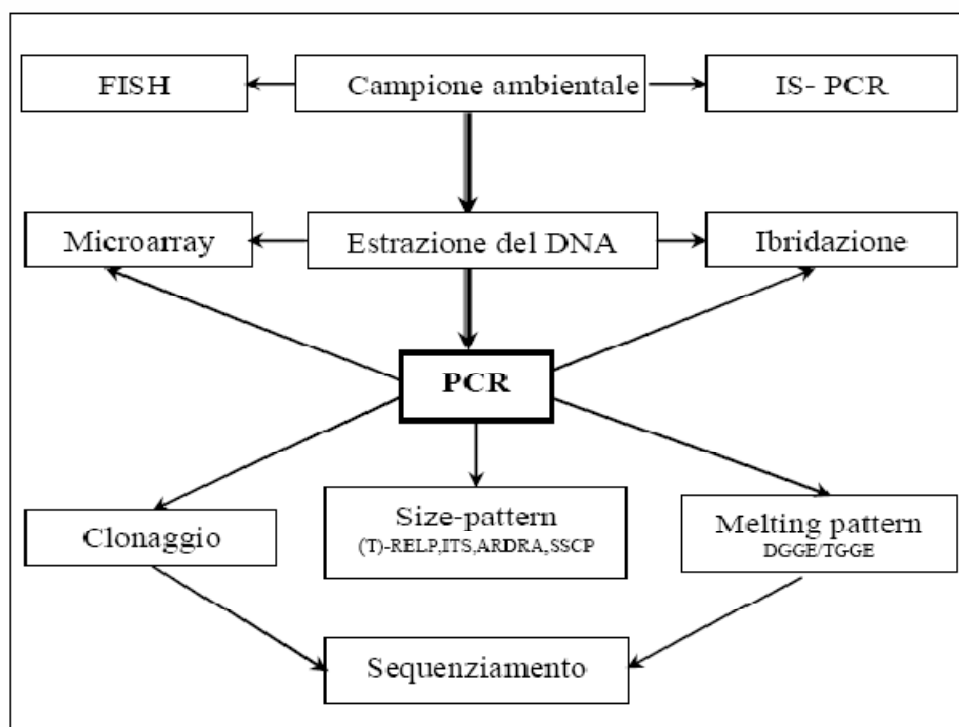


Fig 3.8: Metodiche comuni per lo studio della diversità genetica delle comunità microbiche: *PCR*: Polymerase Chain Reaction; *IS-PCR*: In Situ-Polymerase Chain Reaction; *FISH*: Fluorescence In Situ Hybridisation; *T-RFLP*: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; *ITS*: Internal Transcribed Spacer; *ARDRA*: Amplified rDNA Restriction Analysis; *SSCP*: Single-Stranded Conformation Polymorphism; *DGGE*: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; *TGGE*: Temperature Gradient Gel Electrophoresis (Dahllöf, 2002).

Due approcci metodologici molecolari che hanno trovato e stanno trovando sempre più ampia applicazione nello studio della popolazione batterica dal fango attivo sono l'elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE) e la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) di cui di seguito si riportano alcuni dettagli relativi alle procedure ed applicazioni specifiche nel settore del trattamento dei reflui.

3.9.1. Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE: Denaturing, TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis)

L'elettroforesi su gel a gradiente denaturante è una delle tecniche comunemente utilizzate in microbiologia molecolare per la caratterizzazione della struttura e lo studio della dinamica di popolazioni microbiche in campioni ambientali. La DGGE, in particolare, è stata largamente utilizzata in diversi studi di caratterizzazione della struttura di comunità batteriche sia in campioni di suolo che di acque (Muyzer et al., 1993; Chang et al., 2000; Nakatsu et al., 2000; Kleikemper et al., 2002; El-Latif Hesham et al., 2006). La tecnica DGGE trova impiego anche nell'analisi della comunità batterica sui fanghi attivi per studiarne la variazione nel processo di nitrificazione (Liu et al., 2007; Zhang et al., 2009 e 2010), la variazione nel processo anaerobico/aerobico (Ding et al., 2011), l'adattamento a differenti carichi organici (Li et al., 2011), la determinazione dei batteri filamentosi (Gulez & De Los Reyes, 2009; Shen et al., 2007). Nelle analisi condotte mediante DGGE o TGGE si ottiene la separazione di piccoli frammenti di DNA (200-700 bp), amplificati tramite PCR, della stessa lunghezza ma di differente sequenza. La separazione avviene su gel di poliacrilammide e si basa sulla diminuzione della mobilità elettroforetica dei prodotti di PCR a doppio filamento che vengono parzialmente denaturati dal gradiente chimico (una miscela di urea e formamide), nel caso della DGGE, o termico, nel caso della TGGE. Inizialmente gli *amplicons* vengono separati in base al loro peso molecolare, determinato principalmente dal loro contenuto in Guanina e Citosina, ma procedendo lungo il gel essi sono soggetti a condizioni denaturanti sempre più forti che provocano la progressiva separazione dei due filamenti di DNA ritardando in tal modo sempre più il loro procedere lungo il gel. L'arresto dei frammenti in un particolare punto del gel si avrà quando essi raggiungono condizioni denaturanti tali da separare quasi completamente i due filamenti. Il punto di arresto di ogni frammento dipende quindi dalla sua composizione nucleotidica per cui, il numero di bande prodotte durante questo tipo di corse elettroforetiche sarà proporzionale al numero di specie dominanti nel campione. I frammenti, comunque, non vengono mai completamente denaturati grazie al fatto che una sequenza ricca in Guanina e Citosina, legata covalentemente al *primer forward*, detta *GC-clamp*, viene aggiunta ai frammenti stessi durante la loro amplificazione. I vantaggi connessi all'utilizzo di queste tecniche possono essere riassunti in tre punti principali:

- la possibilità di monitorare cambiamenti sia strutturali che funzionali, dovuti a qualsiasi tipo di perturbazione, nelle comunità batteriche analizzate;
- la possibilità di ottenere in modo rapido un profilo delle popolazioni principalmente rappresentative delle comunità stesse;

- la possibilità di identificare popolazioni microbiche attraverso l'escissione ed il sequenziamento delle bande. Questo è particolarmente utile, ad esempio, nel riconoscimento di batteri implicati in fenomeni di bulking filamentoso.

Oltre ai vantaggi, anche diverse limitazioni sono legate all'impiego di tali procedure come ad esempio la scelta della coppia dei *primers* utilizzati per l'amplificazione del gene per l'rRNA 16S e l'ottimizzazione del gradiente. Il profilo ottenuto, infatti, dipende strettamente dalla coppia di *primers* utilizzati. Heur et al. (2001) hanno utilizzato ad esempio 14 diverse regioni ipervariabili del gene dell'rRNA 16S per generare profili DGGE dimostrando che la regione V6 è quella che fornisce una migliore risoluzione dei profili da campioni di suolo. Nel caso, invece, si voglia distinguere diversi gruppi filogenetici, devono essere impiegate coppie di *primers* disegnate sulla base di ulteriori regioni ipervariabili (Gomes et al., 2001). Oltre alla scelta della più adeguata coppia di *primers*, queste metodiche mostrano una notevole difficoltà nel poter fare comparazioni tra gel diversi, soprattutto nel caso di profili complessi ed inoltre, le informazioni derivate dal sequenziamento delle bande escisse sono limitate a frammenti di 500-700bp del gene analizzato che possono portare alla mancanza della specificità richiesta per l'identificazione filogenetica di molti organismi. Come tutte le tecniche legate all'amplificazione dei geni ribosomiali, anche in questi casi, una singola banda non corrisponde necessariamente ad una singola specie batterica e ciò è dovuto a due motivi principali: bande derivate da specie diverse possono avere la stessa mobilità elettroforetica oppure, una singola specie può essere rappresentata da bande multiple, dato che praticamente tutti gli organismi possiedono più operoni per i geni ribosomiali (Nubel et al., 1997). Infine, l'intensità delle bande può non riflettere la reale abbondanza delle varie popolazioni all'interno della comunità; questi metodi sono difficilmente applicabili allo studio di comunità estremamente complesse che producono profili con centinaia di bande, e diventano quindi praticamente impossibili da distinguere. Il limite di risoluzione è circa l'1%, quindi, solo DNA derivati da organismi che rappresentano più dell'1% nella comunità studiata possono essere visualizzati (Muyzer et al., 1993; Murray et al., 1998).

3.9.2. FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)

La metodologia molecolare maggiormente applicata per caratterizzare biomasse miste è quella delle *sonde molecolari*, utilizzate con successo nel corso degli ultimi anni per monitorare *in situ* le dinamiche di popolazioni microbiche in campioni ambientali. E' importante sottolineare che per loro natura le sonde molecolari permettono di evidenziare un determinato genotipo (insieme delle proprietà del microrganismo) che non necessariamente e'

correlato ad un particolare fenotipo (proprietà espresse nelle particolari condizioni di crescita). Ciò significa che tale metodologia molecolare consente di caratterizzare comunità microbiche e studiarne la composizione nel tempo ma non fornisce informazioni riguardo alla fisiologia e quindi al ruolo svolto dalle diverse classi di microrganismi presenti. Le sonde molecolari sono costituite da sequenze di oligonucleotidi a catena corta (15-30 nucleotidi), sintetizzate in laboratorio, che possono ibridizzarsi (legarsi specificamente) con una sequenza complementare di RNA ribosomiale 16S o 23S. Tali sonde, a cui è stato precedentemente legato un composto colorato o fluorescente, messe a contatto con il campione biologico da analizzare, penetrano nelle cellule e se trovano gli acidi nucleici con sequenza complementare si legano tramite legami idrogeno. Il preparato, dopo semplice lavaggio per rimuovere le sonde non legate, può essere osservato con microscopia ad epifluorescenza. Il protocollo di utilizzo delle sonde (Amann, 1995) prevede una prima fase di fissaggio del campione (essenziale per mantenere l'integrità morfologica delle cellule in seguito all'esposizione nel corso dell'ibridazione ad elevate temperature, detergenti ed a gradienti osmotici) ed una successiva fase di ibridazione *in situ*. Utilizzando sonde marcate con coloranti diversi che fluorescono a differenti lunghezze d'onda, è possibile trattare un campione con più sonde contemporaneamente e quindi identificare e quantificare molteplici forme microbiche. Tali sonde molecolari possono essere specifiche per una particolare specie di microrganismo oppure generiche per una classe più ampia e la loro versatilità si combina con una estrema semplicità di utilizzo. L'utilizzo contemporaneo di sonde fluorescenti e di un particolare tipo di microscopio definito "laser confocale" (che consente di osservare con elevata risoluzione un singolo piano a diverse profondità nel preparato e consente di "guardare" all'interno dei campioni biologici e di creare delle immagini perfettamente tridimensionali) permette lo studio *in situ* di classi particolari di microrganismi con estrema specificità, dato che il loro riconoscimento avviene su base molecolare e di analizzare in profondità il fiocco biologico. Si possono ottenere inoltre informazioni sull'attività cellulare, dato che l'intensità del segnale fluorescente è dipendente dal numero di ribosomi presenti e quindi del grado di vitalità cellulare. L'utilizzo della tecnica FISH in studi condotti su impianti di trattamenti riguardano vari aspetti come ad esempio la caratterizzazione dei batteri coinvolti nella degradazione di estrogeni presenti nelle acque (Thayanukul et al., 2010), gli effetti della variazione del pH sulla popolazione batterica (Zheng et al., 2010), lo studio dei batteri implicati nei fenomeni di bulking (Levantesi et al., 2004).

SCOPO DEL LAVORO

Oggi, l'industria casearia è considerata la più grande fonte di acque reflue nell'ambito dell'industria agro-alimentare. I reflui sono composti dal latte, dall'acqua utilizzata nelle operazioni di pulizia, sanificazione, riscaldamento, raffreddamento, lavaggio dei pavimenti e dal siero di latte. I volumi sono variabili, e generalmente sono tre volte il volume di latte lavorato, mentre la concentrazione di sostanza organica, è compresa nel range 0,8-7,0 gCOD l⁻¹ (Britz et al., 2006). I reflui caseari richiedono, quindi, trattamenti appropriati (Direttiva UE 2000/60/CE) per soddisfare gli standard di scarico degli effluenti e ridurre il rischio dei problemi ambientali quali l'eutrofizzazione in fiumi, laghi e acque costiere. Gli impianti tradizionali di depurazione per il trattamento di reflui lattiero-caseari si basano principalmente sul sistema aerobico a fanghi attivi con processi che coinvolgono il metabolismo aerobico microbico di grassi, lattosio e proteine. Il trattamento anaerobico può, infatti, essere inibito dalla presenza di grassi che causano una bassa resa nella rimozione dei nutrienti (Vidal et al., 2000) ed, al tempo stesso, è generalmente considerato più adatto per alti carichi organici come, ad esempio, gli effluenti che includono elevate aliquote di siero di latte (Britz et al., 2006; Kushwaha et al., 2011). Il sistema a fanghi attivi consiste in un complesso ecosistema microbico costituito dalla popolazione dei protozoi e la comunità batterica che rimuovono le sostanze organiche e nutrienti dai reflui (Metcalf & Eddy, 2003 ;Seviour & Nilsen, 2010). La comunità batterica agisce in maniera diretta accrescendosi grazie al consumo del substrato inquinante, i protozoi intervengono sia in maniera diretta che indiretta nel processo di depurazione. In maniera diretta, consumando il substrato inquinante (Akpore et al., 2007, 2008) e predando i batteri dispersi nel mixed liquor la cui presenza nell'effluente finale può causare l'aumento di COD e BOD (Nicolau et al., 2001; Madoni, 2002); in maniera indiretta, regolando, mediante l'attività di predazione, i processi della biomassa batterica.

Per ottenere un sistema performante è fondamentale quindi che vi siano le condizioni adatte per permettere lo sviluppo di un fango attivo con caratteristiche che favoriscono la presenza dei protozoi, in particolare dei ciliati sessili e mobili. E' importante quindi il monitoraggio dell'abbondanza dei protozoi e della diversità come indicatore dello stato del sistema a fanghi attivi; questo è tecnicamente possibile, essendo rapida l'identificazione diretta delle specie in base al loro comportamento e morfologia (Seviour & Nielsen, 2010). A questo proposito, Madoni (1994b) ha introdotto un indice oggettivo, l'Indice Biotico del Fango (SBI), in base alla presenza e l'abbondanza di alcuni gruppi protozoi chiave che fornisce un valore numerico

che consente all'operatore di controllare le prevalenti condizioni operative dell'impianto e prestazioni su base giornaliera. Negli ultimi dieci anni, diversi studi hanno avuto lo scopo di dimostrare l'applicabilità della SBI, come uno strumento di monitoraggio utile per valutare la salute fanghi impiegando diverse tipologie di impianti di depurazione e / o acque di scarico con presenza di sostanze tossiche (ad esempio, cromo VI, rame, fenolo e cianuro) (Papadimitriou et al., 2007; Drzewickia & Kulikowska, 2011). Anche se la maggior parte degli studi ha evidenziato una correlazione diretta tra SBI elevati e buone performance del sistema di trattamento, l'indice non sembra essere sempre affidabile (Arévalo et al., 2009; Drzewickia & Kulikowska, 2011).

Inoltre, nonostante l'importanza della comunità batterica negli impianti a fanghi attivi, le informazioni sul loro ruolo ecologico nei sistemi di trattamento delle acque reflue è abbastanza limitato. Le tecniche microbiologiche convenzionali, basate sull'approccio coltura-dipendenti, si sono infatti dimostrate insufficienti, perché i batteri coltivabili rappresentano solo una piccola parte di tutta la comunità presente in questo complesso ecosistema. Al contrario, i metodi molecolari basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) mediante amplificazione di geni codificanti RNA ribosomiale (rRNA 16S), permettono di ottenere un profilo della comunità batterica sulla base della diversità della sequenze, evitando le distorsioni associate alla coltura in laboratorio. Tra i metodi di fingerprinting genetico, l'analisi dei geni 16S rRNA mediante elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE), permette la visualizzazione diretta e rapida nel confronto della struttura delle comunità batteriche, dimostrandosi utile nelle indagini sull'ecologia microbica dei fanghi attivi (Sanz & Kochling, 2007). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di testare l'applicabilità di un sistema aerobico con tre reattori a cascata per il trattamento di reflui caseari. Infatti, a parità di volume complessivo del sistema, i reattori a cascata possono conseguire un'efficacia di trattamento maggiore rispetto ad un singolo reattore completamente miscelato, o anche assicurare una capacità depurativa più elevata (Metcalf & Eddy, 2003).

Oltre alla valutazione della performance dell'impianto si è studiata la struttura della popolazione dei protozoi e della comunità batterica nei tre reattori e la loro dinamica nel tempo. Si è cercato inoltre di approfondire le relazioni che intercorrono tra i due grandi gruppi microbici che costituiscono il cuore dei sistemi a fanghi attivi. Sono stati, inoltre, approfonditi i rapporti tra le performance di degradazione ed il microbiota nel fango attivo. In questo contesto è opportuno notare che, per quanto a nostra conoscenza, non sono mai stati riportati studi sul monitoraggio e studio combinato delle due popolazioni (batterica e dei protozoi) del

fango attivo al fine di valutare le possibili relazioni tra queste comunità microbiche e le performance del sistema.

L'ultima parte dello studio riguarda l'impatto dei cicli di aerazione sulle performance ed il microbiota. L'utilizzo di un trattamento impiegando l'intermittente aerazione dei reattori in cascata con cicli alternati, fase anossica/anaerobica e fase aerobica; è stato dimostrato infatti essere l'approccio tecnologico migliore per la rimozione di carbonio, azoto e fosforo (Gutierrez et al, 2007; Kushwaha et al, 2011). Quindi, un oculato controllo del regime di aerazione rappresenta un aspetto fondamentale se si considera che una fase anaerobica prolungata può portare ad un decremento nelle performance, mentre un aerazione prolungata si può tradurre in un aliquota di ossigeno superiore a quello necessario che può causare destabilizzazione dei fanghi e costi superiori per il consumo energetico delle soffianti ed i costi di manutenzione (Britz et al, 2006).

Il capitolo "Risultati e Discussione" del presente lavoro di tesi verrà quindi articolato in 4 parti: nella prima parte verranno evidenziate le rese di rimozione sui parametri chimici da parte del sistema di trattamento con tre reattori a cascata. Nella seconda parte verrà analizzata la struttura della comunità batterica e la popolazione dei protozoi nei reattori, la loro evoluzione nel tempo ed i rapporti tra i cinque gruppi (ciliati mobili, ciliati sessili, ciliati natanti, tecamebe e flagellati) di protozoi del fango attivo. Nella terza parte saranno prese in considerazione le interazioni tra il microbiota del fango attivo e le performance di rimozione dell'impianto. L'ultima parte riguarderà il comportamento dell'impianto, dal punto di vista delle performance e delle variazioni nel microbiota, al variare del quantitativo di ossigeno fornito.

CAPITOLO IV

MATERIALE & METODI

4.1. Attività del caseificio

Il Caseificio Sini si trova presso Monterosi (VT) ed opera nell'attività casearia da oltre 45 anni. La maggior parte della lavorazione utilizza il latte di pecora, la produzione di punta riguarda il pecorino Romano DOP ed infine vengono inoltre lavorati anche formaggi freschi e ricotta. Una piccola produzione utilizza anche latte bovino e caprino. Il volume di latte generalmente lavorato è intorno ai 200 quintali al giorno. Il refluo giornaliero prodotto è generalmente 3 volte il quantitativo di latte trattato attestandosi intorno ai $45 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$. Il refluo è per la maggior parte frutto del lavaggio attrezzature e pavimenti, ed in piccola quantità per servizi igienici. Il siero, generato durante il processo produttivo, con un volume di circa $15 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$, viene stoccato in una cisterna all'esterno del caseificio e smaltito separatamente. I volumi di refluo prodotto si mantengono pressoché costanti nel corso dell'anno, mentre ci sono variazioni per quanto riguarda le caratteristiche chimico-fisiche dello stesso dipendenti dal processo produttivo.

4.2. Caratteristiche dell'impianto

L'impianto, realizzato dalla Ditta "Manzi Aurelio S.r.L. Impianti di depurazione acque", è dotato di un primo settore di accumulo ed omogeneizzazione dal volume di 200 m^3 , dal quale, mediante una pompa di sollevamento, il refluo viene indirizzato verso il pozzetto di regolazione portata, posto a circa 5 metri di altezza dal piano campagna. Il pozzetto di regolazione ripartisce parte del flusso di nuovo verso il settore di accumulo e parte del flusso verso il settore di ossidazione. Il settore di ossidazione è costituito da 3 vasche di 18 m^3 ciascuna. Le tre vasche sono collocate secondo un'altezza decrescente dalla prima alla terza e poste in serie. L'uscita del terzo settore di ossidazione è collegata a due sedimentatori, dal volume di 18 m^3 ciascuno, posti in parallelo. L'acqua chiarificata confluisce dai due settori di sedimentazione verso il pozzetto di prelievo fiscale. Tra i due sedimentatori, è collocata la vasca di digestione fanghi di supero dal volume di 18 m^3 . Il ricircolo dei fanghi dai due sedimentatori verso il primo settore di ossidazione avviene mediante un flusso in continuo. Ciascun settore di sedimentazione è dotato alle due estremità della vasca di due tubazioni che raccolgono il fango precipitato e lo ricircolano verso il pozzetto centrale di raccolta fanghi. Entrambe le tubazioni sono dotate di valvole regolabili manualmente per settarne il flusso. Dal pozzetto di raccolta mediante una pompa di rilancio i fanghi vengono inviati al primo settore. E' possibile deviare il flusso diretto verso il primo settore di ossidazione,

indirizzandolo verso il digestore, semplicemente chiudendo la valvola della tubazione di ricircolo ed aprendo quella della tubazione di smaltimento fanghi. I fanghi di supero, una volta digeriti, possono essere inviati a tre letti di essiccamento posti vicino al depuratore.

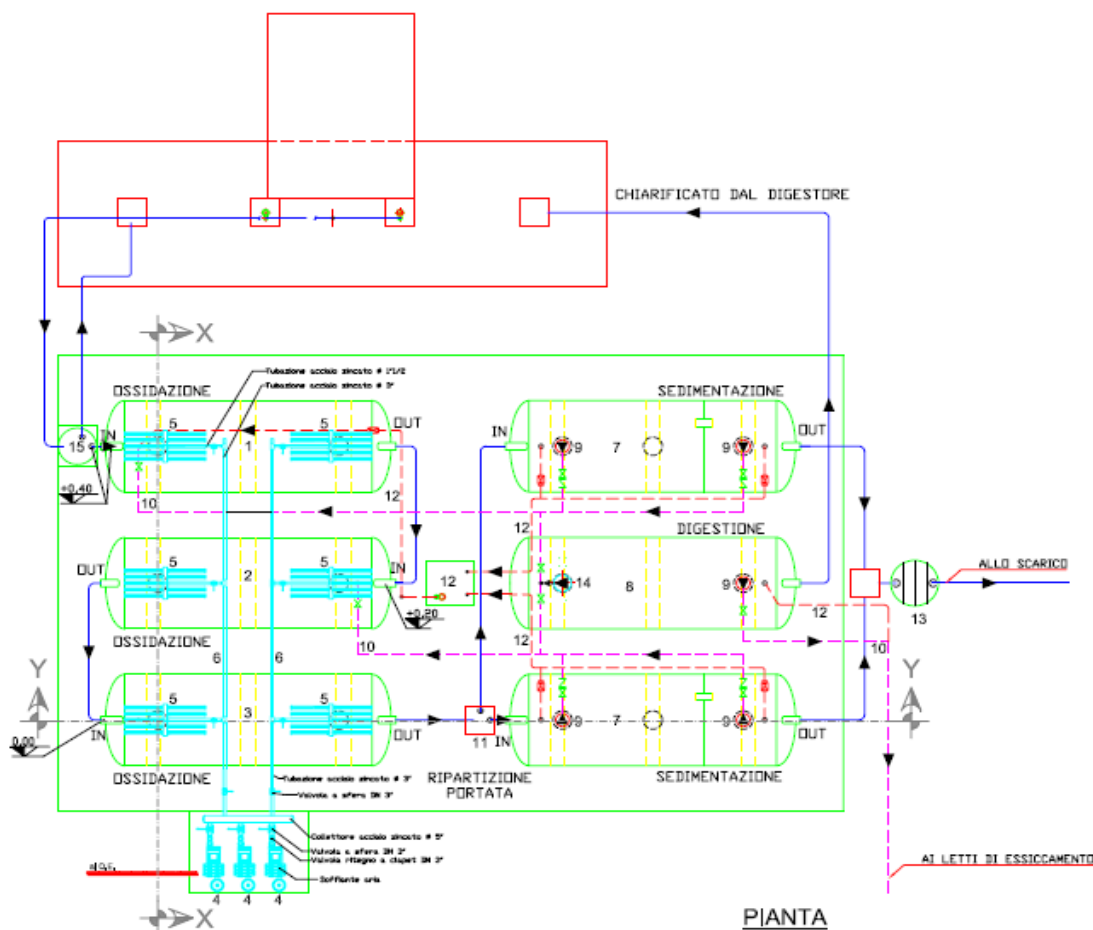


Fig. 4.1: Schema progettuale dell'impianto di depurazione installato presso Caseificio Sini, Monterosi (VT).

Il carico organico giornaliero è stato stimato pari a circa 45 KgBOD g^{-1} calcolando una portata intorno ai $45 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1}$ ed una concentrazione in ingresso media di BOD pari a 1000 mg l^{-1} . Il settore di ossidazione è costituito complessivamente da 54 m^3 di volume, può operare quindi con un Fattore di Carico (F/M) ottimale pari a $0,18 \text{ Kg BOD}_5 \text{ KgMLSS}^{-1}$, ipotizzando una concentrazione di MLSS negli ossidatori di circa $4,5 \text{ g l}^{-1}$ (243 KgMLSS in totale, sommando le biomasse di tutti e 3 i reattori). I due settori di sedimentazione sono pari a 18 m^3 ciascuno. Le soffianti sono state dimensionate considerando, come stima progettuale, di impiegare $2,5 \text{ KgO}_2$ per KgBOD_5 rimosso, per un totale di $112,5 \text{ KgO}_2$ da fornire giornalmente. Stimando una resa dei diffusori pari al 10%, l'ossigeno da fornire è risultato

pari a $1125 \text{ KgO}_2 \text{ g}^{-1}$, che in m^3 di aria è uguale a $4017 \text{ m}^3 \text{ g}^{-1}$ ($167,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$). Considerando un battente di 1,75m per i diffusori ed una pressione di esercizio stimata intorno ai 220 mBar, si è optato per 3 soffianti da $180 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ ciascuna, modello SCLK06MS da 3 kW. Sono state installate due soffianti da utilizzare in alternanza ed una di riserva, per rimediare ad eventuali guasti meccanici e punte di carico.

Tab. 4.1: Valori di calcolo per il dimensionamento dell' impianto di depurazione.

Portata Giornaliera ($\text{m}^3 \text{ g}^{-1}$)	15
BOD ₅ (mg l^{-1})	3000
Carico Organico ($\text{KgBOD}_5 \text{ g}^{-1}$)	45
Fattore di carico ($\text{KgBOD}_5 \text{ KgSS}^{-1}$)	0,18
Kg O ₂ per Kg BOD ₅ rimosso	2,5
Resa diffusori (%)	10
Quantità ossigeno necessaria ($\text{KgO}_2 \text{ g}^{-1}$)	112,5
Quantità ossigeno da fornire realmente ($\text{KgO}_2 \text{ g}^{-1}$)	1125

4.2.1. Caratteristiche costruttive dell'impianto

L'impianto è costituito di vasche in resina poliestere rinforzata con fibra di vetro (PRFV). Il PRFV è un materiale composto da una resina termoindurente rinforzata con fibra di vetro, con sovrapposizione di materiale da $300\text{-}450 \text{ g/m}^2$ fino a spessore adeguato. La resistenza alla corrosione dipende dalla resina, mentre quella meccanica dal contenuto percentuale in peso del materiale di rinforzo (vetro) e dal suo orientamento nello stratificato. Chimicamente le resine sono costituite da poliesteri lineari insaturi, sottoposti ad un processo di reticolazione mediante un agente reticolante che è in genere lo stirene. Le vasche realizzate in P.R.F.V. possiedono le seguenti caratteristiche peculiari:

- materiali termoindurenti e pertanto chimicamente definiti e quindi stabili;
- a tenuta stagna;

- atermiche e con ottimo contenimento di sbalzi di temperatura;
- leggerezza (stima circa 1.5 - 1.8 Kg/m²/mm di spessore);
- resistenti a traffico veicolare almeno di classe D400 ai sensi della EN UNI 124 e meccanicamente resistenti alle operazioni di trasporto, e movimentazione in cantiere;
- facilmente ispezionabili con aperture almeno 800x800mm



A



B



C

Fig 4.2 A-C: Foto dei tre reattori a cascata dell'impianto di depurazione per il trattamento dei reflui caseari installato presso il Caseificio Sini, Monterosi (VT) (A).

Letti di essiccamento per lo smaltimento dei fanghi di supero (B).

Foto del sistema di aerazione costituito da tre soffianti unite da un collettore (C).

4.3. Modalità di campionamento e parametri analizzati

I campionamenti sono avvenuti presso il depuratore del caseificio Sini, con cadenza periodica settimanali e bisettimanale per un periodo di 22 mesi a partire da Giugno 2009.

Venivano campionati i seguenti 5 punti nell'impianto:

A: Pozzetto regolatore di portata (IN)

B: Primo reattore biologico (R1)

C: Secondo reattore biologico (R2)

D: Terzo reattore biologico (R3)

E: Pozzetto di prelievo fiscale (OUT)

F: Linea di ricircolo fanghi (RF)

Per quanto riguarda i tre reattori biologici (R1, R2 e R3) venivano prelevati 2 campioni, uno sul surnatante (dopo sedimentazione naturale) e l'altro sul liquido tal quale (mixed liquor). Per avere campionamento in doppio, un altro prelievo veniva effettuato dopo trenta minuti negli stessi punti e con le stesse modalità.

Presso l'impianto venivano determinati i seguenti parametri:

- Ossigeno disciolto (OD);
- pH;
- Potenziale di ossido riduzione (ORP);
- Solidi sedimentabili in 30 minuti (MS 30);
- Temperatura (T).

I parametri chimico-fisici analizzati in laboratorio erano:

- Anioni inorganici (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+);
- BOD₅ (Domanda Biologica di Ossigeno);
- COD (Domanda Chimica di Ossigeno);
- MS30 (Solidi sedimentabili in 30 minuti);
- Solidi sospesi;
- Tensioattivi MBAS (Methylen Blue Active Substances) e BIAS (Bismute Active Substances);
- Salinità.

I campioni di mixed liquor dei tre reattori biologici (R1, R2 e R3) venivano trasportati in laboratorio entro circa 40 minuti dal prelievo e venivano tenuti in aerazione per la durata delle prove.

4.3.1. Determinazione di OD, ORP, pH, T

La lettura dell'OD e T era effettuata mediante misuratore portatile Hach Lange (mod. LQ20, Lainate, Italy); l'ORP e pH mediante misuratore portatile Hanna Instruments (mod. HI 831401). L'OD, ORP e T venivano misurati sui settori R1, R2 e R3. Il pH veniva misurato su tutti i punti di campionamento.

4.3.2. Determinazione dei solidi sospesi (SS)

I solidi sospesi erano determinati filtrando un campione di 10ml con un filtro di porosità 1 μ m precedentemente pesato su vaschetta. L'aliquota di refluo filtrato poteva essere abbassata a 5ml nel caso in cui l'elevata concentrazione di solidi sospesi avesse impedito il passaggio di liquido attraverso il filtro. La vaschetta con il filtro veniva poi posta in stufa a seccare alla temperatura di 105°C per un giorno. I solidi sospesi erano espressi come grammi di sostanza secca pesata (mg) su unità di volume (litri) (APHA, 2005). La misurazione veniva effettuata sui campioni IN, mixed liquor di R1, R2, R3, OUT e RF.

4.3.3. Determinazione dei solidi sedimentabili in 30 minuti (MS30)

I solidi sedimentabili in 30 minuti erano misurati sul campo per campioni liquidi (1 litro) prelevati dai settori R1, R2 e R3 mediante lettura del volume di sedimentazione su un cono IMHOFF. Il dato era espresso come volume del sedimento (ml) per litro (l) di liquido prelevato. Lo SVI (Sludge Volume Index), indice di sedimentabilità dei fanghi attivi, veniva calcolato secondo la modalità descritta nel Par. 3.7.3.

4.3.4. Determinazione del BOD₅

Per la determinazione del BOD₅ veniva utilizzato l'apparato BOD System 6 (VELP Scientifica srl, Milano, Italia). Venivano riempite 5 bottiglie, una con 100 ml di campione IN scala 0-900, 3 con 250ml del surnatante dei campioni R1, R2 e R3, scala 0-350, una bottiglia con 250ml di campione OUT scala 0-350. Le 5 bottiglie venivano poi inoculate con 2ml di una sospensione in soluzione di una cultura fresca di *Pseudomonas* sp. e veniva aggiunta un'ancoretta magnetica. Il bianco si otteneva riempiendo una bottiglia con 250ml di acqua, inoculando come descritto in precedenza. Sopra ogni bottiglia veniva posta una provetta contenente cotone ed una soluzione di 2ml di KOH satura. Le sei bottiglie inoculate venivano poi poste in agitazione all'interno di un termostato, alla temperatura di 20°C, per 30-40 minuti, al fine di acclimatare i campioni. Passato questo tempo si stringevano i tappi sulle bottiglie e si avviavano i sensori digitali. Dopo 5 giorni si otteneva per ogni campione la

lettura direttamente sulla scala in $\text{mg l}^{-1} \text{ O}_2^{-1}$. A questo valore veniva sottratto la concentrazione letta sull'apposita scala del bianco.

4.3.5. Determinazione del COD

La determinazione del COD (Chemical Oxygen Demand) consente il dosaggio delle sostanze ossidabili chimicamente da parte di un energico ossidante (Bicromato di potassio, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) in soluzione fortemente acida (APHA, 2005). La misurazione veniva effettuata sui campioni IN, surnatante di R1, R2, R3 ed OUT.

Per la determinazione veniva usato un incubatore ad alta temperatura modello ECO 6 (Velp Scientifica s.r.l., via Stazione 16, Usmate, (MI)).

Reagenti usati:

- Soluzione di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.25N;
- Solfato di mercurio;
- Ag_2SO_4 in H_2SO_4 concentrato;
- Soluzione standard di $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ca.0.1N;
- Indicatore: o-fenantrolina-ferroso-solfato.

Procedimento: 10 ml della soluzione di bicromato, miscelati nell'ordine con una punta di spatola di solfato di mercurio, 30 ml di acido solforico concentrato e 20 ml di campione o di bianco, erano fatti bollire per 2 ore in provette dotate di refrigerante a ricadere, alla temperatura di 200°C . Al termine delle due ore si lasciava raffreddare, poi si aggiungevano 80ml di acqua deionizzata e 3-4 gocce di indicatore. A questo punto si retrotitolava l'eccesso di bicromato con la soluzione di solfato ferroso ammonico (viraggio dal verde all'arancio). Il valore di COD del campione era calcolato attraverso la seguente formula:

$$\text{COD (mg l}^{-1}\text{)} = (V_1 - V_2) * N * 8000 V^{-1}$$

In cui V_1 era il volume di solfato ferroso ammonico usato per la titolazione del bianco, V_2 il volume utilizzato per la titolazione del campione analizzato, V il volume del campione sottoposto in analisi, N la normalità del solfato ferroso ammonico e 8000 il peso equivalente dell'ossigeno in mg.

4.3.6. Determinazione dei tensioattivi anionici (MBAS)

Per la determinazione dei tensioattivi MBAS si utilizzava il metodo al blu di metilene. La misurazione veniva effettuata previa filtrazione su membrane da 1 μ sul campione IN di R1, R2, R3 ed il campione OUT.

Procedimento:

- si mettevano in una cuvetta 4 ml di diclorometano;
- si aggiungevano 0,5 ml di blu di metilene (soluzione 600 mg l⁻¹);
- si procedeva con l'estrazione;
- si effettuava la lettura del bianco al fotometro con filtro a 605 nm;
- si aggiungeva il campione e si estraeva.

Dal valore dell'assorbanza del campione analizzato, si ricavava mediante la curva di taratura la quantità in mg di tensioattivi anionici (MBAS) presenti nel campione. La concentrazione di tensioattivi anionici era data dalla seguente formula:

$$C = a/V$$

dove:

C= concentrazione (mg l⁻¹) di tensioattivi anionici MBAS (come dodecibelbenzenesolfonato di sodio);

a= quantità (μ g) di tensioattivi anionici, come MBAS, ricavati dalla curva di taratura;

V= volume (mL) di campione prelevato per l'analisi.

4.3.7. Determinazione dei tensioattivi non ionici (BIAS)

Per la determinazione dei tensioattivi BIAS si utilizzava il metodo rapido fotometrico con iodio. La misurazione veniva effettuata previa filtrazione su membrane da 1 μ sul campione IN di R1, R2, R3 ed il campione OUT.

Procedimento:

- si aggiungeva in una cuvetta 5 ml di tampone (soluzione tamponata a pH 5 di acetato di sodio triidrato e acido acetico);
- si portava a volume e si leggeva il bianco con fotometro con filtro a 520 nm;
- si aggiungeva il campione;
- si leggeva il valore sul fotometro.

Il valore dei tensioattivi (mg l⁻¹) si otteneva mediante lettura su retta di taratura. I tensioattivi totali erano dati dalla somma dei tensioattivi MBAS e dei tensioattivi BIAS.

4.3.8. Determinazione dell'azoto ammoniacale

L'azoto ammoniacale era determinato spettrofotometricamente secondo i metodi ufficiali di analisi (APHA, 2005). Veniva effettuata la misurazione dei campioni IN, sul surnatante di R1, R2, R3 ed OUT.

Reagenti usati:

- Sodio dicloroisocianurato 0,200 g + NaOH 2,0 g sciolti in 100 ml di acqua deionizzata (soluzione A);
- Fenolo 3,5 g + nitroprussiato 0,040 g sciolti in 100 ml di acqua deionizzata (soluzione B);
- Trisodio citrato 14,0 g + NaOH 0,5 g sciolti in 100 ml di acqua deionizzata (soluzione C).

Procedimento: 100 ml di campione erano miscelati a 1 ml di ciascun reattivo (aggiunti in quest'ordine: C, B, A), quindi incubati per circa 1 ora. Le letture spettrofotometriche erano effettuate contro bianco a 635 nm. La retta di taratura era ottenuta utilizzando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per analisi a titolo noto.

4.3.9. Determinazione dell'azoto e fosforo totale

Il metodo si basava su una preliminare trasformazione di tutti i composti dell'azoto e del fosforo totale, organici ed inorganici, a nitrato ed ortofosfato, rispettivamente, mediante ossidazione con una miscela di perossidisolfato, acido borico e idrossido di sodio. Poiché per l'ossidazione di composti azotati era necessaria una miscela ossidante alcalina, mentre l'ossidazione dei composti del fosforo doveva essere condotta in ambiente acido, la miscela impiegata nel metodo assicurava condizioni ottimali di pH (9,7 all'inizio e 5-6 alla fine della reazione) per la trasformazione simultanea dei composti in questione. Il procedimento prevedeva come prima fase la digestione del campione. A 50 mL di campione si aggiungevano 7 mL di miscela ossidante (potassio perossidi solfato, acido borico cristallino, sodio idrossido) e 0,3 g di $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. I campioni andavano posti in autoclave a 120°C per 30 minuti. La determinazione del valore del bianco procedurale, era ottenuta sottoponendo a digestione 50 mL di acqua deionizzata secondo le modalità indicate, era di fondamentale importanza in quanto il perossidisolfato contiene sempre tracce di azoto. Al termine della digestione i campioni andavano lasciati raffreddare all'aria e, se necessario, filtrati con filtri di 0,4 μm di porosità (es. policarbonato) esenti da azoto e fosforo, trasferendo tutta l'aliquota digerita in una beuta da 100 mL. Per quanto riguardava la determinazione dell'azoto totale, si prelevavano 10 mL dal campione digerito, utilizzando una pipetta automatica con puntali

monouso, trasferendo l'aliquota in una beuta da 25 mL. Si acidificava il tutto con 0,15 mL di H_2SO_4 concentrato e portato a volume. Si misurava l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 220 nm, impiegando celle di quarzo di 1 cm di cammino ottico, contro un bianco preparato seguendo le stesse modalità del campione. Per quanto riguarda la determinazione del fosforo totale, si aggiungevano ai rimanenti 47 mL di campione nell'ordine: 1,25 mL di soluzione riducente e dopo circa 2 minuti, 1,25 mL di miscela di reagenti (Soluzione di antimonio potassio tartrato, Soluzione di ammonio eptamolibdato). La lettura spettrofotometrica si eseguiva dopo 5 minuti alla lunghezza d'onda di 882 nm, utilizzando celle di percorso ottico opportuno. Dal valore di assorbanza dei campioni, sottratti del valore del bianco procedurale, si risaliva mediante la curva di taratura alla concentrazione di azoto totale e fosforo totale.

4.3.10. Determinazione degli anioni inorganici

La concentrazione degli anioni Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} era determinata mediante cromatografia ionica. La misurazione veniva effettuata sui campioni filtrati di IN, R1, R2, R3 ed OUT. L'apparecchio utilizzato, il cromatografo ionico della Shimadzu, si componeva di un sistema di pompaggio per l'eluente modello LC-10AT_{VP} prodotto dalla Shimadzu; una precolonna modello Shodex IC SI-90G con una colonna di scambio anionico modello Shodex IC SI-50 4E; un sistema di soppressione del segnale dell'eluente modello SeQuant Anion Membrane Suppressor (SAMS) con annesso sistema di rigenerazione del soppressore modello SeQuant Continuous Anion Regeneration System (CARS); un rilevatore modello CDD-10A_{VP} prodotto dalla Shimadzu. La determinazione dei nitriti e dei nitrati è stata effettuata mediante rivelatore UV a 210 nm per evitare interferenze con l'intenso dei segnale dei cloruri.

L'eluente usato per questo tipo di colonna era un tampone costituito da Na_2CO_3 3.2 mM e NaHCO_3 1.0 mM. con un flusso eluente pari a 0.8 ml/min.

La concentrazione dei suddetti anioni era ottenuta mediante una retta di taratura realizzata con standard esterni.

4.3.11. Efficienza di rimozione

L'efficienza di rimozione veniva calcolata per i parametri chimici applicando la seguente formula:

$$RE(\%) = \frac{C_{in} - C_{eff}}{C_{eff}} \cdot 100$$

Dove C_{in} e C_{eff} erano la concentrazione del componente in esame (es. COD, BOD o Ammoniacca) rispettivamente del refluo in ingresso e del terzo reattore R3 dopo sedimentazione naturale. I dati riportati erano la media della concentrazione dei due campioni prelevati sui punti presi in considerazione.

4.4. Conta ed identificazione dei protozoi del fango attivo

Il conteggio e l'identificazione della popolazione dei protozoi sono state effettuate utilizzando 25 μ l di mixed liquor (ciascuna in duplicato) dei tre reattori aerati (R1, R2 e R3). Un microscopio a contrasto di fase (Labolux 11, Leitz) è stato utilizzato con un ingrandimento 100X per la conta totale, mentre per la differenziazione e l'identificazione delle specie sono stati utilizzati ingrandimenti superiori fino a 400X, a seconda delle dimensioni dei protozoi, mentre come guida di riconoscimento sono state impiegate le chiavi di Foissner et al. (1991, 1992, 1994, 1995) e Curds et al. (2008). Per il conteggio dei piccoli flagellati è stata utilizzata la camera di Fuchs-Rosenthal, secondo le linee guida di Madoni (1994). Oltre ai protisti, anche i piccoli metazoi sono stati inclusi nella conta. L'indice SBI è stato calcolato utilizzando la metodologia descritta da Madoni, 1994b e riportata nel Par. 3.9. Sono stati calcolati inoltre gli indici di diversità: la Richness (R) è stata determinata dal numero di taxa osservati per l'identificazione, mentre l'indice di Shannon-Weaver (H) è stato calcolato utilizzando il Software Past (versione 1.94b). Gli indici erano calcolati utilizzando i campioni prelevati in doppio mediando i risultati per ciascun reattore.

4.5. Analisi molecolare della popolazione batterica del fango attivo

I campioni del mixed liquor dei tre reattori (R1, R2 e R3) venivano centrifugati per 5 minuti (10 g) mediante centrifuga ALC e sottoposti ad analisi molecolare mediante Elettroforesi su Gel in Gradiente Denaturante (DGGE).

4.5.1. Estrazione del DNA dai campioni di fango attivo

Il DNA è stato estratto dai campioni utilizzando “PowerSoil DNA Extraction Kit” (MoBio Laboratories, USA) seguendo le istruzioni fornite dal produttore, con la sola modifica di un’ulteriore fase di lisi cellulare, oltre a quella prevista, riscaldando il campione a 70°C per 10 min. Il DNA è stato quantificato spettrofotometricamente misurando l’assorbanza dei campioni alla lunghezza d’onda di 260nm.

4.5.2. Amplificazione del gene ribosomiale 16S ed analisi DGGE

Dal DNA metagenomico è stata amplificata la regione ipervariabile V3 del gene ribosomiale 16S utilizzando i primers: 341F (ATTACCGCGGCTGCTGG) e 534R (ATTACCGCGGCTGCTGG) (Muyzer et al., 1993) ottenendo un frammento di circa 200bp. All’estremità 5’ del primer 341F era legata una sequenza di circa 40 pb ricca in G e C detta GC-clamp necessaria a stabilizzare gli amplicons durante la separazione in DGGE.

Per ogni campione si utilizzava il seguente mix di reazione:

- DNA template: 10 ng;
- illustra™ HotStart Master Mix (GE Healthcare, UK): 1X;
- Forward primer: 0,4 µM;
- Reverse primer: 0,4 µM.

Le reazioni venivano condotte con un programma termico Touch-Down (Muyzer et al., 1993): la denaturazione del template effettuata a 95°C per 2 min era seguita dalla fase di annealing durante la quale la temperatura veniva ridotta di 0,5°C ad ogni ciclo partendo da 65°C fino a scendere a 55°C, temperatura alla quale venivano effettuati ulteriori 10 cicli. Per ogni campione venivano effettuate reazioni di amplificazione in triplicato e i prodotti ottenuti venivano uniti e quindi concentrati con filtri Microcon Y-100 (Millipore, Bedford, MA) e separati su gel d’agarosio all’1,5% contenente etidio bromuro. L’analisi DGGE dei frammenti è stata effettuata con il sistema INGENY phorU-2. (Ingeny International BV, Goes, NL). In particolare, per la corsa elettroforetica, è stato utilizzato un gel di poliacrilammide al 6% in

TAE 0,5X (20mM Tris, 10 mM acetato, 0.5 mM Na₂EDTA; pH 7.8) contenente un gradiente lineare di urea-formamide da 40 a 60% [dove: 100% corrisponde ad urea 7 M e formamide deionizzata 40% (v/v)]. La corsa elettroforetica è stata condotta per 16 ore a 100 V alla temperatura costante di 60°C. Il gel è stato colorato con SYBR Gold (Invitrogen) in TAE 1X a temperatura ambiente per 45 min e l'immagine è stata rilevata per mezzo di un transilluminatore UV dotato di macchina fotografica (ChemiDoc, BioRad).

4.5.3. Analisi digitale e statistica dei profili DGGE

L'analisi delle immagini relative alle corse elettroforetiche in DGGE veniva effettuata attraverso l'utilizzo del software Quantity-one image analysis (versione 4.2.5 Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) stimando la biodiversità delle specie batteriche nei diversi campioni attraverso i seguenti indici:

Richness (R): numero di bande in ogni linea;

Indice di Shannon-Weaver (H) = $-\sum (n_i/N) \log(n_i/N)$;

dove:

n_i = altezza del picco relativo ad ogni banda;

N = somma di tutti i picchi relativi alle bande di una linea.

Inoltre, attraverso l'analisi dell'immagine era possibile generare dei dendrogrammi sulla base della matrice di similarità calcolata utilizzando l'indice di Dice.

Gli indici erano calcolati utilizzando i campioni prelevati in doppio mediando i risultati per ciascun reattore.

4.6. Variazione dei regimi di aerazione

Sei differenti regimi di aerazione sono stati testati variando il ciclo ON / OFF della soffiante come segue (in minuti on/off): 45/15 (corrispondente a 90,6 KgO₂ g⁻¹), 15/15 (60,4 KgO₂ g⁻¹); 15/45 (30,2 KgO₂ g⁻¹), 30/30 (60,4 KgO₂ g⁻¹), 30/45 (45,4 KgO₂ g⁻¹), 30/60 (40,2 KgO₂ g⁻¹). Ogni regime era applicato almeno due settimane con i campioni di acque reflue influente, mixed liquor dei tre reattori aerati, effluenti liquidi e fanghi di ricircolo preso ogni settimana in duplicato. Salvo diversamente indicato, i dati riportati nelle tabelle e le figure sono sempre riferita ai campioni prelevati dopo due settimane dal cambiamento del regime di aerazione.

4.7. Analisi Statistica

Due tipi di analisi statistica sono state applicati in questo studio: analisi di correlazione (p) Pearson, e l'analisi PCA (Principal Component Analysis). Per il calcolo del coefficiente di correlazione si è utilizzato il software SigmaStat 3.5. Per l'applicazione dell'analisi PCA si sono normalizzate le variabili applicando la trasformazione logaritmica $x = \ln(x+1)$. Il software impiegato per il calcolo era Past versione 1.94b.

CAPITOLO V

Risultati & Discussione

5.1. Caratteristiche del refluo e condizioni operative dell'impianto

5.1.1. Caratteristiche dell'influente

Durante la sperimentazione il carico organico dell'influente ha fatto registrare un'elevata variabilità come si può desumere dalla Tab. 5.1. Il refluo presentava, nei periodi di alto carico, un valore di COD vicino a quello indicato da Koyuncu et al. (2000). L'attenta gestione nello smaltimento del siero da parte del caseificio ha fatto in modo che i valori del carico organico in ingresso si mantenessero sempre entro limiti accettabili per il trattamento biologico. L'unica volta che si è verificato uno sversamento accidentale di una cospicua quantità di siero all'interno dell'impianto i valori di COD e BOD hanno superato i 12000 mg l⁻¹. Il rapporto tra BOD/COD si attestava mediamente sul 61%, un rapporto che indica un refluo rapidamente biodegradabile (Luck, 1996). La concentrazione in solidi sospesi era in linea con quanto trovato dagli altri autori (Koyuncu et al., 2000; Passeggi et al., 2009), mentre la frazione dei solidi era per lo più costituita dall'aliquota in sospensione, visto che i solidi sedimentabili erano molto pochi o assenti. La frazione azotata era costituita quasi unicamente da azoto ammoniacale; probabilmente il lungo tempo di permanenza nel settore di sedimentazione primaria (circa 106 ore) favoriva la conversione della frazione organica in ione ammonio mediante il processo di ammonificazione (Grady et al., 1999). I valori di azoto totale misurati erano vicini al range trovato da Passengi et al. (2009) (14-90 mg l⁻¹), ma molto lontani da quelli trovati da Arbeli et al. (2006) che riferivano un valore di TKN pari a 329 mg l⁻¹. Anche la concentrazione di fosfati era molto variabile nel corso dell'anno, tuttavia il range di valori trovato risulta in linea con quello riportato da altri autori (Kasapgil et al., 1994; Koyuncu et al., 2000; Schwarzenbeck et al., 2005). Per quanto riguarda i tensioattivi si misurava generalmente una concentrazione più alta di quelli anionici (MBAS) rispetto a quelli non ionici (BIAS), probabilmente dovuta al tipo di detergenti utilizzati per la pulizia del caseificio. I tensioattivi anionici rappresentano comunque la maggior classe dei tensioattivi utilizzata nei detergenti e costituiscono circa il 41% dei tensioattivi utilizzati (Bizukojc & Bizukojc, 2006). I cloruri erano mediamente molto più alti di quanto indicato da Passeggi et al. (2009) (160–1760 mg l⁻¹) e prossimi a quanto indicati da Arbelli et al. (2006) (4890 mg l⁻¹), visto il cospicuo utilizzo di sale nel processo di salagione per la produzione del Pecorino Romano. Il pH in ingresso era in media leggermente acido, con un valore di 6,5, arrivando a toccare punte acide di 4,3. Non si sono registrati invece valori basici come riportato da altri autori (Gutierrez et al., 1991; Kasapgil et al., 1994; Ince, 1998); probabilmente, nel caso da noi esaminato si preferiva un utilizzo contenuto di prodotti alcalini, o altri prodotti basici, per i processi di sanificazione dei serbatoi.

Tab. 5.1: Caratteristiche chimico–fisiche misurate sul refluo nell’arco della sperimentazione. Si riporta il range dei valori e la media su tutti i campionamenti effettuati.

	Unità di misura	Range	Media
Domanda chimica d’ossigeno (COD)	mg l ⁻¹	288-1928	897,8
Domanda biologica d’ossigeno (BOD ₅)	mg l ⁻¹	145-913	514
Azoto ammoniacale (NH ₃ -N)	mg l ⁻¹	3,42-50,02	24,2
Azoto nitroso (NO ₂ -N)	mg l ⁻¹	0-0,87	0,13
Azoto nitrico (NO ₃ -N)	mg l ⁻¹	0-3,38	2,34
Fosfati (PO ₄ -P)	mg l ⁻¹	0,33-10,63	12,53
Cloruri (Cl)	mg l ⁻¹	114,7-10256,4	3092,84
Tensioattivi anionici (MBAS)	mg l ⁻¹	0,38-12,2	4,07
Tensioattivi non ionici (BIAS)	mg l ⁻¹	0,27-8,76	1,51
Solidi Sospesi Totali (SS)	mg l ⁻¹	100-1535	332
pH		4.3-7.1	6,48

5.1.2. Condizioni operative

L'impianto ha iniziato ad operare nel Luglio 2009; il settaggio per la fase di Start-up prevedeva una portata in ingresso (Q_i) pari a circa $15 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$ con un tempo di ritenzione idraulica per singolo reattore circa 29 ore, un flusso di ricircolo (Q_r) pari a $35 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$ mentre il fango di supero smaltito (Q_s) era pari a $1 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$. Le due soffianti operavano in alternato con un ciclo di ossigenazione "On/Off" pari a 45/15 min. L'ossigeno insufflato era pari a $90,6 \text{ KgO}_2 \text{ g}^{-1}$. Dopo 70 giorni, una volta raggiunto un rendimento soddisfacente, la portata era incrementata a circa $45 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$ (con un tempo di ritenzione idraulica per singolo reattore circa 9,6 ore), la portata di ricircolo era aumentata a $100 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$ mentre i fanghi di supero smaltiti erano pari a $3 \text{ m}^3\text{g}^{-1}$. La quantità di ossigeno fornita rimaneva invariata. Nell'intervallo 336-525 (giorni) si è proceduto a modificare i regimi di ossigenazione mantenendo costanti i parametri Q_i , Q_r e Q_s . Nell'intervallo 532-651 (giorni) si è monitorato l'impianto per vedere il comportamento a seguito dello smaltimento di siero nell'impianto.

5.2. Efficienza di rimozione dei tre reattori a cascata

5.2.1. Efficienza complessiva calcolata tra influente ed effluente

L'impianto ha mostrato una ottima resa di abbattimento (In-Out) sui parametri presi in considerazione (Tab. 5.2). I dati sono stati estrapolati considerando il massimo periodo di funzionalità dell'impianto; comunque, sono state escluse la fase di Start-Up dell'impianto (0-90 giorni), i due campionamenti eseguiti in regime di scarsa ossigenazione (371-525 giorni) e la fase successiva allo sversamento di siero all'interno dell'impianto (532-651 giorni).

Questi valori di abbattimento sono in linea con quanto riportato da altri autori per questo refluo su altre tipologie di impianto a fanghi attivi. Carta et al. (1999) riportavano valori di abbattimento del 92-98% sul COD per un impianto pilota aerobico con supporti in plastica, mentre Andreottola et al. (2002) indicavano valori di abbattimento sul COD superiori all'80% per un impianto pilota MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor). Altri autori (Fang et al., 2000) considerando il BOD e l'azoto totale (TKN) raggiungevano efficienze di rimozione pari al 90 e 91%, rispettivamente, su un impianto pilota con tre reattori sequenziali. Anche Schwarzenbeck et al. (2005) che utilizzavano un impianto pilota con tecnologia SBR (Sequential batch reactor) a fanghi granulari indicavano valori di abbattimento del COD del 90%. Le rese più alte (efficienze di abbattimento del 99,5% del COD e 95% sul TKN) venivano riportate da Torre et al. (2004) con una tecnologia SBR. Ahn e Park (2008) descrivevano per 9 impianti con tecnologia SBR operanti in Wisconsin, una rimozione dei

fosfati nel range 42,2 - 91%. Non sono invece disponibili dati sulla rimozione dei tensioattivi su questa tipologia di refluo trattata con il sistema a fanghi attivi.

Tab. 5.2: Range e valore medio della efficienza di rimozione (ER) su alcuni parametri chimici calcolato tra IN e OUT. E' riportato anche il valore medio in uscita (OUT) rispetto ai limiti di legge secondo Dgls.152/2006 (Tab.3 All.5 Scarico in Acque Superficiali)

	COD	BOD	NH ₄	PO ₄	Tensioattivi totali
ER range (%)	77-97	85-98	79-100	0-92	51-95
ER media (%)	90	93	94	72	80
OUT medio (mg l ⁻¹)	80	24	1,1	3	0,85
OUT limite Tab.3 All.5 (mg l ⁻¹)	160	40	15	10	4

5.2.2. Abbattimento del substrato organico

L'andamento dell'efficienza di rimozione del substrato organico è un parametro chiave per valutare l'efficienza del processo depurativo (Wang et al., 2010). La rimozione del COD e BOD avveniva per la maggior parte nel settore R1, il tasso di rimozione del substrato (Fig. 5.1A) era più alto in questo settore rispetto agli altri due (R2 e R3) a causa del consumo del COD rapidamente biodegradabile (Metcalf & Eddy, 2003). E' noto, infatti, che il refluo caseario presenta una cospicua componente di lattosio, un substrato rapidamente biodegradabile da parte della microflora batterica (Farizoglu & Uzuner, 2011). I reattori R2 e R3 presentavano tassi di rimozioni del substrato molto più bassi, ma erano comunque fondamentali per metabolizzare il substrato non rimosso in R1 (Miksch, 1991) ed abbattere il substrato lentamente degradabile, costituito per questa tipologia di refluo essenzialmente da grassi e proteine (Hwang & Hansen, 1998).

Anche i dati di respirometria confermavano un'elevata attività metabolica nel settore R1. Infatti i valori dell'ossigeno disciolto (OD) e del potenziale di ossido-riduzione (ORP) sono risultati sempre più bassi in questo reattore rispetto agli altri due (R2, R3). Questo andamento era ricollegabile al rapido tasso di degradazione nella cinetica di rimozione della sostanza organica (Haug, 1993; Ndegwa et al., 2007; D'Imporzano & Adani, 2007). Il consumo del substrato degradabile portava poi ad un aumento di OD ed ORP nei reattori R2 e R3, dovuto al fatto che i microorganismi del fango attivo operavano con processi metabolici a basso consumo di ossigeno sul substrato più recalcitrante (Miksch, 1991; Tanwar, 2008). E'

interessante inoltre notare come per alti valori di carico ($>21.15 \text{ KgBOD}_5 \text{ g}^{-1}$) nel reattore R1 si venivano generalmente a creare situazione di anossia (Dubber & Gray, 2011) con valori di ORP inferiori ai 150 mV e OD inferiore ad 1 mg l^{-1} .

I valori di pH (Fig. 5.2B) tendevano, come visto in altri studi (Eusebio, 2004), a stabilizzarsi all'interno del reattore biologico rispetto al valore di ingresso. Il pH non sembrava influenzato dal carico organico in ingresso, mentre è interessante notare come questo parametro seguiva lo stesso trend di incremento all'interno dei tre reattori in maniera analoga all'OD e l'ORP confermando l'osservazione fatta da Ndegwa et al. (2007) su questa tipologia di reflu. Questo andamento è stato osservato anche per altre tipologie di reflu, fornendo le basi per suggerire l'utilizzo del pH come ulteriore parametro per la verifica del corretto svolgimento del processo di ossido-riduzione (Al-Ghusain, 1994; Kishida et al., 2003; Tanwar, 2008). Lo studio dell'andamento del substrato organico nel tempo permette di avere un quadro preciso sui vari passaggi seguiti durante la sperimentazione. L'analisi dell'andamento delle performance di abbattimento del settore biologico (Fig. 5.2 A e B) mostra una resa media pari al 80% sul COD e 86% sul BOD nella fase di Start-Up dell'impianto (1-57 giorni). L'aumento successivo della portata da 15 m^3 a 45 m^3 , con conseguente incremento del carico organico (da una media di $9,78 \text{ KgBOD}_5 \text{ g}^{-1}$ a $22,4 \text{ KgBOD}_5 \text{ g}^{-1}$), nel 71° giorno, faceva inizialmente calare la resa di rimozione sia del BOD₅ che del COD, ma in poco tempo l'impianto recuperava una buona resa di rimozione (86 e 88% su COD e BOD₅ in ingresso, rispettivamente). Dopo il 195° giorno si è registrato un progressivo calo del substrato organico dovuto ad una variazione nel ciclo di produzione ed all'afflusso di acqua meteorica dalla fognatura mista. L'arrivo di questo reflu a carico molto basso ha fatto registrare di nuovo un decremento delle performance nel processo di ossidazione. Un reflu con basso carico organico è noto infatti che possa provocare infatti un riduzione eccessiva del fattore di carico (F/M) che può generare fenomeni di predazione endogena tra i batteri a causa della mancanza di substrato di crescita, provocando cali di resa depurativa del fango attivo (Comas et al., 2003). In termini di concentrazione assoluta del COD l'effluente in uscita dal R3 presentava comunque valori inferiori ai 110 mg l^{-1} . Con il progressivo incremento del carico l'impianto si osservava nel reattore biologico un nuovo aumento in termini di resa depurativa, con picchi di rendimento superiori al 94% su COD e BOD₅. Questi valori sono confrontabili con lo studio fatto da Carta-Escobar et al. (2004) che riferivano per un impianto pilota a tre stadi sequenziali di ossidazione, alimentato con reflui caseari, un valore finale di rimozione del COD pari a 98%. I valori di abbattimento misurati nel nostro lavoro sono inferiori di qualche punto percentuale, ma c'è da considerare che, a

differenze del lavoro citato, il dato di COD da noi ottenuto era relativo a campioni non filtrati. I picchi verso il basso nei valori di rimozione di COD e BOD₅ che si notavano nell'intervallo 370-520 (giorni) erano imputabili alle modifiche effettuate al regime di ossigenazione nell'ambito della sperimentazione (Par. 5.1.2.). Nell'intervallo tra 530–550 (giorni) si verificava uno sversamento accidentale di siero stimabile in circa 10 m³g⁻¹. I reattori biologici subivano uno shock da elevato carico, che causava di fatto la scomparsa della popolazione dei protozoi del fango attivo a seguito delle condizioni di anaerobiosi instauratesi nei tre reattori (Par. 5.3.4.). L'impianto recuperava nel breve termine una efficienza depurativa adeguata; tuttavia in questa fase di recupero dell'efficienza venivano registrati ripetuti fenomeni di Foaming biologico, probabilmente causati dalla microflora in piena fase di crescita (Pujol et al., 1991; Heard, 2008).

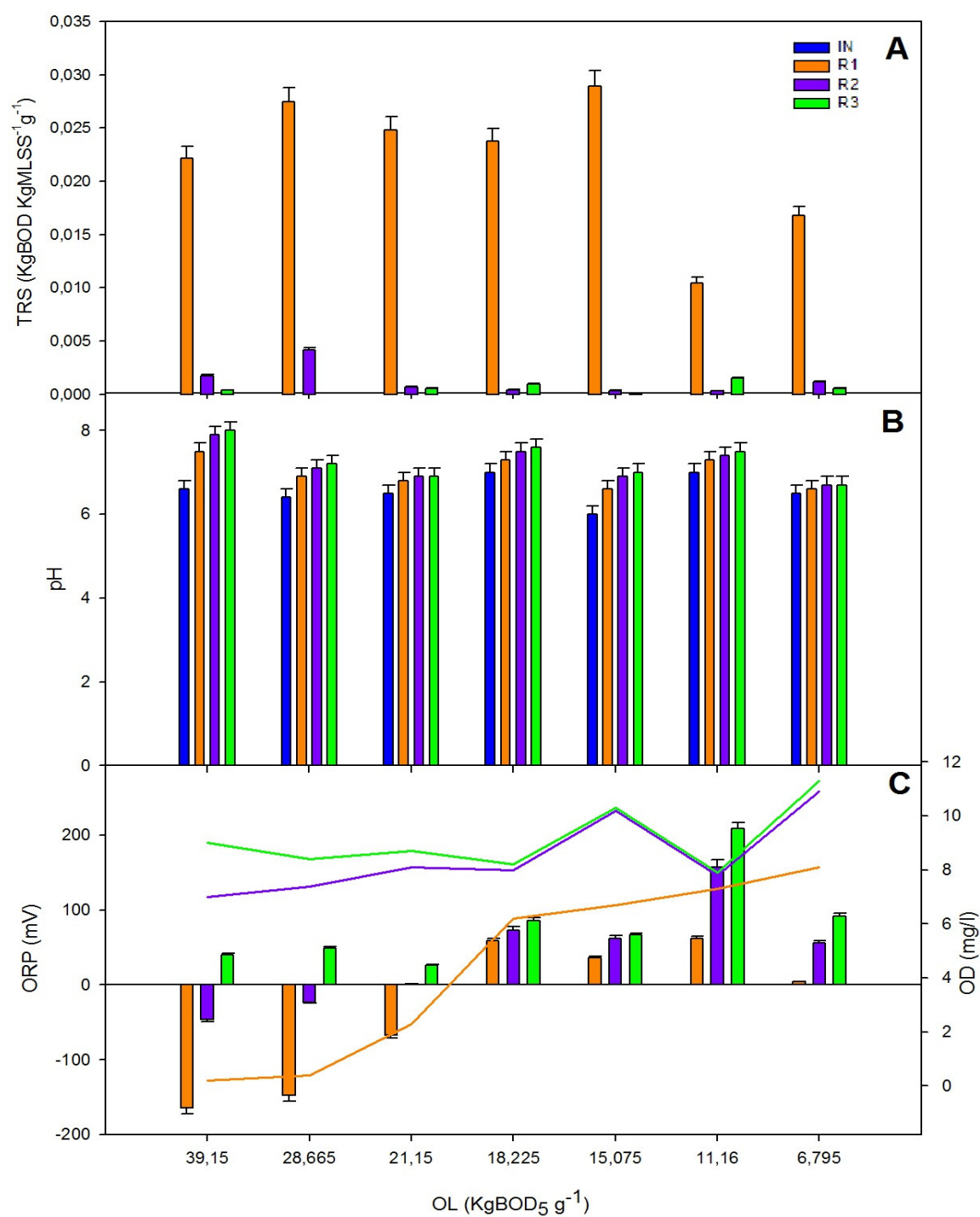


Fig. 5.1: Potenziale di Ossido-Riduzione (ORP, C), Ossigeno Disciolto (OD, C), pH (B) e tasso di rimozione del substrato (A, TRS) al variare del carico organico (organic load, OL) in ingresso.

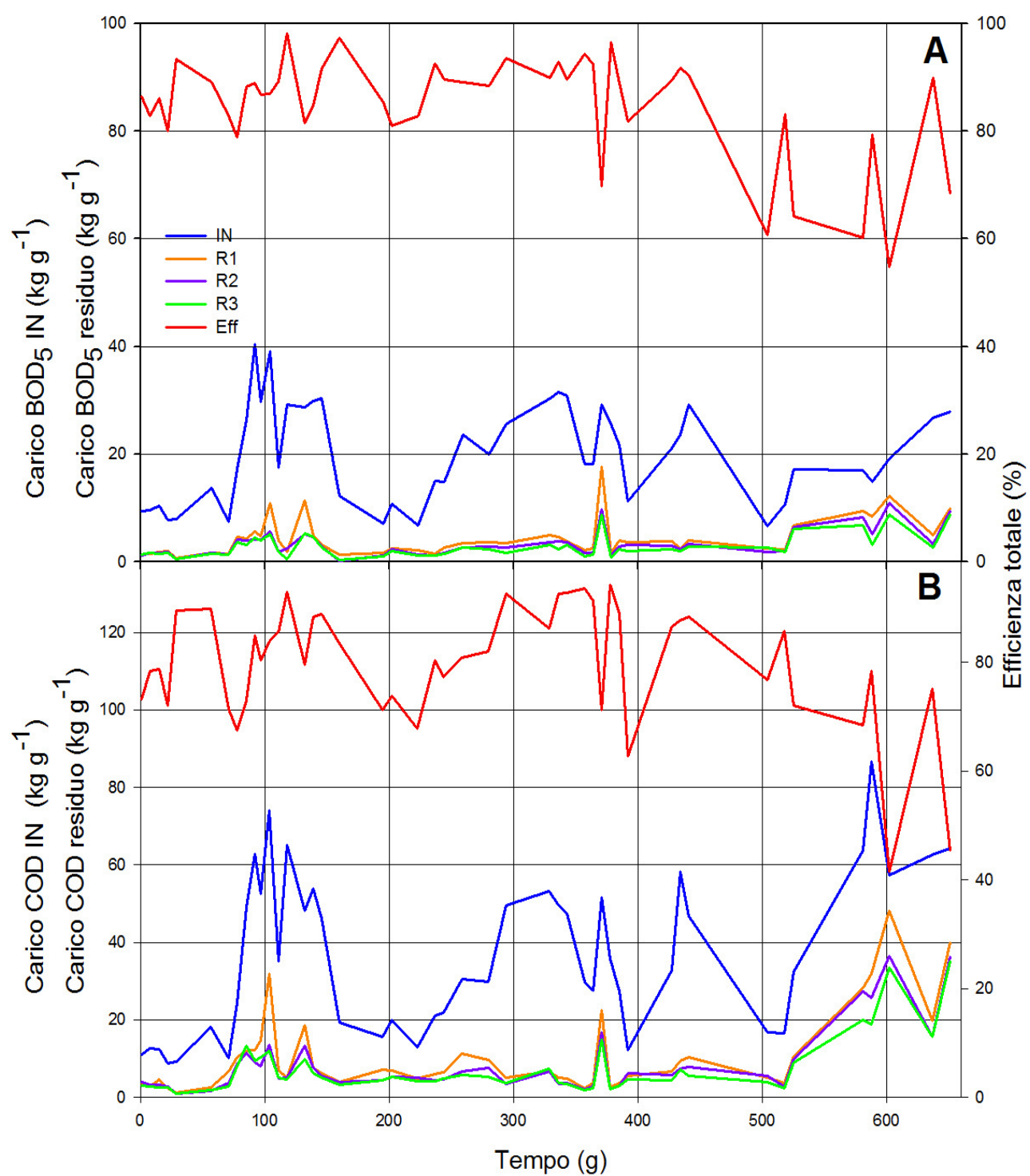


Fig. 5.2: Andamento nel tempo del carico in ingresso (IN) di COD (A) e BOD₅ (B), del carico residuo di COD (A) e BOD₅ (B) nei tre reattori (R1, R2 e R3) e delle rispettive efficienze di rimozione (Eff).

5.2.3. Rimozione del substrato azotato

Il sistema con reattori a cascata si dimostrava molto performante nella rimozione dello ione ammonio (NH_4). Le rese misurate, infatti, erano in vari casi pari al 100% (Fig. 5.3). È interessante notare come la rimozione dello ione ammonio avvenisse in maniera cospicua già nel primo reattore R1, nonostante ci fossero condizioni di OD e ORP non sempre favorevoli allo svolgersi del processo di nitrificazione. Metcal & Eddy (2003) riportano, infatti, per questa tipologia di impianto, elevate performance di nitrificazione a partire dal secondo reattore, anche se la tipologia di reflui considerata dagli autori è quella domestica. I tassi di nitrificazione ($\text{KgNH}_4\text{-N KgMLSS}^{-1}$ per giorno) nel primo reattori R1 erano particolarmente elevati ($0,07\text{-}0,01 \text{ Kg Kg}^{-1} \text{ g}^{-1}$) rispetto agli due reattori ($0,01\text{-}2,1 \times 10^{-5}$ e $0,002\text{-}0 \text{ Kg Kg}^{-1} \text{ g}^{-1}$ in R2 e R3, rispettivamente). Oltre al consumo di rbCOD (COD rapidamente biodegradabile) il primo stadio R1 era coinvolto quindi anche in un intenso processo nitrificazione. Li e Zhang (2002) in uno studio condotto su questa tipologia di refluo utilizzando un impianto pilota costituito da SBR e un CBMR (Complete-mix biofilm reactor) posti in serie, riportavano una rimozione dello ione ammonio pari al 76% nel primo stadio, e al 97% nel secondo stadio. Bisogna però considerare che nel caso citato da questi autori la concentrazione di ione ammonio era pari a 510 mg l^{-1} , assai più elevata da quella mediamente misurata durante la sperimentazione da noi condotta. Inoltre, gli autori, confrontando il processo a doppio stadio rispetto al singolo stadio, riportano che le performance di abbattimento sullo ione ammonio erano simili per le due configurazioni, ma il doppio stadio consentiva di ottenerle con 1/3 del tempo. Nel presente studio, per carichi molto bassi ($<0,73 \text{ KgN}_{\text{tot}} \text{ g}^{-1}$) il tasso di rimozione decresceva, come già osservato anche per il substrato organico, anche se non in maniera accentuata (Fig. 5.3). Per quanto riguarda il processo di denitrificazione (Fig. 5.4 A e B) è interessante notare come l'azoto nitroso ($\text{NO}_2\text{-N}$) tendeva generalmente a calare passando dal reattore R1 al reattore R3, mentre l'azoto nitroso ($\text{NO}_3\text{-N}$) generalmente aumentino la loro concentrazione dal primo all'ultimo stadio. Il sistema tendeva quindi negli stadi avanzati (R2 e R3) a formare nitrati probabilmente ossidando il nitrito generato nel primo stadio R1. La somma della componente azota dei nitriti e nitrati non bilanciava comunque mai il carico di azoto presente all'ingresso (Fig. 5.4 A e B). Questo è probabilmente correlato al fatto che i nitrati possono essere ridotti attraverso un processo assimilatorio e/o dissimilatorio, detta denitrificazione (Ahmed, 2012). Va sottolineato, comunque, che dei due processi metabolici elencati la denitrificazione è il processo che generalmente ha maggiore rilevanza con il 70-75% di rimozione dei nitrati (Benefield & Randall, 1980). Negli impianti per la depurazione di reflui civili; infatti, per favorire il processo di denitrificazione, si utilizza una

configurazione che prevede uno stadio anaerobico indirizzato alla denitrificazione seguito da quello aerobico. Gli NO_x, generati dal processo di nitrificazione nel settore aerobico, vengono infatti ricircolati nel settore anaerobico dove, mediante l'utilizzo di substrato carbonioso proveniente dall'ingresso, avviene la reazione di denitrificazione con formazione di azoto gassoso (Metcalf & Eddy, 2003). L'impianto oggetto di questo studio operava senza avere uno stadio anaerobico separato, ma giocando sulla possibilità di alternare fasi di aerazione a fasi di stasi nei tre reattori in serie. Le fasi di nitrificazione e denitrificazione possono, infatti, essere innescate mediante l'alternanza di fase anossica e fase aerobica (Muench et al., 1996; Zeng et al., 2003; Dytczak, 2008a). Inoltre queste condizioni alternate si sono dimostrate più efficaci con tassi di nitrificazione più elevati rispetto a sistemi che operano con ossigenazione in continuo (Dytczak et al., 2007, 2008b). L'impianto ha operato per tutto il periodo della sperimentazione con una fase di stop delle soffianti di almeno 15 minuti; se questo si associa a condizioni di alto carico organico, come visto in precedenza, si generano condizioni prossime all'anossia. Si può quindi ipotizzare nelle condizioni operative dell'impianto in esame il processo di nitrificazione e denitrificazione avvenisse efficientemente grazie alle condizioni alternate di aerobiosi/anossia che venivano a crearsi in R1 proprio in conseguenza dell'alternanza On/Off delle soffianti. Inoltre, è opportuno considerare che le comunità di batteri eterotrofi, nitrificanti e denitrificanti possono coesistere all'interno dei fiocchi (Yang et al., 2003). In uno studio condotto da Obaja et al. (2005) su reflui da porcilaia, attraverso l'utilizzo di diversi cicli di ossigenazione su un impianto SBR si sono ottenute rimozioni del 99% su NH₄ e del 100% sui NO_x. Per spiegare gli elevati tassi di nitrificazione in R1 abbinati a processi di denitrificazione si potrebbe inoltre ipotizzare la presenza di batteri Anammox (ANaerobic AMMonium OXidation). Il processo Anammox avviene in condizioni anaerobiche, l'azoto ammoniacale viene trasformato in azoto gassoso utilizzando i nitriti come accettori di elettroni (Strous et al., 1997). Il processo si concilia bene con la presenza di una fase aerobica perché è durante quest'ultima che viene prodotto il nitrito utilizzato nella reazione Anammox (Schmidt, 2002). Altri studi condotti su altre tipologie di refluo per impianti con tecnologia SBR mostrano come la presenza di questa tipologia di batteri siano associati ad elevati tassi di nitrificazione e denitrificazione (Lopez et al., 2008).

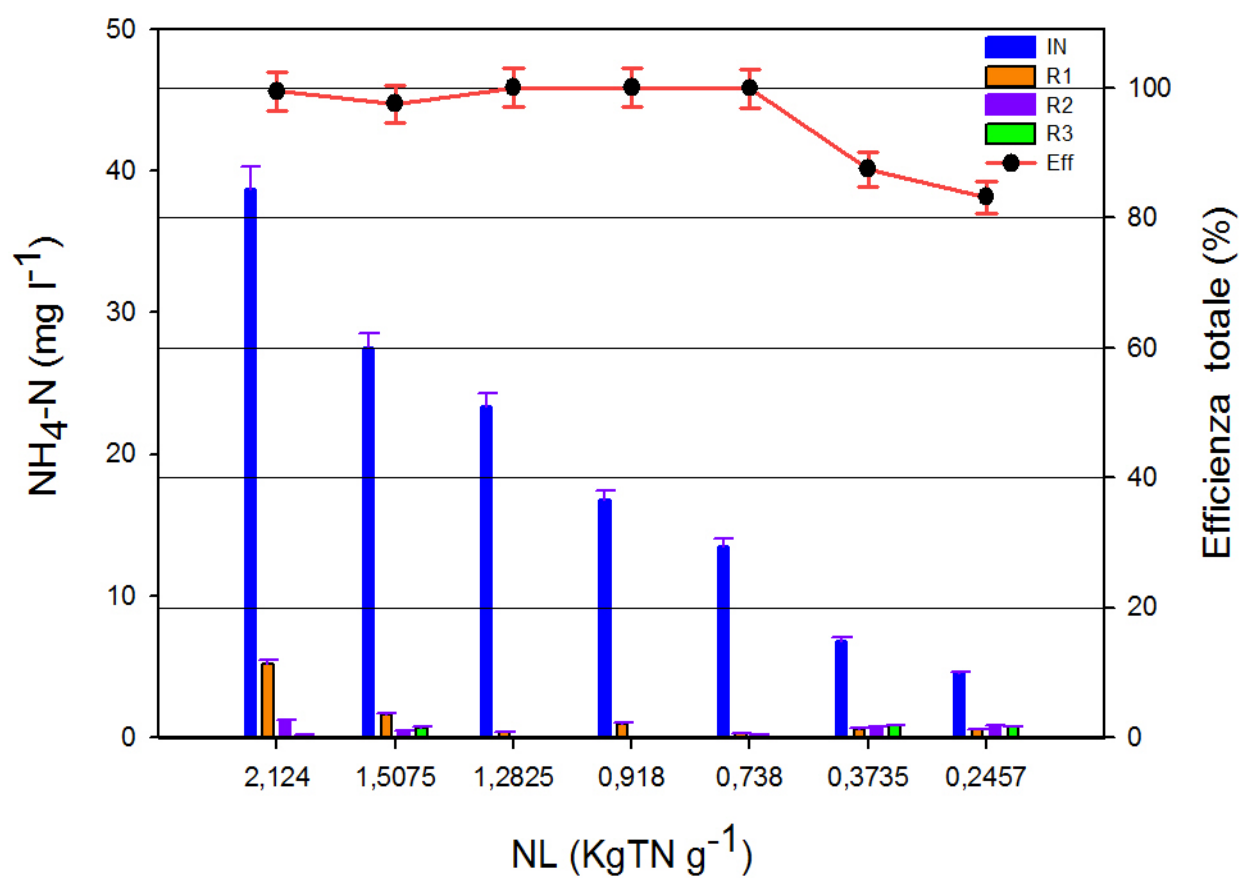


Fig. 5.3: Concentrazione in ingresso (IN) e nei tre reattori (R1, R2 e R3) dell'azoto ammoniacale (NH₄-N) e relativa efficienza di rimozione (Eff) a differenti carichi di azoto totale (Nitrogen Load, NL).

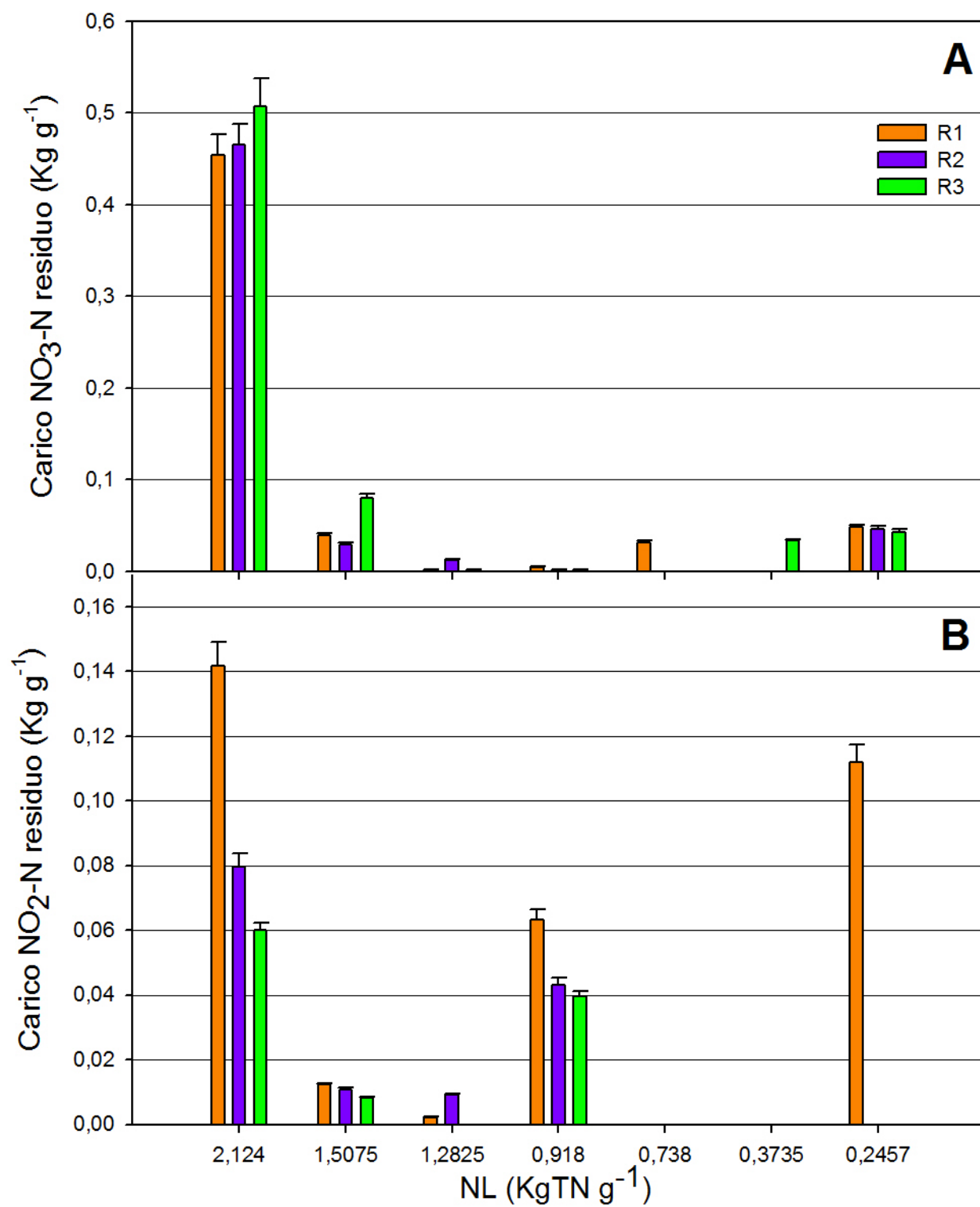


Fig. 5.4: Carico dei nitrati (A) e nitriti (B) nei tre reattori (R1, R2 e R3) a vari carichi di azoto (NL)

5.2.4. Rimozione dei fosfati

Il sistema con reattori a cascata mostrava generalmente una buona capacità nella rimozione dei fosfati (Fig. 5.5). A differenza di quanto avveniva per la rimozione del substrato carbonioso ed azotato il reattore R1 non sempre riusciva ad abbattere in maniera efficiente i fosfati. Anche la rimozione dei fosfati sembrava peggiorare in condizioni di basso carico ($<0.26 \text{ KgPtot g}^{-1}$). Un limitato carico di fosfati poteva infatti favorire la crescita dei batteri GAO (Glycogen Accumulating Organism) limitando l'attività dei batteri PAO (Phosphorus Accumulating Organism) (Sudiana et al., 1999). Si osservava inoltre in alcune fasi il rilascio di PO_4 nei tre reattori rispetto ai valori di fosfato in ingresso (dati non mostrati). Analizzando le variabili mediante PCA (Principal Component Analysis) (Par. 5.6) e variando i regimi di ossigenazione si è tentato di comprendere il significato degli andamenti osservati (si veda il Par. 5.8). La tecnologia più usata per la rimozione del fosfato è l'BPR (Biological Phosphate Removal) che consiste in una fase anossica seguita da una aerobica. Nella fase anossica, i PAO assimilano acetato, proveniente dall'idrolisi del COD, immagazzinandolo sotto forma di prodotti di stoccaggio intracellulari come i polidrossibuturati (PHB). Nel contempo si ha l'idrolisi dei polifosfati e il rilascio di orto fosfato (O-PO_4). Nella fase aerobica i PHB vengono ossidati per produrre glicogeno da utilizzare per la sintesi di nuova biomassa. Contemporaneamente, l'energia prodotta dall'ossidazione dei PHB viene utilizzata per ricostruire i legami tra polifosfati all'interno della cellula utilizzando l'ortofosfato solubile. Il fosforo, accumulato nel fango attivo, viene allontanato mediante la separazione e lo smaltimento di quest'ultimo dal sistema (Metcalf & Eddy, 2003). Il settore anossico serve per favorire la crescita dei batteri PAO che altrimenti faticerebbero a svilupparsi in competizione con i batteri eterotrofi, in quanto in questa zona i PAO riescono ad accumulare il glicogeno mentre le altre specie sono in sofferenza a causa della mancanza di substrato (Sedlak, 1991). Il ciclo del fosfato è molto complesso da interpretare essendo comunque influenzato in negativo da molteplici variabili come il basso carico organico (Carucci et al., 1999), la presenza di nitrati (Shehab et al., 1996), la bassa temperatura (Knoop & Kunst, 1998), il pH acido o basico (Converti et al., 1995) e da un elevato fattore di carico (Crites & Tchobanoglous, 1998). Nell'impianto oggetto di questo studio la configurazione dei reattori non prevedeva, come già sottolineato, un vero e proprio stato anossico, anche se questa condizione poteva determinarsi a seguito dell'alternanza On/Off delle soffianti associata ad elevati carichi organici, in particolare nel settore R1. Sono disponibili in letteratura diversi studi (Kuba et al., 1993; Jeon et al., 2001; Lee et al., 2001) che dimostrano come sia possibile ottenere condizioni di adsorbimento dei fosfati all'interno dei fanghi attivi operando con i

cicli di ossigenazione della soffiante in un impianto SBR. In particolare nello studio condotto da Lee et al. (2001), si dimostrava come sia i processi di rimozione dell'azoto e del fosforo avvengano contemporaneamente durante l'alternanza delle fasi aerobiche, anossiche ed anaerobiche. Si ipotizza che la rimozione biologica del fosforo sia effettuata da due gruppi microbici: un gruppo in grado di utilizzare sia l'ossigeno che i nitrati come accettori di elettroni (PAO denitrificanti) ed un altro in grado di utilizzare solamente ossigeno (PAO aerobici) (Gerber et al., 1987; Kerrn-Jespersion & Henze, 1993; Meinhold et al., 1998). I PAO denitrificatori utilizzerebbero in condizioni anossiche un metabolismo basato sul PHA intracellulare ed il glicogeno simile a quello dei PAO aerobici. Visti i buoni tassi di rimozione ottenuti sui nitriti e nitrati contemporaneamente alla rimozione del fosfato, è possibile ipotizzare che anche nell'impianto studiato venisse seguita una dinamica simile. Inoltre l'impianto operando con tre comparti separati permetteva, qualora il ciclo di lavorazione del caseificio producesse fosfati in quantità eccessiva tale da rendere difficile l'abbattimento, di rendere il reattore R1 un comparto anossico, alternando solamente il ciclo di ossigenazione o semplicemente chiudendo il flusso dell'aria su questo settore.

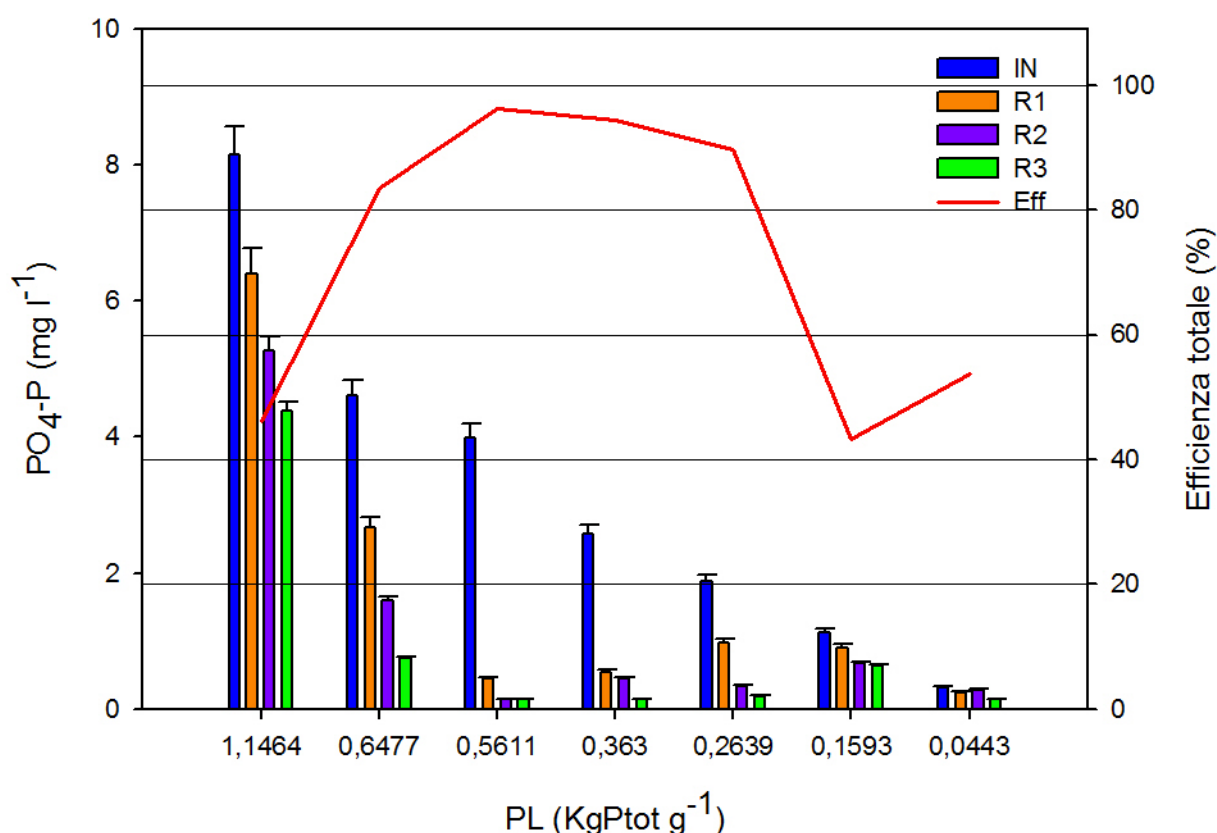


Fig. 5.5: Concentrazione dei fosfati ($\text{PO}_4\text{-P}$) in ingresso (IN) e nei tre reattori (R1, R2 e R3) e relativa efficienza di rimozione (Eff) a differenti carichi di Fosforo totale (Phosphorous Load, PL).

5.2.5. Rimozione dei tensioattivi totali

Il sistema di ossidazione con reattori a cascata mostrava un'ottima efficienza sia nella rimozione dei tensioattivi non ionici (BIAS), che in quella dei tensioattivi anionici (MBAS) (Fig. 5.6 A e B). I tensioattivi essendo costituiti per lo più da catene carboniose rappresentano un ottimo substrato per la crescita dei fanghi attivi (Van Ginkel, 1996). I tensioattivi non ionici sono caratterizzati infatti dalla presenza di una componente idrofobica (catena idrocarburica lineare o ramificata) e di una idrofila non carica (gruppo etossilato etero, estereo o ammidico). I tensioattivi anionici sono invece delle molecole organiche caratterizzate dalla presenza di una componente idrofobica (catena idrocarburica lineare o ramificata) e di una idrofila carica negativamente (anione solfonato o solfato) (Van Os, 1994). Le rese di abbattimento ottenute (>95%) erano elevate per entrambe le classi di tensioattivo, per carichi di tensioattivi totali maggiori di $0,39 \text{ Kg g}^{-1}$; le rese tuttavia tendevano a calare per entrambe quando il carico risultava inferiore a $0,19 \text{ Kg g}^{-1}$ dei tensioattivi totali. Complessivamente, il sistema mostrava percentuali di abbattimento maggiori sui tensioattivi anionici; bisogna però anche considerare che quest'ultimi generalmente presentavano una concentrazione superiore in ingresso rispetto ai non-ionici.

Il reattore R1 tendeva a rimuovere la maggior parte del carico dei tensioattivi totali, anche se per alti carichi si notava come anche le successive fasi R2 ed R3 contribuissero alla rimozione del substrato rimanente. In letteratura non vengono descritte particolari accorgimenti per il trattamento di questa classe di inquinanti a livello di configurazione nei reattori biologici. Un incremento delle prestazioni può essere al limite ottenuto in fase di trattamento terziario con l'aggiunta di filtri a carbone attivo (Espantaleon, 2003). Uno studio condotto da Othman et al. (2010) su un impianto per il trattamento di reflui civili mostrava anche in questo caso come i tensioattivi anionici avessero migliori performance di rimozione rispetto ai tensioattivi non-ionici. Le performance di rimozione evidenziate da questi autori sulle due classi di tensioattivi riportavano per i tensioattivi MBAS un range tra 27 e 98%, mentre per i BIAS tra 25 e 90%. Secondo altri autori (Crescenzi et al., 1995; Di Corcia & Samperi, 1994) la degradazione dei tensioattivi non ionici raggiungeva performance comprese tra 74 e 89 %.

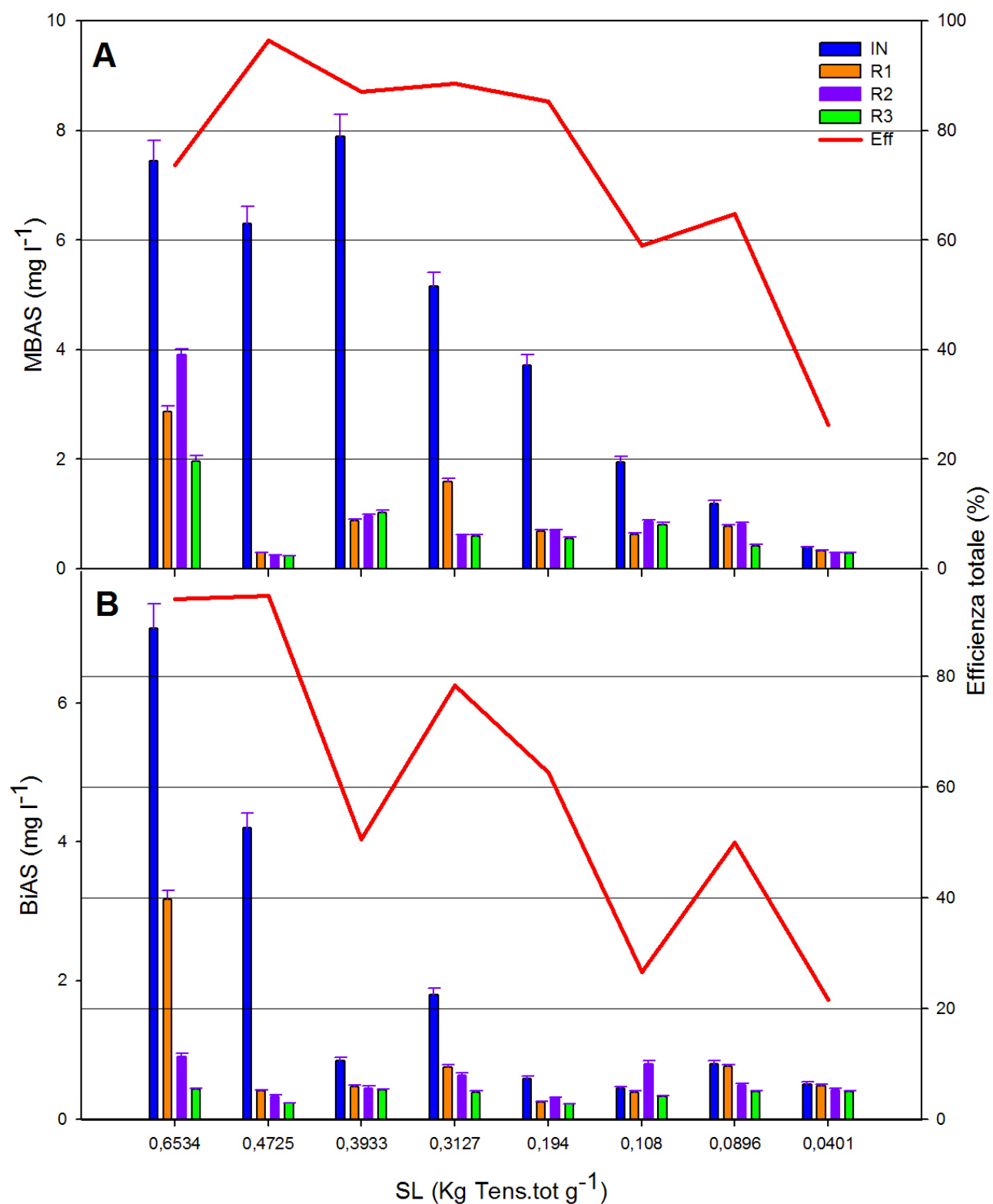


Fig. 5.6: Concentrazione dei tensioattivi non ionici BIAS (A) e anionici MBAS (B) in ingresso (IN) e nei tre reattori (R1, R2 e R3) e relative efficienze di rimozione (Eff) a vari carichi di tensioattivi totali (Surfactant Load, SL).

5.3 Caratterizzazione del microbiota del fango attivo nei tre reattori a cascata e sua evoluzione nel tempo

5.3.1 Biodiversità della comunità batterica nei reattori a cascata

La comunità batterica mostrava un elevato grado di similarità in termini di Richness (R) ed indice Shannon-Weaver (H) nei tre reattori a cascata sebbene, come visto nel precedente paragrafo, il reattore R1 presentasse caratteristiche molto differenti in termini sia di parametri funzionali (OD, ORP) sia in termini di carico carbonioso ed azotato rispetto ai settori R2 e R3. Come mostrato in Fig. 5.7 che riporta il profilo DGGE dei campioni prelevati durante la fase di Start-Up dell'impianto (i primi 15 giorni), ed i campioni prelevati in fasi successive (campionamenti a 118, 357 e 441 giorni) non si osservavano differenze marcate fra le tre lanes corrispondenti ai tre reattori; anche i valori di R ed H si mantenevano simili nei tre settori soprattutto nella fasi dove il fango attivo era più maturo (Tab. 5.3). Nemmeno l'elevato carico organico ed azotato misurato ad esempio nel 118° giorno, generava differenze significative a livello di R e H nelle comunità batterica del reattore R1 rispetto ad R2 e R3 (Tab. 5.3). Probabilmente, il tempo di ritenzione nei reattori era troppo breve per poter apportare modifiche rilevanti alla comunità batterica in termini di Richness e Shannon-Weaver tra i tre reattori. E' interessante notare invece come nel giorno 15 quando il tempo di ritenzione era più alto (29 h) si notavano differenze nella Richness di R1 ed R3, mentre negli altri casi, con un tempo più breve (9,6 h) non si notavano differenze significative tra i tre reattori. C'è tuttavia da considerare che la differenza potrebbe dipendere anche dal fatto che il fango si trovava nella fase di Start-Up dell'impianto ed era quindi soggetto ad un più intenso processo di selezione batterica (Lijiao et al., 2010).

In termini di similarità della struttura della popolazione batterica, calcolata con l'indice di Dice sui campioni saggiati mediante DGGE, i reattori presentavano invece alcune differenze anche se clusterizzavano insieme. Infatti, come si può notare dal dendrogramma di Fig. 5.8 nei campioni prelevati durante la fase di Start-Up (15-71 giorno) e nella fase successiva di maturazione del fango attivo, il dendrogramma associava generalmente i reattori R2-R3 oppure i diversi prelievi riferiti al solo reattore R3; raramente si trova il reattore R1 associato al reattore R3. Probabilmente, il differente apporto di substrato nutritivo generava delle differenze soprattutto tra il primo e l'ultimo stadio. C'è da sottolineare come comunque la similarità si manteneva generalmente alta tra i tre reattori in un range 60-85%. In definitiva pure essendoci alcune differenze nella struttura della popolazione che evidenzia la presenza di specie (bande) diverse nei tre reattori, ed in particolare tra il primo reattore R1 e l'ultimo

reattore R3, il numero complessivo di specie, ossia la Richness, e la distribuzione di quest'ultime all'interno dell'ecosistema, ossia l'indice Shannon-Weaver che tiene conto oltre del numero di banda anche della loro intensità, non sembravano variare. Il sistema sembra occupare sempre lo stesso numero di nicchie ecologiche nei tre reattori pur variando in qualche maniera le specie presenti. Anche nello studio condotto da You & Ouyang (2007) gli autori evidenziavano come ci fossero differenze tra le comunità batteriche presenti nei 4 reattori RBC (reattori a dischi biologici) operanti in serie per il trattamento di reflui civili. Nello stesso studio, l'ultimo settore, che riceveva un carico organico molto inferiore rispetto al primo, presentava una differenza di popolazione però molto marcata rispetto al primo stadio. Infatti, vi era una maggiore presenza di batteri filamentosi e batteri nitrificanti, che erano invece assenti nel primo settore proprio a causa della presenza di un elevato carico organico. Anche la Richness risultava differente con un numero di specie maggiore nel primo settore rispetto all'ultimo (You & Ouyang, 2007). C'è da considerare comunque che i sistemi RBC, essendo basati sulla presenza di biomasse microbiche adese, non permettono di fatto un vero e proprio passaggio di fanghi attivi tra un settore ed il successivo. In questi casi, quindi, il fango attivo si trova a trattare il refluo ed il relativo substrato in un settore chiuso senza possibilità di ricevere una biomassa condizionata dagli altri stadi come avviene invece per il sistema a cascata che prevede, inoltre, ricircolo parziale del fango attivo, oggetto del nostro studio. Anche altri studi evidenziano come la variazione di carico organico modifichi la comunità batterica (Miura et al., 2007; Li et al., 2010).

In termini invece di quantità di biomassa batterica, espressa come concentrazione MLSS, parametro che può approssimarsi bene alla massa attiva dei microorganismi (Sigmund, 2005), si osservavano differenze tra i tre reattori. Infatti, il valore di MLSS medio, calcolato su tutti i campioni prelevati in R1 durante la sperimentazione, era maggiore di quello calcolato in modo analogo negli altri due reattori R2 ed R3 (1801, 1726 e 1680 mg l⁻¹, in R1, R2 e R3, rispettivamente). La cinetica di Monod prevede che il tasso di crescita della biomassa sia proporzionale al substrato organico rimosso (Beltran et al., 2000), per cui è plausibile attendersi che in R1, essendoci maggiore rimozione di substrato, si ottengano concentrazioni di biomassa leggermente superiori. C'è tuttavia anche da considerare che nel caso in esame, con reattori in cascata, la concentrazione di MLSS potrebbe essere stata influenzata dal ricircolo dei fanghi attivi che periodicamente avveniva tra il sedimentatore secondario ed R1 (Par. 5.1.2.).

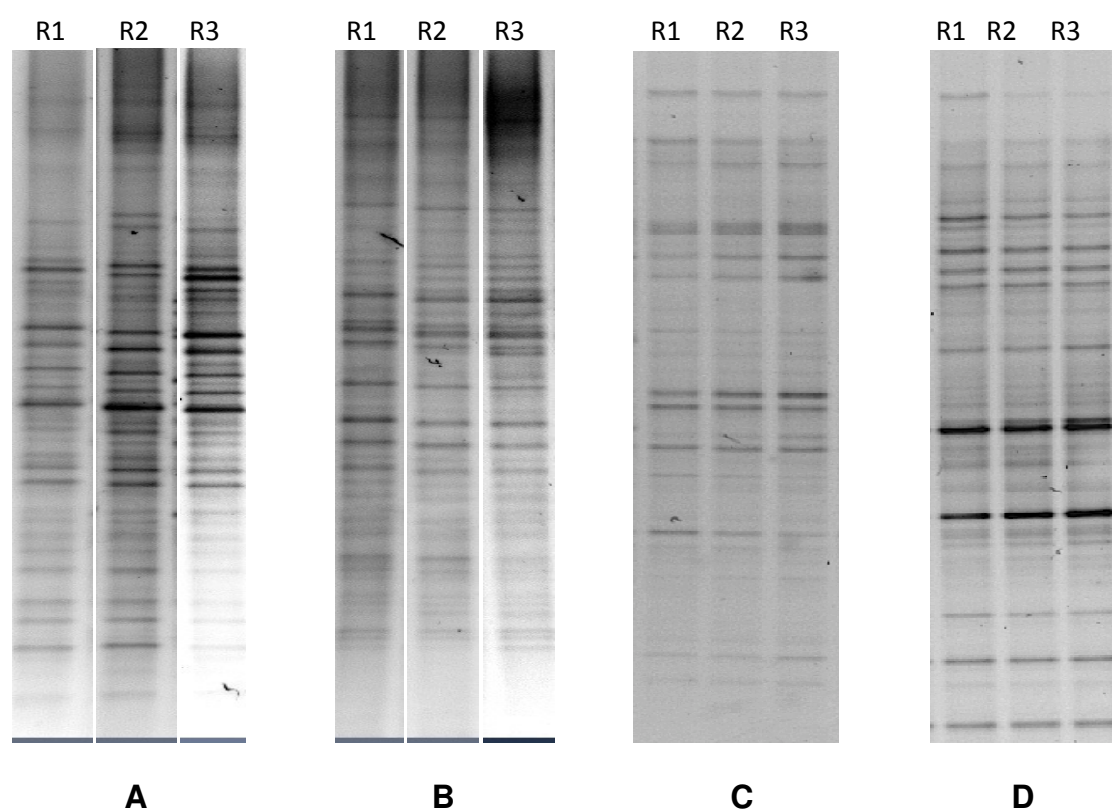


Fig 5.7: Profilo DGGE nei tre reattori (R1, R2 e R3) prelevati a tempi differenti durante l'intero arco della sperimentazione: A, 15 giorni; B, 118 giorni; C, 357 giorni; D, 441 giorni).

Tab 5.3: Tempo di prelievo (g), Carico Organico (OL), Azoto totale (NL), Richness (R) ed indice Shannon-Weaver (H) dei tre reattori (R1, R2 e R3) riferita ai tempi di prelievo e profili DGGE di cui alla Fig 5.7 (A, B, C e D).

Profilo	Tempo (g)	OL (KgBOD ₅ g ⁻¹)	NL (KgTN g ⁻¹)	(R)*			(H)*		
				R1	R2	R3	R1	R2	R3
A	15	12,3	0,29	37,3 ^a	32,1 ^b	30,6 ^b	3.26 ^a	3.2 ^a	3.06 ^a
B	118	65,1	1,7	27,2 ^a	28,0 ^a	25,7 ^a	3.04 ^a	3.14 ^a	3.06 ^a
C	357	29,8	1,3	22,2 ^a	23,1 ^a	22,5 ^a	2.81 ^a	2.86 ^a	2.79 ^a
D	441	46,8	0,89	26,3 ^a	28,3 ^a	27,1 ^a	3.12 ^a	2.96 ^a	2.85 ^a

*I valori medi di R e H dei tre reattori sono stati comparati statisticamente con il Tukey test. Differenti lettere dopo i valori medi indicano differenze statisticamente significative ($P \leq 0.05$) tra i tre reattori (R1, R2 e R3) nell'ambito dei gruppi omogenei.

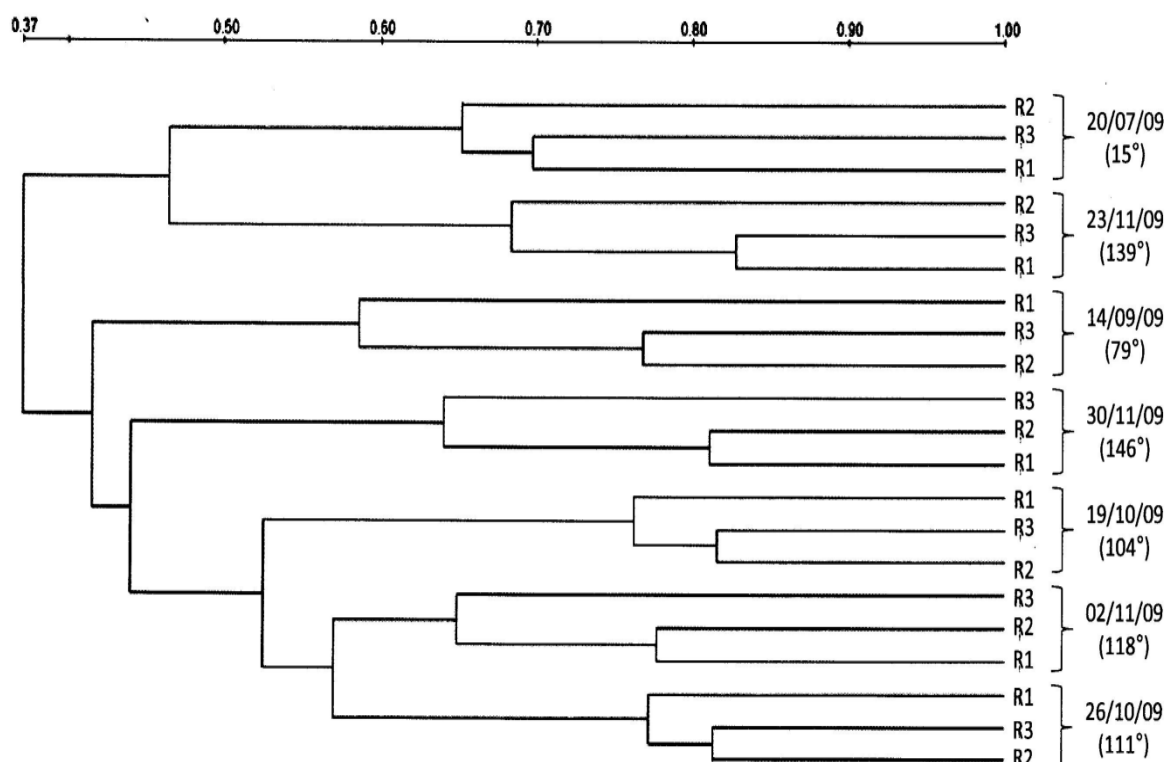


Fig. 5.8: Analisi Cluster (dendrogramma) della comunità batterica desunte dai profili di DGGE nei tre reattori durante la fase di start-up e maturazione del fango attivo.

5.3.2. Dinamica della comunità batterica nel tempo

Seguendo lo sviluppo temporale, la comunità batterica mostrava invece molta variabilità in termini di Richness ed indice Shannon-Weaver. La Figura 5.9 riporta l'andamento nel tempo dei due differenti indici della popolazione batterica rapportati ad un loro potenziale fattore di influenza, quale il carico organico (Li et al., 2010) espresso in termini di $BOD_5 \text{ g}^{-1}$. La comunità batterica sembrava mostrare, durante le prime fasi dello start-up, un'iniziale crescita sui due indici seguita poi da un loro repentino decremento associabile ad una stabilizzazione del fango attivo, fase che, molto probabilmente, corrispondeva ad una selezione delle specie che meglio si erano adattate alle condizioni operative determinando la scomparsa di specie meno competitiva. Successivamente, si osservavano comunque nuove fasi di rapido aumento della biodiversità seguite da fasi di decrescita. In particolare, si può notare come nell'intervallo temporale 150-250 (giorni), associabile ad un periodo di basso carico per l'impianto, gli indici Richness e Shannon-Weaver erano soggetti di nuovo ad una fase di crescita. D'altra parte è stato descritto come la biomassa del fango attivo sottoposta ad elevati carichi risponda con una significativa riduzione degli indici di diversità rispetto a quanto non

avvenga per biomasse sottoposte a carichi inferiori (Li et al., 2008). In particolare, il fattore di carico (F/M) sembra giocare un importante ruolo nel regolare la dinamica della comunità batterica (Li et al., 2008), così come per i protozoi dove il variare del F/M incide sulla Richness e sulla struttura della popolazione (Madoni, 2003). Li et al. (2010) osservavano una lenta decrescita negli indici di diversità Richness e Shannon-Weaver con l'aumentare della concentrazione del substrato organico contenuto nel refluo, seguita poi da una marcata decrescita, una volta che la comunità batterica si era adattata alla nuova condizione. Anche i risultati ottenuti in questo studio mostravano che, dopo una fase di stabilizzazione della comunità batterica, si osservava una decrescita negli indici Richness e Shannon-Weaver. Comunque, questa evoluzione nel tempo non sembrava associata solo alle variazioni del carico, visto che si osservava anche in periodi di relativa stabilità nel carico influente all'impianto. Altri studi al riguardo mostrano una dinamicità della comunità batterica, su impianto MBR per acque grigie (Stamper et al., 2003) e per i reflui civili (Miura et al., 2007), anche durante fasi stazionarie di funzionamento dell'impianto.

Una variazione nella biodiversità sicuramente associabile ad un cambiamento dei parametri operativi, era l'improvviso aumento di carico causato dall'immissione di siero (Par. 5.1.2.) che faceva decrescere rapidamente la Richness e l'indice Shannon-Weaver, causando inoltre un azzeramento in termini di individui nella popolazione dei protozoi. Il fango attivo rispondeva con buona flessibilità alle variazioni delle condizioni operative e, conseguentemente, gli indici della popolazione batterica del fango mostravano di nuovo un rapido incremento nei campionamenti successivi, dimostrando un recupero della biodiversità. Anche Li et al. (2007) analizzando la risposta della comunità batterica presente sul suolo in seguito ad un forte shock causato da elevato carico organico, in questo caso petrolio, osservavano un forte calo nella biodiversità della popolazione. Anche Eichner (1999) riportava come ci sia un calo nell'indice Shannon-Weaver della comunità batterica a seguito di un shock causato da un elevato quantitativo di fenoli nell'effluente. Le dinamicità della comunità batterica e la flessibilità nell'adattarsi ai cambiamenti ambientali sono perciò i requisiti fondamentali per ottenere performance stabili (Miura et al., 2007).

Analizzando infine gli indici di similarità (indice di Dice) tra tutti i campioni presi in considerazione durante la sperimentazione (dendrogramma non mostrato), la stagionalità non sembrava pesare in alcun modo nella composizione della comunità microbica. In sostanza, confrontando campioni prelevati a circa un anno di distanza (stessa stagione) si osservavano valori di similarità (Cs) molto bassi tra loro (71g – 434g Cs=0.18; 139g – 518g Cs= 0.03;

294g – 651g Cs=0.3), mentre le differenze erano minori confrontando campioni prelevati nelle quattro stagioni dell'anno.

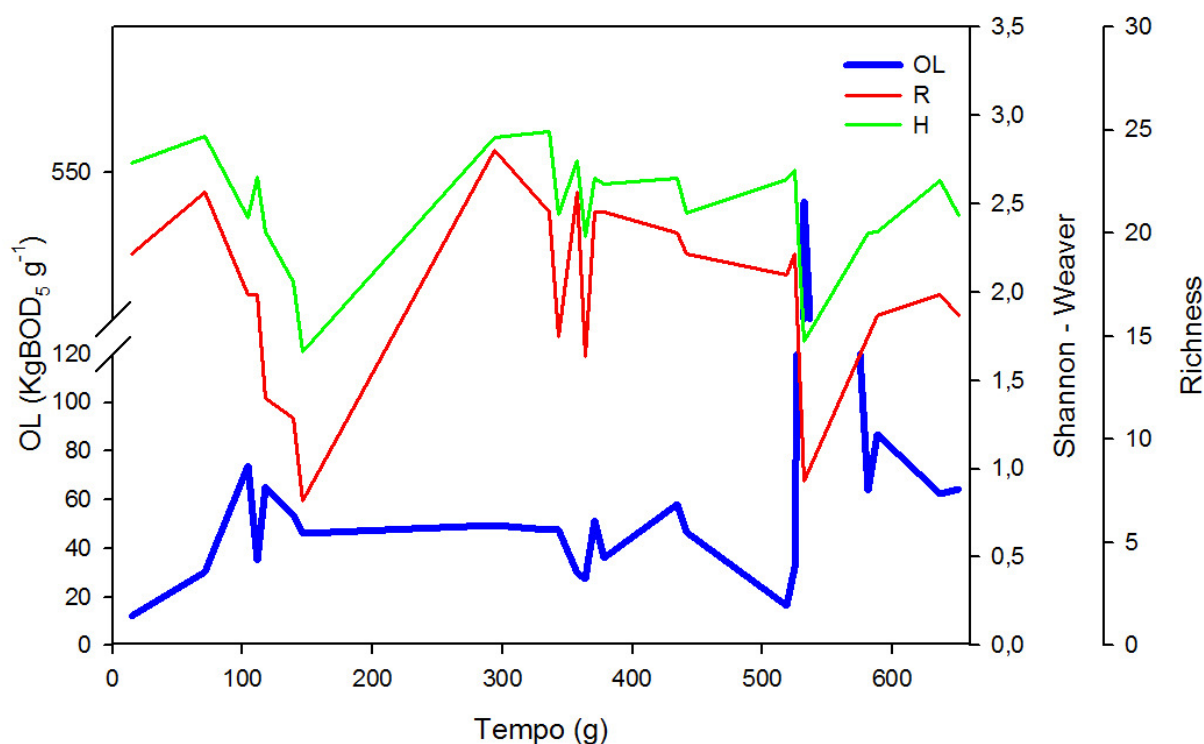


Fig. 5.9: Andamento nel tempo del Carico Organico (OL) in ingresso, dell'indice Shannon – Weaver (H) e della Richness (R) nel reattore R1.

5.3.3. Biodiversità della popolazione dei protozoi nei reattori a cascata

La popolazione dei protozoi, come quella batterica, mostrava elevata similarità nei tre reattori a cascata. Anche in questo caso, le notevoli differenze in termini di carico organico e condizioni operative (OD, ORP) tra il reattore R1 ed i reattori R2 e R3 sembravano influire sulla struttura della popolazione dei protozoi.

Il Mantel Test, che permette di ottenere una misura del grado di correlazione esistente fra due matrici di distanze o di similarità (Mantel, 1967), analizzato attraverso le misure Bray Curtis, un indice ecologico inerente alla similarità delle popolazioni (Bloom, 1981), evidenziava valori elevati nel confronto a coppia dei reattori biologici R1, R2 e R3. In particolare, il grado di similarità era pari a 0,73 ($P < 0,01$) nel confronto R1-R2, 0,75 ($P < 0,01$) tra R2 e R3 e 0,68 ($P < 0,01$) tra R1 e R3. Tuttavia, si può sottolineare come la similarità fosse più alta tra i reattori contigui (R1-R2 e R2-R3) rispetto a quella misurata tra R1 ed R3, osservazione che è stata rilevata anche per quanto riguarda la comunità batterica. Il grafico della Fig. 5.10 riporta

l'abbondanza media delle specie più frequenti campionate durante l'intero arco della sperimentazione all'interno dei tre reattori R1, R2 e R3 raggruppate secondo la classificazione riportata da Madoni (1994b); l'abbondanza, intesa come concentrazione cellulare, era sempre maggiore di 1500 cellule ml^{-1} . Il 1° gruppo comprendeva le tecamebe, il 2° gruppo i ciliati natanti, il 3° gruppo i ciliati mobili, il 4° gruppo i ciliati sessili ed infine i piccoli flagellati, riportati come gruppo e non come singola specie. Alcuni limiti nell'identificazione hanno riguardato il riconoscimento di varie specie che risultavano, comunque, classificate all'interno dei cinque gruppi a seconda della funzione ecologica attribuitagli nell'osservazione del fango attivo. Dall'analisi delle abbondanze medie, confrontate mediante Tukey test, si evidenziava come generalmente alcune specie tendevano ad aumentare nel settore R3. In particolare, le tecamebe, i ciliati sessili ed i ciliati mobili sembravano adattarsi favorevolmente alle condizioni di elevata ossigenazione e basso carico presenti in questo reattore. La specie che sembrava più influenzata da questa condizione era il ciliato sessile *Zoothamnium*, che mostrava un'abbondanza media più elevata in R3 rispetto agli altri due reattori. I ciliati natanti non sembravano invece seguire questa tendenza, visto che la loro abbondanza non incrementava nel reattore R3. Infine, i piccoli flagellati risultavano mediamente più abbondanti nel reattore R1 rispetto agli altri due reattori R2 e R3. Anche Luna-Pabello et al. (2002) in uno studio condotto su di un reattore RBC riportavano come *Zoothamnium procerius* fosse la specie più abbondante presente nell'ultimo stadio del reattore dove il carico risultava più basso, mentre flagellati e ciliati natanti erano prevalenti nello stadio iniziale caratterizzato dalla presenza di elevato carico. Bisogna considerare comunque che la differenza rilevata riguardava l'abbondanza relativa ma non la media della Richness misurata su tutti i campionamenti nei tre reattori ($R1=9,74$; $R2=10,06$; $R3=9,97$) visto che questi valori non risultano statisticamente differenti ($P<0,05$) applicando il Tukey test. Martín-Cereceda et al. (2001) in uno studio condotto su tre RBC (rotator biological reactor) in serie, evidenziavano invece come cambiamenti anche nel numero della specie di protozoi presenti oltre che nell'abbondanza erano rilevati passando dal primo all'ultimo reattore; gli stessi autori attribuivano questi cambiamenti al differente afflusso di substrato organico nei tre comparti. Tuttavia, per il sistema RBC valgono le considerazioni fatte nel Par. 5.3.1.

Le specie più abbondanti, rilevate durante la sperimentazione, erano nel caso dei ciliati mobili *Aspidisca cicada*, per i ciliati sessili *Zoothamnium* e per i ciliati natanti *Paramecium*. E' da sottolineare, comunque, che queste specie sono piuttosto comuni ed infatti sono già state descritte su impianti per il trattamento di altre tipologie di refluo (Madoni 1994b; Martín-

Cereceda, 1996; Chen et al., 2004; Puigagut, 2009). Per quanto riguarda le tecamebe la specie con l'abbondanza maggiore era *Trinema*, che viene citata raramente come specie presente nel fango attivo (Abraham et al., 1997). I flagellati maggiormente rilevati appartenevano ai generi *Bodo* e *Cercobo*, anche questi molto comuni all'interno degli impianti a fanghi attivi (Sudo & Aiba, 1984). Analizzando il grafico ottenuto dalla PCA delle popolazioni dei protozoi contenute nei tre reattori (R1, R2 e R3) (Fig. 5.11), si può notare come ci fosse una forte sovrapposizione nelle aree che rappresentavano la popolazione campionata nel corso della sperimentazione su ogni reattore, a confermare l'alta similarità tra le popolazioni dei tre reattori. Il primo asse spiegava il 14,2 % della varianza, il secondo il 12,1%, il terzo il 9,3%, ed il quarto il 7,4%; la varianza cumulata sulle quattro componenti era pari al 43%. In particolare, la componente 1 veniva influenzata dalla frequenza del gruppo dei ciliati sessili ($r=0,82$), mentre la componente 2 risultava influenzata dalla frequenza delle tecamebe ($r=0,4$). Il grafico ottenuto dall'analisi PCA delle prime 2 componenti associava le specie appartenenti a ciliati mobili e sessili. Le specie appartenenti al gruppo dei ciliati sessili a sviluppo coloniale (*Carchesium*, *Zoothamnium* e *Epystillis*) risultavano associate. I piccoli flagellati ed il natante *Paramecium* erano associati e disposti nel quadrante opposto rispetto a quello *Zoothamnium*. L'analisi PCA quindi da un lato associava i gruppi ciliati sessili e mobili e li separava da i flagellati ed ciliati natanti, indicando quindi delle nicchie ecologiche differenti per questi gruppi. Per quanto riguarda le tecamebe mentre *Arcella* veniva associata ai ciliati mobili e sessili, *Trinema* ed *Euglypha* non trovano viceversa associazione con questi due gruppi.

5.3.4. Dinamica della popolazione dei protozoi

La popolazione dei protozoi ha mostrato molti cambiamenti di frequenza nell'ambito dei vari i gruppi nel corso della sperimentazione. Come si può osservare dalla Fig.5.12 nei primi 15 giorni di funzionamento la popolazione dominante era costituita essenzialmente da piccoli flagellati. Madoni (1982) e Esteban (1991) descrivendo la dinamica della popolazione osservata in impianti a fanghi attivi, riportavano i flagellati come la prima specie riscontrabile all'avvio degli impianti. I flagellati vengono, infatti, generalmente definiti come specie "pionieristica", ossia specie che riesce a colonizzare per prima il substrato di crescita, salvo poi venire sostituita in fase più avanzate da specie che riescono ad essere più competitive nella concorrenza per le nicchie ecologica (Madoni, 2003).

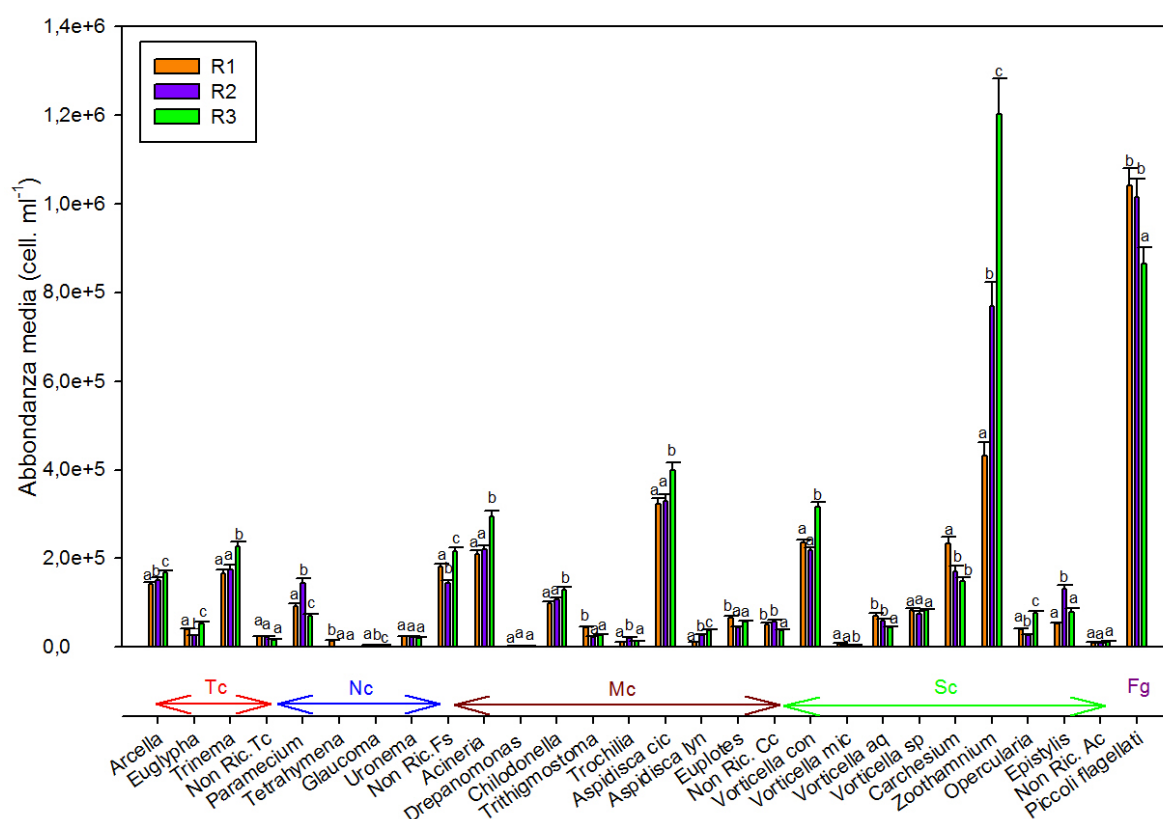


Fig. 5.10: Abbondanza media dei protozoi nei tre reattori (R1, R2 e R3) campionati durante la sperimentazione raggruppati nei seguenti cinque gruppi: Tecamebe, Tc; Ciliati Natanti, Nc; Ciliati mobili, Mc; Ciliati Sessili, Sc; Piccoli flagellati, Fg. Alcuni protozoi, pur essendo riconducibili ad uno dei 5 gruppi, non erano riconosciuti a livello di genere e quindi erano designati come “Non Ric.”. Differenti lettere sopra le barre di errore indicano differenze statisticamente significative ($P \leq 0.05$) secondo il Tukey test, tra i tre reattori (R1, R2, R3) nell'ambito di ciascun Taxa.

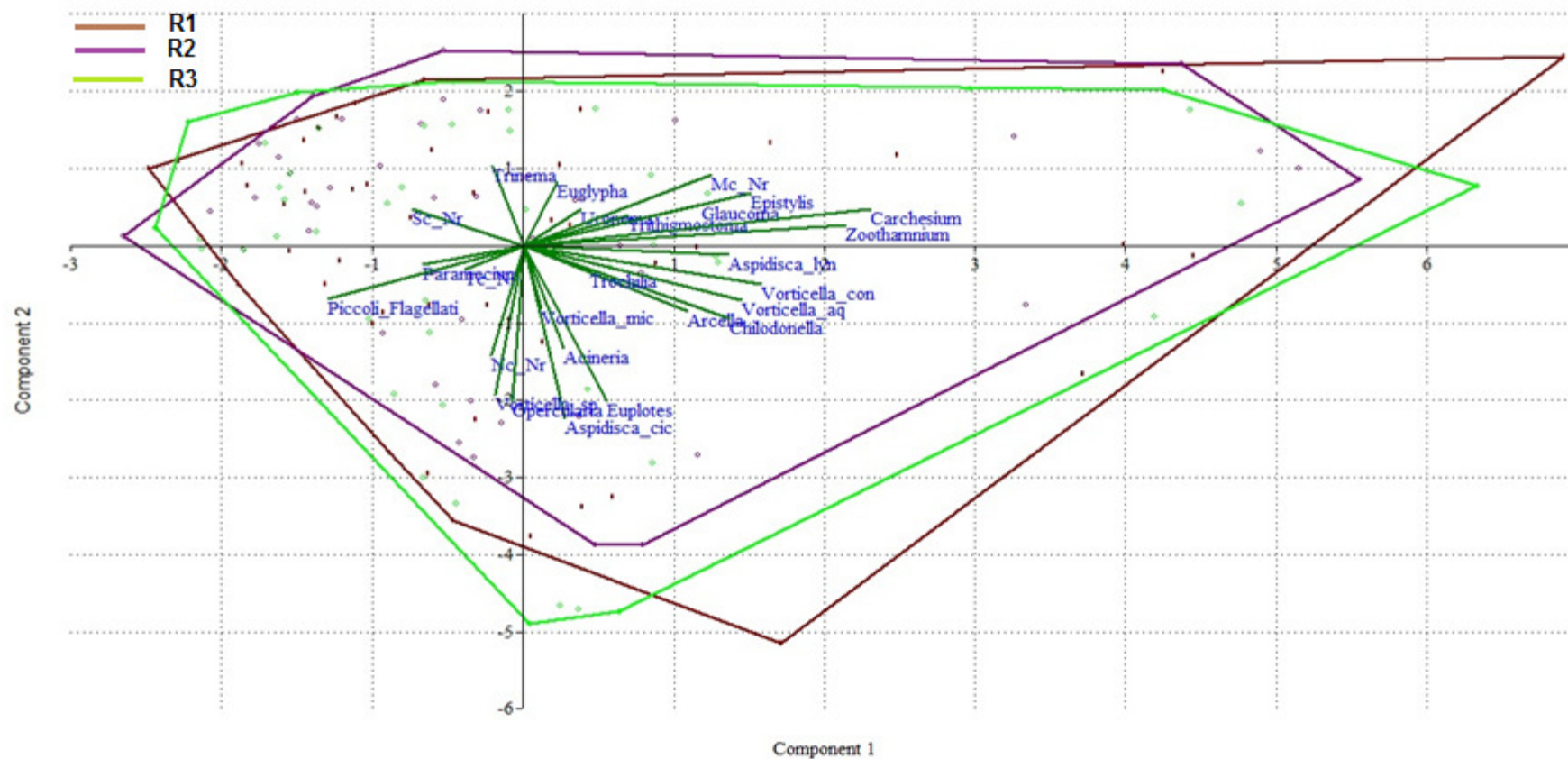


Fig. 5.11: Analisi delle Componenti Principali (in ascissa ed in ordinata sono rappresentati rispettivamente la componente 1 e 2 della PCA) della popolazione dei protozoi rilevate durante l'intera sperimentazione. La linea marrone indica il reattore 1 (R1), la linea viola il reattore 2 (R2), la linea verde il reattore 3 (R3).

Successivamente, dal 22° giorno fino al 104°, si registrava una forte dominanza delle amebe con teca, in particolare del genere *Trinema*. Anche questa osservazione sembra in linea con quanto descritto da Madoni (2002), che correlava l'alta frequenza delle tecamebe con lunghi tempi di ritenzione idraulica, visto che durante la fase di start-up l'impianto da noi studiato presentava elevati tempi di ritenzione (Par. 5.1.2.); questa condizione potrebbe aver quindi favorito la crescita di questo gruppo, anche se è opportuno osservare che un'elevata frequenza era registrata anche nell'intervallo dei giorni 92-104 in cui il tempo di residenza idraulica era più basso. Tuttavia, in termini di abbondanza relativa alle sole tecamebe si trovavano valori medi più bassi (626 cell. ml⁻¹), rispetto a quanto misurato con un tempo di ritenzione idraulica più alto (1377 cell. ml⁻¹). La frequenza di ciliati sessili e mobili era invece bassa nella fase di start-up. Durante il periodo di basso carico (intervallo fra il 160° e il 244° giorno) si osservava un'elevata presenza di flagellati autotrofi che spesso vengono associati alle precipitazioni abbondanti che in genere fanno affluire acqua piovana nel sedimentatore primario. Dopo circa 280 giorni comunque si assisteva ad una crescita nella frequenza dei ciliati sessili e mobili ad indicare la completa maturazione del fango attivo (Curds, 1970; Madoni, 2003). E' interessante notare come l'eccessivo carico organico dovuto allo sversamento del siero di latte abbia di fatto azzerato sia la concentrazione cellulare della popolazione dei protozoi che la biodiversità in termini di Richness; il primo gruppo microbico a colonizzare nuovamente l'impianto era quello dei flagellati, in questo caso associato con i ciliati natanti ma non con le tecamebe.

I gruppi dei protozoi mostravano delle interazioni tra di loro. Dall'analisi dei dati riportati in Tab. 5.4, che riporta una matrice di confronto tra le medie delle frequenze dei gruppi nei tre reattori (R1, R2 e R3) misurate nell'arco di tutta la sperimentazione, sembrerebbero sussistere fenomeni di competizione tra tutti i gruppi presenti nel fango attivo. Le relazioni più strette, con significatività (P) più elevata, riguardavano i flagellati che presentavano una correlazione negativa sia con i ciliati mobili che con i sessili e le tecamebe, mentre non sembravano in competizione con i ciliati natanti. Questo risultato era simile a quello ottenuto in precedenza attraverso la PCA che separava i flagellati ed i natanti rispetto agli altri gruppi dei protozoi (Fig 5.12). Zhou et al. (2008) evidenziavano per quanto riguarda i flagellati una relazione inversa e statisticamente significativa con i ciliati sessili, mentre riportavano una correlazione negativa ma non statisticamente significativa confrontando questo gruppo con i ciliati mobili e le tecamebe. Nel presente studio, i ciliati natanti risultavano invece in competizione solo con i ciliati sessili ($r=-0,31$; $p<0,05$) e questo trova piena giustificazione considerando che entrambi i gruppi generalmente predano la stessa nicchia ecologica, ossia i batteri dispersi nel

mixed liquor. I ciliati sessili, tendono a far scomparire i ciliati natanti essendo dei filtratori molto più efficienti di quest'ultimi nel convogliare i batteri dispersi nella regione orale per mezzo delle correnti ciliari (Madoni, 2003). Tra le popolazioni dei ciliati sessili e di quelli mobili è stata trovata una correlazione inversa statisticamente significativa ($r=-0.37$; $p<0,05$) (Tab. 5.4). A questo riguardo è interessante considerare che Zhou et al. (2008) riportavano per questi due gruppi un'interazione positiva, anche se non statisticamente significativa. Anche altri autori (Madoni, 2003) descrivono una co-dominanza tra i due gruppi visto che la loro nicchia ecologica è differente. Si può, quindi, ipotizzare che nel caso dell'impianto con reattori in cascata oggetto del presente studio i continui mutamenti nel carico organico possano aver favorito la crescita dei sessili e, conseguentemente, fatto diminuire la concentrazione dei mobili che sono sensibili a variazioni di carico (Curds & Cockburn, 1970; Klimowicz, 1970). Quindi, pur non essendoci una vera e propria competizione tra i due gruppi per le nicchie ecologiche, dall'analisi delle frequenze risultava tra loro una correlazione di tipo negativo. E' interessante notare come invece l'analisi PCA tenda ad associare le specie appartenenti ai due gruppi.

Vi era inoltre una correlazione inversa e significativa anche tra il gruppo dei ciliati sessili e le tecamebe (Tab. 5.4). Dall'osservazione del grafico PCA (Fig. 5.12) si nota che *Trinema* ed *Euglipha* si trovavano in posizione opposta a diversi ciliati sessili come *Vorticella* ed *Opercularia*. Invece il genere *Arcella* si trovava associato con i ciliati sessili e mobili. E' possibile ipotizzare per i generi *Trinema* ed *Euglipha* una competizione per le nicchie ecologiche o una sopravvivenza a diverse condizioni ambientali rispetto ad alcune specie di ciliati appartenenti al gruppo dei sessili. Si può infine osservare che i protozoi non sembravano seguire un andamento legato alla stagionalità. Infatti i campioni prelevati su R1 a circa un anno di distanza (stessa stagione) mostravano valori di similarità, calcolata con l'indice Dice, molto bassi (22g - 385g $Cs=0,2$; 71g - 436g $Cs=0,2$; 223g - 588g $Cs=0,4$).

Tab. 5.4: Analisi di correlazione dei gruppi di protozoi identificati durante l'intera sperimentazione. Le frequenze sono la media della popolazione presente nei tre reattori (R1, R2 e R3).

	Ciliati Mobili	Ciliati Sessili	Tecamebe	Ciliati Natant	Flagellati
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Ciliati Mobili (%)	1	-0,37*	-0,14	-0,07	-0,48**
Ciliati Sessili (%)	-0,37*	1	-0,31*	-0,32*	-0,51***
Tecamebe (%)	-0,14	-0,31*	1	-0,13	-0,47**
Ciliati Natanti (%)	-0,07	-0,32*	-0,13	1	-0,01
Flagellati (%)	-0,48**	-0,51***	-0,47**	-0,01	1

Legenda: Livelli di significatività del coefficiente *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$.

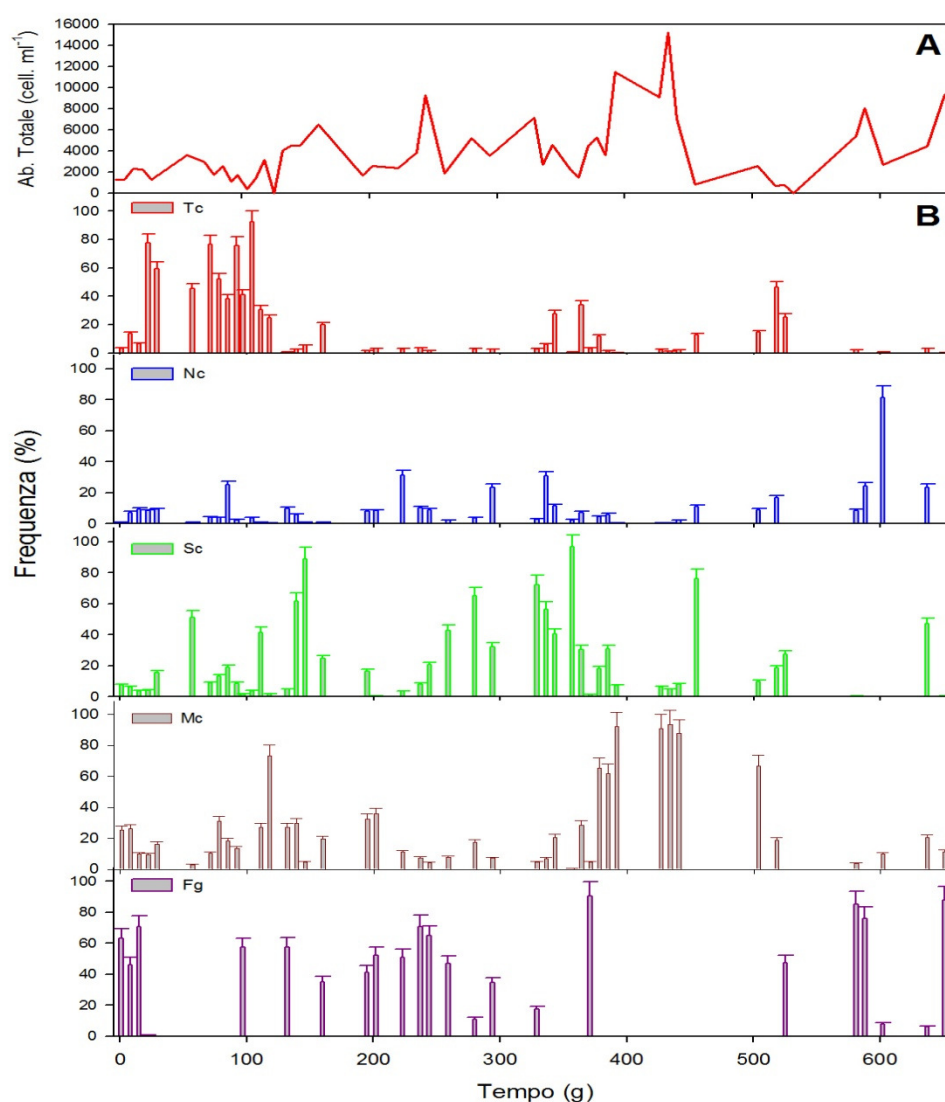


Fig 5.12: Andamento nel tempo dell'abbondanza totale (A) e della frequenza della popolazione dei protozoi (B) mediata sui tre reattori (R1, R2 e R3). Legenda: Tc=Tecamebe; Nc= Ciliati Natanti; Sc=Ciliati Sessili; Mc=Ciliati Mobili; Fg=Flagellati.

5.4. Interazione tra la popolazione dei protozoi e la comunità batterica

Confrontando gli indici relativi al microbiota monitorati sia relativamente alla popolazione dei protozoi che alla comunità batterica (Richness, Shannon-Weaver ed abbondanza), si è provato a verificare l'eventuale presenza di interazioni tra le due popolazioni. Dal confronto della Richness della popolazione dei protozoi e della comunità batterica misurate nel reattore R1 risultava una correlazione non significativa con $r=0,26$ (Fig. 5.13A). Viceversa il confronto degli indici Shannon-Weaver della popolazione dei protozoi e della comunità batterica misurati in R1 mostrava una correlazione diretta e significativa ($P<0,05$) (Fig. 5.13B). La Richness è un indice che misura il numero dei taxa differenti, mentre l'indice Shannon-Weaver (H) prende in considerazione, sia il numero dei taxa, sia la loro frequenza (abbondanza relativa) all'interno della comunità (Marzorati et al., 2008). Quindi, il valore dell'indice aumenta all'aumentare della diversità ed alti valori di Shannon sono associabili ad una comunità diversificata. I valori dell'indice Shannon-Weaver variano da un minimo di zero, in corrispondenza al quale la comunità sarà caratterizzata dalla presenza di una sola specie, ad un massimo che dipende dal numero di specie riscontrate e dal loro grado d'equidistribuzione. Dai risultati ottenuti in questo studio sembrerebbe che un'elevata biodiversità, misurata in termini di Richness, nella popolazione batterica non portava necessariamente ad un'elevata biodiversità nei protozoi, ma era piuttosto il peso dell'abbondanza delle specie batteriche ad influenzare la struttura della popolazione dei protozoi. Sembra esserci quindi una correlazione tra la biodiversità della comunità batterica e la popolazione dei protozoi visto che l'indice Shannon-Weaver misura in maniera più sensibile la biodiversità rispetto alla Richness che si riferisce semplicemente all'abbondanza di specie diverse. Ekelund et al. (2001) riportavano una correlazione positiva significativa tra l'abbondanza della comunità batterica e della popolazione dei protozoi per dei campioni di suolo prelevati a diverse profondità. Una maggiore biodiversità della componente dei batteri era quindi un elemento fondamentale per ottenere una maggiore stabilità all'interno del sistema batteri-protozoi (Hairston, 1968). Correlando inoltre l'abbondanza dei batteri in R1, generalmente approssimata all'MLSS, con l'abbondanza dei protozoi si trovava una correlazione inversa che, tuttavia, non era statisticamente significativa ($r=-0,29$ $p=0,17$) (grafico non mostrato). A questo riguardo, è noto che i protozoi esercitano una pressione sulla popolazione del fango attivo influenzando in modo significativo la quantità di biomassa (MLSS) al punto che un decremento nella predazione da parte dei protozoi porta ad un

incremento nella biomassa (Lee & Welander, 1994; Rensink & Rulkens, 1997). Tuttavia, secondo Lee & Oleszkiewicz (2003) incrementi significativi in termini di biomassa erano osservabili solo quando si determinava la completa inibizione della popolazione dei protozoi. E' interessante notare che nel presente studio la concentrazione più elevata di biomassa (R1, MLSS= 6525 mg l⁻¹) è stata registrata in coincidenza dell'azzeramento della popolazione dei protozoi causata, come già accennato, dallo sversamento del siero.

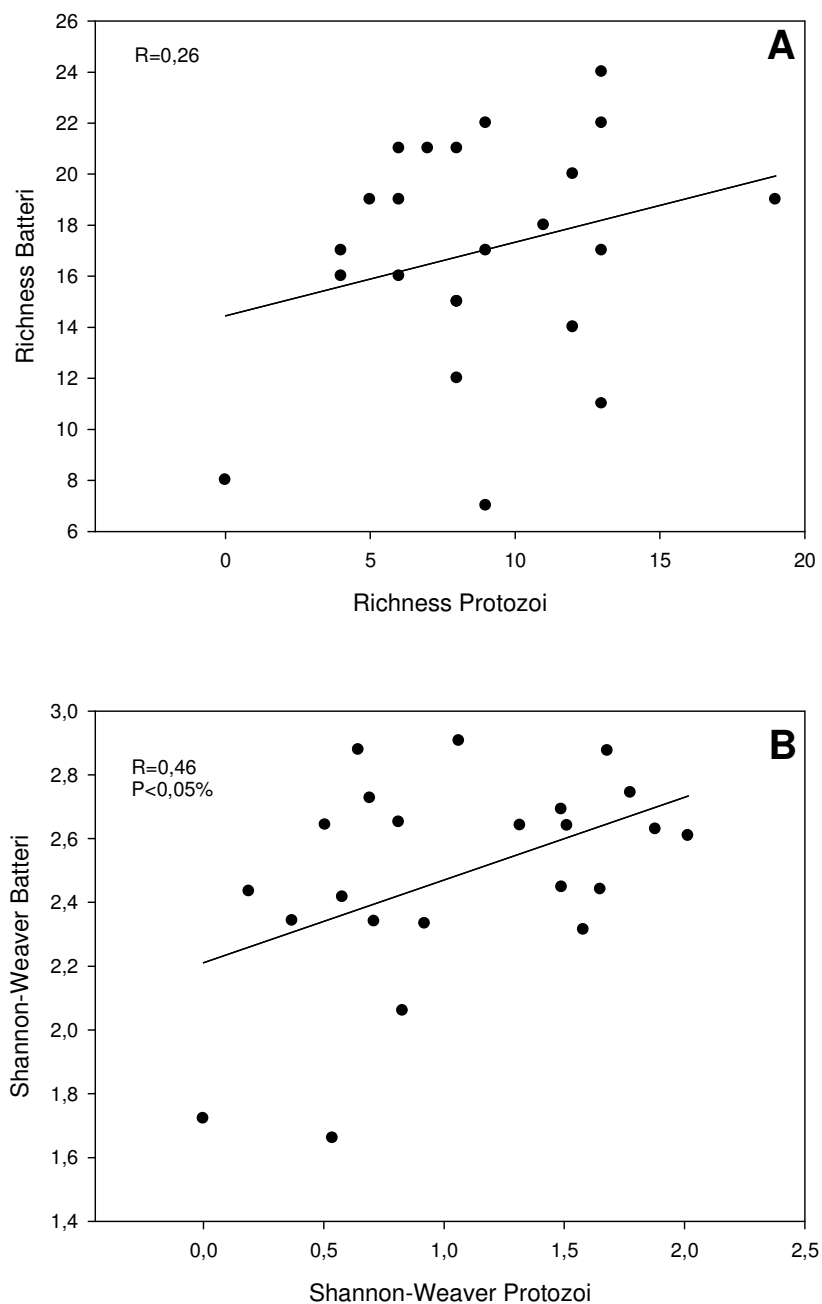


Fig. 5.13: Analisi di correlazione tra la Richness (A) e Shannon-Weaver (B) della comunità batterica e della popolazione dei protozoi.

5.5. Interazione tra il microbiota del fango attivo e le performance di rimozione dei reattori a cascata

Il microbiota del fango attivo, ed in particolare i protozoi, mostrano in genere una buona correlazione nei confronti dei tassi di rimozione di alcuni parametri chimici (Madoni, 1994; Lee et al., 2004; Zhou et al., 2006, 2008; Perez-Uz et al., 2010). Infatti, i protozoi intervengono sia in maniera diretta che indiretta nel processo di depurazione. Nel primo caso, intervengono consumando il substrato inquinante (Akpore et al., 2007, 2008) e predando i batteri dispersi nel mixed liquor che causano un aumento in termini di COD e BOD (Nicolau et al., 2001; Madoni, 2003). In maniera indiretta giocano un ruolo significativo, regolando mediante l'attività di predazione i processi della biomassa batterica, componente principale nella rimozione degli inquinanti presenti nel refluo (Bj et al., 2010). Sembra infatti che alcuni dei batteri del fango attivo possano rimanere in fase di crescita logaritmica grazie all'attività di pascolo dei protozoi (Ratsak et al., 1996). Anche in questo studio si sono riscontrate diverse correlazioni significative tra la popolazione dei protozoi e la rimozione di alcune delle principali classi di inquinanti monitorate nei reflui industriali. In Tab. 5.5 vengono riportate alcune classi di inquinanti come COD, NH_4 , tensioattivi MBAS e BIAS, riportate in termini di abbattimento percentuale calcolato tra l'ingresso (IN) e l'ultimo reattore (R3). Gli ioni NO_2 ed NO_3 , generati durante il processo di nitrificazione, vengono riportati in termini di concentrazione (mg l^{-1}) misurata sul terzo reattore R3. Anche lo ione PO_4 , essendo soggetto sia a rimozione che a processi di rilascio, è stato riportato in termini di concentrazione sul reattore R3. Come si può osservare dalla Tab. 5.5, i ciliati mobili e sessili sembravano svolgere, come già indicato da altri autori (Madoni, 1994b; Salvado et al., 1995; Zhou et al., 2008), un importante ruolo per quanto riguarda l'abbattimento del substrato organico misurato sotto forma di COD, mostrando una correlazione positiva e significativa ($P \leq 0.01$ e $P \leq 0.05$, rispettivamente) con questo parametro. Inoltre, oltre ad agire in maniera diretta, l'escrizione di nutrienti minerali da parte dei protozoi sembra favorire un più rapido utilizzo del substrato carbonioso da parte dei batteri (Coleman et al., 1978; Bloem et al., 1988; Tezuka, 1990). Il tasso di rimozione dello ione ammonio mostrava una buona correlazione con la presenza di tecamebe, come già osservato da altri autori (Madoni, 1994b; Perez-Uz et al., 2010). La presenza di un ottimo tasso di nitrificazione, in presenza di questo protozoo, sembrerebbe dovuto al fatto che sia il processo di nitrificazione che la crescita delle tecamebe siano influenzati entrambi da elevati tempi di ritenzione idraulica (Madoni, 2003). Anche i ciliati mobili, come rilevato da Madoni (1994b) ma non da Zhou et al. (2008), mostravano buoni

valori di correlazione sull'abbattimento dello ione ammonio. L'incremento del tasso di nitrificazione associato ai ciliati, era dovuto probabilmente all'abilità dei protozoi di regolare la presenza dei batteri nitrificanti mediante la loro opera di predazione (Verhagen & Laanbroek, 1991; Petropoulos & Gilbride, 2005; Pogue & Gilbride, 2007). Tuttavia, Lifang et al. (2011) riportano come i protozoi influenzino sicuramente il tasso di crescita dei nitrificanti, in particolar modo i K-strateghi (*Nitrosospira* e *Nitrospira*), ma non abbiano un influenza diretta sulle performance di nitrificazione. L'elemento che correlava maggiormente con l'abbattimento del substrato carbonioso e azotato risultava essere la Richness, ossia la biodiversità del fango attivo. Anche secondo Madoni (1994b), la biodiversità risultava essere l'indice con una maggiore correlazione nei confronti nell'abbattimento del substrato organico. Viceversa i flagellati ed i ciliati natanti si dimostravano indicatori di cattiva condizione del fango attivo correlando negativamente sia con il tasso di rimozione del substrato organico, che con quello dello ione ammonio (Tab. 5.5) come trovato anche da Madoni, 1994b. Zhou et al. (2006; 2008) riportavano per i flagellati un interazione negativa con il tasso di nitrificazione ma non con quello di rimozione del substrato organico, mentre i ciliati natanti non mostravano interazioni significative con nessuno dei due substrati. Secondo Perez et al. (2010) invece i flagellati giocherebbero un ruolo positivo nella nitrificazione incrementandone l'efficienza, per gli autori, infatti, la pressione dei flagellati indurrebbe la formazione di aggregati batterici per resistere alla predazione, che produrrebbero un effetto positivo per quanto riguarda l'abbattimento del substrato azotato.

Anche la resa di rimozione dei tensioattivi anionici (MBAS) e non ionici (BIAS) mostrava una correlazione positiva con la popolazione dei protozoi. In particolare, l'abbattimento dei tensioattivi anionici correlava in maniera significativa con la frequenza dei ciliati mobili, mentre quello dei tensioattivi non ionici con i ciliati sessili (Tab. 5.5). In base alle nostre conoscenze, non sono disponibili in letteratura informazioni riguardo a possibili correlazioni tra rimozione dei tensioattivi e ciliati nei fanghi attivi; alcune pubblicazioni (Hrenovic & Ivankovic, 2007; Wyrwas et al., 2011) riportavano invece come elevati valori di questo parametro in ingresso possano abbassare le potenzialità di rimozione dei fanghi attivi. I motivi per cui la dominanza di ciliati mobili o sessili sembrava favorire l'abbattimento di una sola classe di tensioattivi (MBAS o BIAS, rispettivamente), potrebbe dipendere dal fatto che i due gruppi agivano su differenti specie di batteri operanti nella rimozione dei tensioattivi. Infatti è noto che alcune specie batteriche sono più adatte a rimuovere determinati tipi di tensioattivi rispetto ad altri (Abd-Allah & Srorr, 1998). Anche l'abbondanza e la Richness dei protozoi correlava positivamente e significativamente ($P \leq 0,05$) con i tensioattivi anionici, mentre la

presenza di ciliati natanti e flagellati correlava negativamente ed in maniera significativa ($P \leq 0,05$) con i tensioattivi non ionici, mentre non risultava correlare con i tensioattivi anionici. Per quanto riguarda la presenza di nitriti e nitrati, generati nel processo di nitrificazione, si osservava assenza di correlazione tra i nitriti e le varie classi di protozoi. I nitrati, invece, mostravano una correlazione positiva e significativa ($P \leq 0,05$) con le tecamebe. Questo risultato può essere spiegato dal fatto che, come accennato in precedenza, le tecamebe sono associate positivamente con il processo di nitrificazione, che genera NO_3 come prodotto finale quando la reazione avviene in maniera completa. La correlazione tecamebe - nitrati confermerebbe quindi che la presenza di questo gruppo di protozoi è indice del corretto svolgimento di tutto il processo. Viceversa i flagellati, correlati negativamente con il processo di nitrificazione, mostravano una correlazione negativa anche con la concentrazione di NO_3 . Vi era inoltre una correlazione positiva tra la concentrazione dei PO_4 in R3 e la frequenza delle tecamebe, mentre questo parametro chimico correlava negativamente con la Richness. La Richness dei batteri, a differenza di quella dei protozoi, non sembrava essere un buon indicatore per definire il processo di depurazione: questo parametro, infatti, non mostrava nessuna correlazione statisticamente significativa con tutti i parametri chimici presi in considerazione (Tab. 5.5). Questa situazione è stata analizzata in maniera più approfondita nel Par. 5.10.

Tab. 5.5: Coefficiente di correlazione tra il microbiota, espresso in termini di frequenza dei cinque gruppi di protozoi (Ciliati Mobili, Ciliati Sessili, Ciliati Natanti, Tecamebe e Flagellati), di Richness dei Protozoi e dell'abbondanza e della Richness dei batteri, ed alcuni parametri chimici, espressi come percentuale di rimozione di alcuni inquinanti (COD, NH_4 , Tensioattivi MBAS, Tensioattivi BIAS) e come concentrazione nel terzo reattore (R3) di alcuni anioni (PO_4 , NO_2 , NO_3). I dati riportati sono i valori medi ottenuti nei tre reattori (R1, R2 e R3).

	COD (%)	NH₄ (%)	Tens.MBAS (%)	Tens.BIA S (%)	PO₄ (mg l⁻¹)	NO₂ (mg l⁻¹)	NO₃ (mg l⁻¹)
Ciliati Mobili (%)	0,45**	0,38*	0,17	0,35*	-0,1	0,25	0,17
Ciliati Sessili (%)	0,34*	0,19	0,4**	-0,04	-0,18	-0,06	-0,05
Ciliati Natanti (%)	-0,46**	-0,3*	0,06	-0,32*	-0,1	-0,16	-0,09
Tecamebe (%)	0,29	0,38*	0,005	0,2	0,3*	-0,03	0,31*
Flagellati (%)	-0,39**	-0,33*	0,06	-0,32*	-0,04	-0,02	-0,35*
Richness Protozoi	0,7***	0,52**	0,32*	0,2	-0,4**	0,16	0,07
Abbondanza (cell. l⁻¹)	0,32*	0,18	0,35*	0,13	-0,22	0,02	0,04
Richness bacteri	-0,0151	0,00390	-0,0242	-0,0735	-0,0766	0,0116	0,249

Legenda: Livelli di significatività del coefficiente *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$.

5.6. Utilizzo dell'analisi P.C.A. (Principal Component Analysis) per la definizione delle variabili più importanti all'interno del processo depurativo e delle possibili loro interazioni.

Al fine di riuscire ad integrare tutti i parametri chiave per comprendere a fondo il processo di depurazione dei reflui lattiero-caseari in un impianto aerobio a fanghi attivi con reattori a cascata sono state analizzate 29 variabili utilizzando, appunto, l'analisi delle componenti principale (PCA, Principal Component Analysis). La Tab. 5.6 riporta tutte le variabili prese in considerazione, raccolte in 5 gruppi a seconda del ruolo svolto nell'ambito del processo di depurazione e la loro correlazione con i primi 3 assi. Nel primo gruppo venivano prese in considerazione le variabili già approfondite nel precedente paragrafo, ossia gli inquinanti chimici rimossi biologicamente: COD, BOD, NH_4 , BIAS, MBAS, calcolati come abbattimento tra l'ingresso (IN) e l'ultimo reattore (R3). Il secondo gruppo raccoglieva gli ioni che potevano svilupparsi durante il processo di depurazione, ossia nitriti (NO_2) e nitrati (NO_3) nell'ambito del processo di nitrificazione misurati come concentrazione nell'ultimo settore (R3), e i fosfati (PO_4) misurati anch'esso come concentrazione nell'ultimo reattore (R3). Il terzo gruppo riguardava i parametri in ingresso che potevano in qualche modo determinare inibizione del processo di depurazione, ossia i cloruri ed un parametro in parte correlato la salinità, che ad elevate concentrazione possono disturbare l'attività dei protozoi (Salvadò et al., 2001). Allo stesso gruppo di variabili era aggiunto inoltre il pH in ingresso, che presentando valori molto variabili (particolarmente bassi o alti nell'influente) poteva favorire la crescita di batteri filamentosi peggiorando la qualità di sedimentazione (Jenkins, 2004). Il quarto gruppo di variabili analizzate riguardava il microbiota del fango attivo, per il quale venivano considerati: cinque gruppi di protozoi (tecamebe, ciliati natanti, ciliati sessili, ciliati mobili e flagellati), abbondanza e Richness dei protozoi, e per quanto riguarda i batteri la Richness. Tutti i valori riportati erano la media tra i tre reattori (R1, R2 e R3), tenendo conto di tutti i campionamenti effettuati. Il quinto gruppo riguardava i principali parametri operativi (Metcalf & Eddy, 2003) inerenti al processo di depurazione: OD e ORP riferiti all'R1, MLSS, MS30, Età del fango (SRT), Fattore di carico (F/M) e Temperatura (T) considerati come media sui tre reattori. Infine, il sesto gruppo di variabili riguardava gli indici di qualità per la valutazione del fango attivo: lo SVI (Par. 3.7.3.) e lo SBI (Par. 3.9.1.) mediati sui tre reattori (R1, R2 e R3). L'analisi fattoriale, come si può vedere dalla Tab. 5.6, mostra i 3 fattori che spiegavano il 42% della varianza accumulata. Il primo fattore spiegava 20% della varianza ed era influenzato dalla rimozione del substrato organico (COD e BOD). Il secondo

fattore spiegava il 13% della varianza ed era influenzato dalla salinità ed i cloruri. Infine, il terzo fattore spiegava il 12% della varianza in relazione al carico organico in ingresso (ORL) e alla biomassa del fango attivo (MLSS). Questi tre fattori spiegavano complessivamente il 45 % della varianza, valore comparabile con quello trovato da Zhou et al. (2008) che, comunque, avevano condotto analisi PCA su un numero più ridotto di parametri rispetto al presente studio. Dall'osservazione del grafico di Fig. 5.14, che riporta la disposizione delle variabili rispetto alle prime 2 componenti, si desumono le seguenti quattro indicazioni utili per comprendere meglio il processo.

1) Esistenza di associazione tra abbattimento del COD e BOD e indice SBI, che denota come quest'ultimo sia molto sensibile per quanto riguarda l'abbattimento del substrato carbonioso; non era un caso, quindi, se il valore di correlazione con il primo asse risultava elevato (0,81) (Tab 5.6). Il tasso di rimozione del BOD e COD era inoltre associato alla Richness come già visto correlando in maniera diretta i dati. Anche i ciliati sessili e mobili mostravano buoni valori di correlazione con il primo asse (0,41 e 0,51, rispettivamente), confermando i risultati ottenuti con la correlazione diretta. Altro fattore influenzato dal primo asse era l'ORP che come già riportato da altri autori (Wareham, 1994; Metcalf & Eddy, 2003; Li & Bishop, 2004) è un parametro strategico che evidenzia il corretto svolgimento del processo di depurazione aerobica.

2) Associazione tra F/M ed i flagellati e ciliati natanti. Diversi autori (Curds & Cockburn, 1970; Comas et al, 2003) hanno riportato come questi due gruppi siano generalmente favoriti da valori elevati del Fattore di Carico.

3) Associazione tra la T, la percentuale di abbattimento dello ione ammonio e la formazione di nitrati. Infatti, è noto che l'alta temperatura gioca un importante ruolo nel favorire il processo di nitrificazione migliorandone l'efficienza, viceversa basse temperature rallentano il processo (Antoniou et al., 1990; Kim et al., 2006).

4) Associazione tra la concentrazione dei PO_4 , la salinità ed i cloruri. La concentrazione salina potrebbe in qualche modo quindi giocare un ruolo nei processi di rimozione dei PO_4 . Alcuni autori riportano come i cationi svolgano un ruolo nel rilascio dei fosfati; in particolare la presenza K^+ e Mg^+ è fondamentale per l'adsorbimento del fosfato nel fango attivo (Randall et al., 1992; Schonborn, 2001). La presenza eccessiva di cloruri potrebbe forse inibire l'adsorbimento dei fosfati. Bisogna inoltre notare come i Cloruri e la Salinità siano opposti allo SVI, che presenta infatti una correlazione negativa con il secondo asse ($R=-0,6$). A questo riguardo è interessante notare che i cloruri vengono in genere utilizzati nel controllo dei processi di Bulking per contenere i filamentosi e regolare la corretta

sedimentazione del fango attivo (Jenkins, 2004). E' ipotizzabile quindi che i cloruri giochino un ruolo nel contenimento dei valori dell'indice SVI, limitando la crescita dei filamentosi.

Tab. 5.6: Relazione tra i primi tre fattori ottenuti dalla PCA ed i parametri presi in considerazione nell'ambito del processo di depurazione.

Gruppo	Parametro	Asse1	Asse 2	Asse 3
Inquinanti chimici rimossi IN-R3 (%)	COD	0,8	-0,03	0,18
	BOD	0,83	0,001	0,12
	NH ₄	0,35	0,34	-0,006
	Bi.A.S.	0,2	0,34	0,36
	M.B.A.S	0,14	0,31	0,39
	Solidi sospesi	0,26	-0,32	0,51
Ioni rilasciati R3 (mg l ⁻¹)	NO ₂	0,25	0,18	0,02
	NO ₃	0,29	0,52	-0,14
	PO ₄	-0,05	0,74	0,17
Potenziali fattori di inibizione	Cl (mg l ⁻¹)	-0,16	0,59	0,11
	Sal	0,02	0,79	-0,12
	pH	0,24	-0,07	-0,55
Struttura Microbiota	Tecamebe - Tc (%)	0,11	0,59	-0,11
	Ciliati Natanti - Nc (%)	-0,3	-0,29	-0,11
	Ciliati Sessili - Sc (%)	0,41	-0,16	-0,1
	Ciliati Mobili - Mc (%)	0,51	-0,03	0,12
	Flagellati - Fg (%)	-0,57	-0,16	0,21
	Richness Protozoi	0,67	-0,17	-0,17
	Abbondanza dei protozoi (cell. ml ⁻¹)	0,29	0,04	0,1
	Richness Batteri	0,15	0,17	-0,48
Reactor Parameters	Solidi sedimentabili in 30 min – MS30 (ml l ⁻¹)	0,47	-0,51	0,33
	Solidi sospesi mixed liquor - MLSS (mg l ⁻¹)	0,36	0,16	0,71
	Ossigeno disciolto R1 - OD (mg l ⁻¹)	0,39	0,01	-0,69
	Potenziale Redox R1 - ORP (mg l ⁻¹)	0,61	-0,13	-0,35
	Età del fango - SRT (g)	0,38	0,08	0,52
	Fattore di Carico (F/M) (KgBOD KgMLSS ⁻¹ g ⁻¹)	-0,36	-0,11	0,17
	Temperatura - T (°C)	0,39	0,43	-0,06
	Carico Organico – OL (KgBOD ₅ g ⁻¹)	-0,17	0,08	0,71
Sludge Quality Index	Indice del volume del fango – SVI (ml l ⁻¹)	0,3	-0,6	-0,05
	Indice biotico del fango – SBI	0,81	0,07	-0,13

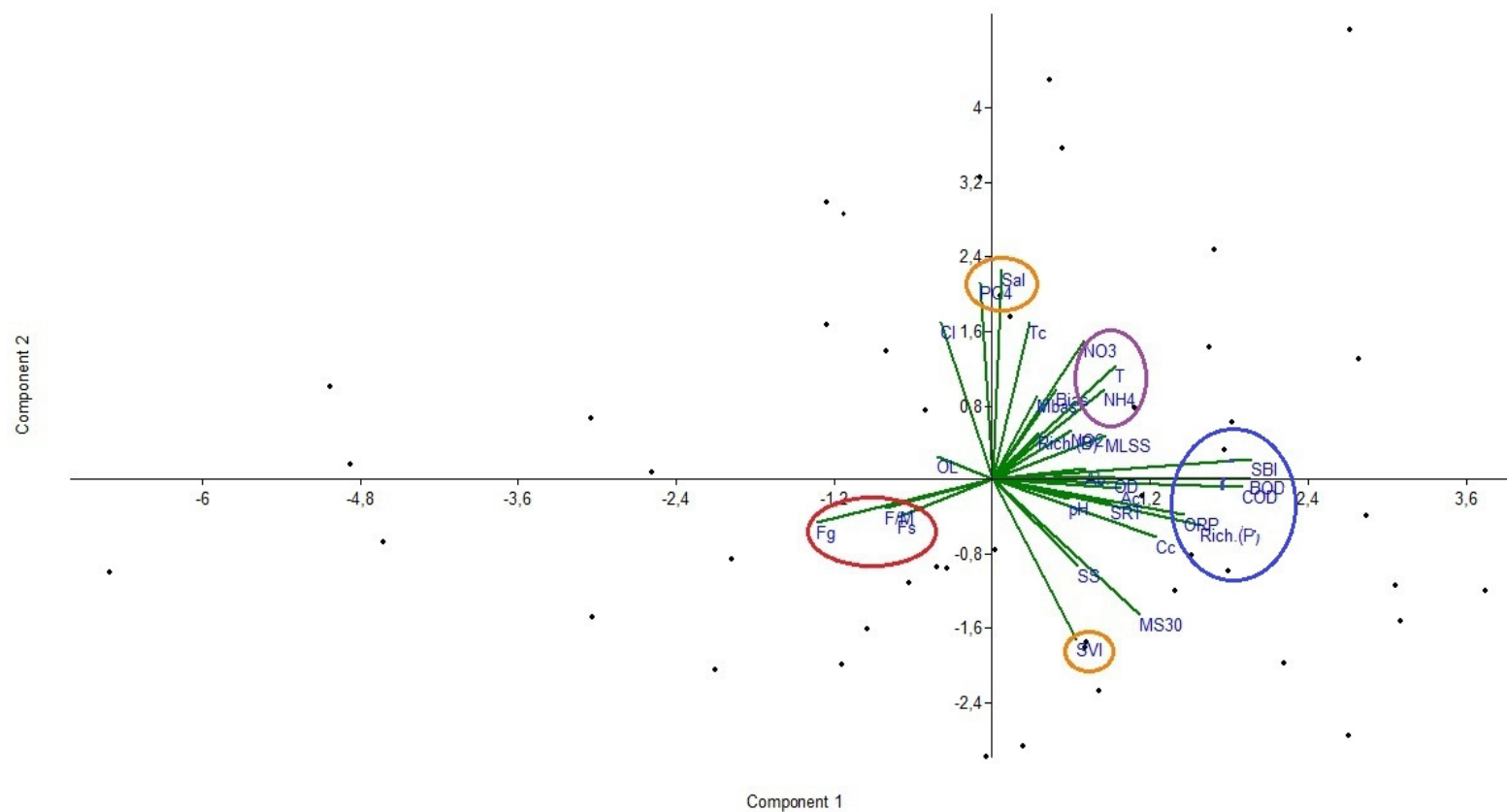


Fig. 5.14: Analisi delle Componenti Principali (in ascissa e in ordinata sono rappresentati rispettivamente la componente 1 e 2 della PCA)

5.7 Applicazione dell'indice SBI su reattori a cascata per reflui caseari

Diversi autori hanno testato l'applicabilità dell'indice SBI in particolari condizioni di funzionamento degli impianti a fanghi attivi.

Arévalo et al. (2009) hanno misurato l'indice SBI su impianto SBR testando la risposta dei protozoi a due differenti tempi di ritenzione. Papadimitrou et al. (2007), hanno applicato l'indice SBI su un reattore SBR disturbato mediante elementi tossici (fenoli, tiocianidi, cianidi). Lourenco et al. (2009) hanno impiegato invece l'indice SBI su un sistema SBR per determinare l'effetto sui protozoi di una prolungata fase anaerobica nel trattamento di biodecolorazione di coloranti sintetici. Le variazioni di indice SBI sono state studiate anche in relazione al confronto fra due differenti tipi di impianto a fanghi attivi quali, la tipologia SBR e l'impianto a fanghi attivi in continuo (Papadimitrou et al., 2004). Drzewicki & Kulikowska (2011) evidenziano invece i limiti nella precisione dell'indice a fronte di elevati carichi di ione ammonio. In questo studio si è cercato di testare l'applicabilità dell'indice SBI sui reflui caseari e su un sistema a fanghi attivi a cascata. Entrambi gli elementi costituiscono delle novità, in quanto non ci sono ricerche sull'applicabilità dello SBI a questa particolare tipologia di refluo, che presentando peculiarità come la variabilità del carico in ingresso e la presenza di potenziali inibitori (ad esempio i cloruri) potrebbe presentare fattori di criticità per l'indice. Non ci sono studi nemmeno sull'applicabilità dell'indice su un reattore a cascata che presenta, come abbiamo visto in precedenza (Par 5.1), condizioni differenti da un reattore ad un altro. Lo studio è stato condotto valutando l'impatto, e conseguentemente il grado di correlazione tra 5 classi di inquinanti chimici presenti nel refluo (COD, BOD, NH_4 , MBAS e BIAS) e l'indice SBI. Come si può notare dalla Tab. 5.7, l'indice rispondeva bene se veniva messo in relazione solo il primo reattore (R1), anche se in questa maniera la rimozione dei tensioattivi non risultava correlare con l'indice, oppure il valore mediato dell'indice. In quest'ultimo caso l'indice sembrava correlare in maniera significativa con tutti i parametri presi in considerazione.

L'indice SBI non correlava bene con i valori di abbattimento misurati nelle vasche R2 e R3 perché, come visto in precedenza, in questi due settori l'abbattimento degli inquinanti era di entità molto inferiore rispetto a quanto non avvenga nel primo reattore a fronte di un valore dell'indice che resta simile nei tre reattori biologici.

Tab. 5.7: Coefficiente di correlazione tra il valore dell'indice SBI e l'efficienza di rimozione di alcuni parametri chimici. La correlazione è stata effettuata ponderando i valori dello SBI misurati su ogni reattore (R1, R2 e R3) e la percentuale di rimozione di ciascun inquinante su ogni reattore (IN-R1; R1-R2; R2-R3). L'ultima riga riporta la correlazione tra l'indice SBI mediato tra i tre reattori e l'abbattimento degli inquinanti calcolato tra l'ingresso (IN) e l'ultimo reattore (R3).

	COD (%)	BOD (%)	NH4 (%)	MBAS (%)	BIAS (%)
SBI (R1)	0.72***	0.73***	0,62***	0.11	0.05
SBI (R2)	0.02	0.08	0.25	0.27*	0.34*
SBI (R3)	-0,17	0,09	0,02	0,14	0,11
SBI (R1, R2, R3)	0.67***	0.65***	0.46**	0.38*	0.4**

Legenda: Livelli di significatività del coefficiente *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

Un altro approccio utile all'interpretazione dell'indice era quello di relazionarlo con la concentrazione degli inquinanti misurata nei tre reattori. In tal modo l'indice correlava in maniera significativa con la concentrazione di COD, BOD e NH_4 dei tre settori (Tab. 5.8), anche se lo ione ammonio mostrava coefficienti di correlazione altamente significativi in R1. Infine, la concentrazione dei tensioattivi MBAS e BIAS correlava significativamente solo nel reattore R3.

Tab. 5.8: Coefficiente di correlazione tra il valore dell'indice SBI ed alcuni parametri chimici. Viene riportata la correlazione tra i valori dello SBI misurati su ogni reattore (R1, R2, R3) e la concentrazione dei vari inquinanti su ogni reattore.

	COD (mg l^{-1})	BOD (mg l^{-1})	NH4 (mg l^{-1})	MBAS (mg l^{-1})	BIAS (mg l^{-1})
SBI (R1)	-0.66***	-0,67***	-0.48***	-0.36*	-0.01
SBI (R2)	-0.68***	-0,67***	-0.36**	-0.22	-0.36**
SBI (R3)	-0,67***	-0,66***	-0,34*	-0.34*	-0.52***

Legenda: Livelli di significatività del coefficiente *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

In conclusione, l'indice SBI sembra un valido strumento anche per il monitoraggio degli impianti a fanghi attivi per il trattamento dei reflui caseari. L'indice sembra molto sensibile nei confronti dell'abbattimento del substrato carbonioso mentre risulta leggermente meno sensibile nei confronti del substrato azotato. Anche i tensioattivi MBAS e BIAS correlano in maniera significativa con l'indice SBI. La valutazione più corretta per correlare il punteggio all'indice SBI con le performance del processo di depurazione nei reattori a cascata sembra quella di mediare l'indice oppure considerare semplicemente il valore dell'ultimo reattore.

5.8. Effetto della variazione dei regimi di ossigenazione sulle performance ed il microbiota del fango attivo

5.8.1. Effetto sulle performance

La variazione dei regimi di aerazione in termini di ciclo "ON/OFF" (tempo, min) di funzionamento delle soffiante, hanno provocato un cambiamento sia nei valori dell'ossigeno disciolto (OD) sia del potenziale redox (ORP) nei tre reattori R1, R2 e R3 (Tab. 5.9) influenzando le performance di rimozione (Fig. 5.15 A e B). Quando il quantitativo di ossigeno fornito era pari a 40,2 e 30,2 $\text{KgO}_2 \text{ g}^{-1}$ (regimi di aerazione del 30/60 e 15/45, rispettivamente) sia l'OD che l'ORP facevano registrare valori molto bassi. In particolare, nel regime di ossigenazione 15/45, l'OD e l'ORP erano pari a 0,2 mg l^{-1} e -180 mV, rispettivamente, valori tipici di una condizione anossica (Dubber & Gray, 2011). Evidentemente, i 15 min di aerazione non erano sufficienti per controbilanciare la lunga fase anossica (45 min). Molto probabilmente, la frazione organica rapidamente biodegradabile, principalmente costituita da acidi grassi (Ndegwa et al., 2007), veniva consumata solo in parte nel primo reattore a causa della bassa disponibilità di ossigeno disciolto che sfavorisce il processo di degradazione aerobica. Conseguentemente, nei reattori R2 ed R3 il substrato organico biodegradabile risultava troppo elevato per l'OD che veniva rapidamente e completamente consumato. Al contrario, nel caso di regimi di aerazione 45/15, 15/15, 30/30 e 30/45, in cui la quantità di ossigeno fornito era sempre superiore a 45,4 $\text{KgO}_2 \text{ g}^{-1}$, i valori di ORP e DO aumentavano passando da R1 ad R2 e, successivamente, a R3 (Tab. 2). Con questi regimi di aerazione più favorevoli la degradazione della frazione organica rapidamente biodegradabile avveniva in R1, e di conseguenza, vi era un eccesso di ossigeno disponibile nei reattori R2 e R3, per la biodegradazione aerobica della frazione organica residua (Ndegwa et al., 2007). Ad eccezione dei regimi 15/45 e 30/60, l'efficienze di rimozione del COD era nel range 88-94%, valori simili a quelli riportati dalla Carta-Escobar et al. (2004) su un

impianto pilota con tre reattori a cascata per il trattamento di reflui caseari anche se gli autori avevano utilizzato per il loro studio un refluo modelli anziché reale. Analogamente, ed in accordo con questi autori (Carta-Escobar et al., 2004), il pH del mixed liquor aumentava passando attraverso i tre reattori (Tab. 5.9). Con l'eccezione dei regimi 15/45 e 30/60, il carico di COD era sempre rimosso principalmente in R1, mentre in R2 ed R3 si osservava una riduzione del COD limitata (Fig. 5.15 A).

L'effluente finale presentava una concentrazione di COD sempre inferiore a 160 mg l^{-1} . Al contrario, con bassi regimi di aerazione (15/45 e 30/60), corrispondenti ad un quantitativo di ossigeno pari a 30,2 e 40,2 $\text{Kg O}_2 \text{ g}^{-1}$, rispettivamente, il tasso di rimozione del COD si riduceva a circa il 70% di abbattimento complessivo (IN-R3) (Fig. 5.15 A).

Come già accennato, questi regimi di aerazione, soprattutto nella condizione 15/45, presentavano bassi valori di OD ed ORP (Tab. 5.9) associabili a condizioni anossiche, che generalmente portano a performance di rimozione ridotte negli impianti a fanghi attivi (Metcalf & Eddy, 2003; Li & Bishop, 2004).

L'effetto dei vari regimi di aerazione sulla rimozione del BOD_5 mostrava risposte e andamenti del tutto simili a quelli osservati monitorando il COD (figura non mostrata).

La performance di rimozione sullo ione ammonio (NH_4) sembrava mostrare un comportamento simile a quello del substrato carbonioso; infatti, sotto il regime di aerazione 15/45 si registrava un decremento dell'efficienza di rimozione che scendeva a circa il 37% complessivamente. Allo stesso modo, Zhanping e Jingly (2010) osservavano diminuzioni importanti nel processo di nitrificazione con un valore critico di OD pari a 0,5-0,2 mg l^{-1} , lo stesso trovato nel nostro studio. Guo et al.(2009) riferiscono che il processo di nitrificazione può avvenire anche a bassi livelli di OD; si deve notare, tuttavia, che nel loro studio il livello di COD era 215 mg l^{-1} e, pertanto, molto inferiore a quello ($\text{COD } 1147 \text{ mg l}^{-1}$) registrato quando il regime di aerazione era 15/45. Molto probabilmente, nel nostro caso il poco ossigeno disponibile è stato usato principalmente per ossidare il substrato carbonioso a scapito della frazione azotata che richiede per il processo ossidativo una quantità di O_2 non trascurabile (4,57 KgO_2 per Kg NH_4) (Metcalf & Eddy, 2003) e superiore a quella necessaria per l'esaurimento della frazione organica. Tuttavia, la quantità di $\text{NH}_4\text{-N}$ rimossa (0,69 $\text{Kg NH}_4\text{-N}$) in questa condizione può dipendere, più che dal processo di nitrificazione difficile da far avvenire in questa condizione, da un processo di assimilazione. Diversi studi, infatti, riportano un ruolo attivo dei protozoi nella rimozione del substrato azotato (Petropoulos & Gilbride, 2005; Akpor et al., 2007 e 2008). Inoltre, vale la pena ricordare che le concentrazioni di nitriti ($\text{NO}_2\text{-N}$) e nitrati ($\text{NO}_3\text{-N}$) accumulati nel mixed liquor nelle

condizioni di bassa ossigenazione (regimi di aerazione 15/45 e 30/60) erano praticamente nulle in tutti e tre i reattori (dati non mostrati). Questo fenomeno può essere spiegato in parte con una scarsa rimozione dello ione ammonio, in particolare nel caso del regime di aerazione 15/45, ed in parte, con processi di denitrificazione che, secondo Yuan e Gao (2010), potrebbero avvenire anche nelle micro-zone anaerobiche all'interno dei fiocchi di fango attivo. A tutti gli altri regimi di aerazione, i livelli di rimozione di azoto ammoniacale erano molto elevati, con performance comprese tra il 93 ed il 98%. A differenza di quanto osservato nel caso della rimozione di COD, anche nel regime di aerazione 30/60 l'efficienza di rimozione era alta; si deve notare, tuttavia, che il carico giornaliero dell'affluente $\text{NH}_4\text{-N}$ ($0,33 \text{ Kg NH}_4\text{-N g}^{-1}$) era significativamente inferiore a quello rilevato con il regime di aerazione 15/45 ($1,86 \text{ Kg NH}_4\text{-N g}^{-1}$); questa condizione potrebbe aver favorito una migliore performance di rimozione. Analogamente al COD, il carico di $\text{NH}_4\text{-N}$ era rimosso per la maggior parte nel reattore R1 con l'eccezione, tuttavia, del regime 45/15 (Fig. 5.15 B). Infine, con la sola eccezione del regime di 15/45, la concentrazione finale di $\text{NH}_4\text{-N}$ dell'effluente (all'uscita di R3) era sempre inferiore a $1,0 \text{ mg l}^{-1}$. L'impianto ed i fanghi attivi hanno mostrato buona flessibilità e adattabilità ai diversi regimi di aerazione: infatti, passando da $30,2 \text{ Kg O}_2 \text{ g}^{-1}$ (regime di aerazione 15/45) a $60,4 \text{ KgO}_2 \text{ g}^{-1}$ il sistema riacquisiva una buona funzionalità ed una adeguata efficienza nella rimozione di COD e $\text{NH}_4\text{-N}$ dopo solo due settimane (Fig. 5.15 A e B). Per quanto riguarda la rimozione dello ione fosfato ($\text{PO}_4\text{-P}$), nei cicli anerobici (15/45 e 30/60) veniva osservata una performance negativa probabilmente causata dal rilascio di questo ione in condizioni anossiche prolungate da parte del microbiota del fango attivo (Majed et al., 2009; Jeon et al., 2001) (Fig. 5.16). Tuttavia, venivano registrati tassi di rimozione negativa anche nei regimi più alti di aerazione ($90,6$ e $60,4 \text{ KgO}_2 \text{ g}^{-1}$). Questa osservazione è in qualche modo coerente con quello riportato da Danesh e Oleszkiewicz (1997) i quali hanno ipotizzato che, in carenza di acidi grassi volatili, i fosfati rilasciati durante la fase anaerobica possano non venire assorbiti dai batteri PAO durante la successiva fase aerobica. Anche Dubber & Gray (2011) osservavano situazioni simili con tassi negativi nell'abbattimento del fosfato in condizione aerobiche. Nel nostro caso anche la presenza dei cloruri potrebbe aver avuto un ruolo nel condizionare la fase di adsorbimento dei fosfati in condizioni aerobiche da parte del fango attivo (Par. 5.6).

Tab. 5.9: Differenti regimi di aerazione, espressi come cicli ON/OFF (min) della soffiante, e condizioni operative (OD, ORP, pH, T) nei tre reattori a cascata (R1, R2 e R3).

Regime di aerazione	Ossigeno fornito	Ossigeno disciolto (mg l ⁻¹)			Potenziale Redox (mV)			pH (U.pH)			Temperatura (°C)		
ON/OFF (min)	(kg O ₂ g ⁻¹)	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
45/15	90.6	3.1	8.9	8.1	5.5	92.5	145.7	7	7.2	7.3	21.6	21.8	22.1
15/15	60.4	6.2	8.0	8.2	59.3	73.2	86.0	7.3	7.5	7.6	23.0	22.6	22.6
15/45	30.2	0.2	0.2	0.2	-182.8	-190.5	-200.2	7	7.2	7.3	24.8	25.1	25.3
30/30	60.4	6.1	9.1	9.4	75.8	147	204.7	6.7	7	7.2	21.7	21.6	21.6
30/45	45.4	5.5	7.0	7.8	18.3	84.8	130.6	6.7	6.9	7	21.9	22.0	21.9
30/60	40.2	0.5	0.8	1.0	-41.3	6.6	7.1	6.2	6.6	7	18.4	18.0	18.2

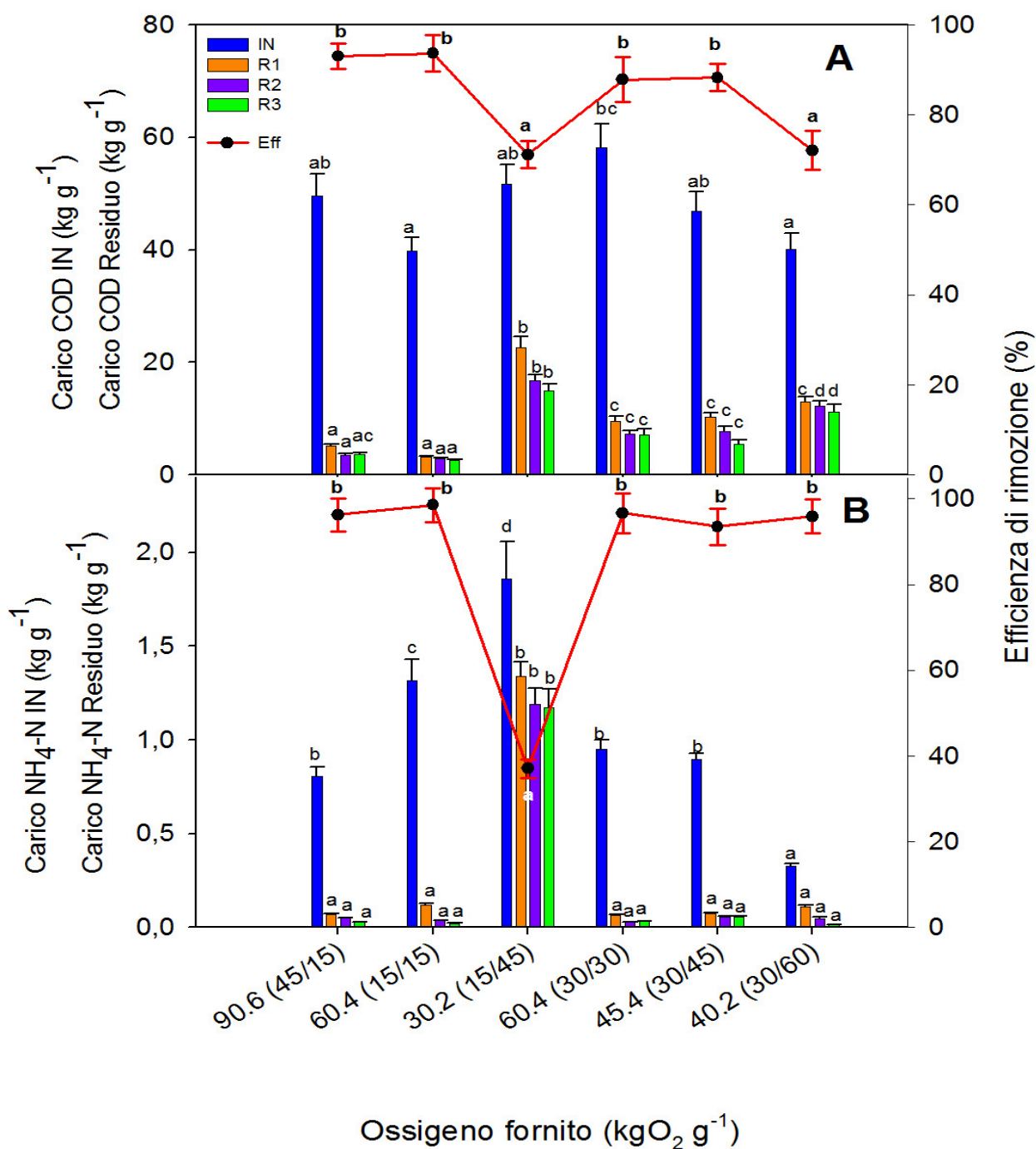


Fig. 5.15: Carico del COD in ingresso (IN) e del COD residuo e relativa efficienza di rimozione (A) e carico di $\text{NH}_4\text{-N}$ in ingresso (IN) e di $\text{NH}_4\text{-N}$ residuo e relativa efficienza di rimozione (B) nei tre reattori in serie (R1, R2 e R3) a differenti regimi di aerazione corrispondenti a diversi quantitativi di ossigeno fornito. Differenti lettere sopra le barre di errore indicano differenze statisticamente significative ($P \leq 0.05$) secondo il Tukey test tra i differenti regimi di ossigenazione all'interno dello stesso gruppo (esempio, IN, R1, R2, R3 o Eff.%).

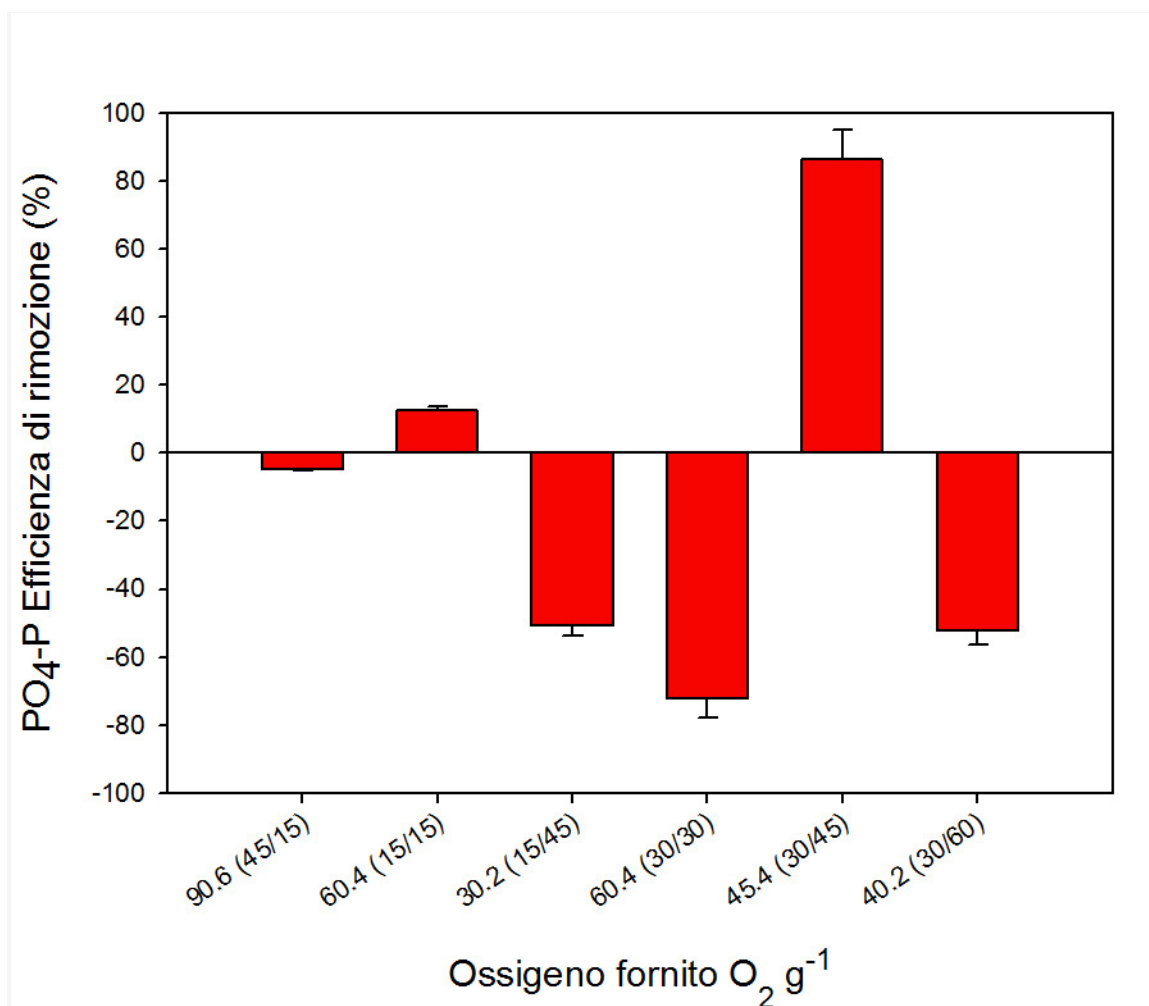


Fig. 5.16: Efficienza complessiva di rimozione dei fosfati a differenti quantitativi di ossigeno fornito.

5.9 Effetto del regime di aerazione sulla popolazione dei protozoi

Le variazioni del regime di aerazione hanno influenzato notevolmente la popolazione dei protozoi presente nel fango attivo sia in termini di densità che di struttura. Le frequenze dei gruppi di protozoi erano simili nei tre reattori (Fig. 5.17 A, B e C, facendo riferimento ai reattori R1, R2 e R3, rispettivamente) indipendentemente dai regimi di aerazione. Il taxa maggiormente presente in R1 aveva la frequenza più alta anche nei reattori R2 ed R3, osservazione pienamente confermata anche dal mantenimento di valori di Richness e dell'indice di Shannon-Weaver molto simili nei tre reattori (Fig. 5.18 A e C)

Sotto i regimi di aerazione 45/15 e 15/15 i ciliati mobili erano il gruppo prevalente (Fig. 5.17 A, B, C), inoltre erano presenti anche altre forme di ciliati insieme alle tecamebe, mentre erano assenti i flagellati. L'indice SBI, calcolato in corrispondenza di questi regimi di aerazione era molto elevato (tra il 9 e 10) in tutti e tre i reattori confermando le ottime performance di

degradazione su COD e $\text{NH}_4\text{-N}$. I livelli di aerazione più bassi influenzano in maniera significativa la struttura della popolazione dei protozoi presenti nel fango attivo. Sotto il regime di aerazione 15/45, infatti, si osservava una diminuzione della biodiversità evidenziata dalla riduzione del numero di taxa (Richness) e di Shannon-Weaver (Fig. 5.18 A e B, rispettivamente). La diminuzione del numero dei taxa dei protozoi può essere interpretata come la loro difficoltà ad adattarsi a prolungate condizioni anossiche (Duber e Gray, 2011). Nell'ambito di questo regime di aerazione, si è inoltre osservata anche una modifica della frequenza dei protozoi con una netta prevalenza del gruppo dei flagellati (Fig. 5.17 A,B,C), in particolare del genere *Trepomonas*, un flagellato anaerobio obbligato (Priya et al., 2008), in grado di vivere in condizioni anossiche (livelli negativi di ORP e basse concentrazioni di OD), conseguenza del regime di aerazione 15/45 (Tab. 5.9). A questo proposito vale la pena ricordare un lavoro pionieristico (Lacley, 1932) nel quale l'autore riferisce che *Trepomonas* sp. necessitava di condizioni anaerobiche per proliferare, mentre dopo solo 6 ore di aerazione scompariva a favore dei ciliati. Contrariamente, a quanto ci si aspettava, nelle condizioni anossiche provocate dal regime di aerazione 15/45 non erano presenti ciliati sessili, come *Vorticella microstoma* (Madoni, 2003; Arevalo et al., 2009) e *Opercularia* sp. (Lee et al., 2004; Madoni, 2003; Arevalo et al., 2009); probabilmente, le concentrazioni di OD risultavano troppo basse anche per la sopravvivenza di questi ciliati. Sempre nello studio di Lacley (1932), viene descritto come proprio la specie *Trepomonas agilis* riesca ad adattarsi a condizioni di ossigenazione totalmente differenti rispetto a quanto osservato nel genere *Opercularia*, tanto che aumentando l'ossigenazione si osservava un decremento di *T. agilis* proprio a favore di *Opercularia* sp.

I bassi tassi di rimozione sotto il regime di ossigenazione 15/45 (vedi sopra) erano associati inoltre ad un'elevata torbidità dell'effluente probabilmente causata dalla bassa efficienza di predazione sui batteri dispersi da parte dei protozoi flagellati, il gruppo prevalente (Madoni, 2003). L'indice SBI misurava un valore pari a 3 in tutti i tre reattori confermando così il funzionamento anomalo del settore di ossidazione dell'impianto in queste condizioni operative. Sotto i regimi di ossigenazione 30/30 e 30/45, i ciliati sessili rappresentavano il gruppo prevalente con un marcato aumento della Richness (Fig. 5.18 A) e dell'indice Shannon Weaver ma solo in R1, rispetto al regime di aerazione precedente (Fig. 5.18 C). L'indice SBI risaliva con valori nel range 9-10 nei tre reattori, indicando così il recupero completo anche della struttura della popolazione del fango attivo (Madoni, 1994b). Sotto il regime di aerazione 30/60, anche se la condizione non era strettamente anossica come nel regime 15/45, la popolazione dei ciliati variava in maniera simile a questa condizione. Anche sotto questo regime di aerazione si verificava la prevalenza delle specie appartenenti al genere *Trepomonas* accompagnata dalla

diminuzione della Richness e l'indice Shannon Weaver. In questo caso il valore di indice SBI nei tre reattori era compreso tra 4 e 5, confermando così un funzionamento anomalo del comparto biologico. Tuttavia, il predominio di flagellati, situazione generalmente associata a basse performance di trattamento (Madoni, 1994b), non può essere considerata una regola: Perez-Uz et al. (2010), infatti, hanno trovato la più alta rimozione del substrato azotato quando i flagellati erano prevalenti negli impianti di depurazione per reflui civili.

Variando i regimi di aerazione, la densità cellulare dei protozoi nel fango attivo era sempre comunque maggiore di 1×10^6 cell. l^{-1} indipendentemente dalle condizioni aerobiche (45/15 e 15/15) o anossica (15/45). I regimi 30/30 e 30/45 hanno mostrato densità cellulari molto elevate, a causa della presenza di ciliati sessili, in particolare appartenente al genere *Carchesium* e *Zoothamnium*, protozoi caratterizzati da uno sviluppo coloniale (Miao et al., 2004). Al regime di aerazione 30/60 scomparivano i ciliati sessili portando ad un numero di cellule totale inferiore. È interessante notare come nell'ambito della sperimentazione condotta a diversi regimi di aerazione i valori di Richness delle popolazioni di protozoi e le efficienze di rimozione del COD fossero correlate positivamente, confermando gli studi di Madoni (1994), raggiungendo valori di R pari a 0,766 ($P \leq 0,001$) (Fig. 5.20 A) Anche l'indice Shannon Weaver mostrava un comportamento simile, ma con coefficiente di correlazione più basso ($R = 0,619$; $P = 0,001$) (Fig. 5.20 B).

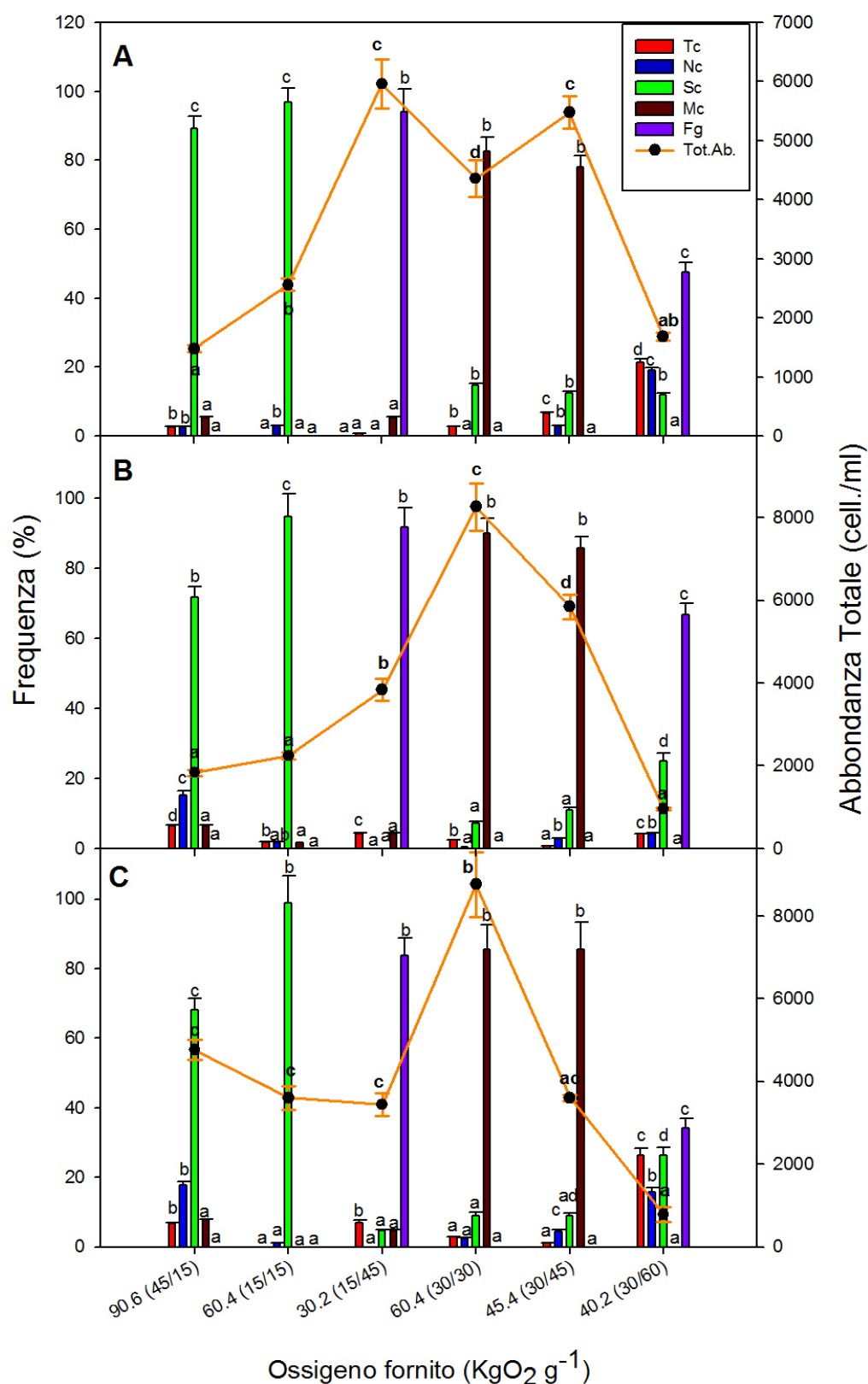


Fig. 5.17: Frequenza delle varie classi di protozoi (Tc, Tecamebe; Nc, ciliati natanti; Sc, ciliati sessili; Mc, ciliati mobili; Fg, flagellati) e abbondanza totale dei protozoi nei tre reattori R1 (A), R2 (B), R3 (C) a differenti quantitativi di ossigeno fornito.

5.10 Effetto dei regimi di aerazione sulla comunità batterica

La dinamica delle comunità batteriche nei tre reattori (R1, R2 e R3) al variare dei regimi di aerazione veniva studiata mediante la tecnica PCR-DGGE dei geni rRNA 16S (Fig. 7A) e le successive elaborazioni ed analisi dei risultati: indici S e H (Fig. 5 C e D, rispettivamente) ed analisi cluster basata sull'indice di Dice (Fig. 7B). Indipendentemente dai regimi aerazione, i tre reattori hanno mostrato, come già riportato in precedenza, comunità batteriche simili (similarità $\geq 76\%$) (Fig. 5.19 A). La variazione delle condizioni di ossigenazione, invece, avevano un grande impatto sulle comunità batteriche, come chiaramente indicato dalla bassa percentuale di similarità (da 38 a 74%) fra i profili ottenuti ai diversi regimi di aerazione. Va qui sottolineato come questa biodiversità batterica era osservata sulla struttura della comunità, ma non in termini di indici quantitativi come l'indice Shannon-Weaver che si è mantenuto stabile (Fig. 5.17 D).

I quantitativi di ossigeno 90,6-60,4 KgO₂ g⁻¹ (regimi di aerazione 45/15 e 15/15, rispettivamente) non evidenziavano effetti negativi sulla riduzione dei carichi organici e ammonio (Fig. 5.15 A e B), ma causavano notevoli cambiamenti nella struttura della comunità batterica (similarità, 55%). Confrontando i regimi di aerazione 15/15, 15/45 e 30/30, caratterizzati da condizioni prevalentemente aerobiche, anossiche e aerobiche, rispettivamente (vedi Tab. 5.9), si potevano osservare effetti marcati sulla composizione della comunità batterica con conseguenti variazioni di performance che erano, per certi versi, prevedibili. Sulla base dei profili DGGE e del dendrogramma di Fig. 5.19 A e B, rispettivamente, la somiglianza tra i due regimi 15/15 e 15/45 era bassa (61%), probabilmente dovuta alla variazione sfavorevole del regime di aerazione che causava un'importante diminuzione del rendimento dell'impianto. E particolarmente interessante notare come il ritorno a condizioni di aerazione favorevoli (regime 30/30, 60,4 KgO₂ g⁻¹ di ossigeno fornito) fosse in grado di ripristinare le prestazioni ideali, ma non di riportare la comunità batterica alle condizioni iniziali. Rispetto a quest'ultimo aspetto, infatti, la comunità batterica sembrava cambiare la propria struttura in modo ancor più marcato: la percentuale di similarità tra i profili ottenuti in queste condizioni e quelle due precedenti era pari solo al 38%. Nel passaggio dal regime 30/30 a 30/45 e poi a 30/60, le condizioni di aerazione cambiavano da favorevole a sfavorevole, passando dalla condizione 30/30 a quella 30/45; tuttavia, i profili DGGE mantenevano un'elevata somiglianza (similarità del 74%). In linea con questa osservazione le prestazioni dell'impianto si mantenevano stabili nonostante la riduzione dell'ossigenazione (Fig. 2). Al contrario, con il regime di aerazione 30/60 i livelli di OD erano sufficientemente bassi causando una netta diminuzione delle prestazioni di rimozione del COD cui corrispondeva una marcata variazione della comunità batterica (similarità del 66%).

Confrontando gli indici S e H ai regimi di aerazione 15/15 (aerobiosi), 15/45 (anossia) e 30/30 (aerobiosi), non si registravano differenze significative (Fig. 5.17 B e D). Lo stesso tipo di risultato era ottenuto anche quando il regime di aerazione passava da 30/45 a 30/60.

Analogamente, non cambiava in modo significativo nemmeno la densità batterica espressa in termini di conta vitale dei batteri eterotrofici totali (Fig. 8). Questo risultato indicava che la comunità batterica pur modificando il tipo di specie che la compongono, come evidenziato dai bassi valori di similarità, riusciva ad adattarsi alle diverse condizioni ambientali (livelli di DO e ORP) a cui era sottoposta, probabilmente con la colonizzazione del fango da parte di nuove specie più adattabili rispetto ad altre che venivano così rimpiazzate. Anche (Maurines-Carboneill, 1998) evidenziava la resistenza della comunità batterica a condizioni di prolungata anaerobiosi. L'autore, in particolare, sottolineava come l'abbondanza della popolazione batterica fosse sovrapponibile al rilascio dell'adenil nucleotide durante la fase di anaerobiosi per i ceppi di cultura pura *Zoogloea ramigera* e *Alcaligenes*. Questo rilascio di amminoacidi avrebbe consentito ai batteri di resistere per lunghi periodi a condizioni spinte di anaerobiosi aiutandoli a mantenere costante la carica energetica. Veniva sottolineato inoltre come le colture isolate presentassero tassi di sopravvivenza inferiori rispetto alle colture miste facendo supporre quindi un'interazione tra i vari ceppi per il mantenimento di un metabolismo di base.

Viceversa, i ciliati mostravano una modifica della struttura delle specie presenti nel fango attivo insieme però ad un evidente calo nella Richness dato che poche specie riuscivano evidentemente ad adattarsi a condizioni ambientali sfavorevoli.

In conclusione, diversamente dalla popolazione dei protozoi, quella della comunità batterica non mostrava elevata correlazione tra R e l'efficienza di rimozione ($R = 0,181$) (Fig. 5.20 A), proprio per il fatto che il numero di specie del fango non sembravano essere influenzate dalle variazioni dei regimi di ossigenazione. Simile era il comportamento dell'indice H ($R = 0,0065$) (Fig. 5.20 B).

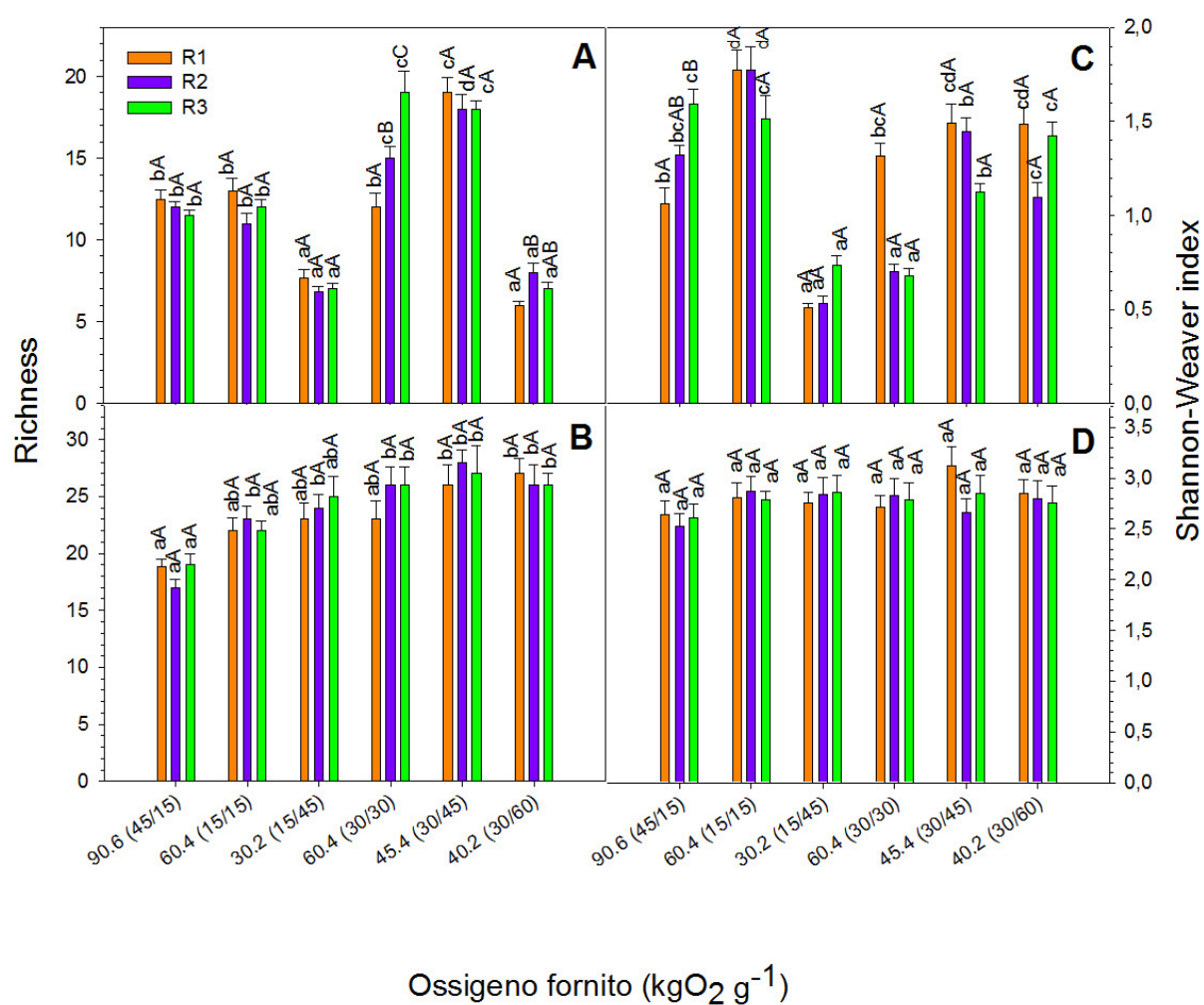


Fig 5.18: Richness e indice Shannon Weaver della popolazione dei protozoi (A e C, rispettivamente) e della comunità batterica (B e D) nei tre reattori (R1, R2 e R3) a differenti quantitativi di ossigeno fornito.

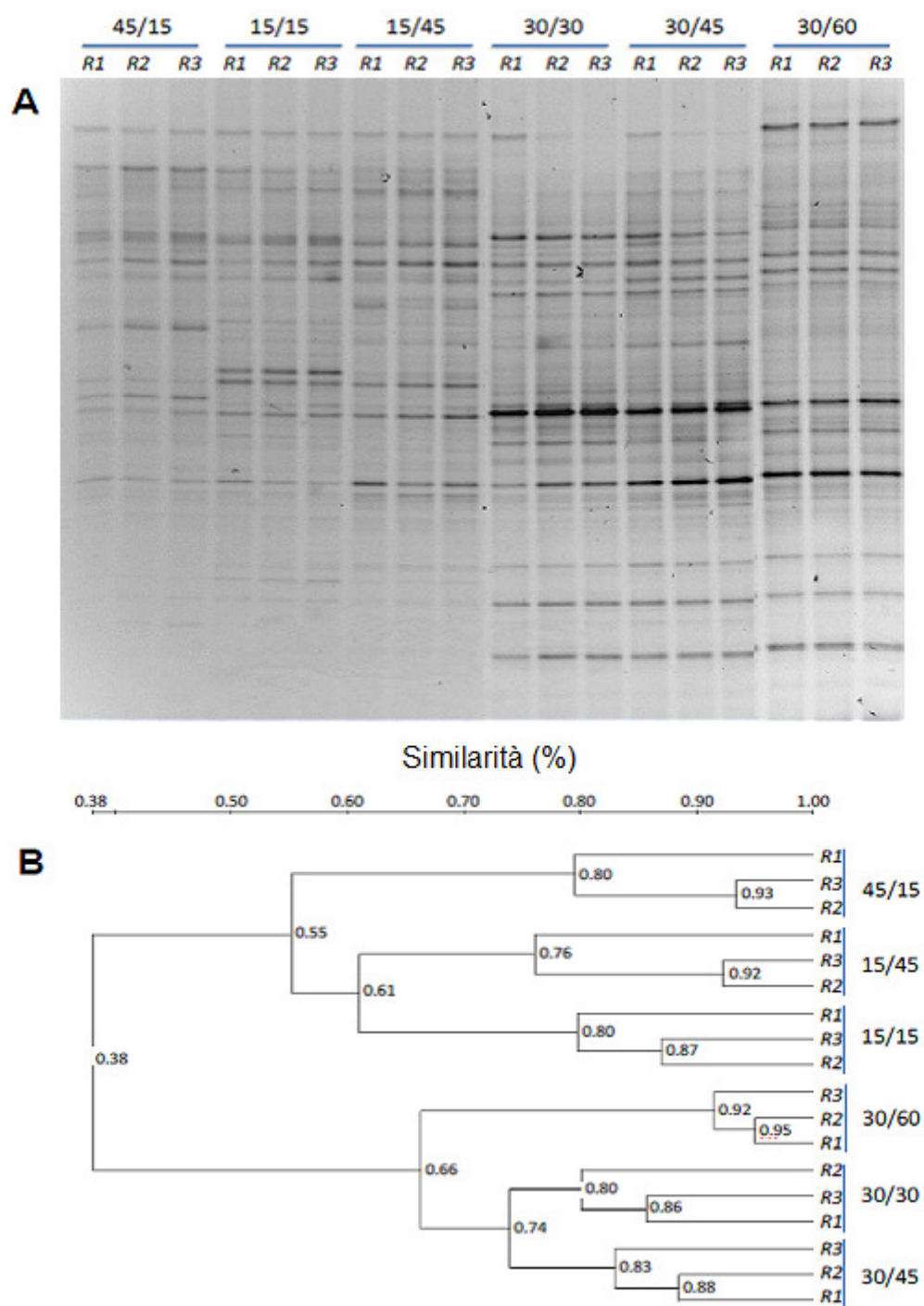


Fig. 5.19: Analisi DGGE della popolazione batterica nei tre reattori a cascata (R1, R2 e R3) a differenti regimi di aerazione (cicli On/Off) **(A)** e analisi Cluster ottenuta dai profili DGGE basata sulla matrice di similarità **(B)**. Le scala indica il grado di similarità lungo i nodi.

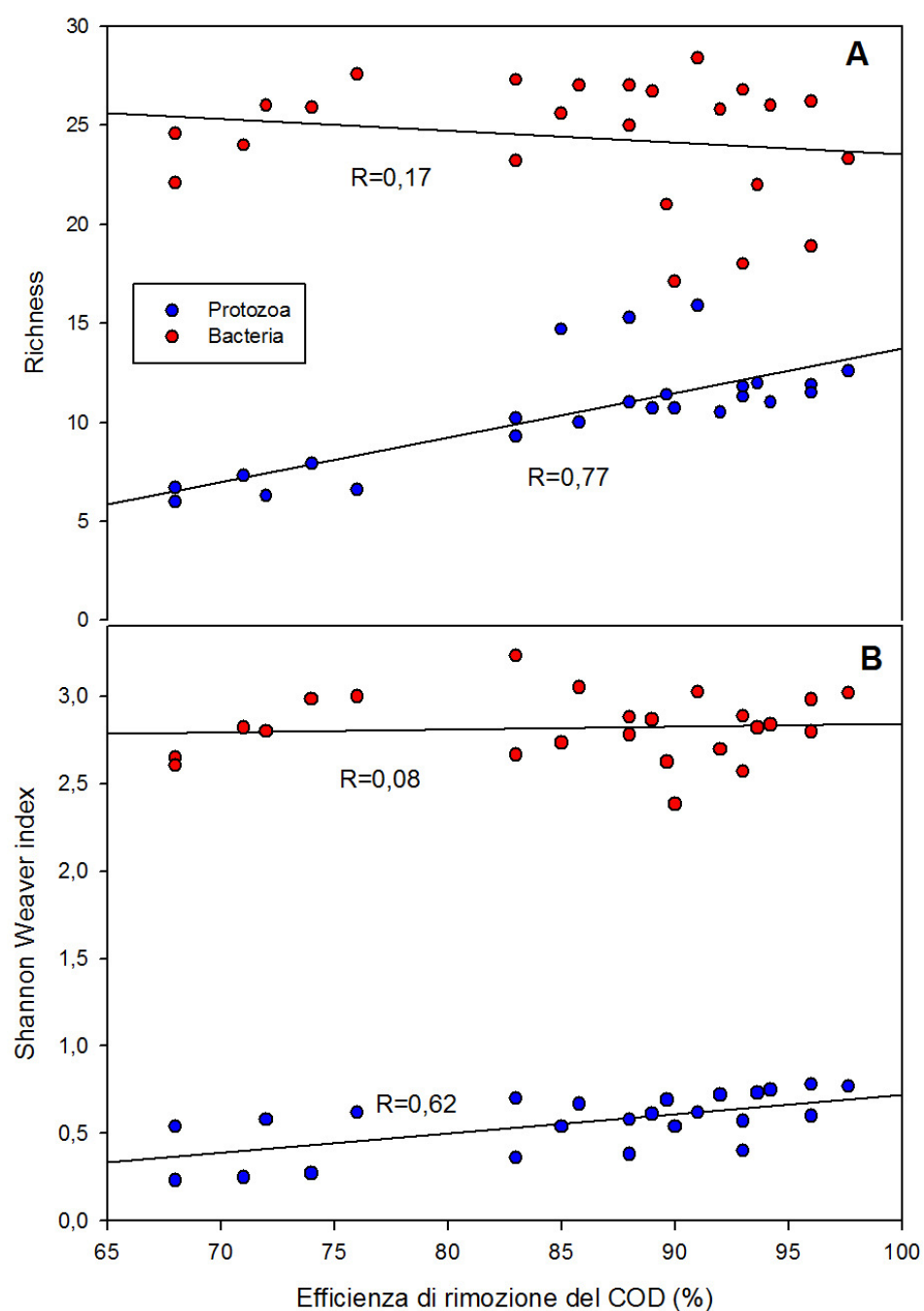


Fig. 5.20: Correlazione tra la Richness della popolazione dei protozoi e della comunità dei batteri relative al primo reattore R1 e l'efficienza di rimozione del COD nel primo reattore (In-R1) (A); Correlazione tra lo Shannon Weaver della popolazione dei protozoi e la comunità dei batteri relativi al primo reattore R1 e l'efficienza del COD nel primo reattore (In-R1) (B).

CONCLUSIONI

La lavorazione del latte produce molte sostanze inquinanti, ed è quindi necessario operare con sistemi in grado di ridurre l'impatto ambientale. Prima di essere immessi in qualsiasi corpo recettore sia esso suolo, acque superficiali o fognatura questi reflui necessitano per prescrizione legislativa di un trattamento che ne riduca l'impatto sull'ambiente. Generalmente il sistema a fanghi attivi mostra una buona affidabilità nel trattare questa tipologia di refluo.

Di fondamentale importanza risulta essere inoltre il monitoraggio di questi sistemi di trattamento, visto che le peculiarità che costituiscono generalmente un refluo di origine agroindustriale (discontinuità nella portata, caratteristiche chimiche estremamente variabili, etc.) rendono necessaria una alta frequenza nei controlli. I risultati conseguiti con il presente lavoro sperimentale permettono di trarre le seguenti conclusioni riassuntive:

Il trattamento aerobico dei reflui caseari mediante utilizzo di reattori a cascata impiegato nel presente studio ha mostrato ottime efficienze di rimozione del substrato carbonioso ed azotato (rimozione del COD > 90% e NH_4 > 95%). Buone rese sono state misurate anche per quanto riguarda l'abbattimento dei fosfati (rimozione del PO_4 > 90%) anche se tuttavia in alcuni campionamenti si sono misurati rilasci di questo anione da parte del fango attivo.

Nel sistema di reattori a cascata il primo reattore ha lavorato principalmente per la rimozione del substrato rapidamente biodegradabile, consentendo agli altri due reattori di operare con carichi molto bassi ($F/M < 0.1$). La presenza dei tre reattori in serie ha, così, contribuito a creare un ambiente particolarmente favorevole, soprattutto per il processo di nitrificazione.

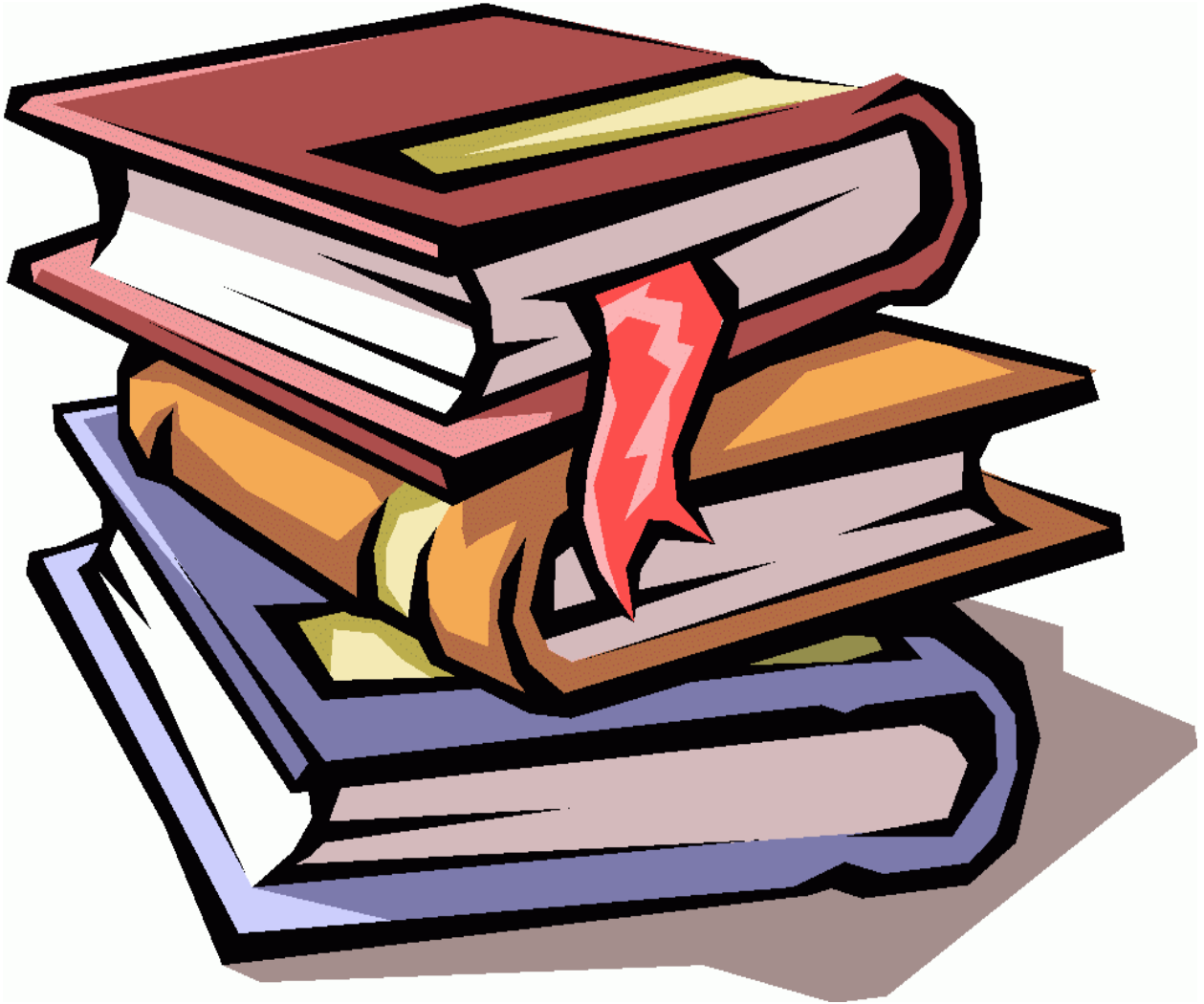
La comunità batterica del fango attivo ha mostrato un elevato grado di similarità in termini di specie presenti all'interno dei tre reattori, anche se tuttavia si è riscontrata una percentuale più alta di similitudine tra i reattori adiacenti. Anche l'indice di Shannon-Weaver e la Richness si è mantenuta simile nei tre reattori variando tuttavia nel tempo.

La popolazione dei protozoi ha mostrato un elevato grado di similarità in termini di specie presenti; tuttavia, l'ultimo settore, grazie a condizioni di basso carico ed elevata concentrazione di ossigeno disciolto, è risultato essere un ambiente favorevole al proliferare di ciliati mobili e sessili visto che l'abbondanza di alcune specie appartenenti a questi due gruppi era maggiore in quest'ultima parte dell'impianto. Anche la popolazione dei protozoi, come la comunità batterica, ha presentato una grande dinamicità nel tempo. Infatti, i gruppi che inizialmente avevano colonizzato il fango attivo, flagellati e tecamebe, venivano rimpiazzati da ciliati mobili e sessili

in un fase di maturazione della biomassa. I protozoi hanno mostrato inoltre dei coefficienti di correlazione significativi rispetto alla rimozione di alcuni inquinanti chimici come COD, NH_4 ed i tensioattivi MBAS e BIAS. Alcuni gruppi di protozoi, come ciliati sessili e mobili erano presenti quando l'impianto mostrava ottime performance di rimozione, viceversa ciliati natanti e flagellati erano associati a basse performance. Tuttavia la Richness della popolazione dei protozoi, ossia un elevata biodiversità nel fango attivo, sembrava essere il parametro con una maggiore correlazione rispetto al rendimento dell'impianto. La Richness dei batteri invece non sembrava correlare con la rimozione di nessuno dei parametri chimici presi in considerazione. L'analisi PCA condotta su tutti i parametri oggetto di studio (chimici, operativi, struttura del microbiota) ha evidenziato come elevati tassi di rimozione del substrato organico fossero legati alla Richness ed al potenziale redox.

Il fattore di carico (F/M) sembra aver giocato un ruolo importante, invece, nella presenza dei flagellati e dei ciliati natanti, mentre il rilascio dei fosfati sembra essere associato alla concentrazione dei cloruri presenti nell'influenza. I diversi regimi di aerazione testati hanno avuto un impatto significativo sulle performance che sono risultate migliori nella condizione 30/45 ($45,4 \text{ KgO}_2 \text{ g}^{-1}$), mentre una maggiore quantità di ossigeno non ha portato ad aumenti significativi delle prestazioni. Con i regimi di aerazione 30/60 ($40,2 \text{ KgO}_2 \text{ g}^{-1}$) e 15/45 ($30,2 \text{ KgO}_2 \text{ g}^{-1}$) sono state misurate perdite rilevanti in termini di performance. Tali condizioni anossiche hanno causato la riduzione nella diversità dei protozoi e la modifica nella struttura della comunità (prevalenza di flagellati del genere *Trepomonas* a scapito dei ciliati mobili e forme sessili) che hanno portato ad un fango attivo meno efficiente, ma quando l'ossigeno è stato portato di nuovo ad un livello adeguato la popolazione ha recuperato rapidamente l'efficienza. Per quanto riguarda la comunità batterica, i diversi regimi di aerazione hanno avuto un marcato effetto sulla struttura della comunità batterica, anche se la quantità totale di diversità batterica (basata sulla Richness e l'indice di Shannon-Weaver) rimaneva stabile. In conclusione la comunità batterica e la popolazione dei protozoi tendono a variare la loro struttura nel tempo, tuttavia un elevata biodiversità nella popolazione dei protozoi si dimostra essere una caratteristica fondamentale per raggiungere le migliori performance degradative.

BIBLIOGRAFIA



- Abd-Allah A.M. A., Srorr T. (1998). *Biodegradation of anionic surfactants in the presence of organic contaminants*. Water Research, 32, 944-947.
- Abraham J. V., Butler R. D., Sigee D. C. (1997). *Ciliate populations and metals in an activated-sludge plant*. Water and Research, 31, 1103-1111.
- Aescht E. & Foissner W. (1992), *Biology of a high-rate activated sludge plant of a pharmaceutical company*. Arch.Hydrobiol. /Suppl. 90, 207-251.
- Ahn C.H., Park J.K. (2008). *Critical Factors Affecting Biological Phosphorus Removal in Dairy Wastewater Treatment Plants*. Journal of civil Engineering, 12, 97-107.
- Akpor O.B., Momba M.N.B., Okonkwo J.O. (2007). *Phosphorus and nitrate removal by selected wastewater Protozoa isolates*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10, 4008-4014.
- Akpor O.B., Momba M.N.B., Okonkwo J.O., Coetzee M.A. (2008). *Nutrient removal from activated sludge mixed liquor by wastewater protozoa in a laboratory scale batch reactor*. International Journal Environmental Science Technologies, 5, 463-4970.
- Alais C. (2000). *Scienza del latte 3° edizione*. Tecniche Nuove, Milano.
- Alexiou I.E., Anderson G.K., Evison L.M. (1994). *Design of pre-acidification reactors for the anaerobic treatment of industrial wastewaters*. Water Science and Technology, 29, 199–204.
- Al-Ghusain IA, Huang J, Hao OJ, Lim BS. (1994). *Using pH as a real time control parameter for wastewater treatment and sludge digestion process*. Water Science and Technology, 30, 159–168.
- Al-Shahwani S. M., Horan N. J. (1991). *The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated sludge plants*. Water Research, 25, 633-638.
- Amann R.I. (1995). *In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA targeted nucleic acid probes*. Molecular Microbial Ecology Manual, 1-15.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiological Reviews, 59, 143–169.
- Amass W., Amass A., Tighe B. (1998). *A review of biodegradable polymers: Uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polymers, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies*. Polymer International, 47, 89–114.
- Ahmed Z. (2012). *Microbial communities in Nutrient-removing membrane bioreactors: a Review*. Journal of Environmental Science and Technology, 5, 16-28.
- Andreottola G., Foladori P., Ragazzi M., Villa R. (2002). *Dairy wastewater treatment in a moving bed biofilm reactor*. Water Science and Technology, 45, 321–328.
- Antoniou P., Hamilton J., Koopman B., Jain R., Holloway B., Lyberatos G., Svoronos S.A. (1990). *Effect of temperature and ph on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria*. Water Research, 24, 97-101.

APHA (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th ed. American Public Health Association, AWWA, WEF, Baltimore.

Arbeli Z., Brenner A., Abeliovich A. (2006). *Treatment of high-strength dairywastewater in an anaerobic deep reservoir: Analysis of the methanogenic fermentation pathway and the rate-limiting step*. Water Research, 40, 3653–3659.

Arevalo J., Moreno B., Perez J., Gomez M.A. (2009). *Applicability of the Sludge Biotic Index (SBI) for MBR activated sludge control*. Journal of Hazardous Materials 167, 784-789.

Audic J. M., Faup G.M. (1987). *Simultaneous removal of carbon, nitrogen, and phosphorus pollutants contained in dairy wastewater*. From Eau, l'Industrie, les Nuisances, 111, 40-42.

Audic J.L., Chaufer B., Daufin G. (2003). *Non-food applications of milk components and dairy coproducts: a review*. Lait, 83, 417–38.

Baggi G., Pacini N., Sorlini C. (1998). *Microbiologia generale ed agraria*. Città Studi Edizioni, 4Ed., Milano.

Bakka R.L. (1992). *Wastewater issues associated with clearing and sanitizing chemicals*. Dairy Food Environmental Sanitation, 12, 274-276.

Bao L., Li D., Li X., Huang R., Zhang J., Lv Y., Xia G. (2007). *Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system*. Journal of Environmental Sciences, 19, 391–395.

Beaulieu J., Dupont C., Lemieux P. (2006). *Whey proteins and peptides: beneficial effects on immune health*. Therapy, 3, 69–78.

Bedogni G., Falanelli A. & Pedrazzi R. (1991). *Evaluation of the abundance ratio between crawling and attached ciliates in the management of an activated sludge sewage-treatment plant*. Biological Approach to Sewage Treatment Process: current status and perspectives (Madoni P., Ed.), 229-233, Centro Bazzucchi, Perugia.

Beltran F.J., Garcia-Araya J.F., Alvarez P.M. (2000). *Estimation of biological kinetic parameters from a continuous integrated ozonation activated sludge system treating domestic wastewater*. Biotechnology Progress, 16.

Benefield D., Randall C.W. (1980). *Biological process design for wastewater treatment*. Prentice-hall, Inc., USA.

Benitez F., Beltran-Heredia J., Real F., Acero J. (1999). *Enhancement of the ozonation of winw distillery wastewater by an aerobic pretreatment*. Bioprocess Engineering, 21, 59-464.

Bizukojc E.L., M. Bizukojc M. (2006). *Effect of selected anionic surfactants on activated sludge flocs*. Enzyme and microbial technology, 39, 660-668.

Bj N., Rittmann B.E, Yu H.Q. (2010). *Modeling predation processes in activated sludge*. Biotechnol Bioenergy, 105, 1021-1030.

Bloem J., Starink M., Bär-Gilissen M.J.B., Cappenberg T.E. (1988). *Protozoan grazing, bacterial activity, and mineralization in two-stage continuous cultures*. Applied and Environmental Microbiology, 54, 3113–3121.

Bloom A.S. (1981). *Similarity Indices in Community Studies: Potential Pitfalls* Marine ecology progress series, 5, 125-128.

Bond P.L., Erhart R., Wagner M., Keller J., Blacklall L.L. (1999), *Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and non efficient biological phosphorus removal activated sludge systems*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 4077–4084.

Britz T.J., Van Schalkwyk C., Hung Y.T. (2006). *Treatment of dairy processing wastewaters*. In: Yapijakis C., Hung Y.T., Lo H.H., Wang L.K. (Eds.) Waste Treatment in the Food Processing Industry. CRC Press, Boca Raton, FL, 1–28.

Brodisch K. (1985). *Interaction of different groups of micro-organisms in biological phosphate removal*. Water Science and Technology, 17, 89-97.

Buchta K. (1983). *Lactic acid*. Biotechnology, 3, 409–417.

Burton C. (1997). *FOG clearance*. Dairy Industry International, 62 (12), 41-42.

Carta-Escobar F., Alvarez P., Romero F., Pereda J. (1999). *Aerobic purification of dairy wastewater in continuous regime; reactor with support*. Process Biochemistry, 34, 613–619.

Carta-Escobar F., Pereda-Marin J., Alvarez-Mateos P., Romero-Guzman F., Duran- Barrantes M.M., Barriga-Mateos F.(2004). *Aerobic purification of dairy wastewater in continuous regime Part I: Analysis of the biodegradation process in two reactor configurations*. Biochemical Engineering Journal, 21, 183–191.

Carucci A., Kuhni M., Brun R., Carucci G., Koch G., Majone M. (1999a). *Microbial competition for the organic substrates and its impact on EBPR systems under conditions of changing carbon feed*. Water Science and Technology, 39, 75– 85.

Chandrasekara S. S. K. , Dharmasena D. A. N., Mowjood M. I. M., Premarathne K.P. (2000). *Whey incorporated compost as an alternative effluent treatment technique*. Department of Agricultural Engineering, Faculty of Agriculture, University of Peradeniya.

Chang Y.J., Stephen J.R., Richter A.P., Venosa A.D., Bruggemann J., Macnaughton S.J., (2000). *Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method*. Journal Microbiological Methods, 40, 19-31.

Chen S., Xu M., Cao H., Zhu J., Zhou K., Xu J., Yang X., Gan Y., Liu W., Zhai J., Shao Y. (2004). *The activated-sludge fauna and performance of five sewage treatment plants in Beijing, China*. European Journal of Protistology, 40, 147–152.

Christensen A.D., Kádár Z., Oleskowicz-Popiel P., Thomsen M.T. (2011). *Production of bioethanol from organic whey using Kluyveromyces marxianus*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 38, 283-289.

Coleman D.C., Cole C.V., Hunt H.V., Klein D.A. (1978). *Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics: Part I, introduction*. Microbial Ecology, 4, 345–349.

Comas J., Rodriguez-Roda I., Sanchez-Marre M., Cortes U., Freixo A., Arraez J., Poch M. (2003). *A knowledge-based approach to the deflocculation problem: integrating on-line, off-line, and heuristic information*. Water Research, 37, 2377–2387

Converti A., Rovatti M., Del Borghi M. (1995). *Biological removal of phosphorus from wastewaters by alternating aerobic and anaerobic conditions*. Water Research, 29, 263–269.

Crescenzi C., Di Corcia A., Samperi R. (1995). *Determination of nozioni polyethoxylate surfactants in environmental waters by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 67, 1797–1804.

Crites R., Tchobanoglous G. (1998). *Small and decentralised wastewater management systems*. McGraw Hill, New York (USA).

Curds C. R. (1971). *A computer simulation study of predator-prey relationship in a single-stage continuous-culture system*. Water Research, 5, 793-812.

Curds C. R. (1975). Protozoa. *Ecological Aspects of Used Water Treatment* (Curds C. R. & Hawkes H. A., Ed.), 203-268, Academic Press, London.

Curds C. R., Cockburn A. (1970), *Protozoa in biological sewage-treatment processes. II. Protozoa as indicators in the activated-sludge process*. Water Research, 4, 237-249.

Curds C.R., Cockburn A., Vandyke J.M. (1968). *An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated sludge process*. Water Pollution Controll, 67, 312-329.

Curds C.R., Fey G.J. (1969). *The effect of ciliated protozoa on the fate of Escherichia coli in the activated-sludge process*. Water Research, 3, 853-867.

Curds C.R., Warren A., Salvado' Cabre' H., Roberts D.(2008). *An Atlas of Ciliated Protozoa Commonly Found in Aerobic Sewage-treatment Processes. An Aid to Monitor Treatment -plant Performance*. Natural History Museum, London.

Damodaran S., Paraf A. (1997). *Food proteins and their applications*. Marcell Deker Inc., New York Basel.

Danalewich J.R., Papagiannis T.G., Belyea R.L., Tumbleson M.E., Raskin L. (1998). *Characterization of dairy waste streams, current treatment practices, and potential for biological nutrient removal*. Water Research, 32, 3555–3568.

Danesh S., Oleszkiewicz J.A. (1997). *Use of a new anaerobic-aerobic sequencing batch reactor system to enhance biological phosphorus removal*. Water Science and Technology, 35, 137-144.

Datta R., Tsai S. P., Bonsignore P., Moon S. H. (1995). *Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives*. FEMS Microbiology Reviews, 16, 221–231.

Davila-Vazquez G., Cota-Navarro C.B., Rosales-Colunga L.M., Leon-Rodriguez A., Razo-Flores E. (2009). *Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate*. International journal of Hydrogen Energy, 34, 4296 – 4304.

Demirel B., Yenigun O. (2003). *Acidogenesis in anaerobic treatment of dairy wastewater*. Proceedings of Asian Waterqual, IWA Asia-Pacific regional conference.

Demirel B., Yenigun O., Onay T.T. (2005). *Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review*. Process Biochemistry, 40, 2583–2595.

Di Corcia A., Samperi R. (1994). *Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid-phase extraction and liquid chromatography*. Environmental Science Technologies, 28, 850–858.

Dignac M.F., Ginestet P., Rybacki D., Bruchet A., Urbain V., Scribe P. (2000). *Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter*. Water Research, 34, 4185-4194.

D'Imporzana D., Adani F. (2007). *The contribution of water soluble and waster insoluble organic fractions to oxygen uptake rate during high rate composting*. Biodegradation, 18, 103–13.

Ding L., Zhou Q., Wang L., Zhang Q. (2011). *Dynamics of bacterial community structure in a fullscale wastewater treatment plant with anoxic-oxic configuration using 16S rDNA PCR-DGGE fingerprint*. African Journal of Biotechnology, 10, 589-600.

Drakides C. (1978). *L'observation microscopique des boues actives appliquée à la surveillance des installations d'épuration: Technique d'étude et interpretation*. T.S.M.-L'Eau, 73, 85-98.

Drakides C. (1980). *La microfaune des boues activées. Etude d'une method d'observation et application au suivi d'un pilote en phase de démarrage*. Water Research, 14, 1199-1207.

Drzewicki A., Kulikowska D. (2011). *Limitation of Sludge Biotic Index application for control of a wastewater treatment plant working with shock organic and ammonium loadings*. European Journal of Protistology, 47, 287–294.

Dubber D., Gray N.F. (2011). *The effect of anoxia and anaerobia on ciliate community in biological nutrient removal systems using laboratory-scale sequencing batch reactors (SBRs)*. Water Research, 45, 2213-2226.

Dytczak, M.A., Londry, K.L., Siegrist, H., Oleszkiewicz, J.A., (2007). *Ozonation reduces sludge production and improves denitrification*. Water Research, 41, 543–550.

Dytczak M.A., Londry K.L., Oleszkiewicz J.A. (2008a). *Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates*. Water Research, 42, 2320 – 2328.

Dytczak, M.A., Londry, K.L., Oleszkiewicz, J.A., (2008 b). *Nitrifying genera in activated sludge may influence nitrification rates*. Water Environmental Research, 80, 388-96.

- Eichner C. A., Erb R.W., Timmis K. N. (1999). *Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community*. Applied Environmental Microbiology, 65, 102–109.
- Eikelboom D.H. (2000). *Process control of activated sludge plants by microscopic investigation*. IWA Publishing, London (UK).
- Ekelund F., Rønn R., Christensen S. (2001). *Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites*. Soil Biology and Biochemistry, 33, 475–481.
- El-Latif Hesham A., Khan S., Liu X., Zhang Y., Wang Z., Yang M. (2006). *Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil*. Yeast, 23, 879–887.
- Espantaleon A.G., Nieto J.A., Fernandez M., Marsal A.(2003). *Use of activated clays in the removal of dyes and surfactants from tannery waste waters* Applied Clay Science, 24, 105–110.
- Esteban G., Tellez C., Bautista L. M. (1991). *Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process*. Water Research, 25, 967–972.
- Eusebio A., Petruccioli M., Lageiro M., Federici F., Duarte J.C. (2004). *Microbial characterization of activated sludge in jet-loop bioreactors treating winery wastewater*. Microbial Biotechnologies, 31, 29–34.
- Fang H.H.P., Yu H.Q. (2000). *Effect of HRT on mesophilic acidogenesis of dairy wastewater*. Journal Environmental Engineering, 126, 1145–1148.
- Farizoglu B., Uzuner S. (2011). *The investigation of dairy industry wastewater treatment in a biological high performance membrane system*. Biochemical Engineering Journal, 57, 46– 54.
- Ferchichi M., Crabbe E., Gil G.H., Hintz W., Almadidy A. (2005). *Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey*. Journal Biotechnologies, 120, 402–409.
- Ferrer J., Paez G., Marmol Z. (2001). *Agronomic use of biotechnologically processe grape wastes*. Bioresource Technology, 76, 39–44.
- Foissner W. (1991). *Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of Ciliated Protozoa*. European Journal Protistology, 27, 313–330.
- Foissner W., Berger H., Blatterer H., Kohmann F. (1995). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystem. Band IV. Gymnostomatea, Loxodes, Suctorina*. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
- Foissner W., Berger H., Kohmann F. (1992). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystem. Band II. Peritrichia, Heterotrichia, Odontostomatidia*. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
- Foissner W., Berger H., Kohmann F. (1994). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystem. Band III. Hymenostomatida, Prostomatida, Nassulida*. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.

Foissner W., Blatterer H., Berger H., Kohmann F. (1991). *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystem. Band I.* Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.

Fox P., Venkatasubbiah V. (1996). *Coupled anaerobic/aerobic treatment of high-sulfate wastewater with sulfate reduction and biological sulfide oxidation.* Water Science and Technology, 34, 359-366.

Franklin R.B. & Mills A.L. (2003). *Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field.* FEMS, Microbial Ecology, 44, 335-346.

Gavala N., Kopsinis H., Skiadas I. V., Stamatelatou K., Lyberatos, G. (1999). *Treatment of dairy wastewater using an upflow anaerobic sludgeblanket reactor.* Journal Agricultural Engineering Research, 73, 59–63.

Geary P.M, Moore J.A. (1999). *Suitability of treatment wetland for Dairy Wastewaters.* Water Science and Technology, 40, 179-185.

Gerber A., De Villiers R. H., Mostert E. S. Van Riet C.J. (1987). *The phenomenon of simultaneous phosphate uptake and release, and its importance in biological nutrient removal.* In Biological Phosphate Removal from Wastewaters, ed. R. Ramadori, Pergamon Press, Oxford.

Gibson A. (2006). *Ethanol from whey.* Sustainable Energy Conference, 26–27 July, Palmerston North, New Zealand.

Goluke C.G. (1982). *When is compost ‘safe’? A review of criteria for assessing the discriptions of pathogens in composting.* Biocycle, 28, 28-38.

Gomes N.C.M., Heuer H., Schonfeld J., Costa R., Mendonca Hagler L., Smalla K. (2001). *Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (Zea mays) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis.* Plant and Soil, 232, 167-180.

Grady C.P.L., Daigger G.T., Lim H.C. (1999). *Biological wastewater treatment*, Marcel Dekker, NY, USA

Grasshoff A. (1997). *Fouling and cleaning of heat exchanges.* Bulletin of the IDF, 328, 32–44.

Guimarães P.M.R., Teixeira J.A., Domingues L. (2010). *Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey.* Biotechnology Advances, 28, 375–384.

Gulez G., De Los Reyes F.L. (2009). *Multiple approaches to assess filamentous bacterial growth in activated sludge under different carbon source conditions.* Journal of Applied Microbiology, 106, 682–691.

Guo J., Peng Y., Wang S., Zheng Y., Huang H., Wang Z. (2009). *Long-term effect of dissolved oxygen on partial nitrification performance and microbial community structure.* Bioresource Technology, 100, 2796–2802.

- Gutierrez S., Ferrari A., Benitez A., Travers D., Menes J., Etchebehere C., Canetti R. (2007). *Long-term evaluation of a sequential batch reactor (SBR) treating dairy wastewater for carbon removal*. Water Science and Technology, 55, 193–199.
- Hairston N. G., Allan J. D., Colwell R. K., Futuyma D. J., Howell J., Lubin M. D., Mathias J., Vandermeer J. H. (1968). *The Relationship between Species Diversity and Stability: An Experimental Approach with Protozoa and Bacteria Ecology*, 49, 1091-1101.
- Hakkak R., Korourian S., Ronis M.J.J., Johnson M., Badger T.M. (2001). *Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats*. Cancer Epidemiol, Biomark. Prev, 10, 555–558.
- Haug R. (1993). *The practical Handbook of Compost Engineering*, 717, Lewis Publishers, USA
- Haug RT (1993). *Development of simulation models*. The practical handbook of compost engineering. Lewis Publishers, Boca Raton (USA).
- Heard, J., Harvey, E., Johnson, B.B., Wells, J.D., Angove, M.J. (2008). *The effect of filamentous bacteria on foam production and stability*. Colloids and Surfaces Biointerfaces, 63, 21-26.
- Heuer H., Wieland G., Schonfeld J., Schnwalder A., Gomes N.C.M. & Smalla K.(2001). *Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis*. Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications (ed. P.A.Rochelle), 177–190. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Hofvendahl K., Hahn-Hagerdal B. (2000). *Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources*. Enzyme and Microbial Technology, 26, 87–107.
- Hrenovic J., Ivankovic T. (2007). *Toxicity of anionic and cationic surfactant to Acinetobacter junii in pure culture*. Central European Journal of Biology, 2, 405–414.
- Hwang S., Hansen C.L. (1998) *Characterization of and bio production of short-chain organic acids from mixed dairy-processing wastewater*. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers, 41,795–802.
- Ince O. (1998). *Potential energy production from anaerobic digestion of dairy wastewater*. Journal Environmental Science Health Part A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng, 33, 1219–1228.
- Janczukowicz W., Zielinski M., Debowski M. (2008). *Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production*. Bioresource Technologies, 99, 4199–4205.
- Jenkins D., Richard M.G., Daigger T.G. (2004). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems*. IWA Publishing, London.
- Jeon C.O., Lee D.S., Lee M.W., Park J.M. (2001). *Enhanced Biological Phosphorus Removal in an Anaerobic–Aerobic Sequencing Batch Reactor: Effect of pH*. Water Environment Research, 73, 301-305.
- Jorgensen K.S., Pauli A.S. (1995). *Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge*. Anaerobe, 1, 161-8.

Kapdan I.K., Kargi F.(2006). *Bio-hydrogen production from waste materials*. Enzyme Microbial Technology, 38, 569–82.

Kasapgil B., Anderson G.K., Ince O. (1994). *An investigation into the pretreatment of dairy wastewater prior to aerobic biological treatment*. Water Science and Technology, 29, 205–212.

Kennedy R.S., Konok G.P., Bounous G., Baruchel S., Lee T.D. (1995). *The use of whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: a phase I-II clinical study*. Anticancer Research, 15(6B), 2643–2649.

Kerrn-Jespersion J. P., Henze M. (1993). *Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions*. Water Research, 27, 617–624.

Kim D.J., Lee D.I., Keller J. (2006). *Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH*. Bioresource Technologies, 97, 459-68.

Kishida N., Kim J.H., Chen M., Sasaki H., Sudo R. (2003). *Effectiveness of oxidation–reduction potential and pH as monitoring and control parameters for nitrogen removal in swine wastewater treatment by sequencing batch reactors*. Journal Bioscience Bioengineering, 96, 285–290.

Kleikemper J., Schroth M.H., Sigler W.V., Schmucki M., Bernasconi S.M., Zeyer J., (2002). *Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon contaminated aquifer*. Applied Environmental Microbiology, 68, 1516-1523.

Klimowicz H. (1970). *Microfauna of activated sludge. Part I. Assemblage of microfauna in laboratory models of activated sludge*. Acta Hydrobiology, 12, 357-376.

Knoop S., Kunst S.(1998). *Influence of temperature and sludge loading on activated sludge settling, especially on Microthrix parvicella*. Water Science and Technology, 37, 27– 35.

Kolarski R. and Nyhuis G. (1995). *The use of sequencing batch reactor technology for the treatment of high strength dairy processing waste*. The Proceedings of the 50th Purdue International Waste Conference, 485–494.

Kosikowski F.V. (1979). *Whey utilization and whey products*. Journal Dairy Science, 62, 1149–60.

Koyuncu I., Topacik D., Turan M., Celik M. S., Sarikaya H. Z. (2000). *Influence of filtration conditions on the performance of nanofiltration and reverse osmosis membranes in dairy wastewater treatment*. Water Science and Technology, 1, 117–124.

Kuba T., Smolders G., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (1993). *Biological Phosphorus Removal from Wastewater by Anaerobic-Anoxic Sequencing Batch Reactor* Water Science and Technology, 27, 241–252.

Kushwaha J.P., Srivastava V.C., Mall I.D. (2011). *An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 51, 442–452.

Lackey J.B. (1932). *Oxygen deficiency and sewage protozoa: with descriptions of some new species*. Biological Bulletin, 63, 287-295.

Lee D.S., Jeon C.O., Park J.M. (2001). *Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system*. Water Research, 35, 3968–3976.

Lee N.M., Welander T. (1994). *Influence of predators on nitrification in aerobic biofilm processes*. Water Science and Technology, 29, 355–63.

Lee S., Basu S., Tyler C.W., Wei I.W. (2004). *Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island treatment plant*. Advances Environmental Research, 8, 371-378.

Lee Y., Oleszkiewicz J.A. (2003). *Effects of predation and ORP conditions on the performance of nitrifiers in activated sludge systems*. Water Research, 37, 4202–4210.

Levantesi C., Beimfohr C., Geurkink B., Rossetti S., Thelen K., Krooneman J., Snaird J., Van der Waarde J., Tandoi V. (2004). *Filamentous Alphaproteobacteria Associated with Bulking in Industrial Wastewater Treatment Plants*. Systematic Applied Microbiology, 27, 716–727.

Li A., Yang S., Li X., Gu J. (2008). *Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates*. Water Research, 42, 3552 – 3560.

Li B., Bishop P.L. (2004). *ORP changes in aeration tanks and micropfiles of activated sludge floc in the medium and low pollutant strength wastewaters*. Water Environment Research, 76, 394-403.

Li H., Zhang Y., Kravchenko I., Xu H., Zhang C.G. (2007). *Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: a laboratory experiment*. Journal Environmental Science (China), 19, 1003–1013.

Li J., Jin Z., Yu B., (2010). *Changes in the structure and diversity of bacterial communities during the process of adaptation to organic wastewater*. Canadian Journal Microbiology, 56, 352–355.

Li X., Zhang R. (2002). *Aerobic treatment of dairy wastewater with sequencing batch*. Bioprocess Biosystem Engineering, 25, 103–109.

Li XY, Yang SF., (2007). *Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge*. Water Research, 41, 1022-30.

Lifang Y., Dangcong P., Yongxiang R. (2011). *Protozoan predation on nitrification performance and microbial community during bioaugmentation*. Bioresource Technology, 102, 10855–10860.

Lijiao R., Yining W., Nanqi R., Kun Z., Defeng X. (2010). *Microbial community structure in an integrated A/O reactor treating diluted livestock wastewater during start-up period*. Journal of Environmental Sciences, 22, 656–662.

- Ling K.C. (2008). *Whey to ethanol: a biofuel role for dairy cooperatives?*. Rural Business and cooperative programs, research report 214, USDA, Washington DC.
- Litchfield J. H. (1996). *Microbial production of lactic acid*. Advances in Applied Microbiology, 42, 45–95.
- Liu X., Zhang Y., Yang M., Wang Z., Lv W., (2007). *Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method*. Journal of Environmental Sciences, 19, 60-66.
- López H., Puig S., Ganigué R., Rusalleda M., Balaguer D.M., Colprim J. (2008). *Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 83, 233–241.
- Lourenço N. D., Novais J. M., Pinheiro H. M. (2009). *Effect of the introduction of an anaerobic phase on the protozoa community of an SBR used for biodecolorization of an azo dye*. Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 4, 228-231.
- Luck F. (1996). *A review of industrial catalytic wet air oxidation process*. Catalysis Today, 27, 195-202.
- Luna-Pabello V.M., Aladro-Lubel A., Duran-de-Bazua C. (1992). *Temperature effect on ciliates diversity and abundance in a rotating biological reactor*. Bioresource Technology, 39, 55–60.
- Lunt J. (1998). *Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers*. Polymer Degradation and Stability, 59, 145–152.
- Lynn D.H. (2008). *The ciliated protozoa: characterization, classification, and guide to the literature*. Springer Ed., NY.
- Mace S., Mata-Alvarez J. (2002). *Utilization of SBR technology for wastewater treatment: an overview*. Industrial and Engineering Chemistry Research, 41, 5539-5553.
- Madoni P. (1981). *I Protozoi Ciliati degli Impianti Biologici di Depurazione*. CNR. AQ/1/167, Roma, p. 1-134.
- Madoni P. (1982). *Growth and succession of ciliate populations during the establishment of a mature activated sludge*. Acta Hydrobiol., 24, 223-232.
- Madoni P. (1986). *Protozoa in waste treatment systems*. In: Perspectives in Microbial Ecology (Megusar F. & Gantar M., Ed.), p. 86-90, Slovene Society of Microbiologists, Ljubljana.
- Madoni P. (1994a). *Estimates of ciliated protozoa biomass in activated sludge and biofilm*. Bioresource Technologies, 48, 245-249.
- Madoni P. (1994b). *A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge based on the microfauna analysis*. Water Research, 28, 67-75.
- Madoni P. (1994c). *La microfauna nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi*. AGAC, Università degli Studi di Parma.

Madoni P. (2002). *Protozoa in Activated Sludge*. Encyclopedia of Environmental Microbiology John Wiley & Sons Inc., New York (USA).

Madoni P.(2003), *Protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency*. The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. D. Mara & N. Horan, Oxford (UK).

Madoni P., Davoli D. & Chierici E. (1993). *Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works*. Water Research, 27, 1485-1491.

Madoni P. & Ghetti P. F. (1981). *The structure of Ciliated Protozoa communities in biological sewage treatment plants*. Hydrobiologia 83, 207-215.

Mahan D. C. (1983). *Increasing swine reproductive efficiency through early weaning*. Proc. Distillers Feed Conf., 6, 38-41.

Majed N., Matthaus C., Diem M., Gu Z.A. (2009). *Evaluation of intracellular polyphosphate dynamics in Enhanced Biological Phosphorus Removal process using Raman Microscopy*. Environmental Science Technologies, 43, 5436–5442.

Mantel N. (1967). *The detection of disease clustering and a generalized regression approach*. Cancer Research, 27, 209–220.

Mantovi P., Piccinini S. (2006). *Fitodepurazione delle acque di scarico dei caseifici*. Agricoltura, 83-85.

Martín-Cereceda M., Pérez-Uz B., Serrano S., Guinea A. (2001). *Dynamics of protozoan and metazoan communities in a full scale wastewater treatment plant by rotating biological contactors* Microbiology Research, 156, 225–238

Martín-Cereceda M., Serrano S., Guinea A. (1996). *A comparative study of ciliated protozoa communities in activated-sludge plants*. FEMS Microbiology Ecology, 21, 267–276.

Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. (2008). *How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology*. Environmental Microbiology, 10, 1571-1581.

Masotti L. (1993), *Depurazione delle Acque*. Calderini, Bologna.

Maurines-Carboneill C., Morin L., Pernelle J. J. , Derlet N., Sachon G., Leblon G. (1998) *Revivescence of aerobic chemorganotrophic bacteria in an activated sludge pilot plant after a prolonged absence of oxygen*. Water Research, 32, 2211-2219.

Medhat M.A., Saleh U.F. (2004). *Anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment*. Eighth International Water Technology Conference, IWTC8, Alexandria, Egypt.

Meinhold J., Pedersen H., Arnold E., Isaacs S., Henze M. (1998). *Effect of continuous addition of an organic substrate to the anoxic phase on biological phosphorus removal*. Water Science and Technology, 38, 97–105.

Metcalf & Eddy (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. McGraw-Hill

Miao W., Fen W.S., Yu Y., Zhang X.W., Shen Y. (2004). *Phylogenetic Relationships of the Subclass Peritrichia (Oligohymenophorea, Ciliophora) Inferred from Small Subunit rRNA Gene Sequences*. Journal Eukaryot, 51, 180-186.

Miksch K. (1991). *Optimization of the Cascade System of Activated Sludge by Means of the Metabolic Activity Measurements of Microorganisms*. Water Science and Technology, 24, 65–71.

Miura Y., Hiraiwa M.N., Ito T., Itonaga T., Watanabe Y., Okabe S. (2007). *Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: relationship between community stability and reactor performance*. Water Research, 41, 627-637.

Monroy O., Johnson K. A., Wheatley A. D., Hawkes F., Caine M. (1994). *The anaerobic filtration of dairy waste: Results of a pilot trial*. Bioresource Technologies, 50, 243–251.

Morgan J. W., Evison L. M., Forster C. F. (1991). *Changes to themicrobial ecology in anaerobic digesters treating ice cream wastewater during start-up*. Water Research, 25, 639–653.

Motta-Marques D. M. L., Cayless S. M., Lester J. N. (1990). *Start-up regimes for anaerobic fluidized systems treating dairy wastewater*. Biological Wastes, 34, 191–202.

Mucchetti G., Neviani E. (2006). *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza*. Tecniche nuove, Milano.

Muench E.V., Lant P., Keller, J. (1996). *Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors*. Water Research, 30, 277-284.

Murray A.E., Preston C.M., Massana R., Taylor L.T., Blakis A., Wu K., DeLong E.F., (1998). *Seasonal and spatial variability of bacteria and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antartica*. Applied Environmental Microbiology, 64, 2585-2595.

Murtagh J. (1985). *Commercial Production of Ethanol from Cheese Whey*. The Carbery Process, Energy from Biomass and Wastes IX, Symposium, Buena Vista, FL, Institute of Gas Technology, 1029-1039.

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G., (1993). *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Applied Environmental Microbiology, 59, 695-700.

Nakatsu C.H., Torsvik V., Øvreå L., (2000). *Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA chain reaction products*. Soil Science Society American Journal, 64, 1382-1388.

Ndegwa P.M., Wang L., Vaddella K.V. (2007). *Potential strategies for process control and monitoring of stabilization of dairy wastewaters in batch aerobic treatment systems*. Process Biochemistry, 42, 1272-1278.

Nicolau A., Dias N., Mota M. and Lima N. (2001). *Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment*. Research Microbiol, 152, 621-630.

Nubel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. (1997). *PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria*. Applied Environmental Microbiology, 63, 3327-3332.

Obaja S., Mace S., Mata-Alvarez J. (2005). *Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater*. Bioresource Technology, 96, 7-14.

Othman M.Z., Ding L., Jiao Y (2009). *Effect of Anionic and Non-ionic Surfactants on Activated Sludge Oxygen Uptake Rate and nitrification*. International Journal of Civil and Environmental Engineering, 58, 1199-1205.

Ottova V., Balcarova J., Vymazal J., (1997). *Microbial characteristics of constructed wetlands*, Water Science and Technology, 35, 117-123.

Pagnotta R., Tommasi M. (1979). *Applicazione di parametri biologici allo studio del fenomeno del bulking*. Inquinamento, 21, 27-32.

Panesar P.S., Kennedy J.F., Gandhi D., Bunko K. (2007). *Bioutilisation of whey for lactic acid production*. Food Chemistry, 105, 1-14.

Papadimitriou Ch., Palaska G., Lazaridou M., Samaras P., Sakellaropoulos G.P. (2007). *The effects of toxic substances on the activate sludge microfauna*. Desalination, 211, 177-191.

Passeggi M., Lopez I., Borzacconi L. (2009). *Integrated anaerobic treatment of dairy industrial wastewater and sludge*. Water Science and Technology, 59, 501-506.

Perez-Uz B., Arregui L., Calvo P., Salvado H., Fernandez N., Rodriguez E., Zornoza A., Serrano S.(2010). *Assessment of plausible bioindicators for plant performance in advanced wastewater treatment systems*. Water Research, 44, 5059 -5069.

Pesta G., Meyer-Pittroff R., Russ W. (2007). *Utilization of whey*. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry, 10, 193-207.

Petropoulos P., Gilbride K.A. (2005). *Nitrification in activated sludge batch reactors is linked to protozoan grazing of the bacterial population*. Canadian Journal of Microbiology, 51, 791-799.

Pihlanto-Lepala A. (2000). *Bioactive peptides derived from bovine whey proteins opioid and ace-inhibitory peptides*. Trends Food Science & Technologies, 11, 347-356.

Pogue A.J., Gilbride K.A.(2007). *Impact of protozoan grazing on nitrification and the ammonia- and nitrite-oxidizing bacterial communities in activated sludge*. Canadian Journal of Microbiology, 53, 559-571.

Poole J. E. (1984). *A study of the relationship between the mixed liquor fauna and plant performance for a variety of activated sludge sewage treatment works*. Water Research, 18, 281-287.

Pope S., Allee G.L. (1982). *Use of whey in diets for pigs weaned at three weeks*. Journal Animal Science, 55, 291.

- Priya M., Haridas A., Manilal V.B. (2008). *Anaerobic protozoa and their growth in biomethanation systems*. Biodegradation, 19, 179–185.
- Puigagut J., García J., Salvadó H. (2009). *Microfauna community as an indicator of effluent quality and operational parameters in an activated sludge system for treating piggery*. Wastewater Water Air Soil Pollut, 203, 207–216.
- Pujol R., Duchene P., Schetrite S., Canler J.P. (1991). *Biological foams in activated sludge plants: Characterization and situation*. Water Research, 25, 1399–1404.
- Randall C.W., Barnard J.L., Stensel H.D. (1992). *Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal*. Lancaster: Technomic Publishing, 25–78
- Ratsak C. H., Maarsen K. A. and Kooijman S. A. L. (1996). *Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge*. Water Research, 30, 1–12.
- Renner E. (1983). *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Volkswirtschaftlicher Verlag, Munchen.
- Rensink J.H., Rulkens W.H. (1997). *Using metazoan to reduce sludge production*. Water Science Technology, 36, 171–179.
- Ricci N. (1989), *Lezioni di Protozoologia*. Ed. Libreria Baroni, Pisa.
- Rico Gutierrez J. L., Garcia Encina P. A., Fdz-Polanco F., (1991). *Anaerobic treatment of cheese-production wastewater using a UASB reactor*. Bioresource Technologies, 37, 271–276.
- Salvado H., Gracia M.P., Amigo J.M. (1995). *Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants*. Water Research, 29, 1041–1050.
- Salvadò H., MAS M., Menendez S., Gracia M.P. (2001) *Effects of Shock Loads of Salt on Protozoan Communities of Activated Sludge*. Acta Protozoology, 40, 177 – 185.
- Sanin F.D., Clarkson W.W., Vesilind P.A. (2009), *Sludge Engineering: The Treatment and Disposal of Wastewater Sludges*. DEStech Publications Inc., Lancaster PA.
- Sanz J.L., Kochling T. (2007). *Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview*. Process Biochemistry, 42, 119–133.
- Sasahara T. & Ogawa T. (1983). *Treatment of brewery effluent. Part VIII: Protozoa*
- Schmidt I., Sliekers O., Schmid M., Cirpus I., Strous M., Bock E., Kuenen J.G., Jetten S.M. (2002). *Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria – competitors or natural partners?* FEMS Microbiology Ecology, 39, 175–181.
- Schramm A., Santegoeds C.M., Nielsen H.K., Ploug H., Wagner M., Pribyl M., Wanner J., Amann R., De Beer D. (1996). *On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge*. Applied Environmental Microbiology, 65, 4189–4196.

Schwarzenbeck N., Borges J. M., Wilderer P. A. (2005). *Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor*. Applied Microbiological Biotechnologies, 66, 711–718.

Schonborn C, Bauer H-D, Roske I.(2001). *Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules*. Water Research, 35, 3190– 3196.

Sedlak R.I. (1991). *Phosphorous and Nitrogen Removal from Municipal Wastewater*, 2d ed., The Soap and Detergent Association, Lewis Publisher, New York

Seviour R., Nielsen P.H. (2010). *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing Company, London, UK.

Sezgin M. ,Jenkins D., Parker D.S. (1978). *A unified theory of filamentous activated sludge bulking*. Journal (Water Pollution Control Federation), 50, 362-381.

Shehab O., Deininger R., Porta F., Wojewski T. (1996). *Optimising phosphorus removal at the Ann Arbor wastewater treatment plant*. Water Science and Technology, 34, 93 –99.

Shen F.T., Huang H.R., Arun A.B., Lu H.L., Lin T.C., Rekha P.D., Young C.C. (2007). *Detection of filamentous genus Gordonia in foam samples using genus-specific primers combined with PCR – denaturing gradient gel electrophoresis analysis*. Canadian Journal of Microbiology, 53, 768-774.

Sigmund C. (2005), *Teoria e pratica della depurazione delle acque reflue*. Flaccovio Dario Editore, Palermo.

Sirianuntapiboon S., Jeeyachok N., Larplai R. (2005). *Sequencing batch reactor biofilm system for treatment of milk industry wastewater*. Journal Environmental Management, 76, 177–183.

Siso M. (1996). *The biotechnological utilization of cheese whey: a review*. Bioresource Technologies, 57, 1-11.

Smithers G.W. (2008). *Whey and whey proteins—from ‘gutter-to-gold’*. International Dairy Journal, 18, 695–704.

Stamper D.M., Walch M., Jacobs R.N. (2003). *Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments*. Applied and Environmental Microbiology, 69, 852-860.

Streble H., Krauter D. (1981). *Atlante dei microrganismi acquatici*. F. Nuzzio Ed.,Padova.

Strous M.,Van Gerven E., Zheng P., Kuenen J.G., Jetten M.S.M., (1997). *Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations*. Water Research, 31,1955-1962.

Strydom J.P., Britz T.J., Mostert J.F. (1997). *Two-phase anaerobic digestion of three different effluents using a hybrid bioreactor*. Water Salination, 23,151–156.

Sudiana I.M., Mino T., Satoh H., Nakamura K., Matsuo T.(1999). *Metabolism of enhanced biological phosphorus removal and non-enhanced phosphorus removal sludge with acetate and glucose as carbon source*. Water Science and Technology, 39, 29 –35.

Sudo R., Aiba S., (1984). *Role and function of protozoa in the biological treatment of polluted waters*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology., 29, 117-141.

Surampalli Rao Y., Baumann E., Robert R.B.C. (1992). *Kinetics in treating domestic and industrial dairy wastewater under low and high organic loading conditions*. Water Pollution Research Journal of Canada, 27, 665-691.

Takada Y., Aoe S., Kumegawa M. (1996). *Whey protein stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3t3-E1 cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 223, 445–449.

Tandoi V., Jenkins D., Wanner J. (2006). *Activated sludge separation problems: theory, control measures, practical experiences*. IWA Publishing, UK

Tanwar P., Nandy T., Ukey P., Manekar P. (2008). *Correlating on-line monitoring parameters, pH, DO and ORP with nutrient removal in an intermittent cyclic process bioreactor system*. Bioresource Technology, 99, 7630–7635.

Tezuka Y. (1990). *Bacterial regeneration of ammonium and phosphorus ratio of organic substrates*. Microbial Ecology, 29, 227–238.

Thayanukul P., Zang K., Janhom T., Kurisu F., Kasuga I., Furumai H. (2010). *Concentration-dependent response of estrone-degrading bacterial community in activated sludge analyzed by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization*. Water Research, 44, 4878 - 4887.

Thiele J.H. (2005). *Estimate of the energy potential for fuel ethanol from putrescible waste in New Zealand*. Dunedin: Waste Solutions Ltd

Torrijos M., Sousbie Ph., Moletta R., Delgenes J. P. (2004). *High COD wastewater treatment in an aerobic SBR: treatment of effluent from a small farm goat's cheese dairy*. Water Science and Technology, 50, 259–267.

U.S. Patent and Trademark Office. United States Patent 2,183,141, Kauffmann, W., and van der Lee, P. J., Method of Fermenting Whey to Produce Alcohol, December 12, 1939.

Van Ginkel C.G. (1996). *Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms*. Biodegradation, 7, 151-164.

Van Os N.M., Haak J.R., Rupert L.A.M. (1994) *Physico-Chemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactants*. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 113, 113.

Verhagen F.J.M., Laanbroek H.G. (1991). *Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats*. Applied and Environmental Microbiology, 57, 3255–3263.

- Vick Roy T.B. (1985). *Lactic acid*. M.Moo-Young Comprehensive biotechnology, 3, 761–776.
- Vidal G., Carvalho A., Mendez R., Lema, J. M. (2000). *Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters*. Bioresource Technologies, 74, 231–239.
- Vismara R. (1998). *Depurazione biologica*. Hoepli, Milano.
- Vizzardi M., Maffei P. (1999). *Formaggi italiani. Storia – tecnologia e microbiologia lattierocasearia*. Edagricole, Bologna.
- Wang J. W., Zhang T. Z., Chen J. N. (2010). *Operating costs for reducing total emission loads of key pollutants in municipal wastewater treatment plants in China*. Water Science and Technology, 62, 995–1002.
- Wang K.L., Hung T.Y., Lo H.H., Yapijakis K. (2006). *Waste treatment in the food processing industry*. Taylor&Francis Group.
- Wang L.K., Tay J.H., Ta S.T. (2010). *Environmental Bioengineering*, 11, Humana Press, New York.
- Wareham D.G., Hall K.J., Mavinic D.S. (1994). *Real-Time Control of Wastewater Treatment Systems Using ORP*. Water Science and Technology, 28, 273–282.
- Wildbrett G. (1988). *Bewertung von reinigungs- und desinfektionsmitteln im abwasser*. Dtsch. Milchwirtschaft., 39, 616–620.
- Wilderer P.A., Irvine R.L., Goronszy C.M. (2001). *Sequencing batch reactor technology*. IWA Publishing, London (UK).
- Wyrwas B.; Kruszelnicka I., Ginter-Kramarczyk D.(2011). *Effect of the concentration of an anionic surfactant on the composition of microorganisms in activated sludge*. Przemysł Chemiczny, 90, 1743-1748.
- Yalçın A.S. (2006). *Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides*. Current Pharmaceutical Design, 12, 1637–1643.
- Yan J.Q., Lo K.V., Liao P.H. (1989). *Anaerobic digestion of cheese whey using up-flow anaerobic sludge blanket reactor*. Biological Wastes, 27, 289–305.
- Yang S-F, Tay J-H, Liu Y. (2003). *A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater*. Journal of Biotechnology, 106, 77–86.
- You S.J., Ouyang C.F. (2007). *Identification the microbial diversity in a municipal wastewater treatment plant using non-cultured based methods*. Journal of the Chinese Institute of Engineers, 30, 431-440
- Yu H.Q., Fang H.H.P. (2000). *Thermophilic acidification of dairy wastewater*. Applied Microbiological Biotechnologies, 54, 439–44.

Yuan X., Gao D. (2010). *Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor*. Journal of Hazardous Materials, 178, 1041–1045.

Zeng R.J., Lemaire R., Yuan Z., Keller J. (2003). *Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor*. Biotechnology and Bioengineering, 84, 170-178.

Zhang B., Sun B., Ji M., Liu H., (2009). *Population dynamic succession and quantification of ammonia-oxidizing bacteria in a membrane bioreactor treating municipal wastewater*. Journal of Hazardous Materials, 165, 796–803.

Zhang B., Sun B., Ji M., Liu H., Liu X., (2010). *Quantification and comparison of ammonia-oxidizing bacterial communities in MBRs treating various types of wastewater*. Bioresource Technology, 101, 3054–3059.

Zhanping C., Jingli Z. (2010). *Nitrogen removal and operational characteristics in MBR under low dissolved oxygen concentration*. Technology of Water Treatment, 11, 123-127.

Zheng S., Zhang Y., Tong T., Cui C., Sun J. (2010). *Dominance of yeast in activated sludge under acidic pH and high organic loading*. Biochemical Engineering Journal, 52, 282–288.44

Zhou K., Xu M., Daia J., Cao H. (2006). *The microfauna communities and operational monitoring of an activated sludge plant in China*. European Journal of Protistology , 42 ,291–295.

Zhou K., Xu M., Liu B., Cao H. (2008). *Characteristics of microfauna and their relationships with the performance of an activated sludge plant in China*. Journal of Environmental Sciences, 20, 482–486.

Citazioni online:

1) http://www.apv.com/pdf/catalogs/Evaporator_Handbook_10003_01_08_2008_US.pdf

2) Hamilton R. (2006). *The manufacture of ethanol from whey*. Institute of chemistry. <http://www.nzic.org.nz/ChemProcesses/dairy/3H.pdf>.

Ringraziamenti

Al Prof.Maurizio Petruccioli per l'aiuto nella stesura della tesi.

Al Dr.Vittorio Vinciguerra per l'aiuto nello sviluppo dei dati in cromatografia ionica.

Al Dr.Ermanno Federici, Dr.ssa Laura Fidati, Dr.ssa Silvia Sgargetta, Università di Perugia (PG) Dipartimento di Biologia cellulare ed ambientale, per l'aiuto nello sviluppo dei dati DGGE.

Al Dr.Giorgio Pace, Università di Barcellona, per l'aiuto nella stesura dei dati PCA.

Alla Ditta Manzi Aurelio Srl per il finanziamento e supporto della ricerca.

All'Ing.Mauro Giorni per il supporto durante lo svolgimento della tesi.

Al Caseificio Sini, in particolare all'A.D. Giuseppe Capuani, per l'ospitalità presso la struttura.

Al sig.Alberto Rapicetta per l'assistenza e supporto durante il monitoraggio sul campo.