







# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Ingegneria Civile, Ambientale, dei Materiali  
Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale, Aerospaziale, dei Materiali.  
Settore Scientifico Disciplinare ICAR 03.

Trattamento di reflui industriali con sistemi biologici a  
biomassa aerobica granulare: analisi delle performance  
di processo e della stabilità del fango granulare

IL DOTTORE  
**Santo Fabio Corsino**

IL COORDINATORE  
**Prof. Mario Di Paola**

IL TUTOR  
**Prof. Michele Torregrossa**



## Ringraziamenti

Giunto alla fine di questo importante percorso, sento il dovere di ringraziare quelle persone che in questi anni, in particolare negli ultimi tre, mi sono stati vicini e mi hanno aiutato a raggiungere questo traguardo.

Le prime persone che devo ringraziare sono i miei genitori e mia sorella, che mi hanno sempre aiutato e sostenuto negli studi, che non mi hanno mai fatto mancare nulla e grazie ai cui sacrifici sono arrivato a questo importante traguardo. Per il sostegno morale e non solo ringrazio mia nonna Maria e mio zio Andrea, mio stimatissimo maestro.

Il ringraziamento più grande lo devo al mio tutor, Prof. Michele Torregrossa, per la fiducia, la stima che mi ha dimostrato, per avere creduto in me in questi anni e per avermi sapientemente guidato in questo percorso formativo.

Un sentito ringraziamento va anche ai Prof. Gaspare Viviani e Giorgio Mannina, per la disponibilità e l'interesse mostrato durante in questi anni.

Un caloroso grazie lo devo anche ai miei amici e colleghi Alida, Daniele e Marco, che mi hanno accolto nel gruppo e aiutato molto con sapienti consigli. Ringrazio in particolare Marco, per il prezioso aiuto nella maggiorparte delle sperimentazioni che ho portato avanti in questi tre anni e per essersi preso cura dei miei impianti mentre ero in Canada.

A proposito di Canada, ringrazio l'Ing. Giulio Munz e il Prof. Jan Oleszkiewicz, miei supervisorsori durante il soggiorno a Winnipeg, e gli amici e colleghi Alessandro, Tanner e Maciek che hanno reso meno freddo l'inverno canadese.

Un sentito ringraziamento va anche a Gaetano, che in questi anni mi ha dato tanti utili e validi consigli nell'interpretazione dei risultati sperimentali.

Per l'interesse e per il preziosissimo aiuto nelle attività di laboratorio, un ringraziamento particolare va alla Sig.ra Rosa D'Addelfio e al Dott. Dario Gallotta. Tantissimi grazie (ma veramente tanti) vanno a Riccardo, mio carissimo amico e stimatissimo collega, per il sostegno morale, per l'aiuto, i consigli che ha saputo darmi e per le lunghe chiacchierate sui nostri amati granuletti.

Ma senza nulla togliere agli altri, il grazie più importante, quello "di cuore", perchè è proprio da lì che viene, va al mio amore, alla mia Federica, per l'amore che mi trasmette ogni giorno, per il sostegno e soprattutto per avermi reso felice.



a mia nonna Maria,  
ad Azzurra



---

<b>Introduzione</b> .....	I
---------------------------	---

## **Capitolo 1**

### **La granulazione aerobica: formazione dei granuli e applicazioni**

1.1	Introduzione .....	1
1.2	Il fenomeno della granulazione: dai granuli anaerobici a quelli aerobici.....	1
1.3	La formazione dei granuli aerobici .....	2
1.4	La granulazione aerobica nei reattori SBR .....	4
1.5	Fattori che influenzano la granulazione aerobica.....	6
1.5.1	Composizione del substrato .....	6
1.5.2	Carico organico (OLR) .....	8
1.5.3	Sforzi di taglio idrodinamici .....	13
1.5.4	La pressione di selezione idraulica .....	15
1.5.5	Tempo di residenza cellulare (SRT) .....	20
1.5.6	L'alternanza delle condizioni di <i>feast</i> e <i>famine</i> .....	23
1.5.7	Effetto dei cationi polivalenti sulla granulazione .....	25
1.5.8	La concentrazione di ossigeno disciolto .....	27
1.5.9	Il pH e la temperatura.....	30
1.5.10	L'ammoniaca libera .....	32
1.5.11	Alternanza di condizioni non aerate e aerate .....	32
1.5.12	Il ruolo delle EPS nella formazione del fango granulare .....	34
1.6	Applicazione dei fanghi granulari nei processi di rimozione biologica dei nutrienti .....	47
1.6.1	Rimozione dell'azoto .....	47
1.6.2	Rimozione del fosforo.....	54
1.7	Bibliografia .....	57

## Capitolo 2

### **La gestione degli impianti a biomassa granulare: strategie di coltivazione, gestione delle disfunzioni e ottimizzazione del processo**

2.1	Introduzione .....	63
2.2	Lo start-up di un sistema a biomassa granulare e strategie per la riduzione dei tempi di coltivazione.....	63
2.3	Problematiche gestionali di un impianto a biomassa granulare: perdita di stabilità dei granuli nel lungo periodo .....	76
2.4	Meccanismi di rottura dei granuli aerobici e strategie di controllo .....	78
2.5	Strategie per incentivare la stabilità dei granuli .....	88
2.6	Ottimizzazione del processo di rimozione dei nutrienti: ruolo delle strategie di aerazione/alimentazione e delle dimensioni dei granuli .....	90
2.7	Bibliografia .....	103

## Capitolo 3

### **Applicazione dei fanghi granulari al trattamento di reflui industriali**

3.1	Introduzione .....	111
3.2	Meccanismi di rimozione dei substrati particolati.....	111
3.3	Trattamento di reflui salini .....	115
3.4	Le caratteristiche del fango granulare nel trattamento di reflui industriali .....	136
3.5	Trattamento dei reflui dell'industria chimica .....	142
3.6	Trattamento di reflui prodotti dall'industria conserviera del pesce .....	149
3.7	Trattamento di percolato di discarica .....	151
3.8	Trattamento di reflui contaminati da idrocarburi.....	161
3.9	Trattamento di reflui contenenti inquinanti "emergenti" .....	169
3.10	Trattamento di reflui prodotti da birrifici .....	184
3.11	Bibliografia .....	187

---

## Capitolo 4

### La granulazione in impianti a flusso continuo

1.1	Introduzione .....	197
5.1	La granulazione in impianti a flusso continuo .....	197
5.2	La coltivazione dei granuli in impianti convenzionali .....	204
5.3	Stabilità dei granuli aerobici in impianti a flusso continuo .....	212
5.4	Caratteristiche dei granuli aerobici in impianti MBR a flusso continuo.....	220
5.5	La coltivazione in impianti colonnari operanti a flusso continuo	223
5.6	Bibliografia .....	228

## Capitolo 5

### Analisi sperimentale sul trattamento di slop

5.1	Introduzione e obiettivi dello studio .....	231
5.2	Materiali e Metodi.....	233
5.3	Campagna di analisi e metodiche analitiche .....	236
5.3.1	Analisi sulla miscela aerata .....	236
5.3.2	Analisi chimiche sull'influenza/effluente .....	239
5.4	Caratterizzazione degli slops .....	240
5.5	Set-up sperimentale.....	242
5.6	Risultati e discussioni.....	245
5.6.1	Coltivazione e caratteristiche dei granuli aerobici .....	245
5.6.2	Rimozione della sostanza organica.....	262
5.6.3	Rimozione dei nutrienti .....	266
5.6.4	Rimozione degli idrocarburi .....	269
5.7	Conclusioni .....	273
5.8	Bibliografia .....	275

## Capitolo 6

### Analisi sperimentale sul trattamento di reflui ittico-conservieri

6.1	Introduzione e obiettivi dello studio .....	279
6.2	Origine e caratterizzazione del refluo ittico-conserviero.....	281
6.3	Materiali e Metodi .....	282
6.4	Campagna d'analisi e metodiche analitiche .....	284
6.4.1	Analisi sulla miscela aerata .....	284
6.4.2	Analisi sull'influente/effluente.....	284
6.4.3	Prove di frazionamento del refluo .....	285
6.5	Inoculo .....	290
6.6	Caratteristiche dei granuli aerobici .....	290
6.6.1	Analisi dei solidi sospesi totali e volatili.....	291
6.6.2	Caratterizzazione e composizione delle EPS .....	292
6.6.3	Caratteristiche fisiche dei granuli: analisi del contenuto d'acqua, idrofobicità e sedimentabilità .....	296
6.6.4	Effetti della salinità sulla stabilità dei granuli .....	300
6.6.5	Dimensioni e morfologia dei granuli .....	302
6.7	Rimozione dei solidi sospesi .....	304
6.8	Rimozione della sostanza organica.....	306
6.8.1	Risultati del frazionamento del COD .....	311
6.9	Rimozione dell'azoto .....	314
6.10	Conclusioni .....	318
6.11	Bibliografia .....	319

## Capitolo 7

### Analisi sperimentale sul trattamento di reflui prodotti da birrifici

7.1	Introduzione e obiettivi dello studio .....	323
7.2	Materiali e metodi .....	324
7.2.1	Origine e caratterizzazione del refluo .....	325

7.2.2	Set-up della campagna sperimentale .....	326
7.2.3	Configurazione e start-up dei reattori .....	328
7.2.4	Metodiche analitiche.....	330
7.3	Risultati e discussioni.....	332
7.3.1	Formazione e morfologia del fango granulare .....	332
7.4	Rimozione della sostanza organica .....	335
7.5	Rimozione dell'azoto.....	338
7.6	Rimozione del fosforo.....	341
7.7	Processo di nitrificazione e denitrificazione simultanea.....	342
7.8	Analisi del contenuto di EPS durante il ciclo .....	344
7.9	Caratterizzazione e composizione delle EPS .....	346
7.10	Conversione del substrato organico in EPS .....	349
7.11	Effetti del bilanciamento delle fasi di <i>feast</i> e <i>famine</i> sulla stabilità dei granuli.....	350
7.12	Conclusioni .....	351
7.13	Bibliografia .....	353

## Capitolo 8

### Analisi sperimentale sulla stabilità dei granuli aerobici nel lungo periodo

8.1	Introduzione e obiettivi dello studio .....	355
8.2	Materiali e Metodi.....	356
8.3	Risultati e Discussioni.....	357
8.3.1	Analisi del contenuto di EPS .....	357
8.3.2	Analisi delle cinetiche metaboliche.....	362
8.3.3	Caratteristiche fisiche dei granuli: andamento di idrofobicità, contenuto di solidi sospesi totali e volatili, densità, caratteristiche di sedimentabilità e della resistenza strutturale. ....	366
8.3.4	Analisi granulometrica dei granuli aerobici .....	372
8.4	Performance biologiche: rimozione del carbonio .....	378
8.4.1	Performance biologiche: rimozione dell'azoto.....	380
8.5	Modello concettuale: ruolo delle EPS nella perdita di stabilità dei granuli .....	382
8.6	Conclusioni .....	386
8.7	Bibliografia .....	387

## **Capitolo 9**

### **Stabilità strutturale dei granuli aerobici in un impianto MBR a flusso continuo**

9.1	Introduzione e obiettivi dello studio .....	389
9.2	Materiali e Metodi .....	391
9.3	Verifica idrodinamica .....	393
9.4	Metodiche analitiche.....	395
9.5	Set-up sperimentale .....	397
9.6	Risultati e Discussioni .....	399
9.6.1	Analisi della stabilità strutturale dei granuli .....	400
9.6.2	Performance biologiche del sistema.....	410
9.6.3	Performance idrauliche: analisi del fouling della membrana.....	414
9.7	Conclusioni .....	420
9.8	Bibliografia .....	422
	<b>Conclusioni .....</b>	<b>425</b>

## Introduzione

Nel corso dell'ultimo decennio la tecnologia dei fanghi granulari aerobici ha suscitato un sempre più crescente interesse in seno alla comunità scientifica, grazie ai moltissimi vantaggi che tali sistemi offrono rispetto ai sistemi convenzionali di trattamento delle acque di scarico. Le eccellenti caratteristiche di sedimentabilità, la stratificazione che consente la rimozione simultanea dei nutrienti in un unico reattore, e l'elevata capacità di ritenzione di biomassa, fanno sì che i sistemi a fanghi granulari siano, oltre che altamente efficienti, sistemi molto compatti, tali dunque da configurarsi come una valida alternativa ai processi biologici convenzionali. Inoltre, secondo quanto riportato in letteratura, il processo di granulazione sarebbe incentivato quando il sistema viene alimentato con reflui ad alto carico e contenenti sostanze tossiche o inibenti. Per tali motivi, i fanghi granulari si presterebbero molto bene per il trattamento di reflui industriali. Ciò per altro garantirebbe di operare con sistemi molto compatti da installare in situ.

Nella letteratura scientifica di settore svariate sono le applicazioni della tecnologia del fango granulare al trattamento di acque reflue caratterizzate dalla presenza di sostanze recalcitranti, o xenobiotiche, ovvero ancora di acque le cui caratteristiche le rendono incompatibili con i convenzionali sistemi di depurazione (es. reflui ad elevata salinità). Tuttavia, gran parte degli studi riportati in letteratura fanno riferimento ad esperienze condotte con reflui di natura sintetica, che seppure aventi caratteristiche simili a quelli industriali, in molti casi non sono del tutto rappresentativi delle reali condizioni. Infatti, i reflui di origine industriale sono caratterizzati da specifiche peculiarità, ciascuna delle quali ha effetti più o meno marcati sui sistemi biologici. In diversi casi, tali aspetti vengono studiati in maniera indipendente e pertanto, forniscono solo informazioni limitate riguardo la potenziale applicazione della tecnologia per il trattamento di questi reflui, nei quali l'effetto sinergico esercitato dai vari agenti potenzialmente inibenti sul sistema biologico in esame, può essere molto più significativo rispetto a quello esercitato dal singolo agente.

L'obiettivo di questa tesi di dottorato è stato quello di accertare la trattabilità di alcune tipologie di reflui industriali mediante l'utilizzo di sistemi biologici con fango granulare aerobico e di valutarne la resa di rimozione in termini sia di macrodescrittori che di sostanze refrattarie, tossiche e inibenti, nonché di analizzare i principali fattori che ne influenzano la stabilità strutturale.

L'attività sperimentale è stata suddivisa in 5 fasi, in ciascuna delle quali si è analizzata la trattabilità di alcuni reflui industriali, tra i quali quelli derivanti dal settore navale e in particolare dei trasporti di carburanti (slop), quelli dal settore ittico-corserviero, e infine dai birrifici. Tali reflui sono caratterizzati da un elevato contenuto di sostanza organica e di nutrienti, e inoltre per alcuni di essi, l'elevata salinità e la presenza di sostanze recalcitranti e potenzialmente inibenti per le popolazioni batteriche (idrocarburi), ne rende molto complessa la trattabilità con sistemi di tipo biologico.

Essendo ciascuno di questi reflui caratterizzato da specifiche problematiche, per ciascuna sperimentazione, sono state analizzate e discusse le performance biologiche ottenute, i meccanismi di rimozione dei principali contaminanti, e individuate le condizioni operative ottimali.

Inoltre, in molti studi, è stato più volte evidenziato come i sistemi a biomassa granulare, se da un lato consentono di ottenere eccellenti rese depurative, dall'altro soffrono di gravi problemi di instabilità degli aggregati stessi. La stabilità dei granuli è considerata infatti il "collo di bottiglia" della tecnologia, in quanto la destabilizzazione dei granuli determina il venir meno dei peculiari vantaggi che la tecnologia stessa offre rispetto ai trattamenti convenzionali, quali le caratteristiche di sedimentabilità, la struttura densa e compatta, la stratificazione, ecc. Sebbene alcune cause che portano alla degranolazione siano già state individuate, le strategie finalizzate al mantenimento strutturale dei granuli non sono state ancora adeguatamente sviluppate, specie con riferimento al trattamento di reflui reali e di origine industriale. In ragione di quanto detto, i due aspetti, ovvero le performance biologiche e la stabilità dei granuli, richiedono necessariamente uno studio tra loro integrato. Per tali motivi, in questa tesi, con riferimento a ogni singolo reflu trattato, si è fatto riferimento sia alle performance biologiche che alla stabilità dei granuli, al fine di individuare le condizioni operative che garantiscono le migliori rese di processo.

Parallelamente a questi studi, ne è stato condotto un altro avente la finalità di analizzare la stabilità dei granuli nel lungo periodo. Poiché in letteratura, la maggiorparte degli studi sulla stabilità dei granuli è relativo ad una finestra temporale piuttosto limitata (qualche mese), si è ritenuto necessario approfondire tale aspetto cercando di osservare il comportamento dei granuli aerobici per un periodo più lungo (circa 2 anni). In questa fase del lavoro, poiché l'obiettivo è stato lo studio degli effetti di alcuni parametri operativi sul mantenimento dei granuli, si è deciso di operare con un reflu sintetico, in modo da potere depurare i risultati da eventuali aspetti legati alle caratteristiche del reflu.

Infine, è stato condotto un ulteriore studio connesso sempre alla stabilità dei granuli ma in un sistema a flusso continuo, nell'ottica di una eventuale implementazione della tecnologia in impianti già esistenti.

# Capitolo 1

## La granulazione aerobica: formazione dei granuli e applicazioni

### 1.1 Introduzione

L'obiettivo di questo capitolo è quello di descrivere il processo che porta alla formazione dei granuli aerobici a partire dal fango attivo convenzionale. Viene discusso il ruolo dei principali i parametri operativi e la loro influenza sul fenomeno della granulazione aerobica e, infine, sulle applicazioni di questa tecnologia per il trattamento delle acque reflue ed in particolare per la rimozione combinata dei nutrienti.

### 1.2 Il fenomeno della granulazione: dai granuli anaerobici a quelli aerobici

Il fenomeno della bio-granulazione implica l'interazione cellula-cellula, e include fenomeni fisici, chimici e biologici. I prodotti della bio-granulazione in ambiente aerobico sono i cosiddetti granuli aerobici che si formano attraverso l'auto-immobilizzazione dei microorganismi e la conseguente formazione di densi agglomerati che contengono milioni di organismi per grammo di biomassa, includendo al loro interno differenti specie batteriche. Questi granuli sono dei "consorzi" di moltissime specie batteriche le quali svolgono ruoli differenti nella depurazione delle acque reflue. Comparati ai fanghi attivi convenzionali, i granuli hanno dimensioni di un ordine di grandezza superiori e una struttura più regolare, più densa e più compatta. Di conseguenza, sono caratterizzati da ottime caratteristiche di sedimentabilità e sono inoltre capaci di operare con elevati valori di carico organico, elevati tempi di ritenzione cellulare e, infine, risultano più resistenti ai picchi e alle variazioni di carico. Un ulteriore vantaggio di tali sistemi è dato dalla possibilità di rimuovere in maniera combinata sia la sostanza organica che i nutrienti, in quanto all'interno dei granuli stessi possono manifestarsi contemporaneamente reazioni biologiche da parte di popolazioni di batteri eterotrofi, nitrificanti e denitrificanti (Jiang et al., 2003; Yang et al., 2003). In

origine, il processo di granulazione è stato ottenuto in impianti operanti in condizioni anaerobiche. La formazione dei granuli anaerobici è stata ampiamente studiata ed è stata applicata in reattori del tipo UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket). Molti impianti di depurazione già utilizzano la tecnologia della granulazione anaerobica e la loro efficacia è stata dimostrata con successo (**Lettinga et al., 1980; Fang e Chui, 1993; Schmidt e Ahring, 1996**). I granuli anaerobici contengono milioni di specie di microrganismi per grammo di biomassa, ma nessuna di queste individualmente è in grado di operare la degradazione, per ottenere la quale è necessaria una completa interazione tra queste specie. I reattori a fanghi granulari consentono di mantenere all'interno del reattore un grandissimo numero di microrganismi, e per tanto risultano particolarmente convenienti nei processi di trattamento biologici. Ciò implica che la depurazione avviene in tempi brevi e che il trattamento di grandi volumi di reflui può avvenire in reattori compatti. Nei reattori a fanghi granulari la dimensione e la densità dei granuli determina la loro elevata velocità di sedimentazione, e ciò naturalmente semplifica la separazione dell'effluente trattato dalla biomassa. La tecnologia della granulazione anaerobica presenta tuttavia degli svantaggi. Questi consistono nella necessità di un lungo periodo di start-up, nella necessità di operare con temperature di processo relativamente alte, e nell'inadeguatezza di trattamento per reflui a basso carico organico. Inoltre tali sistemi, mal si prestano per la rimozione dei nutrienti (N e P). Per superare queste problematiche, la ricerca si è dedicata allo sviluppo dei sistemi granulari aerobici. Lo sviluppo di tale tecnologia fu presentato per primi da **Mishima e Nakamura, (1991)**, i quali riuscirono a far sviluppare i granuli in un reattore aerobico alimentato in continuo. In dettaglio, si svilupparono granuli con un diametro compreso tra i 2 e gli 8 mm, caratterizzati da eccellenti caratteristiche di sedimentazione. In seguito la granulazione aerobica è stata studiata in reattori alimentati in batch (SBRs) da molti ricercatori (**Morgenroth et al., 1997; Beun et al., 1999; Peng et al., 1999; Etter e Wilderer, 2001; Tay et al., 2001a; Liu e Tay, 2002**), utilizzandola nel trattamento di reflui contenenti carbonio organico, azoto, fosforo e sostanze tossiche (**Jiang et al., 2003; Moy et al., 2001; Liu et al., 2003a; Yang et al., 2004**). Lo sviluppo dei granuli aerobici richiede l'aggregazione dei microrganismi e affinché ciò avvenga, devono verificarsi una serie di condizioni tra loro concomitanti. Infatti, la formazione dei granuli è un processo che comprende più fasi, ed è influenzato da numerosi parametri gestionali e non, che verranno nel seguito discussi.

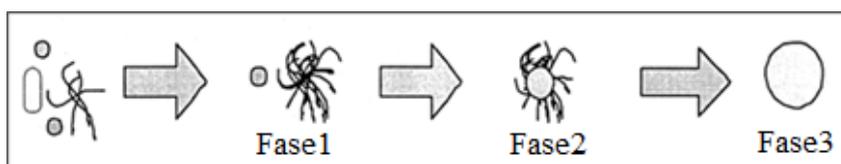
### 1.3 La formazione dei granuli aerobici

I granuli aerobici possono essere definiti come aggregati microbici densi e compatti con una superficie esterna quasi sferica, caratterizzati dall'aver

dimensioni e velocità di sedimentazione nettamente superiori rispetto ai fiocchi di fango di un sistema a fanghi attivi convenzionale. Diversi autori ritengono che la formazione dei granuli aerobici sia un caso particolare di sviluppo di pellicola biologica (Liu e Tay, 2002; Yang et al., 2004). Quasi tutti i granuli aerobici sono stati coltivati in reattori del tipo SBR, una variante del sistema convenzionale a fanghi attivi. Alcuni autori agli inizi degli anni 2000, hanno cercato di spiegare il meccanismo che portava al fenomeno della granulazione aerobica. Liu e Tay, (2002) hanno proposto un possibile meccanismo, individuando in particolare tre fasi (figura 1.1):

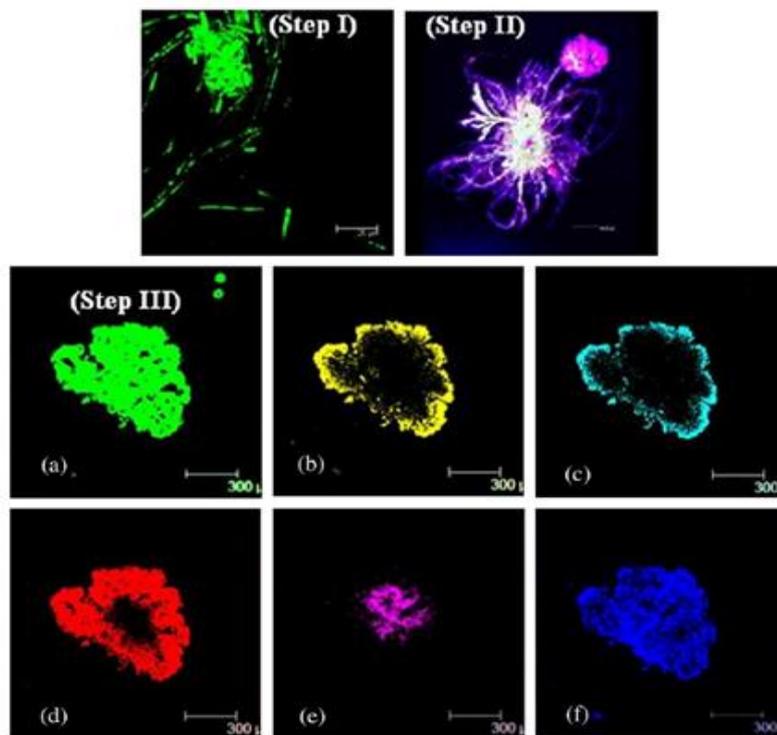
- contatto cellula-cellula a formare piccoli aggregati, per forze di natura idrodinamica, e termodinamica (Fase 1);
- attrazione di questi piccoli aggregati, che unendosi per forze di natura fisica (Van der Waals, elettrostatiche, termodinamiche), chimica (legami ionici divalenti e trivalenti) biochimica (fusione tra le membrane cellulari, attrazione tra i ricettori cellulari), diventano sempre più grandi (Fase 2);
- la produzione di EPS che favorisce l'unione di questi aggregati e lo sviluppo di microstrutture dense e compatte (Fase 3);

Gli sforzi di taglio idrodinamici che si realizzano opportunamente nel reattore, stabilizzano la struttura dei granuli e conferiscono loro una forma rotondeggiante.



**Figura 1.1:** Meccanismo di formazione dei granuli (Liu e Tay, 2002)

Utilizzando un microscopio confocale a scansione laser (CLSM) con differenti onde oligonucleotidiche, fluorocromi specifici e microsferi fluorescenti, è stato possibile osservare la progressiva formazione dei granuli, evidenziando proprio le tre fasi distinte (Adav e Lee, 2008; McSwain e Irvine, 2008). Nella figura 1.2, sono riportate le immagini che mostrano le tre fasi distinte del processo che porta alla formazione dei granuli aerobici.



**Figura 1.2:** Meccanismo di formazione dei granuli: particolari delle tre fasi (Adav et al. 2008).

#### 1.4 La granulazione aerobica nei reattori SBR

La maggior parte degli studi effettuati fino a ora sul fenomeno della granulazione aerobica, sono stati condotti in reattori alimentati in batch. In tali impianti l'alimentazione, l'aerazione, la sedimentazione e lo scarico dell'effluente si susseguono nel tempo anziché nello spazio come avviene negli impianti alimentati in continuo. In tali sistemi rivestono un ruolo molto importante la durata del ciclo di reazione, e le cinetiche che si instaurano all'interno del reattore in virtù del regime di alimentazione in discontinuo. È stato osservato che la durata del ciclo di reazione aveva importanti effetti sulle caratteristiche strutturali dei granuli. A tal proposito, **Liu e Tay, (2007)** notarono che quando il tempo di durata del ciclo veniva incrementato da 1,5 a 8 ore, il coefficiente di crescita cellulare ( $Y$ ) diminuiva da 0,266 a 0,032  $\text{giorni}^{-1}$ . Inoltre, i granuli coltivati nei reattori che operavano con un ciclo di 1,5 ore avevano le dimensioni maggiori, mentre i granuli coltivati operando con un ciclo di 4 ore, risultavano essere più piccoli ma in

compenso maggiormente compatti rispetto agli altri. Gli stessi autori, inoltre, notarono l'esistenza di un valore ottimale del carico organico di  $6 \text{ KgCOD m}^{-3} \text{ giorno}^{-1}$ , in corrispondenza del quale i granuli risultavano sufficientemente stabili e grandi. Infatti, all'aumentare del carico organico, i granuli aumentavano di dimensioni ma perdevano gradualmente la loro stabilità, circostanza che era legata alla proliferazione di batteri filamentosi (Zheng et al., 2006).

Per quanto riguarda le cinetiche, si è osservato che la fase di aerazione consisteva di due fasi: una prima in cui il substrato si esauriva rapidamente, detta fase di *feast*, seguita da una fase di inedia aerobica in cui il substrato non era più disponibile in grandi quantità, detta *famine* (o inedia). L'alternanza di queste due fasi è ritenuto essere il principale meccanismo che porta alla formazione dei granuli, in quanto funzionerebbe come selettore biologico di batteri fiocco-formatori (Mosquera-Corral et al., 2005). In questo contesto, alcuni autori (Wang et al., 2007) hanno osservato che un lungo periodo di inedia riduce la stabilità dei granuli, di conseguenza è bene non operare con cicli di elevata durata.

Un ulteriore fattore fondamentale per la buona riuscita del processo di granulazione è la pressione di selezione idraulica. Tale parametro è usualmente espresso in termini di velocità di sedimentazione, ed è dato dal rapporto tra l'altezza del livello idrico sopra lo scarico e il tempo di sedimentazione. La scelta del tempo di sedimentazione, e di conseguenza della pressione di selezione idraulica, è facilmente gestibile solo in impianti del tipo SBR. In letteratura è riportato che tempi di sedimentazione ridotti che corrispondono ad elevate pressioni di selezione idraulica, causano il dilavamento della biomassa che ha scarse caratteristiche di sedimentabilità, e consente di trattenere nel reattore solo i granuli di dimensioni maggiori (Qin et al., 2003).

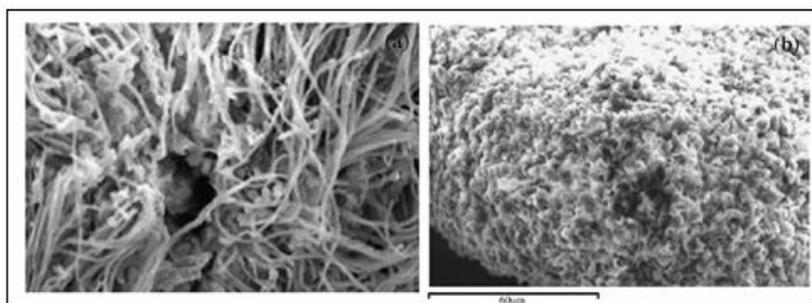
Un fattore altrettanto importante per la granulazione è quello degli sforzi di taglio che vengono espressi in termini di velocità del flusso ascensionale d'aria. Tale parametro è però tipico dei reattori con prevalente sviluppo verticale (colonnari), ovvero di unità caratterizzate da un rapporto altezza/diametro maggiore di 5-6 unità. Adav et al. (2008) riportano che operando con basse portate d'aria ( $1 \text{ L min}^{-1}$ ) non si formavano granuli, mentre con portate medie ( $2 \text{ L min}^{-1}$ ) si formavano granuli di grosse dimensioni (3-3,5 mm), in cui risultano abbondanti i batteri filamentosi. La bassa portata d'aria determinava l'insufficiente intensità degli sforzi di taglio che permetteva la proliferazione dei batteri filamentosi che causavano l'instabilità dei granuli. In questo contesto, è stato provato che la portata d'aria ottimale deve essere compresa in un range tra  $2,5$  e  $4 \text{ L min}^{-1}$  (Liu e Tay, 2006).

## 1.5 Fattori che influenzano la granulazione aerobica

Il fenomeno della granulazione è assai complesso, e affinché si possano formare agglomerati stabili, è necessario che si verifichino determinate condizioni. Di seguito verranno esaminati tutti i fattori che influenzano il fenomeno della granulazione aerobica, già in parte richiamati al paragrafo 1.4.

### 1.5.1 Composizione del substrato

La formazione dei granuli è stata osservata alimentando i reattori con diverse varietà di substrato sintetico (a base di glucosio, acetato, etanolo, fenolo) e reale (refluo civile o industriale) (Beun et al., 1999; Schwarzenbeck et al., 2004). Si è osservato che la microstruttura dei granuli e le specie batteriche prevalenti, sembrano essere legate al tipo di carbonio utilizzato come substrato. Tay et al., (2001b) hanno usato differenti tecniche microscopiche per studiare come si formano i granuli. Il fango granulare è stato coltivato in due reattori alimentati in batch utilizzando come substrato carbonioso glucosio nel primo caso e acetato di sodio nel secondo. I primi risultati hanno dimostrato che il fango prodotto aveva una struttura irregolare dominata dai batteri filamentosi. I primi granuli con una struttura regolare si sono formati dopo una settimana; analisi microscopiche hanno dimostrato la graduale scomparsa dei batteri filamentosi nel reattore alimentato con acetato, mentre in quello alimentato con glucosio erano ancora prevalenti. Due settimane dopo l'avvio, i granuli erano ben formati in entrambi i reattori. I batteri filamentosi erano totalmente scomparsi nel reattore alimentato con acetato, mentre erano ancora dominanti nel reattore alimentato col glucosio. Questo dimostrava che un substrato a base di glucosio stimolava la crescita e la persistenza dei batteri filamentosi. Dopo tre settimane i granuli erano ben formati in entrambi i reattori, e i granuli erano caratterizzati da una superficie esterna regolare, liscia e sferica. Dalle stesse osservazioni microscopiche si è visto che i granuli che si sono formati nel reattore alimentato con glucosio erano leggermente più grandi (0,79 mm) rispetto agli altri (0,73 mm), ed erano caratterizzati da una superficie esterna meno regolare, probabilmente per la prevalenza di batteri filamentosi. Da un'analisi micro strutturale dei granuli, questa ipotesi è stata confermata. Come mostrato in figura 1.3, i batteri filamentosi erano dominanti nei granuli formati nel reattore alimentato con glucosio, mentre gli altri granuli presentavano una struttura molto compatta in cui predominavano batteri a forma di bastoncelli. In generale quindi, sebbene la composizione del substrato non sia decisiva ai fini della granulazione, le caratteristiche qualitative del substrato carbonioso incidono in maniera significativa sulla struttura dei granuli aerobici.



**Figura 1.3:** Effetto del substrato carbonioso sulla struttura dei granuli; a sinistra i granuli del reattore alimentato con glucosio, a destra quelli del reattore con acetato. (Tay et al. 2001b)

Sun et al. (2006) hanno studiato l'effetto di differenti composizioni del substrato sul processo della granulazione aerobica, utilizzando 4 reattori SBR (R1, R2, R3 ed R4) alimentati rispettivamente con acetato, glucosio, peptone e fecola. Le condizioni con cui operavano i reattori erano le stesse. Sono state osservate tre fasi di sviluppo della biomassa: la fase di acclimatazione, in cui si cominciarono a formare grandi fiocchi di fango, la successiva fase di maturazione, caratterizzata da un significativo incremento della concentrazione di biomassa nel reattore e la fase stazionaria, in cui i granuli erano ben compatti. I granuli si sono ben formati nei reattori R1, R2 ed R4, mentre nel reattore alimentato con peptone i pochi granuli che si sono riusciti a formare erano di ridotte dimensioni e avevano scarsa resistenza. Nel reattore alimentato con acetato (R1), piccoli granuli di colore giallo chiaro (2mm di diametro), apparvero dal 7° giorno e divennero dominanti a partire dal 13° giorno in poi. Il colore dei granuli nel tempo variò dal giallo chiaro al giallo scuro; analisi microscopiche mostrarono che la presenza di batteri filamentosi, dapprima dominanti, andò progressivamente diminuendo, e la struttura dei granuli divenne sempre più stabile. Nel reattore alimentato con glucosio (R2) i granuli erano simili a quelli formati nel reattore R1 perciò che riguarda la forma e le dimensioni. Da osservazioni microscopiche (figura 1.4) si notò la maggiore presenza di batteri filamentosi che rendeva la superficie esterna all'apparenza più soffice, la cui presenza rimase dominante per tutta la durata della sperimentazione. Nel reattore alimentato con peptone, si formarono piccolissimi granuli (0,5 mm) e instabili e non è stata riscontrata la presenza di EPS e ciò era dovuto probabilmente alla bassa biodegradabilità del peptone. Nel reattore alimentato con fecola (R4) invece, i granuli erano ben formati ed è stata riscontrata un'elevata concentrazione di EPS dovuta all'elevata biodegradabilità del substrato carbonioso.

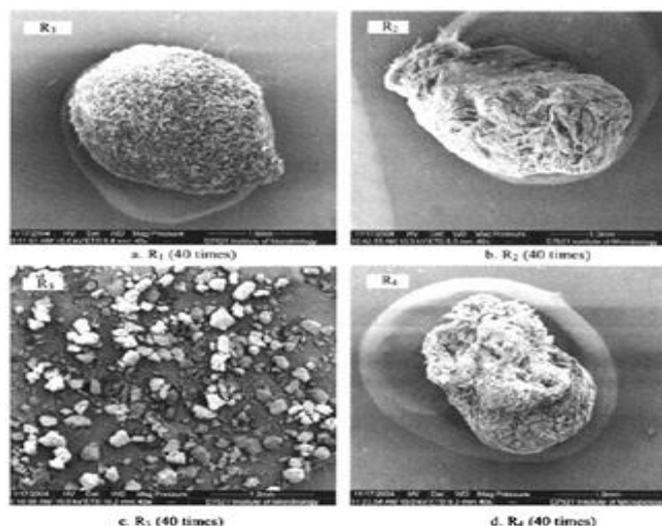


Figura 1.4: Osservazione dei granuli nei 4 reattori (Sun et al., 2006)

### 1.5.2 Carico organico (OLR)

Il ruolo del carico organico nella formazione dei granuli anaerobici è stato riconosciuto come essenziale per quanto riguarda la loro struttura. Infatti, è stato osservato che la loro formazione è facilitata applicando carichi organici relativamente elevati e all'interno di una finestra di valori piuttosto ristretta.

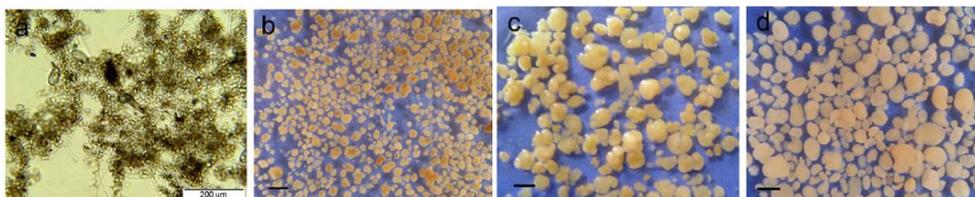
In contrasto con quanto avviene nella granulazione anaerobica, evidenze sperimentali mostrano che la formazione dei granuli aerobici è avvenuta applicando differenti valori di carico organico, variabile da 2,5 a 15 KgCOD m<sup>-3</sup> giorno<sup>-1</sup> (Moy et al., 2002; Liu et al., 2003b). Valori più bassi di 2,5 KgCOD m<sup>-3</sup> giorno<sup>-1</sup> rallentano tuttavia i tempi di coltivazione e i granuli si formano dopo circa 300 giorni come osservato da Ni et al. (2008). Quindi, sebbene il carico organico non risulti un fattore decisivo per la formazione dei granuli, visto che seppur in tempi molto lunghi essi si formano ugualmente, le caratteristiche fisiche degli stessi, dipende fortemente da questo parametro.

Li et al. (2008a), hanno studiato l'effetto del carico organico sul processo di formazione dei granuli e sulla loro struttura e composizione. Sono stati utilizzati a tal fine tre reattori SBR, R1, R2, R3, alimentati con differenti concentrazioni di substrato organico; i valori del carico organico nei tre reattori erano rispettivamente di 1,5 (R1), 3 (R2) e 4,5 (R3) KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup>. Come alimento è stato utilizzato refluo sintetico a base di glucosio.

I granuli si formarono con successo in tutti e tra i reattori, ma erano morfologicamente e strutturalmente diversi. I granuli che si sono formati nel reattore operante con un carico organico più elevato (R3), si formarono più

rapidamente (7 giorni), ed erano più grandi ma meno stabili; i granuli che si sono formati nei reattori che operavano con un carico organico più basso (R1 ed R2) risultarono più piccoli e stabili, ma il tempo necessario per la loro formazione fu maggiore (38 e 20 giorni rispettivamente) (Figura 1.5).

Inoltre, è stato osservato che i granuli coltivati nel reattore R2 presentavano una maggiore diversità di specie batteriche rispetto agli altri.

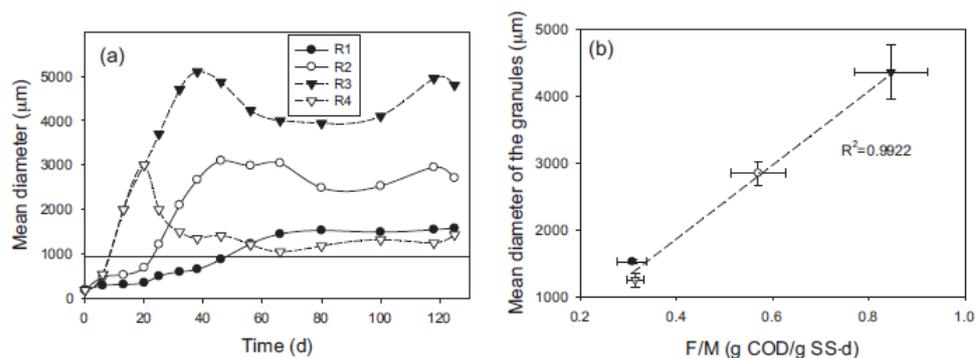


**Figura 1.5:** Fotografie del fango di inoculo e dei granuli: a) fango di inoculo; b) granuli di R1; c) granuli di R2; d) granuli di R4 (Li et al., 2008a).

Gli autori conclusero che un incremento del carico organico promuove la rapida formazione di granuli di maggiori dimensioni ma di scarsa resistenza strutturale. Al contrario, bassi valori del carico organico promuovono la formazione di granuli di minori dimensioni ma più stabili, caratterizzati da una maggiore diversità di specie batteriche.

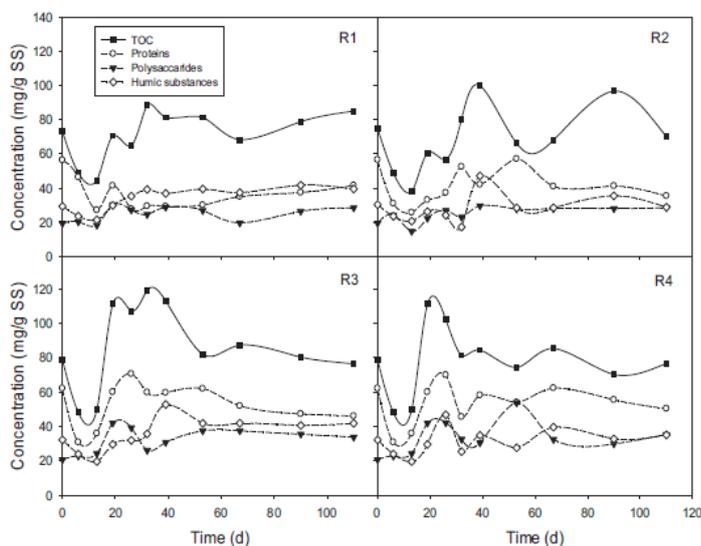
Li et al. (2011) hanno studiato gli effetti di differenti valori del carico organico sulle proprietà fisiche dei granuli aerobici. Per il loro studio gli autori utilizzarono 4 impianti (R1-R4), alimentati con differenti valori di COD, nei quali la concentrazione di biomassa veniva mantenuta pari a  $2 \text{ g L}^{-1}$ . Il carico organico era rispettivamente pari a  $0,3 - 0,7 - 0,9 - 1,1 \text{ KgCOD m}^{-3}\cdot\text{giorno}^{-1}$ .

I granuli si sono formati in tutti e quattro gli impianti, per cui esso non è risultato un parametro decisivo per la granulazione. Tuttavia esso ha inciso sensibilmente sia sul tasso di granulazione che sulla morfologia dei granuli. Nell'impianto alimentato con carico maggiore i granuli si sono sviluppati in brevissimo tempo (7 giorni) mentre negli altri i tempi di coltivazione sono stati inferiori. In ogni caso però, al crescere del carico i granuli si formavano in meno tempo. Nell'impianto con carico maggiore (R4) il carico venne successivamente ridotto a  $0,3 \text{ KgCOD m}^{-3}\cdot\text{giorno}^{-1}$ . Gli autori osservarono un graduale sfaldamento dei granuli le cui dimensioni si stabilizzarono su un valore simile a quelli di R1 ovvero al reattore con lo stesso carico (Figura 1.6).



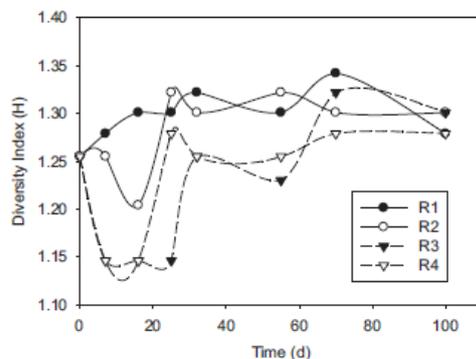
**Figura 1.6:** Andamento dei diametri medi dei granuli nei quattro reattori (a); correlazione tra il diametro medio dei granuli e il carico del fango (Li et al., 2011).

Dal punto di vista strutturale i granuli di R1 (basso carico) erano più piccoli e compatti. Essi mostravano una maggiore velocità di ossidazione del substrato per via della loro maggiore superficie specifica e una minore resistenza alla diffusione del substrato e dell'ossigeno al loro interno. Granuli di dimensioni maggiori, invece, seppur caratterizzati da una velocità di sedimentazione maggiore, mostravano minori efficienze di rimozione del substrato organico. Tali granuli esibivano un contenuto di EPS più alto rispetto a quelli coltivati con carico minore. In particolare gli autori osservarono che il contenuto di EPS aumentava in maniera significativa nei primi giorni e successivamente si stabilizzava su un valore di equilibrio a granulazione completa (Figura 1.7).



**Figura 1.7:** Andamento del contenuto di EPS nei granuli coltivati nei quattro impianti (Li et al., 2011).

Il carico organico gioca un ruolo chiave anche nella diversità microbiologica dei granuli. Similmente a quanto precedentemente discusso, i granuli coltivati con un carico del fango più basso mostravano una maggiore diversità microbiologica, che si riduceva al crescere di esso. Gli autori sostengono che la ridotta disponibilità di substrato promuova la presenza di più specie batteriche, in quanto quelle dominanti non si trovano nelle condizioni ideali affinché potessero essere tali (Figura 1.8).

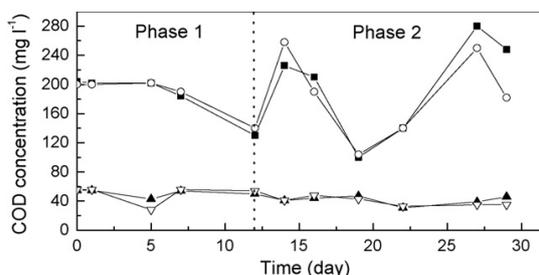


**Figura 1.8:** Andamento dell'indice di diversità batterica nei quattro reattori. (Li et al., 2011).

Se da un lato dunque l'applicazione di elevati valori del carico in fase di coltivazione promuove la rapida formazione dei granuli, dall'altro determina la formazione di granuli strutturalmente instabili. Granuli più piccoli invece risultano preferibili soprattutto nell'ottica del mantenimento nel lungo periodo. Una possibile strategia gestionale potrebbe essere quella di coltivare i granuli con un elevato valore del carico al fine di agevolarne la rapida formazione, e successivamente ridurlo per aumentare la stabilità strutturale dei bioaggregati nel lungo periodo.

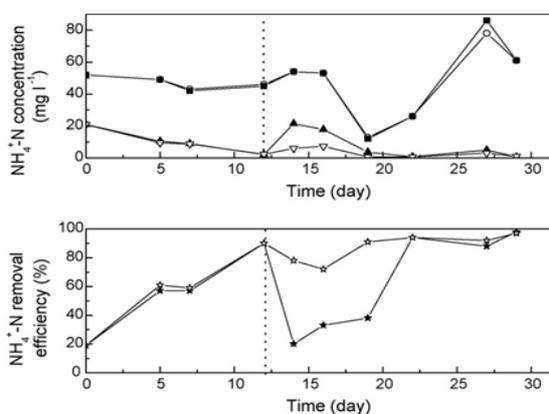
**Liu et al. (2008)** in una loro sperimentazione precedente, avevano già trattato tale tema, utilizzando tre reattori SBR alimentati con refluo reale caratterizzato da un basso valore del carico organico ( $0,6 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$ ). Per ovviare al problema della formazione dei granuli nella fase di coltivazione, è stato utilizzato refluo sintetico a base di acetato, caratterizzato da  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  di COD, da  $50 \text{ mg L}^{-1}$  di azoto ammoniacale e da tracce di altri micronutrienti. I tre reattori operavano con un ciclo di 4 ore (5 minuti per l'alimentazione dell'inflente, 200-220 minuti per l'aerazione, 10-30 minuti per la sedimentazione e 5 per lo scarico). Una volta che i granuli erano ben formati, il refluo sintetico è stato sostituito da un refluo reale di origine civile. La concentrazione di COD nel refluo era compresa tra  $100\text{-}280 \text{ mg L}^{-1}$ , mentre per l'azoto ammoniacale tra  $12\text{-}88 \text{ mg L}^{-1}$ , per il primo mese. Le concentrazioni medie erano di circa  $200 \text{ mg L}^{-1}$  per il COD, e di  $50 \text{ mg L}^{-1}$  per l'azoto ammoniacale. Il carico organico era di  $0,6 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$ , mentre per l'azoto ammoniacale il carico era di  $0,15 \text{ Kg NH}_4^+\text{-N m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$ .

Lo studio è stato articolato in 2 fasi: una prima dalla durata di 12 giorni in cui i reattori hanno operato con un ciclo di 4 ore, e una seconda nella quale la durata dei cicli è stata di 2 ore. Nella seconda fase i valori delle concentrazione di COD e azoto ammoniacale raddoppiarono per la riduzione dei tempi del ciclo da 4 a 2 ore. Sono state effettuate misure sullo SVI, sulla concentrazione di biomassa e sulla concentrazione di COD, azoto ammoniacale, nitriti e nitrati nell'effluente. La Figura 1.9 mostra il trend della concentrazione di COD nell'effluente, e si può notare come questa di mantenga sempre al di sotto di 60 mg L<sup>-1</sup> nei due reattori.



**Figura 1.9:** Andamento del COD allo scarico durante le due fasi della sperimentazione. (Liu e Tay 2008).

Per quanto riguarda l'azoto ammoniacale, nei primi 12 giorni i granuli non avevano la capacità di nitrificare; a partire dal 12° giorno in poi la concentrazione nell'effluente cominciò a diminuire significativamente e i rendimenti passarono dal 19 al 90% (Figura 1.10).



**Figura 1.10:** Andamento dell'azoto ammoniacale allo scarico e rendimenti di rimozione dello stesso. (Liu e Tay, 2008)

Ciò indicava che l'acclimatazione dei granuli avveniva progressivamente. Dopo 12 giorni, quando cioè il carico di  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  è stato raddoppiato, il rendimento di rimozione di nitrificazione diminuì al 70%, per aumentare nuovamente fino al 90% dopo 10 giorni. Ciò dimostrerebbe come la nitrificazione richieda una fase in cui i granuli debbano acclimatarsi per essere efficaci ai fini della nitrificazione, e questa fase è necessaria affinché si possano sviluppare i batteri nitrificanti i quali, avendo un tasso di crescita cellulare inferiore a quello dei batteri eterotrofi, necessitano di tempi maggiori per potersi acclimatare ed essere così efficaci ai fini della depurazione. Il terzo reattore è stato avviato con le stesse condizioni operative degli altri due, eccetto l'influente. È stato utilizzato infatti del refluo sintetico che aveva concentrazioni simili di COD ed azoto ammoniacale del refluo reale. In questo reattore la nitrificazione non si è verificata neanche dopo due settimane.

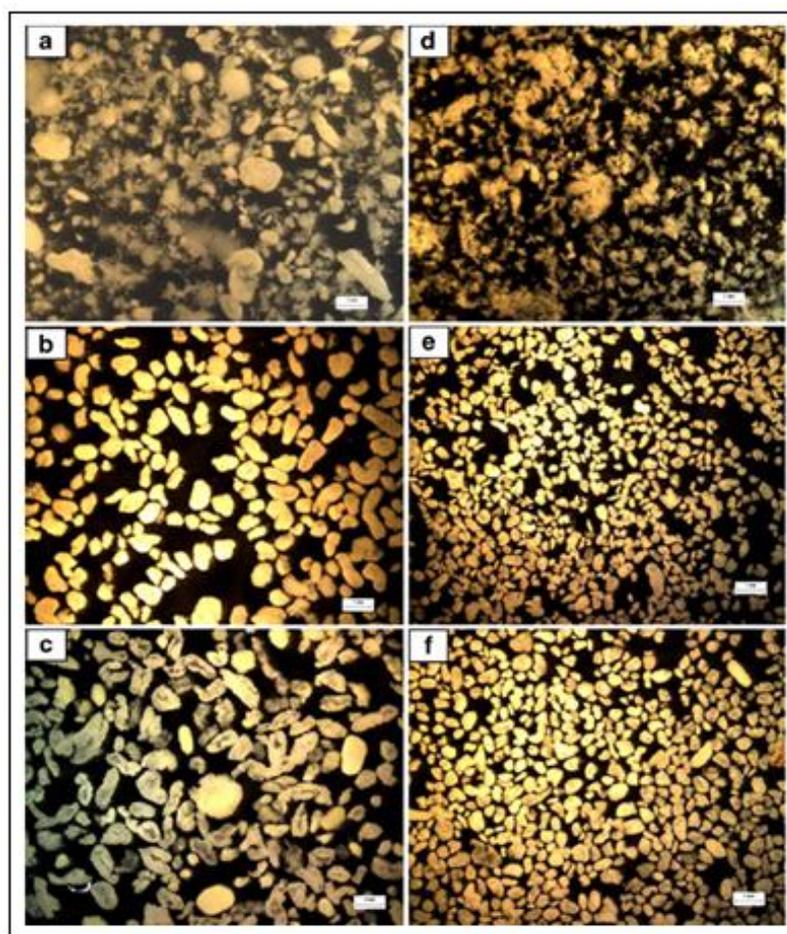
È ovvio allora che il refluo di origine civile risulta essere più favorevole per lo sviluppo di batteri nitrificanti, e che quindi per reflui di origine civile, la rimozione del carbonio e l'ossidazione dell'azoto ammoniacale sia possibile utilizzando i granuli aerobici. È chiaro tuttavia che se il refluo presenta valori bassi del carico organico sia necessario utilizzare granuli già formati.

### 1.5.3 Sforzi di taglio idrodinamici

Un fattore ritenuto fondamentale per la granulazione è quello degli sforzi di taglio idrodinamici, che vengono di solito espressi in termini di velocità del flusso ascensionale d'aria. Tale parametro è però tipico dei reattori colonnari, ovvero di unità caratterizzate da un rapporto altezza/diametro maggiore di 5-6 unità.

Per analizzare il fenomeno della granulazione e la struttura dei granuli al variare degli sforzi di taglio idrodinamici, **Chen et al. (2007b)** hanno condotto una sperimentazione utilizzando 4 reattori (R1, R2, R3 ed R4) operanti a differenti valori degli sforzi. In particolare, questi valori erano di  $0,8 \text{ cm sec}^{-1}$  per il reattore R1,  $1,6 \text{ cm sec}^{-1}$  per R2,  $2,4 \text{ cm sec}^{-1}$  per R3 e infine  $3,2 \text{ cm sec}^{-1}$  per R4. Le restanti condizioni operative erano le stesse per tutti i reattori. Dopo 5 e 7 giorni, nei reattori R1 ed R2 cominciarono ad apparire i primi granuli di colore giallastro, di piccole dimensioni ( $350 \mu\text{m}$  in R1 e  $300 \mu\text{m}$  in R2). Nel reattore R1 i granuli si svilupparono presto e le loro dimensioni crebbero fino a  $2 \text{ mm}$ ; dal 15° giorno i granuli erano dominanti. I granuli erano morfologicamente molto vari, e la superficie appariva piuttosto irregolare. Osservazioni microscopiche mostrarono che i batteri filamentosi erano dominanti nei granuli, i quali avevano pessime caratteristiche di sedimentabilità, e di conseguenza i valori di SVI a 30 minuti risultarono piuttosto elevati ( $270 \text{ mL gSST}^{-1}$ ). Nel complesso, la concentrazione di biomassa risultò bassa ( $2,02 \text{ gSST L}^{-1}$ ), e dal 30° giorno i granuli si deteriorarono del tutto.

Nel reattore R2 i granuli erano densi e compatti, la loro superficie era regolare e tondeggiante e le dimensioni crebbero gradualmente fino a 860  $\mu\text{m}$ ; rispetto al reattore R1, la concentrazione di biomassa si mantenne pressoché invariata (2,48  $\text{gSST L}^{-1}$ ), mentre il valore dello  $\text{SVI}_{30}$  era notevolmente più basso (73  $\text{mL gSST}^{-1}$ ). Dal 40° giorno in poi i batteri filamentosi cominciarono ad essere sempre più dominanti nei granuli, e la loro struttura divenne simile a quella dei granuli nel reattore R1. I valori di  $\text{SVI}$  crebbero progressivamente fino a 272  $\text{mL gSST}^{-1}$ , le dimensioni aumentarono fino a 10 mm, e i granuli risultavano in generale meno densi e compatti. Per tali motivi le caratteristiche di sedimentabilità dei granuli peggiorarono significativamente, finché tutto il fango granulare venne dilavato con l'effluente.



**Figura 1.11:** Confronto tra i granuli di R3 ed R4 (Chen et al., 2007b)

Nei reattori operanti con velocità del flusso superficiale d'aria più elevato (R3 ed R4), i granuli si formarono dall'undicesimo giorno in poi. Come mostra la figura 1.11, i granuli avevano caratteristiche simili fino sia in termini di dimensioni (260  $\mu\text{m}$  e 210  $\mu\text{m}$ ), che in termini di struttura (in entrambi molto compatta e regolare). Dopo 40 giorni i granuli erano dominanti in entrambi i reattori, e le dimensioni erano comprese tra i 500-700  $\mu\text{m}$  in R3 e i 300-500  $\mu\text{m}$  in R4. Questa piccola differenza è dovuta ai maggiori sforzi di taglio nel reattore R4. I valori di  $\text{SVI}_{30}$  erano rispettivamente 41 e 27  $\text{mL gSS}^{-1}$ , per cui i granuli mostravano ottime caratteristiche di sedimentabilità.

In Tabella 1.1, sono riportate alcune caratteristiche dei granuli coltivati nei reattori R3 ed R4:

**Tabella 1.1:** Struttura e caratteristiche dei granuli di R3 ed R4 (Chen et al., 2007b)

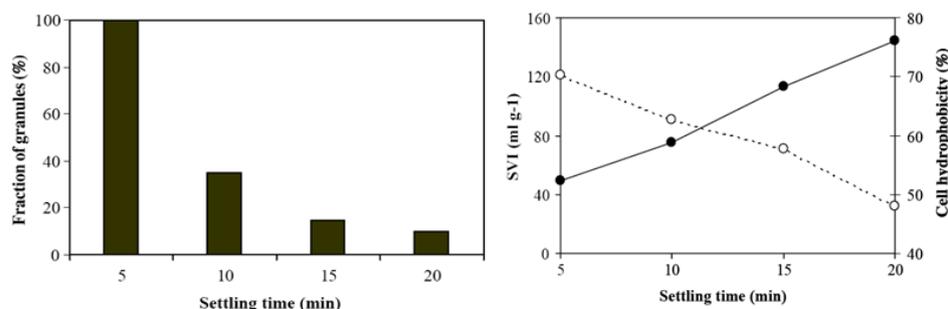
	R3	R4
$D_f$	1.96±0.02	2.07±0.04
Particle size ( $\mu\text{m}$ )	557±60	342±48
SVI ( $\text{mL g}^{-1}$ SS)	41±6	27±6
SS ( $\text{g l}^{-1}$ )	7.16±0.93	4.69±0.42
VSS ( $\text{g l}^{-1}$ )	6.45±0.81	4.38±0.43
Effluent SS ( $\text{g l}^{-1}$ )	0.50±0.08	0.51±0.10
EPSs ( $\text{mg g}^{-1}$ VSS)	17.34±2.11	26.10±9.04
EPSp ( $\text{mg g}^{-1}$ VSS)	13.53±3.66	11.24±2.70
SOUR ( $\text{mg O}_2 \text{g}^{-1}$ VSS $\text{h}^{-1}$ )	23.39±6.99	41.25±10.72
SRT (d)	32±5	22±4

Questi risultati mostrano come gli sforzi di taglio idrodinamici giochino un ruolo fondamentale per il processo di formazione dei granuli aerobici e per il mantenimento della loro stabilità. Se da un lato valori bassi producono granuli più grandi ma caratterizzati da una struttura molto porosa e quindi instabile, dall'altro valori elevati determinano lo sviluppo di granuli più piccoli ma più compatti, forti e stabili. I risultati sono simili a quelli trovati da Tay et al. (2001a) che dimostrò che i granuli aerobici si possono formare una volta superato il valore limite di 1,2  $\text{cm sec}^{-1}$ , e che granuli più compatti, rotondi e di forma regolare si formano al crescere degli sforzi di taglio. Queste osservazioni mostrano che la formazione dei granuli è principalmente determinata dagli sforzi di taglio idrodinamici presenti nel reattore. Valori degli sforzi di 2,4  $\text{cm sec}^{-1}$  e 3,2  $\text{cm sec}^{-1}$ , permettono di ottenere granuli più stabili e in grado di mantenere più a lungo una struttura compatta.

#### 1.5.4 La pressione di selezione idraulica

Negli impianti SBR le acque reflue vengono trattate in cicli successivi ognuno della durata di diverse ore. Alla fine di ogni ciclo, la biomassa viene fatta sedimentare all'interno del medesimo reattore, prima che l'effluente venga scaricato.

Il tempo di sedimentazione gioca un ruolo fondamentale nella formazione dei granuli aerobici, proprio perché determina la selezione tra biomassa che ha migliori caratteristiche di sedimentabilità e che, quindi, viene mantenuta nel reattore, e quella che deve essere dilavata con l'effluente. Bassi tempi di sedimentazione consentono di trattenere nel reattore solo la biomassa che mostra velocità di sedimentazione più elevata, mentre il fango che sedimenta più lentamente viene dilavato. **Qin et al., (2004)** condussero una sperimentazione con lo scopo di analizzare gli effetti di diverse pressioni di selezione idraulica sul processo di granulazione. In dettaglio, gli autori operarono utilizzando 4 reattori (R1-R4) con tempi di sedimentazione rispettivamente di 20, 15, 10 e 5 minuti. Come alimento fu utilizzato refluo sintetico a base di acetato per tutti e quattro i reattori. Appena dopo una settimana, nel reattore che operava con un tempo di sedimentazione di 5 minuti, si erano già formati i primi granuli, mentre negli altri apparvero dopo circa 10 giorni. Nella Figura 1.12 possiamo vedere come la frazione dei granuli con dimensione superiore a 0,35 mm, dopo tre settimane dall'avvio dell'attività sperimentale, fosse nettamente maggiore nel reattore operante con un tempo di sedimentazione di 5 minuti, e che va diminuendo man mano che aumenta il tempo di sedimentazione. Il tempo di sedimentazione quindi è un fattore fondamentale nel processo di formazione dei granuli.



**Figura 1.12:** Andamento della frazione dei granuli, dello SVI e dell'idrofobicità cellulare in funzione del tempo di sedimentazione (**Qin et al., 2004**).

Durante la sperimentazione furono eseguite misure sullo SVI e sull'idrofobicità cellulare. Si osservò, per quanto riguarda lo SVI, che nel reattore operante con un tempo di sedimentazione di 5 minuti, il valore del parametro SVI era più basso rispetto agli altri e che quindi il fango aveva migliori caratteristiche di sedimentabilità, mentre nel reattore operante con il tempo di sedimentazione più alto, lo SVI<sub>5</sub> era piuttosto elevato (circa 150 mL gSST<sup>-1</sup>). Per cui fu dedotto che all'aumentare del tempo di sedimentazione il parametro SVI<sub>5</sub> tende ad aumentare, come era logico aspettarsi.

Analizzando l'idrofobicità cellulare invece, si notò che questa aumentò al diminuire del tempo di sedimentazione: infatti, nel reattore operante con un tempo

di sedimentazione di 5 minuti, l'idrofobicità cellulare è risultata maggiore rispetto a quella che si aveva nel reattore operante con 20 minuti (figura 1.12).

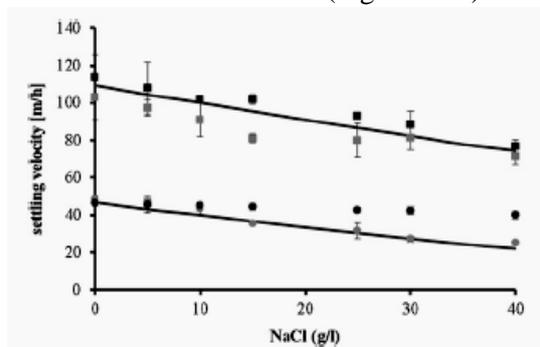
Dopo il sessantesimo giorno di sperimentazione, i tempi di sedimentazione sono stati ridotti nei reattori R1, R2, R3 da 20, 15 e 10 minuti a 5, 2 e 1 minuto. La conseguenza di questa variazione è stato il progressivo dilavamento della biomassa meno densa e dopo due settimane nei reattori era presente solo fango granulare. Confrontando i valori di  $SVI_5$  e dell'idrofobicità cellulare prima e dopo la variazione dei tempi di sedimentazione, si è notata una riduzione dello  $SVI_5$  e un aumento dell'idrofobicità.

Quanto detto dimostra come la pressione di selezione idraulica, espressa in questo caso in termini di tempi di sedimentazione, è un parametro decisivo per la formazione di granuli aerobici. Pressioni di selezione molto deboli non favoriscono la granulazione aerobica, e pressioni di selezione relativamente alte sono essenziali per lo sviluppo dei granuli. In accordo coi risultati ottenuti da **Qin et al., (2004)**, affinché il processo di formazione dei granuli abbia successo, il tempo di sedimentazione non deve essere maggiore di 5 minuti, anche se ciò è da contestualizzare alla geometria del reattore. In particolare, poiché le dimensioni dei reattori possono essere differenti, per generalizzare il concetto della selezione idraulica sarebbe più opportuno parlare di pressione di selezione idraulica facendo riferimento non tanto al tempo di sedimentazione quanto alla velocità delle particelle che si intendono trattenere nel reattore. Infine, è stato dimostrato come la comunità microbica risponda alla pressione di selezione idraulica attraverso la regolazione del proprio metabolismo, che porta all'aumento della idrofobicità cellulare. E' probabile dunque che la granulazione aerobica sia una strategia protettiva della comunità microbica contro le pressioni selettive esterne.

L'effetto della pressione di selezione idraulica sui cambiamenti della comunità microbica è stato approfondito da **Adav et al. (2009a)**. Gli autori hanno utilizzato tre reattori R1-R3, operanti in parallelo con diversi tempi di sedimentazione, rispettivamente di 10, 7 e 5 minuti per 75 giorni. Nel reattore che operava con la pressione di selezione idraulica maggiore (R3) i granuli si sono formati più rapidamente, ed erano caratterizzati da dimensioni medie maggiori e  $SVI$  inferiori rispetto agli altri. Gli autori osservarono inoltre che la comunità microbica era maggiormente simile al fango di inoculo nel reattore dove la pressione di selezione idraulica era più bassa (R1), mentre in R3 la comunità microbica si era sensibilmente modificata. Nel complesso, la comunità microbica risultava meno complessa nel reattore R3, dove a causa del massiccio wash-out che ha caratterizzato i primi giorni di esercizio dell'impianto, la maggior parte dei ceppi batterici non flocculanti (*Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*) furono dilavati, favorendo lo sviluppo dei soli ceppi fiocco-formatori e incentivando il processo di granulazione. I ceppi batterici che invece si svilupparono nei granuli erano prevalentemente la *Zooglea resiniphila sp.*, il ceppo *Chryseobacterium gleum* e i batteri *Rhodocyclales*. Tali ceppi funzionali riuscivano a proliferare all'interno del

reattore, in quanto veniva meno lo sviluppo competitivo nei confronti degli altri ceppi batterici che erano stati dilavati con l'effluente. In tali condizioni questi batteri sono stimolati a produrre una maggiore quantità di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) che favorirono la formazione dei granuli aerobici.

La velocità di sedimentazione dei granuli può non essere legata esclusivamente alle loro caratteristiche morfologico-strutturali. In taluni casi infatti, ad avere un ruolo significativo nella velocità di sedimentazione sono sia la temperatura che la densità del bulk. In particolare, taluni reflui industriali, quali quelli derivanti dalle industrie che operano nel settore alimentare quali quello della conservazione del pesce, o della lavorazione delle olive, ovvero quelli derivanti dal lavaggio delle cisterne delle navi carburante (slops), sono caratterizzati da salinità molto elevate, nell'ordine delle decine di grammi per litro. Tale circostanza determina un sensibile incremento della densità del mezzo in cui si muovono i granuli aerobici, che è tale da ridurre la velocità di sedimentazione dei granuli e quindi influenzare in maniera significativa la pressione di selezione idraulica. **Winkler et al. (2012)** hanno valutato gli effetti della temperatura e della salinità sulla velocità di sedimentazione del fango granulare. Gli autori osservarono che il fango granulare non acclimatato alla salinità tendeva inizialmente a flottare, fin quando il sale iniziava a penetrare all'interno dei granuli appesantendoli. Tale risultato suggerisce dunque che l'inoculo di un reattore destinato al trattamento di reflui salini non può essere effettuato direttamente con fango granulare non acclimatato. Risulta necessario dunque, in maniera preventiva, consentire che i granuli vengano penetrati dal sale in modo che la loro struttura ne risulti appesantita, evitando in tal modo che essi flottino. Tali tempi risultano nel complesso modesti, e si aggirano nell'ordine di qualche minuto per granuli di piccolo diametro, mentre sono necessari all'incirca 30 minuti per granuli di dimensioni maggiori. Gli autori osservarono che la velocità di sedimentazione dei granuli diminuiva, come è logico attendersi, al crescere della salinità del refluo (Figura 1.13).



**Figura 1.13:** Velocità di sedimentazione dei granuli in funzione della salinità del refluo (**Winkler et al., 2012**).

Tale aspetto deve essere tenuto in considerazione in sede di progetto, in modo da scegliere opportunamente i tempi di sedimentazione e di conseguenza la pressione di selezione idraulica da applicare al sistema.

Di recente alcuni autori (Zhou et al., 2014) hanno fornito un differente punto di vista sulla questione del ruolo della pressione di selezione idraulica sulla formazione dei granuli. Nello specifico, la pressione di selezione può essere identificata come selezione fisica e microbiologica, in cui la prima porta alla ritenzione idraulica della biomassa con peso maggiore, mentre la seconda determina la selezione di ceppi batterici funzionali, stimolandone la loro produzione di EPS (Adav et al., 2009a). La pressione di selezione biologica favorisce lo sviluppo di ceppi batterici con elevata idrofobicità cellulare, che diventano dominanti in poco tempo (Gao et al., 2011), e portano alla formazione dei granuli stante la loro elevata affinità all'aggregazione. Rispetto alla pressione di selezione fisica, quella di selezione biologica è influenzata da diversi altri fattori, come l'alternanza di condizioni di *feast* e *famine*, gli sforzi idrodinamici e i lunghi periodi di starvation (Liu et al., 2005). Per questi motivi, i reattori SBR, in cui tali fattori sono facilmente controllabili, sono ritenuti essere gli unici in cui si può ottenere la granulazione del fango attivo. Valutare il solo ruolo della pressione di selezione in un impianto SBR non è facile, stante l'influenza dei suddetti fattori sul fenomeno della granulazione. Pochi studi sono riportati in letteratura circa il processo di granulazione in assenza di fattori che determinano la selezione microbica. Zhou et al. (2014) hanno studiato il processo di granulazione in un impianto a flusso continuo, quindi senza alternanza di fasi *feast* e *famine* e in assenza di selezione idraulica della biomassa, al fine di valutare la dinamica della granulazione e l'evoluzione della comunità microbiologica.

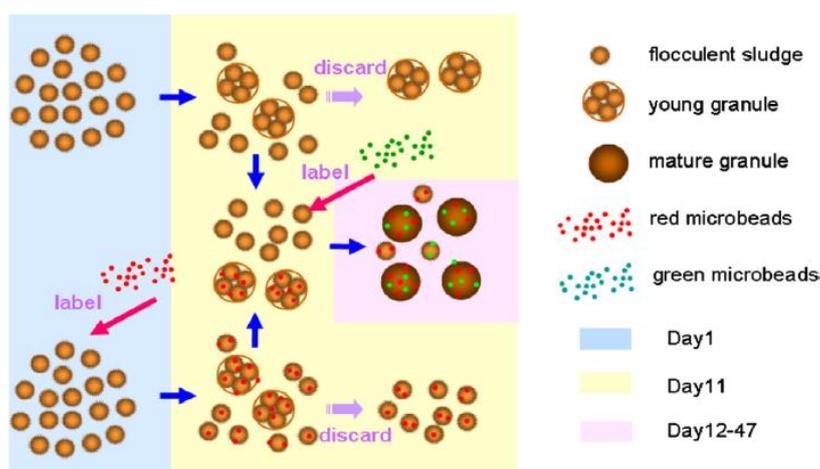


Figura 1.14: Modello concettuale relativo alla formazione dei granuli aerobici in assenza di pressione di selezione idraulica (Zhou et al., 2014).

L'impianto in questione era configurato in modo da creare elevatissimi sforzi idrodinamici, che di fatto rimanevano l'unico fattore chiave per la granulazione. Gli autori riportano che in tali condizioni operative granuli stabili furono ottenuti in circa 11 giorni. In particolare, gli autori evidenziarono dapprima l'auto-aggregazione dei fiocchi di fango, successivamente la loro progressiva unione a formare piccoli granuli e infine il loro sviluppo in granuli maturi (Figura 1.14). In questo processo, i granuli non risultano perfettamente stabili dal punto di vista strutturale, e in parte si sfaldano a causa degli urti con altri bio-aggregati. Il prodotto di tali processi in parte si riaggrega nuovamente a formare altri granuli e in parte viene dilavato con l'effluente.

Secondo gli autori dunque la granulazione è un processo che deriva dal bilanciamento dei fenomeni di tipo fisico, che coinvolgono l'aggregazione e lo sfaldamento dei fiocchi di fango attivo. Specifiche analisi microbiologiche hanno permesso di evidenziare che la popolazione microbica non si è significativamente modificata rispetto al fango di inoculo, il che secondo gli autori indica che la selezione microbica non è un prerequisito essenziale per la granulazione. La granulazione viene dunque ritenuta essere un processo dinamico di aggregazione, sfaldamento e riaggregazione della biomassa. La biomassa che non riesce ad aggregarsi in granuli non è dunque il risultato di una selezione idraulica o biologica, bensì il prodotto di un processo fisico dinamico in continua evoluzione.

Il tema della selezione idraulica appare essere ancora piuttosto dibattuto nella letteratura scientifica di settore. Sebbene la maggiorparte degli studi abbia evidenziato che questa venga imposta nel sistema perché si ottenga la granulazione, altre evidenze sperimentali hanno mostrato che la granulazione si può ottenere anche senza tale imposizione.

### 1.5.5 Tempo di residenza cellulare (SRT)

L'età del fango (Sludge Retention Time – SRT) è uno dei più importanti parametri di progetto e operativi, nel processo a fanghi attivi. E' ben noto che questo parametro può avere un effetto molto significativo sulla bioflocculazione del fango attivo. Perché si formino i primi fiocchi di fango con buone capacità di sedimentazione, spesso sono necessari 2 giorni (Ng, 2002), mentre il valore ottimale per avere una buona bioflocculazione e buoni trattamenti depurativi è necessario operare con un valore di SRT compreso tra i 2 e gli 8 giorni (Rittman, 1987). Valori dell'età del fango inferiori a 2 giorni favoriscono la crescita di batteri dispersi, il che determina un aumento dello SVI e della concentrazione di COD nell'effluente.

Nei sistemi a fanghi granulari senza un controllo intenzionale su questo parametro, è stato osservato che questo può variare all'interno di un range molto ampio che va da 1 a 30 giorni (Pan, 2003). Come già evidenziato nel precedente paragrafo 1.5.4,

la formazione dei granuli aerobici dipende fortemente dalla pressione di selezione idraulica espressa in termini di velocità di sedimentazione delle bioparticelle. In questi sistemi la pressione di selezione idraulica rappresenta quel parametro che consente di mantenere nel reattore le particelle che hanno migliori caratteristiche di sedimentabilità, e il dilavamento delle altre con l'effluente. Di conseguenza, a meno che determinati volumi di miscela aerata non vengano appositamente allontanati, tale parametro rappresenta l'unico fattore in grado di regolare l'età del fango del sistema. Appare per tanto utile discernere gli effetti dell'uno e dell'altro parametro sul processo di formazione dei granuli.

A tal fine **Li et al. (2008d)** effettuarono uno studio per verificare il ruolo dell'età del fango nella granulazione aerobica, nella condizione in cui gli effetti della pressione di selezione idraulica fossero trascurabili. A tal proposito è stato imposto che la pressione di selezione idraulica, espressa in termini di velocità di sedimentazione, fosse di  $0,76 \text{ m h}^{-1}$ . Questo valore rappresenta il rapporto tra il livello idrico nel reattore sopra lo scarico e il tempo del ciclo destinato alla sedimentazione. Tale parametro è stato mantenuto basso imponendo tempi di sedimentazione elevati. Per la sperimentazione sono stati utilizzati 5 reattori R1, R2, R3, R4, e R5 inoculati con fango attivo provenienti da un impianto di trattamento per le acque reflue. I reattori sono stati avviati con 5 diversi valori dell'età del fango, rispettivamente di 3, 6, 9, 12 e 40 giorni, per i reattori R1, R2, R3, R4, e R5. Per tutti i reattori sono state mantenute le stesse condizioni operative; un ciclo di 4 ore era così suddiviso: 5 minuti per l'alimentazione, 30 come già anticipato per la sedimentazione, 5 per lo scarico e il tempo restante per l'aerazione. Due minuti prima che la fase di aerazione terminasse, dalla miscela aerata veniva prelevato un volume noto, in modo da ottenere e mantenere il valore dell'età del fango desiderato.

Il volume da prelevare veniva calcolato tramite la seguente formula:

$$V_s = \frac{V}{6SRT} - \frac{V_e X_e}{X} \quad (\text{eq. 1.1})$$

in cui  $V$  rappresenta il volume del reattore, 6 il numero di cicli di reazione giornalieri, SRT il valore dell'età del fango desiderato,  $X_e$  la concentrazione di solidi nel surnatante e  $V_e$  il volume dell'effluente.

L'alimento era costituito da refluo sintetico il cui substrato organico era a base di acetato. Dopo il terzo giorno dall'avvio qualche aggregato microbico cominciò a comparire nel reattore R1, mentre negli altri dopo 4 e 5 giorni si cominciarono a vedere piccolissimi aggregati microbici. La Figura 1.15 mostra l'evoluzione della dimensione media dei granuli nei reattori R1-R5 operanti con differenti valori di tempi di ritenzione idraulica. La dimensione media dei fiocchi del fango di inoculo era di circa  $75 \mu\text{m}$ . Nei primi 3 giorni è stato osservato un significativo incremento delle dimensioni degli aggregati microbici; dal quarto giorno in poi la dimensione

media dei granuli si è gradualmente stabilizzata. Solo pochi granuli con la superficie ben arrotondata si sono formati dopo 30 giorni di attività, mentre una relativamente grande quantità di minuscoli aggregati risultavano dominanti nel fango. La distribuzione delle dimensioni fu determinata al trentesimo giorno. Stando alla distribuzione della dimensione media degli aggregati, la frazione dei granuli, definiti come aggregati microbici con una dimensione media maggiore di 350  $\mu\text{m}$  e con una superficie sferica (Qin et al., 2004), risultò inferiore al 20% in tutti i reattori, indicando che i fiocchi erano dominanti nella biomassa, e che quindi il processo di granulazione non si era completato.

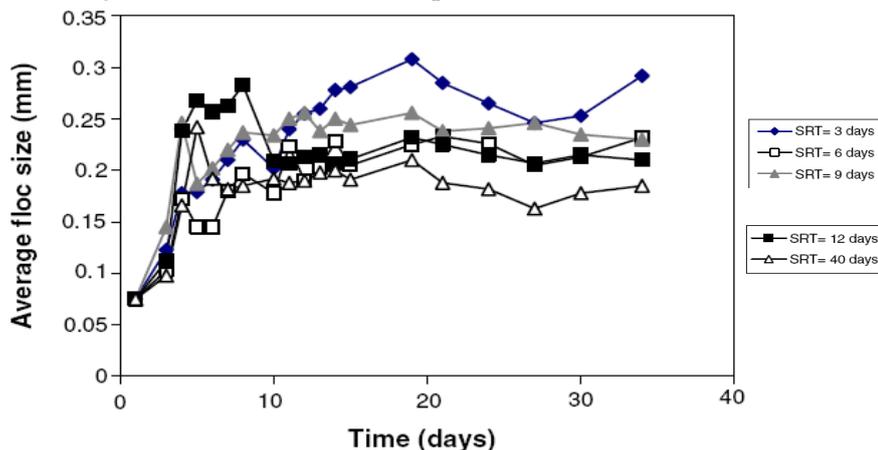


Figura 1.15: Variazioni nelle dimensioni medie dei granuli a differenti valori dell'età del fango (Li et al., 2008d).

In Figura 1.16 è mostrato l'andamento del parametro  $\text{SVI}_{30}$  in funzione dell'età del fango.

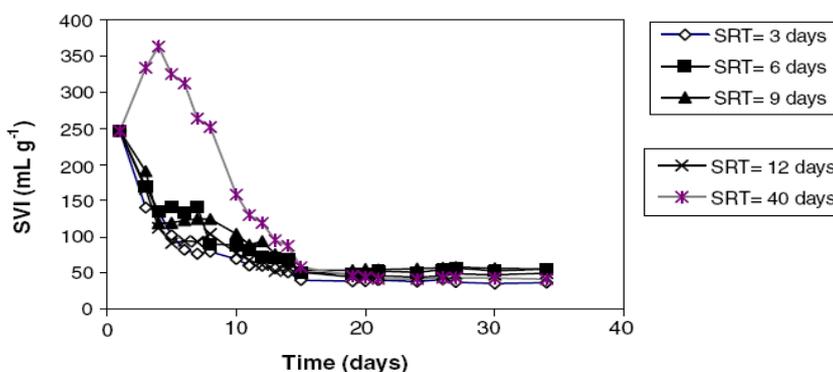


Figura 1.16: Variazioni del parametro SVI a differenti valori dell'età del fango (Li et al., 2008d).

Come si osserva dalla figura, lo SVI in tutti i reattori tendeva a decrescere rapidamente nei primi 10 giorni, e gradualmente si stabilizzava su un valore prossimo a  $50 \text{ mL g}^{-1}$ . Nel reattore operante con un valore dell'età del fango di 40 giorni decresce più lentamente a partire dal quinto giorno (Figura 1.16).

I risultati ottenuti hanno mostrato inoltre che l'età del fango non ha effetti significativi sull'idrofobicità cellulare, visto che l'aumento rispetto all'idrofobicità del fango di inoculo (22%) risultò solo di qualche punto percentuale (25-40%). Il basso valore dell'idrofobicità cellulare spiega in parte il fallimento del processo di granulazione. Tuttavia il reale motivo che ha portato alla mancata formazione dei granuli è stato la bassa pressione di selezione idraulica, in quanto bassi valori di questo parametro hanno fatto sì che le particelle più piccole e dotate di scarse caratteristiche di sedimentabilità fossero mantenute nel reattore. La regolazione "manuale" dell'età del fango non consente infatti di fare tale selezione.

In conclusione, questa sperimentazione ha dimostrato che l'età del fango non rappresenta un fattore decisivo nel processo di granulazione.

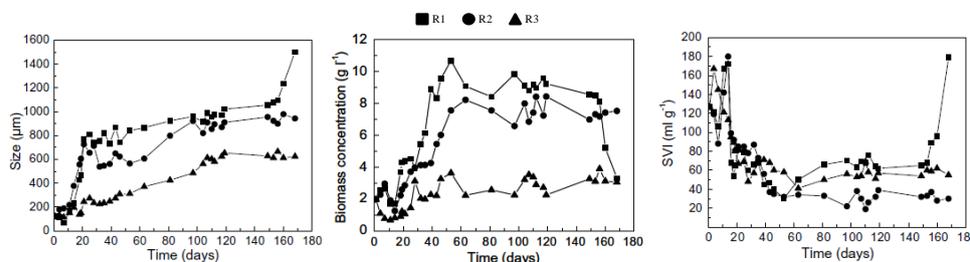
### 1.5.6 L'alternanza delle condizioni di *feast* e *famine*

Nei reattori SBR le operazioni si susseguono ciclicamente. Come già detto precedentemente esse sono: alimentazione, aerazione (o reazione), sedimentazione e scarico dell'effluente. Come risultato i microrganismi sono soggetti a periodiche fluttuazioni delle condizioni ambientali e, in particolare, delle cinetiche metaboliche. Il periodo di reazione consiste di due fasi: la prima in cui il substrato viene esaurito rapidamente (*feast*), seguita da una fase di inedia aerobica (*famine*) nella quale il substrato è disponibile in concentrazioni minori perché è già stato consumato precedentemente (Tay et al., 2001a). Il tempo richiesto per la degradazione del substrato tende a ridursi con l'aumentare del numero dei cicli operativi. In condizioni di inedia l'idrofobicità dei batteri aumenta, il che facilita l'adesione microbica (Tay et al., 2001a).

Se il substrato alimentato all'inizio del ciclo viene biodegradato rapidamente, si promuove lo sviluppo di batteri capaci di accumulare il substrato organico, a scapito dei batteri filamentosi che non possiedono tali capacità. Durante il periodo di *famine*, infatti, soltanto i batteri che hanno accumulato prodotti di stoccaggio intracellulari riescono a sopravvivere e, col tempo, risulteranno predominanti rispetto ai batteri filamentosi. La strategia di alimentazione in discontinuo, dunque, promuove il processo di granulazione. Val del Rio et al. (2012) riportano che man mano che il processo di granulazione aumenta, la durata della fase di *feast* si va progressivamente riducendo, a causa del crescente sviluppo di microrganismi substrato-accumulanti.

Si ritiene probabile che l'aggregazione sia una strategia delle cellule contro l'inedia, e che i batteri siano in grado di cambiare le loro caratteristiche superficiali quando affrontano l'inedia (Tay et al., 2001a). Bossier e Verstraete (1996)

riportano che anche sotto condizioni di inedia i batteri diventano più idrofobici e ciò facilita l'adesione e l'aggregazione. Si ritiene altresì, che i periodici cambiamenti delle condizioni ambientali contribuiscono a migliorare la capacità dei microrganismi ad aggregarsi. **Liu e Tay (2007)** hanno studiato gli effetti del tempo di inedia sulla stabilità dei granuli aerobici, utilizzando tre reattori SBRs (R1, R2, R3), operanti rispettivamente con cicli dalla durata di 1,5 4 e 8 ore, a cui corrispondevano tempi di inedia di 0,8, 3,3, e 7,3 ore. I risultati mostrarono che i granuli si formarono con successo in tutti e tre i reattori, ma i tempi erano differenti. Infatti nel reattore che operava con un tempo di inedia più elevato (R3) furono necessari 63 cicli perché i granuli fossero dominanti nel reattore, mentre nel reattore che operava con un tempo di inedia più basso (R1) ne occorsero ben 256. Tuttavia i primi granuli cominciarono a svilupparsi dopo 16 giorni nel reattore R1 e dopo 21 nel reattore R3, e ciò indica che cicli di più breve durata con bassi tempi di inedia accelerino la formazione dei granuli; ciò probabilmente è dovuto alla maggiore pressione di selezione idraulica dovuta ai brevi tempi dei cicli. I granuli sviluppatasi nel reattore R1 erano instabili: infatti la loro struttura era "fluff", e le scarse caratteristiche di sedimentabilità determinarono il loro disfacimento e il dilavamento con l'effluente.



**Figura 1.17:** Andamento delle dimensioni medie dei granuli (a), del parametro SVI (b), e della concentrazione di biomassa (c) nei tre reattori (Liu e Tay, 2007).

I granuli del reattore R2, cioè quello operante con un tempo di inedia di 3,3 ore, erano più densi ed avevano migliori caratteristiche di sedimentabilità. I granuli dei reattori R2 ed R3 presentavano buone caratteristiche di stabilità e di sedimentabilità, come dimostrano i valori di SVI. Le dimensioni dei granuli nei tre reattori risultarono differenti: granuli di maggiori dimensioni si svilupparono nel reattore R1 (a scapito della stabilità), mentre in R2 ed R3 le dimensioni risultarono decisamente inferiori, a vantaggio delle migliori caratteristiche strutturali. La concentrazione di biomassa raggiunse valori elevati nei reattori R1 ( $10 \text{ gSST L}^{-1}$ ) ed R2 ( $8 \text{ gSST L}^{-1}$ ), mentre nel reattore R3 si mantenne bassa ( $3 \text{ gSST L}^{-1}$ ) (Figura 1.17). Gli autori conclusero che il tempo di inedia non era decisivo per la

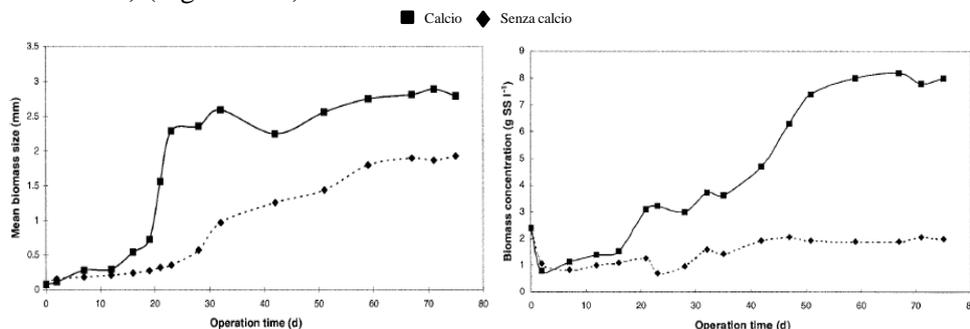
formazione dei granuli aerobici, come dimostrava il fatto che si erano formati in reattori operanti con tempi di inedia differenti; inoltre, i risultati mostravano che i granuli si sviluppavano più velocemente con un tempo di inedia minore; tuttavia tempi di inedia troppo brevi non favoriscono la stabilità dei granuli a lungo termine.

### 1.5.7 Effetto dei cationi polivalenti sulla granulazione

Come visto nel paragrafo 1.5.2 la formazione dei granuli risulta essere direttamente influenzata dal valore del carico organico. Valori bassi di questo parametro di processo rallentano la formazione dei granuli, per cui la fase di start-up per impianti a basso carico, come gli impianti per il trattamento di reflui civili, richiederebbe tempi molto lunghi.

**Jiang et al. (2003)** hanno condotto uno studio per valutare come l'aggiunta di ioni calcio acceleri il processo di granulazione aerobica e ne migliori la resistenza e la compattezza. Si è ipotizzato che gli ioni calcio si leghino alle particelle caricate negativamente presenti sulle superfici dei batteri e alle molecole di polisaccaridi extracellulari agendo così come un ponte per promuovere l'aggregazione batterica. Per la sperimentazione sono stati utilizzati due reattori R1 ed R2, che operavano con le stesse condizioni, ma il primo senza l'aggiunta di calcio, mentre al secondo venivano aggiunti  $100 \text{ mg Ca}^{2+} \text{ L}^{-1}$ .

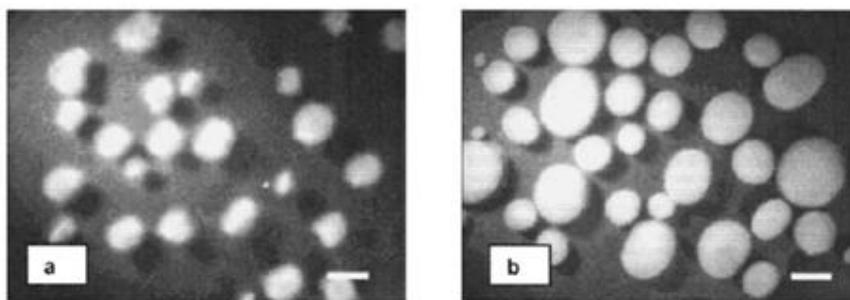
Nel reattore R1 operante senza l'aggiunta di ioni calcio, il processo di granulazione è stato lento e la formazione dei granuli aerobici ha richiesto 32 giorni; nel reattore R2 il processo di formazione dei granuli è stato notevolmente accelerato, e i primi granuli ben compatti sono apparsi dopo 16 giorni. La concentrazione di biomassa è risultata significativamente maggiore nel reattore R2 ( $8 \text{ g L}^{-1}$  contro i  $2 \text{ g L}^{-1}$  del reattore R1) (Figura 1.18).



**Figura 1.18:** Profilo di variazione delle dimensioni medie dei granuli e della concentrazione di biomassa con o senza l'aggiunta di ioni calcio.

(Jiang et al. 2003)

L'aggiunta di ioni calcio miglioravano la sedimentabilità dei granuli, come dimostrano i valori di SVI ( $171 \text{ mL gSST}^{-1}$  in R1 contro  $73 \text{ mL gSST}^{-1}$  in R2), causava l'aumento della produzione di polisaccaridi extracellulari ( $41 \text{ mg gSSV}^{-1}$  in R1 contro  $97 \text{ mg gSSV}^{-1}$  in R2), i quali come si discuterà nel seguito, giocano un ruolo molto importante nel mantenimento dell'integrità strutturale dei granuli, data la loro capacità di formare una matrice polimerica indeformabile di tipo gelatinoso; ne migliora la struttura, aumentandone le dimensioni e la densità ( $1,5 \text{ mm}$  in R1 contro  $2,5\text{-}3 \text{ mm}$  in R2, e  $1,0038 \text{ Kg L}^{-1}$  in R1 contro  $1,0068 \text{ Kg L}^{-1}$  in R2) (Figura 1.19).



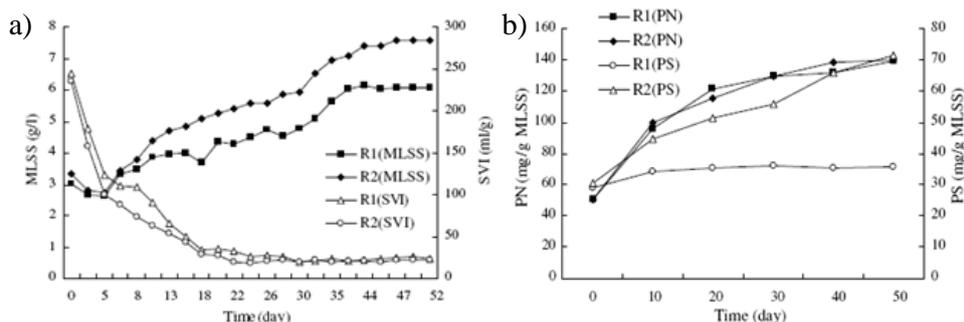
**Figura 1.19:** Foto dei granuli nei reattori R1(a), ed R2(b). (Jiang et al. 2003)

In conclusione, l'aggiunta di ioni calcio riduce significativamente il tempo richiesto per la formazione dei granuli, e il concomitante incremento della produzione di polisaccaridi extracellulari contribuisce alla formazione di granuli più densi e compatti, e con migliori caratteristiche di sedimentabilità. Queste considerazioni possono essere applicate soprattutto nella fase di avviamento dell'impianto, sia per accelerare il processo di formazione dei granuli, che per migliorarne la stabilità.

L'effetto di accelerare il processo di formazione dei granuli aerobici e di migliorarne la stabilità può essere ottenuto anche tramite l'aggiunta di ioni  $\text{Mg}^{2+}$ , analogamente a quanto visto nel precedente paragrafo, in cui si valutava l'effetto dell'aggiunta di ioni calcio. Li et al. (2008b), hanno condotto una sperimentazione per valutare come l'aggiunta di ioni  $\text{Mg}^{2+}$ , migliori il fenomeno della granulazione e le caratteristiche strutturali dei granuli stessi. A tal fine sono stati utilizzati due reattori SBR identici (R1 ed R2), operanti sotto le medesime condizioni. Come fonte di ioni di magnesio veniva utilizzato il solfato di magnesio idrato; nel reattore R1 non veniva aggiunto il solfato, mentre nel reattore R2 ne venivano aggiunti  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . I primi granuli comparvero nel reattore R2 dopo 4 giorni, diventando sempre più grandi e densi; nel reattore R1 invece, i primi granuli si formarono dopo 17 giorni.

I granuli divennero maturi dopo 18 giorni in R2, e la loro struttura era compatta, con la superficie ben arrotondata. Nel reattore R1 il processo di granulazione fu

simile, ma più lento, e i granuli risultarono maturi solo a partire dal 32° giorno. Analisi microscopiche mostrarono una morfologia e una composizione sostanzialmente simile dei granuli sviluppatasi nei due reattori; quindi l'aggiunta di ioni  $Mg^{2+}$  non implicava la diversità della morfologia dei granuli. Le misure di sedimentabilità mostrarono come il parametro SVI diminuisse più lentamente nel reattore in cui veniva aggiunto il magnesio, ma questa differenza risulta poco sensibile, e in generale i granuli avevano ottime caratteristiche di sedimentabilità ( $SVI=20-25 \text{ mL gSST}^{-1}$ ). La concentrazione di biomassa risultò invece superiore nel reattore R2 (figura 1.20a). Contestualmente le misure sulle sostanze polisaccaridi extracellulari mostrarono come l'aggiunta di magnesio stimoli la loro produzione (figura 1.20b).



**Figura 1.20:** Andamento della concentrazione di biomassa e del parametro SVI nei due reattori (a); variazione della produzione di proteine (PN), e polisaccaridi (PS) durante il processo di granulazione (b). (Li et al., 2008b)

In conclusione, l'aggiunta di ioni magnesio si traduce in un beneficio per la granulazione. L'aggiunta di  $10 \text{ mg L}^{-1}$  di ioni magnesio riduce significativamente il tempo di formazione di granuli stabili da 32 a 18 giorni, e allo stesso tempo la dimensione media dei granuli risulta maggiore (2,9 mm contro 1,9 mm). Inoltre, i granuli risultarono più densi e compatti, mostravano migliori caratteristiche di sedimentabilità e una maggiore produzione di sostanze polisaccaridi extracellulari.

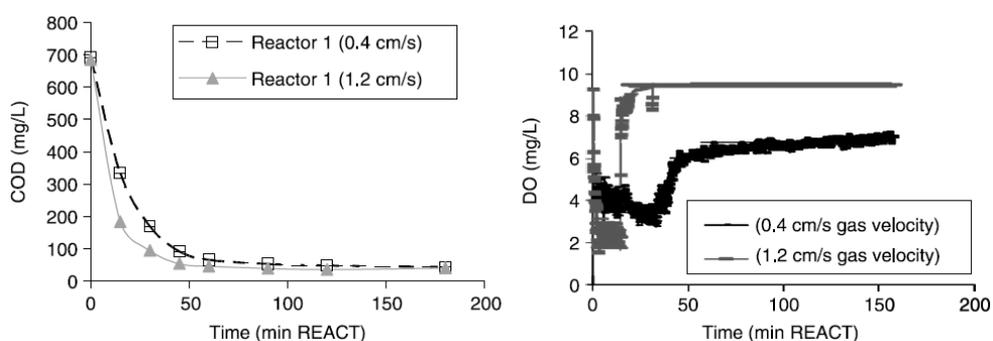
### 1.5.8 La concentrazione di ossigeno disciolto

La concentrazione di ossigeno disciolto rappresenta una variabile molto importante che influenza i processi aerobici di trattamento delle acque reflue. Molti studi sulla tecnologia del fango granulare hanno dimostrato che per la formazione dei granuli è necessario che gli sforzi di taglio idrodinamici, espressi in termini di velocità del flusso ascensionale d'aria, debbano risultare superiori a  $1,2 \text{ cm sec}^{-1}$  (Tay et al., 2001a); riducendo tali sforzi, il processo di granulazione o non si completa, ovvero

se i granuli sono già formati, questi si sfaldano. In questi studi la riduzione degli sforzi di taglio è ottenuta riducendo la portata d'aria alimentata, con dirette conseguenze sulla concentrazione di ossigeno disciolto nella miscela aerata. Tuttavia la concentrazione di ossigeno non viene quasi mai riportata nelle esperienze rilevate in letteratura, ed è pertanto utile discernere gli effetti della riduzione degli sforzi di taglio idrodinamici dalla riduzione della concentrazione di ossigeno disciolto che ne consegue.

**McSwaine e Irvine, (2008)** hanno condotto uno studio per analizzare nel dettaglio questo aspetto. Lo studio è stato articolato in due periodi differenti: nel primo è stato utilizzato un reattore SBR nel quale veniva progressivamente ridotto il flusso d'aria e contestualmente l'ossigeno; nel secondo sono stati utilizzati due reattori nei quali gli sforzi di taglio venivano mantenuti costanti, ma in uno veniva alimentata una miscela di aria e azoto che manteneva bassa la concentrazione di ossigeno disciolto, mentre nell'altro veniva alimentata soltanto aria.

Nel primo periodo della sperimentazione il flusso d'aria è stato progressivamente ridotto, una volta che i granuli si erano formati, da  $1,2 \text{ cm sec}^{-1}$  fino a  $0,4 \text{ cm sec}^{-1}$ ; i granuli si sono formati durante le prime settimane, ma la riduzione del flusso d'aria ne ha progressivamente determinato lo sfaldamento, confermando quanto dimostrato da altri autori (**Tay et al., 2001a**). In questo periodo non è stato possibile discernere gli effetti degli sforzi di taglio e dell'ossigeno sui granuli, perché i due parametri risultavano strettamente connessi. Gli effetti della riduzione del flusso d'aria è stato ben visibile nei test cinetici di rimozione del COD eseguiti durante un ciclo, e nelle durate del tempo di "feast" e "famine" (o inedia). Per elevati valori del flusso d'aria ( $1,2 \text{ cm sec}^{-1}$ ), la durata del periodo di "feast" era piuttosto breve ( $t_{feast} = 45 \text{ min}$ ), mentre quello di "famine" risultava più lungo ( $t_{famine} = 135 \text{ min}$ ). Per valori del flusso d'aria inferiori ( $0,4 \text{ cm sec}^{-1}$ ) la durata della del periodo di "feast" si estese per quasi tutta la durata del ciclo, riducendo il periodo di "famine".



**Figura 1.21:** Andamento del COD e dell'O.D. durante un ciclo di reazione. (McSwaine e Irvine, 2008).

Come si può vedere in Figura 1.21, per elevati valori del flusso d'aria la concentrazione di ossigeno nei primi minuti del ciclo risultava molto bassa ( $< 2 \text{ mg L}^{-1}$ ), mentre poi aumentava fino alla concentrazione di saturazione nel periodo di "famine"; in queste condizioni la durata del periodo di "feast" era breve e il COD veniva consumato in breve tempo. La riduzione del flusso d'aria e la conseguente riduzione dell'ossigeno ha determinato un aumento del periodo di "feast", durante il quale la concentrazione di ossigeno si è mantenuta bassa ( $< 5 \text{ mg L}^{-1}$ ), e la conseguente riduzione del periodo di "famine" durante il quale l'ossigeno non superava i  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ; in queste condizioni la velocità di rimozione del COD si riduceva sensibilmente.

Nel secondo periodo della sperimentazione, per valutare gli effetti della riduzione degli sforzi di taglio da quelli della riduzione dell'ossigeno disciolto, sono stati utilizzati due reattori nei quali gli sforzi di taglio erano della stessa intensità ( $1,2 \text{ cm sec}^{-1}$ ), ma, mentre in uno veniva alimentata aria come nel primo periodo della sperimentazione, nell'altro una miscela di aria e azoto per mantenere bassa la concentrazione di ossigeno. Nel reattore alimentato solo con aria i granuli si formarono nelle prime settimane, mentre in quello mantenuto in condizioni di basso ossigeno, non si formarono granuli, ma soltanto aggregati con scarse caratteristiche strutturali, nei quali erano dominanti batteri filamentosi. Nel reattore con bassa concentrazione di ossigeno, i rendimenti di rimozione del COD risultarono tuttavia elevati, non osservando al contempo l'aumento della concentrazione di solidi sospesi nella miscela aerata. È stata osservata infatti la crescita di biomassa adesa sulle pareti dei reattori, la quale non veniva tenuta in considerazione nel calcolo della concentrazione dei solidi sospesi. La biomassa quindi in condizioni di basso ossigeno disciolto tendeva a svilupparsi sotto forma di biomassa adesa, mentre nella miscela aerata erano predominanti agglomerati filamentosi poco stabili. La riduzione del periodo di "famine" inoltre ha limitato fortemente l'alternanza di condizioni anossiche/aerobiche, le quali determinavano la selezione di batteri a crescita lenta che miglioravano la stabilità dei granuli.

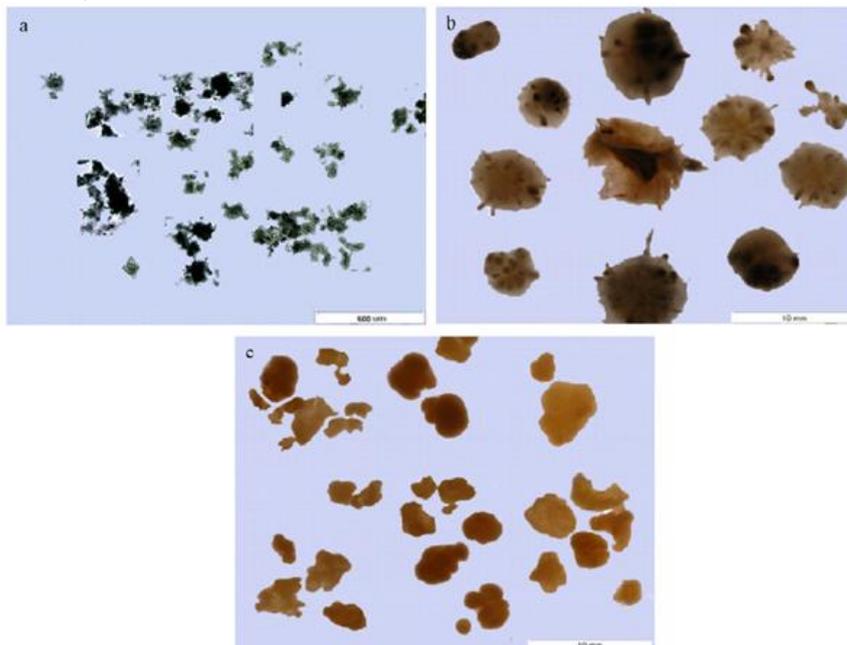
In conclusione, McSwain e Irvine hanno confermato che per valori degli sforzi di taglio inferiori a  $1,2 \text{ cm sec}^{-1}$  i granuli non sono stabili e tendono facilmente a disintegrarsi. In più hanno dimostrato che la concomitante riduzione del flusso d'aria influenza tanto la concentrazione di ossigeno disciolto, quanto la cinetica di rimozione del substrato organico. In particolare, è proprio la concentrazione di ossigeno a risultare il reale fattore chiave nel processo di formazione e mantenimento dei granuli, in quanto, come visto nel secondo esperimento, pur essendo gli sforzi di taglio di pari intensità, la scarsa concentrazione di ossigeno in un reattore ha determinato il fallimento del processo di granulazione, mentre nell'altro il processo di formazione dei granuli è andato a buon fine.

### 1.5.9 Il pH e la temperatura

Per quel che riguarda la temperatura, la maggiorparte delle ricerche sulla granulazione sono state condotte a temperatura ambiente, non fornendo quindi utili informazioni di come il parametro influenzi lo sviluppo e la crescita dei granuli. Tra le poche in cui questo aspetto è stato analizzato si riporta quella di **DeKreuk et al. (2005)** che hanno condotto una sperimentazione con due reattori: il primo (R1) operante alla temperatura di 8 °C, e il secondo (R2) inizialmente a 20 °C, che è stata ridotta a 8 °C dopo la fase di avviamento. Nel reattore R1 dopo 3 giorni dall'avvio della sperimentazione erano visibili i primi granuli, di forma ancora irregolare. Dopo 25 giorni la biomassa presente nel reattore era in prevalenza costituita da granuli dalla forma regolare e rotondeggiante. Nel reattore R2 invece, i granuli ben formati comparvero dopo circa 12 giorni, quindi il tempo necessario per la completa formazione dei granuli risulta dimezzato. In entrambi i reattori, la morfologia e la dimensione dei granuli risultano simili, mentre rispetto al reattore R1 nell'altro i granuli si presentavano più compatti e più densi. Analisi microscopiche hanno consentito di constatare la presenza di batteri filamentosi nel fango proveniente dal reattore R1, mentre questi erano del tutto assenti nell'altro. Si è concluso quindi che le basse temperature nel reattore R1 hanno consentito lo sviluppo di batteri filamentosi che hanno causato la formazione di granuli irregolari ed il dilavamento della biomassa. Nel reattore R2 l'avviamento a temperature maggiori ha consentito la formazione di granuli compatti e resistenti, che si sono mantenuti anche quando le temperature sono state ridotte. Contestualmente all'analisi dei granuli sono stati valutati i rendimenti di rimozione del COD, dell'azoto e del fosforo. Nel reattore R1 si sono ottenuti rendimenti del 90% sul COD, del 10% sul fosforo e valori bassissimi per la rimozione dell'azoto. L'assenza della fase di nitrificazione secondo gli autori è dovuta alla particolare struttura dei granuli; questi infatti sono formati da tre strati: quello più esterno formato da batteri eterotrofi obbligati, quello intermedio da batteri autotrofi e infine il nucleo anossico/anaerobico in cui sono presenti microrganismi denitrificanti. Le temperature basse riducono sia l'attività dei batteri eterotrofi presenti nello strato esterno, che di quelli denitrificanti presenti nel nucleo, con la conseguente riduzione dell'efficienza di rimozione dell'azoto. In conclusione l'attivazione di un sistema a biomasse granulari è conveniente nei periodi estivi, visto che l'abbassamento della temperatura nella seguente stagione invernale non produce instabilità nei granuli che ormai sono ben formati.

Recentemente è stato studiato l'effetto che differenti valori di pH hanno sulla struttura e sulle proprietà idrodinamiche dei granuli (**Xiao et al., 2008**). I granuli sono stati coltivati in due reattori SBRs alimentati con refluo sintetico a base di glucosio. Il primo reattore (R1) aveva un basso valore di pH, dovuto alla bassa alcalinità dell'influyente (28,7 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>), mentre il secondo aveva un valore di pH più elevato, dovuto alla maggiore alcalinità dell'influyente (301 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>).

Nel primo reattore, analisi microscopiche hanno permesso di osservare che i funghi erano predominanti nei granuli, mentre nel secondo erano dominanti i batteri (Figura 1.22).



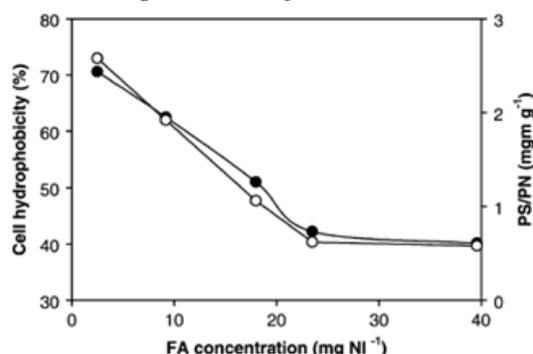
**Figura 1.22:** Immagini rappresentative del fango di inoculo (a), dei granuli del reattore R1 senza l'aggiunta di alcalinità e di R2 con l'aggiunta di bicarbonato di sodio. (Xiao et al., 2008)

I granuli del reattore R1 erano più grandi ma meno resistenti, con una struttura poco solida, mentre i granuli del reattore R2 erano più piccoli ma più resistenti e la loro struttura appariva più compatta. Le caratteristiche di sedimentabilità dei granuli del reattore R2 si dimostrarono leggermente superiori rispetto agli altri, infatti la velocità di sedimentazione variava tra i  $0,42\text{-}3,21\text{ cm sec}^{-1}$  mentre per altri variava tra  $0,38\text{-}2,67\text{ cm sec}^{-1}$ .

Anche il contenuto di EPS era diverso; infatti i granuli di R1 avevano un contenuto di EPS pari a  $198,8\text{ mgTOC gSSV}^{-1}$ , maggiore rispetto a quello dei granuli di R2 pari a  $142,6\text{ mgTOC gSSV}^{-1}$ . Entrambi i valori risultarono maggiori rispetto a quelli di un fango attivo convenzionale. È probabile che il maggior contenuto di EPS ocludesse i pori e limitasse la porosità dei granuli. Questi risultati mostrano come il contenuto di alcalinità dell'influente determini delle modificazioni sostanziali nella struttura dei granuli aerobici, e di conseguenza nella loro stabilità e nei rendimenti depurativi.

### 1.5.10 L'ammoniaca libera

**Yang et al. (2003)** hanno studiato l'effetto inibitorio dell'ammoniaca libera ( $\text{NH}_3$ ) sulla granulazione aerobica in un reattore SBR, alimentato con acetato come sola fonte di carbonio. I granuli aerobici si sono formati solo quando la concentrazione di ammoniaca era minore di  $23,5 \text{ mg L}^{-1}$  e la nitrificazione era del tutto cessata già per concentrazioni di ammoniaca libera maggiori di  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . La velocità di respirazione della biomassa (definita dal coefficiente SOUR) eterotrofa e nitrificante si è ridotta di 2,5 e 5 volte rispettivamente, quando la concentrazione di ammoniaca libera è aumentata da 2,5 a  $39,6 \text{ mg L}^{-1}$ . L'elevata concentrazione di ammoniaca libera ha provocato una significativa diminuzione dell'idrofobicità cellulare e ha anche ridotto la produzione di polisaccaridi extracellulari (Figura 1.23). I cambiamenti dell'idrofobicità e della produzione di polisaccaridi sono stati responsabili del fallimento del processo di granulazione.



**Figura 1.23:** Effetti dell'ammoniaca libera su l'idrofobicità cellulare (●) e sul rapporto PS/PN(o) (Yang et al., 2003).

### 1.5.11 Alternanza di condizioni non aerate e aerate

Come già discusso nei paragrafi 1.5.4 e 1.5.9, si è detto che per la formazione del fango granulare è necessario applicare un elevato tasso di aerazione espresso in termini di sforzi di taglio idrodinamici. **Tay et al. (2001a)** osservarono che i granuli si formano solo se gli sforzi di taglio idrodinamici, espressi in termini di velocità del flusso ascendente d'aria, fossero stati superiori a  $1,2 \text{ cm sec}^{-1}$ . Inoltre **McSwaine e Irvine, (2008)**, osservarono che i granuli si disintegravano in fiocchi quando gli sforzi di taglio risultavano inferiori di  $1 \text{ cm sec}^{-1}$ . Il tasso di aerazione gioca due ruoli molto importanti nei reattori granulari, sia perché impone le condizioni idrodinamiche, che perché regola il trasferimento di ossigeno alla miscela aerata. L'ossigeno disciolto d'altra parte, risulta anch'esso essere un fattore di fondamentale importanza nel processo di granulazione; sempre **McSwaine e**

**Irvine, (2008)**, osservarono che, per concentrazioni di ossigeno inferiori a  $5 \text{ mgL}^{-1}$ , i granuli non si formarono, mentre per concentrazioni più elevate ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ), il processo giunse a completamento. Tuttavia, gli elevati tassi di aerazione richiesti per la formazione dei granuli, naturalmente comportano elevati consumi energetici e di conseguenza elevati costi di gestione. Altri autori (**Wan e Sperandio, 2009**), dimostrarono che la respirazione cellulare in condizioni di alternanza di accettori di elettroni (nitrati e ossigeno), favorisce la crescita all'interno dei granuli. Come conseguenza di ciò, granuli stabili possono essere ottenuti a basse concentrazioni di ossigeno, se un'efficiente processo di nitrificazione produce nitrati a sufficienza che possono essere utilizzati come accettori di elettroni negli strati più interni dei granuli. In questo senso, il processo di granulazione può beneficiare della nitrificazione e denitrificazione simultanea, che si realizza in maniera molto comune nei granuli aerobici.

**Wan e Sperandio, (2009)**, studiarono l'influenza di un periodo anossico all'inizio del ciclo sulla formazione dei granuli aerobici. Per la sperimentazione sono stati utilizzati due reattori SBAR uno dei quali mantenuto in condizioni aerobiche durante tutto il ciclo di reazione (R2), e l'altro nel quale venivano imposte condizioni anossiche durante una prima fase, insufflando azoto al posto dell'aria, in modo che gli sforzi di taglio risultassero gli stessi. Il periodo convenzionalmente denominato "*feast*", nel quale il substrato viene rapidamente consumato, è in condizioni anossiche o aerobiche a seconda della disponibilità e dal consumo di ossigeno. Il periodo susseguente, denominato "*famine*", è apparentemente in condizioni aerobiche e può essere suddiviso in due periodi: il primo nel quale si verifica un'elevata attività biologica dovuta alla nitrificazione e alla denitrificazione simultanea, utilizzando come substrato organico i prodotti di stoccaggio intracellulari, e un secondo nel quale l'attività biologica subisce una riduzione dovuta alla respirazione endogena, nel quale avviene una parziale riduzione nei nitrati ad azoto molecolare. Durante la sperimentazione fu aumentato il carico organico in entrambi i reattori, determinando notevoli differenze nei rispettivi granuli. Nel reattore R1 i granuli si svilupparono bene e mostravano ottime caratteristiche strutturali, oltre che elevate performance depurative sia in termini di rimozione della sostanza organica che dell'azoto, anche quando il carico è aumentato. Tutto ciò può essere spiegato dal fatto che la crescita in condizioni anossiche dei batteri eterotrofi riduce la competizione tra loro e i batteri autotrofi, i quali riescono a svilupparsi ed accrescersi anche per elevati valori del rapporto carbonio azoto. La respirazione in condizioni anossiche infatti spinge i batteri eterotrofi a crescere più lentamente e a collocarsi negli strati prossimi alla superficie. La cinetica della nitrificazione infatti subisce un rapido incremento nel momento in cui il substrato organico viene rimosso nella fase anossica (periodo di "*feast*"). In R2 i granuli formati in un primo periodo si disintegrarono in fiocchi all'aumento del carico, e l'efficienza di nitrificazione e denitrificazione si ridusse sensibilmente fino ad annullarsi del tutto. La grande disponibilità di ossigeno infatti

ha favorito la competizione tra i batteri autotrofi nitrificanti e gli eterotrofi, che ha determinato la supremazia dei secondi sui primi, soprattutto delle specie che hanno un elevato tasso di crescita cellulare (filamentosi), e la conseguente perdita di stabilità dei granuli. Si può concludere osservando che l'alternanza tra le condizioni anossiche (*feast*) e aerobiche (*inedia*), fa sì che l'ossidazione della sostanza organica avvenga principalmente utilizzando i nitrati come accettori di elettroni, per via della maggiore elettronegatività rispetto l'ossigeno, e ciò determina uno sviluppo più equilibrato delle specie batteriche con conseguenze positive sia sulla stabilità dei granuli, sia sulle efficienze depurative.

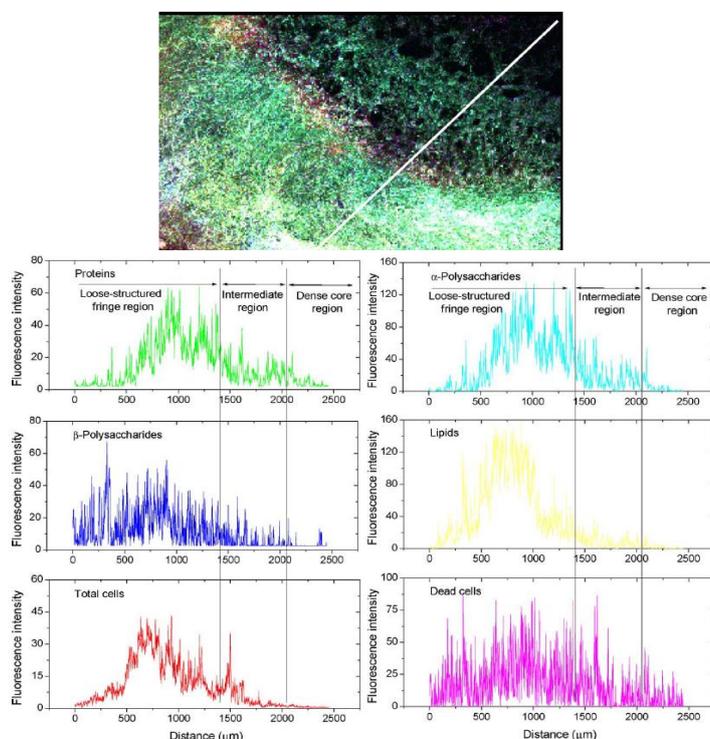
**De Kreuk e Van Loosdrecht (2004)** dimostrarono che la chiave per ottenere granuli strutturalmente stabili e in grado di rimuovere in maniera simultanea i nutrienti con elevate rese, è quella di prevedere una fase di alimentazione in condizioni non aerate, e precisamente in condizioni anaerobiche. Il sistema di alimentazione era tale che il letto di granuli fosse attraversato dal basso verso l'alto, secondo una modalità a "flusso a pistone". Secondo gli autori, tale accorgimento favoriva lo sviluppo di batteri in grado di utilizzare gran parte del COD rapidamente biodegradabile per formare prodotti di stoccaggio intracellulare. Tale caratteristica, prerogativa dei batteri fosforo-accumulanti (PAO) e glicogeno accumulanti (GAO), favoriva la selezione biologica dei suddetti ceppi batterici, che risultavano per tanto avere un vantaggio competitivo nei confronti di altre popolazioni microbiche. La selezione di questi microrganismi, caratterizzati dal basso tasso di crescita cellulare, è secondo gli autori il principale meccanismo che determina non solo la formazione dei granuli, ma che ne garantisce la stabilità nel lungo periodo.

### 1.5.12 Il ruolo delle EPS nella formazione del fango granulare

La formazione dei granuli può incrementare la concentrazione di solidi sospesi nel reattore, migliorare le caratteristiche di sedimentabilità e migliorare la simbiosi degli agglomerati microbici. Essendo un processo complesso, il fenomeno della granulazione è influenzato da molti fattori fisico-chimici e microbiologici, tra cui le sostanze polimeriche extracellulari (EPS). Le EPS sono prodotti del metabolismo microbico che si accumulano sulla superficie delle cellule, e che contengono una grande varietà di sostanze organiche come i polisaccaridi cellulari (PS), le proteine cellulari (PN), lipidi, DNA, acido umico e altre. Questi formano uno strato protettivo per le cellule contro gli agenti ambientali esterni, e serve da riserva di carbonio e di energia durante l'inedia. La produzione e il contenuto di EPS è strettamente correlato con la composizione e le proprietà degli aggregati microbici, e, inoltre, con l'ecosistema microbico che si sviluppa nei reattori biologici (**Wang et al., 2010**). Dal punto di vista fisico-chimico le EPS possono alterare le caratteristiche della superficie delle cellule, come la carica elettrostatica, l'idrofobicità e altre proprietà. Poiché le caratteristiche della superficie delle cellule

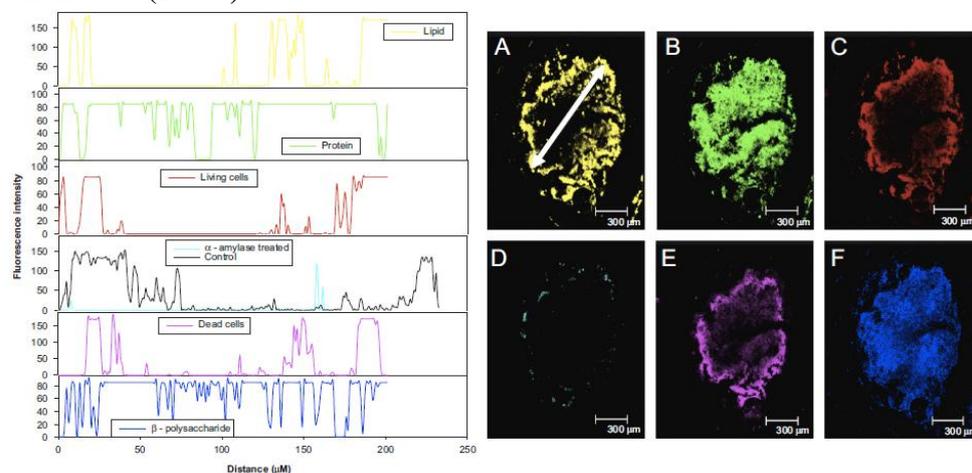
batteriche sono importanti in termini di flocculazione, adesione e granulazione, diversi ricercatori riportano che le EPS giocano un ruolo fondamentale nella flocculazione e nella granulazione del fango attivo (Liu e Tay, 2004).

Yu et al (2009), tramite l'utilizzo di coloranti fluorescenti, sono riusciti a realizzare una mappatura delle varie componenti delle EPS in granuli maturi di circa 4-5 mm di diametro. Gli autori distinguono in particolare tre zone: quella più interna, comunemente chiamata "nucleo", una intermedia, e infine una regione di "confine" che risulta quella strutturalmente più debole in quanto soggetta a deterioramento meccanico. La zona più interna dei granuli, che va da 2 a 2,5 mm dalla superficie, risulta costituita in modo preponderante da cellule morte e in misura minima da proteine; la regione intermedia (1,4-2 mm) risulta costituita prevalentemente da proteine nella fascia prossima al nucleo, mentre la frazione di polisaccaridi cresce man mano che ci si avvicina alla superficie. Nella regione esterna sono presenti sia proteine che polisaccaridi; anche in questo caso, nella fascia più interna le proteine risultano più abbondanti, mentre in quella esterna lo sono i polisaccaridi,  $\beta$  e  $\alpha$ , questi ultimi in misura maggiore (Figura 1.24).



**Figura 1.24:** Immagine dei granuli al 25° giorno; risposta in fluorescenza delle proteine,  $\alpha$ -polisaccaridi,  $\beta$ -polisaccaridi, lipidi, cellule totali e cellule morte in funzione della profondità nel granulo (Yu et al., 2009).

Risultati analoghi sono stati ottenuti da **Adav et al. (2008)**, i quali osservarono una maggiore concentrazione di proteine e cellule morte nel nucleo dei granuli, mentre gli  $\alpha$ -polisaccaridi erano localizzati nello strato più esterno insieme ai lipidi e a gli acidi umici (Figura 1.25); i  $\beta$ -polisaccaridi invece erano maggiormente distribuiti nel nucleo e negli strati esterni dei granuli. Tale schema venne osservato anche da **Chen et al. (2007a)**.

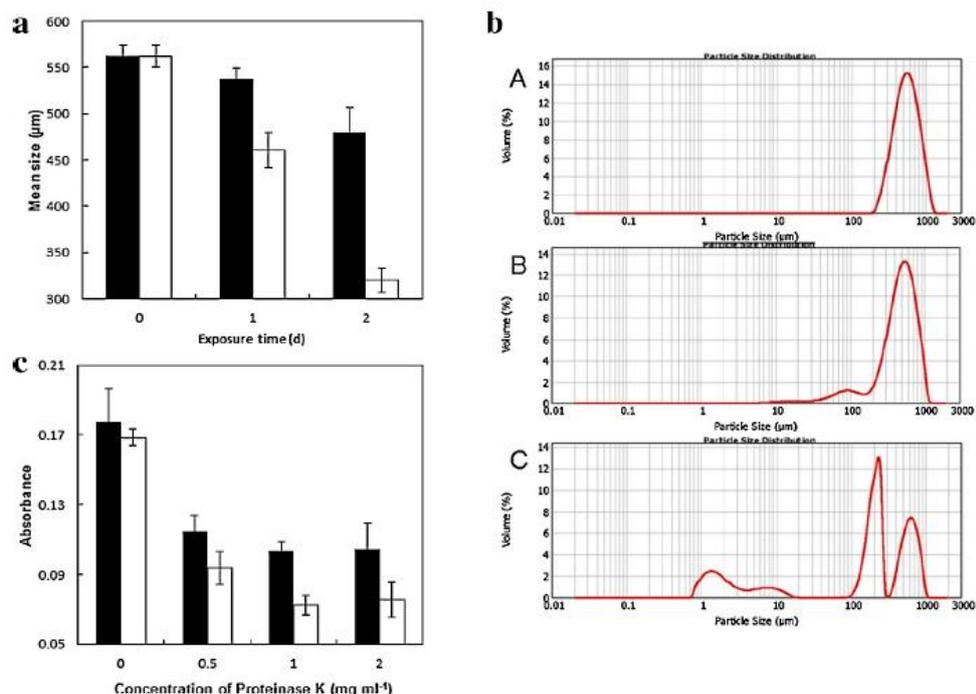


**Figura 1.25:** Immagini al CLSM dei granuli: lipidi (A), proteine (B), acidi nucleici (C),  $\alpha$ -polisaccaridi (D), cellule morte (E),  $\beta$ -polisaccaridi (F). **Adav et al. (2008)**.

Gli autori inoltre cercarono di studiare l'effetto di ciascun componente sulla stabilità strutturale dei granuli. In particolare, i granuli venivano idrolizzati utilizzando specifici enzimi, e si riusciva in tal modo a rimuovere dai granuli in maniera selettiva una specifica componente delle EPS. Dai risultati ottenuti si osservò che i granuli idrolizzati con l'enzima che rimuoveva i  $\beta$ -polisaccaridi, risultarono strutturalmente instabili, infatti si frammentarono in breve tempo. Invece, i granuli privi di proteine, lipidi e  $\alpha$ -polisaccaridi non mostravano una particolare debolezza strutturale. I risultati ottenuti confermarono quelli riportati da **Wang et al. (2005)**, i quali sostenevano che i  $\beta$ -polisaccaridi sono i componenti più importanti per la stabilità strutturale dei granuli, in quanto formano un denso nucleo che funge da supporto per l'intera struttura del granulo. I  $\beta$ -polisaccaridi probabilmente formano la "spina dorsale" del granulo, in quanto formano una sorta di "rete" che ingloba al suo interno proteine, lipidi e  $\alpha$ -polisaccaridi, la cui elasticità contribuisce a conferire ai granuli la stabilità meccanica necessaria a mantenerli integri.

Tuttavia il ruolo che giocano le proteine e i polisaccaridi nella stabilità strutturale dei granuli non è ancora stato chiarito in maniera univoca. Se da un lato gli autori sopracitati sostengono che siano i polisaccaridi ad avere un ruolo chiave nel mantenimento strutturale dei granuli, altri ritengono che il loro ruolo risulti

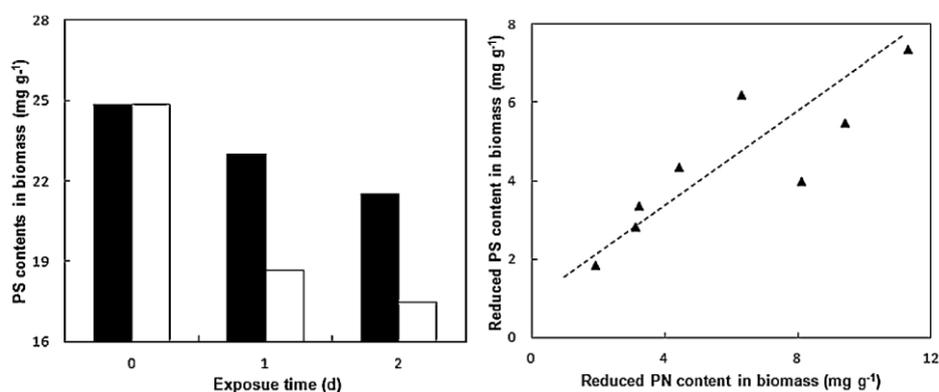
marginale a fronte di quello delle proteine (McSwain et al., 2005). Xiong et al. (2013) hanno cercato di chiarire tale aspetto studiando l'effetto della riduzione del contenuto di proteine sulla struttura dei granuli. A tale scopo i granuli venivano messi in contatto con specifici enzimi in grado di bloccare la secrezione di proteine (*Proteinasi K*), e in seguito ne venivano valutate le caratteristiche strutturali in termini di dimensioni medie della struttura e di sfaldamento, misurando la torbidità dell'effluente (Figura 1.26).



**Figura 1.26:** Variazione delle dimensioni dei granuli dopo differenti tempi di esposizione a 1 mg ml<sup>-1</sup> di *Proteinasi K* (a); distribuzione granulometrica del fango granulare senza esposizione al giorno 0 (A), dopo due giorni senza esposizione (B) e dopo due giorni di esposizione (C) (b); effetto di distacco del biofilm in funzione della concentrazione di *Proteinasi K*. (Xiong et al., 2013).

I risultati ottenuti dagli autori indicavano come l'aumento della concentrazione di *Proteinasi K*, e la conseguente riduzione del contenuto di proteine, determinava un sostanziale sfaldamento dei granuli, per cui dedussero che le proteine giocano davvero un ruolo chiave nel mantenimento dell'integrità strutturale della matrice polimerica.

Inoltre, gli stessi autori hanno osservato che anche i polisaccaridi si idrolizzavano con l'aggiunta della *Proteinasi K*, e che essa era ben correlata alla riduzione del contenuto di proteine (Figura 1.27).



**Figura 1.27:** Effetto del tempo di esposizione alla *Proteinasi K* sulla riduzione del contenuto di polisaccaridi (barra nera reattore di controllo senza *Proteinasi K*, barra bianca 1 mg ml<sup>-1</sup>); relazione tra la riduzione del contenuto di proteine e polisaccaridi. (Xiong et al., 2013).

Gli autori ritengono che la *Proteinasi K*, oltre all'idrolisi delle proteine, determinasse la rottura di catene inter-biopolimeriche di proteine e carboidrati che riducevano la quantità di polisaccaridi nei granuli e causano l'indebolimento della matrice di EPS. Risulta alla luce di ciò più plausibile affermare che proteine e polisaccaridi insieme contribuiscano all'architettura della matrice polimerica di supporto all'intera struttura dei granuli.

Gli effetti delle sostanze polimeriche extracellulari sono stati studiati anche per valutare come il contenuto e la composizione delle EPS stesse influenzino la formazione e le proprietà morfologiche dei granuli. Wang et al., (2005) hanno coltivato granuli aerobici in una serie di reattori SBR. Il carico organico con cui sono stati alimentati i reattori è stato di 0,5 KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup> nella fase iniziale, ed è stato progressivamente aumentato a 0,7 KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup>, poi a 1,4 KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup>, e, infine, a 4 KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup>. Il tempo di ritenzione idraulica è stato ridotto da 36 a 4,5 h. Durante la sperimentazione la temperatura era mantenuta costante intorno ai 20 °C, e durante ogni ciclo veniva effettuato un controllo sul pH, che veniva mantenuto in un range compreso tra 6,8 e 7,2 aggiungendo NaHCO<sub>3</sub>. Inizialmente i granuli apparivano come piccole particelle dense e sferiche dopo 7 giorni. Col procedere della sperimentazione, i granuli divennero più grandi e più densi. Dopo che i granuli erano ormai maturi, la concentrazione dei SS nel reattore fu mantenuta costante intorno a 8 gSST L<sup>-1</sup> e lo SVI si stabilizzò intorno ai 43 mL gSST<sup>-1</sup>, che rifletteva l'elevata concentrazione di

biomassa nel reattore e le buone caratteristiche di sedimentabilità dei granuli. Il diametro medio dei granuli era di circa 1,5 mm e la velocità di sedimentazione era compresa tra i 24,2 m h<sup>-1</sup> e i 36,4 m h<sup>-1</sup>. I rendimenti di rimozione del COD e dell'azoto sono stati rispettivamente del 97% e del 55%. Osservazioni al microscopio mostravano che i granuli avevano una forma regolare, sferica e soffice, e che nella superficie era possibile vedere molte specie differenti di batteri, come cocci, bacilli e in special modo i batteri filamentosi (Figura 1.28).

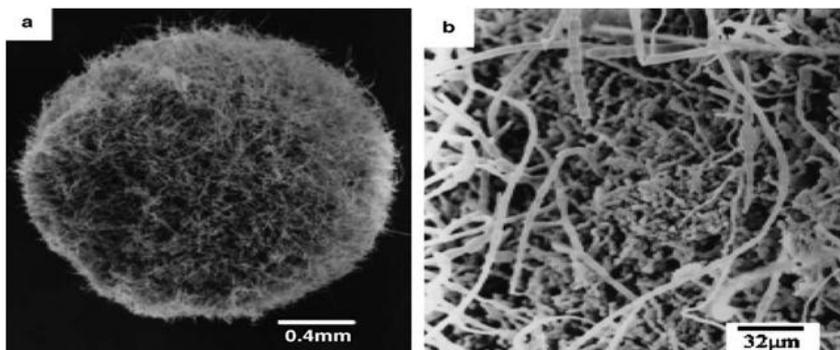


Figura 1.28: Osservazioni sui granuli maturi: (a) granulo intero; (b) superficie del granulo. (Wang et al., 2005)

La Figura 1.29 mostra i cambiamenti dei valori di EPS, solidi sospesi e SVI durante il processo della granulazione. Con l'avanzare del processo la concentrazione di solidi sospesi e il valore di EPS cresce velocemente contestualmente al decremento dello SVI, specialmente dopo la formazione dei granuli (7° giorno). I granuli già maturi (15° giorno), avevano un contenuto di EPS (47 mg gSSV<sup>-1</sup>) maggiore del fango di inoculo (17 mg g<sup>-1</sup>). Questa relazione tra EPS, e solidi sospesi e SVI, può essere considerata come l'evidenza che le EPS facilitino l'accumulo della biomassa, promuovendo la granulazione aerobica.

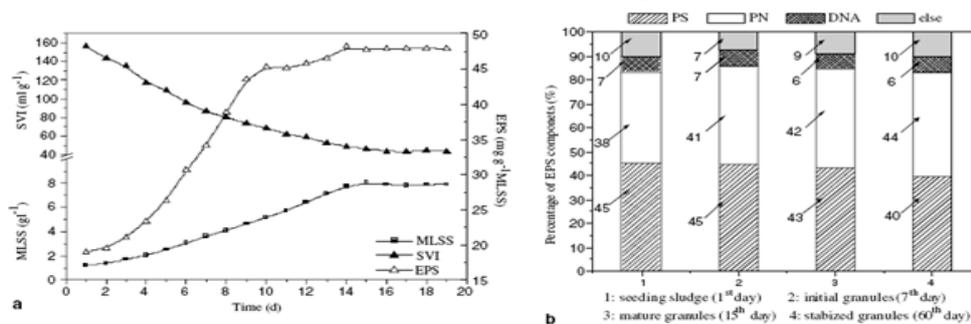
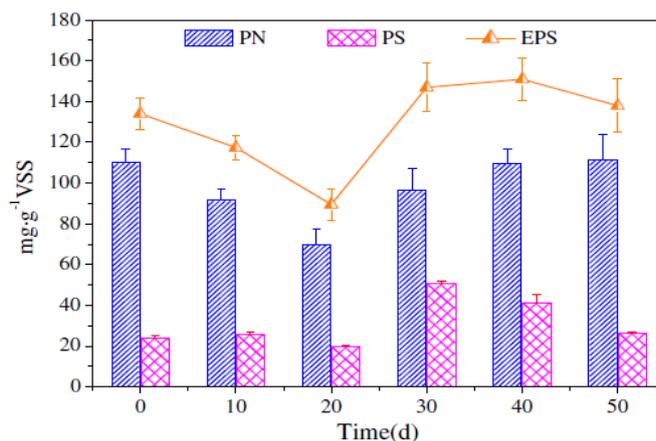


Figura 1.29: Variazioni di MLSS, SVI ed EPS nel processo di granulazione (a); Componenti delle EPS (b). (Wang et al., 2005).

È stato inoltre osservato che la produzione di EPS è variabile all'interno dei vari cicli di reazione. In particolare è stato osservato che la produzione di EPS avviene all'inizio di ogni ciclo, in corrispondenza del periodo di "feast", ossia quando il substrato presente in notevoli quantità viene rapidamente assimilato dai microrganismi e in parte utilizzato per la produzione delle sostanze polimeriche. Durante il periodo di inedia invece, la quantità di EPS tende a diminuire, in quanto i microrganismi tendono ad utilizzarle come substrato organico.

**Zhu et al. (2012)** hanno analizzato l'andamento temporale e le principali componenti delle EPS durante il processo di formazione dei granuli. Mediante l'applicazione di tecniche di spettroscopia a fluorescenza tridimensionale.



**Figura 1.30:** Andamento del contenuto di proteine (PN) e carboidrati (PS) durante la fase di coltivazione dei granuli. (Zhu et al., 2012a).

Gli autori osservarono che durante il processo di granulazione, si possono distinguere tre fasi (Figura 1.30): in una prima, fino al 25° giorno, il contenuto di proteine (PN) diminuì in maniera significativa, mentre quello di carboidrati (PS) rimase pressoché costante; in un secondo momento invece, sia il contenuto di proteine che quello dei carboidrati iniziò ad aumentare in maniera alquanto rapida (20°-30° giorno); infine il contenuto di proteine continuò a crescere in modo pressoché continuo, mentre quello di carboidrati si ridusse in maniera graduale. Gli autori ritengono che le cause di queste oscillazioni siano dovute alle variazioni della composizione microbica del reattore, che soprattutto nella fase di start-up subisce importanti cambiamenti. In particolare, nella prima fase i batteri adattano il loro metabolismo alle nuove condizioni ambientali, in particolare agli elevati sforzi di taglio imposti dall'aerazione, per cui il contenuto di EPS aumenta in maniera significativa. Nella seconda fase, il dilavamento della biomassa con scarse caratteristiche di sedimentabilità viene dilavata, e il reattore si arricchisce di

biomassa con buone caratteristiche di flocculazione, determinando in tal modo l'aumento del contenuto sia di proteine che di carboidrati. Tuttavia, con la progressiva maturazione dei granuli (terza fase), il contenuto di carboidrati si riduce probabilmente a causa del loro consumo da parte dei microrganismi durante la fase di inedia (Wang et al., 2005; Adav et al., 2008). Quando i granuli sono ormai maturi, sia il contenuto di proteine che quello di carboidrati raggiunge un valore pressoché stazionario, e il loro rapporto può essere usato per stabilire le performance degli aggregati microbici.

Gli stessi autori in un altro studio (Zhu et al., 2012b) osservarono invece solo l'aumento del contenuto delle EPS durante la fase di coltivazione; in particolare, l'aumento di proteine è stato nettamente maggiore rispetto a quello dei carboidrati che invece sono aumentati leggermente nei primi 30 giorni e poi si sono mantenuti su valori pressoché stazionari (Figura 1.31). Nel complesso le proteine risultavano la frazione preponderante delle EPS, confermando i risultati ottenuti da altri autori (Su e Yu, 2005). La differenza dei valori osservata nei due reattori è dovuta al tipo di fonte di carbonio utilizzata nel refluo sintetico di alimento. Gli autori osservarono inoltre che la riduzione della produzione di carboidrati coincide con la perdita di stabilità strutturale dei granuli, che cominciarono a ridursi notevolmente di dimensioni, confermando quanto sottolineato da Adav et al. (2009b) in un loro studio. Infatti secondo quanto osservato da questi ultimi, le proteine si localizzano nel nucleo dei granuli, contribuendo dunque a costituire la struttura portante del granulo stesso, mentre i carboidrati si localizzano negli strati più esterni, quindi una loro riduzione indebolisce solo questi strati che risultano per tanto maggiormente suscettibili al deterioramento meccanico dovuto agli urti con le altre particelle e agli sforzi di taglio idrodinamici.

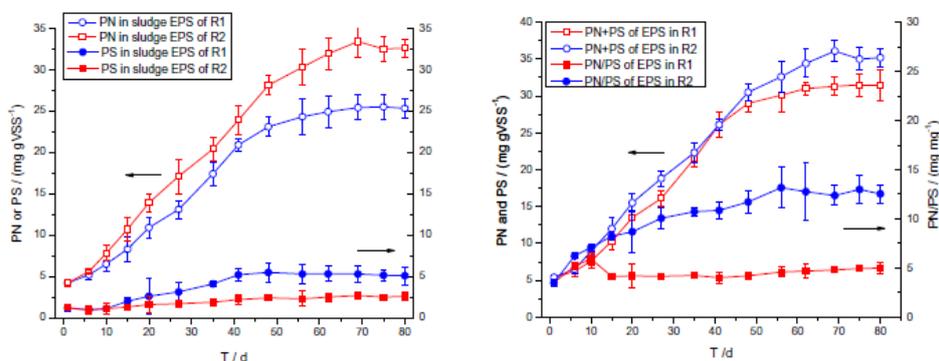
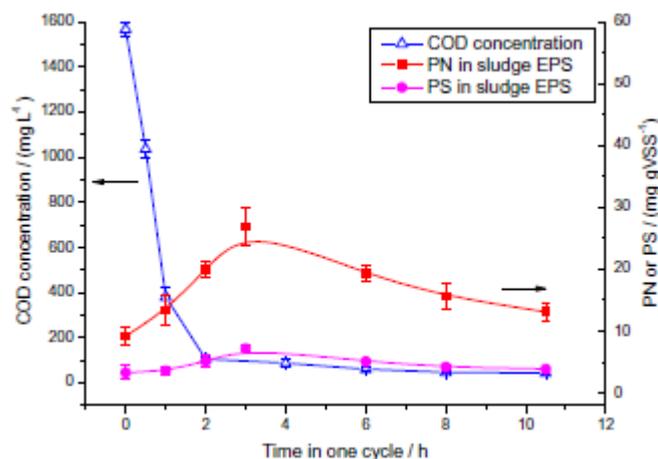


Figura 1.31: Andamento delle EPS, proteiche (PN) e carboidratiche (PS) durante la granulazione (Zhu et al., 2012).

Sempre Zhu et al. (2012b) nello stesso studio, hanno analizzato la variazione delle EPS durante un ciclo di reazione. I risultati ottenuti mostrano come il contenuto di

PN e PS aumenti durante la fase di *feast*, ovvero quando il COD viene quasi del tutto degradato (Figura 1.32). Terminata tale fase, i microrganismi entrano in fase di inedia (*famine*) e circa il 50% e il 47% rispettivamente di PN e PS vengono consumate. Secondo gli autori dunque, i microrganismi, quando il substrato è presente in grandi quantità, creano riserve energetiche all'interno delle loro cellule sottoforma di polimeri, che utilizzeranno come fonte di carbonio e di energia durante la successiva fase di inedia.



**Figura 1.32:** Andamento della concentrazione di COD, delle proteine (PN) e dei carboidrati (PS) durante un ciclo di reazione (Zhu et al., 2012).

Le proteine inoltre aiutano i microrganismi ad accrescere l'idrofobicità cellulare e accresce l'abilità dei granuli a resistere a shock dovuti all'esposizione a sostanze tossiche (Wang et al., 2006). Nel corso della sperimentazione, il rapporto tra proteine e carboidrati aumentò in maniera significativa e si stabilizzò intorno a 5 quando i granuli avevano raggiunto la completa maturazione. Le proteine sono perlopiù costituite da amminoacidi idrofobici, mentre i carboidrati da gruppi funzionali carbossilici idrofili. L'aumento del contenuto di proteine, determina dunque un sensibile cambiamento nelle proprietà superficiali dei granuli, che diventano maggiormente idrofobici, circostanza che favorisce l'adesione cellulare e il mantenimento della stabilità strutturale dei granuli (McSwain et al., 2005, Wang et al., 2006). L'idrofobicità aumentò in conseguenza dell'aumento del contenuto di proteine da circa il 40% del fango di inoculo a poco più del 70% dei granuli maturi. I risultati ottenuti e riportati in Figura 1.33 evidenziano la buona correlazione tra i due parametri.

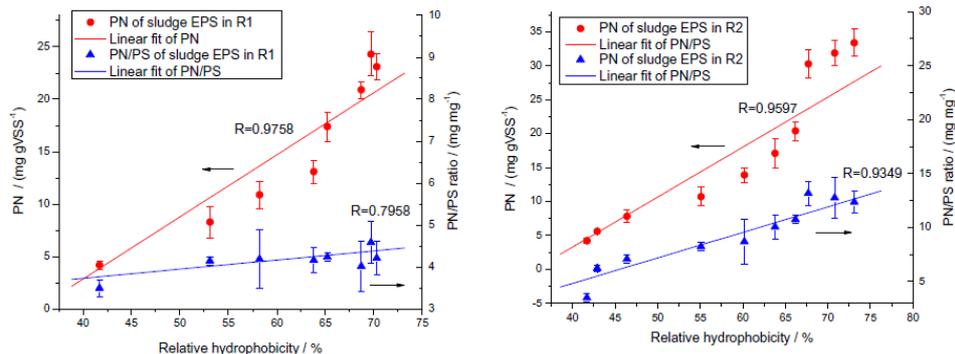


Figura 1.33: Relazione tra l'idrofobicità e il contenuto di EPS (Zhu et al., 2012).

La produzione di EPS e l'idrofobicità del fango sono state altresì correlate ad altri parametri, quali il carico organico volumetrico e gli sforzi di taglio idrodinamici espressi in termini di velocità del flusso ascensionale d'aria. I risultati mostrano che l'incremento di carico da 3 a 6 KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup> determinava un aumento del 50% sia del contenuto di proteine che di carboidrati. Un ulteriore incremento del carico ha determinato ancora un aumento del contenuto di carboidrati, ma allo stesso tempo una sensibile riduzione del contenuto di proteine. Il rapporto PN/PS infatti si ridusse in maniera sensibile superato il carico di 3 KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup>, mentre oltre gli 8 KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup> il contenuto in carboidrati diventa maggiore rispetto alle proteine. Nonostante queste sensibili variazioni, nel complesso il contenuto di EPS si è mantenuto costante, quindi superato un certo valore del carico, a variare è solo la composizione delle EPS stesse (Figura 1.34).

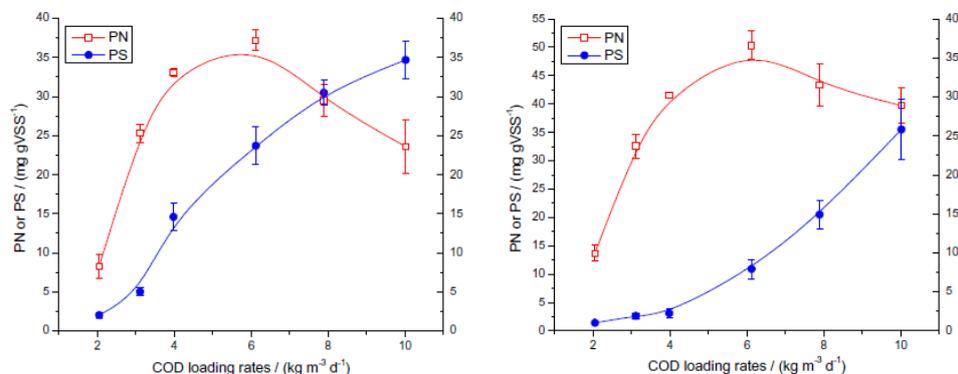
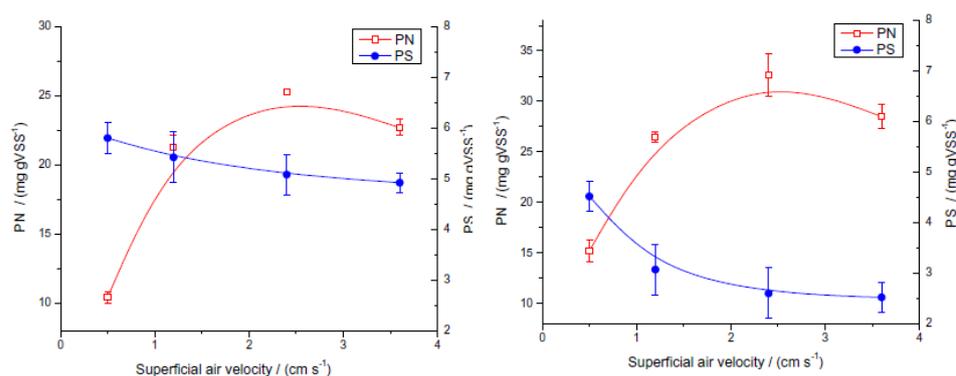


Figura 1.34: Relazione tra il carico organico volumetrico e la produzione di EPS nei due reattori (R1 a sinistra, R2 a destra) (Zhu et al., 2012).

L'incremento di carico a  $4 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$  determinò un sensibile incremento dell'idrofobicità del fango granulare. Superato tale valore di carico tuttavia, si osservò un repentino decremento dell'idrofobicità insieme a quello del contenuto proteico; tale avvenimento è stato strettamente correlato allo sfaldamento dei granuli occorso proprio in occasione dell'aumento del carico.

Le proteine, infatti, sono in prevalenza costituite da anioni i quali tendono a legarsi elettricamente con cationi polivalenti, incidendo sia sull'idrofobicità che sulla resistenza strutturale dei granuli (Liu e Tay, 2002; Laspidou e Rittmann, 2002). In condizioni di substrato in eccesso rispetto al fabbisogno metabolico, i microrganismi non tendono ad ossidarli tempestivamente, ne tanto meno a creare prodotti di stoccaggio intracellulari complessi come le proteine, piuttosto producono sostanze strutturalmente più semplici come i carboidrati. L'aumento del contenuto di carboidrati e la contestuale riduzione delle proteine provoca inoltre una diminuzione dell'idrofobicità dei granuli, con conseguente indebolimento delle forze di adesione cellulare e dello sfaldamento dei granuli stessi.

La variazione del contenuto di EPS al variare del flusso d'aria superficiale è mostrato in Figura 1.25. Come osservano gli autori, l'aumento del flusso ascensionale dell'aria determina una graduale riduzione del contenuto di carboidrati, mentre le proteine raggiungono un massimo in corrispondenza di un flusso pari a  $3 \text{ cm sec}^{-1}$ , valore in corrispondenza del quale anche il rapporto PN/PS risulta massimo. L'idrofobicità, invece, risulta sempre crescente ma, superato tale valore di flusso, la pendenza con cui essa cresce risulta inferiore.



**Figura 1.35:** Relazione tra il flusso d'aria superficiale e la produzione di EPS nei due reattori (R1 a sinistra, R2 a destra) (Zhu et al., 2012).

Per quanto concerne la pressione di selezione idraulica, gli autori hanno osservato che al diminuire di essa, ovvero al crescere del tempo di sedimentazione, sia il contenuto di proteine e carboidrati, che dell'idrofobicità, si riducono progressivamente. È dunque chiaro che lo stress cui i microrganismi sono indotti a causa della pressione di selezione idraulica, e allo stesso modo degli sforzi di taglio

idrodinamici, inducano i microrganismi stessi a produrre una maggiore quantità di EPS e in particolar modo di proteine che, da un lato aumentano l'idrofobicità del fango favorendo in tal modo l'adesione cellulare e, dall'altro, contribuiscono a costituire la base portante sulla quale si sviluppa l'intera struttura del granulo. In merito a tale aspetto **Adav et al. (2009)** affermano che, la rapida formazione dei granuli che si verifica applicando elevate pressioni di selezione idraulica, sia dovuta alla selezione di alcuni ceppi batterici, come la *Rhodocyclales sp.*, che sono in grado di produrre una grande quantità di EPS.

**Wang et al. (2010)** hanno studiato la relazione tra le dimensioni dei granuli e la produzione di EPS, in un impianto pilota MBR, nel quale il fango era in parte fioccoso e in parte granulare ( $d > 0,18$  mm). Sebbene altri studi in letteratura (**Tay et al., 2002**) riportano che il contenuto di EPS nel fango granulare sia 2-3 volte superiore rispetto a quello del fango fioccoso, nello studio di tali autori si è verificata una situazione inversa. Il contenuto di EPS nel fango fioccoso, in fase di granulazione, risultava infatti circa il 50% maggiore rispetto a quello del fango granulare maturo. A tal proposito gli autori sostengono che una volta che i granuli sono maturi e strutturalmente stabili, la loro maggiore densità cellulare e la solida e compatta struttura li rendono più facilmente adattabili alle variazioni di carico organico, concentrazioni di ossigeno, sforzi di taglio idrodinamici, rispetto al fango fioccoso che per adattarsi a condizioni ambientali avverse è "costretto" a produrre una maggiore quantità di EPS. Inoltre gli stessi autori osservarono che il contenuto di EPS, in tutte le loro componenti, si riduceva al crescere delle dimensioni dei granuli. Un risultato simile è stato osservato anche da **Zhang e Bishop (2001)**, i quali osservarono una sensibile riduzione del contenuto di EPS al crescere dello spessore della pellicola biologica. Le possibili spiegazioni a tale risultato possono essere due: la prima è che i microrganismi che si trovano negli strati più interni non ricevono abbastanza nutrienti e rallentano la produzione di EPS; la seconda invece è che tali microrganismi utilizzano le EPS come substrato secondario per sopravvivere, in mancanza di altro substrato che viene utilizzato dai microrganismi negli strati più esterni.

Secondo **Lin et al. (2010)**, la grandissima diversità microbica che caratterizza i granuli aerobici determina la produzione di svariati composti extracellulari i quali contribuiscono in maniera differente alla struttura e alle proprietà fisiche dei granuli aerobici. Alcuni polimeri extracellulari infatti hanno un ruolo primario nel mantenimento strutturale dei granuli, mentre altri no (**Sadovskaya et al., 2005**). Ad esempio, i polisaccaridi con legami 1,3-1,4  $\beta$  conferiscono una straordinaria rigidità al gel, mentre gli 1,2 e 1,6  $\alpha$  formano strutture molto instabili che vengono facilmente dilavate (**Sutherland, 2001**). **Lin et al. (2008)** in un precedente lavoro, avevano misurato sensibili quantità di un eso-polisaccaride simile all'alginato, chiamato per l'appunto ALE, acronimo di alginate-like exopolysaccharides. Nel più recente studio del 2010, gli stessi autori valutarono nel dettaglio il ruolo di questo eso-polimero sulla formazione e stabilità dei granuli aerobici.

Gli autori proposero un nuovo protocollo di estrazione degli esopolimeri. Il protocollo proposto prevedeva la disidratazione della biomassa che veniva successivamente omogeneizzata per 5 minuti e messa poi in bagno a 80°C con 80 mL di una soluzione di carbonato di sodio (0,2 M). Il campione veniva poi centrifugato a 15000 rpm per 20 minuti. Il surnatante veniva acidificato a pH 2 mediante l'aggiunta di HCl (0,2 M). Il precipitato veniva poi raccolto per centrifugazione (15000 rpm per 30 minuti) e lavato con acqua deionizzata affinché il pH si riportasse a 7, e infine disciolto in NaOH (0,1 M). L'ALE è stato infine fatto precipitare aggiungendo etanolo freddo fino all'80% in volume. Il precipitato è stato separato nuovamente per centrifugazione (15000 rpm per 30 minuti), risospeso tre volte con etanolo e infine liofilizzato. Il campione è stato quindi analizzato secondo le metodiche APHA.

La percentuale di ALE nei granuli (su base secca) era di superiore al 10%. Paradossalmente gli autori osservarono che il contenuto di ALE nei granuli era superiore rispetto al contenuto medio dei polimeri totali nei granuli (**Wang et al., 2006; Adav and Lee, 2008**); probabilmente ciò era legato al metodo di estrazione utilizzato per l'analisi dell'alginato, che quindi nelle comuni metodiche per l'analisi delle EPS nei fanghi granulari viene sottostimato a causa della densa struttura dei granuli stessi. In effetti, il fango granulare è un complesso consorzio microbico, in cui vari tipi di esopolisaccaridi possono essere sintetizzati. Alcuni di loro sono neutri, alcuni sono anionici e altri infine sono macromolecole cationiche (**Sutherland, 2001**). Questi esopolisaccaridi non si trovano isolati, ma possono interagire con una vasta gamma di altre specie molecolari, tra cui le proteine, i lipidi, ioni metallici, nonché altri esopolisaccaridi attraverso forze elettrostatiche, legami idrogeno e/o reazioni biochimiche (**Rickard et al., 2000**). Questo determina la formazione di una struttura densa e compatta, col risultato che è quasi impossibile estrarre tutti i esopolisaccaridi con un unico metodo. La quantità di alginato estratta dai granuli era di circa 160 mg gSSV<sup>-1</sup> e, inoltre, è risultato l'esopolimero maggiormente presente nei granuli aerobici. L'alginato ha comportato indubbi benefici sul mantenimento strutturale dei granuli. L'alginato è in grado di formare rapidamente un gel rigido non deformabile, grazie al legame con i cationi polivalenti. L'alginato è l'unico degli esopolimeri che riesce a formare strutture gelatinose indipendentemente dalla temperatura e dal pH, mentre altri esopolimeri, come proteine e carboidrati, richiedono specifiche condizioni affinché possano formare strutture di gel (**Braccini et al., 1999**). Quindi la naturale e rapida formazione del gel di ALE favorisce la rapida formazione dei granuli e contribuisce a mantenerne l'integrità strutturale, formando una fitta rete fatta di legami chimico-fisici con altre sostanze come proteine, lipidi, cationi e altri polisaccaridi. Gli autori osservarono inoltre che i batteri maggiormente responsabili della secrezione di tali composti sono le specie *Pseudomonas* e *Azotobacter*.

## 1.6 Applicazione dei fanghi granulari nei processi di rimozione biologica dei nutrienti

Nei successivi paragrafi viene illustrato e discusso il meccanismo di rimozione dei nutrienti nei sistemi a biomassa granulare.

### 1.6.1 Rimozione dell'azoto

La rimozione biologica dell'azoto richiede due fasi consecutive: la prima prevede l'ossidazione dell'azoto ammoniacale in nitriti e nitrati (fase di nitrificazione), la seconda in cui queste sostanze vengono ridotte ad azoto molecolare (fase di denitrificazione). La fase di nitrificazione prevede dunque l'ossidazione dei composti inorganici dell'azoto allo stadio ridotto, svolta da batteri autotrofi, in grado cioè di utilizzare per la sintesi cellulare carbonio inorganico e di trarre l'energia necessaria al loro metabolismo dall'ossidazione di questi composti facilmente ossidabili (ammoniaca e nitriti) usando l'ossigeno libero come accettore di elettroni. La fase di denitrificazione viene condotta da popolazioni batteriche di tipo eterotrofo, i quali in ambiente anossico sono in grado di utilizzare i nitrati ed i nitriti come accettori di elettroni nel processo di respirazione cellulare. Essendo microrganismi di tipo eterotrofo necessitano di carbonio organico per il loro metabolismo.

La struttura dei granuli aerobici può essere ritenuta costituita da tre strati di cui lo strato più esterno è costituito da batteri eterotrofi aerobici, quello più interno da batteri autotrofi nitrificanti, e infine quello più interno da batteri fosforo-accumulanti (PAO) e da batteri eterotrofi facoltativi (figura 1.36). Ciò fa sì che la rimozione dell'azoto sia possibile utilizzando la tecnologia del fango granulare.

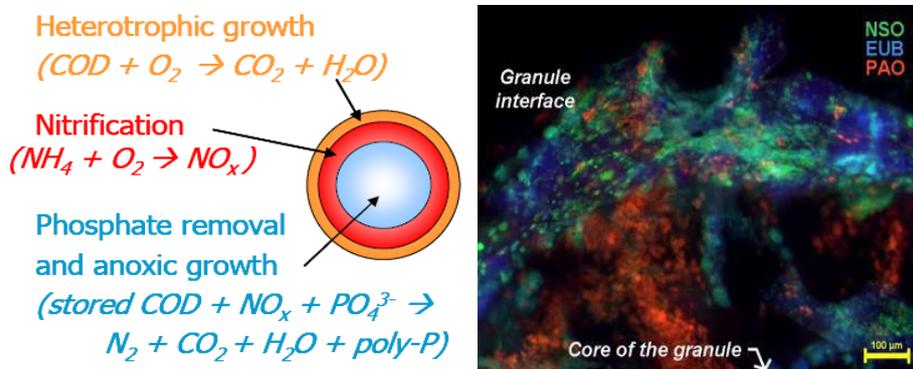


Figura 1.36: Struttura dei granuli aerobici (De Kreuk et al., 2005).

Un fattore che risulta decisivo nel processo di rimozione dell'azoto è la concentrazione di ossigeno disciolto, che influenza la cinetica della nitrificazione, oltre che come già detto nei precedenti paragrafi, le caratteristiche strutturali dei granuli stessi. Particolari condizioni, siano esse operative come la concentrazione di ossigeno disciolto o il rapporto COD/N, o dovute alle dimensioni dei granuli, fanno sì che la diffusione di ossigeno all'interno del granulo sia limitata, pertanto la denitrificazione può avere luogo simultaneamente alla nitrificazione.

Nei sistemi SBR, il substrato organico viene rapidamente consumato dalla biomassa in un breve periodo di tempo, solitamente in poche decine di minuti dall'inizio del ciclo; durante questa fase l'ossigeno viene rapidamente consumato negli strati più esterni, per la crescita cellulare e per la produzione di prodotti di stoccaggio intracellulari, e di conseguenza ha una profondità di diffusione limitata. La produzione delle sostanze di stoccaggio e la crescita cellulare avvengono in condizioni aerobiche negli strati più esterni, e in condizioni anossiche in quelli più interni. La presenza quindi di condizioni anossiche in questa fase rende possibile il processo di denitrificazione dei nitrati eventualmente presenti nel refluo grezzo o prodotti durante i precedenti cicli.

Mosquera-Corral et al. (2005) osservarono che durante la fase in cui il substrato è stato già consumato (fase di inedia aerobica o "famine"), la profondità di diffusione dell'ossigeno è maggiore, perché gli organismi eterotrofi diminuiscono la loro attività metabolica e di conseguenza diminuisce il consumo di ossigeno, ma nonostante ciò essa è pur sempre limitata per via della nitrificazione ad opera della biomassa autotrofa. I nitrati così prodotti, vengono simultaneamente ridotti negli strati più interni utilizzando i prodotti di stoccaggio intracellulari come accettori di elettroni (Figura 1.37).

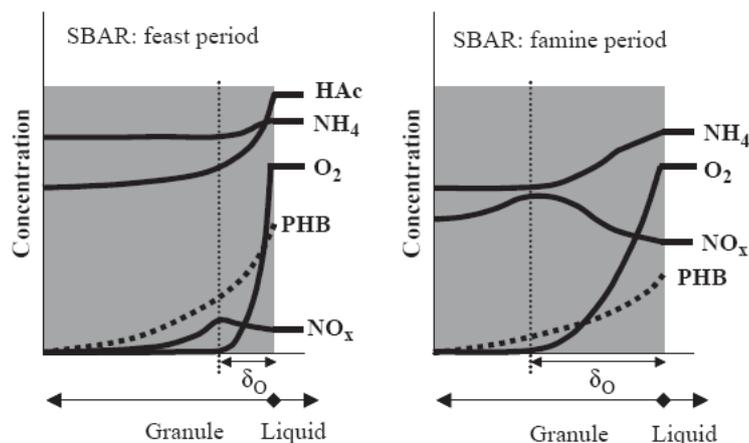


Figura 1.37: Profili di diffusione dei substrati e dell'ossigeno all'interno dei granuli durante i periodi di "feast" e "famine" (Mosquera-Corral et al., 2005).

La differente profondità di diffusione dell'ossigeno tra le due fasi fa sì che gli spessori degli strati aerobici e anossici sia variabile durante il ciclo di reazione. Inoltre le differenti dimensioni dei granuli determinano differenti spessori di tali strati con effetti differenti sul processo di rimozione dell'azoto. Osservando l'andamento dei tre principali composti azotati durante un ciclo di reazione, si osserva che durante il periodo di "feast" la concentrazione di nitriti e nitrati diminuisce (denitrificazione, utilizzando il substrato organico presente nell'alimento come fonte di carbonio). Nel periodo di "inedia", la concentrazione di ammoniaca diminuisce (nitrificazione), mentre aumenta in un primo tempo quella dei nitriti e dei nitrati, prodotti dalla nitrificazione stessa, per poi diminuire nuovamente (denitrificazione con substrato endogeno come fonte di carbonio) (Beun et al., 2001) (Figura 1.38).

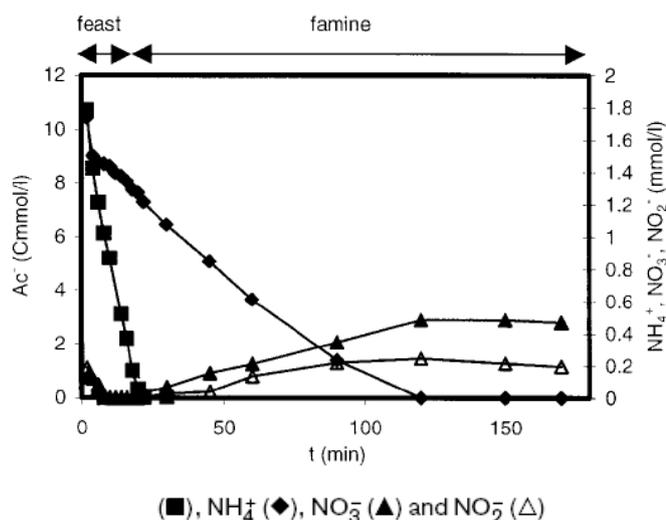


Figura 1.38: Andamento delle concentrazioni di  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  ed  $\text{NO}_2^-$  durante i periodi di "feast" e "famine" (Beun et al., 2001)

La simultanea rimozione della sostanza organica e la nitrificazione fa sì che i microrganismi eterotrofi e autotrofi competano all'interno dei granuli.

In particolare dopo il periodo di "feast" i microrganismi autotrofi nitrificanti ricevono sufficiente ossigeno necessario alla loro crescita, ma necessitano di un tempo di acclimatazione maggiore.

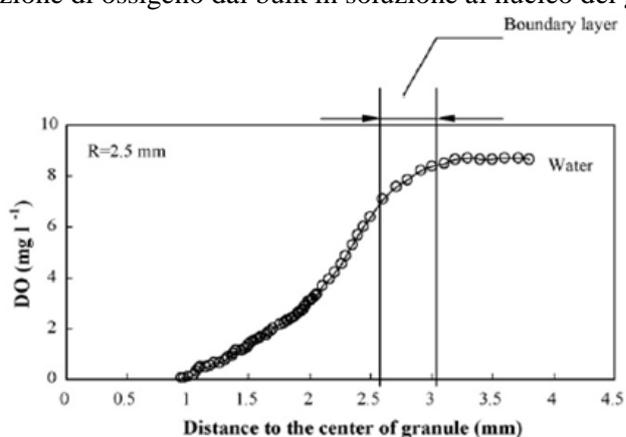
Come già più volte detto i granuli presentano una struttura molto più grande e compatta rispetto a quella dei fiocchi di un fango attivo convenzionale, ma proprio per questa caratteristica la diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli stessi può subire notevoli limitazioni, con ovvie conseguenze sui rendimenti depurativi. In generale il substrato organico riesce a penetrare maggiormente all'interno dei granuli rispetto a quanto riesca l'ossigeno; ciò implica che il vero fattore limitante

possa non essere la concentrazione del substrato, bensì la concentrazione di ossigeno disciolto.

**Tay et al. (2002)** mediante analisi microbiologiche in fluorescenza (FISH), hanno trovato uno strato di cellule morte alla profondità di 800-1000  $\mu\text{m}$ . **Li et al. (2008c)** hanno condotto una sperimentazione per analizzare il profilo di diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli al variare della loro dimensione. La profondità di diffusione del gas all'interno dei granuli è stata valutata per mezzo di un microelettrodo.

I granuli sono stati coltivati in circa 2 settimane, al termine delle quali avevano un diametro compreso in un range di 0,9-4,4 mm.

Lo studio è stato condotto applicando due differenti condizioni operative: la prima consisteva nel mantenere elevata la concentrazione di substrato, la seconda nel mantenerlo in concentrazioni inferiori ma comunque sufficienti e tali che il substrato non risultasse un fattore limitante. La Figura 1.39 mostra l'andamento della concentrazione di ossigeno dal bulk in soluzione al nucleo del granulo.

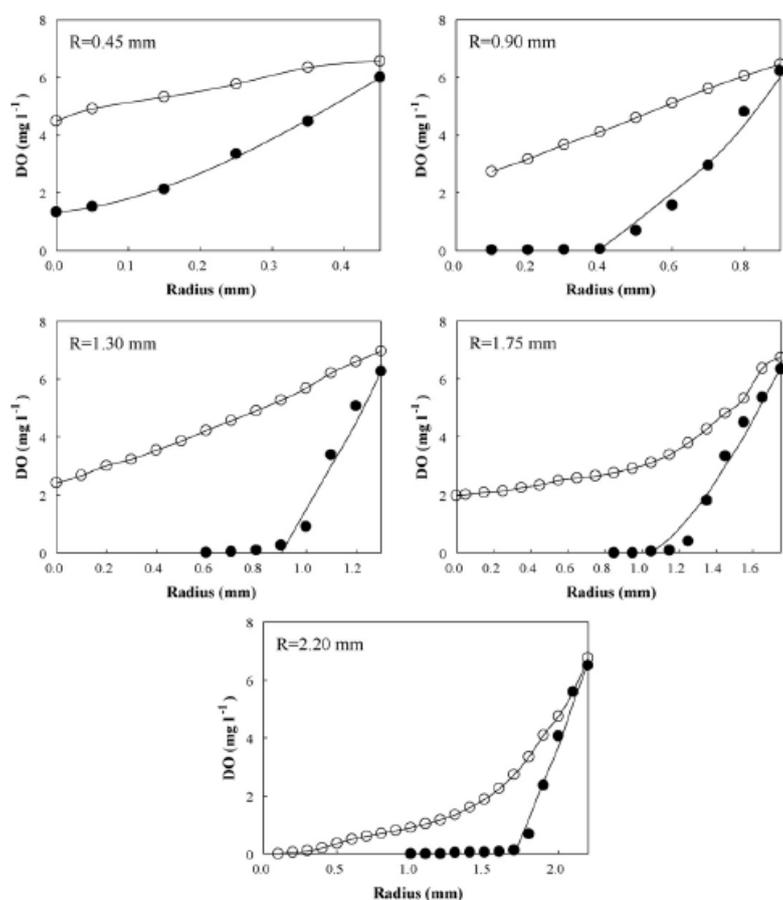


**Figura 1.39:** Andamento della concentrazione di ossigeno disciolto dall'acqua al nucleo del granulo, e strato limite. (Li et al., 2008c)

Nel bulk la concentrazione di ossigeno è prossima alle condizioni di saturazione ( $8,6 \text{ mg L}^{-1}$ ); spostandosi verso la superficie del granulo la concentrazione di ossigeno si abbassa a  $6,55 \text{ mg L}^{-1}$  indicando la presenza di uno strato limite tra il bulk e la superficie del granulo. Come è possibile vedere nella figura 2.5, lo spessore di questo strato limite è di circa  $400 \mu\text{m}$  per i granuli con un raggio di 2,5 mm, e la concentrazione di ossigeno diminuisce progressivamente man mano che ci si avvicina al nucleo del granulo, fino ad annullarsi alla profondità di 1,6 mm; gli autori conclusero che l'ossigeno non riesce a penetrare l'intero granulo.

La Figura 1.40 mostra il profilo di diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli al variare della loro dimensione. Per i granuli di dimensioni (raggio) di  $0,45 \mu\text{m}$ , l'ossigeno riesce a penetrare fino al nucleo del granulo, sia in condizioni di

concentrazioni di substrato elevato che in concentrazioni inferiori, ma la concentrazione di ossigeno risulta sempre maggiore nel caso in cui la concentrazione di substrato sia più elevata.



**Figura 1.40:** Profilo di diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli al variare delle loro dimensioni. (Li et al., 2008c).

Per i granuli con un raggio di 0,9 mm, l'ossigeno riesce a penetrare fino al centro dei granuli soltanto in acqua pulita (rappresenta la fase in cui la concentrazione di substrato è minore, e quindi la fase di inedia aerobica), mentre in presenza di substrato (rappresenta la fase di "feast") la concentrazione di ossigeno si annulla alla profondità di 0,5 mm dalla superficie del granulo stesso. In presenza di substrato a concentrazioni minori, anche per i granuli di dimensioni di 2,2 mm, l'ossigeno riesce a penetrare fino al nucleo, mentre quando il substrato è presente

in concentrazioni maggiori la concentrazione di ossigeno disciolto si annulla prima di arrivare al centro del granulo. Quindi nei granuli di dimensioni maggiori, la zona aerobica ed anaerobica possono coesistere (la parte più esterna è in condizioni aerobiche, quella più interna in condizioni anaerobiche). La limitazione alla diffusione di ossigeno all'interno dei granuli può tuttavia influenzare la struttura e la stabilità degli stessi. La presenza di batteri anaerobici nel nucleo dei granuli aerobici, fa sì che i prodotti del loro metabolismo (acidi e gas) possano creare problemi alla struttura dei granuli. Inoltre le EPS all'interno dei granuli, possono essere utilizzate da tali batteri come fonte di energia, e ciò determina la formazione di pori e la riduzione della stabilità che può comportare la loro rottura. Quindi dato che nei reattori SBR la biomassa è soggetta a periodiche variazioni ambientali, e anche a variazioni della disponibilità del substrato, possono essere distinte due fasi: la prima in cui il substrato è presente in grandi quantità e viene prontamente biodegradato (fase di "feast"); la seconda in cui la concentrazione di substrato si è notevolmente ridotta ma rimane in concentrazioni tali da non costituire un fattore limitante (fase di inedia aerobica). Durante la prima fase l'ossigeno viene rapidamente consumato negli strati più esterni, mentre nella seconda il consumo è minore e il gas riesce a penetrare più in profondità. Ciò implica che per i granuli aerobici nei reattori SBR con diametri da 0,5 a 1 mm, una concentrazione di ossigeno bassa può essere sufficiente per penetrare all'interno del granulo nella fase di inedia. Di conseguenza la concentrazione di ossigeno può essere ridotta in questa fase.

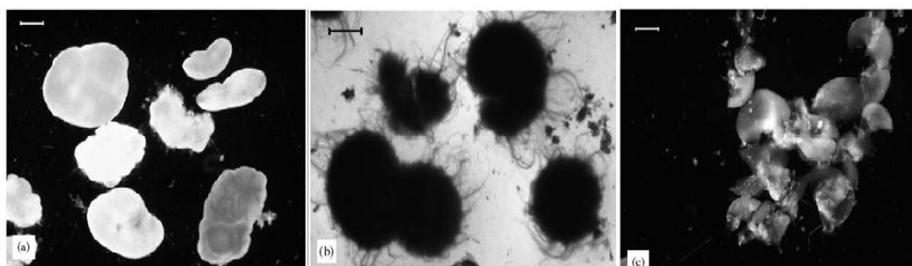
In conclusione, in condizioni di concentrazioni di substrato elevate, la diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli avviene fino alla profondità di 500  $\mu\text{m}$  dalla superficie, per cui nei granuli di dimensioni (raggio) superiori a 0,5 mm si viene a creare lo strato anaerobico e anossico. Quando il substrato è presente in concentrazioni minori invece, l'ossigeno riesce a penetrare fino al nucleo del granulo, se questo ha una dimensione non superiore a 2,2 mm, e nell'intero granulo vengono mantenute le condizioni aerobiche. Appare dunque che le dimensioni ottimali dei granuli siano di circa 2 mm per l'ossidazione aerobica della sostanza organica e per la nitrificazione e denitrificazione. A seconda delle dimensioni infine risulterà uno spessore più o meno grande degli strati aerobici, anossici e anaerobici.

Il controllo dell'ossigeno risulta essere un importantissimo fattore per ottimizzare i processi di nitrificazione e denitrificazione. **De Kreuk et al., (2005)** hanno studiato il processo di rimozione dell'azoto utilizzando fango granulare in reattori SBAR; in particolare hanno valutato l'incidenza di differenti concentrazioni di ossigeno sui rendimenti di nitrificazione e denitrificazione. Le condizioni operative erano tali da non influenzare le cinetiche di nitrificazione e denitrificazione, quindi la temperatura e il pH venivano mantenuti costantemente pari a valori standard (20° C per la temperatura e 7 per il pH). L'alimento consisteva in refluo sintetico a base di acetato.

La sperimentazione venne divisa in tre fasi:

- **Fase 1:** dalla durata di 150 giorni durante i quali la saturazione dell'ossigeno non veniva controllata e approssimativamente era il 75% durante la fase di "feast" e il 100% durante la fase di inedia.
- **Fase 2:** dalla durata di 50 giorni, in cui la saturazione dell'ossigeno veniva mantenuta al 40%;
- **Fase 3:** in cui il sistema è stato riavviato dopo un nuovo inoculo alle stesse condizioni operative della fase 2.

Durante la prima fase i granuli si svilupparono rapidamente e raggiunsero le dimensioni di circa 1,6 mm al 30° giorno, la concentrazione di biomassa si stabilì a 5 gSSV/l al 50° giorno, l'età del fango si stabilizzò intorno a 25 giorni e lo SVI fluttuava tra 48 e 75 mL gSST<sup>-1</sup>. La durata della fase di "feast" variava durante questa fase tra 15 e 20 minuti. Il rendimento di rimozione dell'azoto complessivamente non fu molto elevato e si stabilizzò intorno al 16% dopo il 100° giorno. Al 150° giorno (inizio della fase 2) la concentrazione di ossigeno venne ridotta al 40% della concentrazione di saturazione. La riduzione della concentrazione di ossigeno portò ad un aumento dell'efficienza di denitrificazione, e ad un peggioramento di quella di nitrificazione, ma complessivamente il rendimento di rimozione dell'azoto aumentò fino al 63%. Tuttavia la riduzione della concentrazione di ossigeno determinò lo sviluppo di batteri filamentosi sulla superficie dei granuli, che ne determinarono il rapido sfaldamento e la conseguente perdita di biomassa con l'effluente (figura 1.41).



**Figura 1.41:** Immagini dei granuli durante la Fase1 (a), Fase2 (b), e Fase3 (c).  
(De Kreuk et al., 2005)

La terza fase fu avviata con le medesime condizioni della fase precedente, ma in questo caso i granuli che si formarono erano piccoli e instabili, e venivano dilavati con l'effluente.

In conclusione, una minore concentrazione di ossigeno determinò un peggioramento dell'efficienza di nitrificazione e un miglioramento di quella di

denitrificazione, ma ciò a scapito della stabilità dei granuli che si deteriorarono e vennero dilavati con l'effluente. Le condizioni operative della prima fase invece seppur garantendo una maggiore stabilità strutturale dei granuli non furono tali da ottenere buoni rendimenti di rimozione dell'azoto, principalmente per la scarsa efficienza di denitrificazione, dovuta probabilmente alle piccole dimensioni dei granuli e di conseguenza al ridotto spessore dello strato anossico.

Questo argomento viene ripreso nel capitolo 2 relativo alla gestione degli impianti a biomassa granulare in particolare quando si espongono i criteri di ottimizzazione del processo per la rimozione dei nutrienti.

### 1.6.2 Rimozione del fosforo

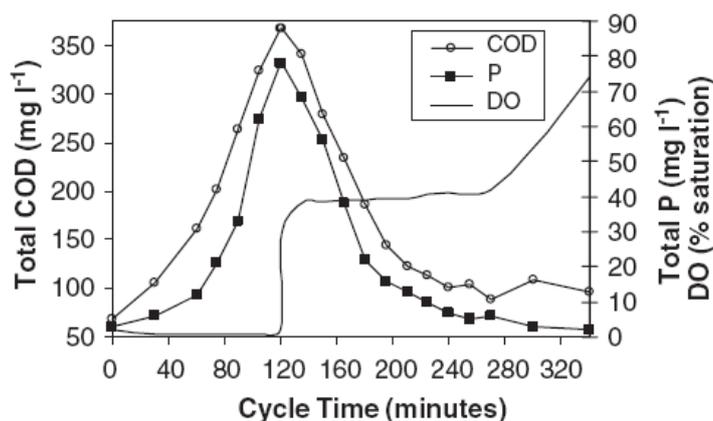
I limiti di legge, nel caso di scarico in "aree sensibili", richiedono una riduzione della concentrazione del fosforo nell'acqua reflua, prima dello scarico, fino a valori di  $2 \text{ mg L}^{-1}$  o  $1 \text{ mg L}^{-1}$  a seconda delle potenzialità dell'impianto ( $P < 100.000$  o  $P > 100.000$  A.E.). Il processo di rimozione biologica del fosforo (EBPR, Enhanced Biological Phosphorus Removal) consente l'eliminazione del fosforo senza dover ricorrere alla precipitazione chimica e rappresenta una alternativa economica e affidabile. Il processo EBPR si basa sull'alternanza tra fase anaerobica e aerobica, con somministrazione di substrato limitata alla sola fase anaerobica. La maggior parte dei processi EBPR si basano sul trattamento di biomassa sospesa e richiedono perciò reattori con grossi volumi operativi: di conseguenza l'ingombro del reattore è notevole. Sebbene l'esperienza a scala reale mostra un enorme potenzialità del processo EBPR, bisogna però sottolineare che sono state anche incontrate difficoltà nell'assicurare condizioni operative stabili e affidabili. Nel tentativo di superare i problemi connessi alla biorimozione convenzionale del fosforo, **Lin et al. (2003)** sono riusciti ad ottenere granuli microbici fosforo-accumulanti in reattori SBR operanti con valori del rapporto P/COD che variavano tra 1/100 e 10/100 in peso. L'analisi del COD solubile e del  $\text{PO}_4\text{-P}$  hanno mostrato che i granuli possedevano tipiche caratteristiche fosforo-accumulanti, con concomitante accumulo di carbonio organico solubile e rilascio di fosfati durante la fase anaerobica, seguita da rapido accumulo dei fosfati durante la fase aerobica. La dimensione dei granuli fosforo-accumulanti ha mostrato una tendenza decrescente al crescere del rapporto P/COD e la struttura dei granuli è diventata più densa e compatta. Il fosforo accumulato dai granuli era compreso tra l'1,9% e il 9,3% in peso, quindi comparabile con quello dei convenzionali processi EBPR. **Cassidy e Belia, (2005)**, hanno studiato la possibilità di applicare la tecnologia del fango granulare nella rimozione biologica del fosforo in un impianto SBR. Per questa sperimentazione è stato utilizzato un reattore SBR dal volume di 8 litri operante secondo cicli di 6 ore. Durante le prime 2 ore venivano mantenute condizioni anaerobiche tramite una semplice agitazione

senza l'insufflazione di aria, e le successive 4 di aerazione. Come mostra la Tabella 1.2, i granuli ottenuti mostrano buone caratteristiche strutturali e morfologiche.

**Tabella 1.2:** Principali caratteristiche dei granuli. (Cassidy e Belia, 2005)

Property (units)	Granular sludge	Flocculating sludge
Mean diameter (mm)	1.7 ± 0.3 (42)	0.4 ± 0.2 (27) <sup>a</sup>
Specific gravity	1.035 ± 0.01 (37)	1.009 ± 0.006 (27)
Density (g VSS l <sup>-1</sup> )	22 ± 10 (13)	7 ± 4 (9)
ZSV (m h <sup>-1</sup> )	51 ± 9 (40)	4 ± 3 (34)
SVI (ml g <sup>-1</sup> )	22 ± 8 (40)	163 ± 30 (33)

La Figura 1.42 mostra l'andamento del COD, del fosforo e dell'ossigeno disciolto durante un ciclo. Come è possibile osservare durante la fase anaerobica, il COD tende ad essere rimosso ad opera dei batteri fosforo-accumulanti, che utilizzano il carbonio organico per la produzione di sostanze di stoccaggio intracellulari; un'aliquota del COD rimosso è tuttavia dovuta anche a batteri aerobici, in quanto la miscelazione a cui è sottoposta la biomassa determina una seppur minima diffusione di ossigeno all'interno del reattore. Progressivamente questa rimozione tende a diminuire e il COD nell'effluente aumenta. Durante questa fase avviene il rilascio del fosforo da parte dei batteri fosforo-accumulanti, e ciò è ben visibile nel grafico che segna il progressivo aumento del fosforo nella miscela.



**Figura 1.42:** Andamento del COD, P e OD durante un ciclo. (Cassidy e Belia, 2005).

Durante la successiva fase aerobica, i batteri fosforo-accumulanti utilizzando come fonte energetica la sostanze di stoccaggio prodotte nella precedente fase anaerobica, riescono ad accumulare una quantità di fosforo molto maggiore rispetto a quello rilasciato nella fase anaerobica. La rimozione biologica del fosforo ha

pertanto raggiunto rendimenti molto elevati, superiori al 97%, e contestualmente sono stati raggiunti ottimi rendimenti anche per la rimozione del COD. Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti da **Wang et al. (2009)**, che hanno condotto una sperimentazione simile, utilizzando un reattore SBR operante secondo cicli che prevedevano una fase iniziale di 90 minuti di miscelazione in condizioni anaerobiche 270 in condizioni aerobiche. Sono stati ottenuti rendimenti eccellenti sul fosforo (90%), e altrettanto buoni sul COD (80-90%). Sembra quindi che la rimozione del fosforo utilizzando fango granulare richieda una fase iniziale di miscelazione in condizioni anaerobiche, e una successiva fase di aerazione.

## 1.7 Bibliografia

- Adav, S., Lee, D.J. (2008a). Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *Journal of Hazardous Material* 154,1120–1126.
- Adav, S., Lee, D.J., Show, K.Y., Tay, J.H., (2008b). Aerobic granular sludge: Recent advances. *Biotechnology Advances* 26, 411-423.
- Adav, S., Lee, D.J., Lai, J.Y., (2009a). Aerobic granulation in sequencing batch reactors at different settling times. *Bioresource Technology* 100, 5359-5361.
- Adav, S., Lee, D.J., Tay, J.H., (2009b). Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Research* 42, 1644-1650.
- Beun, J.J., Hendriks, A., van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A., Heijnen, J.J. (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research* 33, 2283– 2290.
- Beun, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., (2001). Aerobic granulation in a Sequencing Batch Airlift Reactor. *Water Research* 36, 702–712.
- Bossier, P., Verstraete, W. (1996) Triggers for microbial aggregation in activated sludge *Appl. Microbiol. Biotechnology* 45, 1–6.
- Braccini, I., Grasso, R.P., Perez, S., (1999). Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modelling investigation. *Carbohydrate Research* 317, 119-130.
- Cassidy, D.P., Belia, E., (2005). Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge. *Water Research* 39, 4817–4823.
- Chen, M.Y., Lee, D.J., Tay, J.H., (2007a). Distribution of extracellular polymeric substances in aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnology* 73, 1463–1469.
- Chen, Y., Jiang, W., Liang, D.T., Tay, J.H., (2007b). Structure and stability of aerobic granules cultivated under different shear force in sequencing batch reactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 76, 1199–1208.
- De Kreuk M.K., Van Loosdrecht M.C.M., (2004). Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Sci Technol* 49(11-12), 9–17.
- De Kreuk, M.K., Pronk, M., Van Loosdrecht, M.C.M., (2005). Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. *Water Research* 39, 4476– 4484.
- Etterer, T., Wilderer, P.A. (2001). Generation and properties of aerobic granular sludge. *Water Science & Technology* 43, 19– 26.
- Fang, H.H.P., Chui, H.K. (1993). Maximum COD loading capacity in UASB reactors at 37 °C. *J Environ Eng* 1993 119, 103–119.

- Fang, H.H.P., Chui, H.K., Li, Y.Y., (1995) Effect of degradation kinetics on the microstructure of anaerobic biogranules. *Water Science & Technology* 32, 165–72.
- Guo, F., Zhang, S.H., Yu, X., Wei, B., (2011). Variations of both bacterial community and extracellular polymers: the inducements of increase of cell hydrophobicity from biofloc to aerobic granule sludge. Evolution of bioaggregate strength during aerobic granular sludge formation. *Bioresource Technology* 102, 6421–6428.
- Jiang, L., Tay, H.J., Liu, Y., Tay, S.T.L. (2003). Ca<sup>2+</sup> augmentation for enhancement of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors. *Biotechnology Letters* 25, 95–99.
- Lapidou, G.S., Rittmann, B.E., (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.* 36, 2711–2720.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W., Klapwijk. K. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological waste water treatment especially for anaerobic treatment. *Biotechnol Bioeng* 22, 699–734.
- Li, A.J., Yang, S.F., Li, X.Y., Gu, J.D., (2008a). Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. *Water Research* 42, 3552-3560.
- Li, X.M., Liu, Q.Q., Yang, Q., Guo, L., Zeng, G.M., Hu, J.M., Zheng, W., (2008b). Enhanced aerobic sludge granulation in sequencing batch reactor by Mg<sup>2+</sup> augmentation. *Bioresource Technology* 100, 64–67.
- Li, Y., Liu, Y., Shen, L., Chen, F., (2008c). DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications. *Enzyme and Microbial Technology* 43, 349-354.
- Li, Y., Liu, Y., Xu, H., (2008d). Is sludge retention time a decisive factor for aerobic granulation in SBR? *Bioresource Technology* 99, 7672–7677.
- Li, A., Li, X., Yu, H., (2011). Effect of the food-to-microorganism (F/M) ratio on the formation and size of aerobic sludge granules. *Process Biochemistry* 46, 2269-2276.
- Lin, Y.M., Liu, Y., Tay, J.H., (2003). Development and characteristics of phosphorus-accumulating microbial granules in sequencing batch reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 430–435.
- Lin, Y.M., Wang, L., Chi, Z.M., Liu, X.Y., (2008). Bacterial alginate role in aerobic granular bio-particles formation and settleability improvement. *Separation Science and Technology* 43(7), 1642-1652.
- Lin Y., de Kreuk, M., van Loosdrecht, M.C.M., Adin, A., (2010). Characterization of alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant. *Water Research* 44, 3355-3364.

- Liu, Y., Tay, J.H. (2001). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36, 1653–1665.
- Liu, H., Yang, S.F., Tay, J.H., (2003a). Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. *Journal of Biotechnology* 108, 161–169.
- Liu, Q.S., Tay, J.H., Liu, Y., (2003b) Substrate concentration-independent aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *Environ Technology* 24, 1235 – 1243.
- Liu, Y., Tay, J.H., (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22, 533–563.
- Liu, Y., Wang, Z.W., Qin, L., Liu, Y.Q., Tay, J.H., (2005). Selection pressure-driven aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnology* 67, 26–32.
- Liu, Q.Y., Tay, H.J. (2006). Cultivation of aerobic granules in a bubble column and an airlift reactor with divided draft tubes at low aeration rate. *Biochemical Engineering Journal* 34, 1-7.
- Liu, Y.Q., Tay, J.H., (2007). Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 99, 980-985.
- Liu, Y.Q., Pui, B.Y.M., Tay, J.H., (2008). COD removal and nitrification of low-strength domestic wastewater in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 23–28.
- McSwain, B.S., Irvine, R.L., Hausner, M., Wilderer, P.A., (2005). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl. Environ. Microbiology* 71, 1051-7.
- McSwain, B.S., Irvine, R.L. (2008). Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. *Water Science & Technology* 58(4), 781-787.
- Mishima, K., Nakamura, M. (1991). Self-immobilization of aerobic activated sludge: a pilot study of the aerobic upflowsludge blanket process in municipal sewage treatment. *Water Science & Technology* 23, 981– 990.
- Morgenroth, E., Sherden, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., Wilderer, P.A. (1997). Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Research* 31, 3191– 3204.
- Mosquera-Corral, A., de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., (2005). Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Research* 39, 2676–2686.
- Moy, B.Y.P., Tay, J.H., Toh, S.K., Liu, Y., Tay, S.T.L. (2002). High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. *Lett Appl Microbiol* 34, 404-412.
- Ng, P.H. (2002) Storage stability of aerobic granules cultivated in aerobic granular sludge blanket reactor. Final year report of Bachelor of Engineering 2002. Singapore: Nanyang Technological University.

- Ni B.J., Xie W.M., Liu, S.G., Yu, H.Q., Wang, Y.Z., Wang, G., Dai, X.L., (2008). Granulation of activated sludge in a pilot-scale sequencing batch reactor for the treatment of low-strength municipal wastewater. *Water Reserch* 42, 1583 – 1594.
- Pan, S., (2003). Inoculation of microbial granular sludge under aerobic conditions. Ph.D. Thesis, Nanyang Technological University, Singapore.
- Peng, D., Bernet, N., Delgenes, J.P., Moletta, R. (1999). Aerobic granular sludge: a case report. *Water Research* 33, 890–893.
- Qin, L., Liu, Y., Tay, J.H., (2003). Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochemical Engineering Journal* 21, 47–52.
- Rickard, A.H., Leach, S.A., Buswell, C.M., High, N.J., Handley, P.S., (2000). Coaggregation between aquatic bacteria is mediated by specific growth phase dependent lectin saccharide interactions. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 431-434.
- Rittmann, B.E., (1987). A critical evaluation of soluble microbial formation in biological processes. *Water Science & Technology* 19, 517–528.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G., Jabbouri, S., (2005). Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infection and Immunity* 73, 3007-3017.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K. (1996) Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol Bioeng* 49, 229– 246.
- Schwarzenbeck, N., Erley, R., Wilderer, P.A., (2004). Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. *Water Science and Technology* 49, 41–46.
- Su, K.Z., Yu, H.Q., (2005). Formation and characterization of aerobic granules in a sequencing batch reactor treating soybean-processing wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2818–2827.
- Sun, F.Y., Yang, C.Y., Li, J., Yang, Y., (2006). Influence of different substrates on the formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Journal of Environmental Science* 18 (5), 864-871.
- Sutherland, I.W., (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147, 3-9.
- Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y. (2001a) Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *J Appl Microbiol* 91, 168-175.
- Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y. (2001b). The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 227– 233.
- Tay, J.H., Ivanov, V., Pan, S., Tay, S.T.L., (2002). Specific layer in aerobically grown microbial granules. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 254–257.

- Val del Río, A., Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R., (2013). Stability of aerobic granular biomass treating the effluent from a seafood industry. *International journal of Environmental Research* 7(2), 265-276.
- Wan, J., Sperandio, M., (2009). Possible role of denitrification on aerobic granular sludge formation in sequencing batch reactor. *Chemosphere* 75, 220-227.
- Wan, Y., Bessiere, Y., Sperandio, M., (2009). Alternating anoxic feast/aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at reduced aeration rate. *Water research* 43, 5097-5108.
- Wang, Z.W., Liu, L., Yao, J., Cai, W., (2005). Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Chemosphere* 63, 1728-1735.
- Wang, Z.W., Liu, Y., Tay, J.H., (2006). The role of SBR mixed liquor volume exchange ratio in aerobic granulation. *Chemosphere* 62 (5), 767-771.
- Wang, Z.W., Liu, Y., Tay, J.H., (2007). Biodegradability of extracellular polymeric substances produced by aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 462-466.
- Wang, X., Zhang, B., Shen, Z., Qiu, Z., Chen, Z., Jin, Min., Li, J., Wang, J., (2010). The EPS characteristics of sludge in an aerobic granule membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 101, 8046-8050.
- Winkler, M.K.H., Bassin, J.P., Kleerebezem, R., van der Lans, R.G.J.M., van Loosdrecht, M.C.M., (2012). Temperature and salt effects on settling velocity in granular sludge technology. *Water Research* 46, 3897-3902.
- Xiao, F., Yang, S.F., Li, X.Y., (2008). Physical and hydrodynamic properties of aerobic granules produced in sequencing batch reactors. *Separation and Purification Technology* 63, 634-641.
- Xiong, Y., Liu, Y. (2013). Importance of extracellular proteins in maintaining structural integrity of aerobic granules. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces* 112, 435-440.
- Yang, S.F., Tay, J.H., Liu, Y., (2003). Inhibition of free ammonia to the formation of aerobic granules. *Biochemical Engineering Journal* 17, 41-48.
- Yang, S.F., Liu, Q.S., Tay, J.H., Liu, Y. (2004). Growth kinetics of aerobic granules developed in sequencing batch reactors. *Lett Appl Microbiol* 38, 106-112.
- Yu, G.H., Juang, Y.C., Lee, D.J., He, P.J., Shao, L.M., (2009). Filterability and extracellular polymeric substances of aerobic granules for AGMBR process. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40, 479-483.
- Zhang, X.Q., Bishop, P.L., (2001). Spatial distribution of extracellular polymeric substances in biofilms. *J. Environ. Eng. – ASCE* 127, 850-856.
- Zheng, Y.M., Yu H.Q., Liu, S.J., Liu, X.Z., (2006). Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere* 63, 1791-1800.

- Zhou, D., Niu, S., Xiong, Y., Yang, Y., Dong, S., (2014). Microbial selection pressure is not a prerequisite for granulation: Dynamic granulation and microbial community study in a complete mixing bioreactor. *Bioresource Technology* 161, 102-108.
- Zhu, L., Qi, H.Y., Lv, M.L., Kong, Y., Yu, Y.W. and Xu, X.Y., (2012). Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies. *Bioresource Technology* 124, 455-459.

## Capitolo 2

# La gestione degli impianti a biomassa granulare: strategie di coltivazione, gestione delle disfunzioni e ottimizzazione del processo.

### 2.1 Introduzione

L'obiettivo di questo capitolo è quello di analizzare le principali problematiche gestionali di un impianto a biomassa granulare. Si focalizzerà l'attenzione sulla fase di avviamento di tali sistemi, e su quello che ad oggi sembra essere il maggiore ostacolo allo sviluppo della tecnologia su impianti a piena scala, ovvero la stabilità dei granuli nel lungo periodo.

### 2.2 Lo start-up di un sistema a biomassa granulare e strategie per la riduzione dei tempi di coltivazione.

La formazione del fango granulare negli impianti SBR è stata per la prima volta riportata alla fine degli anni novanta (**Morgenroth et al., 1997; Beun et al., 1999**). Inizialmente molti ricercatori hanno studiato sull'incidenza di alcuni parametri sul processo di granulazione, come l'applicazione di brevi tempi di sedimentazione (**Beun et al., 1999; McSwain et al. 2004; Qin et al., 2004**), gli elevati sforzi di taglio causati dall'aerazione (**Liu e Tay 2002; Tay et al., 2004**) e sull'alimentazione in condizioni anaerobiche al fine di favorire lo sviluppo dei batteri a lenta crescita (**de Kreuk e van Loosdrecht, 2004**). In condizioni favorevoli, la trasformazione del fango da fioccoso a granulare è stata ottenuta da alcuni autori in circa 3 settimane, trattando diverse tipologie di refluo: sintetico (**Li e Li, 2009**), civile (**de Kreuk e van Loosdrecht, 2006**) e industriale (**Arrojo et al., 2004**). Tuttavia, in questi studi nelle prime fasi del processo di granulazione, si ottiene solo la rimozione del carbonio in maniera soddisfacente. Infatti, per ottenere performance soddisfacenti per la rimozione dell'azoto e del fosforo, sono necessari periodi ben più lunghi (**de Kreuk et al., 2005; Xavier et al., 2007; Gonzalez-Gil e Holliger, 2011**). L'elevato wash-out che si verifica nei primi giorni dopo lo start-up dell'impianto è stata ritenuta una delle principali cause della

mancata rimozione dei nutrienti nelle fasi iniziali (**Pijuan et al., 2011; Weissbrodt et al., 2012**). Quindi, anche se il fango di inoculo inizialmente contiene i microrganismi necessari per la rimozione dei nutrienti, questa capacità viene gradualmente persa. Di conseguenza, il recupero di tale capacità è un processo lento, in quanto sia i batteri autotrofi che i PAOs sono microrganismi a crescita lenta. Sono stati analizzati diversi approcci per evitare eccessivi dilavamenti di biomassa nella fase iniziale del processo e mantenere, dunque, la capacità di rimuovere i nutrienti anche durante la fase di start-up. **Cassidy e Belia (2005)** ad esempio, hanno gradualmente ridotto i tempi di sedimentazione per limitare il wash-out e consentire alla biomassa di adattarsi gradualmente alla forte pressione di selezione idraulica. Altri studi riportano una più rapida formazione dei granuli aggiungendo cationi polivalenti nell'alimento (**Jiang et al., 2003; Liu et al., 2010**). Altri recenti studi riportano che la perdita di biomassa durante lo start-up può essere notevolmente ridotta inoculando granuli rotti insieme al fango attivo fioccoso (**Pijuan et al., 2011; Coma et al., 2012**).

**Lochmatter e Holliger, (2014)** hanno condotto uno studio mirato a determinare le condizioni operative ottimali per ottenere una rapida trasformazione da fango attivo convenzionale a fango granulare. In particolare gli autori hanno focalizzato la loro attenzione su quei parametri ritenuti chiave per la selezione dei batteri PAOs e autotrofi, per ottenere rendimenti di denitrificazione soddisfacenti e infine per ottenere granuli stabili in tempi ragionevolmente brevi. Nel dettaglio, i parametri analizzati sono stati sette: il carico di contaminante, la strategia di aerazione, l'aggiunta di alliltiurea, la velocità del flusso d'aria, la strategia di riduzione del tempo di sedimentazione, il pH e infine la temperatura. Lo studio è stato condotto applicando il metodo statistico proposto da **Plackett e Burman (1946)**, basato sulla costruzione della matrice di Hadamard. Tale metodo consente di valutare l'effetto di un certo numero di parametri attraverso un set minimo di esperimenti. Tale approccio viene solitamente utilizzato in ambito biologico, dove la moltitudine di variabili in gioco, molte delle quali tra loro correlate, richiede lo svolgimento di una enorme serie di esperimenti. Fondamentalmente, si tratta di prove in cui una variabile indipendente (concentrazione di nutriente, pH, temperatura ecc..) viene fatta variare mentre si lasciano costanti gli altri parametri, quindi la procedura va ripetuta per tutte le altre variabili. L'unico difetto di tale metodo è che l'interferenza tra le variabili non può essere rilevata. L'obiettivo di tale metodo è quello di individuare quali parametri hanno un elevato effetto sul processo e quali no. Il vantaggio del metodo proposto da Plackett e Burman è che i vari parametri vengono testati in maniera simultanea e non singolarmente. Nello studio di **Lochmatter e Holliger, (2014)**, sono stati effettuati otto esperimenti per valutare l'influenza di sette parametri. Nella matrice degli esperimenti, sulle colonne sono indicate le variabili da valutare e sulle righe gli esperimenti da effettuare, i valori che assumono le variabili sono solitamente due e indicano due possibili livelli del componente i-esimo. In particolare per ciascun parametro, sono

stati definiti due livelli, uno positivo (+1) e uno negativo (-1). La risoluzione di questa matrice consente di individuare quale livello ha un effetto positivo sul processo e il peso che ciascun parametro ha sul processo stesso. Per ciascun parametro sono stati definiti dunque i due possibili livelli (Tabella 2.1).

**Tabella 2.1:** Parametri operativi testati e livelli positivi e negativi per ciascuno (Lochmatter e Holliger, 2014).

Parameter	Type	Negative (-1)	Positive (+1)
A Contaminant load	Binomial	Constant load	Performance-adapted load
B Aeration strategy	Binomial	Constant DO	Alternate high-low DO
C Allylthiourea	Binomial	Without	With
D Airflow velocity	Continuous	0.015 m/s	0.030 m/s
E Settling time	Binomial	Strategy I	Strategy II
F pH	Continuous	7.0–7.3	7.5–7.8
G Temperature	Continuous	15 °C	20 °C

In particolare, per il carico di inquinante (COD) il livello negativo prevedeva la cosiddetta condizione a “carico costante”, ovvero che il refluo influente aveva la stessa concentrazione in COD, N e P durante l’intero ciclo e che la durata della fase di starvation era sempre la stessa. Per l’altro livello, il refluo influente veniva diluito e inoltre è stata aggiunta una fase di miscelazione in condizioni anaerobiche con azoto gas per circa 3 ore, dopo la fase di alimentazione, svolta sempre in condizioni anaerobiche. La concentrazione del refluo influente e la durata della fase di miscelazione post-alimentazione venivano adattate continuamente in base alla capacità del consumo di COD della biomassa in condizioni anaerobiche, al fine di evitare di avere acidi grassi volatili nella fase aerobica successiva. Questo livello venne chiamato “carico adattato alle performance”. Per la strategia di aerazione, il livello negativo è stato identificato con la strategia di controllo dell’ossigeno a una concentrazione pari al 60% di quella di saturazione, mentre il livello positivo prevedeva tre distinte fasi della durata di 20 minuti ciascuna, in cui si alternavano condizioni di elevate concentrazioni di ossigeno (50%, 40% e 30%) alternate a condizioni di basse concentrazioni (5%), al fine di favorire il processo di denitrificazione. Per quanto riguarda l’alliltiurea, il livello negativo non prevedeva la sua aggiunta, mentre la prevedeva quello positivo. Lo scopo in questo caso era quello di favorire lo sviluppo dei batteri PAOs (**de Kreuk e van Loosdrecht, 2004**). Per la velocità del flusso d’aria furono scelti due differenti valori, che identificavano i due livelli. Per quanto riguarda il tempo di sedimentazione, furono individuati due diverse strategie, I e II, che individuavano rispettivamente i due livelli negativo e positivo. La strategia I prevedeva la riduzione giornaliera del tempo di sedimentazione da 30 minuti (mantenuti per 20 giorni) a 25 e poi 20, 15,

12,9,7,5,4,3 minuti al 29° giorno, mentre la II prevedeva la riduzione da 30 minuti a 20 al secondo giorno e a 10 al terzo; tale tempo veniva poi mantenuto fino al decimo giorno e dopo veniva ridotto di 30 secondi al giorno fino ad arrivare a un tempo di sedimentazione di 5 minuti. Per il pH i due livelli sono stati identificati con un preciso range di valori, e lo stesso per la temperatura.

Ciascuno di questi parametri con i rispettivi livelli (-1) oppure (+1), è stato dunque inserito nella matrice di Hadamard (Tabella 2.2). Le righe e colonne di questa matrice sono ortogonali tra di loro, quindi tutti i risultati sono interpretati come effetti principali e non è possibile identificare interazioni tra i vari parametri.

**Tabella 2.2:** Matrice di Hadamard utilizzata per la sperimentazione (Lochmatter e Holliger, 2014).

Run	Parameter						
	Contaminant load	Aeration strategy	Allylthiourea	Airflow velocity	Settling time	pH	Temperature
1	+	+	+	-	+	-	-
2	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	-	+
4	+	-	-	+	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-	+	+
7	+	+	-	+	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-

Gli esperimenti sono stati condotti nel corso di 15 giorni in un impianto SBR di 2,4 L. Il successo dei diversi esperimenti è stato valutato in numero di giorni necessari allo start-up. Per stabilire il successo o l'insuccesso di ogni esperimento, sono stati presi in considerazione 5 processi: la rimozione del COD in condizioni anaerobiche, la rimozione dell'ammonio, la rimozione dell'azoto totale, la rimozione del fosforo e infine la crescita della biomassa e la granulazione. Per ciascuno di questi processi è stato stabilito un criterio di successo, secondo il quale la media dei valori osservati per tre giorni doveva essere superiore a un limite stabilito a priori. Secondo questo approccio, l'esperimento si riteneva concluso con successo se tutti e cinque i criteri per ogni processo venivano raggiunti. Una penalità è stata assegnata a ciascun processo se il successo veniva raggiunto oltre i 15 giorni; tale penalità è stata calcolata considerando la differenza osservata tra il valore limite prefissato e il massimo valore raggiunto. L'impatto dei diversi parametri sul processo è stato calcolato risolvendo il sistema di equazioni lineari risultanti dalla matrice di Plackett-Burman.

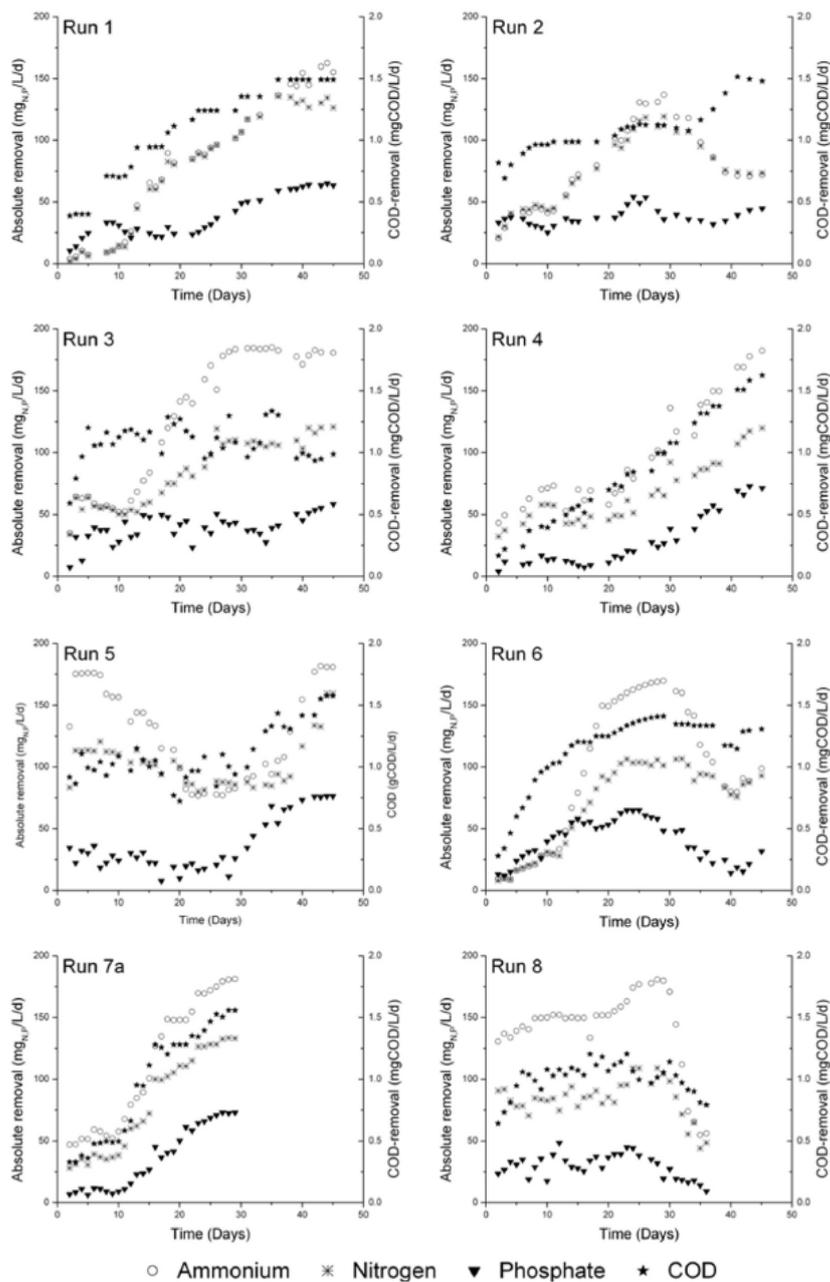


Figura 2.1: Rendimenti di rimozione del COD, azoto e fosforo negli 8 esperimenti (Lochmatter e Holliger, 2014).

I risultati riportati in figura 2.1, mostrano come solo per gli esperimenti 1,3,4 e 5 sono stati ottenuti entro il 45° giorno, mentre per gli esperimenti 2, 6 e 8 essi sono stati raggiunti entro il 25° giorno. Negli esperimenti 1, 5 e 7, tutti e quattro i criteri relativi alle performance sono stati soddisfatti prima del 45° giorno. Nel secondo esperimento non si sono soddisfatti i criteri dell'ammonio e del fosforo, nel terzo invece quello del COD e del fosforo, nel quarto quello dell'azoto e nell'ottavo quelli del COD, azoto e fosforo. I giorni operativi necessari al soddisfacimento dei criteri sono riportati in tabella per ciascun esperimento effettuato.

**Tabella 2.3:** Numero di giorni necessari a raggiungere i criteri prestabiliti per ciascun esperimento (Lochmatter e Holliger, 2014).

	Anaerobic COD-removal	P-removal	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -removal	N-removal	Biomass growth and granulation	Overall startup time
Run 1	37	37	44	33	32	44
Run 2	40	(38) <sup>a</sup>	(45) <sup>a</sup>	27	15	45
Run 3	(41) <sup>a</sup>	(50) <sup>a</sup>	25	44	16	50
Run 4	36	40	41	(46) <sup>a</sup>	24	46
Run 5	40	38	41	41	27	41
Run 6	27	22	22	(38) <sup>a</sup>	13	38
Run 7	24	22	23.5	26.5	15	26.5
Run 8	(40) <sup>a</sup>	(52) <sup>a</sup>	23	(40) <sup>a</sup>	15	52

I principali parametri che hanno influenzato in maniera significativa la durata dello start-up sono stati la strategia di aerazione, la strategia di sedimentazione, il carico di contaminante, il pH e la temperatura (tabella 2.3). La maggior parte dei parametri tuttavia, ha avuto solo influenza su specifici processi e non su altri, e inoltre alcuni parametri hanno effetti positivi su alcuni e negativi su altri. La strategia di aerazione è stato il parametro ad avere l'impatto più elevato sullo start-up. L'alternanza di elevate e basse concentrazioni di ossigeno ha avuto effetti positivi sulla rimozione di azoto e fosforo, mentre la strategia a concentrazione di ossigeno costante ha avuto successo sulla nitrificazione e sullo SVI. I risultati ottenuti risultarono in linea con quanto riportato nella letteratura scientifica. Altri autori riportano infatti che elevate concentrazioni di ossigeno sono favorevoli per l'ottenimento di elevate efficienze di nitrificazione (Beun et al., 2001; Mosquera-Corral et al., 2005), mentre l'alternanza di elevate e basse concentrazioni risulta favorevole alla rimozione simultanea dei nutrienti (Lochmatter et al., 2013). Il miglioramento delle performance sul fosforo è stato presumibilmente dovuto alla competizione per il COD tra batteri denitrificanti e PAOs, vantaggio di questi ultimi. A elevate concentrazioni di ossigeno, l'accumulo di N-NO<sub>x</sub> ha aumentato la competizione tra i batteri PAOs e i denitrificanti, finendo per favorire questi ultimi stante la mancanza delle condizioni anaerobiche necessarie all'acclimatazione dei primi. La prima strategia di sedimentazione ha avuto un impatto positivo sulle tempistiche dello start-up così come su tutti e cinque i processi separatamente. Con la strategia II si è osservato un rapido wash-out tra il decimo e ventesimo giorno, mentre con la I il wash-out è stato osservato dopo il 25° giorno. È stato osservato

un collegamento diretto tra il wash-out e la rimozione dei nutrienti. Come osservato da **Pijuan et al. (2011)**, il controllo del wash-out iniziale è fondamentale per ottenere buone performance di rimozione dei nutrienti. Nessuna delle due strategie provate si è rivelata ottimale ai fini della riduzione del wash-out, in quanto in entrambe il massiccio dilavamento di biomassa si è verificato seppure in tempi diversi. La granulazione si è ottenuta in entrambi i casi, ma in ogni caso è consigliabile non ridurre i tempi di sedimentazione al di sotto dei 10 minuti. Per quanto riguarda il carico di contaminante (COD), inizialmente esso è stato un handicap per il sistema, ma con il tempo si è rivelato un fattore decisivo sia per le performance che per la stabilità strutturale dei granuli. L'obiettivo di tale strategia era quello di favorire lo sviluppo dei batteri PAOs che sono in grado di stoccare all'interno delle loro cellule gli acidi grassi volatili prodotti dalla degradazione della sostanza organica in condizioni anaerobiche, e di sopportare la carenza di COD in condizioni aerobiche (**Weissbrodt et al., 2012**). L'uptake di COD in condizioni anaerobiche è ritenuto essere un parametro fondamentale per la rimozione del fosforo e per la stabilità dei granuli nel lungo periodo (**de Kreuk e van Loosdrecht 2004**). Infatti, lo sviluppo di batteri a crescita lenta, al posto degli ordinari batteri eterotrofi è un aspetto ritenuto molto importante per lo sviluppo di granuli stabili (**Liu et al., 2004; Wan et al., 2009**). La disponibilità di COD nel periodo di aerazione è infatti favorevole allo sviluppo di batteri filamentosi, che determinano la formazione di granuli instabili (**McSwain et al., 2004**). Riguardo la temperatura, è noto come temperature basse determinino scarse performance di rimozione dell'azoto, mentre per quanto concerne il fosforo la questione è più complessa. A temperature di circa 20°C, l'attività dei batteri PAOs è massima, ma allo stesso tempo lo è quella dei GAOs, loro principali antagonisti. Tuttavia, in precise condizioni, dettate dal carico e dalla suddivisione del ciclo di reazione, alla temperatura di 20°C la specie dominante è proprio quella dei PAOs. Riguardo il pH invece, bassi valori hanno avuto effetti buoni sulla rimozione dell'azoto, mentre quelli maggiori sul fosforo, confermando così i risultati ottenuti da **Weissbrodt et al. (2013)**. Le due strategie di aerazione non hanno avuto effetti significativi sulla durata dello start-up. I valori di aerazione maggiori hanno avuto effetti positivi sia sul contenuto di solidi volatili sia sullo SVI.

In conclusione, sulla base degli esperimenti effettuati, gli autori ritengono che per ottenere una rapida formazione dei granuli capaci di rimuovere anche i nutrienti, è necessario alternare elevate e basse concentrazioni di ossigeno, adottare una recisa strategia di sedimentazione al fine di evitare il massiccio dilavamento di biomassa, adattare il carico di COD in funzione della capacità dei batteri di rimuoverlo in condizioni anaerobiche, temperature nell'ordine dei 20°C e infine pH neutri.

In letteratura sono presenti altri studi finalizzati ad un rapido start-up dei sistemi a biomassa granulare. Tra questi va citato lo studio condotto da **Pijuan et al. (2011)**. Gli autori in particolare hanno proposto una nuova strategia per ridurre i tempi di start-up, che consiste nell'inoculo con fango fioccoso e granuli sfaldati. Gli autori

hanno confrontato diverse combinazioni di fango granulare e fioccoso, in impianti SBR che trattavano reflui di mattatoio. I granuli sono stati prelevati da un impianto che trattava anch'esso reflui di mattatoio, e dopo frantumazione manuale sono stati inoculati in un altro impianto insieme al fango fioccoso, prelevato a sua volta da un impianto municipale. Gli autori hanno inoculato sette impianti a scala di laboratorio (volume 2 L), di cui sei inoculati con diverse percentuali di fango granulare (5, 10, 15, 25, 30 e 50%) e uno con fango fioccoso. Inizialmente il tempo di sedimentazione applicato fu di 20 minuti per tutti i reattori, e progressivamente fu ridotto a 10 nei successivi 10 giorni e infine a 5 minuti. Quando la granulazione fu completa esso venne ridotto a 1,5 minuti. Il ciclo di reazione comprendeva invece una prima fase anaerobica in cui veniva alimentato il 75% del carico, seguita da una prima fase aerobica e poi anossica, e successivamente una seconda fase anaerobica in cui veniva alimentato il restante 25% del substrato e una seconda fase aerobica e anossica. Anche il rapporto di scambio volumetrico fu progressivamente aumentato dal 15 al 50%, al fine di aumentare in maniera graduale il carico alimentato. Nell'impianto inoculato con solo fango fioccoso la granulazione non è stata ottenuta, nonostante il tempo di sedimentazione sia stato progressivamente ridotto nelle prime fasi al fine di limitare un massiccio wash-out di biomassa. Nel tempo la concentrazione di biomassa si ridusse progressivamente fino a 1 gSST/L e le dimensioni degli aggregati non superarono i 100 micron. Nei restanti sei reattori inoculati con granuli rotti e fango attivo fioccoso, la completa granulazione fu ottenuta in tempi differenti, e anche le caratteristiche dei granuli in termini di dimensioni ( $d_{10}$ ,  $d_{50}$ ,  $d_{90}$ ) erano diverse (Figura 2.2).

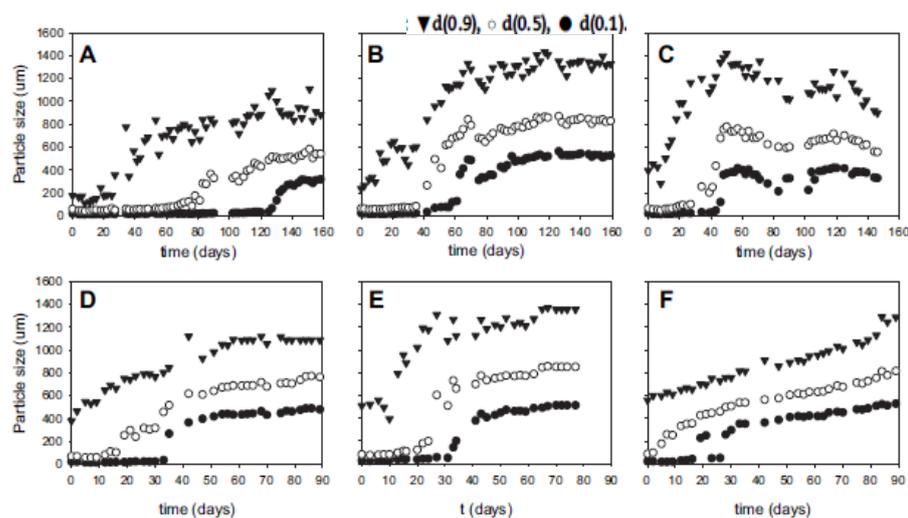


Figura 2.2: Andamento delle frazioni granulometriche dei granuli (Pijuan et al., 2011).

Gli autori osservarono che al crescere della percentuale di granuli nell'inoculo, il tempo di granulazione si è ridotto esponenzialmente.

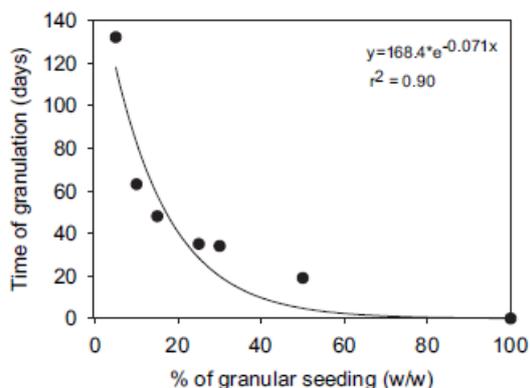


Figura 2.3: Andamento del tempo di granulazione in funzione della percentuale di fango granulare nell'inoculo (Pijuan et al., 2011).

In tutti i reattori, lo spurgo di biomassa non è stato controllato, ma si autoregolava attraverso lo scarico successivo alla fase di sedimentazione. La più rapida crescita di biomassa è stata osservata nei reattori a maggiore percentuale di fango granulare di inoculo (Figura 2.4).

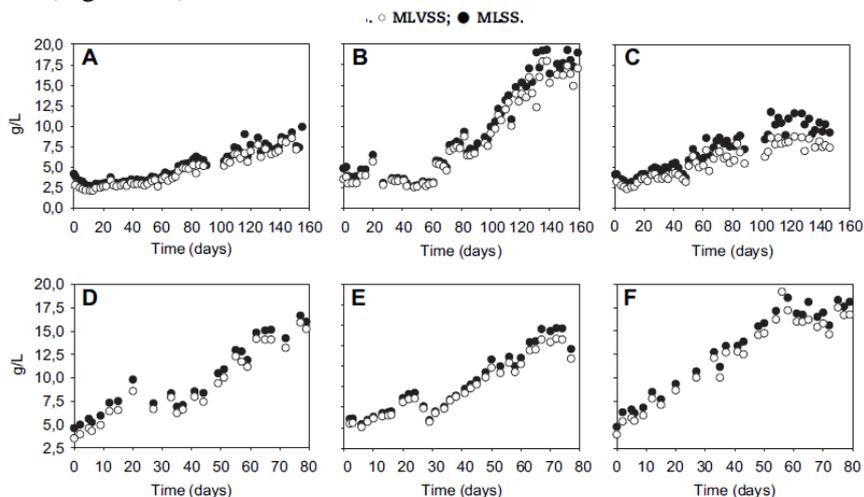
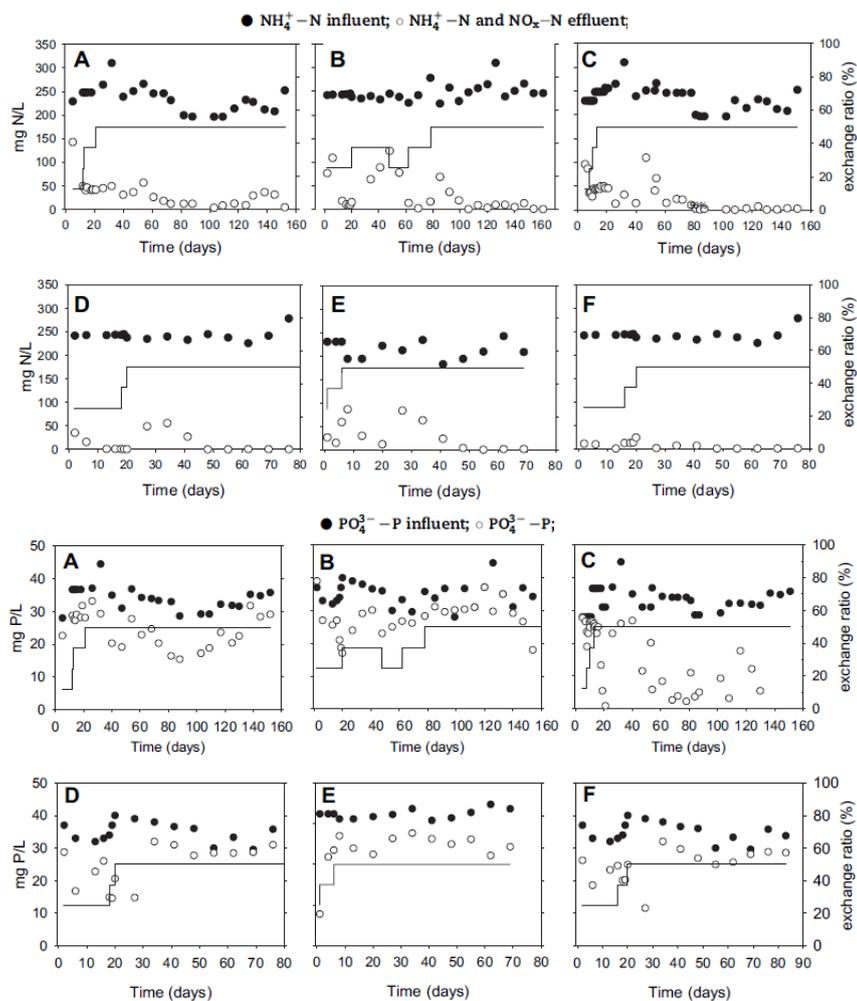


Figura 2.4: Andamento della concentrazione di SSV e SST nel tempo in funzione della percentuale di fango granulare nell'inoculo (Pijuan et al., 2011).

I rendimenti di rimozione dell'azoto sono stati abbastanza soddisfacenti, quasi sempre superiori al 90% anche quando si è aumentato il carico influente, a seguito dell'aumento del rapporto di scambio volumetrico. Riguardo il fosforo invece i rendimenti sono stati più bassi (Figura 2.5). Tale risultato conferma quelli ottenuti da altri autori, i quali mostrano come le elevate concentrazioni di ammonio ( $> 200 \text{ mg L}^{-1}$ ), conducono a un accumulo di nitriti e nitrati che sono dannosi per lo sviluppo dei batteri PAOs (Lemaire et al., 2009; Pijuan e Yuan 2009).

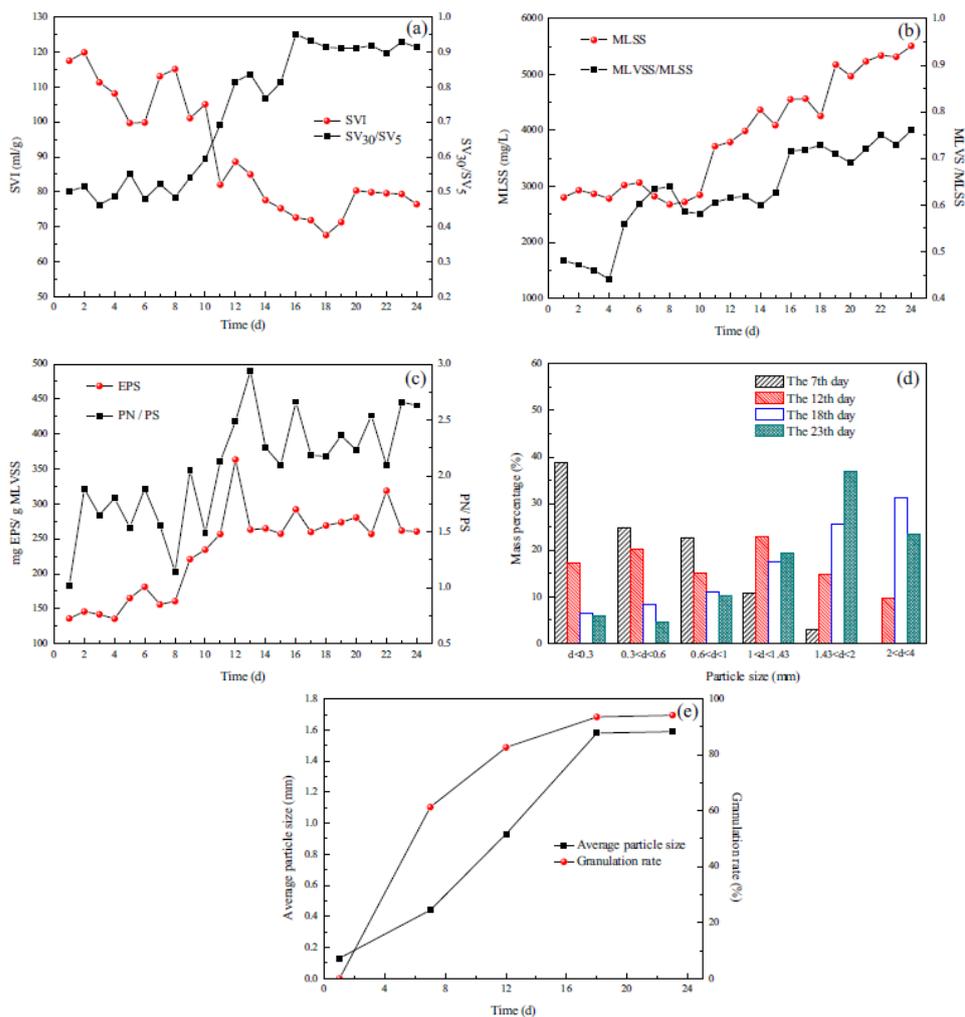


**Figura 2.5:** Andamento dei rendimenti di rimozione dell'azoto e del fosforo nel tempo in funzione della percentuale di fango granulare nell'inoculo (Pijuan et al., 2011).

Gli autori conclusero il loro lavoro affermando dunque che l'inoculo di fango granulare effettivamente riduce sensibilmente i tempi di start-up in misura maggiore quanto maggiore è la frazione di fango granulare, anche se le interazioni che si realizzano tra il fango granulare e il fango attivo fioccoso non sono state analizzate. In questo modo, oltre a ottenere un processo di granulazione più rapido, i granuli sono in grado di rimuovere efficacemente sia la sostanza organica che i nutrienti. Da questi studi appare è chiara l'importanza del ruolo del fango di inoculo nel processo di granulazione (Coma et al., 2012). Un'ulteriore approfondimento sul tema è stato fatto da Long et al. (2014), i quali hanno analizzato nel dettaglio cosa succede inoculando fango granulare e fango attivo fioccoso, approfondendo dunque il lavoro svolto da Pijuan et al. (2011). Gli autori inocularono un impianto a scala pilota (volume 100 L) con del fango attivo fioccoso, e ridussero gradualmente il tempo di sedimentazione da 25 minuti a 10 nel corso di 12 giorni. Al dodicesimo giorno venne aggiunto un noto volume di fango granulare, coltivato in precedenza in un impianto a scala di laboratorio, in modo che il rapporto in peso tra fango attivo e granulare fosse 3 a 1 (75% fango attivo e 25% granulare). Gradualmente nel reattore cominciò ad essere dominante una specie batterica chiamata *Zooglea*, un particolare ceppo batterico che si sviluppa in condizioni di abbondanza di substrato a svantaggio dei batteri filamentosi, caratterizzati da una velocità di crescita inferiore. Il fango granulare divenne dominante nel reattore al 17° giorno e il tasso di granulazione aumentò in maniera significativa a partire dal 19° giorno. Col tempo aumentò pure il contenuto di EPS, che garantì il mantenimento di granuli con ottime caratteristiche strutturali (Figura 2.6).

Le performance di processo in termini di rimozione del COD, azoto e fosforo si sono mantenute su standard elevati per tutta la durata della sperimentazione. Dall'analisi dei trend delle concentrazioni di nitriti e nitrati, gli autori hanno dedotto che per ottenere buone performance di rimozione dell'azoto è necessario più tempo rispetto a quello per la formazione dei granuli. Gli autori hanno altresì analizzato l'andamento delle concentrazioni dei vari inquinanti in un ciclo di reazione. La concentrazione di COD, azoto ammoniacale e fosforo al termine del periodo anaerobico rimase sempre relativamente alta; successivamente le loro concentrazioni si riducevano sensibilmente all'inizio della fase aerobica (miscelata) in seguito a fenomeni di adsorbimento biologico. I nitriti si mantenevano su valori complessivamente bassi (< 1 mg/L); in particolare, aumentavano nella fase iniziale della fase aerobica, e successivamente diminuivano, contestualmente all'aumento di nitrati nel bulk. I nitrati invece venivano ridotti nella fase anaerobica, mentre nel periodo aerobico si osservava un leggero tratto decrescente, coincidente con l'accumulo di nitriti nel reattore, a testimonianza che il processo di nitrificazione fosse in parte ossigeno limitato. Successivamente la concentrazione di nitrati continuava a crescere, risultando nel loro accumulo nell'effluente, a causa

probabilmente della carenza di carbonio che limitava il processo di denitrificazione (Figura 2.7).



**Figura 2.6:** Andamento di SVI (a), SST, SSV (b), EPS (c), distribuzione granulometrica (d) e dimensioni medie dei granuli (e) nel tempo. (Long et al., 2014).

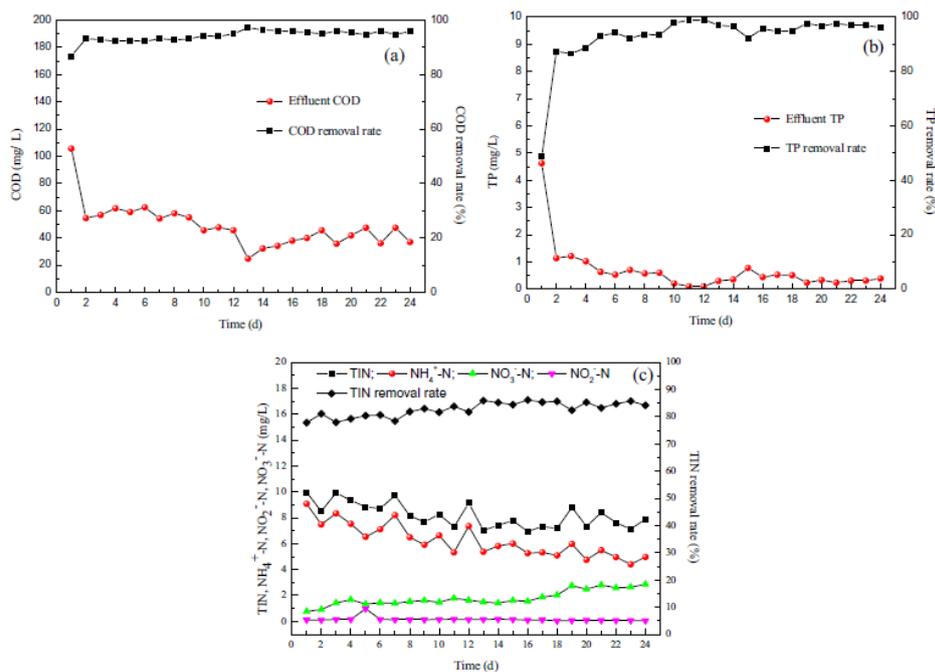


Figura 2.7: Andamento dei rendimenti di rimozione di COD (a), fosforo (b) e azoto nel tempo. (Long et al., 2014).

Sebbene ci siano diverse ipotesi riguardo la formazione del fango granulare, ad oggi il loro meccanismo di formazione non è stato ancora chiarito in maniera esaustiva. Secondo l'esperienza maturata dagli autori, il meccanismo di rapida formazione dei granuli si basa sull'ipotesi di nucleazione (Lettinga et al., 1980) e sulla pressione di selezione, sia biologica che idraulica. Il fango viene infatti selezionato sia idraulicamente, in funzione delle sue capacità di sedimentazione e dai parametri operativi imposti, che biologicamente, in funzione del carico e del tipo di alimento che determina lo sviluppo di alcune specie batteriche a discapito di altre. Secondo l'ipotesi avanzata dagli autori, la formazione del fango granulare è simile al processo di cristallizzazione, in cui, il fango di inoculo, la precipitazione di sali inorganici o il materiale inerte possono essere utilizzati come nucleo di aggregazione su cui si sviluppa l'intera struttura del granulo. Le pressioni di selezione sono state garantite imponendo alternanza di fasi anaerobiche e aerobiche, attraverso la composizione dell'influente, applicando inoltre bassi tempi di sedimentazione e garantendo elevati flussi d'aria. In tali condizioni, il reattore si è progressivamente arricchito di *Zooglea* e di cellule idrofobiche e, inoltre, ha limitato lo sviluppo di batteri filamentosi, nocivi nel lungo termine per la struttura del granulo. L'inoculo di fango granulare già formato ha accelerato il processo di granulazione, in quanto i granuli già stabili fungevano da nucleo di addensamento e

supporto per l'altro fango. Il fango granulare inoculato non si è sfaldato in quanto i tempi di sedimentazione al momento dell'inoculo erano bassi, tali dunque da garantire una sufficiente pressione di selezione (**Qin et al., 2004**). È dunque importante scegliere in maniera opportuna il momento esatto in cui effettuare l'inoculo. Quindi l'inoculo di fango granulare serve da nucleo di aggregazione per la biomassa fioccosa, e inoltre non si verifica lo sfaldamento e la successiva riaggregazione del fango granulare che aumenta sensibilmente il tempo di granulazione.

### 2.3 Problematiche gestionali di un impianto a biomassa granulare: perdita di stabilità dei granuli nel lungo periodo

La perdita di stabilità dei fanghi granulari rimane ad oggi il maggiore ostacolo alla loro diffusione in scala reale. Diversi autori hanno infatti evidenziato che i granuli aerobici tendono a disintegrarsi nel lungo periodo (**Adav e Lee, 2008; Adav et al., 2010**). Una serie di meccanismi sono stati ipotizzati per spiegare questo comportamento, tra i quali lo sviluppo eccessivo di batteri filamentosi, l'idrolisi del nucleo, la perdita di funzionalità di specifici ceppi batterici e infine le EPS.

La densità e la stabilità strutturale dei granuli è stata inversamente correlata al tasso di crescita dei microrganismi. L'elevato tasso di crescita di alcuni ceppi batterici favorisce la formazione e lo sviluppo di granuli di grosse dimensioni che tuttavia hanno una bassa densità e una struttura instabile. La crescita di batteri filamentosi ad esempio può dar luogo a granuli poco stabili che vengono facilmente dilavati con l'effluente per via delle loro scarse caratteristiche strutturali. **Liu e Liu, (2006)** osservarono che l'eccessivo sviluppo di batteri filamentosi si verificava in condizioni di basso ossigeno disciolto. Inoltre, carichi organici superiori a  $6,0 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$  sebbene favorivano lo sviluppo dei granuli in poco tempo, la loro struttura gradualmente peggiorava a causa dello sviluppo di batteri filamentosi al loro interno. Le dimensioni di questi granuli crescevano talmente tanto al punto da limitare il trasporto di materia al loro interno, dove in seguito all'instaurarsi di condizioni anaerobiche i prodotti della fermentazione causavano la rottura dei granuli. I batteri filamentosi determinano inoltre la crescita della biomassa in forma adesa sulle superfici dei reattori e sugli organi di scarico causando ingenti problemi di carattere gestionale. **Adav et al. (2007)** studiarono la granulazione in tre reattori identici alimentati con fenolo ed aerati a diversa intensità. Per bassi valori del tasso di aerazione ( $1 \text{ L min}^{-1}$ ), non si sono formati i granuli, per valori maggiori ( $3 \text{ L min}^{-1}$ ) i granuli erano stabili, mentre per valori intermedi ( $2 \text{ L min}^{-1}$ ) i granuli erano di grosse dimensioni (5 mm) e dominati da batteri filamentosi. Gli autori conclusero affermando che la causa della crescita eccessiva di filamentosi era dovuta alla bassa concentrazione di ossigeno dovuta al ridotto flusso d'aria e contestualmente alla minore intensità degli sforzi di taglio che non determinava la

rottura dei filamenti in eccesso. Elevate concentrazioni di ossigeno e sforzi di taglio sono dunque necessari per limitare lo sviluppo dei batteri filamentosi.

Un altro meccanismo che viene chiamato in causa per lo sfaldamento dei granuli è l'idrolisi del nucleo dei granuli. **Zhang et al. (2007)** proposero che la limitazione del trasporto di materia all'interno dei granuli più grandi produce la formazione di strati anaerobici molto consistenti, all'interno dei quali l'instaurarsi di fenomeni fermentativi determina la rottura dei granuli. **Adav et al. (2009)** osservarono la presenza di alcuni ceppi batterici come la *Pseudomonas* e l'*Acinetobacter* che determinavano il deterioramento del nucleo dei granuli. **Adav et al. (2010)** osservarono inoltre che per carichi molto elevati ( $>20 \text{ KgCOD m}^{-3} \cdot \text{giorno}^{-1}$ ) i ceppi batterici perdevano la capacità di produrre EPS e contestualmente la capacità di aggregarsi. **Lemaire et al. (2008)** dichiararono invece che la rottura dei granuli maturi era da addebitarsi alla ostruzione dei pori e delle canalizzazioni interne dei granuli. Le EPS venivano in questo modo mineralizzate in quanto utilizzate come fonte di carbonio, così la struttura dei granuli si indeboliva fino allo sfaldamento. I granuli diventano instabili se soggetti a elevati periodi di starvation. **Adav et al. (2009)** commentarono che la perdita di stabilità è causata dall'idrolisi delle proteine negli strati interni. Indebolendosi il nucleo dei granuli, che ne rappresenta la struttura portante, in seguito agli elevati sforzi di taglio i granuli si sfaldano molto rapidamente.

Un altro meccanismo proposto è la perdita da parte di alcuni ceppi batterici di produrre EPS. **Zhang et al. (2007)** riportano che per elevati valori del carico organico ( $4-12 \text{ KgCOD m}^{-3} \cdot \text{giorno}^{-1}$ ) la produzione di proteine si riduce e i granuli diventano instabili fino a disintegrarsi. Inoltre, la produzione di ATP da parte delle cellule batteriche che viene utilizzato come fonte di energia per idrolisi delle proteine, determina lo sfaldamento rapido dei granuli. **Jiang e Liu, (2010)** osservarono che al diminuire della quantità di ATP la stabilità strutturale dei granuli non subiva peggioramenti.

Un'ulteriore causa dello sfaldamento dei granuli, per molti aspetti collegato al precedente, è legato al ruolo strutturante delle EPS. Le EPS sono prodotti del metabolismo batterico che si accumulano sulla superficie delle cellule batteriche alterandone le caratteristiche fisico-chimiche, tra le quali l'idrofobicità. I batteri dunque secernono una grande quantità di proteine, carboidrati, acidi umici e lipidi, che favoriscono la reciproca aggregazione delle cellule batteriche fino a formare i granuli (**Liu e Tay, 2004**). È stato ipotizzato che le EPS imbrigliano le cellule batteriche formando una fitta matrice di polimeri formando i precursori dei granuli aerobici. **Wang et al. (2005)** osservarono che la superficie esterna dei granuli era costituita da polisaccaridi i quali garantivano il mantenimento strutturale dei granuli. **Zhang et al. (2007)** osservarono che il nucleo dei granuli era formato da proteine e che questo svolgeva un ruolo primario nel loro mantenimento. **Adav et al. (2010)** studiarono la stabilità dei granuli additivati di enzimi che idrolizzavano in maniera selettiva le proteine. Gli autori osservarono che sebbene il contenuto di

proteine si riducesse in maniera significativa, la stabilità dei granuli non era significativamente inficiata. Invece, l'idrolisi dei polisaccaridi causava una grave perdita di stabilità. I polisaccaridi secondo gli autori formano una vastissima matrice che costituisce la spina dorsale dei granuli, all'interno della quale vengono assemblate proteine e altre sostanze. L'eccesso del contenuto di polisaccaridi promuove l'adesione microbica. Gli sforzi di taglio addensano tale struttura, ma non hanno effetto sul contenuto di EPS né sulla loro composizione (**Di Iaconi et al., 2006**). Altri studi riportano invece che il contenuto di proteine è circa 8-10 volte maggiore rispetto a quello dei carboidrati. Ciò è stato dimostrato essere dovuto al metodo di estrazione adottato (**Adav e Lee, 2008**). **Lin et al. (2008)** osservarono che i granuli erano prevalentemente costituiti da un esopolisaccaride strutturalmente simile all'alginato, che legandosi con gli ioni calcio formava la densa struttura portante dei granuli. Tali sostanze essendo fortemente idrofobiche favorivano l'adesione cellulare e quindi la formazione e il mantenimento strutturale dei granuli.

Altre cause che portano allo sfaldamento dei granuli sono le condizioni operative. **Wang et al. (2008)** osservarono che i granuli aerobici si disintegravano se alimentati in continuo. **Jiang et al. (2010)** osservarono invece che lo sfaldamento dei granuli si verificava in seguito a shock di carico organico. **Li e Wang, (2008)** coltivarono granuli con reflui salini (1-5%), e notarono che al crescere della salinità si inibiva lo sviluppo di batteri filamentosi e così la stabilità strutturale dei granuli aumentava.

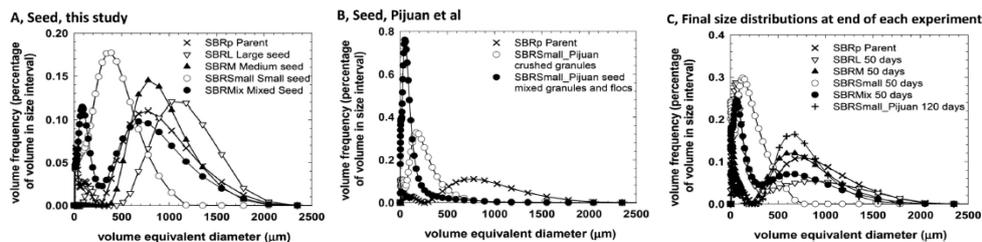
## 2.4 Meccanismi di rottura dei granuli aerobici e strategie di controllo

I vantaggi offerti dai sistemi a biomassa granulare sono tanti rispetto a quelli convenzionali a fanghi attivi, per via della loro densa struttura che permette di semplificare la fase di sedimentazione, e di conseguenza l'ingombro e i costi di investimento per la realizzazione degli impianti (**de Bruin et al., 2004, Liu e Tay 2004**). Inoltre, la possibilità di ottenere all'interno di un unico reattore la rimozione simultanea dei nutrienti, riduce ancora la richiesta di volumi e quindi di aeree per lo sviluppo di altre vasche di processo (**de Kreuk et al., 2005**). Il meccanismo che porta alla formazione dei granuli è ancora oggi in fase di studio (**Ahn et al., 2009, Verawaty et al., 2012**). I sistemi a biomassa granulare sono particolari sistemi a biomassa adesa/sospesa, nei quali si verificano contestualmente fenomeni di aggregazione-disaggregazione cellulare, crescita e morte di microrganismi, produzione e consumo di EPS, predazione a opera di microrganismi superiori, ecc. Lo sviluppo dei fanghi granulari può avvenire a partire da una singola colonia ovvero dall'aggregazione di varie colonie più piccole. L'inoculo del reattore con specifici ceppi batterici (**Ivanov et al., 2008**), ovvero con granuli sfaldati e fango

fioccoso, può accelerare sensibilmente la formazione di nuovi granuli (**Pijuan et al., 2011, Verawaty et al., 2012**). Ciò significa che, se l'inoculo include frammenti di granuli, il processo di granulazione si realizza molto più rapidamente. I granuli vengono rappresentati attraverso una struttura tridimensionale, la quale causa la loro stratificazione e la speciazione metabolica in seguito a diverse dinamiche di diffusione dell'ossigeno e del substrato che si instaurano nella struttura del granulo stesso (**Tay et al., 2003**). Di conseguenza la limitazione del substrato all'interno dei granuli più grandi, può alterare l'attività microbiologica e determinare l'indebolimento strutturale dei granuli (**Toh et al., 2003, Liu et al., 2005**). Inoltre, le particelle più grandi sono maggiormente soggette ad impatto con altre particelle all'interno del reattore, e ciò costituisce un ulteriore rischio di sfaldamento. La struttura e le dimensioni dei granuli sono dei parametri cruciali per le performance del processo biologico. Un interessante studio che mette in evidenza e discute nel dettaglio tali aspetti è stato quello condotto da **Verawaty et al. (2013)**. Gli autori in particolare hanno focalizzato la loro attenzione sull'incidenza della dimensione dei granuli sulla loro propensione allo sfaldamento o frantumazione e di conseguenza sulla stabilità strutturale dei granuli nel lungo periodo. Gli autori hanno ipotizzato l'esistenza di una dimensione definita "critica" che può essere raggiunta dai granuli senza produrre disfunzioni significative. Tale parametro è certamente funzione delle caratteristiche del refluo, dall'aerazione, dalle caratteristiche del reattore e infine della concentrazione di biomassa al suo interno. A causa dell'impatto con gli altri granuli nel reattore, quelli più grandi ovvero che hanno una dimensione superiore a quella critica che per i motivi detti prima risultano strutturalmente più deboli, saranno caratterizzati da un tasso di crescita inferiore a quello di sfaldamento, e quindi tenderanno a rompersi finché la loro dimensione si ridurrà al di sotto di quella critica. Al contrario, il tasso di crescita dei granuli di dimensione minore a quella critica sarà maggiore al tasso di sfaldamento, così questi nel complesso si accresceranno fino a raggiungere e poi superare la dimensione critica. Per validare tale ipotesi gli autori utilizzarono un impianto pilota genitore per la coltivazione del fango granulare, alimentato con refluo proveniente da un mattatoio. Ottenuta la completa granulazione del fango, una volta che i granuli erano dunque stabili, il fango granulare venne suddiviso in tre frazioni, una grande ( $d > 1,8$  mm), una media ( $0,5 < d < 0,7$  mm) e una piccola ( $0,16 < d < 0,5$  mm), e tali frazioni vennero utilizzate come inoculo di altrettanti impianti. Un quarto impianto venne inoculato con una miscela di tali frazioni in modo da ricreare una composizione granulometrica simile a quella dell'impianto genitore.

A causa delle scarse performance biologiche dell'impianto con granuli piccoli, gli autori confrontarono i risultati degli altri impianti con quelli ottenuti da un altro studio (**Pijuan et al., 2011**), nel quale le dimensioni delle particelle appartenevano alla classe dei granuli piccoli. In questo studio in particolare, gli autori inocularono l'impianto con una miscela di fango granulare e fango fioccoso. Tutti gli impianti mostrarono buoni rendimenti di rimozione dei nutrienti per tutta la durata del

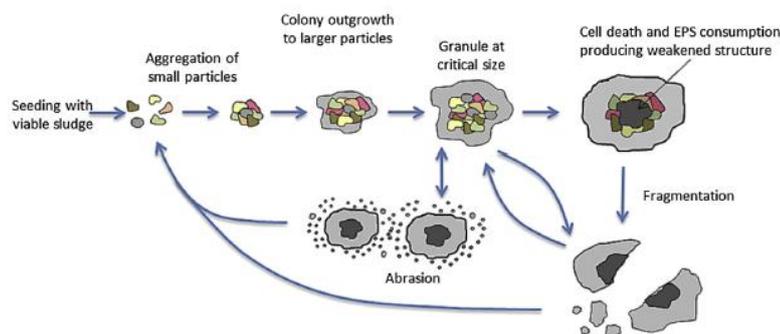
periodo di osservazione. In particolare, riguardo l'azoto, l'impianto con granuli grandi ( $SBR_L$ ) ha ottenuto rendimenti medi del 78%, quello con granuli medi ( $SBR_M$ ) dell'87%, mentre quello con granuli misti ( $SBR_{mix}$ ) dell'86%. Per quanto concerne il fosforo invece, i rendimenti medi furono rispettivamente del 49%, 29% e 30%. I rendimenti ottenuti nell'impianto con granuli piccoli non risultarono comparabili. Nei tre impianti prima citati, la concentrazione di solidi nel reattore si mantenne pressoché costante. La dimensione media dei granuli diminuì gradualmente nel reattore  $SBR_L$ , e la distribuzione dei granuli mutò progressivamente verso una distribuzione bimodale. Tale distribuzione era dunque caratterizzata da due picchi, di cui il primo, in corrispondenza di diametri minori, che metteva in luce la frammentazione dei granuli, e il secondo che individuava il residuo dei granuli dell'inoculo. Nel complesso, la dimensione media dei granuli diminuì, e a causa della loro frammentazione comparvero nel reattore granuli di dimensioni minori. Molti di essi tuttavia vennero poi dilavati con l'effluente, il che risultò nella graduale riduzione del percentile al 10%. Per quanto riguarda i granuli dell'impianto  $SBR_M$ , ovvero quello con granuli di dimensioni prossime alla presunta dimensione critica, si osservò nel tempo una graduale diminuzione della dimensione media. Nel tempo inoltre si osservò la comparsa di particelle più piccole, caratterizzate da una distribuzione granulometrica simile a quella d'inoculo dell'impianto con i granuli piccoli ( $SBR_S$ ). Come anticipato precedentemente, l'impianto inoculato con i granuli piccoli non ha fornito risultati soddisfacenti, in quanto a causa delle ridotte dimensioni dei granuli, questi sono stati quasi del tutto dilavati con l'effluente nel corso di 20 giorni. Nell'impianto  $SBR$  dello studio condotto da **Pijuan et al. (2011)**, i cui granuli avevano caratteristiche simili a quelle dell'impianto  $SBR_S$ , almeno in termini di dimensioni, ha mostrato un netto trend di crescita delle dimensioni medie degli aggregati, soprattutto a partire dal 75° giorno. A partire da questo giorno infatti, la distribuzione dei granuli divenne bimodale, evidenziando un picco minore, rappresentativo dei granuli di inoculo, e uno maggiore rappresentativo dei granuli di nuova formazione. Gradualmente, il picco dei granuli piccoli diminuì, mentre l'altro aumentò, indicando dunque la crescita dei granuli all'interno del reattore. Nell'impianto misto ( $SBR_{mix}$ ), l'andamento delle dimensioni dei granuli fu simile a quello osservato nell'impianto  $SBR_M$ . In particolare, si osservò sia la disgregazione dei granuli di dimensioni maggiori, con la conseguente progressiva riduzione del picco in corrispondenza dei diametri maggiori, e il suo graduale arretramento verso diametri via via minori (Figura 2.8).



**Figura 2.8:** Andamento della distribuzione granulometrica nel fango di inoculo (A), in quello della sperimentazione di Pijuan et al. (2011) (B), e al termine della sperimentazione in tutti i reattori. (Verawaty et al., 2013).

Sulla base dei risultati ottenuti, e sulla scorta di precedenti esperienze, gli autori cercarono di avanzare una possibile teoria circa l'evoluzione delle dimensioni dei granuli verso una condizione di pseudo-stazionarietà. Inizialmente il processo di granulazione prevede l'aggregazione di piccole particelle biologiche a formare dei piccoli e densi aggregati. Successivamente, la biomassa inizia a crescere su tali aggregati in forma adesa, determinandone l'aumento delle dimensioni; le collisioni tra queste piccole particelle possono inoltre favorire il loro aggregamento in strutture sempre più complesse e pesanti (Barr et al., 2010; Verawaty et al., 2012). È presumibile che i granuli aerobici subiscano nel tempo un processo di indebolimento a causa dei fenomeni erosivi e abrasivi che si sviluppano in virtù degli urti tra i granuli stessi o con altre componenti del reattore. Tutto ciò causa la diminuzione delle dimensioni dei granuli, in particolare di quelli di dimensioni maggiori che risultano pertanto maggiormente suscettibili allo sfaldamento. Ciò può essere in parte attribuito alla limitazione del substrato che indebolisce il nucleo dei granuli. La differenza principale rispetto all'influenza dei fenomeni di attrito è che la rottura/frammentazione causa una riduzione più pronunciata delle dimensioni, osservabile per altro attraverso la scomparsa dei granuli di dimensioni maggiori e la comparsa di quelli di dimensioni inferiori, mentre la riduzione delle dimensioni a causa dell'attrito è più graduale. La crescita e lo sfaldamento dei granuli si verificano simultaneamente nel reattore e l'effetto risultante dipende dal prevalere dell'uno o dell'altro. Il materiale che deriva dalla frammentazione dei granuli viene utilizzato come materiale disponibile per il successivo sviluppo di altri granuli (Lemaire et al., 2008). I granuli rotti infatti costituiscono un buon materiale di inoculo per accelerare lo start-up di un sistema a biomassa granulare (Pijuan et al., 2011). Secondo gli autori, i granuli di dimensioni superiori a quella critica, la quale dipende dalle condizioni operative e dal tipo di reflow principalmente, sono caratterizzati da un tasso di sfaldamento maggiore rispetto a quello di crescita, il cui effetto è una riduzione delle dimensioni al di sotto di quella critica. Al contrario, per i granuli di dimensioni inferiori, ci si aspetta che la crescita superi il tasso di sfaldamento, e che per tanto il risultato sia l'aumento delle dimensioni medie fino a raggiungere la dimensione critica. Il risultato

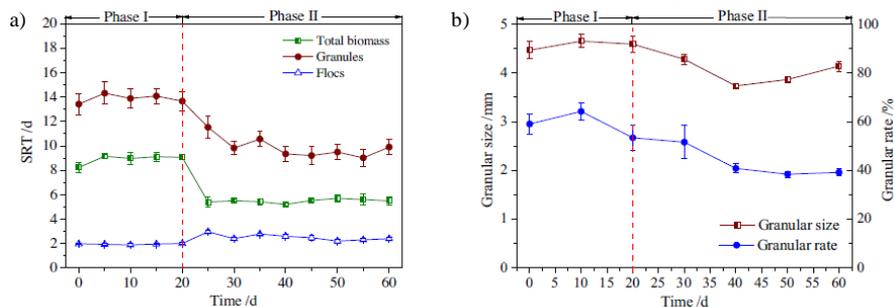
complessivo è una distribuzione pseudo-stazionaria delle dimensioni dei granuli intorno ad un valore di equilibrio che definisce appunto la dimensione critica dei granuli (figura 2.9).



**Figura 2.9:** Modello concettuale per la formazione/rottura dei granuli aerobici. (Verawaty et al., 2013).

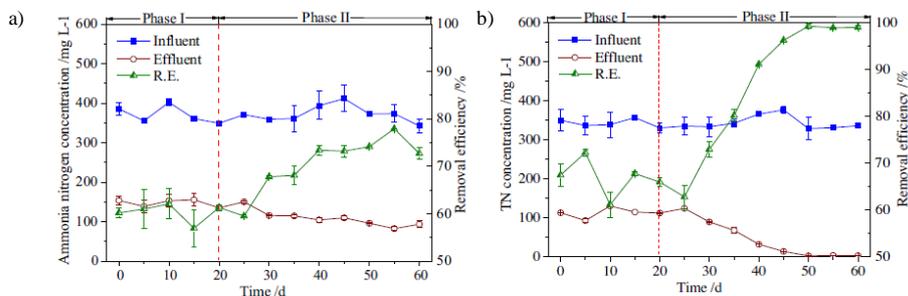
Il mantenimento di precise dimensioni dei granuli, seppur difficile da ottenere, è un prerequisito fondamentale per la buona riuscita dei processi biologici (Wang et al., 2007, Toh et al., 2003). Tuttavia, ciò è legato ad una serie di parametri difficilmente gestibili in maniera contestuale, e perciò le dimensioni dei granuli varieranno in funzione dei parametri geometrici e di processo di ciascun impianto. Il mantenimento di granuli con dimensioni prossime a quella critica è di fondamentale importanza per un impianto che opera a piena scala. Le scarse performance osservate nel caso dell'impianto con granuli piccoli, è stato dovuto alle dimensioni molto lontane da quella critica, che hanno determinato un rapido dilavamento della biomassa. In tali casi, gli autori suggeriscono una riduzione della pressione di selezione idraulica (aumento dei tempi di sedimentazione), per favorire così la formazione di granuli di dimensioni maggiori. Rimane tuttavia il problema della frammentazione dei granuli di dimensioni maggiori rispetto a quella critica. Il loro sfaldamento/rottura, comporterebbe infatti la formazione di piccoli granuli che non è detto riescano a permanere all'interno del reattore. Sebbene la riduzione dei tempi di sedimentazione possa indubbiamente favorirne la riaggregazione in nuovi e più grandi granuli, prevedere esattamente quando questa si verificherà non è semplice. Per tanto una strategia potrebbe essere quella di spurgare i granuli di dimensioni maggiori, prima che questi si rompano. Un interessante studio a riguardo è stato quello condotto da Zhu et al. (2013). Gli autori hanno studiato l'effetto dello scarico selettivo del fango granulare, sulle performance di processo dell'intero sistema, sia in termini di rimozione degli inquinanti che in termini di stabilità strutturale dei granuli. Gli autori suddivisero la campagna sperimentale in due fasi: nella prima gli autori imposero un tempo di sedimentazione di 1 minuto e uno scarico del 5% in volume del fango dalla parte

più bassa del reattore, mentre nel secondo, il tempo di sedimentazione fu aumentato a 1,5 minuti e il volume del fango scaricato al 10%. Gli autori calcolarono l'età del fango nel sistema, distinguendo tra quella del fango fioccoso e quella del fango granulare. Nella prima fase l'SRT del fango fioccoso era mediamente di 2 giorni, mentre quella del fango granulare di 14 giorni (Figura 2.10), nella seconda invece la prima aumentò a 3 giorni per via dell'aumento dei tempi di sedimentazione, mentre l'altra si ridusse a 9 giorni per via dell'aumento del volume di spurgo. Una ingente perdita di fango granulare con grandi dimensioni fece ridurre sensibilmente il tasso di granulazione e le dimensioni medie dei granuli. Entrambi i parametri successivamente aumentarono raggiungendo condizioni stazionarie al termine dell'attività sperimentale.



**Figura 2.10:** Andamento del SRT nel tempo per le varie frazioni di fango (a) e della dimensione media dei granuli e del tasso di granulazione (b). (Zhu et al., 2013).

L'efficienza di rimozione del COD si mantenne costante nei due periodi della campagna sperimentale. Riguardo l'azoto invece, nella prima fase, il rendimento di rimozione dell'azoto totale e dell'ammonio sono stati rispettivamente del 60% e 66%, mentre nel secondo aumentarono rispettivamente fino al 68% e 73% e si stabilizzarono al 75% e al 98% (Figura 2.11).



**Figura 2.11:** Andamento della concentrazione di azoto ammoniacale (a) ed azoto totale (b) nell'influente ed effluente e relativi rendimenti di rimozione. (Zhu et al., 2013).

Nella prima fase dunque il controllo dell'SRT ha consentito un buon sviluppo della comunità microbica, senza dunque avere effetti significativi sulla rimozione dei nutrienti. Nella seconda, la riduzione dell'SRT del fango granulare, e il mantenimento nel reattore della biomassa fioccosa che determinava la nascita di nuovi granuli, ha consentito un incremento dell'attività metabolica e di conseguenza il miglioramento delle performance di processo in particolare della denitrificazione.

Gli autori attribuirono le basse performance osservate nel primo periodo all'eccessivo invecchiamento della biomassa granulare. In tali condizioni infatti, le grandi dimensioni raggiunte dai granuli costituiscono un grande ostacolo alla diffusione dell'ossigeno e del substrato negli strati più interni, che di conseguenza tendono a mineralizzarsi, risultando di fatto inattivi ai fini del processo depurativo. Nel secondo periodo, l'aumento del rendimento di denitrificazione fu attribuito alla formazione di nuovi granuli, di dimensioni minori e tali dunque da permettere una migliore diffusione dell'ossigeno e del substrato negli strati prossimi al nucleo, ma sufficienti allo stesso tempo a garantire la coesistenza degli strati anaerobico, anossico e aerobico. Nel corso dei due periodi gli autori osservarono una significativa variazione del contenuto delle EPS (Figura 2.12). In particolare, nel secondo periodo, dopo il 35° giorno, il contenuto di EPS aumentò in maniera significativa, sia nella componente proteica che carboidratica, quando l'SRT venne ridotto. Si osservò in particolare un aumento del rapporto tra proteine e carboidrati, parametro ritenuto decisivo nella formazione di granuli strutturalmente stabili (de Kreuk et al., 2005).

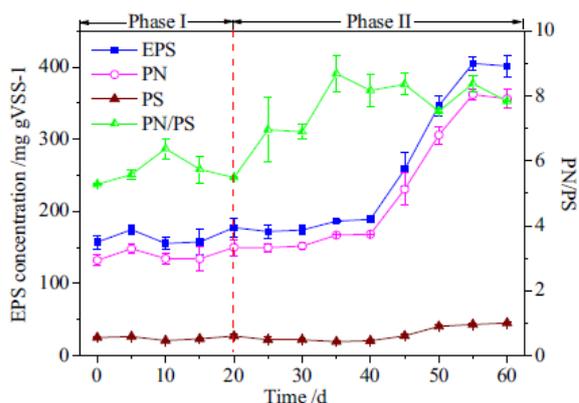


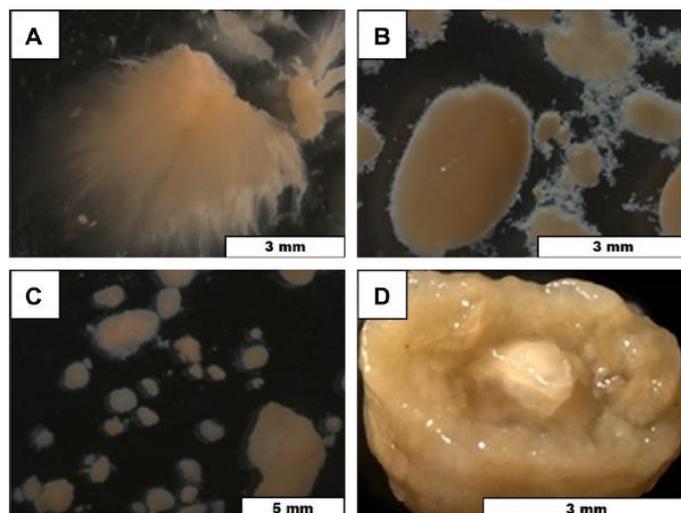
Figura 2.12: Andamento della concentrazione di EPS nei granuli. (Zhu et al., 2013).

Lo spurgo controllato dei granuli ha consentito dunque da un lato il mantenimento di granuli con buona caratteristiche strutturali, prevenendo dunque il loro sfaldamento e, dall'altro, il miglioramento delle performance di processo, legate alla formazione di nuovi granuli biologicamente più attivi. Il controllo dell'SRT ha

consentito inoltre il mantenimento di un tasso di granulazione piuttosto stabile, grazie anche alla maggiore produzione di EPS e in particolare della componente proteica.

La stabilità del fango granulare nel lungo periodo è un aspetto che riveste un'importanza fondamentale soprattutto negli impianti a scala pilota ovvero in quelli che lavorano in a piena scala. In tali impianto infatti, la stabilità dei granuli nel lungo periodo potrebbe essere influenzata anche dal carico influente, stante che molti di questi impianti, non sempre operano con un carico organico elevato. Uno studio interessante da citare a riguardo è stato quello condotto da **Isanta et al. (2012)**. Gli autori hanno monitorato per circa un anno le performance di un impianto a scala pilota (volume 100 litri) alimentato con un refluo sintetico a base di acetato e propionato di sodio ( $\text{COD} = 400 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{N-NH}_4 = 40 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{P-PO}_4 = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Gli autori suddivisero la loro campagna sperimentale in due periodi, con l'unica differenza che nel primo veniva effettuato uno spurgo controllato di fango al fine di mantenere l'età del fango intorno ai 20 giorni, mentre nel secondo l'età del fango non è stata controllata a causa dell'incremento incontrollato della concentrazione dei solidi sospesi nell'effluente; in tali condizioni l'età del fango era prossima a 12 giorni. Per il resto le modalità operative nei due periodi erano del tutto identiche. Gli autori ottennero la completa granulazione in circa 50 giorni, al termine della quale il fango granulare aveva una concentrazione di  $15 \text{ g L}^{-1}$ , un rapporto  $\text{SVI}_5/\text{SVI}_{30}$  pari a 1,05 e infine una frazione minerale (complemento a 1 del rapporto  $\text{SSV}/\text{SST}$ ) pari al 40%. Gli autori osservarono che quest'ultimo parametro aumentò sensibilmente ad un certo punto della sperimentazione. In particolare gli autori associarono ciò ad un inspiegato aumento del pH da 7 a 8.2. A queste condizioni di pH, la solubilità dei fosfati diminuisce e stante la presenza di ioni calcio nell'alimento, è possibile che si siano formati sali di fosfati che sono precipitati all'interno del nucleo dei granuli determinandone l'aumento della frazione mineralogica. Un improvviso aumento del carico organico influente, circostanza alquanto comune negli impianti operanti a scala pilota, determinò un parziale sfaldamento dei granuli intorno al 110° giorno.

L'aumento del carico infatti, secondo quanto riportato da **Picioreanu et al. (2000)**, determina da un lato la riduzione della concentrazione di ossigeno durante la fase di *feast*, per via del maggior contenuto di sostanza organica ossidabile, e dall'altro una riduzione del coefficiente di trasporto diffusivo dell'ossigeno. Queste condizioni risultano favorevoli allo sviluppo di batteri filamentosi, i quali proliferando all'interno del granulo tendono ad indebolirne la struttura (Figura 2.13).

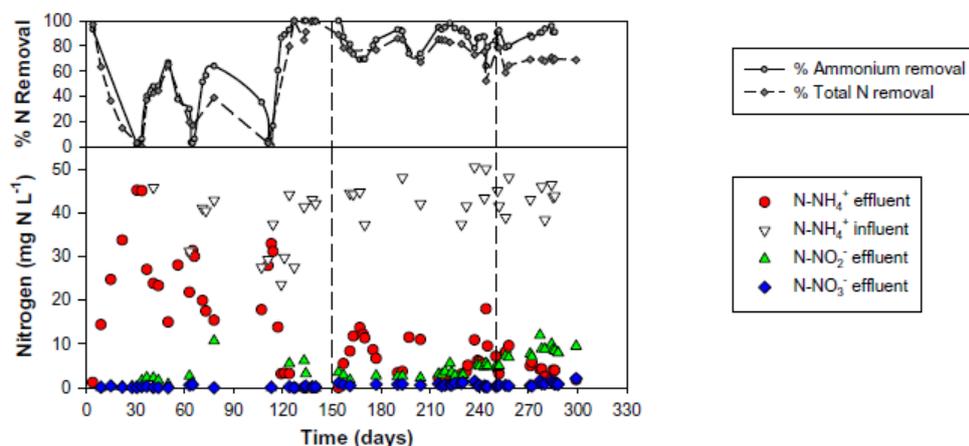


**Figura 2.13:** Immagini dei granuli al 120°giorno (A), al termine del I periodo (B) del secondo (C) e particolare del nucleo dei granuli. (Isanta et al., 2012).

Al contrario della concentrazione di biomassa e del contenuto inorganico dei granuli, i valori di SVI, densità e delle dimensioni dei granuli non cambiarono in maniera significativa nel corso dei 300 giorni di sperimentazione. Rispetto ad altri studi riportati in letteratura, i valori dei principali parametri caratterizzanti i granuli erano paragonabili; gli unici che si discostavano in maniera significativa erano la densità (valore medio  $120 \text{ gSST/L}_{\text{granuli}}$ ) e le dimensioni medie (1,2 mm). Gli autori attribuirono tali differenze da un lato al maggiore contenuto di frazione inorganica e dall'altro agli sforzi di taglio mediamente inferiori rispetto a quelli applicati nella maggior parte degli studi in letteratura.

I rendimenti di rimozione della sostanza organica furono soddisfacenti in tutto il periodo osservato. Riguardo l'azoto invece, gli autori osservarono che il rendimento di rimozione dell'ammonio era in media del 75% nel primo periodo e 85% nel secondo; tuttavia, la nitrificazione risultò incompleta in entrambi i periodi, con un significativo accumulo di nitriti nell'effluente. Gli autori stimarono che circa l'80% nell'ammonio ossidato veniva trasformato in nitriti, che in parte venivano ridotti direttamente ad azoto molecolare senza passare dal massimo stadio di ossidazione (nitrito). Il rendimento medio di rimozione dell'azoto totale si attestò dunque intorno al 60% (Figura 2.14). Gli autori sostengono che a causa delle dimensioni mediamente maggiori dei granuli rispetto a quelli riportati in altri studi (de Kreuk et al., 2005; Coma et al., 2012) e il maggiore addensamento dei granuli hanno causato, da un lato, la riduzione della superficie specifica dei granuli e, dall'altro, un maggiore ostacolo alla diffusione dell'ossigeno al loro interno. Il risultato di ciò, secondo gli autori, è stato che il processo di nitrificazione risultasse

ossigeno limitato, come confermato da altri lavori in letteratura (**Bartroli et al., 2010**).



**Figura 2.14:** Concentrazioni di ammonio, nitriti e nitrati nell’effluente e rendimenti depurativi (**Isanta et al., 2012**).

Questi ultimi ritengono che rapporti OD/ammonio inferiori di 0,3 sono favorevoli ad ottenere la completa nitratazione. Nello studio di **Isanta et al. (2012)**, tale rapporto era prossimo a 0,45-0,9, ma a causa delle dimensioni dei granuli mediamente maggiori (2,4 mm vs 0,9 mm) l’effetto era lo stesso a causa della limitata diffusione dell’ossigeno all’interno dei granuli. Da specifiche analisi microbiologiche (FISH), gli autori osservarono che il rapporto tra le frazioni di batteri AOB ed NOB era compresa tra 5 e 8, lontano dal rapporto ottimale (AOB/NOB = 2,25), indicando dunque che lo sviluppo dei batteri nitrito ossidanti era sfavorito (Tabella 2.4).

**Tabella 2.4:** Quantificazione microbiologica dei batteri AOB, NOB, PAO e GAO nei due periodi sperimentali. (**Isanta et al., 2012**).

	Period I	Period II
AOB fraction (%)	4 ± 2	10 ± 3
NOB fraction (%)	0.5 ± 0.5	2 ± 1
PAO fraction (%)	10 ± 3	5 ± 2
GAO fraction (%)	11 ± 4	2 ± 1

I rendimenti di denitrificazione variarono dal 90% nel primo periodo al 60% nel secondo. Riguardo il fosforo, i rendimenti medi furono del 65% nel primo e 50% nel secondo periodo. Gli autori osservarono che il rapporto tra la concentrazione di ortofosfati rilasciati e il COD consumato durante la fase anaerobica era piuttosto basso (0,11 mmolP mmolC<sup>-1</sup>), soprattutto se confrontato con i valori medi di

letteratura ( $0,3 \text{ mmolP}/\text{mmolC}^{-1}$ , **Pijuan et al., 2009**). Tale rapporto, secondo gli autori, può essere indice del consumo di COD da parte di specie batteriche in competizione con i PAOs, quali ad esempio i GAOs, ovvero di altre specie batteriche eterotrofe autrici della denitrificazione. In conclusione, gli autori osservarono che la riduzione dei rendimenti di rimozione dei nutrienti nel corso dell'anno di sperimentazione è stato dovuto alla graduale destabilizzazione dei granuli che ha causato sensibili perdite di biomassa. Gli autori non riuscirono ad individuare l'esatta causa di tale disfunzione, ma con tutta probabilità l'attribuirono alla formazione di precipitati di fosforo all'interno dei granuli che causarono la progressiva inertizzazione degli aggregati microbici. Gli autori concordano con **Zhu et al. (2013)**, che la strategia migliore per il mantenimento delle performance di processo nel lungo periodo è necessario effettuare uno spurgo selettivo dei granuli con contenuto di sostanza inerte più elevato. Lo spurgo va effettuato dal fondo del reattore, stante che tali granuli, essendo più densi, hanno una velocità di sedimentazione più elevata e quindi si ritrovano sul fondo del reattore al termine della fase di sedimentazione. Tale strategia andrebbe tuttavia analizzata più in dettaglio, in quanto si ritiene che possa favorire la proliferazione dei batteri GAOs, antagonisti della popolazione batterica dei PAOs.

## 2.5 Strategie per incentivare la stabilità dei granuli

A fronte delle disfunzioni precedentemente discusse, nella letteratura si trovano diversi studi che riportano alcune strategie finalizzate all'incremento della stabilità strutturale dei granuli nel lungo periodo. Tra queste vengono riportate l'applicazione di opportune condizioni operative, la selezione di microrganismi a crescita lenta, la soppressione dell'attività metabolica anaerobica e il rafforzamento del nucleo.

Tra i parametri gestionali, uno tra quelli più importanti per il mantenimento strutturale dei granuli è il carico organico volumetrico (**de Kreuk et al., 2005**). **Tay et al. (2004)** non riuscirono a coltivare i granuli per valori del carico inferiori a  $4 \text{ KgCOD m}^{-3}\cdot\text{giorno}^{-1}$ . Al contrario, **Moy et al. (2002)** notarono che i granuli erano instabili per valori superiori a  $9 \text{ KgCOD m}^{-3}\cdot\text{giorno}^{-1}$ . **Zheng et al. (2006)** osservarono che per valori superiori a  $6 \text{ KgCOD m}^{-3}\cdot\text{giorno}^{-1}$  i granuli erano dominati da batteri filamentosi e si sono in poco tempo disintegrati. La causa di tali disfunzioni venne identificata da **Liu e Liu, (2006)**. Secondo gli autori la causa dello sfaldamento dei granuli era legato all'insufficienza di ossigeno che per elevati valori di carico veniva consumato in grosse quantità, risultando per tanto limitante per alcuni ceppi batterici, e inoltre si creavano condizioni ideali per la proliferazione di batteri filamentosi. Per bassi valori del carico ( $2 \text{ KgCOD m}^{-3}\cdot\text{giorno}^{-1}$ ) i granuli si sviluppano lentamente ma risultano strutturalmente stabili in

quanto la crescita dei filamentosi è inibita. Per valori estremamente alti ( $>20 \text{ KgCOD m}^{-3}\cdot\text{giorno}^{-1}$ ) alcuni ceppi batterici perdono le proprie funzionalità e i granuli si sfaldano. Se quindi da un lato alti valori del carico promuovono lo sviluppo di batteri filamentosi, bassi valori ( $<1 \text{ KgCOD m}^{-3}\cdot\text{giorno}^{-1}$ ) sono favorevoli allo sviluppo di funghi, il cui effetto sulla stabilità dei granuli è analogo a quello dei batteri filamentosi.

Altro parametro gestionale che riveste un ruolo chiave nel mantenimento strutturale dei granuli è l'ossigeno disciolto. **McSwain e Irvine, (2008)**, osservarono che i granuli rimanevano stabili per concentrazioni superiori agli  $8 \text{ mg L}^{-1}$ . **Mosquera-Corral et al. (2005)** osservarono che i granuli diventavano instabili per concentrazioni di ossigeno inferiori al 40% del valore di saturazione. Al contrario **Wan e Sperandio, (2009)** ottennero granuli stabili per concentrazioni inferiori ai  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , purché fossero presenti in concentrazioni sufficienti nitrati o nitriti, altrimenti solamente i batteri situati nella parte superficiale dei granuli potevano sopravvivere. Gli autori notarono che l'ossigeno rivestiva un ruolo più importante rispetto agli sforzi di taglio. Per bassi valori di ossigeno, proliferavano i batteri a crescita rapida, come i filamentosi, i quali compromettevano la struttura dei granuli.

Un ulteriore parametro che influenza l'integrità strutturale dei granuli è la durata della fase di starvation. C'è divergenza di pensiero riguardo i suoi effetti sia sulla formazione dei granuli che sulla loro stabilità. Da un lato si afferma che elevati tempi di *famine* determinano un aumento dell'idrofobicità cellulare (**Liu et al., 2004**), dall'altro si pensa che le medesime condizioni ne determinano una sensibile riduzione (**Castellanos et al., 2000**). In ogni caso è stato osservato che la fase di *famine* non è un prerequisito della granulazione (**Liu e Tay, 2008**); in alcuni casi è riportato che favorisca la granulazione, mentre in altri che eccessive durate comportino un sensibile indebolimento della struttura dei granuli (**Wang et al., 2005**).

Un'altra strategia finalizzata al mantenimento strutturale dei granuli è la selezione di microrganismi a crescita lenta. **De Kreuk e van Loosdrecht, (2004)** dimostrarono che la selezione di batteri a crescita lenta come i PAO e GAO, migliorano le caratteristiche strutturali dei granuli. **Li et al. (2008)** notarono che la diversità biologica dei granuli diminuiva al crescere del carico organico. **Adav et al. (2009)** dimostrarono la presenza di batteri nitrificanti e denitrificanti in granuli aerobici stabili. La contemporanea presenza di tali batteri può tuttavia causare problemi operativi, in quanto la simultanea nitrificazione e denitrificazione può determinare l'accumulo all'interno dei granuli di elevate quantità di azoto che aumentano la spinta di galleggiamento dei granuli che in tal modo potrebbero essere dilavati.

Altri autori ritengono che una delle cause che comporta l'instabilità strutturale dei granuli è l'attività anaerobica che si instaura al loro interno. Una delle fasi di maggiore consumo dell'ossigeno all'interno del ciclo SBR è la fase di *feast*, dove a

causa delle elevate concentrazioni di substrato successive all'alimentazione, l'ossigeno viene consumato negli strati esterni, lasciando quelli interni in condizioni anaerobiche. **Wan e Sperandio, (2009)** osservarono che l'introduzione di una preventiva fase anossica, coincidente con quella di *feast*, migliorava la stabilità dei granuli. L'aggiunta di nitrati come accettori di elettroni garantiva sufficienti quantità di ossigeno anche agli strati interni dei granuli.

Al fine di aumentare la resistenza strutturale dei granuli alcuni autori suggeriscono il dosaggio di cationi polivalenti tra i quali il calcio e il magnesio. **Jiang et al. (2003)** osservarono che l'aggiunta di ioni calcio e magnesio nell'alimento favorivano l'adesione cellulare, e i granuli che ne risultavano erano strutturalmente molto stabili. Analogamente **Ren et al. (2008)** osservarono che i granuli additivati con calcio mostravano una resistenza alla compressione significativamente maggiore rispetto ad altri granuli privi di calcio. **Lin et al. (2008)** osservarono che gli ioni calcio si legavano insieme alla matrice polimerica delle EPS contribuendo all'aumento della resistenza strutturale dei granuli. **Kong et al. (2014)** ottennero simili risultati dosando ferro zero valente.

## 2.6 Ottimizzazione del processo di rimozione dei nutrienti: ruolo delle strategie di aerazione/alimentazione e delle dimensioni dei granuli

La tecnologia del fango granulare offre la possibilità di poter rimuovere contestualmente il carbonio e i nutrienti all'interno di un unico reattore. Una delle maggiori sfide di tale tecnologia è appunto quella di ottenere elevate performance di rimozione dell'azoto, un processo che come noto consta di due fasi, una prima ossidativa dell'azoto ammoniacale e una seconda di riduzione/dissimilazione dell'azoto nitrico e nitroso prodotto dalla precedente reazione per la quale sono necessarie condizioni anossiche e substrato organico. Il contestuale sviluppo di queste due reazioni all'interno di un singolo reattore può risultare problematico e può comportare l'accumulo di nitriti o nitrati nel reattore e quindi nell'effluente, che oltre al mancato rispetto dei limiti allo scarico per l'azoto totale, possono causare sensibili peggioramenti nelle performance di rimozione del fosforo (**Peng et al., 2010**). Nei biofilm di un certo spessore, la nitrificazione e la denitrificazione si verificano simultaneamente (SND) durante la fase aerata del processo, in quanto la penetrazione dell'ossigeno al suo interno è limitata sia da fenomeni fisici che biologici. Lo strato esterno dei granuli è quindi aerobico e in esso si sviluppano i processi di nitrificazione, mentre quelli più interni sono anossici che consentono di ottenere la denitrificazione. I principali parametri che governano la SND sono la concentrazione di ossigeno nel bulk, la dimensione dei granuli e l'attività

microbiologica. Diversi studi hanno dimostrato che elevate concentrazioni di ossigeno nel bulk favoriscono la nitrificazione, mentre al contrario basse concentrazioni risultano favorevoli alla denitrificazione (**de Kreuk et al., 2005; Mosquera-Corral et al., 2005**). Per quanto concerne la dimensione dei granuli, la massima rimozione dell'azoto totale è stata osservata per granuli di dimensioni nell'ordine di 1,3 mm (**de Kreuk et al., 2005**). Tuttavia, non ci sono ad oggi strategie che consentono di controllare le dimensioni dei granuli, in quanto molti sono i parametri che influenzano tale caratteristica, tra i quali il carico del fango e l'idrodinamica del reattore (**Li et al., 2011; Tay et al., 2001**). Oltre alla dimensione spaziale, la profondità di diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli è variabile nel tempo. Studi modellistici e microsensori hanno dimostrato che la diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli è molto maggiore al termine della fase di aerazione rispetto che all'inizio della stessa, a causa della riduzione dell'attività metabolica nel corso della fase di aerazione (**de Kreuk et al., 2007; Yilmaz et al., 2008**). Quando il COD viene del tutto ossidato e l'ammonio nitrificato, l'ossigeno riesce a penetrare quasi del tutto il granulo, e ciò causa l'arresto dei processi di denitrificazione. Oltre alle elevate concentrazioni di ossigeno, il rapporto tra COD, N e P nel refluo può avere un sensibile impatto sui processi di denitrificazione. Nei sistemi per la rimozione simultanea di azoto e fosforo infatti, solitamente il contenuto di COD nell'alimento è il parametro limitante (**Keller et al., 1997**). Durante il periodo anaerobico, che solitamente è contestuale alla fase di alimentazione, i batteri PAOs e GAOs stoccano il substrato organico all'interno delle loro cellule sottoforma di PHB, e lo riutilizzano durante la fase aerobica del reattore all'interno degli strati anossici del biofilm. Dal punto di vista operativo, la riduzione della concentrazione di ossigeno nel bulk è stata dimostrata essere una buona soluzione per migliorare l'efficienza di rimozione dell'azoto (**Beun et al., 2001; de Kreuk et al., 2005**); tuttavia, è stato dimostrato che basse concentrazioni di ossigeno causano lo sfaldamento dei granuli (**Mosquera-Corral et al., 2005**). Inoltre, l'aggiunta di una fase anossica dopo la fase di aerazione promuove la denitrificazione risultando nel miglioramento delle performance di rimozione dell'azoto. Tuttavia in questo caso non è più possibile parlare di nitrificazione e denitrificazione simultanea, ma si parla invece di nitrificazione e denitrificazione alternata (AND). **Xavier et al. (2007)** hanno osservato che i maggiori rendimenti di rimozione dell'azoto si ottengono attraverso la AND piuttosto che la SND; tuttavia, tale strategia presenta due problematiche: la prima dovuta alla mancanza di COD che può limitare le cinetiche di denitrificazione, mentre la seconda è legata ad un potenziale rilascio di fosfati in seguito all'instaurarsi di condizioni anaerobiche all'interno del biofilm. Tale strategia è stata ottimizzata da **Cheng et al. (2011)**, i quali hanno risolto parzialmente i sopracitati problemi attuando un'alimentazione a intermittenza. Tuttavia tali autori non hanno focalizzato la loro attenzione sul destino del fosforo.

Un interessante studio che mette a confronto diverse strategie ottimizzate sia di SND che di AND è stato condotto da **Lochmatter et al. (2013)**. Gli autori in particolare hanno confrontato 4 differenti strategie. Le prime due erano relative all'ottimizzazione della SND: nel dettaglio, la prima prevedeva l'ottimizzazione della concentrazione di ossigeno nel bulk a un valore costante e la seconda prevedeva il ricircolo del gas di testa. Le altre due invece miravano ad ottimizzare la AND. Più nel dettaglio, nella prima strategia, gli autori hanno cercato di individuare un set-point ottimale per l'ossigeno, in modo da massimizzare i rendimenti di SND. Nella seconda, la strategia di aerazione consisteva di una fase di aerazione con concentrazioni di ossigeno prossime al 50% della saturazione per un certo periodo del ciclo, mentre per il resto del periodo aerato veniva effettuato un ricircolo del gas di testa, imponendo come limite inferiore un valore prossimo al 5% della concentrazione di ossigeno a saturazione. La prima strategia di AND consisteva di 3 periodi di 20 minuti ciascuno di aerazione con elevate concentrazioni di ossigeno (50%, 40% e 30%), intervallate da 2 periodi di 20 minuti con concentrazioni di ossigeno al 5%, durante le quali veniva insufflato azoto gas per mantenere costanti gli sforzi di taglio idrodinamici. Infine nell'ultima strategia, il fango veniva sottoposto ad aerazione intermittente, in cui si alternavano 6 periodi di 6-10 minuti di aerazione a periodi di 7-12 minuti in cui il fango non era ne aerato ne miscelato. Durante il periodo di start-up gli autori hanno coltivato il fango granulare in un reattore da cui hanno poi prelevato il fango di inoculo per altri due impianti. In questo reattore non veniva attuato alcun controllo sull'ossigeno che raggiungeva concentrazioni dell'80% nel periodo di *feast* e di circa il 95% (i valori percentuali sono riferiti alla concentrazione di saturazione) in quello di *famine*. Ottenuta la maturazione dei granuli, la concentrazione di solidi nel reattore era di circa 35 g/L e la concentrazione di ossigeno nel bulk oscillava tra il 50% e il 95%. In questo reattore, le performance di rimozione dell'azoto e del fosforo erano rispettivamente del 60% e 90%. Nella prima fase, la nitrificazione si completava e l'azoto presente alla fine del ciclo era costituito prevalentemente da nitrati, mentre i fosfati venivano rimossi nei primi 40 minuti della fase aerobica. Nella fase finale del periodo di start-up invece, operando sempre con elevate concentrazioni di ossigeno, l'efficienza di rimozione dell'azoto si ridusse al 40%; in particolare, l'ammonio veniva nitrificato nel corso di 50-70 minuti e la concentrazione di nitrati aumentava sensibilmente durante questo periodo. La SND non è stata osservata, e la denitrificazione si verificava soltanto durante il periodo di alimentazione. Terminata la fase di start-up, il fango venne equamente suddiviso in due reattori, in ciascuno dei quali venivano applicate le strategie prima citate, fino al raggiungimento di condizioni stazionarie. Nella prima fase sperimentale, quella cioè dedicata all'ottimizzazione della SND con concentrazioni di ossigeno basse, l'azoto veniva rimosso con rendimenti dell'ordine del 60-65%. Per mantenere costante la concentrazione di ossigeno durante il ciclo, la fornitura d'aria veniva gradualmente ridotta. All'inizio della fase di aerazione, il tasso di

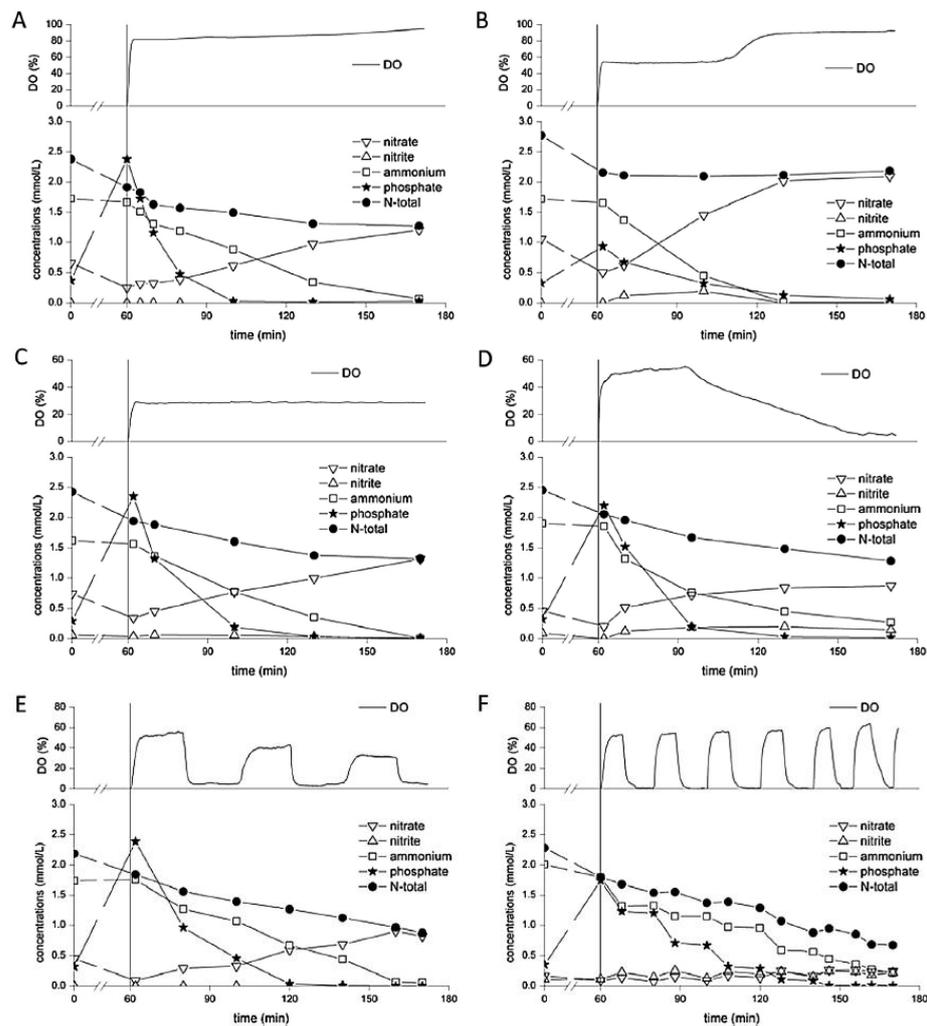
respirazione specifico della biomassa (SOUR) era di 0,224 mgO<sub>2</sub>gSSV<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>, mentre alla fine del ciclo l'SOUR era di 0,100 mgO<sub>2</sub>gSSV<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> quando la nitrificazione non si completava e solo 0,017 mgO<sub>2</sub>gSSV<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> quando invece l'ossidazione dell'ammonio era completa. La minore attività biologica secondo gli autori determinava la maggiore diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli e di conseguenza consentiva il completamento della reazione di ossidazione dell'ammonio. Nella fase in cui veniva ricircolato il gas di testa, la concentrazione di ossigeno si riduceva gradualmente durante il periodo di aerazione. I rendimenti di rimozione dell'azoto erano simili a quelli osservati nella fase precedente. Per verificare se la denitrificazione fosse limitata dalla mancanza di carbonio, il carico di COD venne aumentato da 1,6 a 2,1 KgCODm<sup>-3</sup>·giorno<sup>-1</sup>, e complessivamente i rendimenti di rimozione dell'azoto aumentarono fino al 77% e all'80% rispettivamente nel caso della concentrazione di ossigeno bassa e del ricircolo del gas di testa. In quest'ultimo caso il carico venne aumentato ulteriormente a 2,4 KgCODm<sup>-3</sup>·giorno<sup>-1</sup>, risultando in un incremento del 4% della rimozione dell'azoto. Il fosforo veniva rimosso con rendimenti prossimi al 100% in entrambi i casi.

Per quanto riguarda le strategie di ottimizzazione della AND, l'alternanza di condizioni di alte e basse concentrazioni di ossigeno ha consentito di ottenere rendimenti di rimozione dell'azoto migliori rispetto ai precedenti casi, che aumentarono sensibilmente al crescere del carico organico applicato. Con l'aerazione intermittente i rendimenti furono più elevati rispetto a quelli ottenuti con l'alternanza di condizioni di alte e basse concentrazioni di ossigeno (a parità di condizioni di carico) (Tabella 2.5).

**Tabella 2.5:** Rendimenti di rimozione dei nutrienti per differenti strategie di aerazione (Lochmatter et al., 2013).

Aeration strategy	COD load (gCOD L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Nitrification (%)	N-removal (%)	P-removal (%)	Yield of anaerobic P-release per propionate uptake (P-mol C-mol <sup>-1</sup> )	Duration (d)
Uncontrolled high DO (day 179–313)	1.6	99.6 ± 0.7	62.3 ± 3.4	92.6 ± 7.5	0.39 ± 0.14	134
Uncontrolled high DO (day 488–525)	1.6	98.1 ± 1.6	40.0 ± 3.4	88.3 ± 7.4	0.18 ± 0.09	37
Optimized constant low DO	1.6	99.4 ± 0.7	61.2 ± 5.2	96.3 ± 3.8	0.38 ± 0.07	27
Optimized constant low DO	2.1	99.3 ± 0.8	77.7 ± 2.8	98.3 ± 0.2	0.34 ± 0.05	14
Head-space gas recirculation	1.6	89.3 ± 6.9	61.4 ± 2.8	90.2 ± 9.6	0.35 ± 0.06	52
Head-space gas recirculation	2.1	94.5 ± 6.0	80.5 ± 3.6	97.7 ± 1.4	0.38 ± 0.02	39
Head-space gas recirculation	2.4	95.3 ± 5.4	85.7 ± 3.8	94.8 ± 4.3	0.34 ± 0.10	26
Alternating high/low DO	1.6	96.3 ± 5.3	71.2 ± 5.6	94.1 ± 6.1	0.38 ± 0.04	178
Alternating high/low DO	2.1	97.5 ± 4.1	87.1 ± 2.6	97.5 ± 2.2	0.34 ± 0.03	36
Alternating high/low DO	2.4	97.5 ± 1.9	94.7 ± 1.7	98.1 ± 1.1	0.54 ± 0.12	35
Intermittent aeration	1.6	93.9 ± 4.5	78.3 ± 2.9	94.9 ± 8.6	0.27 ± 0.05	29

La Figura 2.15 mostra l'andamento delle concentrazioni di azoto e fosforo durante un ciclo di reazione per differenti strategie di aerazione.



**Figura 2.14:** Concentrazioni di ammonio, nitriti e nitrati nell'effluente e rendimenti depurativi (Lochmatter et al., 2013).

I rendimenti di rimozione ottenuti in condizioni di limitazione da substrato organico, mostrano dunque che la strategia di aerazione che promuove la AND consente di ottenere rendimenti più elevati rispetto alla SND. Tali risultati confermano quelli ottenuti da **Chen et al. (2011)**, i quali autori, tuttavia, operavano

in condizioni di substrato non limitanti e con alimentazione intermittente. Nello studio di **Lochmatter et al. (2013)**, le buone performance ottenute sull'azoto, nonostante la limitazione del substrato, sono state attribuite dagli autori alla rimozione del fosforo che si verificava contestualmente alla denitrificazione. In condizioni di basse concentrazioni di ossigeno, lo spessore dello strato anaerobico all'interno del granulo è maggiore, di conseguenza l'attività dei batteri fosforo accumulanti aumenta e quindi viene prodotta una maggiore quantità di prodotti di stoccaggio che vengono in seguito utilizzati come fonte di carbonio interna per la denitrificazione. Con l'aerazione intermittente le performance di rimozione dell'azoto migliorarono ulteriormente. Durante la fase non aerata, i granuli sedimentavano formando un letto di fango molto compatto e l'ossigeno veniva rapidamente consumato risultando determinando l'instaurarsi di condizioni anossiche. La formazione di questo letto di fango molto compatto ha tuttavia ridotto il contatto tra i granuli e gli ortofosfati nell'alimento e, di conseguenza, l'assimilazione dei fosfati stessi era inferiore e allo stesso tempo la presenza di ortofosfati nel bulk si protraeva per un tempo maggiore. Inoltre è noto che il tasso di assimilazione dei fosfati è minore in condizioni anossiche rispetto a quelle prettamente aerobiche, quindi la rimozione del fosforo contestualmente alla denitrificazione si verificava sia nella fase di alimentazione e si protraeva fino al termine della fase aerata. Confrontando le misure delle concentrazioni delle forme azotate e dei fosfati nei cicli con le diverse strategie di aerazione, gli autori osservarono che le migliori performance si sono ottenute quando i tre principali processi biologici, ovvero la nitrificazione, la denitrificazione e la rimozione biologica del fosforo si esplicavano durante l'intera fase aerata. L'alternanza di fasi aerate e non aerate ha il vantaggio che le cinetiche di tutti questi processi sono diverse durante le due fasi; in particolare l'alternanza delle fasi consente di rallentare le cinetiche normalmente più rapide (rimozione aerobica del fosforo) e di accelerare quelle più lente (denitrificazione). Al contrario, con le strategie volte ad ottimizzare la SND, la separazione tra processi aerobici e anossici è principalmente spaziale e non temporale. Quindi, il fine della strategia di ottimizzazione della SND è appunto quello di trovare il bilancio ottimale tra zone aerate e non aerate all'interno dei granuli. Con la strategia di mantenimento di basse concentrazioni di ossigeno, è stato osservato che l'ossigeno riusciva a penetrare all'interno dei granuli verso la fine della fase aerata, a causa della riduzione dell'attività metabolica dovuta alla completa rimozione dell'ammonio e degli ortofosfati (**Yilmaz et al., 2008**). Un migliore bilanciamento è stato invece ottenuto con il ricircolo del gas di testa, dove la concentrazione di ossigeno si riduceva gradualmente durante la fase aerata. Tuttavia le performance di rimozione dell'azoto ottenute con le due diverse strategie di SND erano del tutto analoghe, indicando dunque che il ricircolo dei gas di testa non migliora il bilanciamento tra zone aerobiche ed anossiche all'interno dei granuli. Sebbene si è visto che la disponibilità di COD piuttosto che l'ossigeno fosse il reale fattore limitante,

l'incremento del carico organico determinò solo un leggero aumento dei rendimenti di rimozione dell'azoto, maggiore nel caso del ricircolo del gas di testa rispetto al caso di ossigeno costante. Tuttavia le differenze erano irrilevanti per poter affermare che con una maggiore disponibilità di COD il bilanciamento ottimale tra zona aerobica e anossica fosse tale da produrre un significativo incremento delle performance di rimozione dell'azoto. La concentrazione di ossigeno costante ottimale è stata tra il 25 e il 40% rispetto al valore di saturazione, valore confermato anche da altri autori (**de Kreuk et al., 2005**). Gli autori escludono che le ridotte dimensioni dei granuli siano state la causa principale delle ridotte performance di rimozione dell'azoto, in quanto per tutta la durata della sperimentazione il diametro dei granuli era superiore a 2 mm. Poiché l'attività metabolica negli strati esterni era sempre elevata, la diffusione dell'ossigeno negli strati interni era ridotta, consentendo dunque la presenza di uno strato anossico sufficientemente grande e favorendo così la SND. Sia con l'alternanza di elevate e basse concentrazioni di ossigeno, che in condizioni di aerazione intermittente, la dimensione dei granuli risulta meno importante. La separazione tra nitrificazione e denitrificazione è temporale anziché spaziale come si verifica per la SND. Non di meno, la stabilità strutturale del fango granulare è importante per le capacità di sedimentazione del fango. Sebbene molti autori ritengono che la mancanza dell'aerazione causa lo sfaldamento dei granuli a causa della riduzione degli sforzi di taglio (**Xavier et al., 2007**), gli autori non osservarono fenomeni di disintegrazione del fango granulare. In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti gli autori affermano che le strategie volte ad ottimizzare la AND risultano significativamente più efficienti rispetto a quelle della SND. L'introduzione di una fase con basse concentrazioni d'ossigeno, ovvero di una fase anossica nelle prime fasi del periodo di aerazione, consente di promuovere la denitrificazione e la rimozione del fosforo nonché lo stoccaggio di sostanza organica in forma di prodotti intracellulari. L'aerazione intermittente consente quindi di ottenere migliori performance di processo, senza apparentemente causare nel breve periodo problemi strutturali al fango granulare.

Come già accennato, esistono in letteratura altri casi di ottimizzazione delle strategie di SND. Tra queste va citato lo studio condotto da **Di Bella e Torregrossa (2013)**, nel quale gli autori hanno studiato la rimozione combinata di sostanza organica e nutrienti in due reattori SBR senza controllo dell'ossigeno, confrontando le performance di fango granulare di dimensioni differenti. Sulla base di altre esperienze in letteratura (**De Kreuk e van Loosdrecht, 2004**), è noto infatti che i granuli tendono a sfaldarsi quando le concentrazioni di ossigeno disciolto sono inferiori a 3-4 mg/L (40% del valore a saturazione), quindi in tali condizioni è spesso impossibile ottenere granuli strutturalmente stabili (**Liu e Tay, 2006, 2008**). Inoltre, molto spesso le elevate concentrazioni di ossigeno sono necessarie quando il fango granulare è utilizzato con altre tecnologie avanzate come i bioreattori a membrane (**Li et al., 2008**). In questo contesto, le dimensioni dei granuli hanno un

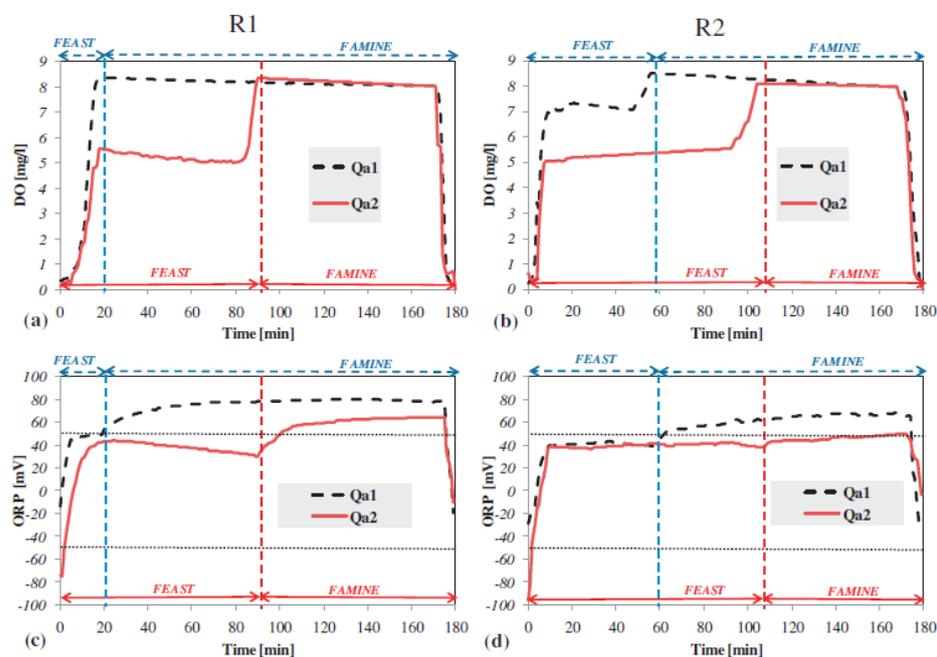
ruolo fondamentale nel processo di SND. In particolare, la differente profondità di penetrazione dell'ossigeno all'interno di granuli più o meno grandi durante le fasi di *feast* e *famine*, può favorire la formazione di strati aerobici, anossici e anaerobici di diverso spessore, che consentono quindi di ottenere la SND senza ricorrere a complesse strategie di aerazione per l'ottimizzazione del processo. Gli autori hanno coltivato il fango granulare in due reattori operanti in parallelo (R1 ed R2), e caratterizzati da un differente valore del carico organico applicato in fase di coltivazione. In particolare, in R1 il carico era di  $2,4 \text{ KgCODm}^{-3}\text{giorno}^{-1}$  mentre in R2 era esattamente il doppio, al fine di ottenere granuli di diverse dimensioni in accordo a **Li et al. (2008)**. Terminata la fase di coltivazione, gli autori suddivisero il secondo periodo sperimentale in 4 sottofasi di 21 giorni ciascuno, ciascuno dei quali caratterizzato da differenti valori del carico organico, del flusso d'aria e del rapporto carbonio/azoto, al fine di valutare l'incidenza di tali parametri sugli spessori degli strati anossici e aerobici dei granuli e di conseguenza sul processo di SND (Tabella 2.6).

**Tabella 2.6:** Condizioni operative per i due reattori al termine della fase di coltivazione (**Di Bella e Torregrossa, 2013**).

Day		R1			R2		
		$Q_{air}$ L/min	VLR kg/m <sup>3</sup> d	C/N --	$Q_{air}$ L/min	VLR kg/m <sup>3</sup> d	C/N --
129th-149th	Sub-period I	3	3.6	8/1	3	3.6	8/1
150th-170th	Sub-period II	3	4.8	8/1	3	4.8	8/1
171st-181th	Sub-period III	2	4.8	16/1	2	4.8	16/1
182nd-191st	Sub-period III	3	4.8	16/1	3	4.8	16/1
192nd-202nd	Sub-period IV	2	4.8	16/1	2	4.8	16/1
203th-212nd	Sub-period IV	3	4.8	16/1	3	4.8	16/1

Durante questo periodo gli autori hanno analizzato nel dettaglio la variazione delle durate delle fasi *feast* e *famine* in relazione alle condizioni operative applicate, con particolare riferimento alla variazione del flusso d'aria e di conseguenza alla disponibilità di ossigeno. La penetrazione dell'ossigeno all'interno dei granuli è stata valutata indirettamente, osservando la sua concentrazione nel bulk e gli effetti sulla rimozione dell'azoto. La durata della fase di *feast* dipende dalla penetrazione dell'ossigeno e dalla disponibilità di substrato per i microrganismi nei vari strati del granulo. Dopo il periodo di *feast*, la concentrazione di ossigeno nel bulk raggiunge il suo massimo valore in quanto il substrato è stato completamente ossidato, e inizia la fase di *famine*, nella quale i microrganismi consumano altri tipi di substrato. In condizioni di elevato flusso d'aria ( $Q_{a1}$ ), la fase di *feast* durava circa 20 minuti in R1 e 58 in R2. La riduzione del flusso d'aria invece, determinando la minore concentrazione di ossigeno nel bulk, ha causato un incremento della durata della fase di *feast* a 80 minuti in R1 e quasi 100 in R2. Tali differenze furono addebitate dagli autori alle diverse dimensioni dei granuli nei due impianti (R1=2,2mm, R2=3,3 mm). Allo stesso modo, gli autori registrarono l'andamento del potenziale di ossido riduzione (ORP) nel bulk a vari flussi d'aria, e osservarono che in generale, nei granuli di dimensioni inferiori l'ossigeno riesce a penetrare più

in profondità, quindi le condizioni anossiche durano per un tempo minore. Nei granuli di dimensioni maggiori invece, l'ossigeno non riesce a penetrare tutto il granulo, quindi lo strato aerobico e anossico coesistono (Figura 2.15).



**Figura 2.15:** Andamento della concentrazione di ossigeno e dell'ORP durante il ciclo di reazione per differenti condizioni operative (Di Bella e Torregrossa, 2013).

I rendimenti di rimozione dell'azoto furono mediamente dell'80% in R1 e del 70% in R2. L'impianto R1 in particolare mostrava performance di nitrificazione significativamente maggiori rispetto a R2, nel quale a sua volta erano maggiori i rendimenti di denitrificazione a causa del maggiore spessore dello strato anossico all'interno dei granuli. Le migliori performance di nitrificazione in R1 furono attribuite dagli autori da un lato alla maggiore penetrazione dell'ossigeno nel granulo che coincideva con un maggiore spessore dello strato aerobico e, inoltre, a causa delle minori dimensioni medie dei granuli, la superficie specifica del sistema particellare era sensibilmente superiore, risultando in una maggiore attività biologica. L'efficienza di nitrificazione diminuì in entrambi gli impianti in seguito alla riduzione del flusso d'aria, a causa della minore diffusione del gas all'interno dei granuli. Tale riduzione è stata maggiormente significativa in R2 a causa delle maggiori dimensioni degli aggregati. La riduzione del flusso d'aria, e di conseguenza della concentrazione di ossigeno, non comportò, come ci si attendeva,

nell'aumento delle performance di denitrificazione, in quanto le dimensioni dei granuli, entrambi maggiori di 1,5 mm, erano di per se sufficienti al mantenimento di uno strato anossico sufficientemente grande.

In taluni casi, specialmente nel caso di reflui industriali caratterizzati da alti carichi di ammoniaca e bassi rapporti C/N, è necessario attuare altre strategie per ottenere performance di rimozione dei nutrienti che siano soddisfacenti. Per risolvere tale problematica, alcuni autori (Zhong et al., 2013) propongono una differente strategia di aerazione/alimentazione, la quale prevede che il refluo venga alimentato in discontinuo, e in particolare una certa aliquota durante una fase anossica opportunamente inserita all'interno del ciclo di reazione, in modo che le cinetiche di denitrificazione non risultino carbonio limitate. Gli autori divisero la loro sperimentazione in tre distinte fasi: nella prima, il reattore veniva alimentato una volta sola, e il ciclo che durava 360 minuti che comprendeva 60 minuti di miscelazione in condizioni anossiche e 260 minuti di aerazione e i restanti di sedimentazione e scarico; nel secondo il reattore veniva invece alimentato in 4 step successivi, ciascuno dei quali intervallato da 4 fasi di miscelazione in condizioni anossiche (30 minuti) e di aerazione (50 minuti), per una lunghezza complessiva del ciclo di 360 minuti; nella terza e ultima fase infine, rispetto alla precedente è stata variata la durata del ciclo a 207 minuti. In ciascuno dei tre periodi gli autori osservarono eccellenti performance di rimozione del COD e dell'ammonio (Figura 2.16).

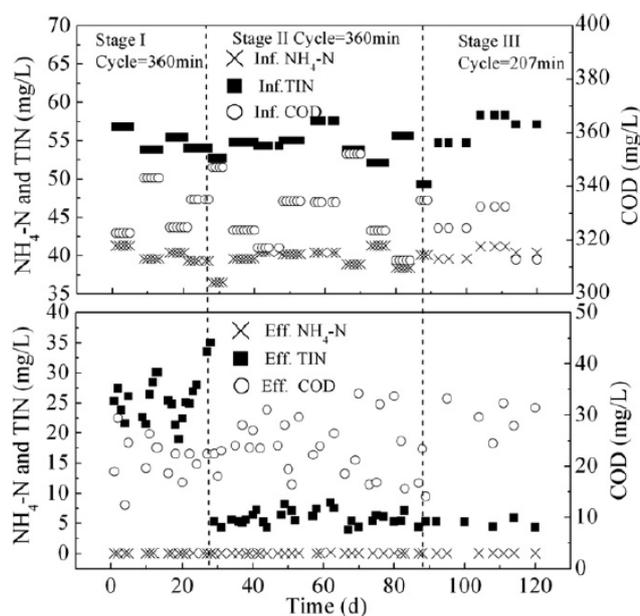
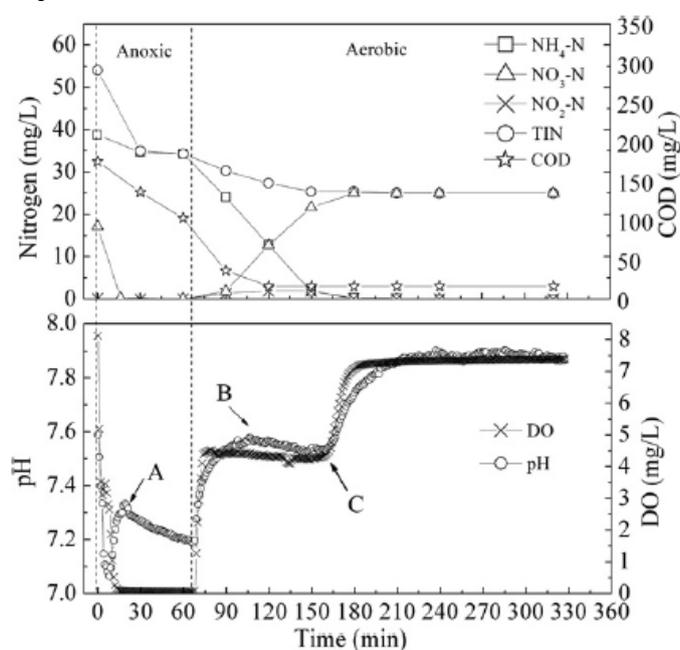


Figura 2.16: Rendimenti di rimozione del COD e dell'azoto durante la sperimentazione (Zhong, 2013).

Tuttavia, l'azoto veniva rimosso per circa il 50% nel primo periodo, dove risultavano elevati i nitrati nell'effluente, mentre nel secondo e nel terzo i rendimenti di rimozione dell'azoto totale aumentarono al 90% in media. Gli autori non osservarono differenze significative tra il secondo e il terzo periodo, nonostante la riduzione della durata del ciclo da 360 a 207 minuti. Tale risultato indica dunque che la strategia di alimentazione a step adottata determina sensibili miglioramenti dei rendimenti di rimozione dell'azoto.

Gli autori monitorarono i profili di concentrazione dell'ossigeno, pH e delle forme azotate nel corso dei tre periodi sperimentali. Nel primo periodo (Figura 2.17), si osservava inizialmente che sia l'ossigeno che il pH diminuivano durante l'alimentazione, a causa della degradazione del substrato organico e della produzione di prodotti di fermentazione. Nella fase anossica l'ossigeno si manteneva prossimo allo zero, mentre il pH aumentava in seguito all'instaurarsi dei processi di denitrificazione. Quando la reazione di denitrificazione si completava, il pH invertiva la sua pendenza, in corrispondenza di un punto (A) caratteristico noto come "nitrate apex".

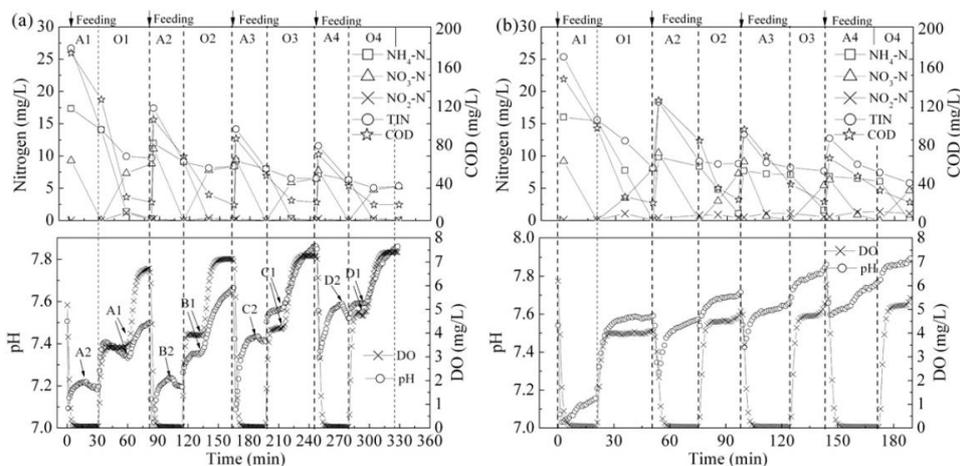


**Figura 2.17:** Andamento della concentrazione di azoto, COD, ossigeno e del pH durante il ciclo di reazione nel primo periodo (Zhang, 2013).

Dopo che il COD era stato del tutto consumato, la concentrazione di ammonio si riduceva sensibilmente, in seguito all'instaurarsi dei processi di nitrificazione. La

fine del consumo del COD, allo stesso modo della denitrificazione, era identificata mediante un breakpoint (B) nella curva del pH nella fase aerobica. Durante la nitrificazione il pH si riduceva, mentre l'ossigeno si stabilizzava intorno a 4,3 mg L<sup>-1</sup>. Dopo che sia il COD che l'ammonio venivano ossidati, la concentrazione di ossigeno aumentava a 7,4 mg L<sup>-1</sup>, e si manteneva costante. La fine della nitrificazione era identificata da due breakpoint sia nella curva del pH che dell'ossigeno (punto C). In tale periodo, gli autori osservarono che, sebbene l'attività biologica dei granuli fosse elevatissima sia per quanto riguarda la rimozione del COD che dell'ammonio, l'efficienza di nitrificazione e denitrificazione simultanea risultava modesta, risultando in bassi rendimenti di rimozione dell'azoto totale.

Negli altri due periodi, al fine di aumentare l'efficienza di rimozione dell'azoto totale, gli autori attuarono una strategia di alimentazione a intermittenza. In particolare, il carico veniva alimentato gradualmente all'interno del ciclo di reazione, in modo da rendere disponibile substrato organico per la biomassa eterotrofa al termine del processo di nitrificazione e di completare così il processo di denitrificazione. Nella fase anossica, l'ossigeno veniva consumato nel corso di 2 minuti, mentre la denitrificazione si completava in circa 30 minuti (Figura 2.18)



**Figura 2.18:** Andamento della concentrazione di azoto, COD, ossigeno e del pH durante il ciclo di reazione nel secondo (a) e terzo (b) periodo sperimentale (Zhang, 2013).

Tali risultati indicano dunque che in condizioni anossiche, e con sufficienti concentrazioni di substrato organico, si possono ottenere rendimenti di denitrificazione molti elevati. Nelle fasi aerobiche, sia l'ammonio che il substrato organico venivano ossidati quasi del tutto. Allo stesso modo del periodo precedente, anche nel secondo e terzo erano ben individuabili i punti singoli nei

profili del pH e dell'ossigeno. Gli autori nel terzo periodo della sperimentazione, ottimizzarono il processo di rimozione dell'azoto, alternando le fasi anossiche ed aerobiche in funzione dei segnali ricevuti dalle sonde. In particolare, il passaggio dalle fasi anossiche a quelle aerobiche e vice versa, veniva effettuato sulla base dell'individuazione dei punti singolari nelle curve del pH e dell'ossigeno disciolto. In tal modo, la durata complessiva del ciclo fu ridotta di circa il 30%.

La riduzione del tempo di starvation conseguente all'alimentazione intermittente, ha determinato l'aumento del contenuto di EPS nei granuli. Inoltre la crescita eterotrofa in condizioni anossiche è un noto fattore che determina l'addensamento dei granuli. Entrambi i fattori, secondo gli autori, sono risultati decisivi nell'ottenere granuli strutturalmente stabili. La presenza di un organo meccanico necessario per la miscelazione in condizioni anossiche, ha tuttavia determinato lo sviluppo di granuli di dimensioni leggermente al di sotto dei valori mediamente osservati nella letteratura.

## 2.7 Bibliografia

- Adav, S.S., Chen, M.Y., Lee, D.J., Ren, N.Q., (2007). Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granules. *Chemosphere* 67, 1566-72.
- Adav S.S., Lee D.J., (2008). Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *J Hazard Mater* 2008a;154:1120-6.
- Adav, S.S., Lee, D.J., Lai, J.Y., (2009). Proteolytic activity in stored aerobic granular sludge and structural integrity. *Bioresource Technol* 100, 68-73.
- Adav, S.S., Lee, D.J., Lai, J.Y., (2010). Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1601-10.
- Ahn, J., McIlroy, S., Schroeder, S., Seviour, R., (2009). Biomass granulation in an aerobic: anaerobic-enhanced biological phosphorus removal process in a sequencing batch reactor with varying pH. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36 (7), 885-893.
- Arrojo, B., Mosquera-Corral, A., Garrido, J.M., Mendez, R., (2004). Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors. *Water Res.* 38 (14-15), 3389-3399.
- Barr, J.J., Cook, A.E., Bond, P.L., (2010). Granule formation mechanisms within an aerobic wastewater system for phosphorus removal. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (22), 7588-7597.
- Beun, J.J., Hendriks, A., Van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A., Heijnen, J.J., (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 33 (10), 2283-2290.
- Beun, J.J., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., (2001). N-Removal in a granular sludge sequencing batch airlift reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 75 (1), 82-92.
- Cassidy, D.P., Belia, E., (2005). Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge. *Water Res.* 39 (19), 4817-4823.
- Castellanos, T., Ascencio, F., Bashan, Y., (2000). Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Ecol* 33, 1-9.
- Chen, F.-Y., Liu, Y.-Q., Tay, J.-H., Ning, P., (2011). Operational strategies for nitrogen removal in granular sequencing batch reactor. *Journal of Hazardous Materials* 189 (1-2), 342-348.
- Coma, M., Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P.L., (2012). Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioresour. Technol.* 103 (1), 101-108.
- de Bruin, L.M.M., de Kreuk, M.K., van der Roest, H.F.R., Uijterlinde, C., van Loosdrecht, M.C.M., (2004). Aerobic granular sludge technology: an

- alternative to activated sludge? *Water Science and Technology* 49 (11-12), 1-7.
- de Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M., (2004). Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Sci. Technol.* 49 (11-12), 9-17.
- de Kreuk, M.K., de Bruin, L.M.M., van Loosdrecht, M.C.M., (2005). *Aerobic Granular Sludge: From Idea to Pilot Plant*. IWA, Munich, Germany.
- de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., (2005). Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 90 (6), 761-769.
- de Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M., (2006). Formation of aerobic granules with domestic sewage. *J. Environ. Eng.-ASCE* 132 (6), 694-697.
- de Kreuk, M.K., Kishida, N., van Loosdrecht, M.C.M., (2007). Aerobic granular sludge e state of the art. *Water Science and Technology* 55(8-9), 75-81.
- Di Bella, G., Torregrossa, M., (2013). Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. *Bioresource Technology* 142, 706-713.
- Di Iaconi, C., Ramadori, R., Lopez, A., Passino, R., (2006). Influence of hydrodynamic shear forces on properties of granular biomass in a sequencing batch biofilter reactor. *Biochem Eng* 30, 152-7.
- Gonzalez-Gil, G., Holliger, C., (2011). Dynamics of microbial community structure and enhanced biological phosphorus removal of propionate- and acetate-cultivated aerobic granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (22), 8041-8051.
- Isanta, E., Suárez-Ojeda, M.E., Val del Río, A., Morales, N., Pérez, J., Carrera, J., (2012). Long term operation of a granular sequencing batch reactor at pilot scale treating a low-strength wastewater. *Chemical Engineering Journal* 198-199, 163-170.
- Ivanov, V., Wang, X.-H., Stabnikova, O., (2008). Starter culture of *Pseudomonas veronii* strain B for aerobic granulation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24 (4), 533-539.
- Jiang, B., Liu, Y., (2010). Energy uncoupling inhibits aerobic granulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 589-95.
- Jiang, H.L., Maszenan, A.M., Zhao, Z.W., Tay, J.H., (2010). Properties of phenol-removal aerobic granules during normal operation and shock loading. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37, 253-62.
- Jiang, H.L., Tay, J.H., Liu, Y., Tay, S.T.L., (2003).  $Ca^{2+}$  augmentation for enhancement of aerobically of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors. *Biotechnol. Lett.* 25, 95-99.
- Keller, J., Subramaniam, K., Gösswein, J., Greenfield, P.F., (1997). Nutrient removal from industrial wastewater using single tank sequencing batch reactors. *Water Science and Technology* 35(6), 137-144.

- Kong, Y.H., Liu, Y.Q., Tay, J.H., Wong, F.S., Zhu, J.R., (2009). Aerobic granulation in sequencing batch
- Lemaire, R., Webb, R.I., Yuan, Z.G., (2008). Micro-scale observations of the structure of aerobic
- Lemaire, R., Yuan, Z., Bernet, N., Marcelino, M., Yilmaz, G., Keller, J., (2009). A sequencing batch reactor system for highlevel biological nitrogen and phosphorus removal from abattoir wastewater. *Biodegradation* 20 (3), 339-350.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W., Klapwijk, A., (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22 (4), 699-734.
- Li, Y., Liu, Y., Shen, L., Chen, F., (2008). DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 349-354.
- Li, Z.H., Wang, X.C., (2008). Effects of salinity on the morphological characteristics of aerobic granules. *Water Sci Technol* 58, 2421-6.
- Li, A.-J., Li, X.-Y., (2009). Selective sludge discharge as the determining factor in SBR aerobic granulation: numerical modelling and experimental verification. *Water Res.* 43 (14), 3387-3396.
- Li, A.-J., Li, X.-Y., Yu, H.-Q., (2011). Effect of the food-to-microorganism (F/M) ratio on the formation and size of aerobic sludge granules. *Process Biochemistry* 46 (12), 2269-2276.
- Lin, Y.M., Wang, L., Chi, Z.M., Liu, X.Y., (2008). Bacterial alginate role in aerobic granular bio-particles formation and settleability improvement. *Separ Sci Technol.* 43, 1642-52.
- Liu, Y., Tay, J.-H., (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* 36 (7), 1653-1665.
- Liu, Y., Tay, J.H., (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnol Adv* 22, 533-63.
- Liu, Y., Yang, S.F., Tay, J.H., (2004). Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. *J. Biotechnol.* 108 (2), 161-169.
- Liu, Y., Qi-Shan Liu (2005). Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Biotechnology Advances* 24, 115-127.
- Liu, Y.Q., Liu, Y., Tay, J.H., (2005). Relationship between size and mass transfer resistance in aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology* 40, 312-315.
- Liu, Y.Q., Tay, J.H., (2006). Variable aeration in sequencing batch reactor with aerobic granular sludge. *J. Biotechnol.* 124, 338-346.
- Liu, Y.Q., Tay, J.H., (2008). Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.* 99, 980-985.

- Liu, L., Gao, D.-W., Zhang, M., Fu, Y., (2010). Comparison of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  enhancing aerobic granulation in SBR. *J. Hazard. Mater.* 181 (1-3), 382-387.
- Lochmatter, S., Gonzalez-Gil, G., Holliger, C., (2013). Optimized aeration strategies for nitrogen and phosphorus removal with aerobic granular sludge. *Water Res.* 47 (16), 6187-6197.
- Lochmatter, S. and Holliger, C., (2014). Optimization of operation conditions for the startup of aerobic granular sludge reactors biologically removing carbon, nitrogen, and phosphorus. *Water Research* 59, 58-70.
- Long, B., Yang, C.Z., Pu, W.H., Yang, J.K., Jiang, G.J., Dan, J.F., Li, C.J., Liu, F.B. (2015). Rapid cultivation of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor. *Bioresource and Technology* 166, 57-63.
- McSwain, B.S., Irvine, R.L., Wilderer, P.A., (2004). Effect of intermittent feeding on aerobic granule structure. *Water Sci. Technol.* 49 (11-12), 19-25.
- McSwain, B.S., Irvine, R.L., (2008). Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. *Water Science & Technology* 58(4), 781-787.
- Morgenroth, E., Sherden, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., Wilderer, P.A., (1997). Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 31 (12), 3191-3194.
- Mosquera-Corral, A., de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., (2005). Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Res.* 39 (12), 2676-2686.
- Moy, B.Y.P., Tay, J.H., Toh, S.K., Liu, Y., Tay, S.T.L. (2002). High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. *Lett Appl Microbiol* 34, 404-412.
- Peng, Z., Peng, Y., Gui, L., Liu, X., (2010). Competition for single carbon source between denitrification and phosphorus release in sludge under anoxic condition. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 18(3), 472-477.
- Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., (2000). Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: a twodimensional modelling study, *Biotechnol. Bioeng.* 43, 504-515.
- Pijuan, M., Casas, C., Baeza, C.A., (2009). Polyhydroxyalkanoate synthesis using different carbon sources by two enhanced biological phosphorus removal microbial communities, *Process Biochem.* 44, 97-105.
- Pijuan, M., Yuan, Z., (2010). Development and optimization of a sequencing batch reactor for nitrogen and phosphorus removal from abattoir wastewater to meet irrigation standards. *Water Science and Technology* 61 (8), 2105-2112.
- Pijuan, M., Werner, U., Yuan, Z., (2011). Reducing the startup time of aerobic granular sludge reactors through seeding floccular sludge with crushed aerobic granules. *Water Res.* 45 (16), 5075-5083.
- Plackett, R.L., Burman, J.P., (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33 (4), 305-325.

- Qin, L., Liu, Y., Tay, J.-H., (2004). Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochem. Eng. J.* 21 (1), 47-52.
- Ren, T.T., Liu, L., Sheng, G.P., Liu, X.W., Yu, H.Q., Zhang, M.C., (2008). Calcium spatial distribution in aerobic granules and its effects on granule structure, strength and bioactivity. *Water Res.* 42, 3343-52.
- Tay, J.H., Tay, S.T.L., Ivanov, V., Pan, S., Jiang, H.L., Liu, Q.S., (2003). Biomass and porosity profiles in microbial granules used for aerobic wastewater treatment. *Letters Applied Microbiology* 36, 297-301.
- Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y., (2004). The effect of upflow air velocity on the structure of aerobic granules cultivated in a sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* 49 (11-12), 35-40.
- Toh, S.K., Tay, J.H., Moy, B.Y.P., Ivanov, V., Tay, S.T.L., (2003). Size effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR. *Applied Microbiol Biotechnology* 60, 687-695.
- Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P.L., (2012). Determining the mechanisms for aerobic granulation from mixed seed of floccular and crushed granules in activated sludge wastewater treatment. *Water Research* 46 (3), 761-771.
- Verawaty, M., Tait, S., Pijuan, M., Yuan, Z. and Bond, P.L., (2013). Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Research* 47(14), 5338-5349.
- Wan, J., Bessiere, Y., Sperandio, M., (2009). Alternating anoxic feast/aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at reduced aeration rate. *Water research* 43, 5097-5108.
- Wan, J., Sperandio, M., (2009). Possible role of denitrification on aerobic granular sludge formation in sequencing batch reactor. *Chemosphere* 75, 220-7.
- Wang, F., Yang, F., Zhang, X.W., Liu, Y., Zhang, H., Zhou, J. (2005). Effects of cycle time on properties of aerobic granules in sequencing batch airlift reactors. *World J Microbiol Biotechnol* 21, 1379-84.
- Wang, X.H., Zhang, H.M., Yang, F.L., Xia, L.P., Gao, M.M., (2007). Improved stability and performance of aerobic granules under stepwise increased selection pressure. *Enzyme and Microbial Technology* 41, 205-211.
- Wang, X.H., Zhang, H.M., Yang, F.L., Wang, Y.F., Gao, M.M., (2008). Long-term storage and subsequent reactivation of aerobic granules. *Bioresource Technol* 99, 8304-9.
- Weissbrodt, D.G., Lochmatter, S., Ebrahimi, S., Rossi, P., Maillard, J., Holliger, C., (2012). Bacterial selection during the formation of early-stage aerobic granules in wastewater treatment systems operated under wash-out dynamics. *Front. Microbiol.* 3, 332-342.
- Weissbrodt, D.G., Neu, T.R., Kuhlicke, U., Rappaz, Y., Holliger, C., (2013). Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular sludge biofilms. *Front. Microbiol.* 4, 175-180.

- Xavier, J.B., De Kreuk, M.K., Picioreanu, C., Van Loosdrecht, M.C.M., (2007). Multi-scale individual-based model of microbial and byconversion dynamics in aerobic granular sludge. *Environ. Sci. Technol.* 41 (18), 6410-6417.
- Yilmaz, G., Lemaire, R., Keller, J., Yuan, Z., (2008). Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 100(3), 529-541.
- Zhang, L.L., Feng, X.X., Zhu, N.W., Chen, J.M., (2007). Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme Microbial Technol* 41, 551-7.
- Zheng, Y.M., Yu H.Q., Liu, S.J., Liu, X.Z., (2006). Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere* 63, 1791-1800.
- Zhong, C., Wanga, Y., Wang, Y., Lv, J., Li, Y., Zhu, J., (2013). High-rate nitrogen removal and its behavior of granular sequence batch reactor under step-feed operational strategy. *Bioresource Technology* 134, 101-106.
- Zhu, L., Yu, Y., Dai, X., Xu, X., Qi, H., (2013). Optimization of selective sludge discharge mode for enhancing the stability of aerobic granular sludge process. *Chemical Engineering Journal* 217, 442-446.

## Capitolo 3

# Applicazione dei fanghi granulari al trattamento di reflui industriali

### 3.1 Introduzione

L'obiettivo di questo capitolo è quello di fare una panoramica sullo stato dell'arte riguardo il trattamento dei reflui industriali con i fanghi granulari. Verranno riportate le varie esperienze condotte da altri autori con riferimento al trattamento di vari reflui di origine industriale e le principali problematiche inerenti al loro trattamento.

### 3.2 Meccanismi di rimozione dei substrati particolati

Prima ancora di entrare nel merito del trattamento di reflui industriali specifici, è utile fare riferimento ad uno studio condotto da **De Kreuk et al. (2010)**, nel quale si è analizzato il presunto meccanismo di rimozione dei substrati particolati nei sistemi aerobici granulari.

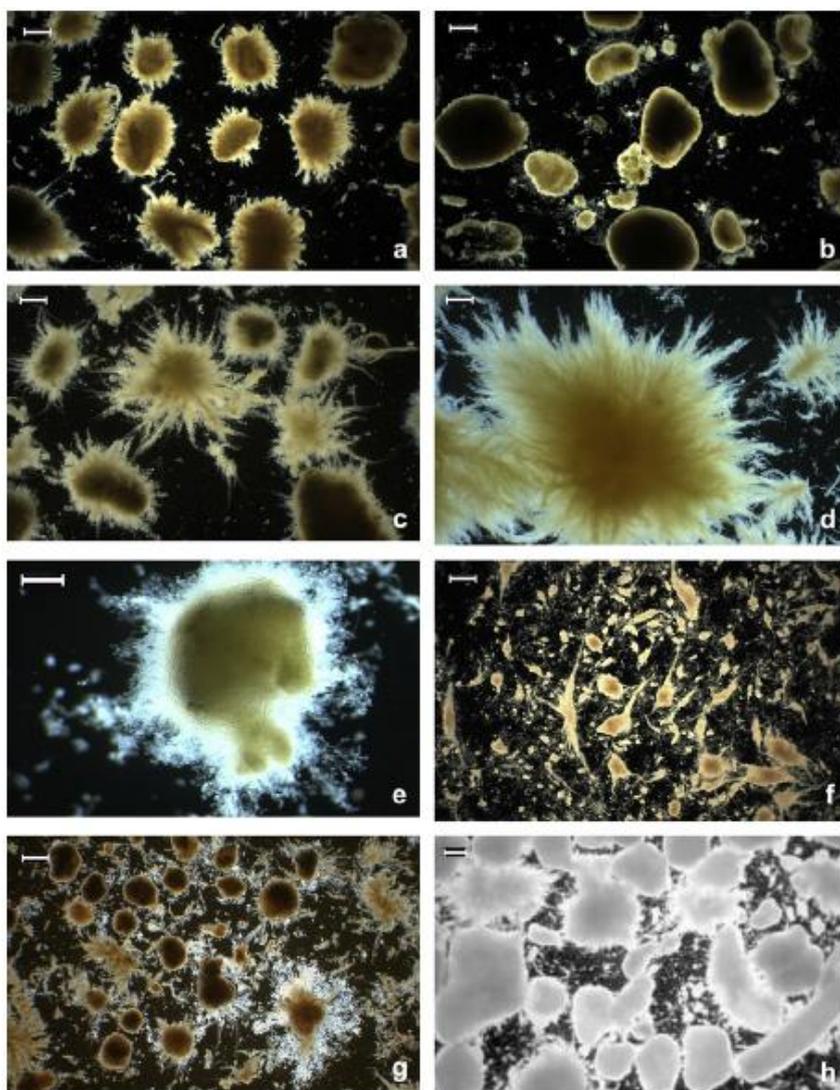
Il substrato particolato è spesso una frazione molto significativa del materiale organico nei reflui di origine civile ed industriale. Le grosse molecole di COD lentamente biodegradabili necessitano di essere prima idrolizzate in composti solubili che successivamente vengono utilizzati dai batteri per il loro metabolismo. Spesso negli impianti che trattano reflui di origine civile misti a reflui industriali, la crescita della biomassa eterotrofa è limitata dal processo di idrolisi che può risultare limitante in quanto piuttosto lento. Di conseguenza, l'efficienza di depurazione può essere significativamente inferiore rispetto a quella ipotizzata in fase di progetto. L'interesse crescente verso i sistemi a biomassa granulare soprattutto nel trattamento di reflui industriali, ha posto l'attenzione di alcuni ricercatori sulle dinamiche di rimozione della frazione organica particolata da parte dei granuli aerobici. La formazione dei granuli con substrati particolati si realizza in maniera soddisfacente, ma i granuli tendono ad esibire una struttura filamentosa soprattutto nella loro superficie.

È stato osservato che il COD particolato viene effettivamente rimosso con risultati soddisfacenti. Studi sul processo a fanghi attivi mostrano che l'idrolisi dell'amido si realizza piuttosto velocemente dopo un rapido adsorbimento sui fiocchi di fango. Successivamente gli enzimi prodotti dai microrganismi idrolizzano tali sostanze che vengono poi metabolizzate secondo cinetiche del primo ordine (Karahhan et al., 2006). Simili osservazioni sono state riportate da Mosquera-Corral et al. (2003) in ricerche condotte su biomassa adesa. Il meccanismo con cui tale processo si realizza nei sistemi a biomassa granulare è stato studiato da De Kreuk et al. (2010). In particolare gli autori hanno studiato la conversione dell'amido particolato e solubile in un reattore con fango granulare e i loro effetti sulla morfologia dei granuli e sulle performance complessive del sistema. Gli autori utilizzarono due reattori operanti in parallelo inoculati con fango granulare. La sperimentazione venne articolata in due fasi: nella prima (start-up) il primo reattore veniva alimentato con una miscela di maltosio (prodotto dell'idrolisi dell'amido) e amido particolato (PS) in rapporto 1:1, mentre il secondo con maltosio e amido solubile (SS) come fonte di carbonio. Nella seconda fase, il primo reattore veniva alimentato con il solo amido particolato, mentre il secondo con amido solubile. Gli autori osservarono che l'aggiunta di amido particolato nell'influenta ha causato la graduale crescita di granuli morfologicamente irregolari (Fig.3.1). La presenza di amido particolato causò infatti un ingente crescita di protozoi sessili ciliati (*Vorticella sp.*) e rotiferi sulla superficie dei granuli, mentre l'amido solubile non ha avuto un effetto significativo in tal senso. Gli autori osservarono un sensibile aumento della quantità di batteri filamentosi specie sulla superficie dei granuli, soprattutto nel reattore alimentato con l'amido particolato, che ne causarono un severo sfaldamento e la produzione di piccoli frammenti di granuli di dimensioni nell'ordine dei 0,2-0,3 mm.

Per quanto concerne le performance, in entrambi i reattori la nitrificazione era pressoché completa, tuttavia, a causa delle scarse efficienze di denitrificazione, la rimozione dell'azoto totale risultò modesta e quasi sempre inferiore al 30 e al 60% rispettivamente nel primo e secondo reattore. I rendimenti di rimozione del fosforo furono altrettanto poco soddisfacenti, a causa della scarsa acclimatazione dei batteri PAO testimoniata dal modesto rilascio di fosforo osservata nella fase anaerobica di alimentazione del reattore. Mediante specifiche analisi, gli autori osservarono che il substrato particolato non veniva del tutto idrolizzato durante il periodo di reazione, mentre quello solubile era idrolizzato in circa 30 minuti.

Il meccanismo di rimozione del substrato polimerico in un sistema operante in discontinuo secondo gli autori è simile a quello che si realizza in sistemi biologici a biomassa adesa o sospesa operanti in continuo: la materia organica in forma particolata viene dapprima adsorbita sulla superficie dei fiocchi o del biofilm, dopodiché viene idrolizzata dai microrganismi. Una sostanziale aliquota è altresì

rimossa ad opera dei protozoi. L'eccessivo sviluppo dei protozoi è favorevole dal punto di vista della quantità dell'effluente, in quanto riducono sensibilmente la quantità di solidi sospesi allo scarico.



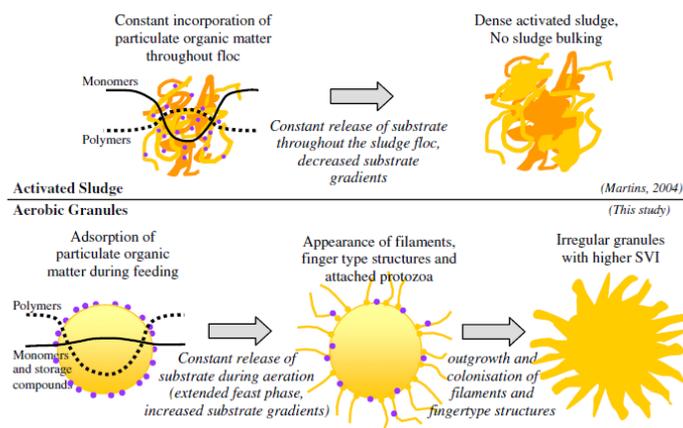
**Fig 3.1:** Immagini dei granuli nei reattori alimentati con l'amido particolato (A, C), l'amido solubile (B, D); granuli dominati da protozoi (E); granuli dell'impianto Nereda (F). (De Kreuk et al., 2010).

La presenza di substrati particolati e lentamente biodegradabili ha dunque favorito lo sviluppo di batteri filamentosi soprattutto sulla superficie dei granuli. Secondo alcuni autori (**Chudoba et al., 1973**), l'eccessivo sviluppo di batteri filamentosi non è tanto dovuto alla concentrazione di substrato, bensì sono i micro-gradienti di concentrazioni di substrato all'interno dei fiocchi/biofilm/granuli che giocano un ruolo più importante nello sviluppo competitivo tra batteri filamentosi e batteri fiocco-formatori.

I microrganismi filamentosi hanno una velocità di crescita superiore rispetto a quella dei batteri fiocco-formatori, poiché essi crescono preferenzialmente in due direzioni, mentre i secondi tendono a formare strutture tridimensionali (**Martins et al., 2003, 2004**). In sistemi senza gradienti di substrato ci si aspetterebbe di avere strutture dei fiocchi/biofilm/granuli maggiormente compatti rispetto a quelli che si hanno in sistemi con gradienti di substrato, dove i microrganismi filamentosi proliferano. Secondo gli autori, nei sistemi a fanghi attivi, i solidi sospesi vengono incorporati all'interno dei fiocchi, dove l'idrolisi causa un continuo rilascio di substrato all'interno del fiocco stesso. Di conseguenza, la concentrazione del substrato nel fiocco è pressoché costante e quindi i micro-gradienti sono assenti, prevenendo così l'eccessivo sviluppo di filamentosi e fenomeni di bulking. Al contrario, nei granuli aerobici, il substrato particolato è principalmente idrolizzato sulla superficie, e viene consumato localmente creando in tal modo dei gradienti di concentrazione di substrato all'interno del granulo, stimolando in tal modo lo sviluppo dei batteri filamentosi. Inoltre la loro crescita è maggiore sulla superficie del granulo risultando quindi in strutture morfologicamente molto irregolari.

Il meccanismo di rimozione del substrato particolato (Fig. 3.2), ha avuto effetti significativi anche sulla rimozione dell'azoto, in particolare sul processo di denitrificazione. L'adsorbimento del materiale particolato, la sua idrolisi e la successiva ossidazione in condizioni aerobiche sulla superficie del granulo ha determinato la carenza di substrato organico per la denitrificazione negli strati anossici più interni.

Per analoghe ragioni, la rimozione del fosforo si realizzava con rendimenti decisamente minori rispetto a quelli normalmente ottenibili in sistemi a biomassa granulare alimentati con refluo sintetico. La mancanza di substrato negli strati più interni infatti non consente ai batteri PAO di effettuare lo stoccaggio di sostanza organica, di conseguenza non si osservava rilascio di fosforo nella fase anaerobica e il riassorbimento nella successiva aerobica.



**Fig. 3.2:** Meccanismo di rimozione dei substrati particolati da parte dei granuli aerobici (De Kreuk et al., 2010).

### 3.3 Trattamento di reflui salini

Questo paragrafo riveste un ruolo molto importante all'interno di questa tesi, in quanto come si leggerà nel proseguo del lavoro, gran parte dell'attività di ricerca è stata incentrata sul trattamento di reflui caratterizzati da elevate salinità. Verrà fatta inizialmente una panoramica generale sui trattamenti dei reflui salini con i sistemi a biomassa sospesa, e se ne individueranno le principali problematiche. Successivamente si affronterà la stessa tematica con i fanghi granulari, in modo da evidenziarne differenze ed analogie.

Il sale destinato al consumo umano (NaCl) ha un doppio ruolo: il nutrimento e la conservazione degli alimenti. L'importanza economica del sale (NaCl) è enorme per quanto riguarda il suo consumo che eccede i 30 milioni di tonnellate per anno nella sola Unione Europea. I principali consumatori di sale sono le industrie chimiche (principalmente il settore dei cloruri), le attività di sbrinamento delle strade e le industrie agro-alimentari (Lefebvre & Moletta, 2006). Le industrie alimentari richiedono elevatissime quantità di sale, per la conservazione delle carni, la preparazione di verdure sottaceto e la lavorazione del pesce. Come è noto infatti, il sale riduce l'attività dell'acqua e per tanto costituisce un agente stabilizzante l'attività biologica (Lozach et al., 2001). Altri usi non trascurabili derivano dalle attività delle industrie petrolifere, tessili, conciarie e allo stesso modo per l'addolcimento delle acque. Tutti questi settori generano una grossa quantità di reflui salini, ricchi sia di sostanza organica che appunto di sali. Oltre alle acque reflue di origine industriale ci sono altre cause che determinano un aumento del contenuto salino nelle acque reflue. Tra queste una delle più importanti è dovuta

all'infiltrazione dell'acqua di mare all'interno dei collettori fognari. Tali tipi di acque vengono normalmente denominate come acque parassite, e il loro apporto in fognatura è tutt'altro che trascurabile specie che in centri costieri.

Nel momento in cui queste acque vengono scaricate senza un preventivo trattamento, possono causare severi danni al suolo, e alle acque superficiali e profonde. Stante le dimensioni del problema, l'Unione Europea stabilì con la direttiva 2000/60/EC la necessità di mettere a punto degli interventi in materia di gestione delle acque, finalizzati a prevenire l'impatto dell'inquinamento salino sull'ambiente. L'interesse verso i processi di trattamento degli effluenti salini è cresciuto in maniera rapida nel corso degli ultimi 20 anni. I reflui salini sono di solito trattati mediante processi fisico-chimici, poiché è noto che i processi biologici risultano fortemente inibiti a causa della presenza di sale (prevalentemente NaCl). Tra questi processi i più utilizzati sono quelli di coagulazione-flocculazione, scambio ionico, evaporazione solare e filtrazione su membrane. Tuttavia, i processi fisico-chimici, seppur affidabili ed efficienti, risultano estremamente costosi. Ad oggi, sono state analizzate diverse soluzioni di processo alternative la maggior parte delle quali consiste del trattamento biologico, sia anaerobico che aerobico (**Lefebvre & Moletta, 2006**).

È noto che concentrazioni di cloruri superiori a 5-8 g L<sup>-1</sup> compromettono le corrette operazioni che si realizzano nei processi tradizionali di trattamento delle acque reflue (**Ludzack and Noran, 1965**). Nonostante l'effetto dannoso del sale sull'attività microbiologica, una moderata acclimatazione del fango attivo ad elevate concentrazioni saline è possibile. L'acclimatazione implica l'esposizione di microrganismi non-adattati al sale, a crescenti concentrazioni dello stesso, al fine di consentire l'ottenimento di performances soddisfacenti anche a elevate concentrazioni di sale. Il successo di tale acclimatazione dipende da numerosi fattori, come il tipo di microrganismi, la fase di sviluppo, la variazione di concentrazione salina del refluo durante l'acclimatazione, ovvero se essa risulta rapida o graduale. È stato dimostrato che l'*Escherichia coli*, esibisce il maggior grado di adattabilità durante la fase di crescita stazionaria (**Doudoroff 1940**); inoltre, è stato osservato che gli effetti negativi sul suo sviluppo si hanno quando l'incremento di salinità è rapido piuttosto che graduale (**Oren et al., 1992**). Di conseguenza, si è osservata una temporanea riduzione nel tasso di rimozione del BOD, soprattutto quando il cambiamento di salinità era accompagnato da elevati valori di carico organico (**Stewart et al., 1962**). Un'altra conseguenza del rapido aumento di salinità è il rilascio di materiale intracellulare, che produce un incremento della concentrazione di COD solubile (**Kincannon et al., 1968**). Sebbene l'acclimatazione del fango attivo ai reflui salini sia possibile, il maggiore problema è legato alle performance, infatti rendimenti depurativi accettabili possono ottenersi solo fino al 5% di salinità (**Dincer and Kargi, 2001**). Di conseguenza l'utilizzo di microrganismi specializzati quali i batteri alofili, rimane l'attuale migliore soluzione per il trattamento di reflui salini. Infine,

l'acclimatazione alla salinità si perde rapidamente se la salinità del refluo decresce rapidamente, circostanza questa che si verifica spesso nei reflui prodotti da attività industriali a carattere stagionale.

È stato osservato che l'elevata salinità può fortemente inibire il trattamento biologico per via aerobica dei reflui. Come indicato nel precedente paragrafo, l'utilizzo di un inoculo di batteri alofili, risulta la maniera migliore per ottenere performance soddisfacenti. **Dincer and Kargi, (2001)**, osservarono infatti che l'aggiunta di alobatteri al fango attivo, migliorò in maniera molto significativa le performance depurative. **Kargi et al. (2000)** hanno ottenuto rendimenti di rimozione del COD superiori al 95% mediante l'inoculo di fango attivo ricco in *Halobacter Halobium*. La tecnica dell'inoculo di batteri alotolleranti (*Staphylococcus sp.* e *Bacillus cereus*) è stata adottata anche da **Kubo et al. (2001)** per il trattamento di reflui ipersalini (15% NaCl) provenienti da industrie alimentari. Un'altra possibile strategia consiste nell'inoculo di batteri alofili derivati da diversi ambienti salini, quali le saline, al fine di renderli capaci allo stesso tempo di resistere alle elevate concentrazioni saline e di rimuovere la sostanza organica. La principale conclusione che si deduce da questi studi è che il fango cosiddetto alofilo contiene in se le stesse caratteristiche di biodiversità di un comune fango attivo, circostanza che favorisce l'ottenimento di performance equiparabili a quelle di un impianto convenzionale.

I reattori sequenziali (SBR) sono conosciuti come una valida soluzione di trattamento in casi in cui i reflui mostrano caratteristiche particolari. Di conseguenza, tale tipo di processo è stato spesso utilizzato nel trattamento di reflui ad elevata salinità. **Woolard e Irvine, (1994)** sono stati tra i primi a inoculare un SBR con una moderata quantità di batteri alofili, prelevati dal Great Salt Lake, USA, al fine di trattare un refluo sintetico contenente 150 g L<sup>-1</sup> di sale. Il rendimento di rimozione misurato sul fenolo era superiore al 99%, con una concentrazione influente dello stesso di circa 120 mg L<sup>-1</sup>, senza un controllo sul pH. Più di recente **Uygun e Kargi (2004)**, utilizzarono un SBR per trattare un refluo salino sintetico. Gli autori osservarono una drastica riduzione del rendimento di rimozione del COD dal 90% al 32% quando la salinità venne incrementata dallo 0% al 6%. **Lefebvre et al. (2004)** inocularono un SBR pilota con batteri alofili, al fine di trattare un refluo proveniente da un'industria alimentare contenente 120 mg L<sup>-1</sup> di sale. I rendimenti di rimozione del COD e TKN furono rispettivamente pari a 83% e 72%. In un altro esperimento, condotto sempre in un sistema SBR, i rendimenti depurativi su un refluo conciarario (34 g L<sup>-1</sup> NaCl) sono stati del 95%, 93%, 96% e 92% rispettivamente per il COD, P-PO<sub>4</sub>, TKN e SST, con un HRT di 5 giorni e un carico organico volumetrico di 0,6 KgCOD/m<sup>3</sup>·giorno (**Lefebvre et al., 2005**). Infine **Ng et al. (2005)** sono riusciti a trattare con buoni risultati un refluo sintetico con concentrazione di 60 g L<sup>-1</sup> di NaCl, utilizzando biomassa acclimatata proveniente da un impianto di trattamento convenzionale. Il rendimento di

rimozione del COD diminuì dal 96% al 86% quando la concentrazione di NaCl aumentò da 0 a 60 g L<sup>-1</sup>.

Oltre all'effetto sul rendimento di rimozione della sostanza organica, la presenza di elevate quantità di sale incide sensibilmente anche sul tasso di respirazione della biomassa. I primi studi effettuati su *Bacillus cereus* indicarono che il tasso di respirazione endogena iniziava a ridursi per concentrazioni superiori all'1% di NaCl (**Ingram, 1940**).

**Kincannon et al. (1966)** osservarono che in presenza di elevate concentrazioni saline, veniva consumato più ossigeno per la sintesi cellulare; gli autori spiegarono tale osservazione affermando che la presenza di elevata quantità di NaCl può esercitare una pressione selettiva che favorisce la predominanza di specie che hanno un tasso di respirazione per sintesi intrinsecamente più alto. **Ludzach e Noran, (1965)** trovarono simili risultati, sostenendo, inoltre, che elevate concentrazioni di sale riducano il tasso di respirazione. Infine, recenti studi condotti a mezzo di test respirometrici, hanno mostrato l'effetto inibente di elevate concentrazioni di sale sul tasso di respirazione della biomassa (**Pernetti e Di Palma, 2005**). In modalità di alimentazione di tipo batch, un rapporto sale/biomassa superiore a 30,7 gramm di sale per grammo di SSV, induce un'inibizione del tasso di respirazione prossima all'84%, mentre alimentando in continuo un rapporto di 35,5 g/g determina un'inibizione dell'81%. Tali esperimenti sono stati condotti su fanghi attivi e il tasso di inibizione è risultato ben correlabile alla perdita di efficienza di rimozione della sostanza organica.

**Chen e Wang, (2004)** dimostrarono che il progressivo adattamento di una coltura fango attivo nitrificante ai cloruri, dava migliori risultati rispetto a quelli di un'altra coltura operante a concentrazioni di cloruri costanti. Tuttavia oltre una concentrazione di cloruri di 18 g L<sup>-1</sup> la nitrificazione diventa instabile.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da **Dahl et al. (1997)**, i quali mostrarono che la nitrificazione aveva luogo fino ad una concentrazione massima di cloruri di 20 g L<sup>-1</sup>, con un massimo tasso di nitrificazione di 2 mgN-NH<sub>4</sub> gSSV<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Inoltre gli stessi autori dimostrarono che un rapido incremento nella concentrazione di cloruri ha un effetto inibitorio sui batteri nitrificanti.

In seguito anche **Campos et al. (2002)** osservarono che la nitrificazione risultava inibita a causa della combinazione di condizioni di elevata salinità e carico di azoto ammoniacale. L'accumulo di ammoniaca fu osservato per concentrazioni di azoto ammoniacale superiore a 3 g L<sup>-1</sup> e per concentrazioni di cloruri superiori a 13 g L<sup>-1</sup>.

La capacità da parte dei batteri alofili di utilizzare i nitrati come accettori di elettroni è un fenomeno ben noto. A metà degli anni 80, alcuni ceppi di batteri alofili sono stati isolati da vari siti coltivati in presenza di nitrati (**Hochstein e Tomlinson, 1985**). Molti di questi batteri si dimostrarono capaci di produrre nitriti, ossido di diazoto e infine azoto gassoso. Questi risultati dimostrarono la presenza di batteri alofili denitrificanti e la loro presenza all'interno di una grande

varietà di ambienti ipersalini. Tuttavia la loro applicazione per la rimozione dell'azoto appare tuttavia ancora complessa. **Dincer e Kargi, (1999)**, osservarono che concentrazioni di sale superiori al 2% erano responsabili di una significativa riduzione delle performance sia di nitrificazione che denitrificazione, quest'ultima in particolare risultava maggiormente inibita dalla presenza del sale.

Risultati opposti però sono stati ottenuti da **Panswad e Anan, (1999)** i quali mostrarono che i batteri denitrificanti erano in grado di tollerare elevate concentrazioni di sale, meglio rispetto ai batteri nitrificanti. Gli stessi autori ottennero un tasso di riduzione dei nitrati di  $2 \text{ mgN-NO}_3 \text{ gSSV}^{-1}\text{h}^{-1}$  per concentrazioni di  $30 \text{ mg L}^{-1}$  di NaCl.

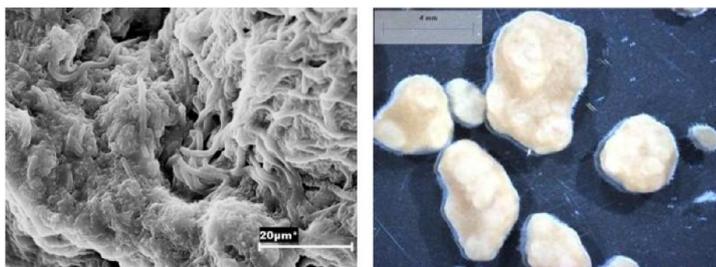
I problemi di sedimentabilità negli ambienti salini sono frequentemente riportati in letteratura e diverse sono le ragioni date alle cause di tale disfunzione (**Woolard and Irvine, 1995**). Innanzitutto, la densità dell'acqua salata è maggiore rispetto a quella dell'acqua dolce, per cui essa esercita una maggiore resistenza al moto di decantazione dei fiocchi. Inoltre, le elevate concentrazioni di sale causano la lisi cellulare, che determina la morte dei microrganismi a causa dell'incremento di pressione osmotica, e dunque si ha una sensibile riduzione delle dimensioni delle particelle (**Kargi and Dincer, 1997**). Ancora, l'elevata salinità riduce la quantità di batteri filamentosi, i quali giocano un ruolo chiave nella integrità strutturale dei fiocchi (**Lefebvre and Moletta, 2006**). Infine, la carenza di protozoi può determinare un sensibile peggioramento della torbidità dell'effluente. I protozoi infatti, non riescono a sopravvivere per più di 24 ore a concentrazioni di NaCl maggiori di  $40 \text{ mg L}^{-1}$  (**Salvado et al., 2001**). **Ng et al. (2005)** osservarono la scomparsa della maggior parte dei protozoi ciliati già a  $10 \text{ g L}^{-1}$  di NaCl.

Il trattamento di acque reflue caratterizzate da elevate concentrazioni saline richiede l'attiva presenza di talune specie batteriche tolleranti alla salinità. Tali microrganismi non sono presenti in quantità sufficienti negli impianti convenzionali per il trattamento delle acque reflue. Gli ioni dei sali in soluzione ( $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  principalmente) esercitano una forte pressione osmotica sui microrganismi, e molti di essi non riescono a sopravvivere in tali condizioni ovvero entrano in uno stato di latenza che li rende inefficaci ai fini della depurazione. Inoltre le elevate concentrazioni saline riducono l'attività biologica, inibiscono molti enzimi e determinano l'essiccazione della cellula a causa dell'espulsione dell'acqua contenuta all'interno del citoplasma per via della pressione osmotica (**Lefebvre e Moletta, 2006**). Di conseguenza le elevate concentrazioni saline possono provocare sensibili danni alla biomassa non specializzata di un sistema biologico, che si traducono in perdite di efficienza di rimozione del carbonio, dell'azoto e del fosforo.

Nel corso degli ultimi anni la tecnologia del fango granulare si è seriamente candidata a una delle più promettenti di nuova generazione specie per il trattamento di acque ad elevato carico (**Schwarzenbeck et al., 2004**), reflui contenenti composti aromatici (**Adav et al., 2008**), sostanze tossiche e xenobiotiche (**Liu et**

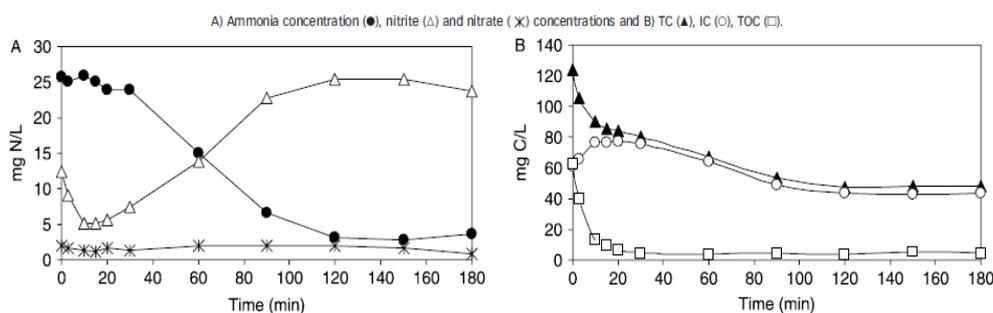
al. 2009; Amorim et al. 2014), nonché per la rimozione combinata di azoto e fosforo (Mosquerra-Corral et al., 2005; Di Bella e Torregrossa 2013). Recentemente tale tecnologia è anche stata applicata per il trattamento di reflui salini.

Un'esperienza interessante è quella condotta da Figuroa et al. (2008) relativamente al trattamento di reflui prodotti da industrie alimentari nel settore della conservazione del pesce. Tali reflui sono caratterizzati da una salinità superiore a  $30 \text{ g L}^{-1}$  di NaCl (Sanchez et al., 2004), circostanza che causa gravi disfunzioni a livello biologico nei trattamenti convenzionali a fanghi attivi. Il trattamento di reflui a elevata salinità determina il rigonfiamento del fango, misurabile attraverso il parametro SVI (Uygur and Kargi, 2004) e la riduzione delle dimensioni dei fiocchi (Moon et al., 2003). È tuttavia noto che l'acclimatazione di comuni microrganismi a elevate concentrazioni saline è possibile (Campos et al., 2002). Gli autori utilizzarono un impianto colonnare di 1,5 litri operante in batch secondo cicli di 3 ore, nel quale è stato inoculato fango attivo proveniente da un impianto per la rimozione dell'azoto. Il refluo grezzo, proveniente da un'industria operante nel settore della produzione di conserve di pesce, veniva sottoposto ad un trattamento preliminare di digestione anaerobica, e da qui il surnatante inviato al reattore di granulazione, previa eventuale diluizione al fine di mantenere il carico organico volumetrico in un range prossimo a  $1,5 \text{ kg COD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$ . In queste condizioni la concentrazione di ioni cloruri veniva mantenuta intorno a  $7\text{-}9 \text{ g L}^{-1}$ . I granuli iniziarono a formarsi dopo 45 giorni; essi erano caratterizzati da una piccola struttura fibrosa nella loro superficie, che scomparve progressivamente al 75° giorno, a partire dal quale nel reattore vi erano solo granuli ormai maturi. Le dimensioni medie dei granuli erano nell'ordine di 2 mm, tuttavia nel reattore era presente una percentuale non trascurabile di granuli di dimensioni superiori ai 4 mm. Dal punto di vista strutturale i granuli erano caratterizzati da una struttura poco densa e irregolare, nella quale vi era una significativa predominanza di batteri filamentosi (Fig.3.3).



**Fig.3.3:** Morfologia dei granuli aerobici (Figuroa et al., 2008).

Tali caratteristiche secondo gli autori sono addebitabili al tipo di refluo utilizzato nel corso della sperimentazione, confermando i risultati ottenuti da altri autori (Hailei et al., 2006). I rendimenti di rimozione della sostanza organica espressa in termini di TOC sono stati sempre superiori al 90%; per quanto concerne l'azoto invece, si sono osservati due differenti comportamenti. In un primo periodo, corrispondente ai primi 59 giorni di sperimentazione non è stata osservata un'apprezzabile riduzione dell'azoto ammoniacale per nitrificazione, mentre dal 60° giorno in poi l'ammoniaca veniva ossidata durante la fase aerobica, successivamente all'ossidazione del COD biodegradabile (Fig.3.4). Tuttavia si è osservato un sensibile accumulo di nitriti, pertanto la reazione di nitrificazione risultava soltanto parziale. Tale fenomeno, secondo gli autori, risultò legato al doppio effetto della salinità e dell'accumulo di ammoniaca libera, che determina un effetto inibitorio sui batteri nitrito-ossidanti (NOB) responsabili del secondo step del processo di nitrificazione.



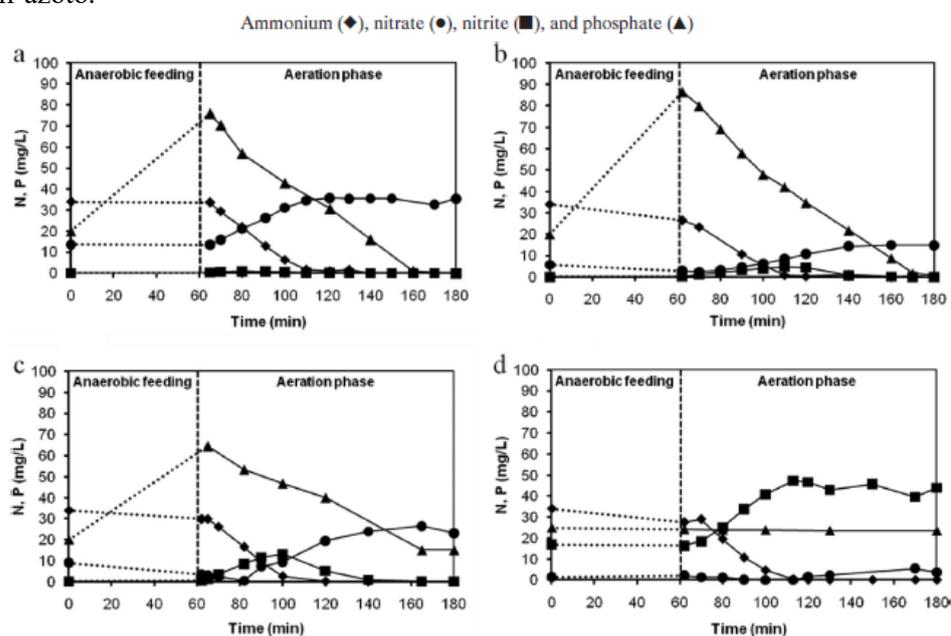
**Fig.3.4:** Andamento della concentrazione di ammoniaca, nitriti, nitrati (A) e TOC, TC e IC (B) durante un ciclo (Figueroa et al., 2008).

Dai risultati ricavati dall'analisi microbiologica del fango, mediante applicazione di tecniche di ibridizzazione per fluorescenza in situ (FISH), è emerso che nella prima fase non sono stati ottenuti risultati positivi ne per i batteri ammonio-ossidanti (AOB) ne per quelli nitrito-ossidanti (NOB), confermando pertanto la mancanza della reazione di nitrificazione. Nella seconda fase invece è stato osservato un cambiamento nella popolazione microbica; infatti, sono risultati presenti batteri AOB appartenenti alle specie *Nitrosomonas* alofila e alotollerante; al contrario sono stati osservati solo pochi batteri NOB, in accordo con la scarsa conversione di nitriti a nitrati nel bioreattore.

I risultati ottenuti da Figueroa et al. (2008) confermano quelli ottenuti da Uygur e Kargi (2004), i quali osservarono, inoltre, che l'effetto inibitorio della salinità sull'attività metabolica della biomassa non è rilevabile per concentrazioni di cloruri inferiori a  $10 \text{ g L}^{-1}$ .

L'aspetto microbiologico è stato approfondito da Bassin et al. (2011b). Gli autori in particolare hanno valutato l'effetto dell'incremento progressivo della

concentrazione salina su granuli già formati e stabili, in termini di cambiamenti nella comunità batterica e sulle dinamiche di processo in senso lato. L'impianto pilota utilizzato dagli autori era un reattore colonnare di 2,7 litri di volume, operante in batch secondo cicli di 3 ore, suddivisi in 60 minuti di alimentazione in condizioni anaerobiche e 112 di reazione, 3 di sedimentazione e i restanti 5 di scarico. L'impianto venne inoculato con fango granulare prelevato da un altro impianto pilota. La sperimentazione venne divisa in 4 fasi, per un totale di 449 giorni. La concentrazione di cloruro di sodio è stata nulla nella prima fase, mentre veniva aumentata progressivamente di  $11 \text{ g L}^{-1}$  in ciascuna altra ogniquale si raggiungevano condizioni pseudo-stazionarie, raggiungendo pertanto una concentrazione di  $33 \text{ g L}^{-1}$  nell'ultima fase. L'efficienza di rimozione dell'ammoniaca non ha subito conseguenze a causa dell'aumento di salinità. In Figura 3.5 sono mostrati i risultati dei test cinetici relativi alla rimozione dell'azoto.



**Fig.3.5:** Andamento della concentrazione di azoto e fosforo durante il ciclo di reazione durante le diverse fasi operative: I no sale (A), II (B) ( $11 \text{ g L}^{-1}$ ), III (C) ( $22 \text{ g L}^{-1}$ ), IV (D) ( $33 \text{ g L}^{-1}$ ). (Bassin et al., 2011).

L'ammoniaca, infatti, veniva ossidata entro i primi 60 minuti di aerazione in tutti e 4 le fasi della sperimentazione. In più, gli autori osservarono che nella fase di alimentazione la concentrazione di ammoniaca si riduceva leggermente, a causa del fenomeno di adsorbimento dello ione ammonio all'interno dei granuli stessi. I

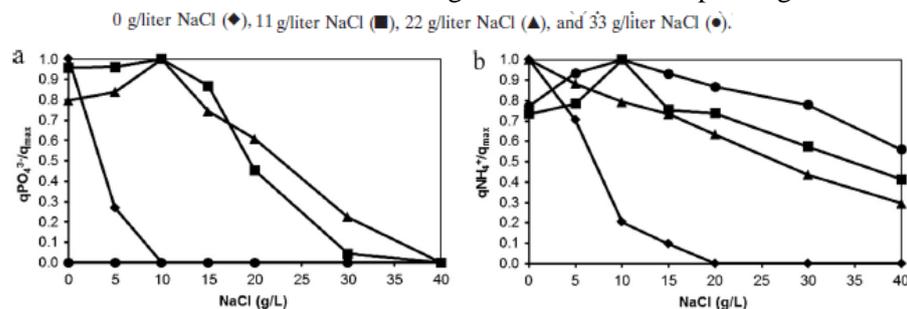
nitriti sono stati i principali prodotti della nitrificazione nella prima e terza fase; durante la terza fase stessa, si è osservato un leggero accumulo di intermedi di reazione (nitriti) che tuttavia venivano ossidati successivamente dai batteri nitrito-ossidanti (NOB), ovvero denitrificati a  $N_2$  o da batteri fosforo-accumulanti (DPAOs) oppure da batteri glicogeno-accumulanti (DGAOs). Durante la quarta fase, quando la concentrazione di cloruro di sodio era di  $33 \text{ g L}^{-1}$ , si è osservato un sensibile accumulo di nitriti (maggiore di  $20 \text{ mg L}^{-1}$  di N); tale risultato indica che i batteri NOB risultano maggiormente sensibili alle elevate concentrazioni saline rispetto ai batteri AOB (Fig.3.5).

In contrasto con quanto osservato relativamente alla nitrificazione, la rimozione del fosforo è risultata fortemente condizionata dall'aumento della salinità. Sia il rilascio di fosfati durante la fase anaerobica che l'uptake durante la successiva aerobica si ridussero sensibilmente al crescere del contenuto salino del refluo da  $11$  a  $22 \text{ g L}^{-1}$  (seconda e terza fase). In particolare gli autori osservarono che la riduzione del tasso di rimozione del fosforo si verificava esattamente durante il periodo in cui si accumulavano grosse quantità di nitriti (Fig. 3.5b, c), confermando per altro quanto già osservato da **Cui et al., (2009)**. In seguito, quando la concentrazione di nitriti diminuiva, il fosforo veniva nuovamente rimosso. La rimozione del fosforo non è stata invece osservata nella quarta fase quando la concentrazione di cloruro di sodio nell'alimento era di  $33 \text{ g L}^{-1}$ .

Mediante l'esecuzione di batch test, gli autori hanno valutato l'effetto a breve termine della salinità sul tasso di rimozione dell'azoto ammoniacale e del fosforo utilizzando la biomassa acclimatata a differenti concentrazioni saline (Fig.3.6). Dai risultati ottenuti gli autori hanno osservato che esso inizia a ridursi quando la concentrazione di sale eccede i  $10 \text{ g L}^{-1}$ . Ciò è particolarmente evidente nel caso in cui la biomassa non è acclimatata alla salinità (fase 1). Il massimo tasso di nitrificazione è stato osservato per concentrazione di NaCl di  $10 \text{ g L}^{-1}$  per la biomassa acclimatata a  $11$  e  $33 \text{ g L}^{-1}$  (seconda e quarta fase rispettivamente). Per la biomassa acclimatata a  $22 \text{ g L}^{-1}$  il massimo tasso di nitrificazione è stato osservato in assenza di sale. I nitrati sono risultati essere il principale prodotto di reazione per tutte le concentrazioni saline relativamente alla biomassa della prima e seconda fase ( $0$  e  $11 \text{ g L}^{-1}$  di NaCl).

Nei test relativi alla biomassa acclimatata a  $22$  e  $33 \text{ g L}^{-1}$  (terza e quarta fase) i principali prodotti di reazione sono stati i nitriti. Dai bilanci di massa per l'azoto è emerso che il tasso più elevato di denitrificazione si è osservato per la biomassa acclimatata a  $11 \text{ g L}^{-1}$ , registrando rendimenti di rimozione dell'azoto totale compresi tra il  $70$  e l' $85\%$ . I risultati ottenuti, combinati con quelli ricavati dalle analisi microbiologiche hanno indotto gli autori a sostenere che i batteri ammonio-ossidanti (AOB) sono in grado di adattarsi alle crescenti concentrazioni saline, come dimostra il fatto che la *Nitrosomonas sp.* è stata sempre rilevata per tutta la durata della sperimentazione. Il cambiamento da nitrati a nitriti come prodotto del processo di nitrificazione è stato invece dovuto alla progressiva scomparsa dei

batteri nitrito-ossidanti NOB, e in particolare della *Nitrospira sp.*, nella terza fase della sperimentazione. Pertanto, gli autori sostengono che nei fanghi granulari i batteri AOB risultano meno suscettibili agli stress osmotici rispetto agli NOB.



**Fig.3.6:** Effetti dell'esposizione a breve termine della biomassa alla salinità in termini di cinetiche di rimozione del fosforo e dell'ammoniaca. (Bassin et al., 2011).

Risultati del tutto analoghi sono stati ricavati relativamente alla rimozione del fosforo. In particolare dall'analisi dei risultati ottenuti nei batch test, quando il principale prodotto della reazione di nitrificazione erano i nitriti anziché i nitrati, il tasso di rimozione del fosforo era pressoché nullo. Gli autori sottolineano in tal modo quanto emerso da altri lavori in letteratura, ovvero che concentrazioni di nitriti superiori a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  risultano essere inibitori per i batteri PAOs (Saito et al., 2004). Pijuan et al. (2011) riportano che l'acido nitrico libero, la cui concentrazione dipende dalla concentrazione di nitriti e dal pH, hanno un maggiore effetto inibitorio sui batteri PAOs rispetto ai GAOs, dando per tanto un maggiore vantaggio competitivo a questi ultimi. Nel corso della sperimentazione da analisi microbiologiche è emerso che l'esposizione a lungo termine a concentrazioni di cloruro di sodio di  $33 \text{ g L}^{-1}$  risultano fatali per batteri come il *Candidatus Accumulibacter*, appartenente ai PAOs, e di conseguenza per il processo di defosfatazione biologica. Tuttavia nel batch test condotto sulla biomassa acclimatata a  $22 \text{ g L}^{-1}$ , si è osservato che la rimozione del fosforo si realizza anche per concentrazioni di NaCl superiori a  $30 \text{ g L}^{-1}$ . Ciò suggerisce che il *Candidatus Accumulibacter* è capace di rimuovere il fosforo anche a elevate concentrazioni saline; tuttavia, a causa della competizione con i GAOs, nel lungo termine, scompare dal reattore. Parallelamente alla scomparsa dei batteri PAOs, le analisi microbiologiche hanno confermato che i batteri GAOs diventavano sempre più dominanti al crescere della salinità. I batteri GAOs, pur essendo in grado di rimuovere il carbonio alla pari di quelli PAOs, non consentono di rimuovere il fosforo in quanto nel loro metabolismo manca il meccanismo di rilascio-uptake del fosforo.

Taheri et al. (2012) hanno analizzato le caratteristiche e il meccanismo di formazione dei granuli, in un impianto pilota SBR alimentato con refluo salino

sintetico. La biomassa utilizzata per l'inoculo proveniva da un impianto a fanghi attivi che trattava reflui salini con una conducibilità elettrica di circa 9 mS cm<sup>-1</sup>. La salinità iniziale del refluo sintetico era di 2g NaCl L<sup>-1</sup> ed è stata incrementata gradualmente a 10 g NaCl L<sup>-1</sup> nel corso di un anno.

I granuli si sono formati dopo 70 giorni, e le loro dimensioni medie variavano tra 3 e 7 mm. All'interno del reattore era possibile osservare due tipologie di granuli differenti nel colore e nella struttura. Una tipologia di granuli era caratterizzata un colore marrone chiaro, da una superficie irregolare e da una struttura alquanto debole, nella quale la presenza di batteri filamentosi non era trascurabile, mentre l'altra era costituita da granuli di colore più scuro e strutturalmente più resistenti. Questi ultimi risultarono dominanti in tutta la sperimentazione, mentre i primi si sfaldarono progressivamente ad ogni incremento di salinità e vennero via via dilavati con l'effluente. Da specifiche analisi ai raggi-X, gli autori osservarono una carenza di anioni fosforo nel nucleo dei questi granuli. La presenza di tale anione, insieme allo ione calcio, è ritenuto uno dei principali elementi che permette la formazione di precipitati che fungono da supporto per la biomassa (Ren et al., 2008; Juang et al., 2010), per cui la loro scarsa abbondanza può determinare il deterioramento strutturale dei granuli ovvero essere causa di una struttura debole. L'altra tipologia di granuli invece si è mantenuta stabile per tutta la durata della sperimentazione. Analisi microscopiche hanno permesso di osservare la presenza di protozoi ciliati (*Opercularia* e *Vorticella*) anche a 20 gNaCl L<sup>-1</sup>; gli autori ritengono che tali protozoi possano costituire nuclei sui quali i granuli possono accrescersi. Mediante l'esecuzione di batch test, gli autori sono riusciti a determinare le costanti cinetiche del processo metabolico. Essi hanno osservato in particolare, che i valori del tasso di crescita della biomassa eterotrofa Y e del tasso specifico di rimozione del substrato organico risultavano dello stesso ordine di grandezza rispetto ai valori medi di un sistema a fanghi attivi convenzionale, mentre sostanziali differenze sono state trovare riguardo il valore del tasso di decadimento cellulare e la costante di semisaturazione. Il primo, in particolare, risultava circa un ordine di grandezza inferiore, mentre la costante di semisaturazione era di un ordine superiore (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1:** Confronto tra le costanti cinetiche di una biomassa non salina e quella acclimatata alla salinità. (Taheri et al., 2012).

Treatment system	Salinity (NaCl g/l)	$k_d$ (mg VSS/g VSS d)	$K_s$ (mg/l s COD)	$k$ (mg s COD/g VSS d)	$Y$ (mg VSS/mg s COD)	Reference
Activated sludge	Normal domestic wastewater	0.06-0.25	10-60	2-10	0.3-0.6	Metcalf and Eddy (2003)
SBR	10	0.025	194.94	2.29	0.45	This study

Inoltre, gli autori osservarono una significativa correlazione tra il carico organico influente e i rendimenti di rimozione del COD. Gli autori hanno cercato di spiegare tale osservazione affermando che, in condizioni di stress osmotico, le cellule batteriche modificano il loro metabolismo per adattarsi alle condizioni osmotiche loro imposte. In particolare, lo stress metabolico indurrebbe la biomassa a produrre

una maggiore quantità di ATP (Adenosinatrifosfato) per contribuire all'osmoregolazione, il che stimola lo sviluppo di reazioni biochimiche che richiedono energia (Ohwada e Sagisaka, 1987). Inoltre, è stato provato che alcuni batteri, ad esempio quelli enterici, sono in grado di inglobare all'interno della parete cellulare degli osmoliti, per cui acquistano un certo livello di alotolleranza (Zahran et al., 1997). Il meccanismo di adattamento alla salinità necessita quindi di molta energia e di conseguenza di una maggiore quantità di carbonio da ossidare, il che causerebbe un aumento dell'affinità per il substrato e quindi l'aumento della costante di semisaturazione. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere dovuta all'aumento della porosità dei granuli che si è osservato al crescere della salinità. In queste condizioni i microrganismi che si trovano negli strati più interni, ricevono sia più ossigeno che più substrato organico, in quanto la loro diffusione risulta favorita.

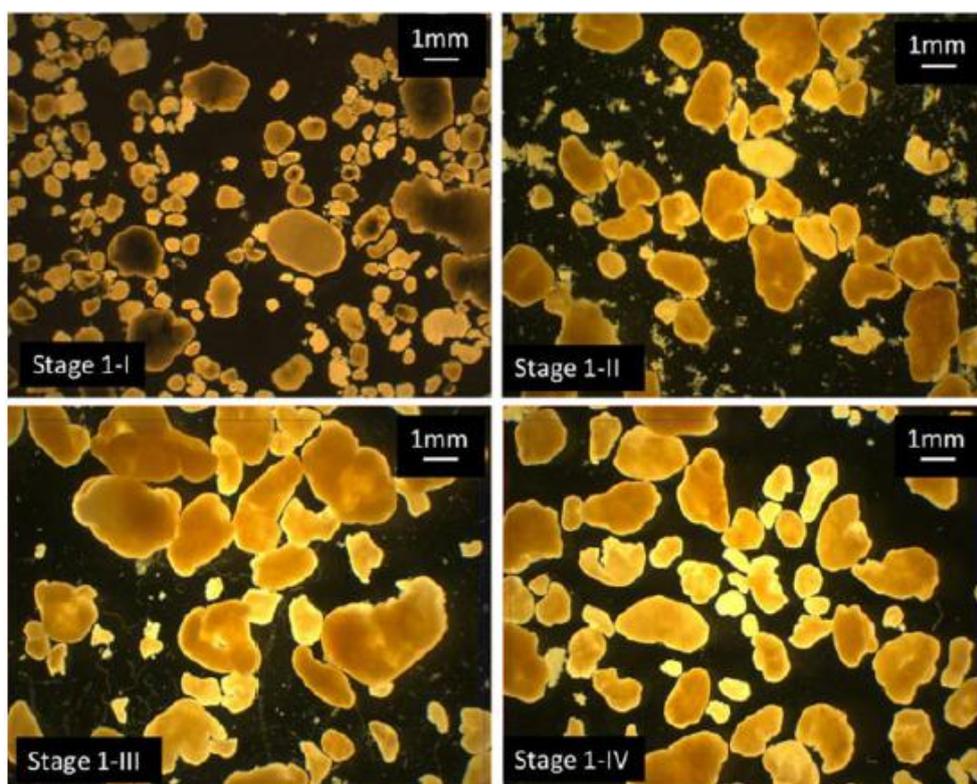
**Pronk et al. (2013)** hanno valutato in maniera globale gli effetti dell'incremento graduale del livello di salinità oltre che sulla stabilità e sulle performance biologiche dei granuli, anche sulla loro formazione.

Gli autori per la loro sperimentazione hanno utilizzato un reattore colonnare con configurazione SBBC, dal volume di 2,7 litri, operante secondo cicli di 3 ore che prevedevano una fase alimentazione in condizioni non aerate di 60 minuti, una di reazione di 112 minuti durante la quale venivano insufflati aria prima (come vettore di ossigeno) e azoto dopo, quest'ultimo per consentire le reazioni di denitrificazione e al contempo mantenere elevati gli sforzi di taglio.

Gli autori hanno utilizzato granuli già formati prelevati da un impianto operante in piena scala. La sperimentazione venne suddivisa in 4 periodi, di cui la prima necessaria soltanto a fare acclimatare i granuli al nuovo impianto in scala di laboratorio e al refluo sintetico a base di acetato di sodio (C:N:P=20:3:1), mentre nelle restanti tre si è gradualmente incrementata la concentrazione di cloruri nell'influente da 6,6 a 13 e infine a 20 mg L<sup>-1</sup> di Cl<sup>-</sup>.

Nel corso di ciascuno dei 4 periodi della sperimentazione si sono ottenuti granuli stabili, e non si è osservata alcuna loro sostanziale modifica strutturale. Ne secondo e terzo periodo il diametro medio dei granuli si è mantenuto costante (1,7 mm), mentre nel quarto si è ridotto (1 mm) (Fig. 3.7).

Gli autori non ritengono vi sia una ragione univoca a tale osservazione. Alcuni autori sostengono infatti che, sebbene la sintesi cellulare risulti ridotta a causa della salinità, l'esposizione prolungata a tali condizioni determina un maggiore addensamento della pellicola biologica, e di conseguenza granuli di minori dimensioni.

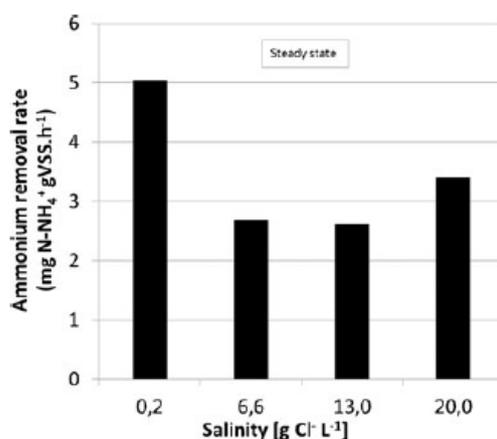


**Fig.3.7:** Immagini dei granuli nei 4 periodi della sperimentazione. (Pronk et al., 2013).

Osservazioni microscopiche dell'effluente hanno permesso di notare la presenza di batteri isolati incapsulati all'interno di EPS. Tale osservazione è indice di instabilità strutturale dei granuli che ne causano la riduzione delle dimensioni. Un incremento di EPS nell'effluente è stato osservato anche da **Bassin et al (2011b)**, trattando refluo con salinità di  $8 \text{ gCl L}^{-1}$  e da **Figueroa et al. (2008)** trattando refluo con salinità di  $9 \text{ gCl L}^{-1}$ . Questi autori ritengono che la riduzione delle dimensioni dei granuli sia stata dovuta alla riduzione della produzione di EPS; tuttavia nello studio di **Pronk et al. (2013)** i granuli alle stesse concentrazioni non mostravano segno di sfaldamento. Si ritiene che la carenza di EPS in seguito all'esposizione ad elevate concentrazioni saline sia dovuta alla sostituzione dello ione  $\text{Na}^+$  al posto dello ione  $\text{Ca}^{2+}$  nella matrice polimerica delle EPS (**Ismail et al., 2010**). La riduzione delle EPS, che fungono da collante nel processo di adesione cellulare nella formazione dei granuli, riduce la resistenza strutturale dei granuli stessi, che quindi risultano maggiormente esposti allo sfaldamento.

Quando la salinità è aumentata a  $6,6 \text{ g L}^{-1}$  (secondo periodo), non si sono più osservati protozoi ciliati; ciò indica che concentrazioni saline superiori a tale valore

esercitano un effetto negativo su questi microrganismi. La torbidità dell'effluente è sensibilmente aumentata nel 4° periodo (20 g L<sup>-1</sup> di Cl<sup>-</sup>) e la produzione di biomassa si è drasticamente ridotta, sebbene tutto l'acetato venisse consumato. Per quanto concerne la rimozione dell'azoto, l'azoto ammoniacale veniva rimosso nei primi 50 minuti della fase di aerazione. Non di meno, sebbene il suo tasso di rimozione volumetrico si mantenesse costante nei 4 periodi, il tasso specifico (per unità di biomassa) si è ridotto di oltre il 50% quando la salinità è stata aumentata. Gli autori, inoltre, hanno osservato che ad ogni incremento di salinità, il tasso specifico di rimozione dell'azoto ammoniacale inizialmente diminuiva sensibilmente, ma in maniera altrettanto rapida si riportava su valori stazionari e indipendenti dalla salinità. Nel quarto periodo, quando la salinità era di 20 g Cl<sup>-</sup> L<sup>-1</sup> si è addirittura osservato un incremento del tasso di rimozione dell'azoto ammoniacale (Fig. 3.8). Ciò non è tuttavia dovuto ad un incremento dell'attività metabolica, ma alla riduzione delle dimensioni delle particelle che si è verificata in questo stesso periodo, e che ha determinato l'aumento della superficie specifica dei granuli e di conseguenza la capacità ossidativa degli stessi.



**Fig.3.8:** Andamento del tasso di rimozione dell'ammonio a differenti salinità. (Pronk et al., 2013).

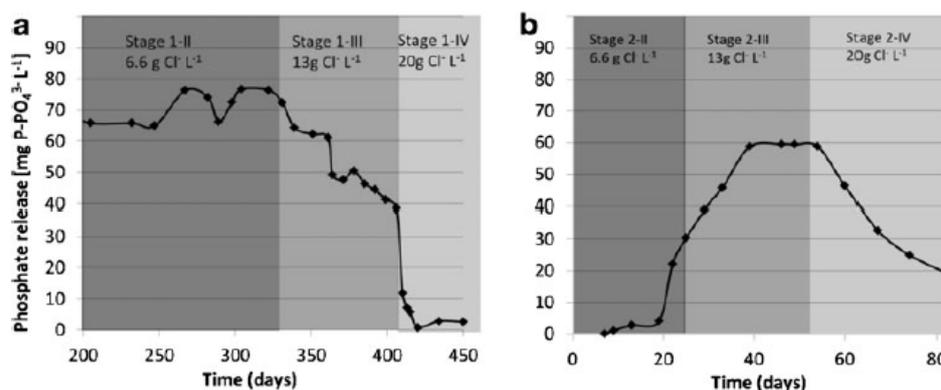
Rispetto alla biomassa sospesa in fiocchi, in quella granulare l'incremento della salinità non mostra particolari effetti in termini di rimozione del substrato ammoniacale. Questo differente comportamento tra biomassa sospesa e adesa si spiega con l'incremento dello spessore della zona aerobica nei granuli quando l'attività cellulare si riduce (de Kreuk et al., 2005). La riduzione dell'attività metabolica, infatti, riduce il consumo di ossigeno e, di conseguenza la sua profondità di penetrazione all'interno del granulo aumenta. Ciò conduce di fatto ad un aumento del volume aerobico che compensa la riduzione del tasso specifico di rimozione del substrato ammoniacale. Inoltre, l'elevata densità e la maggiore

quantità di biomassa rispetto ai fiocchi di fango riducono la sensibilità dei sistemi granulari nei confronti di condizioni ambientali avverse.

L'incremento di salinità dal secondo al terzo periodo (da 6,6 a 13 g L<sup>-1</sup> di Cl<sup>-</sup>) inizialmente non ha avuto effetti sull'attività dei batteri nitrito-ossidanti, cosicché non è stato osservato alcun accumulo di nitriti nel reattore. Tuttavia, durante il terzo periodo, a causa dell'esposizione a lungo termine all'elevata salinità (10 settimane), la concentrazione di nitriti nel reattore raggiunse i 13 mg L<sup>-1</sup>. L'effetto immediato della salinità sull'attività biologica dei batteri NOB si è invece osservata nel quarto periodo quando la salinità venne incrementata a 20 g L<sup>-1</sup> di Cl<sup>-</sup>; nel corso di soli 2 giorni, infatti, la concentrazione di nitriti crebbe da 13 a 25 g L<sup>-1</sup>, e raggiunse i 47 mg L<sup>-1</sup> dopo 6 settimane, evidenziando dunque la totale inibizione dei batteri NOB a questi livelli di salinità. Anche questo studio mostra dunque l'elevata sensibilità dei batteri nitrito-ossidanti verso ambienti fortemente salini. I rendimenti di denitrificazione invece non hanno subito sostanziali alterazioni al crescere della salinità.

Riguardo il fosforo, è stato osservato che il rilascio di polifosfati nella fase anaerobica si è sensibilmente ridotto nella terza fase dopo circa 6 settimane, a causa dunque dell'esposizione a lungo termine alla salinità, mentre la riduzione è stata immediata e drastica nel 4 periodo, nel quale appena 10 giorni dall'incremento della salinità a 20 g L<sup>-1</sup> di Cl<sup>-</sup>, il rilascio di fosfati si è totalmente arrestato.

Ulteriori analisi hanno permesso di constatare che il tasso di rimozione del fosforo si riduceva drasticamente quando nel reattore iniziavano ad accumularsi nitriti; in particolare superata la concentrazione di 13 g N-NO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, corrispondente al terzo periodo, il tasso di rimozione del fosforo si è ridotto di oltre il 40%. In letteratura è noto che concentrazioni di nitriti dell'ordine di 2mg L<sup>-1</sup> sono già sufficienti a causare una sensibile inibizione dell'attività metabolica dei PAO, mentre concentrazioni superiori a 6 mg L<sup>-1</sup> provocano la totale inibizione (**Saito et al., 2004**). Gli autori al fine di valutare in maniera separata gli effetti della salinità e dei nitriti sulla rimozione del fosforo, hanno effettuato attivato un ulteriore reattore nel quale però veniva aggiunta Alliltiurea (ATU) in modo da inibire i processi di nitrificazione, e prevenire così l'accumulo di nitriti. In queste condizioni, nel terzo periodo l'attività dei batteri PAO aumentò in maniera significativa e la loro frazione rispetto ai GAO era nell'ordine del 50% (Fig.3.9a e b).

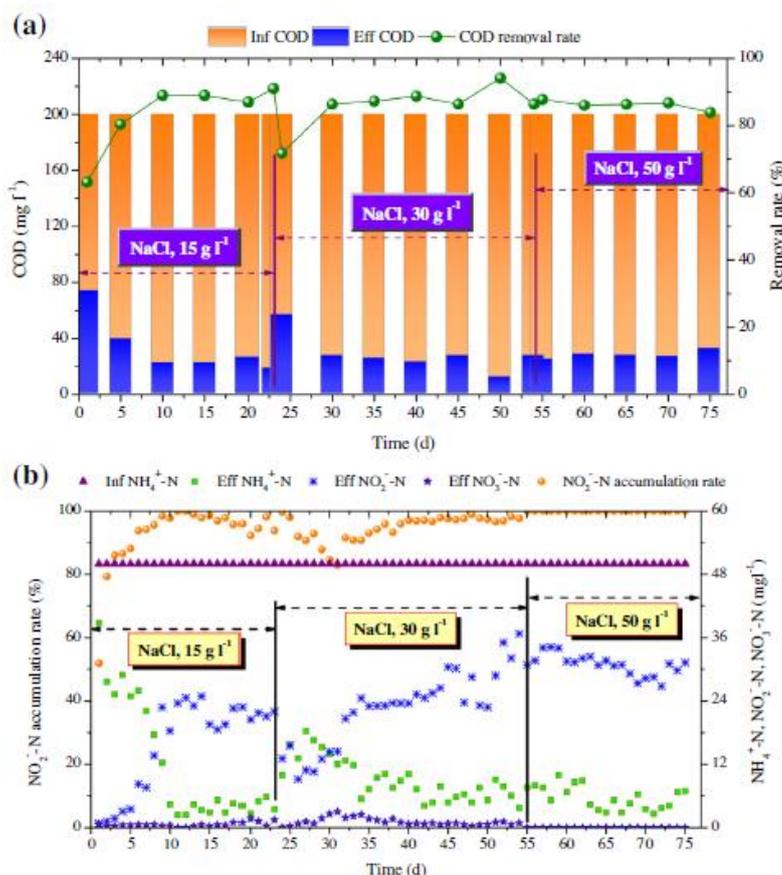


**Fig. 3.9:** Andamento della concentrazione di fosfati in due reattori con (a) e senza attività nitrificante (b). (Pronk et al., 2013).

L'ulteriore incremento di salinità nel quarto periodo coincise con una lenta e graduale riduzione del rilascio dei fosfati, segno tangibile di una ridotta attività dei batteri PAO, la cui frazione si ridusse a poco più del 15%. Gli autori hanno dedotto dunque che l'esposizione a salinità non superiori a 20 g L<sup>-1</sup> di Cl<sup>-</sup>, non ha effetti diretti immediati sull'attività dei batteri PAO, ma solo nel lungo periodo. Tuttavia in queste condizioni di salinità, i batteri PAO, a causa della presenza di nitriti, si trovano in competizione con i GAO, poiché riescono a formare meno polifosfati. Per concentrazioni superiori ai 30 g L<sup>-1</sup> di Cl<sup>-</sup>, l'effetto inibitorio della salinità sui PAO è diretto ed immediato. I risultati ottenuti dagli autori evidenziano come i processi di rimozione dell'azoto e del fosforo risultino strettamente connessi l'uno all'altro.

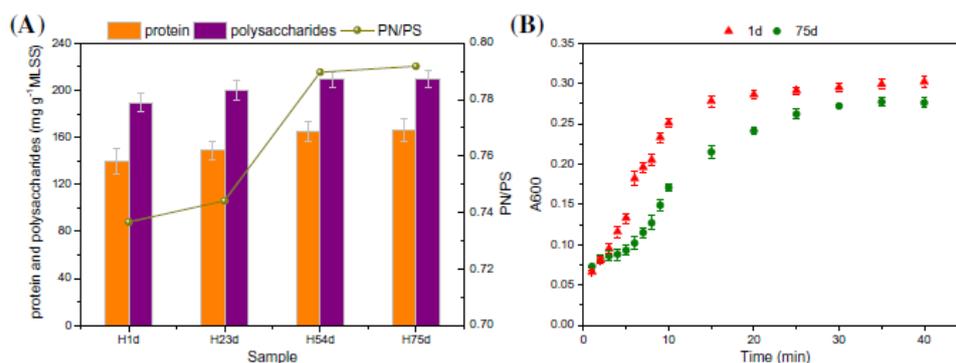
**Wan et al. (2014)** hanno analizzato le caratteristiche e le performance di un reattore a biomassa granulare operante in continuo, soffermandosi in particolare sui meccanismi di tolleranza all'elevata salinità da parte dei granuli aerobici. Il fango granulare utilizzato dagli autori per la sperimentazione è stato coltivato in un reattore SBR, e una volta che i granuli erano maturi sono stati inoculati nel reattore operante in continuo. Come alimento è stato utilizzato refluo sintetico a base di acetato di sodio (COD influente di 200 mg L<sup>-1</sup>), al quale veniva aggiunto cloruro di sodio al fine di ottenere la salinità voluta. La salinità è stata progressivamente incrementata, mediamente ogni 20 giorni, da 15 a 30 e infine a 50 gNaCl L<sup>-1</sup>. Gli autori hanno osservato nel complesso buoni rendimenti di rimozione del COD (>80%) indipendentemente dalla salinità dell'influente (Fig. 3.10a). Tuttavia, ad ogni incremento di salinità si osservava un leggero peggioramento del rendimento, che tuttavia si riportava su valori maggiori in meno di 5 giorni. Gli autori deducono dunque l'adattamento della comunità microbica sia possibile e che esso necessita di un breve periodo affinché i batteri possano

acclimatarsi alle nuove condizioni. Riguardo la rimozione dell'azoto, gli autori hanno osservato quanto fatto da altri autori, ovvero la progressiva acclimatazione dei batteri ammonio-ossidanti alla salinità e l'inibizione totale dei nitrito-ossidanti (Fig.3.10b).



**Fig. 3.10:** Andamento delle concentrazioni di COD (a) e azoto (b) in funzione per diverse concentrazioni saline (Wan et al., 2014).

La dimensione media dei granuli si ridusse al crescere della salinità da  $4 \pm 0.5$  mm a  $3 \pm 0.5$  mm, tuttavia la loro integrità strutturale, misurata come assorbanza del surnatante dopo l'esposizione del fango agli ultrasuoni (25 kHz, 65W), aumentò sensibilmente. Gli autori altresì hanno osservato un leggero aumento della produzione di EPS al crescere della salinità da  $190 \text{ mg gSSV}^{-1}$  del fango di inoculo a  $210 \text{ mg gSSV}^{-1}$  (Fig.3.11).



**Fig. 3.11:** Andamento delle concentrazioni di EPS (A) e della torbidità dei granuli dopo esposizione ad ultrasuoni (Wan et al., 2014).

Inoltre al crescere della salinità si osservò un importante aumento della concentrazione di ioni  $K^+$  e  $Na^+$  all'interno dei granuli e una contestuale diminuzione degli ioni  $Ca^{2+}$  (Tab. 3.2).

**Tab.3.2:** Concentrazione dei principali ioni contenuti nel fango di inoculo e nei granuli dopo 75 giorni. (Wan et al., 2014).

Sample	Ions concentration (mg g <sup>-1</sup> MLSS)				Amino acids (mg g <sup>-1</sup> MLSS)	
	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Glutamine	Proline
Seed	9.97 ± 0.91	0.33 ± 0.05	7.09 ± 0.13	2.13 ± 0.11	1.07 ± 0.04	0.39 ± 0.03
75d	4.90 ± 0.71	0.29 ± 0.07	46.82 ± 1.44	8.44 ± 0.27	6.63 ± 0.21	13.41 ± 0.57

Sulla base dei risultati ottenuti gli autori hanno proposto una possibile spiegazione al meccanismo di adattamento dei granuli alla salinità. Inizialmente la concentrazione di cationi ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ) e di amminoacidi all'interno dei granuli aumenta; successivamente si innesca un scambio di ioni, che coinvolge il calcio e il sodio; in particolare, quando la concentrazione extracellulare di ioni sodio è maggiore di quella intracellulare, questi ultimi tendono ad introdursi all'interno del citoplasma spiazzando gli ioni calcio che subiscono un trasporto verso l'esterno della cellula; gli ioni sodio tuttavia possono risultare deleteri per la produzione di enzimi, la struttura delle proteine e degli amminoacidi (neutralizza le loro cariche negative); allora i batteri tendono sostituirli con lo ione potassio; in questo modo i batteri alofili prevengono l'essiccamento del citoplasma (Fig. 3.12). In seguito, i batteri iniziano a produrre amminoacidi al fine di resistere all'elevata pressione osmotica (Csonka et al., 1989). Measures, (1987) sostiene che i batteri gram-negativi producano glutammine per contrastare la pressione osmotica, mentre i gram-negativi producono le proline.

La produzione in eccesso di proteine e polisaccaridi extracellulari aumenta la resistenza strutturale dei granuli, come si può osservare dalla Figura 3.12. Infine, la comunità microbica si adatta al nuovo ambiente: in particolare iniziano a svilupparsi batteri alotolleranti (*Rhodobacter sp.*, *Sinorhizobium sp.*, *Acinetobacter sp.*), in grado di sopravvivere in condizioni di forti pressioni osmotiche (Bremer 2000).

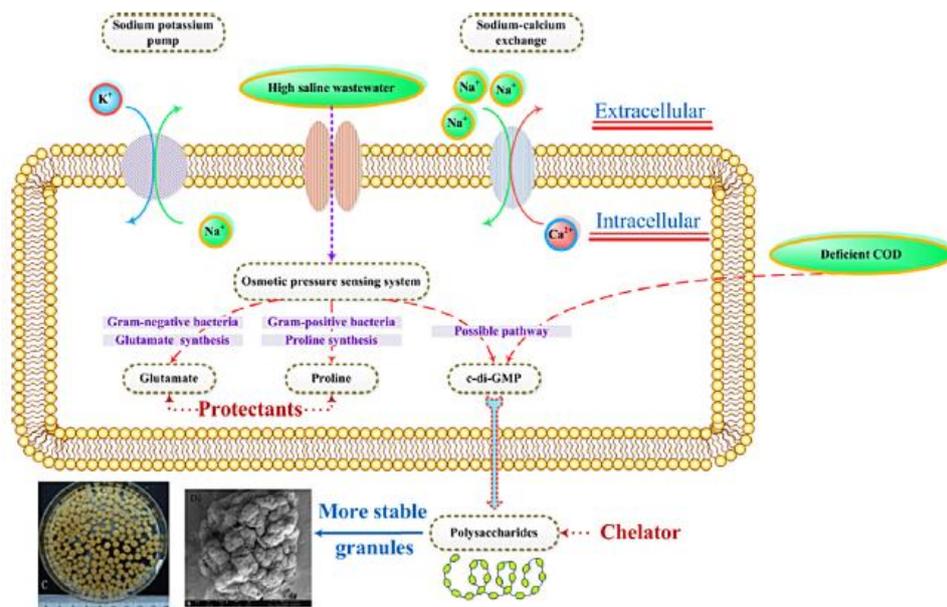
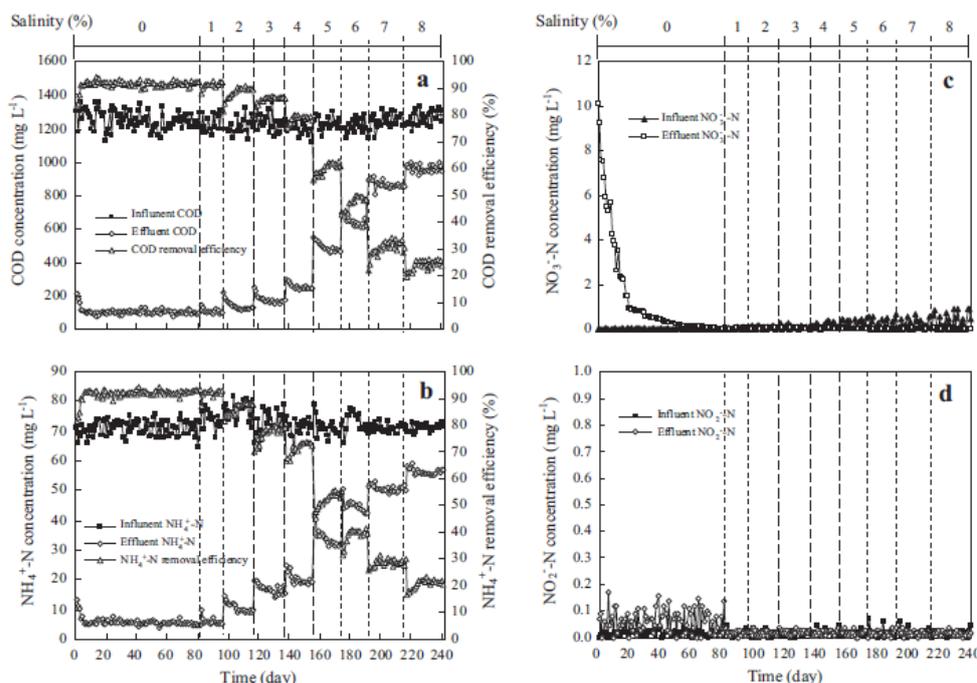


Fig. 3.12: Meccanismo di adattamento alla salinità (Wan et al., 2014).

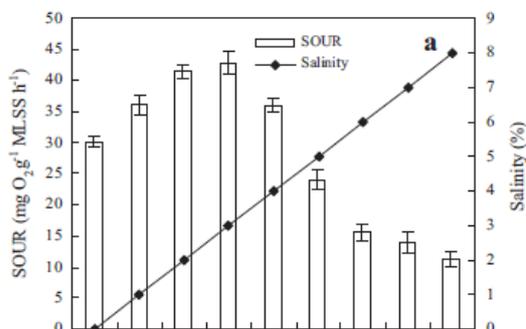
Wang et al. (2015) hanno studiato gli effetti dell'incremento della concentrazione di sale fino all' 8%, corrispondente a una concentrazione di circa 75 g NaCl L<sup>-1</sup>. Gli autori inocularono un impianto SBR con fango attivo prelevato da un impianto di trattamento per reflui civili. Durante la fase di coltivazione dei granuli, non è stato aggiunto sale all'alimento. Questo è stato aggiunto una volta che i granuli si sono formati, e il dosaggio è stato aumentato dell'1% ogni 20 giorni circa al fine di evitare shock di salinità.

Gli autori hanno osservato che al crescere della salinità il rendimento di rimozione della sostanza organica espresso in termini di COD, diminuiva in modo significativo, in seguito all'instaurarsi di fenomeni di plasmolisi o di perdita di funzionalità delle cellule batteriche. Analogamente, per quanto riguarda l'ammonio, gli autori osservarono che i rendimenti si ridussero drasticamente quando la salinità venne incrementata dal 3 al 4% (circa 35 gNaCl L<sup>-1</sup>) (Fig. 3.13).



**Fig. 3.13:** Concentrazioni nell'influente e nell'effluente e rispettivi rendimenti di rimozione, di COD, ammoniaca, nitriti e nitrati (Wang et al., 2015).

Gli autori valutarono, inoltre, i tassi di respirazione cellulare espressi in termini di SOUR. Dai risultati ottenuti emerse che l'aumento della concentrazione di sale determinava una sensibile riduzione di tale indice respirometrico (Fig.3.14).

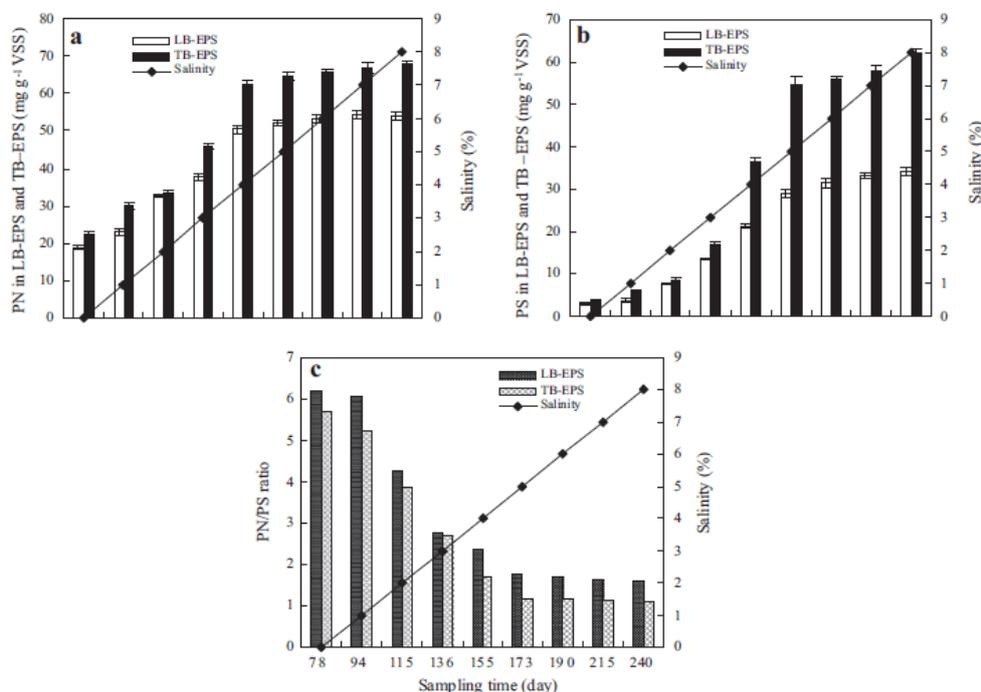


**Fig. 3.14:** Andamento dell'SOUR in funzione della salinità (Wang et al., 2015).

Tale riduzione è stata più marcata per valori superiori al 3%, quando l'SOUR si ridusse da 42 a 11 mgO<sub>2</sub> gSSV<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Allo stesso modo gli autori osservarono che il

tasso specifico di ossidazione dell'ammonio e dei nitriti si riduceva al crescere della salinità. Tuttavia il secondo si riduceva in modo più marcato, evidenziando e confermando la maggiore sensibilità dei batteri nitrito ossidanti alla salinità rispetto agli ammonio ossidanti.

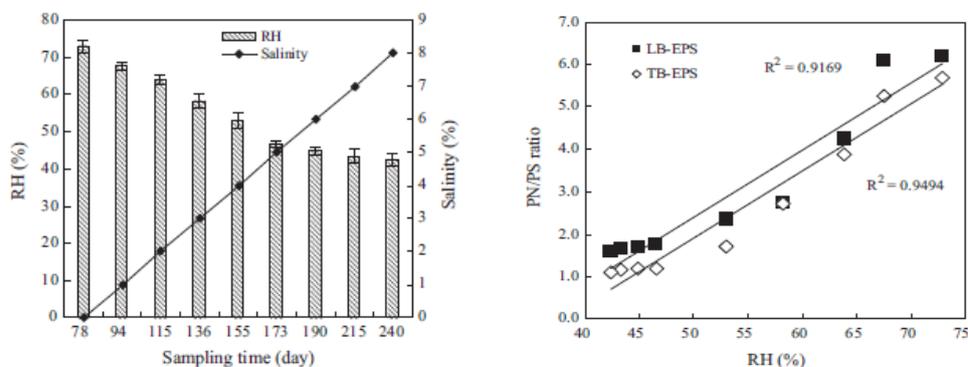
Gli autori riportano interessanti osservazioni riguardo il contenuto di EPS dei granuli. In particolare osservarono un progressivo aumento del contenuto sia di EPS legate (TB-EPS) che di quelle debolmente legate (LB-EPS) al crescere della salinità dell'influente. Gli autori sostengono che l'aumento del contenuto di TB-EPS sia dovuto all'adattamento dei batteri alle forti pressioni osmotiche che producono più EPS per contrastare la pressione dalla parete cellulare. L'aumento contestuale di LB-EPS è dovuto invece a fenomeni di plasmolisi. Sia le TB-EPS che le LB-EPS erano costituite in prevalenza da proteine. Al crescere della salinità tuttavia gli autori osservarono che il contenuto di polisaccaridi aumentava in misura maggiore, determinando la riduzione del rapporto PN/PS (Fig.3.15).



**Fig.3.15:** Andamento delle concentrazioni di proteine (a), carboidrati (b) e del loro rapporto (PN/PS) (c) in funzione della salinità (Wang et al., 2015).

Si osservò, inoltre, che l'idrofobicità del fango granulare si ridusse progressivamente soprattutto all'inizio e in particolare per concentrazioni saline del 5%. In seguito l'idrofobicità si stabilizzò intorno a un valore di equilibrio. Ciò,

secondo gli autori, è legato alla progressiva diminuzione del rapporto PN/PS. Le proteine, infatti, rappresentano le sostanze idrofobiche delle EPS, mentre i carboidrati quelle idrofile. L'aumento della percentuale di carboidrati, e quindi la riduzione del rapporto PN/PS ha determinato dunque la sensibile riduzione dell'idrofobicità cellulare (Fig. 3.16).



**Fig.3.16:** Andamento dell'idrofobicità in funzione della salinità (a), relazione tra l'idrofobicità cellulare e il rapporto PN/PS delle EPS. (Wang et al., 2015).

Dal punto di vista morfologico-strutturale i granuli si sono mantenuti stabili, con una forma ellissoidica e una struttura densa e compatta. Al termine della sperimentazione nei granuli erano predominanti batteri filamentosi; simili risultati vennero osservati anche da Ma et al. (2012) per concentrazioni di sale di 60 gNaCl L<sup>-1</sup>.

### 3.4 Le caratteristiche del fango granulare nel trattamento di reflui industriali

Il trattamento di reflui industriali presenta numerose problematiche connesse principalmente alla composizione e al carico inquinante del refluo. Sebbene il fango granulare sia stato applicato con buoni risultati al trattamento di reflui caratterizzati da un elevato carico organico, la variabilità di quest'ultimo è un aspetto che incide e non poco sulla stabilità strutturale dei granuli stessi. Diversi studi mostrano infatti che il massimo valore del carico organico applicabile a un sistema a fanghi granulari è limitato e dipende dal tipo di substrato. Quando viene raggiunta la massima capacità del sistema, i granuli diventano strutturalmente instabili e tendono a sfaldarsi. In letteratura vengono fornite diverse spiegazioni a tale comportamento: Liu e Liu, (2006) lo attribuiscono all'eccessiva crescita di batteri filamentosi sulla superficie dei granulo, mentre Zheng et al. (2006) all'idrolisi di proteine intracellulari che indeboliscono il nucleo dei granuli stessi.

**Adav et al. (2010)** hanno dimostrato che per elevati valori del carico i microrganismi perdono la loro capacità di auto-aggregazione a causa della riduzione della secrezione di proteine.

Ciò che emerge dagli studi presenti in letteratura è che per ciascun tipo di substrato il sistema presenta un carico massimo tollerabile, superato il quale i granuli diventano strutturalmente instabili. Inoltre, un aspetto non trascurabile è quello della continua variazione del carico. Se infatti l'applicazione di un carico progressivamente crescente determina un graduale adattamento del metabolismo batterico alle condizioni imposte, e di conseguenza granuli strutturalmente stabili, le frequenti variazioni di carico, tipico degli scarichi di alcune industrie alimentari, può comportare notevoli problematiche. I granuli aerobici giocano anche un ruolo molto importante nell'adsorbimento di composti chimici tossici grazie alla loro elevata superficie specifica, porosità ed eccellenti caratteristiche di sedimentabilità.

**Gai et al. (2008)** studiarono i meccanismi di adsorbimento del rame (Cu II) all'interno dei granuli e osservarono che circa il 70% del rame veniva adsorbito e al contempo venivano rilasciati ioni sodio, calcio e magnesio, lasciando pensare dunque a un fenomeno di scambio ionico.

**Yao et al. (2008)** studiarono il bio-adsorbimento del piombo e anche in questo caso osservarono fenomeni di scambio ionico e meccanismi di chelazione.

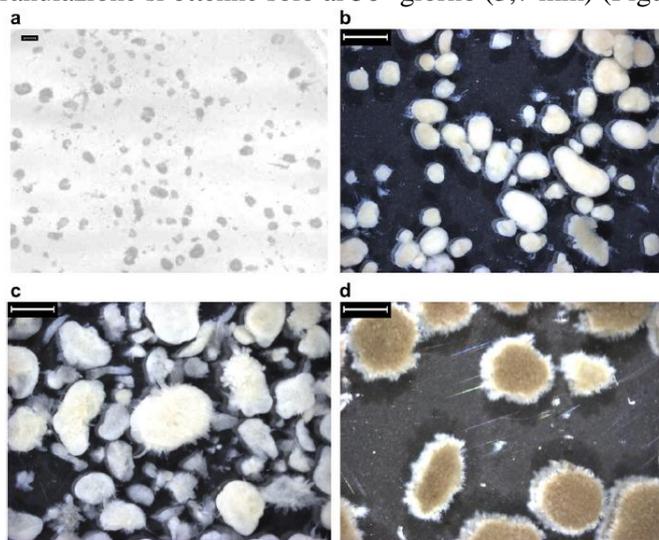
**Xu e Liu, (2008)** avanzarono l'ipotesi che lo scambio ionico, il legame con le EPS, e la precipitazione chimica sono i principali fenomeni che contribuirono al bio-adsorbimento del cadmio, rame e nichel. I risultati di tutti questi lavori mettono in luce il fatto che il fango granulare può essere coltivato con successo direttamente con il refluo industriale, ma evidenze mostrano come la struttura e la diversità microbica siano strettamente connesse al tipo di refluo (**Liu et al., 2003; Tay et al., 2001**).

Un interessante studio che ha focalizzato l'attenzione sulle caratteristiche strutturali dei granuli coltivati con diversi reflui industriali è stato quello condotto da **Val del Rio et al. (2012)**. Gli autori confrontarono le performance e le caratteristiche strutturali dei granuli coltivati con quattro diversi reflui: caseario, caratterizzato da un elevato contenuto di solidi sospesi, refluo dell'industria conserviera del pesce, caratterizzato da elevata salinità, un refluo derivante dalla lavorazione di prodotti marini sottoposto a trattamento preliminare di chiariflocculazione e, infine, un refluo proveniente da un allevamento di suini, caratterizzato da un elevato carico organico e da un altrettanto alto contenuto di azoto (Tab.3.3).

**Tab.3.3:** Caratteristiche dei reflui influenti nei 4 reattori. (**Val del Rio et al., 2012**).

Parameter	R1	R2	R3	R4
COD <sub>T</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	400–1750	350–530	500–1500	400–1550
COD <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	200–1000	300–470	400–1300	375–1250
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N L <sup>-1</sup> )	25–185	40–70	50–150	70–220
TSS (mg TSS L <sup>-1</sup> )	100–900	30–200	30–150	70–520
VSS (mg VSS L <sup>-1</sup> )	50–700	20–70	20–100	60–200
pH	–	6.6–7.5	6.0–7.4	7.2–7.9

Ciascun reattore, rinominati in ordine da R1 a R4, vennero inoculati con fango attivo fioccoso. Durante i primi giorni dopo l'avvio degli impianti, in tutti si è verificato un massiccio dilavamento di biomassa, in seguito alla forte pressione di selezione idraulica applicata sin dai primi giorni per favorirla rapida selezione della biomassa con migliori caratteristiche di sedimentabilità. Nei quattro reattori i tempi per ottenere la completa granulazione sono stati differenti. In R1 i granuli si sono formati dopo 23 giorni (2,3 mm) e risultarono maturi (3,5 mm) intorno al 60° giorno; in R2 i granuli si formarono intorno al 45° giorno ma erano caratterizzati da una struttura fibrosa e debole e questo portò ad una loro rapida scomparsa; i granuli stabili (2,2 mm) si formarono successivamente e maturarono dopo 75 giorni complessivi. In R3 dopo 35 giorni furono osservabili aggregati filamentosi (3 mm) che aumentarono di dimensioni fino al 91° giorno, quando raggiunta la loro massima dimensione di circa 5 mm, si disintegrarono. In seguito al dilavamento di gran parte di questa biomassa, i granuli si formarono con successo al 144° giorno (2,9 mm). In R4 i primi aggregati comparvero all'undicesimo giorno (1,9 mm) ma la completa granulazione si ottenne solo al 50° giorno (3,7 mm) (Figura 3.17).



**Fig.3.17:** Immagini dei granuli ottenuti nei 4 impianti. (Val del Rio et al., 2012).

Una volta che i granuli si sono formati la concentrazione di biomassa risultò elevata in tutti i reattori, e la densità così come le caratteristiche di sedimentabilità

(SVI) erano molto buone, con valori medi dell'ordine rispettivamente di 15-60 gSSV L<sub>granuli</sub><sup>-1</sup> e 30-50 mL gSST<sup>-1</sup>, paragonabili a quelli ottenuti in altri studi con reflui industriali (Schwarzenbeck et al., 2004; Wang et al., 2007) (Tab. 3.4).

Tab.3.4: Caratteristiche dei granuli nei 4 reattori (Val del Rio et al., 2012).

Reactor	Day of operation	Density (g VSS(L <sub>granule</sub> ) <sup>-1</sup> )	SVI (mL(gVSS) <sup>-1</sup> )
R1	60	15	60
R2	90	60	30
R3	170	60	35
R4	100	44	37

Il massiccio wash-out di biomassa si verificò solo durante le prime settimane a causa della forte pressione di selezione idraulica imposta al sistema.

Organic loading rate in the influent (◆) and in the effluent (△), COD removal efficiency (□)

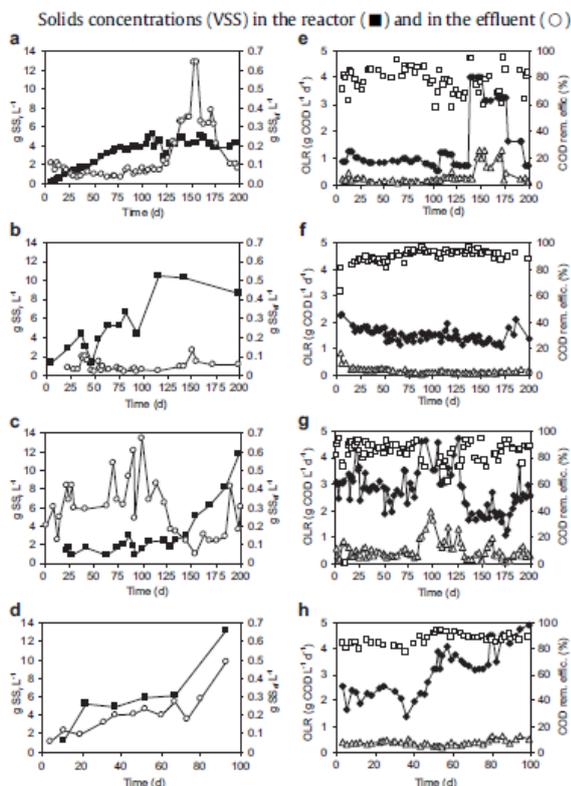
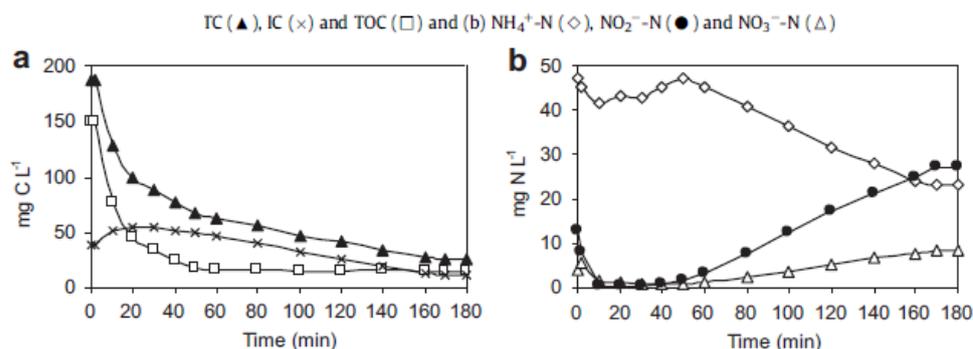


Fig.3.18: Andamento della concentrazione di SSV nel reattore e nell'effluente nei 4 reattori: R1(a), R2 (b), R3 (c), R4 (d); andamento dell'OLR e del rendimento di rimozione del COD nei 4 reattori: R1(e), R2 (f), R3 (g), R4 (h) (Val del Rio et al., 2012).  
 Quando si formarono i granuli la concentrazione di solidi nell'effluente diminuì in maniera significativa attestandosi intorno ai 200 mg L<sup>-1</sup> eccetto che in R4 dove si

osservò un valore medio maggiore (200-400 mg L<sup>-1</sup>). L'incremento della concentrazione al di sopra di questi valori fu dovuto al fatto che il livello del letto di fango granulare in fase di sedimentazione raggiungeva l'altezza dello scarico, così una parte di essa veniva scaricata. L'andamento della concentrazione di solidi seguì un trend simile a quello del carico organico alimentato. Riguardo le performance, tutti e quattro i reattori raggiunsero eccellenti rendimenti di rimozione della sostanza organica, compresi tra l'80 e il 90%. La rimozione dell'azoto invece ha avuto un andamento non costante. I reattori R1 ed R4, che trattavano rispettivamente il refluo caseario e derivante dall'allevamento suino, sono stati quelli che hanno ottenuto i rendimenti migliori (76 e 68%), mentre in R2 ed R3 l'efficienza di rimozione dell'azoto totale non superava il 15%. Nel caso di R2 ciò fu addebitato dagli autori alla carenza di substrato organico che limitava il processo di denitrificazione, mentre nel caso di R3 lo step limitante fu la nitrificazione. Il massimo carico organico trattato nei quattro impianti fu rispettivamente di 4 gCOD L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> per R1, 2 gCOD L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> per R2, 3 gCOD L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> per R3 e infine 5 gCOD L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> per R4 (Fig. 3.18).

Gli autori hanno anche effettuato delle analisi specifiche all'interno di un ciclo di reazione in ciascun impianto per valutare come le concentrazioni dei principali inquinanti variavano nel tempo. Durante il periodo di feast, la concentrazione di ossigeno variava tra i 4 e i 6 mg L<sup>-1</sup>, mentre durante il periodo di fame raggiungeva valori prossimi alla saturazione (Fig. 3.19).



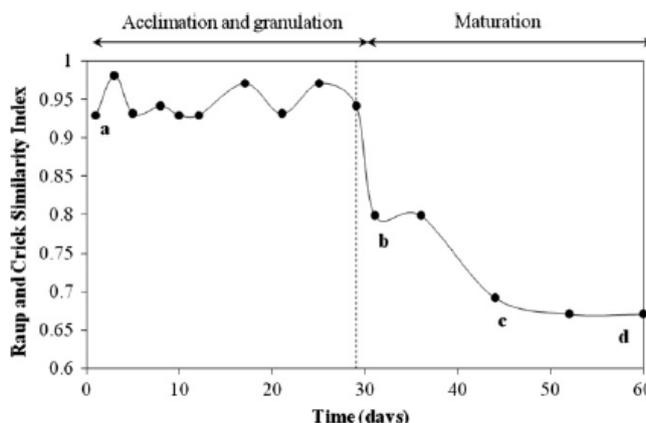
**Fig.3.19:** Andamento della concentrazione di TC, IC, TOC, ammoniaca, nitriti e nitrati durante un ciclo nel reattore 3. (Val del Rio et al., 2012).

Il substrato biodegradabile veniva quasi del tutto consumato all'inizio del ciclo, in corrispondenza della fase di feast, la quale aveva una durata di circa 10 minuti in R1, 20 in R2, 40 in R3 e 30 in R4. La concentrazione residua di sostanza organica era prevalentemente costituita da substrato non biodegradabile o lentamente biodegradabile. L'ammoniaca veniva ossidata a nitriti e poi a nitrati subito dopo la scomparsa del substrato organico biodegradabile. I nitriti e i nitrati che si

accumulavano nel reattore venivano ridotti nel ciclo successivo nella fase di *feast*, in quanto l'elevata disponibilità di substrato organico favoriva la cinetica di denitrificazione.

Un altro interessante studio che va citato è quello condotto da **Abdullah et al. (2013)**, nel quale gli autori hanno studiato la possibile relazione esistente tra la comunità microbica che si sviluppa all'interno del fango granulare e il refluo industriale trattato. Nel dettaglio, il refluo in questione derivava da un'industria che opera nella lavorazione dell'olio di palma (POME), un refluo caratterizzato dall'elevato carico organico ( $\text{COD} > 50000 \text{ mg L}^{-1}$ ), dal basso contenuto di nutrienti e dal pH acido. Gli autori nella loro sperimentazione hanno utilizzato tre reattori, R1, R2 ed R3, operanti con carichi organici diversi e pari rispettivamente a  $1,5 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$  e  $3,5 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$ . Nel reattore R1 i granuli non riuscirono a formarsi e la biomassa era dominata da bio-fiocchi. Nel corso della sperimentazione gran parte della biomassa è stata dilavata, soprattutto nelle 24 ore successive allo start-up. Secondo gli autori, supportati anche da risultati ottenuti da altri autori (**Martins et al., 2003; Tay et al., 2004**), e sulla base di osservazioni microscopiche, l'applicazione di carichi organici bassi, nell'ordine di  $1 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$ , risultano favorevoli allo sviluppo di batteri filamentosi piuttosto che per quelli fiocco-formatori, risultando pertanto in fiocchi strutture poco dense e con scarse capacità di sedimentazione. Negli altri due impianti invece, nonostante il dilavamento osservato nelle fasi successive all'inoculo, si sono ottenuti granuli con buone caratteristiche di sedimentabilità. Dopo 17 giorni, iniziarono ad essere visibili i primi bio-aggregati, che divennero dominanti nel reattore intorno al 60° giorno. Le dimensioni dei granuli aumentarono sensibilmente da 2,0 mm a 4,0 mm in R2, mentre raggiunsero dimensioni ancora maggiori (5,0 mm) in R3. I granuli di R2 in particolare risultavano sferici, compatti e con una superficie molto regolare, mentre quelli di R3 erano caratterizzati da una struttura irregolare e porosa. Le condizioni operative dei reattori R2 ed R3 sembrano dunque essere favorevoli allo sviluppo di granuli aerobici stabili, anche se carichi elevati sembrano favorire lo sviluppo di granuli con caratteristiche morfologiche peggiori. Dal punto di vista microbiologico, gli autori osservarono che sebbene le specie dominanti nel fango di inoculo si erano preservate per tutta la durata della sperimentazione, del corso di essa ne comparvero delle nuove (Fig. 3.20). Nel complesso, le popolazioni batteriche del fango di inoculo erano profondamente diverse da quelle osservabili nel fango granulare maturo. Ciò è probabilmente dovuto al progressivo adattamento delle popolazioni batteriche alle pressioni di selezione, biologiche e idrauliche, che si verificano nel corso del processo evolutivo che porta alla formazione dei granuli aerobici (**Zhang et al., 2011**). Gli autori hanno valutato l'evoluzione della popolazione batterica calcolando un indice di similarità, dall'analisi del quale osservarono che con la maturazione dei granuli, le specie batteriche tendono a

diversificarsi, in seguito allo sviluppo di nuovi ceppi che può anche risultare dall'evoluzione di colonie preesistenti.



**Fig.3.20:** Andamento dell'indice di diversità biologica nel tempo. (Abdullah et al., 2013).

### 3.5 Trattamento dei reflui dell'industria chimica

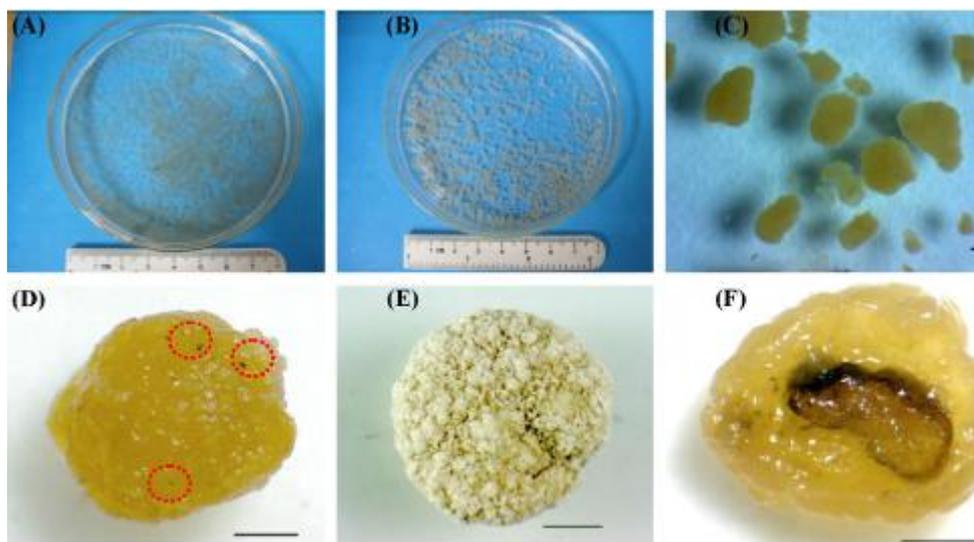
I granuli aerobici si sono dimostrati particolarmente resistenti nei trattamenti di reflui contenenti sostanze tossiche. È stato dimostrato che il fango granulare è in grado di degradare composti organici tossici, come il nitro fenolo, il di-clorofenolo a concentrazioni che causerebbero enormi disfunzioni nei sistemi a fanghi attivi convenzionali (Yi et al., 2006; Adav et al., 2007; Liu et al., 2009). Ciò viene in parte attribuito alla particolare struttura dei granuli, nella quale l'addensamento cellulare e la matrice di EPS costituiscono una barriera che riduce la diffusione delle sostanze tossiche al loro interno (McSwain et al., 2005). La resistenza alle sostanze tossiche, e in più la capacità di degradarle, rende il fango granulare un valido sistema per il trattamento di reflui di origine industriale che contengono elevate concentrazioni di sostanze tossiche. Molti studi riportano tuttavia i risultati relativi al trattamento di reflui sintetici in cui le concentrazioni di tali composti sono modeste, mentre pochi sono quelli relativi al trattamento di reflui reali. Uno studio sul tema è stato condotto da Liu et al., 2011. In particolare gli autori hanno studiato la fase di coltivazione dei granuli direttamente con refluo industriale reale, nonché le performance di processo dei granuli aerobici una volta raggiunte le condizioni di stazionarietà. Il refluo in questione era una miscela degli effluenti di varie industrie inserite all'interno di un polo industriale, dove venivano prodotti prevalentemente pesticidi, cloro alcali e svariati altri composti organici. Tali reflui erano tutti caratterizzati da un elevato tasso di tossicità nonché dalla

scarsa biodegradabilità dovuta alla presenza di composti organici tossici. Inoltre, le caratteristiche di composizione in termini di COD erano estremamente variabili, con notevoli fluttuazioni mensili (da 3000 a 10000 mg L<sup>-1</sup>) (Tab.3.5). Per facilitare lo sviluppo della biomassa, al refluo è stato miscelato un certo volume di un altro refluo proveniente da un impianto di produzione di idrogeno, molto ricco in nutrienti (azoto e fosforo). La sperimentazione venne suddivisa in tre fasi: la prima destinata alla coltivazione del fango granulare (30 giorni), la seconda di maturazione del fango (130 giorni) e la terza dedicata al trattamento del refluo industriale (140 giorni). Nelle prime due fasi il refluo grezzo è stato diluito al fine di ottenere un COD nell'ordine dei 1000 mg L<sup>-1</sup>; in queste fasi la frazione di refluo industriale trattata è stata del 10%; nella terza e ultima fase la frazione di refluo reale venne aumentata al 33%, mantenendo al contempo il COD a valori prossimi a 500 mg L<sup>-1</sup>.

**Tab.3.5:** Caratteristiche del refluo industriale e dell'influenza dell'SBR (Liu et al., 2011).

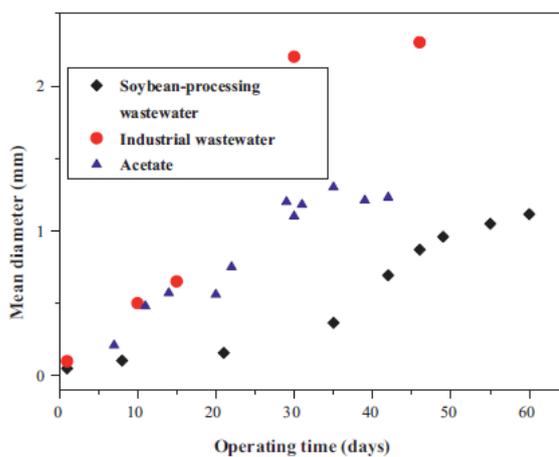
Parameter	Raw water (mg/L, except pH)	Influent to SBR (mg/L, except pH)
COD	3000-10,000	1000 (Stages 1 and 2)/500 (Stage 3)
NH <sub>4</sub>	500-5000	50
TN	1000-10,000	100
TSS	100-1000	<10
TP	<10	10
pH	7.3	7.0

L'impianto operava secondo cicli di 6 ore, che includevano tre minuti di alimentazione, 349 di aerazione, 1 di sedimentazione (a granulazione ottenuta) e 5 di scarico dell'effluente. Il tempo medio di residenza cellulare era di 31 giorni. I primi granuli iniziarono a svilupparsi dopo il 14° giorno, mentre intorno al 30° i granuli iniziarono ad essere ancora più grandi (0,5 mm), finché divennero gradualmente dominanti nel reattore al punto da essere osservabili anche ad occhio nudo (d = 1,0 – 3,0 mm). I granuli risultarono simili a quelli coltivati con refluo sintetico in altri studi, e presentavano una superficie all'apparenza ruvida e di colore giallastro (Fig.3.21).



**Fig.3.21:** Immagini del fango di inoculo (A), e dei granuli dopo 14 giorni (B), dopo 30 giorni (C), di un singolo granulo (D), di un granulo essiccato e congelato (E), e una sezione di un granulo (F). (Liu et al., 2011).

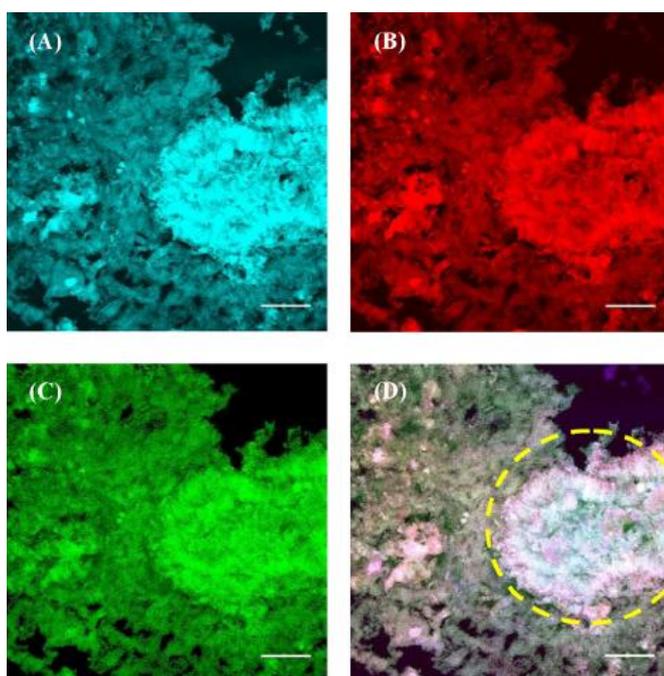
Le dimensioni dei granuli aumentarono dunque in maniera significativa nei primi giorni della sperimentazione, con una velocità simile a quella di granuli coltivati con sintetico ma molto più rapidamente rispetto a granuli coltivati con refluo industriale di altra provenienza (gli autori riportano refluo proveniente dalla lavorazione della soia) (Fig.3.22).



**Fig.3.22:** Andamento delle dimensioni medie dei granuli. (Liu et al., 2011).

Dopo circa 30 giorni di coltivazione, i granuli coltivati col refluo industriale raggiunsero una condizione di stazionarietà. Le immagini dei granuli essiccati (Fig.3.21E) mostrano la presenza di diversi canali superficiali che potevano facilitare il trasferimento di massa all'interno del granulo, e inoltre molti di essi si distinguevano per la presenza di un nucleo interno individuato da un colore più scuro rispetto alla superficie.

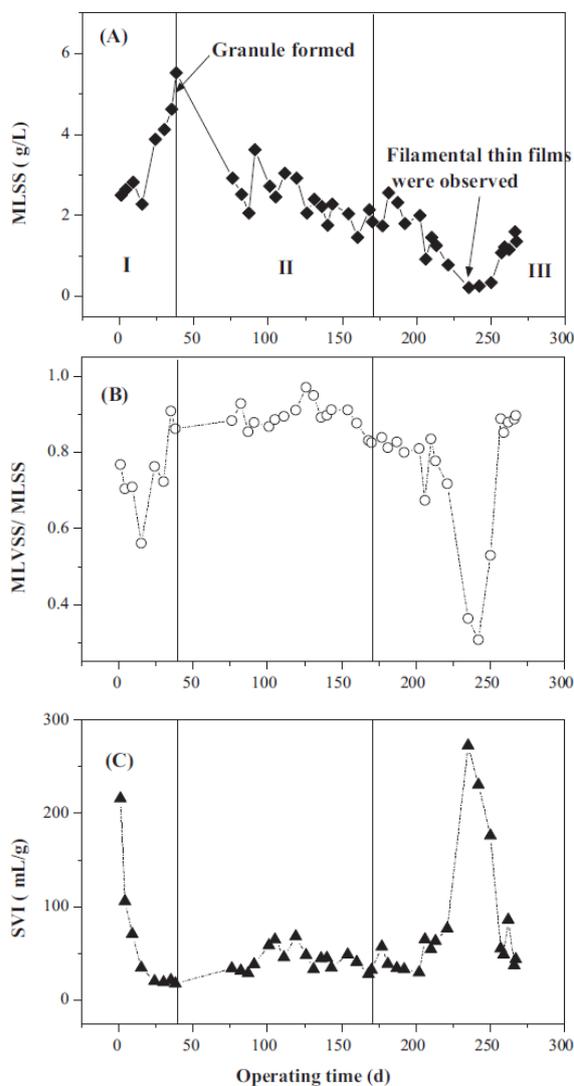
Attraverso l'osservazione microscopica con un microscopio a scansione focale, gli autori hanno individuato un forte addensamento in corrispondenza del nucleo dei granuli. Tale struttura è di fondamentale importanza oltre che per il mantenimento della struttura del granulo anche perché costituisce una barriera protettiva per i microrganismi che si sviluppano al loro interno contro le sostanze tossiche presenti nel bulk (Fig.3.23).



**Fig.3.23:** Immagini a contrasto di fase dei granuli: polisaccaridi (A), cellule totali (B), proteine (C), immagine combinata (D). (Liu et al., 2011).

La concentrazione dei solidi nel reattore aumentò gradualmente man mano che il fango si andava acclimatando al nuovo alimento. Man mano che le caratteristiche di sedimentabilità del fango miglioravano, i tempi di sedimentazione vennero progressivamente ridotti d 20 minuti a 4 minuti al 14° giorno. Lo SVI del fango granulare alimentato con il refluo industriale era nell'ordine di  $30 \text{ mLSTT g}^{-1}$ , decisamente minore rispetto a quello osservato nell'impianto alimentato con l'altro

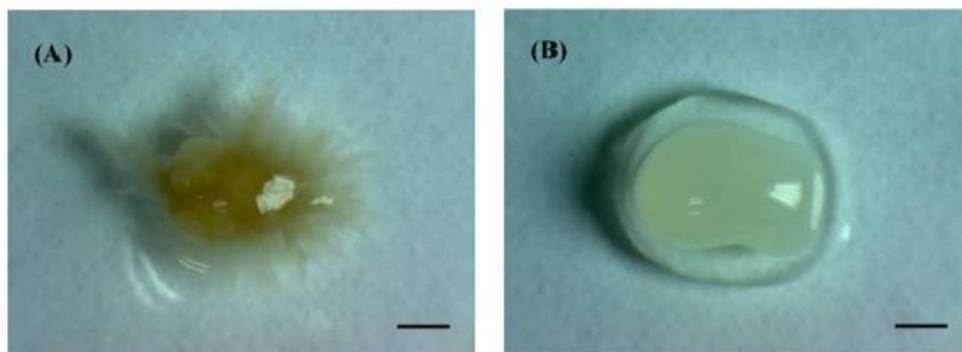
refluo industriale di riferimento (Fig.3.24). A causa dello stress indotto dalla presenza dei composti tossici, i microrganismi secernono infatti più EPS che accelerano il processo di formazione dei granuli i quali risultano strutturalmente densi e stabili (Jiang et al., 2002).



**Fig.3.24:** Andamento dei MLSS (A), del rapporto MLVSS/MLSS (B) e dello SVI (C). (Liu et al., 2011).

Generalmente, l'inibizione della biomassa si verifica per concentrazioni elevate di sostanze tossiche. Nel terzo periodo della sperimentazione, quando il carico

influyente venne aumentato, la concentrazione di MLSS non venne influenzata immediatamente. A partire dal 221° giorno, sui granuli iniziò a formarsi una sottile patina traslucida che incrementava sensibilmente la viscosità del fango. Tale patina crebbe sulla superficie dei granuli fin quando, raggiunto un certo spessore, si staccò e iniziò a muoversi liberamente nel reattore (Fig.3.25).

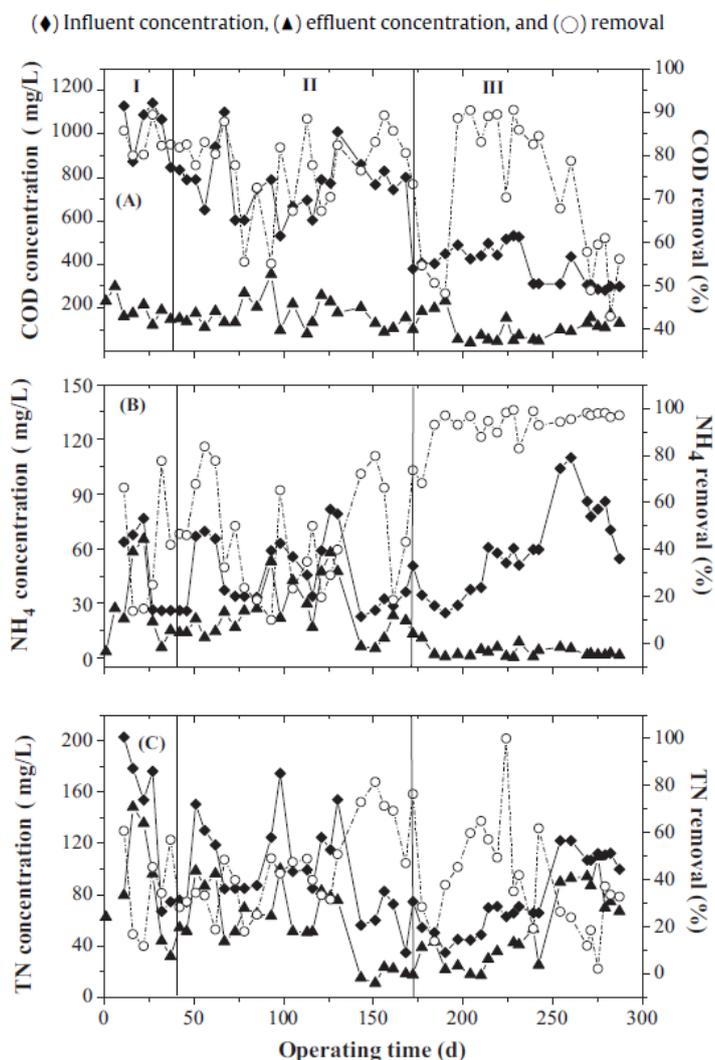


**Fig.3.25:** Immagine del film che avvolgeva i granuli (barra 1 mm). (Liu et al., 2011).

Lo sviluppo di tale patina era legato all'eccessiva proliferazione di batteri filamentosi, che determinarono il graduale peggioramento delle caratteristiche di sedimentabilità del fango nonché una sensibile riduzione del contenuto di solidi, soprattutto volatili. Quando tali batteri vennero dilavati con l'effluente, i granuli ricominciarono a svilupparsi in maniera corretta e le loro caratteristiche di sedimentabilità tornarono sui precedenti standard qualitativi.

Riguardo le performance dell'impianto, gli autori riportano che all'inizio la concentrazione di COD nell'effluente si ridusse in maniera graduale, indicando che la biomassa si andava lentamente acclimatando al refluo industriale. Nel secondo periodo della sperimentazione, i granuli ormai adattati al refluo erano in grado di rimuovere in maniera stabile circa l'80% del COD influente. All'inizio della terza fase, quando venne aumentato il carico di refluo industriale influente (dal 10% al 33% in volume), l'efficienza di rimozione del COD si ridusse dall'80% al 45%, ma subito dopo si riportò sui precedenti standard. Lo sviluppo dei batteri filamentosi che determinò una sensibile perdita di biomassa, causò un graduale decremento delle performance di rimozione del COD che si attestarono al 45% al termine della sperimentazione. L'ammonio fu rimosso con rendimenti molto soddisfacenti in quasi tutta la sperimentazione eccetto che nella fase iniziale, a causa del ritardo dell'acclimatazione dei batteri autotrofi. I rendimenti di rimozione dell'azoto invece risultarono molto fluttuanti nel corso dell'intera sperimentazione. Valori elevati si raggiunsero al termine del secondo periodo quando i granuli erano ormai acclimatati al refluo e all'inizio della terza, prima dello sviluppo dei batteri

filamentosi. Negli altri periodi, il dilavamento della biomassa presumibilmente determinò la sensibile riduzione delle performance di denitrificazione (Fig. 3.26).



**Fig.3.26:** Andamento delle concentrazioni di COD (a), ammoniaca (b) ed azoto totale nell'influente ed effluente, e relativi rendimenti depurativi. (Liu et al., 2011).

Il fango granulare quindi può anche essere coltivato direttamente con il refluo industriale, e inoltre consente di ottenere performance altamente soddisfacenti sebbene la presenza di sostanze tossiche.

### 3.6 Trattamento di reflui prodotti dall'industria conserviera del pesce

Le industrie che operano nel settore della lavorazione e conservazione del pesce utilizzano grandissime quantità di acqua nel processo produttivo, che determina la produzione di ingenti volumi di reflui caratterizzati da carichi di inquinanti molto elevati.

Un interessante studio a riguardo è stato quello condotto da **Val del Rio et al. (2012)**, di cui si riportano i principali risultati ottenuti. Gli autori hanno valutato la stabilità strutturale dei granuli, nonché le performance depurative in termini di azoto e carbonio, nel trattamento di un refluo prodotto da un'industria che opera nel settore della conservazione del pesce. Il refluo in questione prima di essere avviato al trattamento biologico subiva un trattamento di coagulazione-flocculazione per la rimozione di solidi e grassi. La sperimentazione è stata suddivisa in due fasi: nella prima (0-295 giorni) il carico organico variava da 2 a 5 KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup>, mentre nella seconda da 3 a 13 KgCOD m<sup>-3</sup>giorno<sup>-1</sup>. Nel reattore inoculato con fango attivo, i granuli si formarono e risultarono stabili dopo 130 giorni. Il tempo necessario affinché i granuli si formino è strettamente connesso alla natura del substrato contenuto nel refluo; in particolare esso è tanto più breve quanto più il substrato è facilmente biodegradabile. Per tale ragione, la formazione dei granuli a partire da un refluo di origine industriale risulta alquanto lenta. Nella prima fase, il carico del fango (F/M) si mantenne intorno a 1 gCOD gVSS<sup>-1</sup>giorno<sup>-1</sup> prima della formazione dei granuli, mentre quando questi erano predominanti nel sistema, e la concentrazione di solidi aumentò, si ridusse a 0,3-0,6 gCOD gVSS<sup>-1</sup>giorno<sup>-1</sup>; nella seconda fase, a causa dell'incremento di carico nell'influento, il carico del fango crebbe e raggiunse valori di 1-2,5 gCOD gVSS<sup>-1</sup>giorno<sup>-1</sup>, il che coincise con l'indebolimento delle proprietà fisiche degli aggregati. I risultati ottenuti erano in accordo con quelli riportati da altri autori (**Yang et al., 2008 e Jungles et al., 2012**), i quali osservarono che quando il carico del fango è superiore a 1 gCOD gVSS<sup>-1</sup>giorno<sup>-1</sup> il fenomeno di granulazione non si realizza, essendo questo favorito da valori del carico intorno a 0,5 gCOD gVSS<sup>-1</sup>giorno<sup>-1</sup>. Gli autori nel corso della sperimentazione osservarono che ad ogni incremento di carico corrispondeva un aumento delle dimensioni medie dei granuli fino a 11-16 mm; l'eccessivo sviluppo delle dimensioni tuttavia comportava un sensibile peggioramento delle performance del sistema, in quanto i granuli diventavano strutturalmente instabili e tendevano a disintegrarsi, aumentando così la concentrazione di solidi sospesi nell'effluente. L'eccessivo diametro delle particelle secondo gli autori, determina la limitata diffusione di substrato e ancor più di ossigeno all'interno del nucleo dei granuli, dove possono innescarsi fenomeni di fermentazione anaerobica, i cui

prodotti di reazione possono causare la rottura degli aggregati. Il materiale derivante dallo sfaldamento dei granuli tuttavia fungeva da nucleo di aggregazione per la formazione di nuovi granuli che ripopolarono il reattore nei successivi giorni. Con la riduzione del carico i granuli nuovamente formati risultavano strutturalmente stabili e dotati di ottime capacità di sedimentazione. Sulla base di tali osservazioni gli autori suggerirono uno spurgo selettivo dei granuli di dimensioni maggiori prima che si verificasse la loro rottura con conseguente aumento della concentrazione di solidi nell'effluente. I rendimenti di rimozione della sostanza organica furono comunque soddisfacenti (85-90%) indipendentemente dal carico influente, mentre per quanto concerne l'azoto i risultati non furono altrettanto positivi. Il rendimento di rimozione dell'azoto totale non è stato mai superiore al 30%, per lo più dovuto alla sintesi della biomassa eterotrofa e in minima parte all'attività dei microrganismi autotrofi. Gli autori associarono la mancata nitrificazione a tre fattori: il tempo di residenza cellulare, l'ammoniaca libera e le dimensioni dei granuli. Riguardo il tempo di residenza cellulare **Saleem et al. (2003)** osservarono che il valore minimo perché la biomassa autotrofa si possa acclimatare a una temperatura di circa 22°C è di 3-4 giorni, e tale valore non venne quasi mai raggiunto nel corso di tutta la sperimentazione; con riferimento all'ammoniaca libera (*free-ammonia* - FA).

**Yang et al. (2004)** osservarono che per concentrazioni superiori a 10 mg L<sup>-1</sup>, l'attività della biomassa autotrofa risulta fortemente ridotta se non addirittura nulla; infine, per quanto concerne le dimensioni dei granuli, **de Kreuk et al. (2007)** osservarono che quando le dimensioni dei granuli erano maggiori di 1,4 mm, i rendimenti di nitrificazione iniziavano a ridursi sensibilmente. Nel primo periodo, gli autori osservarono un progressivo incremento del rendimento di nitrificazione, in corrispondenza della formazione dei granuli, a seguito della quale il tempo di residenza cellulare crebbe e la concentrazione di ammoniaca libera era bassa. Se da un lato le ridotte dimensioni dei granuli appena formati favorivano la nitrificazione, i nitrati prodotti non venivano rimossi, a causa della mancanza dello strato anossico nei granuli stessi (assenza della nitrificazione e denitrificazione simultanea - SND), e, di conseguenza, essi si accumulavano nell'effluente, determinando i bassi rendimenti di rimozione dell'azoto totale. Nella seconda fase della sperimentazione, l'aumento del carico di ammoniaca e il conseguente aumento della concentrazione di ammoniaca libera, l'eccessivo aumento delle dimensioni dei granuli, e infine la riduzione del tempo di residenza cellulare derivante dal dilavamento dei granuli rotti, furono la causa dei pressoché nulli rendimenti di nitrificazione. Gli autori infine, osservarono un graduale peggioramento delle caratteristiche di sedimentabilità dei granuli, attribuita alla proliferazione di batteri filamentosi sulla loro superficie. Una eccessiva proliferazione di tali batteri fa sì che i granuli risultino meno densi e di conseguenza strutturalmente più instabili. Lo sviluppo di tali microrganismi secondo gli autori è stato causato dall'aumento della durata della fase di *feast* nel

ciclo, determinato a sua volta dalla presenza prevalente di fango fioccoso nel reattore rispetto a quello granulare.

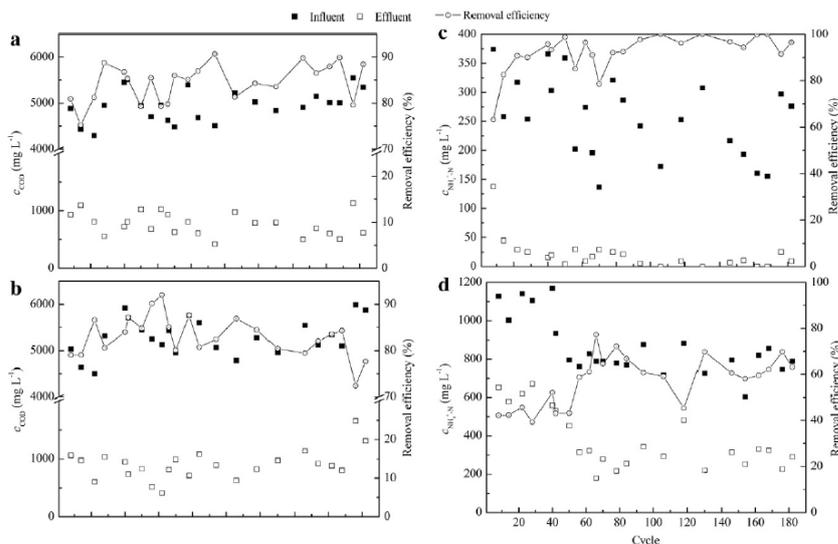
### 3.7 Trattamento di percolato di discarica

Wei et al. (2012) hanno analizzato la rimozione simultanea di carbonio e azoto nel trattamento di percolato di discarica in un impianto SBR inoculato con fango granulare coltivato sempre con percolato. L'impianto pilota utilizzato dagli autori prevedeva due reattori SBR operanti in parallelo; il primo prevedeva un pretrattamento chimico iniziale, mediante l'aggiunta di ossido di magnesio e acido fosforico per ridurre il carico di azoto ammoniacale, mentre il secondo non prevedeva tale pretrattamento.

Tab.3.6: Caratteristiche del percolato alimentato nei due impianti (Wei et al., 2012).

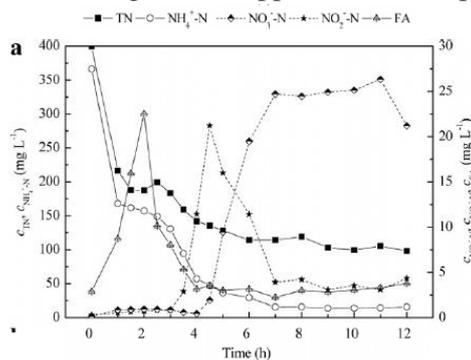
Parameter	GSBR1 <sub>inf.</sub>	GSBR2 <sub>inf.</sub>
COD (mg L <sup>-1</sup> )	4298-5547	4502-5992
BOD <sub>5</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	913-1017	855-1453
TN (mg L <sup>-1</sup> )	126-400	691-1253
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> - N (mg L <sup>-1</sup> )	72-374	602-1168
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N (mg L <sup>-1</sup> )	0.06-0.10	0.02-0.17
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N (mg L <sup>-1</sup> )	0.52-0.75	0.48-1.12
pH	8.6-9.3	7.9-8.9
TDS (mg L <sup>-1</sup> )	13971-17421	11159-14916

I granuli utilizzati come inoculo avevano un diametro compreso tra i 0,3-0,6 mm, la concentrazione di solidi sospesi totali era di circa 4 g L<sup>-1</sup>, l'età del fango mediamente di 30 giorni e infine erano caratterizzati da buone caratteristiche di sedimentabilità (SVI<sub>5</sub>= 27 - 47 mL g<sup>-1</sup>). Gli impianti operarono in continuo per 182 cicli. I risultati ottenuti mostravano ottimi rendimenti di rimozione del COD, superiori all'80%, mentre per quanto riguarda l'azoto, essi risultarono fortemente dipendenti dalla concentrazione di ammoniaca nell'influente. In particolare, gli autori osservarono che l'incremento dell'ammoniaca libera nell'alimento determinava un sensibile calo nei rendimenti di rimozione dell'azoto ammoniacale. Il peggioramento delle performance era molto più visibile nel secondo reattore, nel quale l'assenza del pretrattamento ha determinato un sensibile aumento di concentrazione di ammoniaca alimentata al reattore (800-1200 mg L<sup>-1</sup>), risultando nel peggioramento della qualità dell'effluente soprattutto nei primi cicli. La riduzione del contenuto di ammoniaca nell'alimento è coincisa con l'incremento delle performance depurative, che tuttavia non hanno superato il 70%. Nel reattore con il pretrattamento iniziale, la concentrazione di ammoniaca in ingresso era nell'ordine di 200-400 mg L<sup>-1</sup> e i rendimenti costantemente superiori al 90% (Fig.3.27).



**Fig.3.27:** Andamento delle concentrazioni di COD (a,b) e ammoniaca (c,d) nei reattori 1(a,c) e 2 (b,d). (Wei et al., 2012).

Gli autori analizzarono nel dettaglio la rimozione dell'azoto in un ciclo di reazione nei due impianti, simulando dunque due casi estremi rispettivamente di basso e alto carico di azoto ammoniacale influente. Nel primo caso, la concentrazione di azoto ammoniacale era di circa  $360 mg L^{-1}$  e il rapporto COD/TN pari a 13 (Fig.3.28).



**Fig.3.28:** Andamento delle concentrazioni di azoto, ammoniaca, nitriti, nitrati e FA durante un ciclo in condizioni di basso carico. (Wei et al., 2012).

A causa della prevalenza dei batteri eterotrofi su quelli autotrofi riguardo sia il substrato che l'ossigeno, l'ossidazione della sostanza organica era il processo prevalente nelle prime tre ore di reazione. In questa fase appena  $38 mg L^{-1}$  di ammoniaca venivano rimossi (20% del totale nel ciclo). Terminata questa fase, veniva meno la competizione tra batteri eterotrofi ed autotrofi per il substrato e

l'ossigeno, così la popolazione nitrificante iniziava il processo di ossidazione dell'ammoniaca. Poiché la concentrazione di ammoniaca libera risultava maggiore rispetto al limite di tossicità per i *Nitrobacter* ( $4 \text{ mg L}^{-1}$ ), l'attività microbica dei batteri nitrato ossidanti (NOB) risultava inibita. Di conseguenza nelle due ore successive si osservava un sensibile accumulo di nitriti nel reattore ( $21 \text{ mg L}^{-1}$ ). Man mano che l'ammoniaca veniva ossidata, la concentrazione di ammoniaca libera diminuiva, così i nitriti potevano essere ossidati a nitrati in seguito all'acclimatazione dei batteri NOB. La concentrazione di azoto totale in uscita era di circa  $98 \text{ mg L}^{-1}$ ; gli autori calcolarono l'efficienza di nitrificazione/denitrificazione simultanea ( $SND_{\text{eff}}$ ) mediante la relazione proposta da **Wang, (2006)** (equazione 3.1).

$$SND_{\text{eff}} = \frac{C_{\text{NH}_4\text{-N}(RE)} - C_{\text{NO}_x\text{-N}(AC)}}{C_{\text{NH}_4\text{-N}(RE)}} \cdot 100 \quad [\text{eq. 3.1}]$$

dove:

- $C_{\text{NH}_4\text{-N}(RE)}$ : azoto ammoniacale rimosso nella fase aerobica;
- $C_{\text{NO}_x\text{-N}(AC)}$ : concentrazione di nitriti/nitrati al termine della fase aerobica.

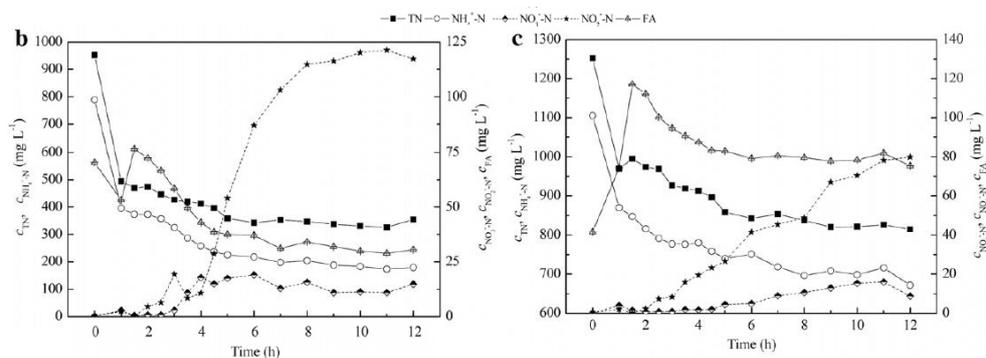
Tali rendimenti furono mediamente pari all'83%. Gli autori ritengono che tali rendimenti siano stati influenzati dall'eccesso di nitrati allo scarico, addebitati a loro volta da una scarsa capacità di denitrificazione del sistema, dovuta sia alle elevate concentrazioni di ossigeno, ma più verosimilmente alle ridotte dimensioni dei granuli che non consentivano la creazione dello strato anossico nei granuli come, per altro, osservato anche da **Di Bella e Torregrossa, (2013)**, e allo stesso tempo alla carenza di substrato organico dovuta all'eccessiva durata della fase di starvation. Tuttavia, la concentrazione di nitrati all'inizio della successiva fase aerobica (ciclo successivo) risultava prossima a zero, a causa sia dell'effetto di diluizione dovuto al caricamento del nuovo influente, sia alla denitrificazione che si sviluppava nella fase di alimentazione in condizioni non aerate. L'efficienza di denitrificazione, calcolata mediante la relazione proposta da **Shao et al. (2008)**, risultava così pari al 96% (equazione 3.2).

$$DE = 1 - \frac{C_{\text{NO}_x\text{-N}(EF)} - C_{\text{NO}_x\text{-N}(IN)}}{C_{\text{NH}_4\text{-N}(IN)} + C_{\text{NO}_x\text{-N}(IN)} - C_{\text{NH}_4\text{-N}(EFF)} - C_{\text{NO}_x\text{-N}(EF)}} \cdot 100 \quad [\text{eq. 3.2}]$$

dove:

- $C_{\text{NH}_4\text{-N(IN)}}$ : concentrazione di azoto ammoniacale nell'influyente;
- $C_{\text{NH}_4\text{-N(EFF)}}$ : concentrazione di azoto ammoniacale nell'effluente;
- $C_{\text{NO}_x\text{-N(EF)}}$ : concentrazione di nitriti/nitrati nell'effluente;
- $C_{\text{NO}_x\text{-N(IN)}}$ : concentrazione di nitriti/nitrati nell'influyente.

In figura 3.29 sono mostrati i risultati ottenuti quando la concentrazione di ammoniaca nell'influyente era di 788 e 1105  $\text{mg L}^{-1}$  (condizione di alto carico).



**Fig.3.29:** Andamento delle concentrazioni di azoto, ammoniaca, nitriti, nitrati e FA durante un ciclo in condizioni di medio (b) e alto carico (c). (Wei et al., 2012).

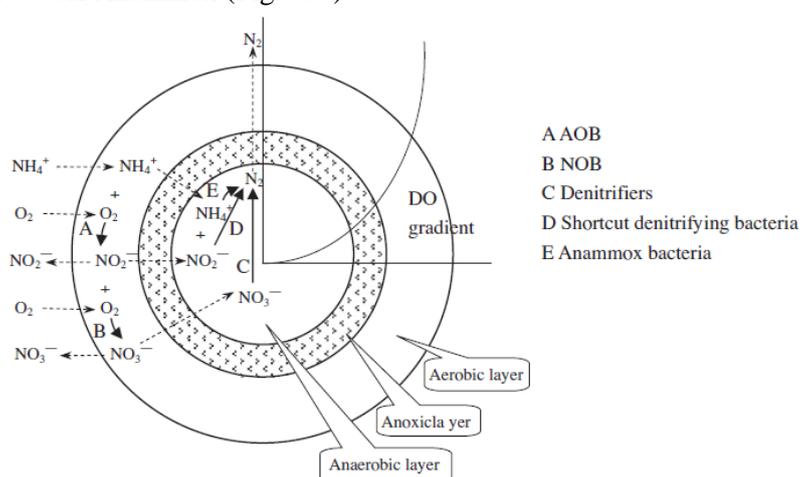
Le elevate concentrazioni di ammoniaca esercitano una forte pressione di selezione microbica: i microrganismi nitrificanti diventano prevalenti all'interno dei granuli, mentre i batteri eterotrofi perdono la loro dominanza competitiva. Inoltre proprio a causa della ridotta attività dei batteri eterotrofi, la quantità di ammoniaca rimossa per la loro sintesi si riduce, determinando l'aumento di concentrazione di ammoniaca libera nel reattore. In tali condizioni, sia i batteri ammonio ossidanti (AOB) che i nitrito-ossidanti (NOB) risultano inibiti, risultando dunque nell'accumulo sia di ammoniaca che di nitriti in entrambi i cicli. I pochi nitrati prodotti, inoltre, si accumulano progressivamente nel reattore, a causa della ridotta attività denitrificante.

Quando invece le concentrazioni di ammoniaca erano di 788  $\text{mg L}^{-1}$ , si è osservato un sensibile accumulo di nitriti già a partire dalla seconda ora; la concentrazione di nitriti nel reattore raggiunse un valore stazionario dopo circa 8 ore; analogamente i nitrati iniziarono ad accumularsi dopo 2 ore come i nitriti, mentre raggiunsero una condizione stazionaria dopo 4 ore. I risultati indicano secondo gli autori che il processo di nitrificazione dominante durante la fase aerobica è quello di denitrificazione via nitrito. Secondo tale processo, l'azoto ammoniacale viene convertito in azoto nitrico che a causa dell'inibizione totale e parziale dei batteri NOB vengono ridotti direttamente ad azoto gas senza essere ulteriormente ossidati a nitrati (Gao et al., 2009). In tali condizioni circa 140  $\text{mg L}^{-1}$  di azoto totale

venivano rimossi durante la fase aerobica, indicando appunto il verificarsi della reazione di nitrificazione parziale e la susseguente denitrificazione via nitrito.

Alla concentrazione di ammoniaca di  $1105 \text{ mg L}^{-1}$ , l'accumulo di ammoniaca e nitrati continuò per tutta la durata del ciclo, non raggiungendo dunque condizioni stazionarie. Il meccanismo di nitrificazione/denitrificazione è stato dunque analogo al caso precedente, tuttavia il continuo accumulo sia di nitriti che di nitrati è stato addebitato alla significativa inibizione sia degli NOB che degli AOB.

Gli autori osservarono inoltre che all'inizio del ciclo la concentrazione di nitriti era molto bassa, tale dunque da non giustificare l'eventuale effetto diluizione dovuto all'alimentazione del nuovo refluo privo di nitriti. Ciò ha spinto gli autori a pensare che durante la fase di alimentazione non aerata si sviluppasse qualche processo che comportasse la sensibile riduzione della concentrazione di nitriti da circa  $120 \text{ mg L}^{-1}$  a quasi zero. A causa della diffusione e al consumo di ossigeno, i granuli sono caratterizzati da un forte gradiente di ossigeno; in particolare gli strati esterni si trovano in condizioni aerobiche, mentre quelli interni in condizioni anaerobiche (Xavier et al., 2007). In questo modo si viene a creare la classica struttura stratificata tipica del fango granulare, nel cui nucleo si possono così sviluppare e coesistere svariate specie batteriche, da quelli eterotrofi, PAO, AOB, NOB, ai batteri Anammox (Fig.3.30).

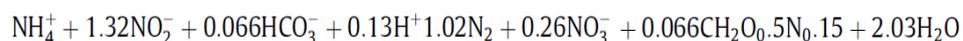


**Fig.3.30:** Stratificazione dei granuli e meccanismo di rimozione dell'azoto (Wei et al., 2012).

L'insieme di questi microambienti contribuisce insieme allo sviluppo contemporaneo di più reazioni che più o meno simultaneamente concorrono alla rimozione dell'azoto.

Il processo di rimozione dell'azoto dominante sarà determinato dagli stress derivanti dall'ambiente esterno. Gli autori hanno ipotizzato che, oltre al già citato processo di nitrificazione parziale e denitrificazione via nitrito, una parte dei nitrati prodotti possa essere stata rimossa ad opera di batteri Anammox.

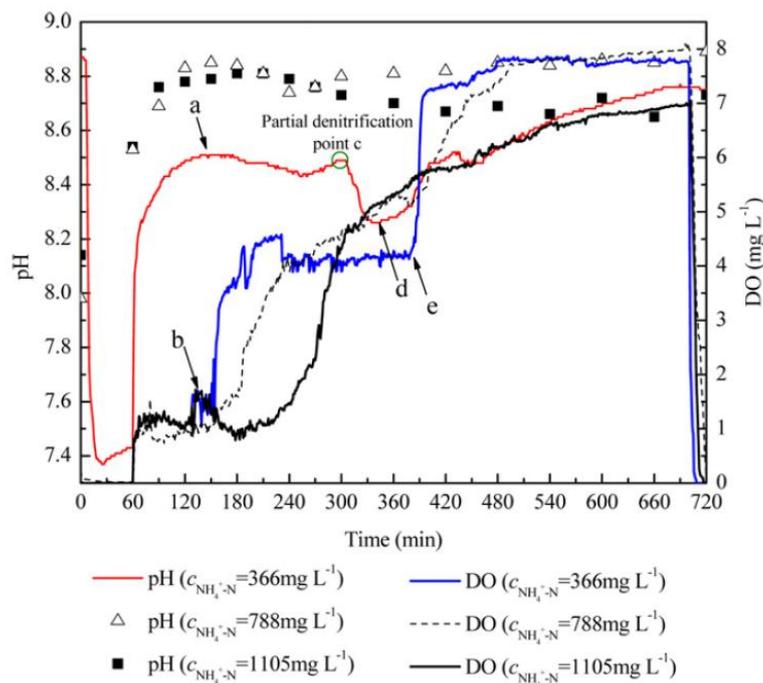
Il processo Anammox consiste in un processo di ossidazione dell'azoto ammoniacale ad azoto molecolare, utilizzando i nitriti come accettori di elettroni, con la produzione di una piccola quantità di nitriti stessi (**Wang et al., 2009**), secondo la reazione sotto riportata:



Dall'analisi stechiometrica della reazione si evince che il rapporto stechiometrico tra ammoniaca e nitriti rimossi è di circa 0.76 moli moli<sup>-1</sup>. Tale rapporto costituisce un importante criterio per stabilire il verificarsi del processo Anammox. Gli autori, stante la difficoltà di valutare la concentrazione di ammoniaca e nitrati durante la fase anaerobica di alimentazione, assunsero come valore iniziale della concentrazione quella dell'influente, mentre come valore finale quello al termine della fase di alimentazione stessa. Il rapporto tra l'ammoniaca e i nitrati rimossi durante la fase di alimentazione è stato di circa 1,5 e 1,2 rispettivamente nei periodi in cui la concentrazione di ammoniaca influente era rispettivamente di 788 e 1105 mg L<sup>-1</sup>. Escludendo l'ammoniaca rimossa per sintesi dai batteri eterotrofi, tali rapporti risultarono molto vicini al valore teorico prima citato, indicando dunque la possibilità che il processo Anammox si realizzasse all'interno dei granuli.

Gli autori infine hanno analizzato l'andamento dei parametri OD e pH all'interno dei cicli di reazione rappresentativi delle tre condizioni precedentemente discusse (Fig.3.31).

Quando la concentrazione di ammoniaca nell'influente era di 366 mg L<sup>-1</sup>, la concentrazione di ossigeno si manteneva prossima allo zero durante la fase di alimentazione. In questa fase, il pH diminuiva a causa del rilascio di idrogenioni derivanti dall'idrolisi cellulare dei batteri PAO e dalla CO<sub>2</sub> prodotta dal metabolismo batterico. Quando iniziava la fase di aerazione, la CO<sub>2</sub> veniva strippata dal reattore, in tal modo il pH aumentava rapidamente.



**Fig.3.31:** Andamento dell'ossigeno e del pH durante un ciclo (Wei et al., 2012).

La concentrazione di ossigeno nel mentre si manteneva su valori bassi ( $0.77-1.55 \text{ mg L}^{-1}$ ) a causa del consumo del substrato organico facilmente biodegradabile da parte dei batteri eterotrofi (fase di *feast*). Sulle curve del pH (a) e dell'OD (b) sono visibili due *breakpoints*, che segnano l'inizio del processo di nitrificazione. I batteri autotrofi nitrificanti consumano l'alcalinità del bulk, quindi il pH tende a diminuire fino ad un secondo *breakpoint* (d) denominato "*ammonia-valley*" che segna la fine del processo di nitrificazione. Tuttavia prima di questo punto, il profilo del pH evidenzia un ginocchio (c). Tale fenomeno può essere dovuto all'accumulo di nitriti all'interno del reattore che, in presenza di una sufficiente quantità di substrato organico, possono essere ridotti ad azoto gas da parte dei batteri eterotrofi (denitrificazione via nitrito). I batteri NOB si troverebbero così in competizione con quelli eterotrofi, cosicché il secondo step ossidativo della nitrificazione non si realizza. L'alcalinità prodotta dalla denitrificazione risulterebbe in tal caso maggiore di quella consumata dal processo di nitrificazione, risultando per tanto nel transitorio un aumento del pH. La concentrazione di ossigeno in questa fase si manteneva intorno ai  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . Il secondo *breakpoint* nella curva dell'ossigeno (e), segna la fine del processo di nitrificazione. Tale punto però si presentava dopo quello nella curva del pH. Ciò può essere spiegato dal fatto che verso la fine del processo di nitrificazione, la cinetica risultava più lenta a causa della minore

disponibilità dell'ammoniaca ormai in gran parte ossidata. Il tasso di denitrificazione all'interno dei granuli andava al contrario aumentando, per tanto la produzione di alcalinità era superiore rispetto al consumo, risultando dunque in un aumento del pH nonostante la nitrificazione non fosse ancora stata completata. In condizioni di carico di ammoniaca maggiori, i punti singolari dei profili di pH e OD risultarono difficilmente identificabili. Gli autori attribuirono ciò al fatto che i batteri eterotrofi risultavano non più dominanti rispetto agli autotrofi che in condizioni di alto carico di ammoniaca hanno uno sviluppo maggiore. In tal modo, il processo di ossidazione dell'ammoniaca e del substrato organico si realizzano contestualmente, rendendo di fatto difficile la corretta individuazione della fine dei due processi. In conclusione si sottolinea come la coltivazione diretta con il percolato abbia limitato lo sviluppo delle dimensioni dei granuli, le cui dimensioni non hanno superato il millimetro di diametro. L'analisi degli effetti del percolato su granuli già coltivati e stabili è stato invece condotto da **Di Bella e Torregrossa, (2014)**. Gli autori hanno utilizzato due reattori operanti in parallelo in modo da poter effettuare un confronto degli effetti indotti da diverse condizioni di carico. La campagna sperimentale venne suddivisa in tre periodi: un primo della durata di 70 giorni dedicato alla coltivazione dei granuli con refluo sintetico a base di acetato di sodio, un secondo della durata di 15 giorni in cui è stato alimentato percolato con un basso rapporto di diluizione, e infine una terza fase sempre della durata di 15 giorni in cui il percolato è stato fortemente diluito (Tab.3.7).

**Tab.3.7:** Condizioni operative nei tre periodi sperimentali. (Di Bella e Torregrossa, 2014).

Experimen tal period	Period duration	Range	Type	Cycle	Duration of single SBR phase				VLR kgCOD·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup>	
					t <sub>F</sub> min	t <sub>AIR</sub> min	t <sub>S</sub> min	t <sub>DS</sub> min		
<b>R1</b>	I Synthetic wastewater	1-7	SBAR	180	5	163	7	5	2.4	
		8-14	SBAR	180	5	165	5	5	2.4	
		15-21	SBAR	180	5	167	3	5	2.4	
	II Leachate Weak dil.	15	71-85	SBBC	1440	5	1427	3	5	4.8
	III Leachate Strong dil.	15	86-100	SBBC	720	5	707	3	5	4.8
	<b>R2</b>	I Cultivation	1-7	SBBC	180	5	163	7	5	2.4
			8-14	SBBC	180	5	165	5	5	2.4
			15-21	SBBC	180	5	167	3	5	2.4
		II Synthetic wastewater	15	71-85	SBBC	180	5	167	3	5
III Leachate Strong dil.		15	86-100	SBBC	480	5	467	3	5	7.2

t<sub>F</sub> – Fill time; t<sub>AIR</sub> – Aeration time; t<sub>S</sub> – Settling time; t<sub>F</sub> – Fill time; t<sub>DS</sub> – effluent discharge time

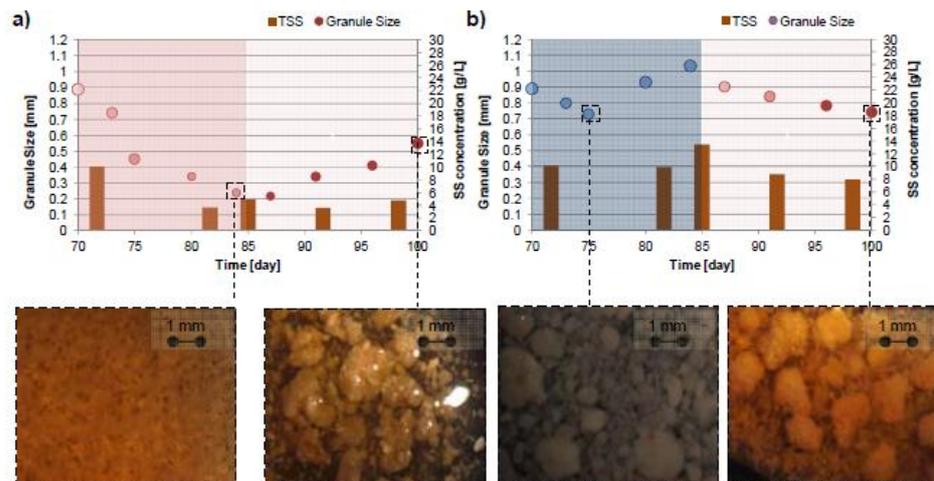
Più in dettaglio, durante il secondo periodo è stato scelto di applicare un carico maggiore rispetto al terzo al fine di valutare l'eventuale sfaldamento dei granuli a causa della diversa natura dell'influente dopo la coltivazione. Nel terzo periodo invece, gli autori hanno voluto valutare l'eventuale miglioramento delle performances del sistema, nonché un nuovo possibile processo di granulazione, applicando una forte diluizione al percolato.

Il refluo sintetico è stato utilizzato solo nel periodo di coltivazione e nel secondo periodo in uno dei due reattori, al fine di confrontare le performance dei due impianti con reflui di differente natura (percolato diluito e refluo sintetico) alimentati con lo stesso carico organico volumetrico (Tab.3.8). A causa della diversa concentrazione di COD dei due reflui, è stata aumentata la durata del ciclo nell'impianto alimentato con il percolato, circostanza tra l'altro necessaria al fine di favorire la degradazione del substrato organico lentamente biodegradabile come, per altro, evidenziato anche da **Wei et al. (2012)**.

**Tab.3.8:** Caratteristiche del percolato alimentato nei due impianti durante i tre periodi (**Di Bella e Torregrossa, 2014**).

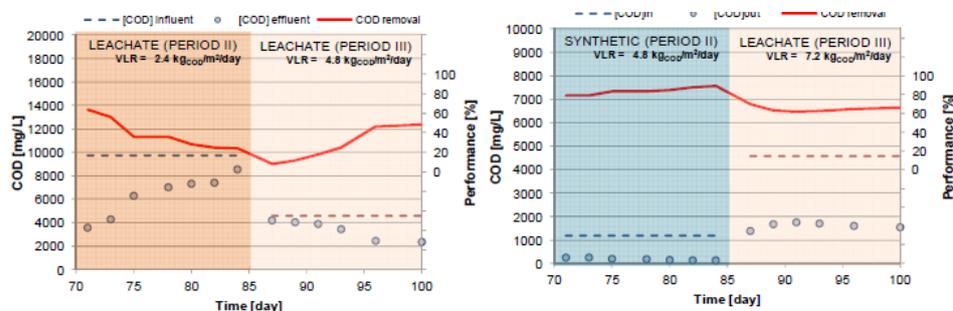
Parameter	[mg/L]	Period I		Period II		Period III	
		R1 <sub>(2BAR)</sub>	R2 <sub>(2BSC)</sub>	R1 <sub>(2BSC)</sub>	R2 <sub>(2BSC)</sub>	R1 <sub>(2BSC)</sub>	R2 <sub>(2BSC)</sub>
Syntetic wastewater	COD	598 ± 50	598 ± 50		1185 ± 101		
	COD <sub>sol</sub>	162 ± 13	162 ± 13		340 ± 24		
	N-NH <sub>4</sub>	25 ± 2.4	25 ± 2.4		51 ± 8.1		
	N-NO <sub>3</sub>	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1		0.3 ± 0.1		
	N-N <sub>tot</sub>	30 ± 2.4	30 ± 2.4		55 ± 9.4		
Leachate Weak dilution	COD			9738 ± 450			
	COD <sub>sol</sub>			2800 ± 125			
	N-NH <sub>4</sub>			1960 ± 82			
	N-NO <sub>3</sub>			0.5 ± 0.4			
	N-N <sub>tot</sub>			3700 ± 285			
Leachate Strong dilution	COD					4560 ± 165	4560 ± 165
	COD <sub>sol</sub>					1540 ± 175	1540 ± 175
	N-NH <sub>4</sub>					945 ± 54	945 ± 54
	N-NO <sub>3</sub>					0.3 ± 0.4	0.3 ± 0.4
	N-N <sub>tot</sub>					1845 ± 175	1845 ± 175

Quando è stato alimentato il percolato all'inizio del secondo periodo, i granuli di R1 iniziarono a sfaldarsi; al contrario in R2, dopo una prima fase di adattamento al nuovo carico, le dimensioni dei granuli si mantennero costanti, per di più aumentarono leggermente al termine del secondo periodo stesso. Nel terzo periodo, la granulazione ha avuto un trend differente: in R1 si sono formati nuovi granuli, mentre gli altri, che in precedenza stavano sfaldandosi, ripresero ad accrescersi; in R2 invece i granuli si sono sfaldati del tutto. Gli autori addebitarono ciò al fatto che il percolato è stato alimentato in R1 dopo che la biomassa era stata acclimatata, seppur parzialmente, alla nuova matrice, ma con un carico di percolato minore (è stato mantenuto costante il carico organico volumetrico riducendo la durata del ciclo da 24 a 12 ore). Al contrario, nel terzo periodo in R2 non essendo la biomassa acclimatata al percolato, l'elevato stress imposto dal maggiore carico organico influente ha determinato il totale sfaldamento dei granuli (Fig.3.32).



**Fig.3.32:** Dimensioni dei granuli e andamento dei SST in R1 (a) ed R2 (b). (Di Bella e Torregrossa, 2014).

Il rendimento di rimozione del COD si mantenne costante seppur su valori bassi (R1=45-50% ; R2=60-65%). Nel secondo periodo il rendimento in R1 si ridusse drasticamente dal 70 al 20% a causa dello sfaldamento dei granuli e al conseguente wash-out della biomassa. Nello stesso periodo, in R2 i rendimenti si attestarono intorno al 78-88% nonostante l'elevato valore del carico influente che, essendo di natura facilmente biodegradabile, veniva rimosso in maniera soddisfacente. Nel terzo periodo, in R1 il rendimento aumentò al 45% grazie alla formazione di nuovi granuli, mentre in R2 si ridusse fino al 55% nonostante il carico molto elevato e il cambio dell'alimento (da sintetico a percolato) (Fig.3.33).



**Fig.3.33:** Rimozione della sostanza organica. (Di Bella e Torregrossa, 2014).

Riguardo l'azoto, i granuli mostrarono buone capacità di nitrificazione e denitrificazione simultanea solo al termine del periodo di coltivazione. Quando è

stato alimentato il percolato, in accordo con il lavoro di **Wei et al. (2012)**, l'elevato carico di azoto ammoniacale ha determinato la progressiva inibizione dei batteri AOB; quando il carico di azoto ammoniacale si è ridotto, si è osservata una parziale nitrificazione (20% in R1 e 40% in R2) (Fig.3.34).

I nitrati prodotti tuttavia si accumulavano allo scarico, a causa della minore attività biologica dei batteri eterotrofi, dovuta a sua volta alla competizione con i batteri autotrofi il cui metabolismo era favorito dalle elevate concentrazioni di ammoniaca nell'influenza (**Wei et al., 2012**).

Gli autori conclusero osservando che è dunque possibile trattare il percolato di discarica con il fango granulare, purché il suo dosaggio venga aumentato in maniera lenta e graduale, al fine di ottimizzare l'acclimatazione dei microrganismi ad una matrice così complessa. Inoltre, per ottenere rendimenti soddisfacenti è necessario ricorrere a pretrattamenti specifici per la riduzione del carico di azoto ammoniacale influente.

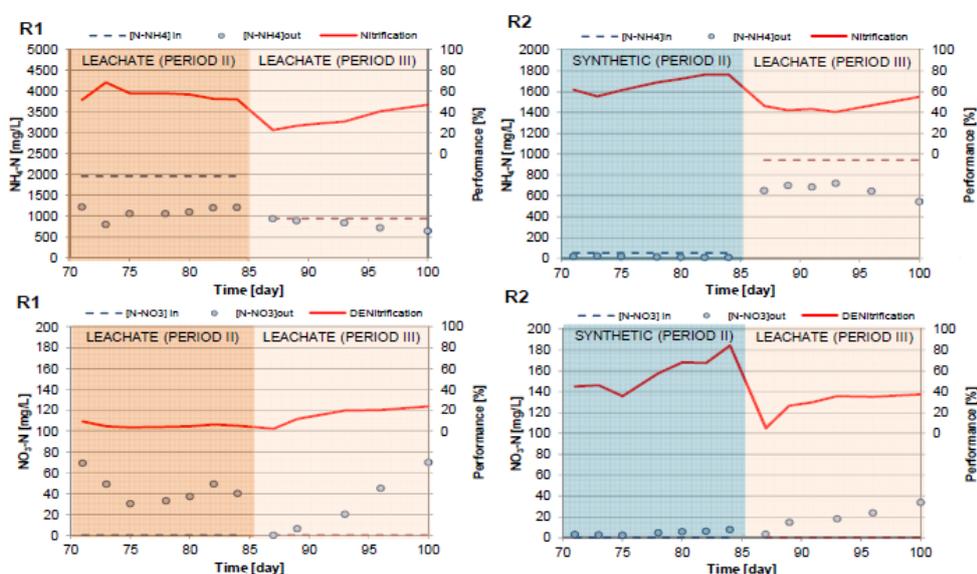


Fig.3.33: Rimozione dell'azoto. (Di Bella e Torregrossa, 2014).

### 3.8 Trattamento di reflui contaminati da idrocarburi

Le acque reflue contaminate da idrocarburi sono caratterizzate da elevati volumi e scarsa biodegradabilità. Inoltre esse contengono oli, sali metallici, solfati, fenoli oltre ad azoto e fosforo. Tali reflui sono caratterizzati da un'elevatissima variabilità dal punto di vista della loro composizione, a seconda del processo che le ha generate. Diversi autori riportano diverse composizioni medie di reflui petrolchimici. **Zhao et al. (2007)** riportano in un loro studio che le concentrazioni dei principali inquinanti erano: COD = 400-900 mg L<sup>-1</sup>, BOD = 150-350 mg L<sup>-1</sup>, N-NH<sub>4</sub> = 10-80 mg L<sup>-1</sup>; **Abdualhal et al. (2010)** riportano invece valori di COD pari a 570-2100 mg L<sup>-1</sup>, BOD di 125-200 mg L<sup>-1</sup>, idrocarburi totali (TPH) pari a 11,7 mg L<sup>-1</sup>. Come già detto, le composizioni medie dei reflui variano chiaramente in funzione della loro origine, ma in ogni caso il dato che emerge in maniera inequivocabile è la loro scarsa biodegradabilità. Risulta per tanto complicato riuscire a trattare tali reflui con i tradizionali sistemi biologici a fanghi attivi. Molto spesso inoltre, le acque derivanti da industrie petrolchimiche sono caratterizzate anche da elevata salinità, circostanza che ne complica sensibilmente la possibilità di un trattamento biologico. La riduzione dell'inquinamento da idrocarburi richiede quindi anche trattamenti fisico-chimici, tra i quali foto-elettrocatalisi, idrocycloni e trattamenti di chiari-flocculazione. Tuttavia, oltre al fatto che tali metodi risultano molto costosi, non tutti riescono a garantire gli standard richiesti dalle norme per lo scarico a mare.

Tra le acque reflue contaminate da idrocarburi vanno citate le acque di lavaggio delle cisterne delle navi adibite al trasporto di idrocarburi grezzi e raffinati, denominate "slop". Tali acque, oltre a contenere idrocarburi, sono caratterizzate da livelli di salinità variabili da 10 a 30 g L<sup>-1</sup>. Il problema dello scarico di queste acque è stato, ed è oggetto, di discussioni in molte nazioni, e recentemente il regolamento dell'Organizzazione internazionale marittima – IMO MARPOL 73/78, che stabilisce norme per le acque nere e grigie, acque di scarico, acque di sentina e trasformati, ha vietato lo scarico diretto in ambienti marini di acque reflue prodotte all'interno delle navi, specificando una concentrazione massima allo scarico di 5 ppm di idrocarburi.

Tale tipologia di refluo crea seri problemi ambientali, a causa dell'accumulo e della persistenza di composti xenobiotici in essi contenuti che possono accumularsi nell'ambiente (**Mancini et al., 2010**). Infatti essi, oltre ad essere caratterizzati da elevata salinità, da un elevato contenuto di sostanza organica più o meno biodegradabile, sostanze idrocarburiche oltre che da metalli (in tracce) (Tab.3.9).

**Tab. 3.9:** Caratteristiche di uno slop (**Di Bella et al., 2014**)

Parameter	Symbol	Value	Legal limit (D.Lgv. 152/2006)	Units
Chemical Oxygen Demand	COD	1088 ± 251	≤160	mg L <sup>-1</sup>
Total Carbon	TC	57.4 ± 4.6		mg L <sup>-1</sup>
Inorganic Carbon	IC	38.2 ± 4.82		mg L <sup>-1</sup>
Total Organic Carbon	TOC	19.1 ± 3.3		mg L <sup>-1</sup>
Total Petroleum Hydroc.	TPH	232.5 ± 28.5	≤5	mg L <sup>-1</sup>
Suspended solids	SS	352.4 ± 84.1	≤80	mg L <sup>-1</sup>
Turbidity		25.0 ± 5.4	--	
Aluminium	Al	<0.005	≤1	mg L <sup>-1</sup>
Arsenic	As	<0.001	≤0.5	mg L <sup>-1</sup>
Boron	Bo	5.02	≤2	mg L <sup>-1</sup>
Cadmium	Cd	<0.001	≤0.02	mg L <sup>-1</sup>
Chrome	Cr	<0.005	≤2	mg L <sup>-1</sup>
Iron	Fe	1.18	≤2	mg L <sup>-1</sup>
Manganese	Mn	<0.005	≤2	mg L <sup>-1</sup>
Nickel	Ni	<0.005	≤2	mg L <sup>-1</sup>
Copper	Cu	<0.005	≤0.1	mg L <sup>-1</sup>
Selenium	Se	<0.005	≤0.03	mg L <sup>-1</sup>
Lead	Pb	<0.005	≤0.2	mg L <sup>-1</sup>
Zinc	Zn	<0.005	≤0.5	mg L <sup>-1</sup>
Chlorides	Cl	8277 ± 121	≤1200	mg L <sup>-1</sup>
Conductivity		48.4 ± 26.5		mScm <sup>-1</sup>
pH		7.78 ± 0.62	5.5–9.5	

Il rispetto dei parametri previsti dalle norme in vigore (**MARPOL 73/78**) risulta una sfida alquanto ardua per tale tipologia di refluo. Gli slop possono essere trattati in un impianto a fanghi attivi convenzionale, previa subire tuttavia pretrattamenti chimico-fisici (disoleatura, filtrazione, flottazione) al fine di rimuovere una sostanziale aliquota di materiale difficilmente biodegradabile e potenzialmente tossico per le popolazioni batteriche. D'altro canto, come già anticipato, i trattamenti chimico-fisici hanno dei costi elevati legati all'utilizzo di *chemicals*, nonché per l'elevata produzione di fanghi chimici. In generale dopo un pretrattamento di disoleatura, gli slop dovrebbero essere sottoposti a un trattamento chimico finalizzato alla rimozione di gran parte degli inquinanti. In particolare, la coagulazione, accoppiata alla flocculazione, è il processo che tra tutti quelli possibili, fornisce rendimenti di rimozione più elevati, in termini di COD, TOC e solidi sospesi (**Di Bella et al., 2014**). La coagulazione costituisce uno step fondamentale nella rimozione del materiale colloidale sospeso, responsabile sia della torbidità che dell'inquinamento organico (**Sarkar et al., 2006**). L'efficacia di tale processo può essere correttamente valutata in funzione delle performance di rimozione di alcuni contaminanti guida, come idrocarburi, metalli, ecc. Infatti, la rimozione della torbidità definisce un effetto globale sulla rimozione dei colloidali, e spesso qualitativo. Di conseguenza, il valore di torbidità residua, non è sempre utile nel caso di analisi di rimozione di contaminanti da una miscela eterogenea. La coagulazione è largamente utilizzata negli impianti di trattamento dei reflui petrolchimici (**Verma et al., 2010; Santo et al., 2012**). In particolare, a causa

dell'elevato costo dei coagulanti organici naturali, rispetto agli altri di uso più frequente, la coagulazione viene effettuata mediante sali metallici. Vengono utilizzati Sali di alluminio o di ferro, eventualmente insieme ad agenti flocculanti. I coagulanti promuovono l'agglomerazione delle particelle riducendo la carica elettrostatica superficiale delle particelle. La dose richiesta varia in funzione della natura dell'influente da trattare: in generale si parla di bassi dosaggi quando la dose richiesta è inferiore a  $150 \text{ mg L}^{-1}$ , medi dosaggi se questa è compresa tra  $150$  e  $600 \text{ mg L}^{-1}$  e infine alti dosaggi se è superiore ai  $600 \text{ mg L}^{-1}$ . I coagulanti maggiormente utilizzati sono il solfato di alluminio e il cloruro ferrico. Tuttavia l'alluminio e il ferro vengono considerati un problema, in quanto tendono ad accumularsi nell'ambiente e possono facilmente entrare a far parte della catena alimentare giungendo così anche all'uomo (**Delgado et al., 2003**). Inoltre, la presenza di concentrazioni residue elevate di ferro e alluminio possono avere effetti negativi su eventuali trattamenti a valle del processo di coagulazione (es. filtrazione su membrana). I trattamenti chimico-fisici difficilmente consentono di rispettare gli standard allo scarico richiesti dalla norma, a meno di utilizzare ingenti quantità di dosi di coagulanti che tuttavia possono causare i sopracitati problemi di accumulo di ferro e alluminio nell'ecosistema. Allora i trattamenti chimico-fisici si prefigurano come pre-trattamenti, al fine di rimuovere gran parte del carico inquinante, e di rendere così il refluo idoneo a un trattamento successivo di tipo biologico, limitando allo stesso tempo la dose di coagulanti utilizzati.

Diversi sono gli studi riportati in letteratura relativi al trattamento chimico-fisico di reflui contaminati da idrocarburi (**Lee et al., 2009**).

A titolo di esempio si cita quello condotto da **Di Bella et al. (2014)**, in quanto relativo al trattamento degli slop, oggetto specifico di discussione in questa tesi. Gli autori hanno valutato quale tra il solfato di alluminio e il cloruro ferrico fosse il coagulante più efficace ai fini della rimozione di COD, TOC e TPH, mediante l'esecuzione di Jar Test; inoltre gli autori, mediante specifiche prove in batch, hanno valutato quale fosse, per ciascuno di essi, la dose ottimale, in funzione dei rendimenti di rimozione osservati e del volume di fango prodotto. Oltre agli agenti coagulanti, gli autori dosavano flocculanti (polimeri anionici A57 e cationici VP584). Gli autori osservarono che con entrambi gli agenti coagulanti. I risultati ottenuti dagli autori mostrarono come entrambi i coagulanti permettessero di ottenere buone performance sia sui TPH (>65%) che sulla torbidità (>80%). Tuttavia, sulla base di una semplice analisi multicriteriale basata principalmente su un approccio ambientale, le performance furono ritenute soddisfacenti solo per il solfato di alluminio, ritenuto essere maggiormente versatile per quanto riguarda la rimozione dei principali contaminanti che potrebbero ostacolare i successivi trattamenti biologici.

Rispetto ai trattamenti chimico-fisici, quelli biologici sono certamente una soluzione economicamente più sostenibile e a minore impatto ambientale; tuttavia, la contestuale presenza di composti recalcitranti e le elevate concentrazioni saline

che inducono i microrganismi alla plasmolisi, li rendono di difficile applicabilità nel trattamento di tali reflui, previo loro pretrattamento. **Pendashteh et al. (2012)** hanno analizzato le performance di un sistema MSBR (Membrane Sequencing Batch Reactor) inoculato con ceppi di batteri alofili, nel trattamento di reflui contaminati da idrocarburi e caratterizzati da elevate concentrazioni saline. Gli autori osservarono che il sistema biologico mostrava buoni rendimenti di rimozione del COD nonostante le variazioni di carico nell'influenta e le elevate concentrazioni saline. Un ruolo molto importante nel processo di rimozione della sostanza organica è stato svolto dall'azione filtrante esercitata dalla membrana. Tuttavia il tasso di sporcamento della membrana risultava molto elevato e tale dunque da richiedere lavaggi molto frequenti. Gli autori osservarono inoltre una forte dipendenza tra il rendimento di rimozione della sostanza organica e dei composti idrocarburi con il tempo di permanenza idraulico nel reattore. Evidentemente, a causa della loro scarsa biodegradabilità, sono necessari tempi maggiori per favorirne la degradazione biologica, seppur essa risulti essere parziale in confronto a fenomeni di adsorbimento all'intero dei fiocchi di fango. Gli autori a proposito di ciò, osservarono un graduale decremento del rapporto solidi volatili/totali, osservazione addebitata dagli autori proprio al fatto che gli idrocarburi venivano adsorbiti all'interno dei fiocchi sottoforma di piccole gocce disperse.

**Sun et al., (2010)** hanno valutato le performance di un impianto pilota BF-MBR alimentato con un refluo sintetico avente le stesse caratteristiche delle acque di sentina ricche di idrocarburi. Gli autori hanno osservato una diminuzione del tasso di rimozione del COD dal 45 al 37% con l'aumentare della concentrazione degli idrocarburi da 40 a 120 mg L<sup>-1</sup>. Ciò conferma che gli idrocarburi del petrolio sono più difficili da biodegradare rispetto alla materia organica proveniente da acque nere o grigie. Al contrario, gli autori hanno osservato un aumento del rendimento di rimozione del COD quando la concentrazione degli idrocarburi è aumentata a 160 mg L<sup>-1</sup>. Gli autori attribuiscono tale risultato all'effetto della separazione per gravità delle emulsioni oleose, dovuta all'aerazione; infatti nelle condizioni di alta concentrazione di petrolio, è stato osservato un fenomeno di flottazione di idrocarburi, rimossi ogni giorno manualmente nel reattore biologico. Gli autori osservarono inoltre un aumento del rendimento di rimozione della sostanza organica al crescere del tempo di residenza idraulico (HRT). Infatti, le molecole organiche più complesse necessitano di una lunga durata per l'idrolisi e la biodegradazione. L'aumento dell'HRT da 4 a 8 h ha comportato un incremento nella rimozione degli idrocarburi solubili del 44%.

Pochissimi riferimenti sono presenti nella letteratura scientifica di settore, relativamente al trattamento di tali reflui con fango granulare aerobico. Merita di essere citato a proposito lo studio condotto da **Zhang et al. (2011)**, nel quale gli autori hanno valutato la trattabilità di tale tipologia di reflui con appunto il fango granulare. La sperimentazione è stata divisa in due fasi: la prima di 97 giorni

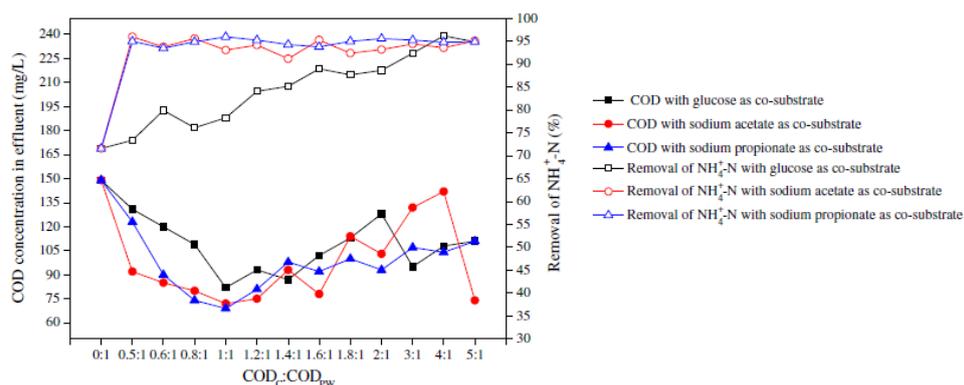
destinata alla coltivazione dei granuli con refluo sintetico, e la seconda di giorni in cui il refluo petrolchimico (PW) è stato progressivamente sostituito al precedente alimento (Tab.3.10). Dal 193° giorno in poi è stato aggiunto un ulteriore substrato, con lo scopo di favorire il co-metabolismo.

**Tab.3.10:** Percentuale di refluo petrolchimico (PW) nel refluo influente (Zhang et al, 2011).

	Day	PW/(SW + PW)
Phase 1	1-97	0
Phase 2	98-100	0.05
	101-104	0.1
	105-132	0.2
	133-142	0.3
	143-161	0.4
	162-166	0.6
	167-171	0.8
	172-192	1
	193-223	1 (co-substrate was added)

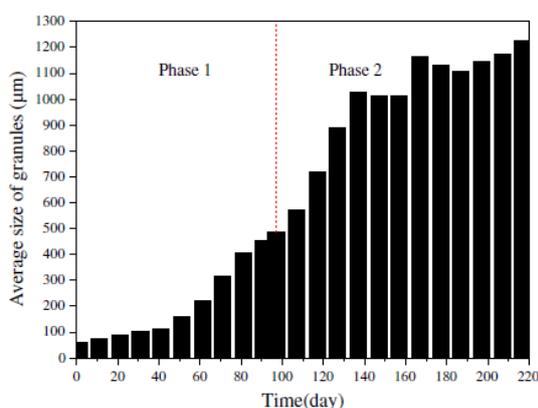
Il co-metabolismo per definizione è la simultanea degradazione di due substrati, in cui la degradazione del secondo (substrato non di crescita) dipende dalla presenza del primo (substrato di crescita).

Il co-metabolismo si verifica per l'azione di enzimi che vengono prodotti dai microrganismi per altri scopi (McCarty et al., 1997). In particolare si verifica che i microrganismi degradando il substrato di crescita producono enzimi i quali degradano l'altro substrato; in tal modo la rimozione del substrato non di crescita avviene in maniera indiretta, e presuppone la presenza di un substrato che venga utilizzato direttamente dai microrganismi per il proprio metabolismo. La scelta e il dosaggio del substrato co-metabolico risulta un passaggio molto delicato. Infatti, in funzione del ceppo batterico e della sostanza da degradare, occorre scegliere in maniera opportuna il tipo di substrato da utilizzare, nonché il suo dosaggio. Gli autori hanno effettuato diversi batch test utilizzando diversi substrati, tra i quali, acetato, glucosio e propionato di sodio e diversi dosaggi in proporzione al refluo petrolchimico (Fig.3.34).



**Fig.3.34:** Risultati dei batch test per la determinazione del co-substrato ideale. (Zhang et al., 2011).

Gli autori, monitorando i rendimenti di rimozione del COD e dell’azoto ammoniacale, osservarono che il propionato di sodio risultava il co-substrato ideale, dosato in rapporto 1:1 con il refluo petrolchimico.

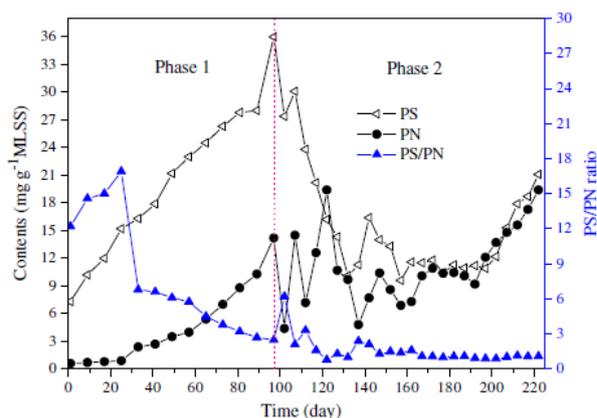


**Fig.3.35:** Andamento delle dimensioni medie dei granuli nei due periodi sperimentali. (Zhang et al., 2011).

La dimensione media dei granuli aumentò fino a 1,67 mm. Tuttavia, gli autori osservarono che quando il dosaggio di refluo petrolchimico nell’alimento fu aumentato all’80%, la mancanza di substrato biodegradabile probabilmente condusse i batteri alla lisi cellulare e quindi alla morte, causando quindi la parziale rottura dei granuli (Fig.3.35).

A conferma di ciò, gli autori osservarono un sensibile decremento nel contenuto di EPS, evidente segno dell’indebolimento della matrice strutturale dei bio-aggregati. L’aggiunta del propionato invece favorì il nuovo riaggregamento dei granuli, le cui dimensioni medie aumentarono fino a circa 1,20 mm. Il rapporto SSV/SST diminuì

costantemente man mano che il dosaggio di refluo petrolchimico veniva aumentato. Gli autori attribuirono ciò alla graduale riduzione dell'attività biologica della biomassa. L'aggiunta del propionato nuovamente incentivò l'attività metabolica, così la percentuale di solidi sospesi volatili aumentò sensibilmente. Gli autori effettuarono una dettagliata analisi del contenuto di EPS. Si osservò che durante la prima fase, il contenuto di EPS aumentò in maniera significativa. In particolare, gli autori osservarono che la riduzione del rapporto carboidrati/proteine nelle EPS era seguito dal rapido aumento delle dimensioni medie dei granuli (Fig.3.36).



**Fig.3.36:** Andamento del contenuto di EPS nei granuli. (Zhang et al., 2011).

Tuttavia, gli autori osservarono, inoltre, che il contenuto di carboidrati risultava molto maggiore rispetto a quello delle proteine, risultato in disaccordo con la maggior parte degli studi presenti in letteratura relativo al contenuto di EPS nei fanghi granulari e, addebitabile, probabilmente, al differente metodo di estrazione/determinazione delle EPS stesse. L'incremento del dosaggio di refluo petrolchimico ha causato, nei primi giorni della seconda fase, una sensibile riduzione del contenuto di carboidrati. Come confermato da altri autori (**Schmidt e Ahring, 1996**) il contenuto di EPS è influenzato sia dalle condizioni di crescita della biomassa ma anche dalla composizione dell'alimento. L'incremento del contenuto di carboidrati, in seguito al dosaggio del propionato, ha determinato il nuovo riaggregarsi dei granuli. I risultati ottenuti dagli autori mostrano quindi che il refluo petrolchimico ha avuto un effetto negativo sulla produzione/composizione delle EPS che, di conseguenza, si è tradotta in un indebolimento strutturale dei granuli. L'aggiunta del propionato ha favorito lo sviluppo di nuova biomassa e contestualmente l'incremento del contenuto sia di proteine che di carboidrati nel

fango, favorendo in tal modo la formazione di nuovi granuli strutturalmente stabili. Per quanto riguarda le performance di processo, durante la prima fase e nei primi 40 giorni della seconda ovvero quando nell'alimento vi era glucosio come fonte di carbonio, l'efficienza di rimozione del COD era di circa il 90%. Allo stesso modo, i rendimenti di rimozione dell'azoto ammoniacale risultavano alti (circa il 95%), indicando la presenza di una biomassa autotrofa sufficientemente attiva. Il rendimento di rimozione dell'azoto totale aumentò progressivamente fino all'80% man mano che i granuli crescevano di dimensioni. All'inizio della seconda fase però, la carenza di substrato organico, e la scarsa biodegradabilità del refluo petrolchimico ( $BOD/COD=0,06$ ), risultarono in una scarsa efficienza di denitrificazione, per tanto il rendimento di rimozione dell'azoto totale si ridusse in maniera significativa. Gli autori giunsero dunque alla conclusione che l'assenza di una fonte esterna di carbonio riduceva sensibilmente l'attività metabolica della biomassa. L'aggiunta del propionato di sodio come substrato co-metabolico ha infatti consentito un sensibile miglioramento sia dell'efficienza di rimozione del COD che dell'azoto (Fig.3.37).

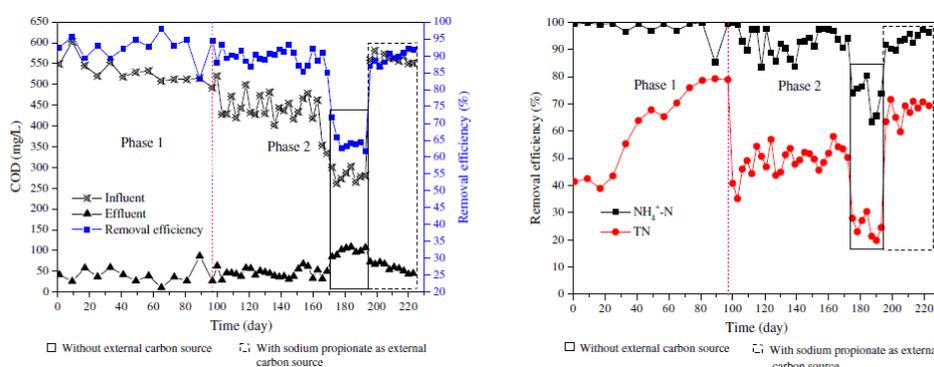


Fig.3.37: Andamento del rendimento di rimozione del COD e dell'azoto (Zhang et al., 2011).

### 3.9 Trattamento di reflui contenenti inquinanti “emergenti”

Negli ultimi anni, nelle acque di approvvigionamento e nei reflui trattati sono stati identificati composti derivanti in larga parte da antibiotici ad uso umano e animale, farmaci di prescrizione e generici, prodotti delle acque reflue industriali e civili, ormoni sessuali e steroidei (Metcalf & Eddy, 2006). Caratteristica comune di tali inquinanti è la loro presenza nelle acque in concentrazioni molto basse, dell'ordine dei  $ng L^{-1}$ , al massimo qualche  $\mu g L^{-1}$ , e, pertanto, sono chiamati anche microinquinanti. Tali composti hanno proprietà chimico-fisiche tali da indurre

effetti avversi sugli organismi, in particolare quelli acquatici. Documentate, infatti, sono soprattutto le implicazioni ambientali (**Pomati et al., 2006**), ma alla luce delle conoscenze attuali non si possono escludere neppure effetti avversi per l'uomo derivanti dall'esposizione cronica, come ad esempio l'aumento di allergie o la selezione di ceppi batterici antibiotico-resistenti (**Kümmerer, 2009a**). Tali inquinanti prendono anche il nome di composti emergenti, poiché molti sono ancora non normati (**Bolong et al., 2009**). Limitare l'impiego di tali sostanze al fine di ridurre la loro presenza nell'ambiente è ragionevole ed economico, ma nel caso di alcuni prodotti, e soprattutto nel caso dei farmaci, questo è difficilmente attuabile. Così, un ruolo fondamentale nel controllo dell'inquinamento ambientale da microinquinanti è assunto dagli impianti di depurazione, poiché i prodotti quotidianamente impiegati per la cura e l'igiene personale e i farmaci escreti come tali o come metaboliti attivi con le urine o le feci dei pazienti si ritrovano nelle acque fognarie dirette agli impianti di trattamento delle acque reflue. I depuratori, purtroppo, non sono progettati per rimuovere sostanze tanto complesse, così diverse tra loro e a concentrazioni tanto basse, e così, molte di queste sostanze non sono degradate e rimosse in misura completa e permangono, quindi, anche nelle acque reflue trattate, riversandosi e accumulandosi nell'ambiente. Da qui nasce la necessità di migliorare le unità di trattamento già esistenti negli impianti o implementare gli stessi con nuove tecnologie (**Larsen et al., 2004**). Tra i trattamenti avanzati studiati per la rimozione dei composti emergenti dalle acque reflue, rientrano i sistemi biologici a biomassa granulare. In letteratura sono presenti alcuni studi relativi al trattamento di acque contaminate da fluorofenoli. L'utilizzo di composti organo-fluorurati come surfattanti, prodotti utilizzati nell'agricoltura e nelle industrie farmaceutiche, ovvero ancora come adesivi, e infine come refrigeranti, è cresciuto drasticamente negli ultimi anni (**Key et al., 1997**). Tali composti hanno effetti biologici significativi soprattutto come inibitori di enzimi; inoltre, modificano la comunicazione tra cellule e interferiscono negativamente con i meccanismi di trasporto di materia ed energia attraverso la membrana cellulare. La biodegradazione di tali composti, tra cui appunto i fluorofenoli, è stata poco studiata. I pochi studi presenti in letteratura, riportano che tali composti vengono degradati per via chimica (**Hagblom 1992, Murphy et al., 2009**). La conversione di questi composti ad altri meno pericolosi è tuttavia un passaggio critico e spesso comporta il loro accumulo all'interno dei reattori (**Carvalho et al., 2006**). La rimozione biologica dei composti alo-aromatici è stata studiata da alcuni autori (**Buitron et al., 2005, Osuna et al., 2008**) i quali hanno osservato che mantenendo un'elevata concentrazione di batteri in grado di decomporre tali composti, si ottengono rendimenti di rimozione molto elevati. Poiché tali composti sono presenti in concentrazioni molto basse e per di più la loro presenza non è continua, il mantenimento di una sufficiente quantità di batteri specializzati non è facilmente ottenibile. I sistemi biologici ad elevata ritenzione di biomassa risultano estremamente promettenti nell'ambito del trattamento di reflui

contenenti composti tossici. **Carucci et al. (2010)** riportano che i sistemi a biomassa granulare risultano i sistemi biologici più performanti nel trattamento di acque contenenti clorofenoli, grazie alla densa struttura dei granuli che proteggono i microrganismi dai composti tossici presenti nel bulk (**Wang et al., 2007; Carucci et al., 2008, 2009, 2010**). Tuttavia, se il fango non è acclimatato alla presenza dei composti tossici, una possibile soluzione potrebbe essere l'aggiunta di ceppi batterici specializzati (bio-augmentation). Tale pratica però si scontra con due problematiche: innanzitutto, poiché l'alimentazione dei contaminanti non è continua ed inoltre essi sono presenti a basse concentrazioni, si può verificare che i ceppi batterici specializzati perdano la loro capacità di degradazione a causa dello sviluppo competitivo con altre specie batteriche. Inoltre, la presenza di protozoi può essere nociva per tali ceppi, in quanto essi si nutrono di tali specie. **Duque et al. (2010)** hanno condotto uno studio relativo alla rimozione di fluorofenoli in sistemi biologici a biomassa granulare. Gli autori in particolare hanno studiato le performance di questo sistema in due differenti condizioni, ovvero senza e successivamente con l'aggiunta di ceppi batterici specializzati (*Rhodococcus sp.* ceppo FP1). Dopo una prima fase di coltivazione della biomassa granulare, nell'influenza è stato aggiunto il clorofenolo (0,22 mM) per circa 120 giorni. Successivamente il dosaggio è stato aumentato a 0,44 mM, per circa 170 giorni, al termine dei quali il dosaggio è stato nuovamente ridotto a 0,22 mM nei rimanenti 40 giorni.

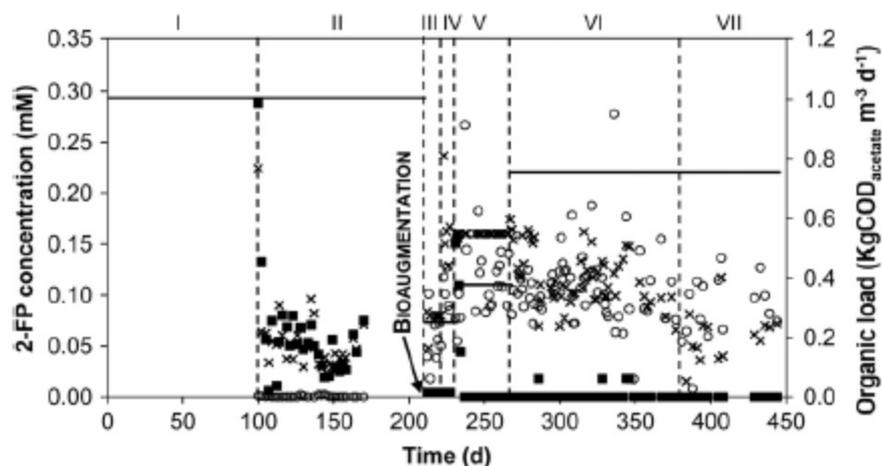
**Tab.3.11:** Condizioni operative nel corso della campagna sperimentale (**Duque et al, 2010**).

Phase	Length of operation (days)	Days of operation	Cycle time (h)	Inlet carbon sources concentrations (mM)		HRT <sup>a</sup> (h)	OLR <sup>b</sup> (kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	
				Acetate	2-FP		Acetate	2-FP
I	0-99	99	3	5.9	0	7.9	1.06	—
II <sup>c</sup>	100-209	109	3	5.9	0.22	7.9	1.06	0.075
Bioaugmentation with <i>Rhodococcus sp.</i> strain FP1								
III	210-222	12	12	5.9	0.22	31.6	0.26	0.019
IV	223-229	6	12	5.9	0.44	31.6	0.26	0.037
V	230-266	36	8	5.9	0.44	21.1	0.40	0.056
VI	267-400	133	4	5.9	0.44	10.5	0.79	0.112
VII	401-444	43	4	5.9	0.22	10.5	0.79	0.056

a HRT – hydraulic residence time.  
b OLR – organic loading rate.  
c Organic shock loadings with 2-FP applied 1 cycle/2 days.

Durante la prima fase (99 giorni), in cui l'obiettivo era quello di ottenere granuli stabili, è stato dosato solo l'acetato come unica fonte di carbonio ed energia. Nella seconda fase, l'impianto è stato esposto ad alimentazione intermittente (1 ciclo ogni 2 giorni) di clorofenoli con concentrazione di 0,22 mM, al fine di valutare la capacità di biodegradazione dei granuli. Poiché l'impianto (volume 2,5 L) operava con un rapporto di scambio volumetrico del 40%, la concentrazione dell'inquinante al suo interno era di 0,09 mM. L'alimentazione intermittente è stata applicata per

un periodo di circa 109 giorni. Gli autori non osservarono fenomeni di degradazione dell'inquinante, segno che la biomassa non si era acclimatata. Sebbene altri studi (Tay et al., 2005) avessero riportato che i granuli alimentati con acetato fossero in grado di degradare composti recalcitranti, ciò non è stato verificato con il clorofenolo. Gli autori allora inocularono nuovamente l'impianto con fango granulare (quello già ottenuto) e una coltura di *Rhodococcus sp.* (ceppo FP1) in parti uguali. Dopo l'inoculo del ceppo batterico il tempo di sedimentazione è stato aumentato a 20 minuti (precedente 3 minuti) al fine di non dilavare la biomassa specializzata finché questa non venisse integrata all'interno dei granuli. Gradualmente il tempo di sedimentazione è stato ridotto nuovamente a 3 minuti. La durata del ciclo è stata invece dapprima aumentata a 12 ore in modo che la durata del ciclo non risultasse un fattore limitante per la degradazione del clorofenolo. Nella terza fase l'impianto è stato alimentato con una concentrazione di clorofenolo costante di 0,22 mM e 5,9 mM di acetato di sodio come co-substrato. La concentrazione di clorofenolo è stata quindi incrementata a 0,44 Mm nella quarta fase alla sesta.



**Fig.3.38:** Andamento della concentrazione di clorofenolo nell'effluente e del carico organico applicato (Duque et al., 2010).

I risultati ottenuti mostrano come il clorofenolo veniva completamente biodegradato, indicando dunque l'acclimatazione della specie batterica specializzata (Fig.3.38). Durante la degradazione di tali composti, non si sono osservati metaboliti di reazioni intermedie nell'effluente. In taluni giorni gli autori osservarono invece una concentrazione di ioni fluoruri, metabolita derivante dalla degradazione dei clorofenoli, nell'effluente. Gli autori attribuirono ciò a fenomeni

di adsorbimento di tali composti all'interno dei granuli, i quali venivano poi desorbiti in particolari condizioni operative. In particolare, gli autori osservarono che il rilascio è stato maggiore durante la quinta fase, ovvero quando, in seguito alla riduzione della durata del ciclo da 12 a 8 ore, il carico giornaliero di clorofenoli è aumentato.

Gli autori osservarono inoltre che i clorofenoli venivano degradati nel corso di 8 ore, ragion per cui decisero di ridurre la durata del ciclo. Successivamente, gli autori osservarono una rimozione ancora più rapida dei clorofenoli (4 ore), così ridussero ulteriormente la durata del ciclo di reazione (fase VI e VII). Nel corso delle ultime fasi la velocità di degradazione del clorofenolo aumentò ulteriormente, e la maggior parte del contaminante veniva rimossa in circa 2-3 ore.

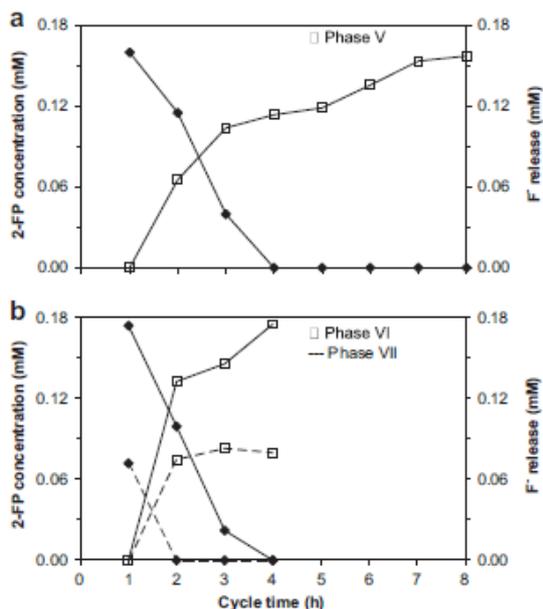
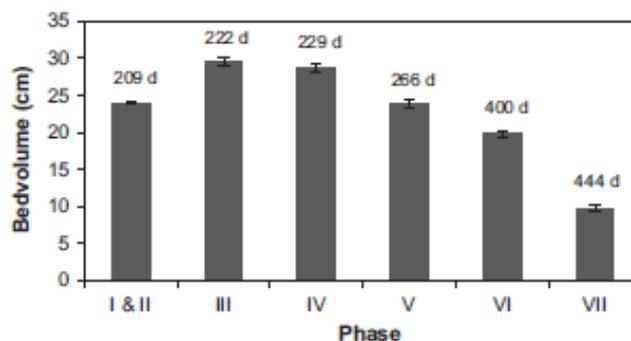


Fig.3.39: Profilo di degradazione dei clorofenoli durante la fase V (a), VI e VII (b). (Duque et al., 2010).

Gli autori misurarono nel corso della sperimentazione il volume del letto di fango al termine della fase di sedimentazione. I risultati mostrano che subito dopo l'inoculo del ceppo batterico specializzato (fase III), il *bed volume* aumentò, testimoniando che i nuovi batteri avevano colonizzato con successo i granuli. Nel tempo, il *bed volume* diminuì, in particolar modo nelle ultime due fasi, quando ormai l'impianto era attivo da oltre 400 giorni e i granuli divennero molto piccoli (simili a sabbia) ma molto densi e con ottime caratteristiche di sedimentabilità (Fig. 3.40).



**Fig.3.40:** Andamento del volume del letto di fango nelle sette fasi (Duque et al., 2010).

Gli autori conclusero il loro lavoro affermando che è possibile rimuovere biologicamente i composti tossici utilizzando un inoculo misto di fango granulare e ceppi batterici specializzati che vengono integrati all'interno dei densi aggregati microbici.

Un altro interessante studio è stato condotto da **Amorin et al. (2014)** relativamente al trattamento di reflui contenenti fluorochinoloni, nella fattispecie ofloxacina, norfloxacin e ciprofloxacina. Trattasi di antibiotici sintetici utilizzati sempre più frequentemente nel trattamento di infezioni batteriche. La presenza di atomi di fluoro conferisce loro una significativa attività biologica e allo stesso tempo una elevata stabilità, circostanza che li rende molto persistenti (**Iwai et al., 2009**). Tali contaminanti possono giungere gli impianti di trattamento delle acque reflue attraverso diversi percorsi e sono presenti in concentrazioni dell'ordine dei nano e microgrammi negli reflui sia domestici che ospedalieri. Negli reflui effluenti delle industrie farmaceutiche tuttavia essi possono raggiungere anche concentrazioni nell'ordine dei milligrammi per litro (**Larsson et al., 2007**). Gli autori in particolare hanno valutato la rimozione di questi contaminanti, indicati con la sigla FQs (fluoroquinolones), con sistemi biologici a biomassa granulare, nonché il loro effetto sulle performance di processo (rimozione COD e nutrienti) e sulla comunità microbiologica del fango granulare. A tal fine gli autori utilizzarono un reattore SBR operante secondo cicli di 3 o 8 ore, e alimentato con acetato di sodio come fonte di carbonio e FQs a concentrazioni variabili. La prima fase, durata 96 giorni, è stata dedicata alla coltivazione del fango granulare, e una volta ottenuti granuli stabili, sono stati dosati anche i FQs secondo le modalità riportate in tabella 3.12.

**Tab.3.12:** Condizioni operative nel corso della campagna sperimentale (**Amorin et al., 2014**).

Phase	Days	[Inlet carbon source] ( $\mu\text{M}$ )		Cycle time (h)	HRT <sup>a</sup> (h)	Operation
		NaAc	FQs			
I	0–96	5900	0	3	7.9	
II	97–111	5900	32	3	7.9	CPF single cycle shock applied on days 97, 98, 104 and 105.
III	112–131	5900	32	3	7.9	NOR single cycle shock applied on days 112, 113, 125 and 126.
IV	132–145	5900	32	3	7.9	OFL single cycle shock applied on days 132, 133, 139 and 140.
V	146–207	5900	0	3	7.9	
VI	208–228	5900	9	8	21.1	OFL continuous shock applied from day 208–219.
VII	229–249	5900	9	8	21.1	NOR continuous shock applied from day 229–240.
VIII	250–270	5900	9	8	21.1	CPF continuous shock applied from day 250–261.
IX	271–291	5900	9 <sup>b</sup>	8	21.1	Mix FQs continuous shock applied from day 271–282.
X	292–340	5900	0	8	21.1	

<sup>a</sup> HRT: Hydraulic retention time.  
<sup>b</sup> 3  $\mu\text{M}$  of each tested FQ.

L'efficienza di rimozione del COD non è stata influenzata in maniera significativa dalla presenza di queste sostanze. Tuttavia, durante i periodi in cui il carico aumentava si è osservato un leggero incremento della concentrazione di COD nell'effluente. Gli autori osservarono, inoltre, che durante i periodi di carico elevato di FQs, la rimozione del COD nella fase anaerobica (primi 60 minuti del ciclo) si riduceva, indicando dunque una minore rimozione dell'acetato in tale fase. Inoltre durante la quinta fase, quando gli FQs non erano presenti nell'influent, non si osservò la loro presenza né nel bulk né tanto meno nell'effluente; gli autori osservarono che in questa fase il COD veniva rimosso più rapidamente nel periodo anaerobico, segno che il sistema aveva ripreso a funzionare dopo l'inibizione causata dai FQs (Fig.3.41).

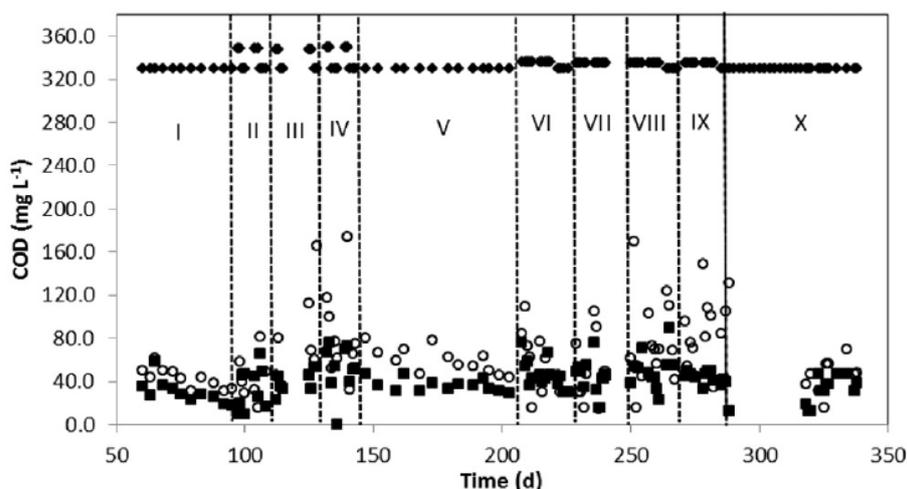
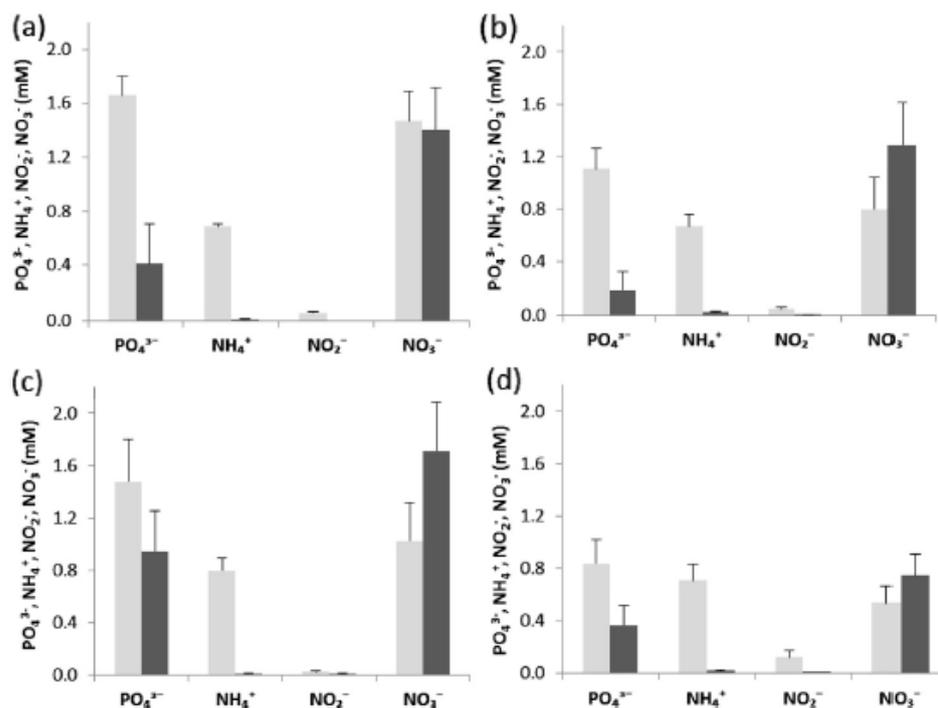


Fig.3.41: Andamento della concentrazione di COD nell'alimento e nell'effluente (Amorin et al., 2014).

Riguardo l'azoto e il fosforo, gli autori riportano che, dalla seconda alla quarta fase, durante le quali i FQs venivano alimentati sporadicamente all'interno di alcuni cicli, non si sono osservati cali di rendimento né per l'azoto né per il fosforo.

Dalla sesta fase alla nona, ovvero quando i FQs sono stati alimentati con continuità per 11 giorni, gli autori osservarono che sia il rilascio che la rimozione del fosforo rispettivamente nelle fasi anaerobiche e aerobiche si era sensibilmente ridotto. Riguardo l'azoto invece, gli autori osservarono che l'ammonio veniva rimosso quasi del tutto, e convertito per intero ad azoto nitrico. Ad eccezione della sesta fase, la concentrazione di nitrati nell'effluente era sempre maggiore rispetto a quella all'inizio della fase aerobica (Fig.3.42).

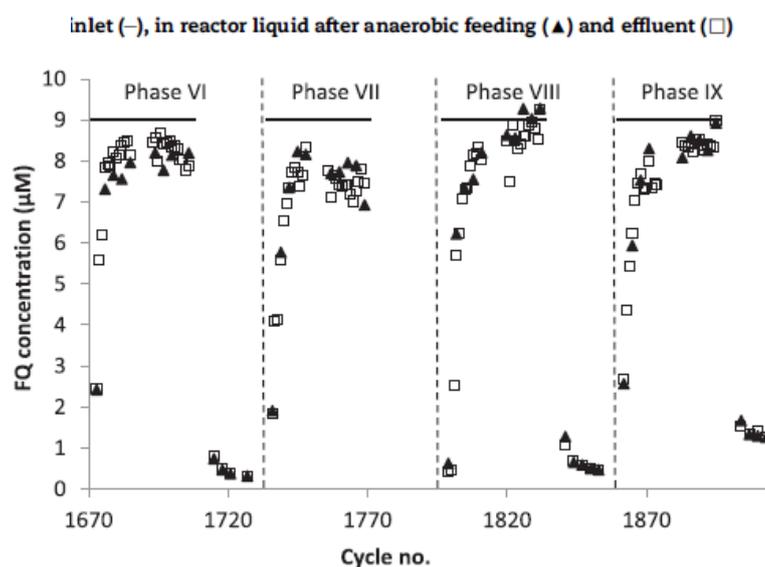


**Fig.3.42:** Andamento della concentrazione di azoto e fosforo nell'alimento e nell'effluente nelle fasi VI (a), VII (b), VIII (c) e IX (d). (Amorin et al., 2014).

Riguardo la rimozione dei FQs, dalla seconda alla quarta fase l'impianto è stato esposto ad alimentazione intermittente di tali composti che venivano alimentati solo durante alcuni cicli. In questo periodo, la maggior parte dei FQs venivano adsorbiti all'interno dei granuli; nei cicli successivi all'alimentazione dei FQs, i composti adsorbiti venivano desorbiti e finivano nell'effluente, denotando l'incapacità dei granuli a mineralizzare tali sostanze. Nei due mesi successivi (fase V), il carico di FQs è stato ripristinato. In particolare, l'impianto è stato sottoposto a un carico costante e continuo per 11 giorni, al fine di valutare gli effetti dell'esposizione a lungo termine a tali composti. All'inizio di ciascuna fase, la

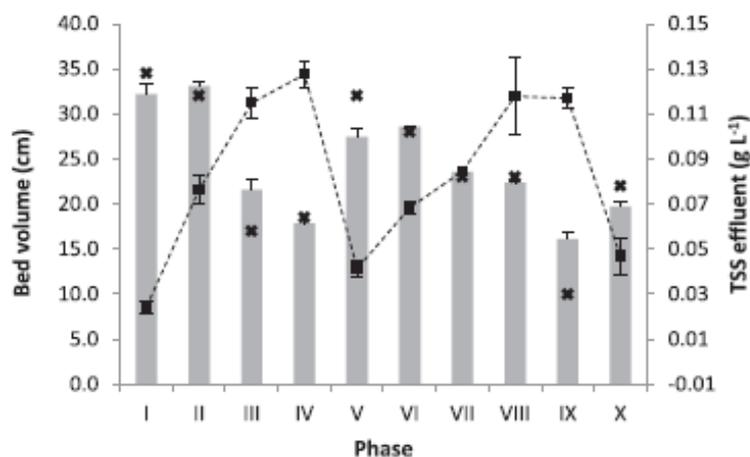
concentrazione di FQs al termine della fase anaerobica era minore di quella attesa, tenendo conto della concentrazione influente e dell'effetto diluizione iniziale, probabilmente a causa di fenomeni di adsorbimento all'interno dei granuli. Sulla base dei risultati ottenuti, gli autori dedussero che le capacità adsorbenti dei granuli erano maggiori nei confronti in ordine della ciprofloxacina, della norfloxacina e della ofloxacina ( $10,1 - 12,1 - 17,9 \text{ mgFQs KgSSV}^{-1}$ ).

Come si può vedere dalla Figura 3.43, dalla sesta fase in poi, in ciascuna di esse si è osservato l'accumulo di FQs all'interno del reattore, finché si è giunti alla condizione per cui la concentrazione nell'influente e nell'effluente erano invariate. La degradazione dei FQs non è stata osservata, poiché la concentrazione di fluoruri, che sono i cataboliti della reazione di idrolisi di tali composti, è stata sempre al di sotto del limite di rilevabilità della metodica analitica utilizzata dagli autori. Dopo che è stato interrotto il dosaggio degli FQs, si è osservato un graduale decremento della loro concentrazione nel reattore, e successivamente al nuovo carico, i composti precedentemente adsorbiti sono stati lentamente desorbiti, indicando dunque che il processo di adsorbimento degli FQs da parte dei granuli aerobici è un processo reversibile.



**Fig.3.43:** Andamento della concentrazione di azoto FQs nell'influente, al termine della fase anaerobica e nell'effluente. (Amorin et al., 2014).

Gli autori contestualmente alle performance di processo, monitorarono anche le caratteristiche morfologico-strutturali dei granuli.



**Fig.3.44:** Andamento del volume del letto di fango nel tempo. (Amorin et al., 2014).

In particolare, dall'analisi dell'altezza del letto di fango, valutata al termine della fase di sedimentazione, gli autori osservarono che sia quando l'alimentazione dei FQs era a intermittenza e in continuo, tale altezza si è progressivamente ridotta (Fig.3.44). Tale riduzione fu accompagnata dall'aumento della concentrazione di solidi allo scarico, evidente segno di sfaldamento dei granuli. Durante la quinta e decima fase, durante le quali è stato alimentato solo acetato, il trend si è invertito sia per l'altezza del letto di fango che per i solidi nell'effluente. Contestualmente alla riduzione dell'altezza del letto di fango osservata dalla seconda alla quarta e della sesta alla nona fase, gli autori osservarono anche la riduzione della densità dei granuli da 80 a 67 e poi da 64 a 43 gSSV L<sup>-1</sup>, segno anche questo del deterioramento dei granuli dovuto all'esposizione prolungata ai FQs.

Poiché i processi biologici non hanno significativamente risentito della presenza degli FQs, gli autori dedussero che la struttura dei granuli debba aver svolto un decisivo ruolo protettivo per i microrganismi nei confronti della presenza di tali composti. Durante il periodo in cui nell'impianto sono stati alimentati i FQs, la concentrazione di COD nell'effluente aumentò, senza tuttavia superare il limite di 125 mg L<sup>-1</sup>. Poiché i FQs non venivano biodegradati, il cambiamento della qualità dell'effluente può essere solo in parte attribuito alla presenza di tali composti nell'alimento, in quanto la quantità di FQs alimentati era decisamente più piccola rispetto all'incremento di COD nell'effluente. Poiché l'acetato veniva quasi del tutto consumato, probabilmente le SMP rilasciate in seguito alla lisi cellulare erano le principali responsabili dell'aumento del COD nell'effluente. Inoltre, ogni volta che i FQs erano presenti nell'influenza, si osservava una riduzione dell'abbattimento del COD nella fase anaerobica, segno della riduzione dell'attività metabolica a causa della presenza di questi composti. Inoltre anche quello rimosso

durante la fase aerobica subiva una lieve, ma nel complesso minore, riduzione. Gli autori osservarono, inoltre, che anche il rilascio (fase anaerobica) e il successivo riassorbimento (fase aerobica) dei fosfati si ridusse sensibilmente. La prolungata esposizione a questi composti ha dunque effetti molto significativi nei confronti dei PAOs. Riguardo la rimozione dell'azoto, gli autori non osservarono significativi fenomeni inibitori nei confronti né dei batteri AOB né degli NOB, dovuti alla prolungata esposizione a queste sostanze. L'ammonio veniva infatti quasi del tutto consumato in tutte le fasi, indipendentemente dalle concentrazioni di FQs nell'influenza, e allo stesso tempo non si osservava accumulo di nitriti, segno dunque che la nitrificazione era completa. I nitrati erano di conseguenza l'unico prodotto del processo di nitrificazione. La loro concentrazione allo scarico era tuttavia elevata, a causa dell'incompleta denitrificazione. Gli autori attribuiscono ciò allo sfaldamento dei granuli osservato in particolare dalla sesta fase alla nona, dove a causa delle ridotte dimensioni dei granuli, l'ossigeno riusciva a penetrare negli strati più interni riducendo lo spessore dello strato anossico. Riguardo i FQs, gli autori applicando bilanci di massa al sistema, si accorsero che non tutta la quantità alimentata veniva ritrovata allo scarico. Poiché inoltre, la concentrazione di fluoruri nell'effluente era sempre al di sotto del limite di rilevabilità della metodica analitica, gli autori dedussero che non vi erano stati fenomeni di degradazione biologica, bensì solamente fenomeni di adsorbimento fisico. Quando i FQs venivano alimentati continuamente, la loro concentrazione nell'effluente tendeva gradualmente a quella dell'alimento, evidente segno del progressivo esaurimento della capacità adsorbente dei granuli.

Simili risultati furono ottenuti anche da altri autori (**Sun et al., 2008**). In particolare questi riportarono che la rimozione della Malachite verde fu molto rapida inizialmente, ma gradualmente si ridusse raggiungendo una condizione stazionaria di equilibrio. Infatti, inizialmente, la superficie dei granuli è disponibile all'adsorbimento, così il processo è molto rapido. Man mano che i siti attivi si vanno riempiendo e inoltre man mano che il gradiente di concentrazione tra i granuli e il bulk si va riducendo, la velocità con cui evolve il processo si riduce fino ad esaurirsi. Nel momento in cui l'alimentazione dei FQs è stata sospesa, la loro concentrazione nell'effluente aumentò drasticamente, segno che tutto quello che era stato precedentemente adsorbito era stato desorbito. Anche altri autori riportano che il fenomeno di adsorbimento da parte dei fanghi granulari sia un processo reversibile, e che circa il 90% dei composti adsorbiti possono essere rilasciati se non metabolizzati (**Bassin et al., 2011a, Wang et al., 2013**). Gli autori sostengono che un ruolo molto importante nei fenomeni di adsorbimento sia giocato dalle EPS. Tali sostanze, come è noto, hanno proprietà idrofobiche il che li rende particolarmente affini nei confronti dei composti organici (**Sheng et al., 2010**). Quindi, l'elevato contenuto di EPS negli strati esterni dei granuli può effettivamente favorire in modo molto importante i fenomeni di adsorbimento da parte dei granuli aerobici. L'esposizione ai FQs provoca inoltre l'indebolimento

strutturale dei granuli, causando la disintegrazione dei granuli più instabili e, provocando di conseguenza, la riduzione del volume del letto di fango. Tale riduzione può tuttavia essere associata anche all'addensamento dei granuli, che diventano più piccoli ma più compatti. Altri autori hanno osservato un comportamento simile (Yi et al., 2006, Duque et al., 2011). Tali autori sostengono che l'esposizione a sostanze tossiche causa, come una strategia difensiva, l'addensamento dei granuli che li protegge dagli effetti inibitori di tali composti (Tay et al., 2005). Quando è stata sospesa l'alimentazione di questi composti, la dimensione media dei granuli aumentò. In conclusione gli autori hanno osservato che la presenza di tali composti non ha avuto effetti significativi sulla rimozione della sostanza organica e sul processo di nitrificazione, mentre effetti negativi sono stati osservati relativamente al processo di rimozione del fosforo, a causa dell'inibizione dei batteri PAOs, e sul processo di denitrificazione, a causa della riduzione delle dimensioni medie dei granuli. I granuli sono stati capaci di rimuovere i FQs ma solo fisicamente, e di conseguenza, essendo l'adsorbimento fisico un fenomeno reversibile, nel momento in cui la perturbazione è venuta meno si è avuto il desorbimento dei composti precedentemente adsorbiti. Infine, l'esposizione a queste sostanze ha determinato sensibili cambiamenti nella morfologia dei granuli, determinandone l'instabilità strutturale e il loro parziale sfaldamento. L'esposizione ai FQs ha infine modificato la comunità microbica all'interno dei granuli, provocando la graduale scomparsa di alcuni ceppi batterici e il proliferare di altri maggiormente resistenti.

Un altro studio per molti versi affine è stato quello condotto da **Moreira et al. (2015)**, relativamente alla rimozione della fluoxetina (antibiotico) e i suoi effetti sulle performance di un sistema a biomassa granulare. Gli autori suddivisero la loro campagna sperimentale in 8 fasi (Tab.3.13). In dettaglio, la prima fu dedicata alla acclimatazione del fango granulare, prelevato da un altro impianto, al nuovo alimento (refluo sintetico a base di acetato di sodio) e al nuovo impianto, mentre dalla seconda in poi nell'alimento è stata aggiunta la fluoxetina, dapprima in continuo, e poi a intermittenza.

**Tab.3.13:** Condizioni operative nel corso della campagna sperimentale (Moreira et al, 2015).

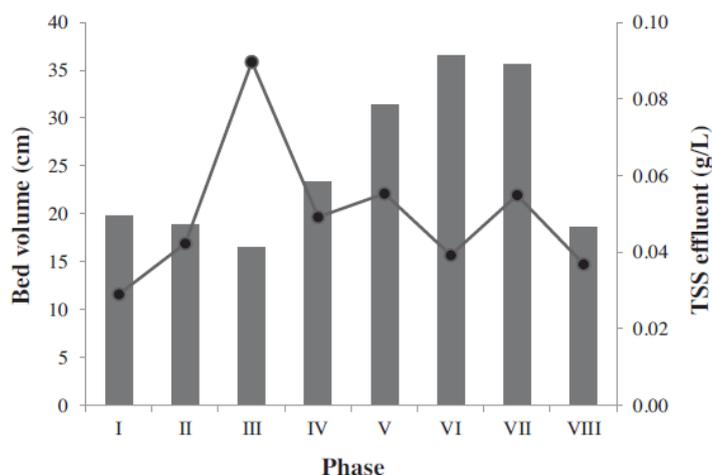
Phase	Length of operation (days)	Days of operation	Cycle time (h)	Inlet acetate concentration (mM)	Inlet FLX concentration ( $\mu\text{M}$ )
I	0-33	34	3	5.9	0
II	34-54	21	12	5.9	4
III	55-62	8	8	5.9	3
IV <sup>a</sup>	63-97	35	6	5.9	3
V	98-105	8	6	5.9	3
VI	106-124	19	6	5.9	0
VII	125-138	14	6	5.9	3
VIII	139-148	10	6	5.9	0

Nel corso della seconda fase l'impianto fu alimentato con una concentrazione di fluoxetina costante di 4  $\mu\text{M}$ ; in questo periodo il rendimento medio di abbattimento fu del 70%, addebitabile in toto a fenomeni di adsorbimento. Durante la terza fase, furono ridotti sia la durata del ciclo che la concentrazione di fluoxetina nell'alimento, al fine di non causare un eccessivo aumento del carico giornaliero. Contrariamente a quanto osservato nella seconda fase, non si osservarono miglioramenti nelle performance di rimozione della fluoxetina. Nella quarta fase, fu interrotta l'alimentazione in continuo della fluoxetina, la quale fu alimentata in discontinuo due giorni alla settimana. Durante questo periodo, la concentrazione di fluoxetina nell'effluente fu maggiore rispetto a quella presente nell'alimento, il che fu addebitato dagli autori a fenomeni di desorbimento dei composti precedentemente adsorbiti. Nelle successive fasi, in particolare nella quinta e settima, la fluoxetina è stata alimentata sempre discontinuamente, alternando quindi periodi di carico a periodi di non alimentazione. Complessivamente i rendimenti di rimozione risultarono dell'8 e 24%. Durante il periodo di non alimentazione, la fluoxetina veniva rilasciata nell'effluente in seguito a fenomeni di desorbimento; il meccanismo prevalente che comportava la rimozione della fluoxetina era dunque di tipo fisico: la fluoxetina veniva adsorbita all'interno dei granuli fin quando la loro capacità adsorbente non si fosse esaurita, e quindi desorbita nel momento in cui la fluoxetina era assente nell'alimento.

**Tab.3.14:** Bilancio di massa della FXL nelle varie fasi (Moreira et al, 2015).

Phase	FLX mass balance (mmol)	
	FLX in the inlet	FLX in the effluent
I	–	–
II	0.37	0.11
III	0.070	0.070
IV	0.31	0.44
V	0.15	0.14
VI	0.00	0.060
VII	0.38	0.29
VIII	0.00	0.080
Total	1.3	1.2

La presenza della fluoxetina non incise in maniera significativa sulla rimozione del COD, che veniva in gran parte rimosso durante il periodo di alimentazione in condizioni anaerobiche. Riguardo il fosforo, gli autori osservarono che nella fase due, si verificò un incremento del rilascio di fosfati durante la fase anaerobica, ma allo stesso tempo un decremento del riassorbimento dei fosfati stessi nella successiva fase aerobica, a causa della presenza della fluoxetina nell'alimento. Nella fase tre, quando la concentrazione di fluoxetina nell'alimento era minore, il rendimento di rimozione del fosforo aumentò nuovamente. Alla fine della fase quattro, quando la fluoxetina veniva alimentata a intermittenza, si osservò un nuovo calo del rendimento, segno quindi che la fluoxetina aveva effetti inibitori sui batteri PAOs. Riguardo l'azoto, sia la concentrazione di ammonio che dei nitriti nell'effluente è stata sempre bassa indicando che il processo di nitrificazione si completava, a eccezione però del secondo periodo, quando la fluoxetina fu alimentata per la prima volta e con la concentrazione maggiore. In tutti gli altri periodi, il principale prodotto della nitrificazione furono i nitrati, che raggiunsero le massime concentrazioni nella quinta e settima fase. Gli autori valutarono inoltre l'effetto della fluoxetina sulle caratteristiche morfologiche dei granuli, monitorando in particolare l'altezza del letto di fango. I risultati ottenuti mostrano che quando la fluoxetina veniva alimentata con continuità, si è osservato un decremento dell'altezza del letto di fango. Tale effetto è stato attribuito in parte alla presenza della fluoxetina nell'alimento ma anche all'eccessiva durata del ciclo (12 ore nella seconda fase). Gli autori osservarono che l'altezza del letto di fango aumentava quando l'alimentazione della fluoxetina veniva sospesa, e allo stesso modo la concentrazione di solidi sospesi nell'effluente diminuiva quando la fluoxetina non era più presente nell'alimento (Fig.3.45).



**Fig.3.45:** Andamento del volume del letto di fango nel tempo. (Moreira et al., 2015)

Nelle fasi due e tre, quando la fluoxetina è stata alimentata in continuo, le performance dell'impianto, soprattutto in termini di rimozione del fosforo, dell'ammonio e dell'aumento dei solidi sospesi nell'effluente si ridussero significativamente. Gli autori dedussero che la fluoxetina aveva avuto effetti tossici nei confronti della biomassa non adattata. Durante la quarta fase, l'applicazione intermittente del carico di fluoxetina favorì il recupero delle performance, che si mantennero invariate anche nelle fasi successive in cui la fluoxetina venne alimentata in continuo seppur solo per alcuni giorni alla settimana. Rispetto ad altri studi, gli autori osservarono che, sebbene in una prima fase i batteri PAOs avessero risentito pesantemente della presenza della fluoxetina (fasi due e tre), in un secondo momento, ovvero quando la fluoxetina venne rialimentata dopo la fase di interruzione, le performance di rimozione del fosforo si mantennero sufficientemente elevate, segno dell'adattamento della comunità microbica allo shock di carico. Riguardo i batteri autotrofi, gli autori osservarono che i batteri AOB risultarono in parte inibiti nella fase due e tre, a causa dell'esposizione alla fluoxetina, mentre non osservarono inibizione dei batteri NOB, come testimoniava l'assenza dei nitriti nell'effluente anche quando la concentrazione di ammonio aumentò. Gli autori attribuirono ciò all'inibizione dei batteri ammonio ossidanti dovuta ai composti organici, circostanza già osservata da altri autori (Hu et al., 2005). Il miglioramento delle performance di nitrificazione fu attribuito dagli autori alla graduale acclimatazione della biomassa alla presenza della fluoxetina.

### 3.10 Trattamento di reflui prodotti da birrifici

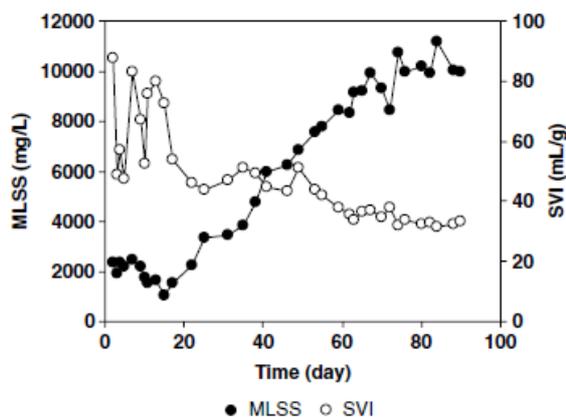
Tra le tante applicazioni relative al trattamento dei reflui industriali, si riporta lo studio condotto da **Wang et al. (2007)** relativamente al trattamento di reflui prodotti da birrifici. Tale tema sarà successivamente approfondito nel capitolo sperimentale, in quanto il trattamento dei reflui prodotti dai birrifici è oggetto di discussione in questa tesi. I reflui prodotti dai birrifici sono caratterizzati da diverse problematiche relative principalmente alla loro composizione. Il processo di produzione della birra, essendo un processo fermentativo, produce infatti effluenti caratterizzati da valori di pH molto bassi, prossimi se non talvolta inferiori a 5. Contestualmente, il carico organico è molto elevato, con valori del COD nell'ordine dei 1500-5000 mg L<sup>-1</sup> (**Filladeau et al., 2006; Liu et al., 2002**). Tuttavia ciò che rende complesso il trattamento di tali reflui è la mancanza di nutrienti che risultano essere presenti in concentrazioni limitanti lo sviluppo dei batteri eterotrofi. Inoltre, la sostanza organica è per lo più costituita da substrati lentamente biodegradabili, che richiedono elevati tempi di ritenzione idraulica per la loro idrolisi prima e la loro successiva degradazione da parte dei batteri eterotrofi. Nello studio condotto da **Wang et al. (2007)**, al fine di consentire lo sviluppo dei batteri eterotrofi, sono stati aggiunti azoto e fosforo con un rapporto rispetto al COD di 100:10:1, in modo che la loro concentrazione non risultasse limitante per il loro metabolismo. Per la sperimentazione gli autori utilizzarono un impianto SBR del volume di 8,6 L, operante durante la fase di coltivazione con tempi di sedimentazione progressivamente minori, al fine di evitare massicci dilavamenti di biomassa, secondo le condizioni operative riportate in Tabella 3.15. Al fine di evitare shock dovuti ai bassi valori del pH, al refluo veniva addizionata una nota quantità di bicarbonato di sodio al fine di portare il pH su valori prossimi alla neutralità.

**Tab.3.15:** Condizioni operative (**Wang et al, 2007**).

Stage	Run 1	Run 2	Run 3
Fill (min)	25	25	25
Anaerobic no-mix (min)	25	15	15
Aeration (min)	290	304	308
Settling (min)	18	8	4
Decant (min)	2	2	2
Idle (min)	–	6	6
Total cycle duration (min)	360	360	360

Gli autori ottennero la completa granulazione del fango attivo in circa 9 settimane, al termine delle quali la concentrazione dei solidi sospesi nel reattore era pari a

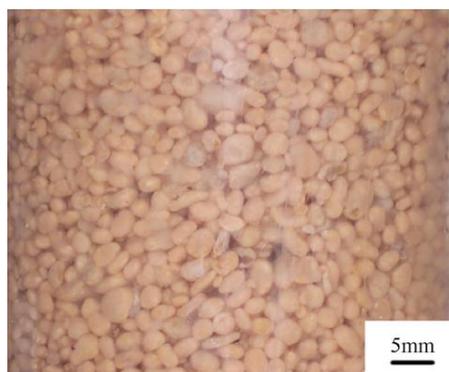
circa  $10 \text{ g L}^{-1}$ , e i granuli esibivano eccellenti caratteristiche di sedimentabilità, con valori dello SVI inferiori ai  $40 \text{ mL gSST}^{-1}$  (Fig. 3.46).



**Fig.3.46:** Andamento della concentrazione dei solidi sospesi nella miscela aerata e dello SVI. (Wang et al., 2007).

Dal punto di vista morfologico i granuli di presentavano in forma densa e compatta con una superficie liscia e molto regolare. Microbiologicamente gli strati interni erano dominati da batteri a bastoncini, mentre nella superficie proliferavano batteri filamentosi e funghi.

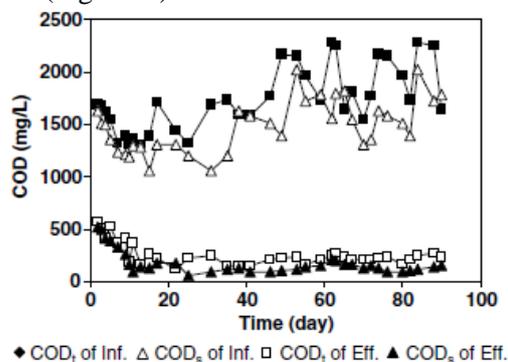
In Figura 3.47 è riportata un'immagine del fango granulare al termine del periodo di coltivazione.



**Fig.3.47:** Fotografia del fango granulare al termine del periodo di coltivazione. (Wang et al., 2007).

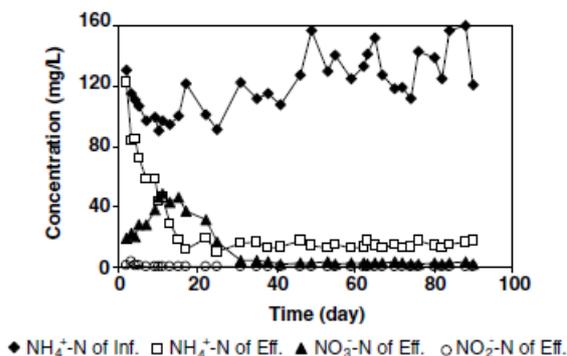
Lo  $SVI_5$  al termine della coltivazione era pari a  $32 \text{ mL gSST}^{-1}$ , a testimonianza delle eccellenti caratteristiche di sedimentabilità dei granuli.

Il carico volumetrico alimentato era pari a  $3,5 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$ . I rendimenti di rimozione del COD nel corso delle prime settimane si mantennero nell'ordine del 60%, e furono necessarie circa 4 settimane affinché le rese depurative superassero l'80%. In condizioni stazionarie i rendimenti di rimozione del COD erano prossimi al 90%, sia per il totale che per il solubile e la concentrazione di COD totale allo scarico era prossima ai  $250 \text{ mg L}^{-1}$ , mentre quella del COD solubile era di poco superiore ai  $200 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 3.48).



**Fig.3.48:** Andamento delle concentrazioni e dei rendimenti sul COD totale e solubile. (Wang et al., 2007).

L'azoto invece veniva rimosso per nitrificazione e denitrificazione simultanea, con rese nell'ordine del 90% (Fig. 3.49).



**Fig.3.49:** Andamento delle concentrazioni e dei rendimenti dell'azoto totale e delle sue forme. (Wang et al., 2007).

I risultati ottenuti da Wang et al. (2007) dimostrano come i fanghi granulari ben si prestano anche al trattamento di reflui complessi come quelli generati dai birrifici.

### 3.11 Bibliografia

- Abdullah, N., Yuzir, A., Curtis, T.P., Yahya, A., Ujang, Z., 2013. Characterization of aerobic granular sludge treating high strength agro-based wastewater at different volumetric loadings. *Bioresource Technology* 127, 181-187.
- Abualhail, S., Naseer, R., Lu, X.W., 2010. Demonstration case of petrochemical wastewater treatment plant. *Am. J. Environ. Sci.* 6, 295–298.
- Adav, S.S., Chen, M.Y., Lee, D.J., Ren, N.Q., 2007. Degradation of phenol by aerobic granules and isolated yeast *Candida tropicalis*, *Biotechnol. Bioeng.* 96, 844-852.
- Adav, S., Lee, D.J., Show, K.Y., Tay, J.H., (2008). Aerobic granular sludge: Recent advances. *Biotechnology Advances* 26, 411-423.
- Adav, S.S., Lee, D.J., Lai, J.Y., 2010. Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1601-1610.
- Amorim, C.L., Maia, A.S., Mesquita, R.B.R., Rangel, A.O.S.S., van Loosdrecht, M.C.M., Tiritan, M.E., Castro, P.M.L., 2014. Performance of aerobic granular sludge in a sequencing batch bioreactor exposed to ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin. *Water Research* 50, 101-113.
- Bassin, J.P., Pronk, M., Kraan, R., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2011a. Ammonium adsorption in aerobic granular sludge, activated sludge and anammox granules. *Water Res.* 45, 5257-5265.
- Bassin, J.P., Pronk, M., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Dezotti, M., Van Loosdrecht, M.C.M., 2011b. Effect of elevated salt concentrations on the aerobic granular sludge process: Linking microbial activity with microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 77(22), 7942-7953.
- Bolong N., Ismail A.F., Salim M.R., Matsuura T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239, 229-246.
- Bremer, E., 2000. Coping with osmotic challenges, osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. *Bacterial Stress Responses.*, 79–97.
- Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Sanchez, M., Mendez, R., Lema, J.M., 2002. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Res.* 36 (10), 2555–2560.
- Carucci, A., Milia, S., Cappai, G., Muntoni, A., 2010. A direct comparison amongst different technologies (aerobic granular sludge, SBR and MBR) for the treatment of wastewater contaminated by 4-chlorophenol. *Journal of Hazardous Materials* 177, 1119-1125.

- Carucci, A., Milia, S., De Gioannis, G., Piredda, M., 2008. Acetate-fed aerobic granular sludge for the biodegradation of chlorinated phenols. *Water Science and Technology* 58 (2), 309-315.
- Carucci, A., Milia, S., De Gioannis, G., Piredda, M., 2009. Acetatefed aerobic granular sludge for the degradation of 4- chlorophenol. *Journal of Hazardous Materials* 166, 483-490.
- Chen, G.H., Wong, M.T., 2004. Impact of increased chloride concentration on nitrifying-activated sludge cultures. *J. Environ.Eng.-ASCE* 130 (2), 116–125.
- Chudoba, J., Grau, P., Ottova´, V., 1973. Control of activated-sludge
- Csonka, L.N., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53, 121–147.
- Cui, Y., Peng, Y., Ye, L., 2009. Effects of salt on microbial populations and treatment performance in purifying saline sewage using the MUCT process. *Clean* 37:649–656.
- Dahl, C., Sund, C., Kristensen, G.H., Vredendregt, L., 1997. Combined biological nitrification and denitrification of highsalinitywastewater. *Water Sci. Technol.* 36 (2–3), 345–352.
- De Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., 2005. Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 90 (6), 761-769.
- De Kreuk, M. K., Picioreanu, C., Hosseini, M., Xavier, J. B. and van Loosdrecht, M. C. M., 2007. Kinetic model of a granular sludge SBR: Influences on nutrient removal. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4), 801-815.
- De Kreuk, M., Kishida, N., Tsuneda, S., van Loosdrecht, M.C.M., 2010. Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. *Water Research*, 44, 5929-5938.
- Delgado, S., Diaz, F., Garcia, D., Otero, N., 2003. Behaviour of inorganic coagulants in secondary effluents from a conventional wastewater treatment plant. *Filtr. Sep.* 40(7), 42–46.
- Di Bella, G., Giustra, M.G., Freni, G., 2014. Optimisation of coagulation/flocculation for pre-treatment of high strength and saline wastewater: Performance analysis with different coagulant doses. *Chemical Engineering Journal* 254, 283-292.
- Di Bella, G., Torregrossa, M., 2013. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. *Bioresource Technology* 142, 706-713.
- Di Bella, G., Torregrossa, M., 2014. Aerobic granular sludge for leachate treatment, pp. 493-498. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 493-498.
- Dincer, A.R., Kargi, F., 1999. Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater. *Environ. Technol.* 20 (11), 1147–1153.
- Dincer, A.R., Kargi, F., 2001. Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater. *Process Biochem.* 36 (8–9), 901–906.

- Doudoroff, M., 1940. Experiments on the adaptation of *E. coli* to sodium chloride. *J. Gen. Physiol.*, 23, 585–590.
- Duque, A. F., Bessa, V.S., Carvalho, M.F., de Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M., Castro, P.M.L., 2011. 2-Fluorophenol degradation by aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Research* 45(20), 6745–6752.
- Figuroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R., 2008. Treatment of saline wastewater in SBR aerobic granular reactors, *Water Science and Technology* 58, 479–485.
- Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P., Daufin, G., 2006. Water, wastewater and waste management in brewing industries. *Journal of Cleaner Production* 14, 463–471.
- Gai, L.H., Wang, S.G., Gong, W.X., Liu, X.W., Gao, B.Y., Zhang, H.Y., 2008. Influence of pH and ionic strength on Cu(II) biosorption by aerobic granular sludge and biosorption mechanism. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83(6), 806–813.
- Gao, D.W., Peng, Y.Z., Li, B., Liang, H., 2009. Shortcut nitrification-denitrification by real-time control strategies. *Bioresour. Technol.* 100, 2298–2300.
- Haggbloom, M.M., 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *Microbiology Reviews* 103, 29–72.
- Hailei, W., Guangli, Y., Guosheng, L., Feng, P., 2006. A new way to cultivate aerobic granules in the process of papermaking wastewater treatment. *Biochem. Eng. J.* 28, 99–103.
- Hochstein, L.I., Tomlinson, G.A., 1985. Denitrification by extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 27 (3), 329–331.
- Hu, Z., Ferraina, R.A., Ericson, J.F., Mackay, A.A., Smets, B.F., 2005. Biomass characteristics in three sequencing batch reactors treating a wastewater containing synthetic organic chemicals, *Water Research* 39, 710–720.
- Ingram, M., 1940. The influence of sodium chloride and temperature on the endogenous respiration of *Bacillus cereus*. *J. Gen. Physiol.* 23, 773–778.
- Ismail S.B., de La Parra, C.J., Temmink, H., van Lier, J.B. (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors operated under high salinity conditions. *Water Res* 44(6), 1909–1917.
- Iwai, N., Sakai, R., Tsuchida, S., Kitazume, M., Kitazume, T., 2009. Screening of fluorinated materials degrading microbes. *J. Fluorine Chem.* 130, 434–437.
- Jiang, H.L., Tay, J.H., Tay, S.T.L., 2002. Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol, *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 439–445.

- Juang, Y.C., Adav, S.S., Lee, D.-J., Tay, J.H., 2010. Stable aerobic granules for continuous-flow reactors: precipitating calcium and iron salts in granular interiors. *Bioresource Technology* 101 (21), 8051-8057.
- Jungles, M. K., Figueroa, M., Morales, N., Val del Río, Á., da Costa, R. H. R., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., 2011., Start up of a pilot scale aerobic granular reactor for organic matter and nitrogen removal. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86 (5), 763-768.
- Karahan, O., Martins, A., Orhon, D., Van Loosdrecht, M.C.M., 2006. Experimental evaluation of starch utilization mechanism by activated sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 93 (5), 964e970.
- Kargi, F., Dincer, A.R., 1997. Biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69 (2), 167–172.
- Kargi, F., Dincer, A.R., Pala, A., 2000. Characterization and biological treatment of pickling industry wastewater. *Bioprocess Eng.* 23 (4), 371–374.
- Key B.D., Howell R.D., Criddle C.S., 1997. Fluorinated Organics in the Biosphere. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2445-2454.
- Kincannon, D.F., Gaudy, A.F., 1966. Some effects of high salt concentrations on activated sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* 38 (7), 1148–1159.
- Kincannon, D.F., Gaudy, A.F., 1968. Response of biological waste treatment systems to changes in salt concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 10, 483–496.
- Kubo, M., Hiroe, J., Murakami, M., Fukami, H., Tachiki, T., 2001. Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. *J. Biosci. Bioeng.* 91 (2), 222–224.
- Kümmerer K., 2009a. Antibiotics in the aquatic environment: A review – Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.
- Larsen T.A., Lienert J., Joss A., Siegrist H., 2004. How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Biotechnology* 113, 295-304.
- Larsson, D.G.J., De Pedro, C., Paxeus, N., 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* 148(3), 751-755.
- Lee, B.B., Choo, K.H., Clang, D., Choi, S.J., 2009. Optimizing the coagulant dose to control membrane fouling in combined coagulation/ultrafiltration systems for textile wastewater reclamation. *Chem. Eng. J.* 155, 101-107.
- Lefebvre, O., Habouzit, F., Bru, V., Delgenes, J.P., Godon, J.J., Moletta, R., 2004. Treatment of hypersaline industrial wastewater by a microbial consortium in a sequencing batch reactor. *Environ. Technol.* 25 (5), 543–553.
- Lefebvre, O., Moletta, R., 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Research* 40(20), 3671-3682.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Torrijos, M., Thanasekaran, K., Moletta, R., 2005. Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 39 (8), 1471–1480.

- Liu, L., Sheng, G. P., Li, W. W., Tong, Z. H., Zeng, R. J., Liu, J. X., Yu, H. Q., 2011. Cultivation of aerobic granular sludge with a mixed wastewater rich in toxic organics. *Biochemical Engineering Journal*, 57(1), 7-12.
- Liu, Q.S., Liu, Y., Show, K.Y., Tay, J.H., 2009. Toxicity effect of phenol on aerobic granules, *Environ. Technol.* 30, 69-74.
- Liu, Q.S., Liu, Y., Show, K.Y., Tay, J.H., 2009. Toxicity effect of phenol on aerobic granules. *Environmental Technology* 30(1), 69-74.
- Liu, Y., Liu, Q.S., 2006. Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Biotechnol Adv* 24, 115–127.
- Liu, Y.; Yang, S.F.; Xu, H.; Woon, K.H.; Lin, Y.M. & Tay, J.H. (2003). Biosorption kinetics of cadmium (II) on aerobic granular sludge. *Process Biochemistry*, 38, 997-1001.
- Liu, W.T., Chan, O.C., Fan, H.H.P., 2012. Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Research* 36, 1767–1775.
- Lozach, E., 2001. Salt and micro-organisms Maisons-Alfort: Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, pp. 98 (in French).
- Ludzack, F.J., Noran, P.K., 1965. Tolerance of high salinities by conventional wastewater treatment process. *J. Water Pollut. Control Fed.* 37 (10), 1404–1416.
- Ludzack, F.J., Noran, P.K., 1965. Tolerance of high salinities by conventional wastewater treatment process *J. Water Pollut. Control Fed.*, 37(10), 1404–1416
- Ma, C., Jin, R.C., Yang, G.F., Yu, J.J., Xing, B.S., Zhang, Q.Q., 2012. Impacts of transient salinity shock loads on Anammox process performance, *Bioresour. Technol.* 112, 124–130.
- Mancini, G., Cappello, S., Yakimov, M.M., Polizzi, A., Torregrossa, M., 2010. Biological approaches to the treatment of saline oily waste(waters) originated from marine transportation. *Chem. Eng. Trans.* 27, 37–42.
- MARPOL 73/78. International Maritime Organization's regulation Prevention of Air Pollution from Ships. IMO MARPOL 73/76, 1997.
- Martins, A.M.P., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., 2003. Effect of feeding pattern and storage on the sludge settleability under aerobic conditions. *Water Research* 37, 2555-2570.
- McCarty, P.L., 1997. *Aerobic Cometabolism of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons*, Subsurface Restoration, Ann Arbor Press, MI, USA.
- Measures, J.C., 1975. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* 257, 398–400.
- Metcalf & Eddy, 2006. 4th ed. *Ingegneria delle acque reflue. Trattamento e riuso*. Milano: The McGraw-Hill Companies.

- Moon, B. H., Seo, G. T., Lee, T. S., Kim, S. S. & Yoon, C. H., 2003. Effects of salt concentration on floc characteristics and pollutants removal efficiencies in treatment of seafood wastewater by SBR. *Water Sci. Technol.* 47(1), 65–70.
- Moreira, I.S., Amorim, C.L., Ribeiro, A.R., Mesquita, R.B.R., Rangel, A.O.S.S., van Loosdrecht, M.C.M., Tiritan, M.E., Castro, P.M.L., 2015. Removal of fluoxetine and its effects in the performance of an aerobic granular sludge sequential batch reactor. *Journal of Hazardous Materials* 287, 93-101.
- Mosquera-Corral, A., de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., (2005). Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Research* 39, 2676–2686.
- Murphy, C.D., Clark, B.R., Amadio, J., 2009. Metabolism of fluoroorganic compounds in microorganisms: impacts for the environment and the production of fine chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 617-629.
- Ng, H.Y., Ong, S.L., Ng, W.J., 2005. Effects of sodium chloride on the performance of a sequencing batch reactor. *J. Environ. Eng- ASCE* 131 (11), 1557–1564.
- Ohwada, T., Sagisaka, S., 1987. An immediate and steep increase in ATP concentration in response to reduced turgor pressure in *Escherichia coli* B. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 259 (1), 157-163.
- Oren, A., Gurevich, P., Malkit, A., Henis, Y., 1992. Microbial degradation of pollutants at high salt concentrations. *Biodegradation* 3(2-3), 387–398.
- Panswad, T., Anan, C., 1999. Impact of high chloride wastewater on an anaerobic/anoxic/aerobic process with and without inoculation of chloride acclimated seeds. *Water Res.* 33 (5), 1165–1172.
- Pendashteh, A.R., Abdullah, L.C., Fakhru'L-Razi, A., Madaeni, S.S., Zainal Abidin, Z., Awang Biak, D.R., 2012. Evaluation of membrane bioreactor for hypersaline oily wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection* 90(1), 45-55.
- Pernetti, M., Di Palma, L., 2005. Experimental evaluation of inhibition effects of saline wastewater on activated sludge. *Environ. Technol.* 26 (6), 695–703.
- Pijuan, M., Ye, L., Yuan, Z., 2011. Could nitrite/free nitrous acid favour GAOs over PAOs in enhanced biological phosphorus removal systems? *Water Sci. Technol.* 63:345–351.
- Pomati F., Castiglioni S., Zuccato E., Fanelli R., Rossetti C., Calamari D., 2006. Effects of environmental contamination by therapeutic drugs on human embryonic cells. *Environmental Science and Technology* 40, 2442-2447.
- Pronk, M., Bassin, J.P., De Kreuk, M.K., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M.C.M., 2014. Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(3), 1339-1348.
- Ren, T.-T., Liu, L., Sheng, G.-P., Liu, X.-W., Yu, H.-Q., Zhang, M.-C., Zhu, J.-R., 2008. Calcium spatial distribution in aerobic granules and its effects on

- granule structure, strength and bioactivity. *Water Research* 42 (13), 3343-3352.
- Saito, T., Brdjanovic, D., Van Loosdrecht, M.C.M., 2004. Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Res.* 38:3760–3768.
- Salem, S., Berends, D. H. J. G., Heijnen, J. J. and Van Loosdrecht, M. C. M., 2003. Bio-augmentation by nitrification with return sludge. *Water Research*, 37(8), 1794-1804.
- Salvado, H., Mas, M., Menendez, S., Gracia, M.P., 2001. Effects of shock loads of salt on protozoan communities of activated sludge. *Acta. Protozool.* 40 (3), 177–185.
- Sanchez, O., Aspe, E., Marti, M. C., Roeckel, M., 2004 The effect of sodium chloride on the two-step kinetics of the nitrifying process. *Water Environ. Res.* 76, 73–80.
- Santo, C.E., Vilar, J.P., Botelho, M.S., Bhatnagar, A., Kumar, E., Boaventura, A.R., 2012. Optimization of coagulation–flocculation and flotation parameters for the treatment of a petroleum refinery effluent from a Portuguese plant. *Chem. Eng. J.* 183, 117-123.
- Sarkar, B., Chakrabarti, P.P., Vijaykumar, A., Kale, V., 2006. Wastewater treatment in dairy industries: possibility of reuse. *Desalination* 195, 141-152.
- Schwarzenbeck, N., Erley, R., Mc Swain, B.S., Wilderer, P.A., Irvine, R.L., 2004. Treatment of malting wastewater in a granular sludge sequencing batch reactor (SBR). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 32(1), 16-24.
- Schmidt, J.E., Ahring, B.K., 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors, *Biotechnol. Bioeng.* 49, 229-246.
- Shao, L.M., He, P.J., Li, G.J., 2008. In situ nitrogen removal from leachate by bioreactor landfill with limited aeration. *Waste Manage.* 28, 1000–1007.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., Li, X.-Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* 28, 882-894.
- Stewart, M.J., Ludwig, H.F., Kearns W.H., 1962. Effects of varying salinity on the extended aeration process. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 34, 1161–1177.
- Sun, C., Leiknes, T., Weitzenböck, J., Thorstensen, B., 2010. Salinity effect on a biofilm-MBR process for shipboard wastewater treatment. *Separation and Purification Technology* 72(3), 380-387.
- Sun, X.-F., Wang, S.-G., Liu, X.-W., Gong, W.-X., Bao, N., Gao, B.-Y., Zhang, H.-Y., 2008. Biosorption of Malachite Green from aqueous solutions onto aerobic granules: kinetic and equilibrium studies. *Bioresour. Technol.* 99, 3475-3483.
- Taheri, E., Khiadani Hajian, M.H., Amin, M.M., Nikaeen, M., Hassanzadeh, A., 2012. Treatment of saline wastewater by a sequencing batch reactor with emphasis on aerobic granule formation. *Bioresource Technology* 111, 21-26.

- Tay, J.H., Pan, S., He, Y., Tay, S.T.L., 2004. Effect of organic loading rate on aerobic granulation II: characteristics of aerobic granules. *Journal of Environmental Engineering* 130 (10), 1102-1109.
- Tay, J.H.; Liu, Q.S. & Liu, Y., 2001. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 168-175.
- Tay, S.T.L., Moy, B.Y.P., Jiang, H.L., Tay, J.H., 2005. Rapid cultivation of stable phenol degrading granules using acetate fed granules as microbial seed. *Journal of Biotechnology* 115, 387e395.
- Uygur, A., Kargi, F., 2004. Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 34, 313–318.
- Uygur, A., Kargi, F., 2004. Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 34 (3–4), 313–318.
- Val del Río, A., Figueroa, M., Arrojo, B., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., García-Torriello, G. and Méndez, R., 2012. Aerobic granular SBR systems applied to the treatment of industrial effluents. *Journal of Environmental Management* 95(SUPPL.), S88-S92.
- Val del Río, A., Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R., 2013. Stability of aerobic granular biomass treating the effluent from a seafood industry. *International journal of Environmental Research* 7(2), 265-276.
- Verma, S., Prasad, B., Mishra, I.M., 2010, Pretreatment of petrochemical wastewater by coagulation and flocculation and the sludge characteristics. *J. Hazard. Mater.* 178, 1055-1064.
- Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Liu, X., Sun, S., Chen, C., 2014. Partial nitrification of wastewaters with high NaCl concentrations by aerobic granules in continuous-flow reactor. *Bioresource Technology* 152, 1-6.
- Wang, L.H., He, Y., Gao, Y., Wu, J.E., Dong, Y.H., He, C., Wang, S.X., Weng, L.X., Xu, J.L., Tay, L., Fang, R.X., Zhang, L.H., 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol. Microbiol.* 51, 903-912.
- Wang, J.F., 2006. Nitrogen and phosphorous removal of aerobic granules and Granules Membrane Bioreactor Dissertation (in Chinese). Tianjin University, Tianjin.
- Wang, S.G., Liu, X.W., Gong, W.X., Gao, B.Y., Zhang, D.H., Yu, H.Q., 2007. Aerobic granulation with brewery wastewater in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* 98(11), 2142-2147.
- Wang, F., Lu, S., Wei, Y.J., Ji, M., 2009. Characteristics of aerobic granule and nitrogen and phosphorus removal in a SBR. *J. Hazard. Mater.* 164, 1223–1227.

- Wang, Z., Gao, M., She, Z., Wang, S., Jin, C., Zhao, Y., Yang, S., Guo, L., 2015. Effect of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor. *Separation and Purification Technology* 144, 223-231.
- Wei Y., Ji M., Li R., Qin F., 2012. Organic and nitrogen removal from landfill leachate in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Waste Management* 32, 448-455.
- Woolard, C.R., Irvine, R.L., 1994. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environ. Res.* 66 (3), 230-235.
- Woolard, C.R., Irvine, R.L., 1995. Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Res.* 29 (4), 1159-1168.
- Xavier, J., Dekreuk, M., Picioreanu, C., Van Loosdrecht, M.C.M., 2007. Multi-scale individual-based model of microbial and bioconversion dynamics in aerobic granular sludge. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6410-6417.
- Xu, H. & Liu, Y. (2008). Mechanisms of Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> biosorption by aerobic granules. *Separation and Purification Technology*, 58, 400-411.
- Yang, S. F., Li, X. Y. and Yu, H. Q., 2008. Formation and characterisation of fungal and bacterial granules under different feeding alkalinity and pH conditions. *Process Biochemistry* 43(1), 8-14.
- Yang, S.F., Tay, J.-H. and Liu, Y., 2004. Inhibition of free ammonia to the formation of aerobic granules. *Biochemical Engineering Journal*, 17(1), 41-48.
- Yao, L.; Ye, Z.F.; Wang, Z.Y. & Ni, J.R. (2008). Characteristics of Pb<sup>2+</sup> biosorption with aerobic granular biomass. *Chinese Science Bulletin*, 53, 948-953.
- Yi, S., Zhuang, W.-Q., Wu, B., Tay, S.T.-L., Tay, J.-H., 2006. Biodegradation of p-nitrophenol by aerobic granules in a sequencing batch reactor. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2396-2401.
- Zahran, H., 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils* 25 (3), 211-223.
- Zhang, B., Min, J., Zhigang, Q., Huina, L., Jingfeng, W., Junwen, L., 2011. Microbial population dynamics during sludge granulation in an anaerobic-aerobic biological phosphorus removal system. *Bioresource Technology* 102, 2474-2480.
- Zhang, H., He, Y., Jiang, T., Yang, F., 2011. Research on characteristics of aerobic granules treating petrochemical wastewater by acclimation and co-metabolism methods. *Desalination* 279(1-3), 69-74.
- Zhao, L.J., Ma, F., Guo, J.B., Zhao, Q.L., 2007. Petrochemical wastewater treatment with pilot-scale bioaugmented biological treatment system. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 8, 1831-1838.
- Zheng, Y.M., Yu, H.Q., Liu, S.H., Liu, X.Z., 2006. Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere* 63, 1791-1800.



## Capitolo 4

# La granulazione in impianti a flusso continuo

### 1.1 Introduzione

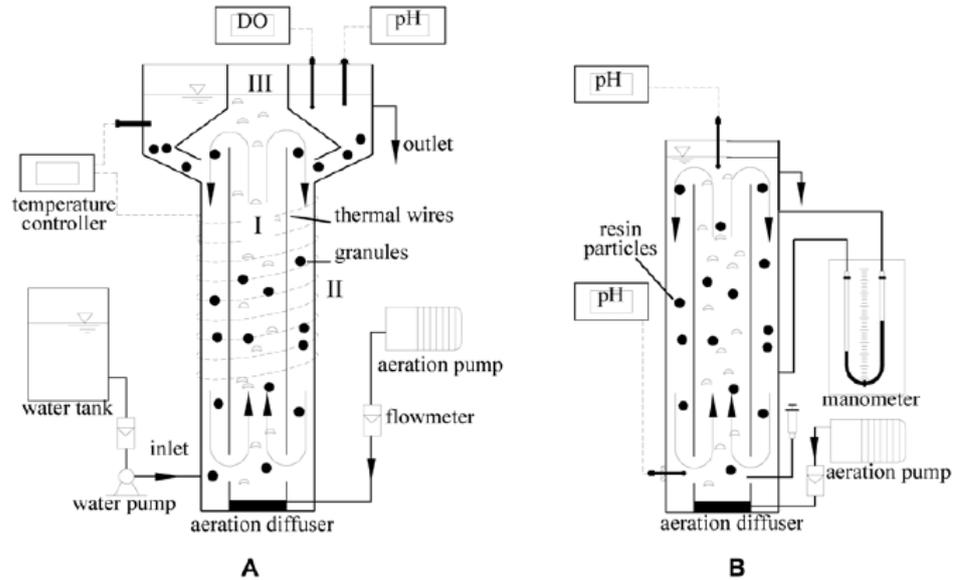
Nei tre precedenti capitoli si è discusso del fenomeno della granulazione aerobica e delle sue applicazioni, in impianti operanti con flusso discontinuo. Recentemente la ricerca scientifica si è orientata verso la ricerca di soluzioni impiantistiche differenti, volte principalmente al superamento di alcune problematiche tipiche degli impianti operanti in batch. Nel seguito di questo capitolo verrà analizzato lo stato dell'arte della tecnologia del fango granulare in impianti a flusso continuo.

### 5.1 La granulazione in impianti a flusso continuo

Il processo della granulazione aerobica è un fenomeno molto complesso che richiede il verificarsi in maniera simultanea di una serie di fattori favorevoli all'auto-immobilizzazione delle cellule batteriche. Il primo caso di formazione di fango granulare è stato ottenuto in un reattore aerobico a letto di fango (**Mishima e Nakamura, 1991**); da allora la maggiorparte, se non la totalità degli studi sulla granulazione aerobica sono stati condotti in impianti SBR. Moltissimi autori hanno evidenziato negli anni che le condizioni favorevoli per la formazione e il mantenimento strutturale dei granuli si verificavano o erano facilmente controllabili in impianti a flusso discontinuo. L'alternanza di condizioni di abbondanza/carenza di substrato, la selezione idraulica, gli sforzi di taglio e la ciclicità delle fasi sono infatti al contempo prerogative degli impianti SBR che requisiti necessari per la granulazione del fango attivo (**Tay et al., 2001; Liu e Tay, 2007, Hu et al., 2005**). Tali condizioni in impianti a flusso continuo vengono meno contemporaneamente, pertanto la granulazione in suddetti impianti risulta essere una sfida dall'esito scontato. In letteratura non mancano, tuttavia, esperienze di granulazione in impianti a flusso continuo. Interessanti e approfonditi studi a riguardo sono stati condotti negli ultimi anni da **Zhou et al. (2014)**.

In uno di questi (**Zhou et al., 2013**) gli autori hanno studiato il processo di granulazione in un impianto a flusso continuo in assenza di alcuni di quei fattori ritenuti essere decisivi per la granulazione e prerogativa degli impianti SBR, quali l'alternanza di fasi feast/famine e la pressione di selezione idraulica. Nel loro lavoro gli autori hanno dato peso dunque solamente gli sforzi idrodinamici.

L'impianto (A) era costituito da due cilindri coassiali funzionanti rispettivamente come riser (I) e downcomer (II), e da un elemento tronco conico che impediva ai granuli di giungere presso la zona di scarico dell'effluente forzandone il moto verso il basso. Il volume totale del reattore era di 5,6 L (Fig. 4.1).



**Fig.4.1:** Schema dell'impianto granulare a flusso continuo (A); schema dell'impianto per lo studio idrodinamico (B). (Zhou et al., 2013)

L'unica forzante del processo di granulazione in questo impianto erano gli sforzi di taglio (espressi in Newton e non in  $\text{cm sec}^{-1}$ ) che gli autori hanno quantificato mediante la seguente equazione (4.1), in funzione del coefficiente di attrito  $C_D$ , della densità del liquido  $\rho_l$ , del diametro del granulo  $d_p$  e della velocità relativa tra i granuli e il liquido  $u_r$ :

$$F = \frac{1}{2} C_D \rho_l \frac{\pi d_p^2}{4} u_r^2 \quad [eq. 4.1]$$

Dove  $C_D$  è il coefficiente di attrito tra i granuli e il liquido, che è funzione del numero di Reynolds del granulo, calcolabile mediante l'equazione 4.2.

$$C_D = \frac{24}{(Re)_p} [1 + 0,173(Re)_p^{0,657}] + \frac{0,413}{1 + 16,3(Re)_p^{-1,09}} \quad [eq. 4.2]$$

Il numero di Reynolds a sua volta è funzione della densità del liquido  $\rho_L$  (secondo l'equazione 4.3), della velocità relativa tra i granuli e il liquido e della viscosità dello stesso  $\mu_l$ .

$$Re_p = \frac{d_p u_r \rho_l}{\mu_l} \quad [eq. 4.3]$$

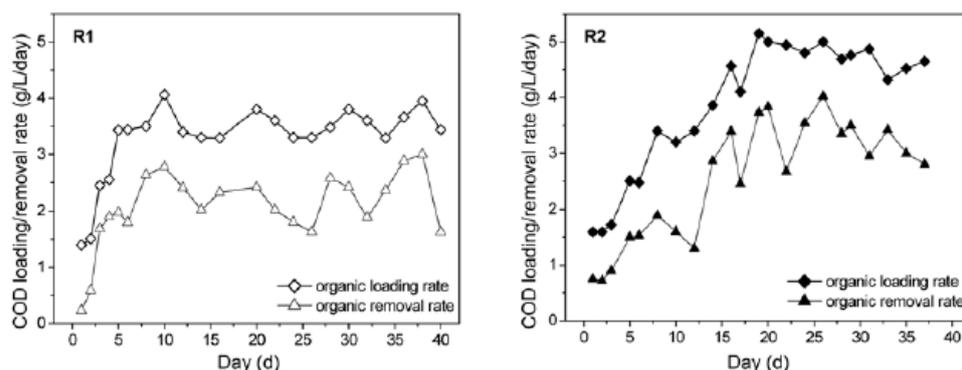
A tale impianto gli autori ne affiancarono un altro a configurazione SBAR, utilizzato nella maggiorparte degli studi sui fanghi granulari (B), al fine di confrontare l'intensità degli sforzi di taglio. Dal punto di vista costruttivo i reattori erano identici a meno del comparto III. Gli sforzi di taglio sono stati calcolati utilizzando l'equazione 4.4:

$$F' = \frac{1}{2} C_D \rho_g \frac{\pi d_p^2}{4} u_{ng}^2 \quad [eq. 4.4]$$

Dove  $u_{ng}$  è la velocità del flusso ascensionale d'aria e gli altri parametri hanno lo stesso significato delle precedenti equazioni.

L'impianto fu stato inoculato con fango attivo e alimentato con refluo civile (COD=150-650 mg L<sup>-1</sup>). La concentrazione di solidi fu mantenuta pari a 4-4,5 gSST/L al fine di evitare possibili occlusioni nel settore III. L'età del fango era di circa 8-10 giorni. La velocità superficiale del flusso d'aria all'interno del riser era pari a 14 mm sec<sup>-1</sup>. La portata alimentata era di 2,8 L h<sup>-1</sup>, quindi il tempo di ritenzione idraulica era di 2 ore.

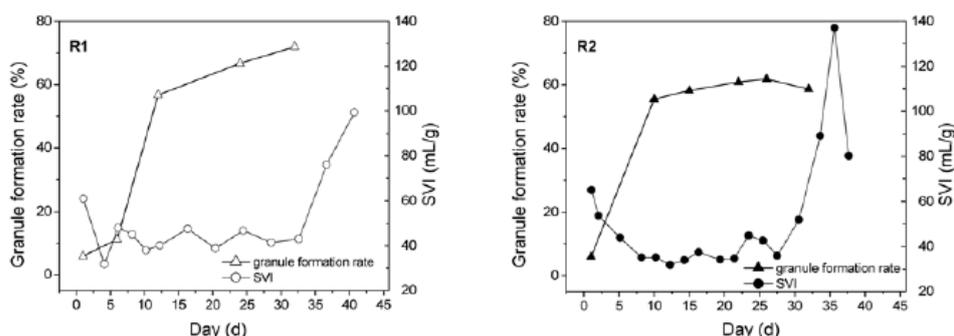
I rendimenti di rimozione del COD furono superiori al 90%, paragonabili a quelli ottenuti da altri autori (Ni et al., 2009) in impianti SBR che trattavano reflui civili. In particolare gli autori osservarono che al crescere del carico influente anche i rendimenti di rimozione aumentavano (Fig. 4.2).



**Fig.4.2:** Andamento del tasso di rimozione del COD e del carico organico nei due reattori (Zhou et al., 2013)

I rendimenti di rimozione dell'azoto invece sono stati modesti. In particolare, l'azoto ammoniacale veniva del tutto ossidato ad azoto nitrico, che tuttavia non veniva denitrificato.

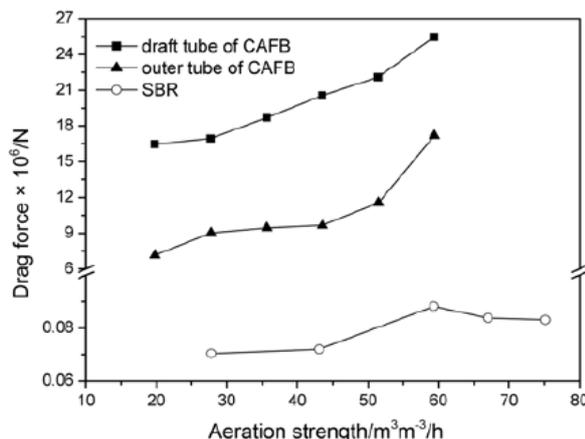
Gli autori osservarono i primi granuli in entrambi i reattori a partire dal 4° giorno. Il tasso di granulazione, valutato come percentuale di aggregati con diametro superiore a 350  $\mu\text{m}$ , aumentò fino al 55% al 12° giorno. Contestualmente, i valori di SVI diminuirono fino a 40 e 35  $\text{mL gSST}^{-1}$ , negli impianti A e B rispettivamente. Il tasso di granulazione aumentò, quindi, fino al 79% (A) e 58,6% (B), al 32° giorno (Fig. 4.3).



**Fig.4.3:** Andamento del tasso dello SVI e del tasso di formazione dei granuli nei due reattori (Zhou et al., 2013)

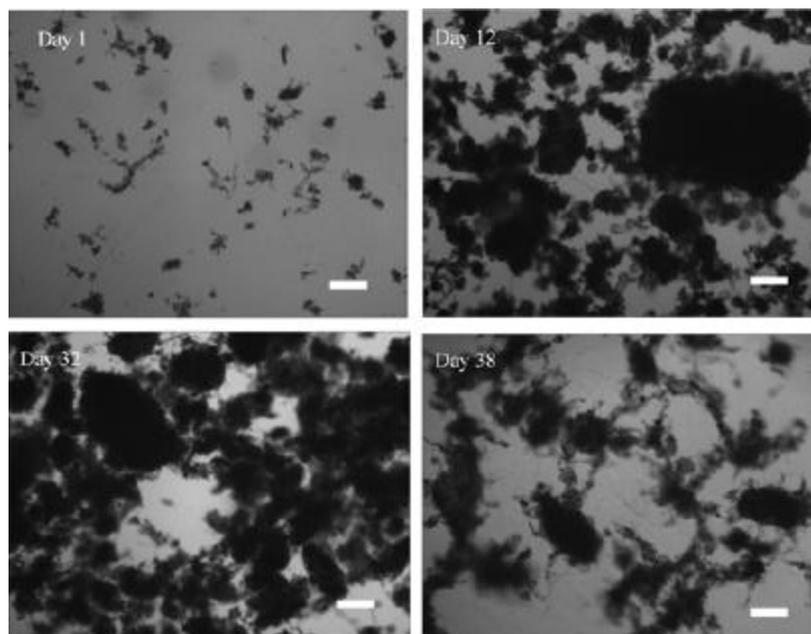
I granuli formati dopo 12 giorni mostravano, secondo gli autori, una morfologia regolare e compatta. Rispetto ad impianti SBR, dove la formazione dei primi aggregati richiede 3-6 settimane, negli impianti in continuo tale tempo risulterebbe dunque minore. Secondo gli autori dunque gli sforzi di taglio risultano essere se

non l'unico, il parametro operativo che maggiormente influenza il fenomeno della granulazione. Gli autori hanno calcolato gli sforzi di taglio del reattore con la configurazione da loro proposta, e hanno osservato che l'intensità degli sforzi era nettamente superiore al reattore colonnare (B) a parità di flusso d'aria applicato (Fig. 4.4). Ciò ha consentito una rapida formazione dei granuli, ma allo stesso tempo anche un notevole risparmio dei costi energetici per l'insufflazione di aria compressa.



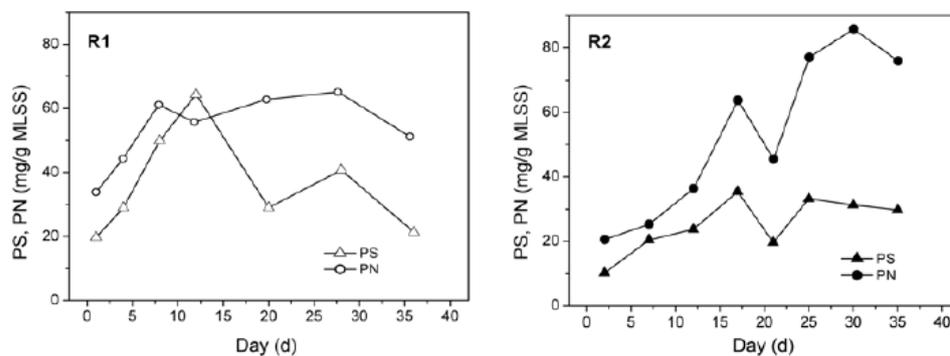
**Fig.4.4:** Andamento degli sforzi di taglio in funzione del tasso di aerazione (Zhou et al., 2013)

A partire dal 35° giorno, in entrambi i reattori gli autori osservarono uno sviluppo eccessivo di batteri filamentosi che proliferavano all'interno dei granuli (Fig. 4.5). Di conseguenza le caratteristiche di sedimentabilità peggiorarono in maniera sensibile e lo SVI aumentò da 30 a 89 mL gSST<sup>-1</sup>. Molta della biomassa venne così dilavata e la concentrazione di solidi si ridusse a 1,5 gSST L<sup>-1</sup>. Gli autori misurarono il contenuto di EPS nei granuli. Nel dettaglio, si osservò che il contenuto di EPS aumentava al crescere del carico organico alimentato, probabilmente perché elevate disponibilità di substrato determinano un incremento dell'attività metabolica della biomassa che secreta più EPS.



**Fig.4.5:** Morfologia dei granuli nel corso della granulazione (Zhou et al., 2013)

Inoltre fu osservato che nei primi 12 giorni il contenuto di EPS è cresciuto in modo importante. Le proteine risultavano essere la frazione dominante delle EPS nei granuli nelle prime due settimane, mentre nelle successive il contenuto di proteine si è drasticamente ridotto pur rimanendo la frazione maggiore (Fig. 4.6).



**Fig.4.6:** Andamento del contenuto di EPS durante la granulazione (Zhou et al., 2013)

Fu altresì osservata una significativa correlazione tra il contenuto di proteine nei granuli e la loro idrofobicità. L'aumento di quest'ultima, legata al contenuto di

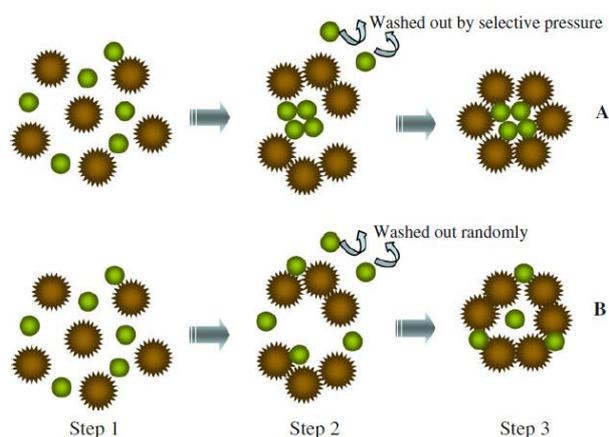
proteine dei granuli, favoriva dunque il contatto e l'interazione tra le cellule che aderivano l'una con l'altra attraverso la matrice di EPS fino a formare i granuli sotto la spinta degli elevati sforzi di taglio.

Sebbene nell'impianto in continuo i granuli si siano formati prima rispetto ad impianti SBR, essi sono risultati strutturalmente instabili nel lungo periodo, a causa della configurazione del reattore e della strategia operativa. Il reattore era, dal punto di vista idrodinamico, a completa miscelazione, dove sia la concentrazione di substrato che di biomassa era uniforme. Ciò è un noto fattore che favorisce la crescita di batteri filamentosi (Liu et al., 2006). Inoltre, la concentrazione di substrato nel reattore, era uguale a quella dell'effluente a causa dell'idrodinamica a completa miscelazione. La concentrazione di COD negli strati esterni dei granuli era pari a circa  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Quindi, confrontando con il funzionamento di un sistema SBR che viene alimentata ad intermittenza, la ridotta differenza di concentrazione tra l'esterno e l'interno dei granuli limita i fenomeni diffusivi a causa della riduzione della forza spingente. In questo modo, è probabile che gli strati interni dei granuli non ricevessero sufficiente substrato organico a causa del limitato trasporto di materia verso l'interno. La mancanza di substrato nei granuli produce solitamente un eccessivo sviluppo di batteri filamentosi con conseguenti problemi di bulking filamentoso. Inoltre, il tempo di ritenzione idraulica (HRT) dovrebbe essere inferiore all'inverso del massimo tasso di crescita cellulare dei batteri sospesi, per consentire il dilavamento di quei microrganismi che non formano aggregati (Morales et al., 2012). Poiché l'inverso del massimo tasso di crescita cellulare variava tra 3 e  $13,2 \text{ giorni}^{-1}$ , l'HRT sarebbe dovuto essere inferiore a 1,8 ore, ma risultando superiore tale condizione non veniva rispettata.

Gli stessi autori in un altro lavoro (Zhou et al., 2013) hanno apportato alcune modifiche gestionali. In particolare, al fine di favorire l'aggregazione e la stabilità strutturale degli aggregati, hanno aggiunto nell'alimento del reattore A ioni calcio per una concentrazione di  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , mentre nel reattore B l'alimento ne era privo. I primi granuli si sono osservati dopo soli 4 giorni ed erano dominanti dopo appena 10. In seguito, il tasso di granulazione aumentò lentamente, raggiungendo una condizione stazionaria al 30° giorno. Da questo giorno in poi, il picco nella distribuzione granulometrica dei soli granuli non aumentò in modo significativo. La mediana della distribuzione era di 1 mm e di 0,7 mm rispettivamente nel reattore A e B. Tale risultato indicava che la presenza di ioni calcio determinava la formazione di granuli di maggiori dimensioni. Inoltre, gli ioni calcio, stimolavano secondo gli autori, la crescita e l'aggregazione dei fiocchi a causa di legami che si creavano tra le EPS e il calcio stesso (Angela et al., 2011). Tuttavia, la distribuzione granulometrica della miscela di fango fioccoso/granulare, non ha mostrato significative differenze tra gli impianti A e B.

Quindi la granulazione era principalmente dovuta al processo di auto-immobilizzazione cellulare, nel quale il calcio svolgeva un ruolo minoritario. L'aggiunta di ioni calcio ha favorito l'aggregazione dei piccoli fiocchi di inoculo

fino a un tasso di granulazione alquanto limitato. Ciò è stato causato dalla mancanza della pressione di selezione idraulica, che negli impianti SBR consente di mantenere nel reattore solo le particelle più grandi; ciò permette di ottenere tassi di granulazione più elevati rispetto a un sistema a flusso continuo dove manca la selezione idraulica della biomassa. Approfondite analisi microscopiche hanno permesso agli autori di evidenziare la presenza di precipitati di calcio (carbonati e sali di fosforo) sia nel nucleo che negli strati esterni dei granuli dell'impianto A. Altri autori (Angela et al., 2011; Wang et al., 2007) hanno invece osservato che nei granuli coltivati in impianti SBR sempre con l'aggiunta di ioni calcio nell'alimento, tali precipitati si trovavano solo nel nucleo. La differenza distribuzionale spaziale degli ioni calcio è il risultato delle differenti condizioni operative dei reattori a flusso continuo e sequenziali. Negli SBR infatti, a causa della pressione di selezione idraulica, le sostanze con scarse caratteristiche di sedimentabilità, compresi la biomassa e piccoli ioni inorganici ( $\text{Ca}^{2+}$ ) vengono dilavati. Quindi, solo gli aggregati di calcio vengono mantenuti nel reattore. La biomassa dunque inizia a svilupparsi in forma adesa su tali supporti che costituiranno il nucleo dei granuli futuri. Negli impianti a flusso continuo invece, gli ioni calcio vengono assorbiti all'interno dei fiocchi ovvero creano dei ponti tra i fiocchi stessi, legandosi alle EPS secrete dalla biomassa (Fig. 4.7). Per tale motivo, la distribuzione degli ioni calcio è uniformemente distribuita in tutta la struttura dei granuli.



**Fig.4.7:** Meccanismo di formazione dei granuli (gli ioni calcio sono rappresentati tramite le sferette di colore verde) (Zhou et al., 2013).

## 5.2 La coltivazione dei granuli in impianti convenzionali

Ad oggi, la formazione dei granuli aerobici è stata sempre ottenuta in impianti colonnari con elevato rapporto altezza/diametro (H/D) operanti in modalità batch. Questa tipologia di reattori non solo permette di applicare elevate pressioni di selezione idraulica sulla biomassa, mediante l'applicazione di bassi tempi di sedimentazione (Liu e Tay, 2004), ma anche altre condizioni ambientali come l'alternanza di periodi di feast e famine ed elevati sforzi idrodinamici che promuovono l'aggregazione della biomassa (Beun et al., 1999). Tuttavia, l'applicazione della tecnologia dei fanghi granulari per l'upgrade di impianti già esistenti può essere limitata dalle differenti condizioni operative e geometriche degli impianti convenzionali rispetto ai sistemi SBR colonnari. D'altro canto, trasformare un impianto che opera in continuo in un SBR è difficile. Quindi, la ricerca finalizzata ad ottenere la granulazione in impianti a flusso continuo apre nuove prospettive per l'applicazione dei fanghi granulari in impianti già esistenti. Morales et al. (2012) hanno cercato di valutare le condizioni operative ottimali affinché la biomassa granulare possa formarsi anche in impianti operanti a flusso continuo. Gli autori hanno utilizzato un impianto (volume 6 L) che ha operato con tempi di permanenza idraulica (HRT) via via minori, al fine di valutare l'incidenza di tale parametro sul processo di granulazione. L'effluente veniva scaricato mediante un sistema che consentiva lo scarico selettivo del fango in funzione delle caratteristiche di sedimentabilità. Il dispositivo in questione era un tubo semi-sommerso di geometria nota che fissava la velocità ascensionale del flusso idrico a un valore di circa  $10 \text{ m h}^{-1}$ . Le particelle con velocità di sedimentazione minore venivano trascinate dall'effluente, mentre quelle con migliori caratteristiche di sedimentabilità rimanevano nel reattore dove eventualmente potevano aggregarsi in granuli. In funzione della portata che alimentava l'impianto, gli autori cambiavano la geometria di tale estrattore, al fine di mantenere costante la velocità al suo interno (Fig. 4.8).

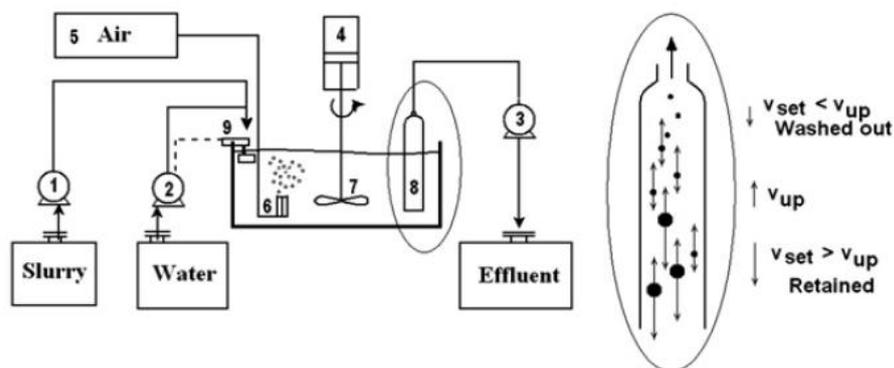


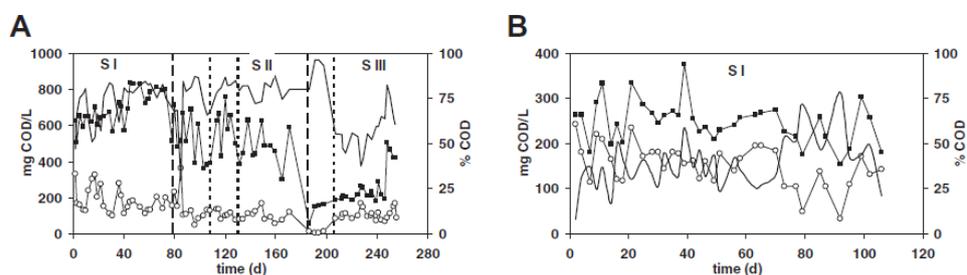
Fig.4.8: Layout dell'impianto (Morales et al., 2012).

L'alimento era un refluo di origine industriale proveniente da un allevamento di suini. L'impianto (R1) ha operato per 260 giorni suddivisi in tre fasi, ciascuna delle quali caratterizzate da un valore di HRT minore, ottenuto incrementando ogni volta la portata influente e di conseguenza un carico organico (OLR) crescente. Stabilite le condizioni operative ottimali, gli autori inocularono un altro impianto (R2) che ha funzionato per 120 giorni con le modalità operative di R1 che hanno consentito di ottenere i granuli (Tab. 4.1).

**Tab.4.1:** Condizioni operative (Morales et al., 2012).

Reactor	R1					R2
	S I	S II		S III		S I
Days (d)	0-78	79-108	109-131	132-184	185-260	1-120
HRT (h)	6	3			1	1
Mechanical stirring	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
COD (mg COD/L)	600	600	600	600	200-500	200-250
OLR (g COD/L d)	2.4	4.8	4.8	4.8	4.8-12.0	4.8-6.0
NLR (g N/L d)	0.5	0.8	1.2	1.2	0.9-2.2	1.4-1.7
DO (mg/L)	5.0	3.8	3.0	2.5	6.1	8.6
VSS influent (g/L)	0.06-0.19	0.14-0.26	0.07-0.11	0.06-0.10	0.02-0.10	0.02-0.06
pH influent	7.1-8.1	7.1-8.1	7.9-8.1	7.5-8.1	6.9-7.3	7.3-8.3
Effluent tube diameter (cm)	1.2	1.6	1.6	1.6	2.8	2.0

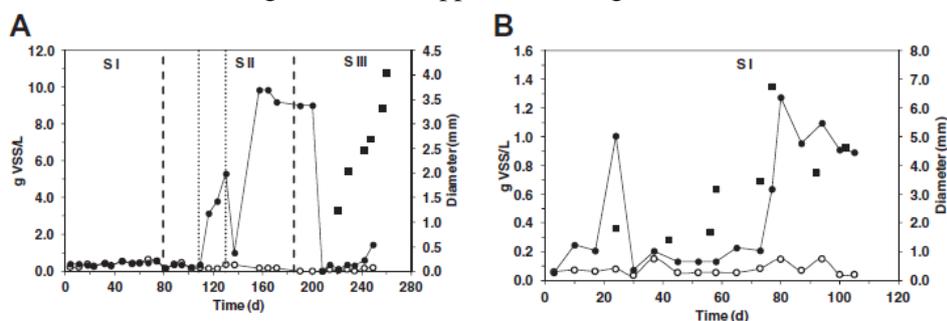
I rendimenti di rimozione della sostanza organica, espressi in termine di abbattimento del COD solubile, erano compresi tra il 50-80% in R1 e il 30-60% in R2. I ridotti rendimenti furono addebitati dagli autori all'elevata frazione lentamente biodegradabile e non biodegradabile del refluo, che possono raggiungere valori nell'ordine del 55% del COD (Figueroa et al., 2011). I rendimenti di rimozione dell'azoto furono molto bassi, compresi tra il 10 e 15%, addebitati del tutto alla sintesi della biomassa eterotrofa, in quanto non è stata osservata attività biologica della biomassa nitrificante, probabilmente a causa dei bassi valori dell'età del fango (2 giorni) (Fig. 4.9).



**Fig.4.9:** Concentrazione di COD nell'influente ed effluente e rendimento depurativo nei reattori R1 (A) e R2 (B) (Morales et al., 2012).

Durante la prima fase in R1 non è stato osservato un significativo incremento nella concentrazione di biomassa, in quanto la concentrazione dei solidi dell'effluente era pressoché pari a quella della miscela aerata nel reattore. Tijhuis et al. (1994) osservarono che per fare sviluppare la biomassa adesa, il tempo di permanenza

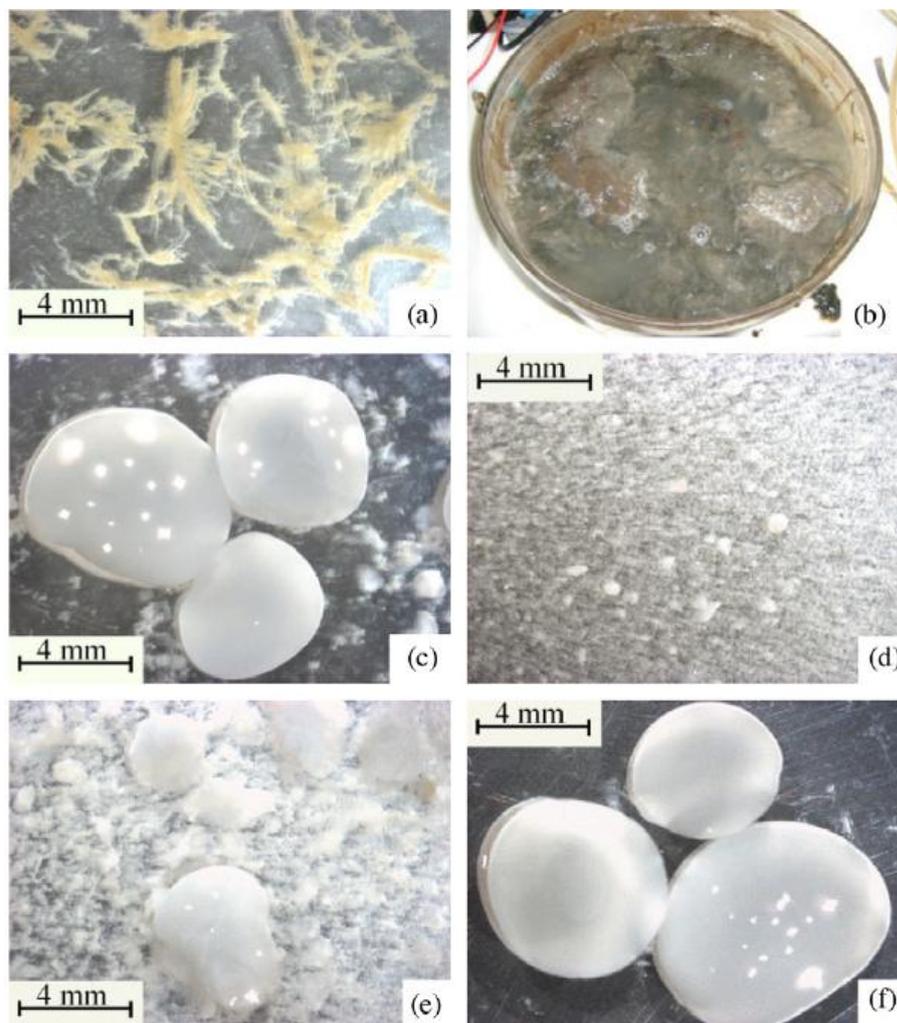
idraulica deve essere minore all'inverso del massimo tasso di crescita cellulare dei batteri, in modo da favorire il dilavamento di quei batteri non in grado di aggregarsi in fiocchi. Nello studio di **Morales et al. (2012)**, l'HRT era di circa 6 ore nella prima fase e risultava superiore a quanto indicato da **Tijhuis et al. (1994)**. Seguendo questo concetto, l'HRT venne ridotto a 3 ore nella seconda e terza fase, ma ciò non portò a significativi miglioramenti. L'agitatore meccanico ad un certo punto della sperimentazione venne spento al fine di evitare possibili danneggiamenti strutturali agli aggregati. In queste condizioni la concentrazione di biomassa crebbe fino a  $6 \text{ gSSV L}^{-1}$ , mentre quella nell'effluente si ridusse a circa  $200\text{-}400 \text{ mg L}^{-1}$ . Gli autori osservarono ad un certo punto della seconda fase una crescita significativa di batteri filamentosi, finché al 132°giorno essi erano predominanti nel reattore. La miscela aerata venne così filtrata e utilizzato come inoculo per la fase 3. Tuttavia in questa si verificò nuovamente lo sviluppo incontrollato di microrganismi filamentosi. Dal 205° giorno, la biomassa venne scaricata e il refluo industriale venne utilizzato come inoculo, in quanto gli autori osservarono che in esso vi era presenta una discreta quantità di biomassa. In queste condizioni, la biomassa si sviluppò sotto forma di granuli a partire dal 227°giorno, e raggiunse una concentrazione di circa  $1,5 \text{ gSST L}^{-1}$  (Fig. 4.10). Le stesse condizioni operative furono applicate in R2, dove però il tempo di detenzione idraulica era di 1 ora. I granuli si svilupparono in 24 giorni.



**Fig.4.10:** Concentrazione di SSV nel reattore e allo scarico, e dimensioni dei granuli nei reattori R1 (A) e R2 (B) (**Morales et al., 2012**).

La biomassa che si è sviluppata nella prima fase in R1 era prevalentemente costituita da batteri filamentosi con scarse caratteristiche di sedimentazione. La biomassa formò una struttura gelatinosa che occupò in breve tempo l'intero reattore. Tale tipo di biomassa si sviluppò nuovamente all'inizio della terza fase, fin quando fu effettuato un nuovo inoculo di biomassa. Nella seconda parte della terza fase, e in R2, la biomassa si aggregò in granuli che dominavano nel reattore. I granuli avevano un colore bianco, con una superficie liscia e contorni molto regolari (Fig. 4.11). Il diametro medio dei granuli crebbe gradualmente fino a raggiungere i 4 mm in R1 e i 6,8 mm in R2. Lo  $SVI_{10}$  progressivamente diminuì da

700 mL gSST<sup>-1</sup> a 127 mL gSST<sup>-1</sup>, mentre la densità variò tra i 7 e gli 11 gVSS L<sup>-1</sup>. Nonostante la densità fosse molto minore rispetto ad altre biomasse granulari coltivate con lo stesso refluo (Figueroa et al., 2011), i granuli sedimentavano abbastanza bene, con velocità dell'ordine dei 36-48 m h<sup>-1</sup>.



**Fig.4.11:** Immagini dei granuli al 44° (a), 184° (b) e 247° (c) giorno in R1 e al 16° (d), 24° (e) e 77° giorno (f) in R2 (B) (Morales et al., 2012).

Quindi la biomassa granulare coltivata in un impianto in continuo risulta essere facilmente separabile gravimetricamente, riducendo per tanto la necessità di sedimentatori con elevati volumi. Inoltre tali tipi di fanghi risultano più facilmente

disidratabili a causa della loro elevata idrofobicità (Liu et al., 2003) il che facilita la gestione dello smaltimento dei fanghi riducendone i costi.

Gli stessi autori effettuarono anche un approfondito studio circa la caratterizzazione microbiologica dei granuli coltivati nell'impianto in continuo. Gli autori analizzarono due campioni, rappresentativi della biomassa filamentosa e di quella granulare. Durante la prima fase dello studio, gli autori evidenziarono la presenza di  $\beta$  e  $\gamma$ -*Protobatteri*, di cui la maggiorparte filamentosi. Questi batteri furono successivamente individuati come Tipo 1701, 0041, *Sphaerotilus natans* e *Leptothrix*. Questi batteri sono responsabili del fenomeno del bulking negli impianti a fanghi attivi e causano il peggioramento delle caratteristiche di sedimentabilità del fango. Altri ceppi batterici molto abbondanti appartenevano ai ceppi *Azoarcus*, *Thaurea* e *Zoogloea*, mentre altri ceppi solitamente presenti nei fanghi attivi convenzionali come lo *Pseudomonas* erano assenti. Nei campioni con fango granulare invece risultarono ugualmente presenti gli  $\beta$  e  $\gamma$ -*Protobatteri*, che tuttavia erano principalmente bacilli e non batteri filamentosi.

Un altro studio relativo alla coltivazione di fango granulare in impianti convenzionali è stato quello condotto da Cheng et al. (2013). Gli autori utilizzarono due impianti pilota, del tutto analoghi come caratteristiche geometriche a quelli utilizzati per i sistemi a fanghi attivi convenzionali (Fig. 4.12).

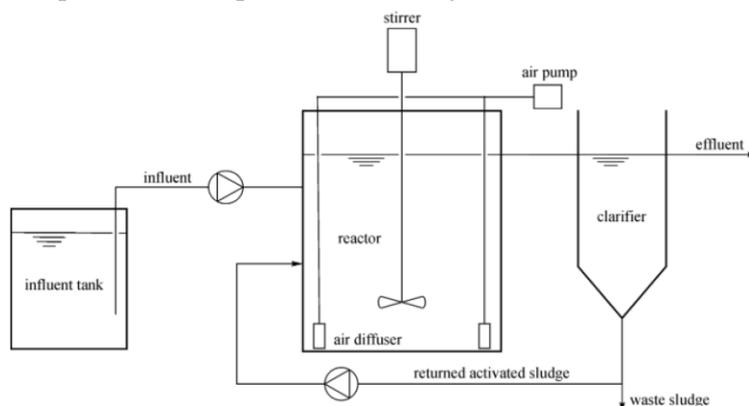
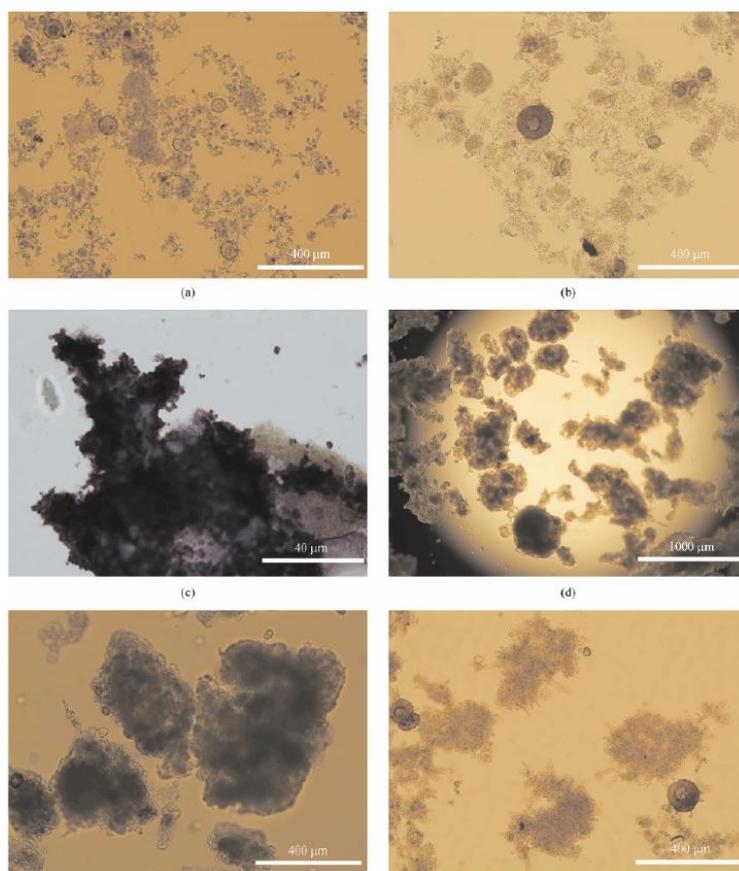


Fig.4.12: Layout dell'impianto utilizzato da Cheng et al. (2013).

Nel dettaglio l'impianto aveva un volume di 18 L ed era alimentato in continuo con una portata di 54 L giorno<sup>-1</sup>. Il sedimentatore aveva un volume di 4,5 litri, in modo da assicurare un tempo di sedimentazione di 2 ore. Il fango dal sedimentatore veniva ricircolato in testa al reattore, in rapporto 1:1 con il refluo influente. L'impianto è stato alimentato con refluo sintetico a base di acetato di sodio e amido di patate, per simulare la presenza di substrato lentamente biodegradabile. Un secondo impianto fu avviato con lo scopo di poter valutare gli effetti della natura del fango di inoculo sulla granulazione. In particolare, il reattore 1 fu inoculato con

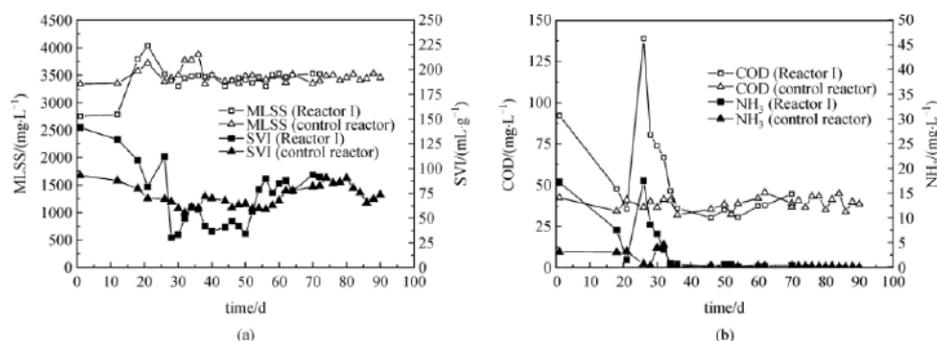
fango attivo contenente una certa frazione di batteri filamentosi, mentre il secondo, con un fango che ne era pressoché privo. Il carico del fango fu mantenuto pari a circa  $0.38-0.48 \text{ kgCOD KgSSV}^{-1}\text{giorno}^{-1}$ , effettuando periodici spurghi di biomassa. Le osservazioni microscopiche permisero di osservare la formazione di granuli nel reattore 1 a partire dal 21° giorno. I granuli di dimensioni comprese tra 0,18 e 1,25 mm avevano una superficie esterna regolare e liscia e inoltre una struttura densa e compatta. Dopo circa 70 giorni i granuli erano ancora stabili e i valori di SVI variavano tra i 50 e i 100 mL gSST<sup>-1</sup>. Nel reattore 2, sebbene i fiocchi apparivano molto ben addensati, non si sono formati granuli (Fig. 4.13).



**Fig.4.13:** Immagini dei granuli ottenuti da Cheng et al. (2013).

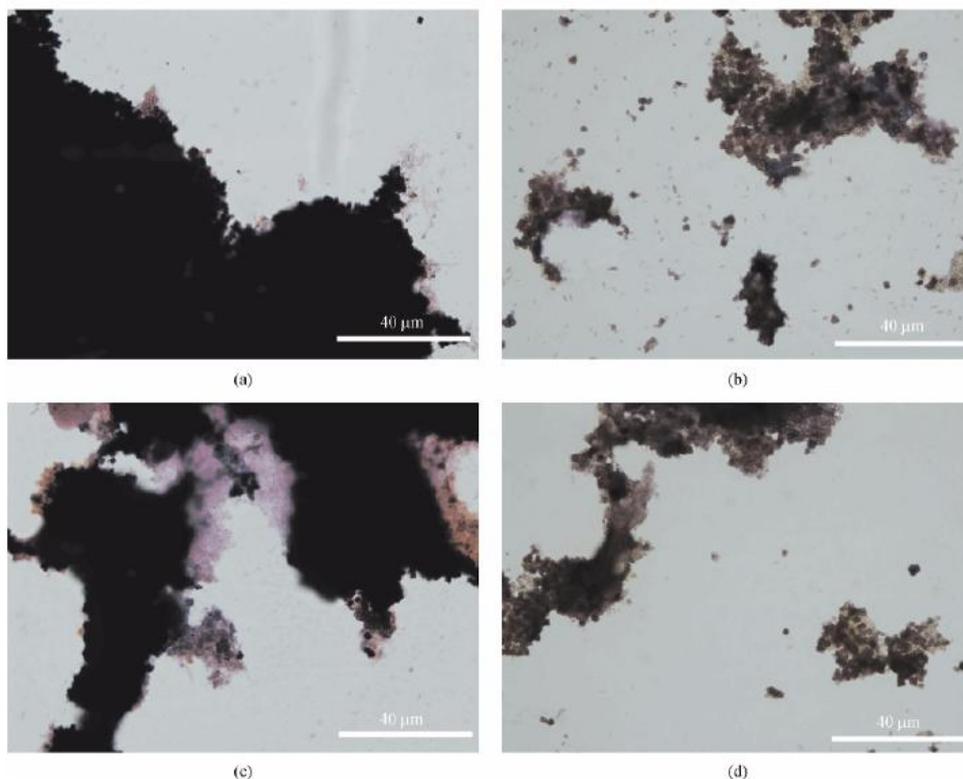
Gli autori dunque riuscirono ad ottenere i granuli nonostante la bassa pressione di selezione idraulica e nonostante il basso rapporto H/D del reattore. Gli stessi sostengono che ad avere avuto un ruolo chiave nell'aggregazione dei fiocchi siano stati gli sforzi idrodinamici. Sia la turbolenza indotta dall'aerazione che

dall'agitatore ha favorito l'aggregazione progressiva dei fiocchi che hanno piano formato i granuli aerobici. Questi risultati sembrano suggerire che la granulazione aerobica è un fenomeno associato alle condizioni idrodinamiche dei reattori. Le performance biologiche furono altrettanto soddisfacenti. I rendimenti di rimozione del COD erano prossimi al 90%, mentre quelli di rimozione dell'ammonio superiori al 96%, eccetto per un breve periodo a seguito di un massiccio spurgo di biomassa che determinò un severo washout di biomassa autotrofa in particolare (Fig. 4.14)



**Fig.4.14:** Andamento dei SSV e dello SVI nel reattore 1 e di controllo (a); andamento delle concentrazioni di COS ed ammoniaca nel reattore 1 e in quello di controllo (Cheng et al.,2013).

Le colorazioni di Gram e Neisser evidenziarono che nel reattore 1 la presenza di batteri filamentosi era decisamente modesta. Probabilmente questo è stato determinato dalla presenza dell'amido di patate nell'alimento. Esso infatti veniva bioadsorbito all'interno dei fiocchi e costituiva una lenta ma continua fonte di substrato. In questo modo, non si verificavano quei gradienti di concentrazione di substrato che favoriscono la crescita dei batteri filamentosi. Nei granuli erano invece dominanti batteri a bastoncelli. I granuli erano caratterizzati dalla presenza di molte cavità che favorivano da un lato, la diffusione dei nutrienti verso l'interno, e dall'altro la retrodiffusione dei metaboliti verso il bulk (Fig. 4.15).



**Fig.4.15:** Immagini del fango con colorazione di Nessler nel reattore 1 (a,c) e in quello di controllo (b,d) (Cheng et al.,2013).

La formazione dei granuli fu osservata dunque solo nell'impianto inoculato con fango attivo in cui erano presenti batteri filamentosi. I batteri filamentosi sono stati, quindi, ritenuti indispensabili, in una certa misura, per la formazione dei granuli, in quanto costituiscono l'impalcatura sulla quale si realizza l'intera struttura del granulo stesso. L'elevata intensità degli sforzi di taglio può, secondo gli autori, aver determinato la continua collisione tra questi batteri che, rimanendo imbrigliati tra di loro, costituivano la spina dorsale della struttura del fango granulare. Quindi, la presenza dei batteri filamentosi nell'inoculo, insieme agli elevati sforzi di taglio, determinano, secondo gli autori, la buona riuscita del processo di granulazione.

### 5.3 Stabilità dei granuli aerobici in impianti a flusso continuo

È stato dimostrato che la granulazione in impianti a flusso continuo produce granuli instabili che non mostrano le stesse caratteristiche di quelli coltivati in impianti SBR, sia dal punto di vista strutturale che per quanto concerne le

performance, specie per l'azoto. Il passo successivo a tali osservazioni fu l'analisi della stabilità dei granuli coltivati in impianti a flusso continuo e il confronto con i granuli di un impianto SBR.

**Juang et al. (2010)** hanno studiato la stabilità dei granuli aerobici coltivati in un impianto SBR e in un reattore a flusso continuo. Nel dettaglio, gli autori utilizzarono due differenti tipologie di granuli aerobici, coltivati con lo stesso refluo sintetico che differiva per la sola concentrazione di fosfati. In particolare, i granuli dell'impianto SBR furono coltivati con una concentrazione di fosfati nell'alimento pari a  $600 \text{ mg L}^{-1}$ , mentre i secondi con una concentrazione di  $325 \text{ mg L}^{-1}$ . Vennero utilizzati due impianti identici a configurazione colonnare entrambi alimentati con un circa di  $7,0 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{giorno}^{-1}$ . Nel reattore A il refluo sintetico veniva alimentato in continuo dal basso e l'effluente veniva scaricato in continuo dall'alto tramite uno stramazzo. Il reattore B era geometricamente identico, eccetto che per la presenza di una membrana a fibre cave che estraeva in continuo il flusso di permeato. Il tempo di ritenzione idraulica era di 24 ore in entrambi gli impianti, così come la portata d'aria insufflata dal fondo mediante un diffusore d'aria a bolle fini ( $3 \text{ L min}^{-1}$ ).

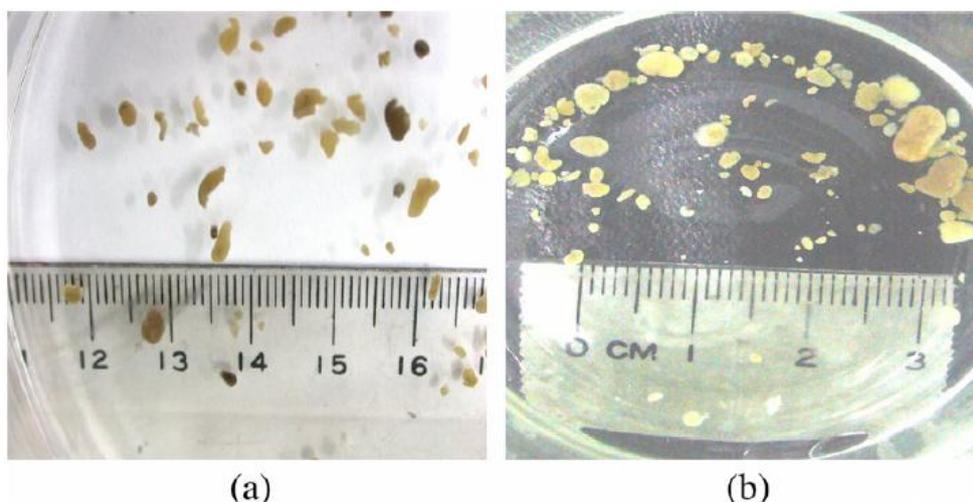
I granuli dell'impianto a flusso continuo si disintegrarono nel giro di tre giorni. Gli autori osservarono un massiccio washout di biomassa che determinò il fallimento della sperimentazione. Questi granuli si dimostrarono strutturalmente instabili e, pertanto, su questi non vennero effettuati ulteriori test. I primi granuli vennero così inoculati nei reattori A e B e si mantennero stabili per tutta la durata della sperimentazione (265 giorni).

I granuli dell'inoculo avevano dimensioni comprese tra i 2 e i 3 millimetri, ed erano caratterizzati da una superficie grigiastra, liscia e regolare, e una densità di circa  $1,2 \text{ Kg m}^{-3}$ .

**Tab.4.2:** Caratteristiche dei granulia aerobici coltivati in un impianto a flusso continuo (Juang et al., 2010).

Characteristics	Seed granules	AGMBR granules (210 days)
Mean size (mm)	2.3	1.9
Mean settling velocity ( $\text{cm s}^{-1}$ )	1.4	1.5
Mean effective density ( $\text{kg m}^{-3}$ )	1.2	1.3
Mean TSS (mg per granule)	0.47	0.87
Mean VSS (mg per granule)	0.37	0.67

Dopo 90 giorni, nel reattore B i granuli mostravano una superficie ancora più regolare, un colore giallo tendente al marrone, e una densità notevolmente maggiore ( $4 \text{ Kg m}^{-3}$ ). Il rapporto tra i solidi volatili e totali diminuì, a causa dell'accumulo di materiale inorganico.

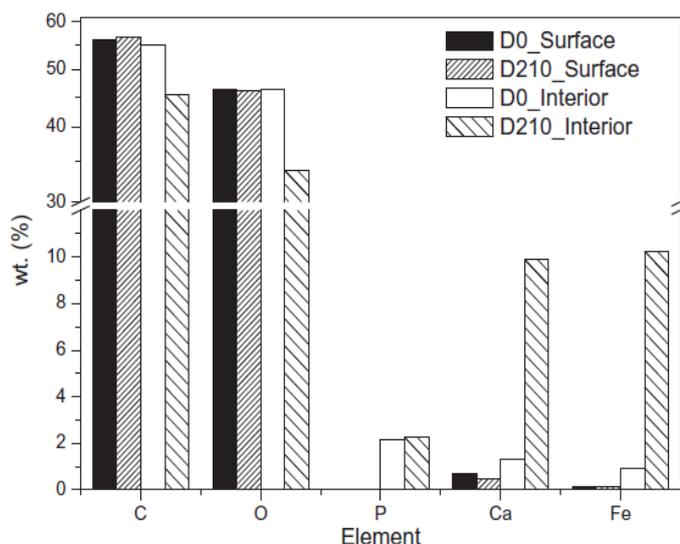


**Fig.4.16:** Immagini del fango granulare di inoculo (a) e dopo 210 giorni (b) (Juang et al.,2010).

Dopo 210 giorni, i granuli divennero bianchi e la loro dimensione media nel complesso si ridusse. In particolare, gli autori osservarono la formazione di granuli di grosse dimensioni ( $> 5$  mm) e di granuli di dimensioni piccole ( $< 1$  mm).

Il contenuto di proteine dei granuli aumentò in maniera significativa fino a circa 2300 mg/L (pari a circa il 36% dei solidi volatili), il che contribuì in maniera significativa al mantenimento delle caratteristiche strutturali dei granuli (Fig. 4.16). Attraverso specifiche analisi microscopiche gli autori effettuarono una dettagliata mappatura dei granuli in termini di distribuzione degli ioni calcio e ferro al loro interno.

Sia nella superficie che nell'interno dei granuli di inoculo (d0) erano costituiti al 55% da carbonio e al 45% da ossigeno. Nella superficie non osservarono fosfati, solo lo 0,7% di calcio e 0,2 di ferro. All'interno dei granuli invece la percentuale di fosfati era il 2%, quella di calcio 1,2% e infine il ferro meno dell'1%. Dopo 210 giorni (d210), la composizione della superficie non si modificò in modo significativo, mentre importanti cambiamenti si osservarono negli strati interni dei granuli. In particolare, il contenuto di fosfati rimase pressoché costante, mentre aumentarono in maniera significativa il contenuto di calcio (10%) e ferro (10%). Ciò indica che i granuli si arricchirono progressivamente di calcio e ferro negli strati più interni (Fig. 4.17).



**Fig.4.17:** Distribuzione degli elementi sulla superficie e all'interno dei granuli in differenti tempi (Juang et al.,2010).

Gli autori ipotizzarono dunque che i precipitati di calcio e ferro all'interno dei granuli abbiano contribuito in maniera sensibile al mantenimento delle caratteristiche strutturali dei granuli in entrambi gli impianti.

Ulteriori analisi microbiologiche hanno consentito agli autori di individuare ceppi batterici denitrificanti come l'*Acinetobacter sp.*, i *Flavobacterium sp.* e i *Corynebacterium glutamicum sp.* Questi ceppi batterici sono in grado di produrre precipitati di calcio e ferro sottoforma di calcite e ferrite. Sia i sali di fosforo che di ferro precipitano in soluzioni alcaline. La presenza di ceppi batterici denitrificanti favoriva dunque tale processo, in quanto è noto che il processo di denitrificazione determina un aumento dell'alcalinità del bulk. Secondo gli autori quindi, la stabilità dei granuli è stata fortemente incentivata dalla precipitazione di sali di fosforo e ferro, risultante dall'effetto combinato della denitrificazione e del sovradosaggio di tali composti nel refluo alimentato.

Tale studio se da un lato mostra che i granuli aerobici possono essere mantenuti in reattori a flusso continuo, dall'altro evidenzia notevoli difficoltà gestionali. Certamente nel caso di reflui reali, tali concentrazioni di fosfati risultano inverosimili, a meno di effettuare ingenti dosaggi di reagenti, con notevoli impatti sul costo gestionale degli impianti. Inoltre, in reattori con fango granulare completamente aerati dove la concentrazione di ossigeno è elevata, l'ottimizzazione del processo di denitrificazione risulta alquanto problematica. Molti altri studi in letteratura (Mosquera-Corral et al., 2005) riportano infatti che la denitrificazione in impianti SBR con fango granulare si realizza prevalentemente all'inizio del ciclo (fase *feast*) dove a causa dell'elevata disponibilità di substrato

organico nel bulk, l'ossigeno viene consumato negli strati esterni dei granuli determinando in tal modo il formarsi una zona anossica all'interno dei granuli stessi sufficientemente estesa da ottenere buone performance di denitrificazione. La denitrificazione può anche verificarsi durante la fase di *famine*, se la concentrazione di ossigeno nel bulk viene ridotta, ovvero se i granuli hanno dimensioni sufficientemente grandi da limitare i fenomeni diffusivi dell'ossigeno al loro interno (Di Bella e Torregrassa, 2013). In ogni caso, in impianti a flusso continuo, la mancanza dell'alternanza di condizioni di *feast* e *famine*, ovvero le ridotte dimensioni medie dei granuli, rendono la denitrificazione un processo difficilmente ottimizzabile.

In un altro studio condotto da Liu et al. (2012) è stato nuovamente affrontato il tema della stabilità dei granuli in impianti a flusso continuo. Rispetto al precedente studio, in questo caso l'impianto era dotato di un sistema di filtrazione che consentiva di selezionare gli aggregati in funzione delle loro dimensioni medie (Fig. 4.18) mediante il passaggio obbligato su una membrana dinamica (DMBR).

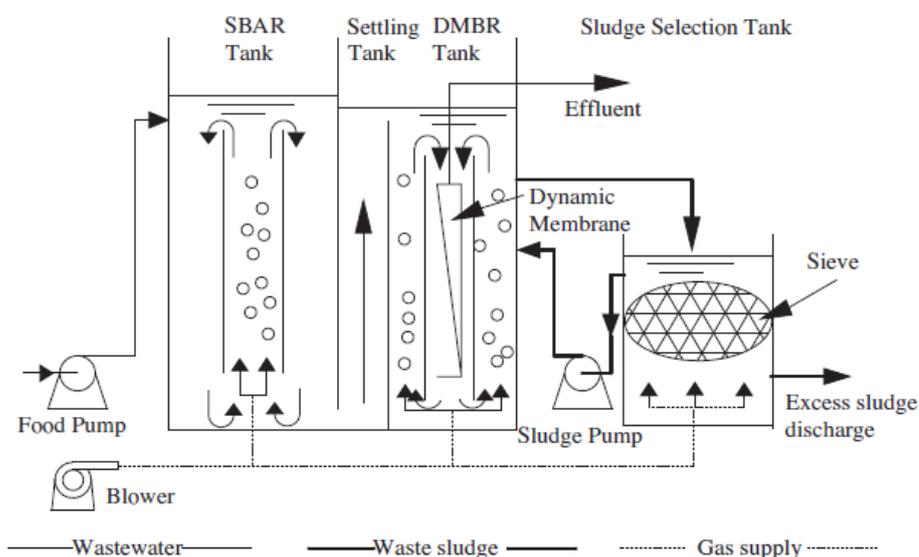


Fig.4.18: Schema d'impianto (Liu et al., 2012).

Come mostrato in figura il refluo veniva pompato all'interno del comparto SBAR ( $110 \text{ L giorno}^{-1}$ ) geometricamente analogo ai reattori utilizzati per la coltivazione. Quindi la miscela aerata passava nel comparto di sedimentazione dove la biomassa fioccosa e granulare si separavano in virtù della loro differente velocità di sedimentazione. Il fango granulare tornava in parte nel comparto SBAR, mentre quello fioccoso e una frazione di quello granulare passavano nel comparto DMBR. Tale comparto era dotato di una membrana che consentiva l'estrazione in continuo

del permeato. Il fango veniva così mantenuto in questo comparto. Periodicamente (1 volta al giorno) il fango veniva pompato su uno staccio con un passante di 0,6 mm che effettuava la selezione del fango in funzione delle dimensioni degli aggregati. Il fango granulare veniva così mantenuto dallo staccio e rimandato indietro nel comparto SBAR tramite una pompa, mentre quello fioccoso veniva allontanato come fango di supero.

Il reattore venne inoculato con fango granulare coltivato in un impianto SBR, le cui caratteristiche sono riportate in Tabella 4.3.

**Tab.4.3:** Caratteristiche del fango di inoculo (Liu et al., 2012).

Characteristics	Granulation rate (%)	MLSS (g/L)	SVI (ml/g)	Particle size (mm)	Settling velocity (NTU)	Water content (%)
Range	≥95	9.0-11.0	25-40	1.0-6.0	70-100	92-94
Average rate	-	10.0	30	3.5	90	92.5

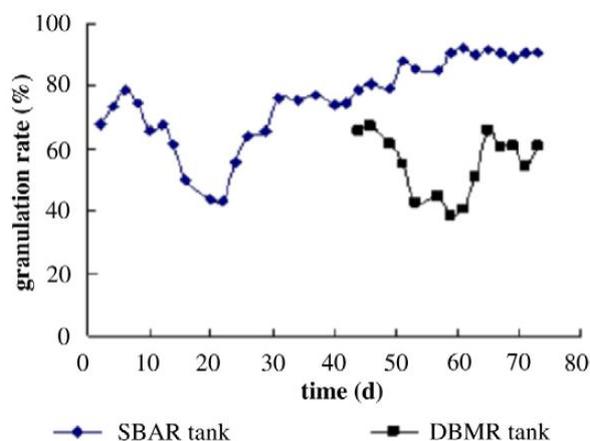
La concentrazione di ossigeno fu mantenuta pari a circa 2-3 mg L<sup>-1</sup>. Il refluo alimentato proveniva da una fossa settica. Le sue principali caratteristiche sono riportate in tabella 4.4.

**Tab.4.4:** Caratteristiche del liquame influente (Liu et al., 2012).

Analysis items	COD (mg/L)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	TN (mg/L)	TP (mg/L)	Turbidity (NTU)	pH
Range	100-300	45-185	40-200	5-30	95-600	6-8
Average rate	207	106	120	14	325	-

Una volta che i granuli furono inoculati nell'impianto a flusso continuo gradualmente si disintegrarono. Ciò fu addebitato alla riduzione della forza spingente della diffusione dei nutrienti verso l'interno dei granuli che inevitabilmente si verifica negli impianti a flusso continuo. Ciò determinò la proliferazione di batteri filamentosi che contribuirono allo sfaldamento dei granuli. Dopo circa 5 settimane i granuli si adattarono alle nuove condizioni. Ciononostante, essi erano di dimensioni modeste e dominati da batteri filamentosi. Secondo gli autori tale trasformazione fu la naturale evoluzione dei granuli che per adattarsi alle nuove condizioni operative, diventarono più piccoli. Infatti, se si riduce la forza spingente che determina la diffusione dei nutrienti all'interno dei granuli, affinché gli strati più interni ricevano sufficiente substrato è necessario che la resistenza al flusso diffusivo sia minore, di conseguenza lo spessore dei granuli deve essere minore.

Nel complesso, dopo circa 5 settimane, il tasso di granulazione nel comparto SBAR, misurato come percentuale di aggregati con dimensioni superiori ai 0,6 millimetri, aumentò e si mantenne stazionario per tutta la durata della sperimentazione. Nel comparto DMBR invece subì continue fluttuazioni a causa del progressivo accumulo del fango fioccoso proveniente dal comparto SBAR (Fig. 4.19).



**Fig.4.19:** Tasso di granulazione nel reattore SBR e nel comparto membrana (Liu et al., 2012).

I granuli di inoculo erano caratterizzati da diametri superiori a 1 mm. Dopo circa 15 giorni come già accennato, la maggiorparte dei granuli si disintegrò, e la percentuale di granuli con dimensioni comprese tra 0,1 e 1 millimetro aumentò in maniera significativa. Dopo 30 giorni, si raggiunsero condizioni stazionarie: i granuli con diametro compreso tra 0,1 e 1 mm erano circa il 60%, mentre quelli con diametro maggiore di 2 mm appena in 15%. Ciò indicava che i granuli in impianti a flusso continuo avevano diametri sensibilmente minori rispetto a quelli coltivati in impianti operanti in discontinuo (Tab. 4.5).

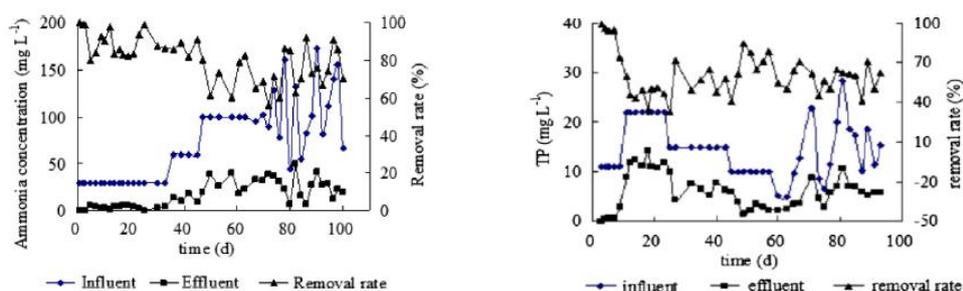
**Tab.4.5:** Confronto tra le caratteristiche dei granuli di inoculo e quelli dell'impianti a flusso continuo (Liu et al., 2012).

Sludge type	Diameter of the granules (mm)						
	≤0.1	0.1-0.15	0.15-0.3	0.3-0.6	0.6-1.0	1.0-2.0	≥2.0
Weight percentage of the sludge with different diameter (%)							
Inoculation sludge	0.1	2.0	2.7	5.0	10.0	35.5	44.6
Granules cultivated for 15 days	1.1	4.1	8.0	10.0	15	32.2	29.7
Granules cultivated for 30 days	0.2	0.3	6.6	35.1	13.0	28.1	16.8

Dal punto di vista della sedimentabilità i granuli mostrarono proprietà progressivamente peggiori, sia a causa delle loro ridotte dimensioni, che per la presenza della membrana che limitava la pressione di selezione idraulica.

Per quanto concerne le performance biologiche, sebbene il rapporto carbonio/azoto fosse sbilanciato in favore di quest'ultimo, la rimozione del COD fu comunque soddisfacente (>86%). L'ammonio veniva rimosso con rendimenti accettabili, prossimi all'80% sebbene l'impianto fosse soggetto a frequenti punte di carico di azoto ammoniacale (30-100 mg L<sup>-1</sup>). La combinazione del fango granulare e della

membrana ebbe quindi effetti positivi sul processo di nitrificazione. Infatti, i granuli permettono di mantenere elevate concentrazioni di batteri autotrofi che restano immobilizzati nella struttura del granulo stesso, e allo stesso tempo la membrana aumenta il tempo di residenza cellulare nel reattore che facilita l'accumulo dei batteri a crescita lenta. I rendimenti di rimozione dell'azoto totale risultarono nel complesso più bassi (60%) a causa di una denitrificazione non totale. La nitrificazione e denitrificazione simultanea, seppur non del tutto compromessa in un impianto a flusso continuo, risulta però meno efficace di quanto avviene in impianti SBR, sia a causa delle ridotte dimensioni dei granuli, che della mancanza dell'alternanza di fasi *feast* e *famine* che, come più volte ribadito, agevolano una migliore stratificazione dei granuli (Fig. 4.20).



**Fig.4.20:** Rendimenti di rimozione dell'azoto e del fosforo nell'impianto a flusso continuo (Liu et al., 2012).

Riguardo il fosforo, gli autori osservarono che nella prima fase della campagna sperimentale, quando il refluo alimentato era sintetico, i rendimenti di rimozione del fosforo erano nell'ordine del 90% fin quando la concentrazione di fosforo nell'alimento era inferiore ai 10 mg L<sup>-1</sup>. Nel secondo periodo invece, quando il refluo alimentato era quello proveniente da una vasca settica, i rendimenti furono sufficientemente elevati (60%) sebbene le significative fluttuazione del carico influente, in quanto la presenza di acidi volatili a basso peso molecolare favoriva il metabolismo dei PAO. Gli autori affermano che nonostante la mancanza della fase anaerobica l'impianto da loro utilizzato era in grado di rimuovere in maniera soddisfacente anche il fosforo.

Tuttavia, va sottolineato che la fase anaerobica aveva luogo direttamente nella vasca settica da cui veniva prelevato il liquame, per tanto tali risultati necessiterebbero di ulteriori approfondimenti.

## 5.4 Caratteristiche dei granuli aerobici in impianti MBR a flusso continuo

La combinazione della tecnologia del fango granulare con quella dei bioreattori a membrane può comportare grandi vantaggi (Li et al., 2005). Tuttavia essi risultano in gran parte solo teorici e la loro effettiva efficacia è ancora oggi in fase di studio da parte di molti ricercatori. L'intrinseca instabilità dei granuli aerobici può comportare infatti diverse problematiche gestionali di questo promettente sistema, specie per quanto concerne lo sporco delle membrane. L'analisi delle caratteristiche morfologico-strutturali dei granuli in impianti MBR diviene uno step fondamentale per un primo approccio analitico di tale complesso sistema.

Li et al. (2008) hanno studiato le caratteristiche strutturali dei granuli in un impianto MBR e allo stesso tempo hanno cercato di valutare le migliori strategie operative per incrementarne la stabilità. L'impianto è stato attivo per circa 60 giorni, durante i quali gli autori hanno osservato una graduale riduzione delle dimensioni dei granuli aerobici. Secondo gli autori ciò fu dovuto alla forte intensità dell'aerazione, che risultava diverse volte maggiore rispetto a quanto si ha negli impianti SBR colonnari. Tale accorgimento era tuttavia inevitabile al fine di limitare il fenomeno del *fouling* della membrana. Le caratteristiche di sedimentabilità dei granuli peggiorarono nel corso della sperimentazione: da uno  $SVI_{30}$  iniziale di  $42 \text{ mL gSS}^{-1}$  si passò a circa  $80 \text{ mL gSS}^{-1}$ , a causa dello sviluppo di batteri filamentosi che divennero dominanti all'interno dei granuli (Fig. 4.21).

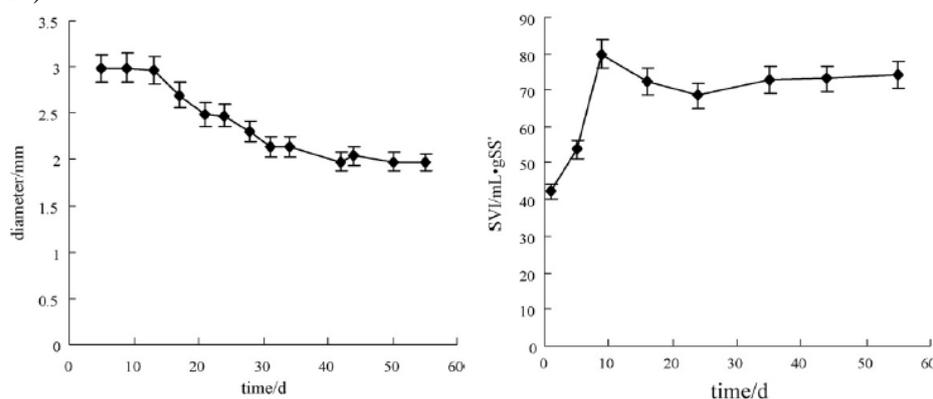


Fig.4.21: Andamento del diametro medio dei granuli e dello SVI (Li et al., 2008).

Dal punto di vista dell'attività biologica, i granuli mostravano valori di OUR progressivamente minori, a causa del decremento della frazione volatile dei solidi. A causa dell'effetto barriera esercitato dalla membrana, le particelle inerti di

dimensioni superiori al diametro medio dei pori della membrana venivano mantenute nel reattore, aumentando di fatto la frazione inerte del fango.

Analisi microscopiche effettuate con un microscopio a scansione di immagine (SEM) mostravano che i granuli progressivamente persero l'iniziale stabilità strutturale, a causa della proliferazione di batteri filamentosi (Fig. 4.22). Mentre i granuli di inoculo erano caratterizzati dalla forte presenza di batteri a bastoncini. Col tempo tali batteri scomparvero e lasciarono il posto ai filamentosi che dominavano i granuli già dopo 15 giorni a partire dall'inoculo.

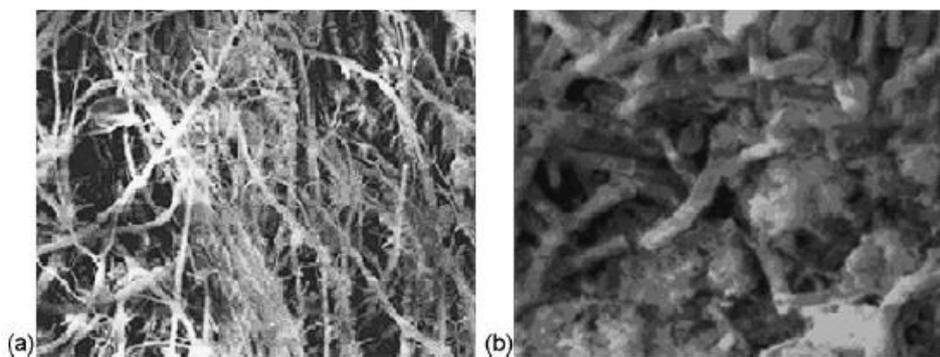


Fig.4.22: Immagini al SEM dei granuli (Li et al., 2008).

La proliferazione dei batteri filamentosi fu addebitata dagli autori all'effetto barriera della membrana, che selezionava i microrganismi non sulla base delle loro capacità di sedimentazione, bensì in funzione delle loro dimensioni. Inoltre, le differenti condizioni operative rispetto ai sistemi SBR, su tutte l'alimentazione continua, hanno causato l'instaurarsi di condizioni differenti da quelle favorevoli alla formazione dei granuli, che hanno invece favorito lo sviluppo di altre specie batteriche che normalmente non proliferano nei sistemi SBR. Un'altra causa può essere addebitata alla completa ritenzione del fango all'interno del sistema. Tale condizione è infatti favorevole allo sviluppo di batteri filamentosi (Chudoba et al., 1985), come la *Microtrix parvicella*, in quanto caratterizzati da una lenta crescita. Un'ulteriore spiegazione è legata all'elevata produzione di EPS. Gli autori hanno osservato che la maggiorparte delle EPS veniva trattenuta dalla membrana. Il loro contenuto aumentò in maniera esponenziale da circa 39 mg gSSV<sup>-1</sup> a 800 mg gSSV<sup>-1</sup>. Elevate concentrazioni di EPS nel bulk rendono la miscela molto viscosa e di conseguenza la diffusione dell'ossigeno si riduce. Tale condizione ambientale costituiva un ulteriore vantaggio per lo sviluppo dei batteri filamentosi, che così si trovavano nelle condizioni ottimali per potere proliferare. L'eccessiva produzione di EPS causava ulteriori problematiche. Infatti i granuli si trasformavano in strutture gelatinose a causa dell'adsorbimento delle EPS sulla loro superficie. Ciò

determinava un ostacolo alla diffusione dell'ossigeno al loro interno che comportava il "soffocamento" degli strati più interni. Di conseguenza i granuli diventavano progressivamente meno densi e il loro contenuto d'acqua aumentava, così come si riduceva l'attività metabolica.

La riduzione delle dimensioni medie invece è stata addebitata alla forte turbolenza necessaria a limitare il deposito del cake sulla membrana.

In un differente studio **Li et al. (2012)** studiarono le possibili relazioni esistenti tra le EPS e il fango granulare in un impianto MBR. Durante la sperimentazione gli autori osservarono che inizialmente il contenuto di EPS aumentò in modo graduale fino al 20° giorno; successivamente invece l'incremento del contenuto di EPS fu molto più repentino. Le componenti principali erano le proteine, che risultavano essere circa il 2-3 volte maggiori rispetto ai carboidrati. La maggiorparte delle EPS nei primi 20 giorni era legata, quindi, gli autori non misurarono significative quantità di SMP. La concentrazione di SMP aumentò in maniera esponenziale invece dopo il 20° giorno. Queste vennero progressivamente accumulate nel bulk a causa della presenza della membrana.

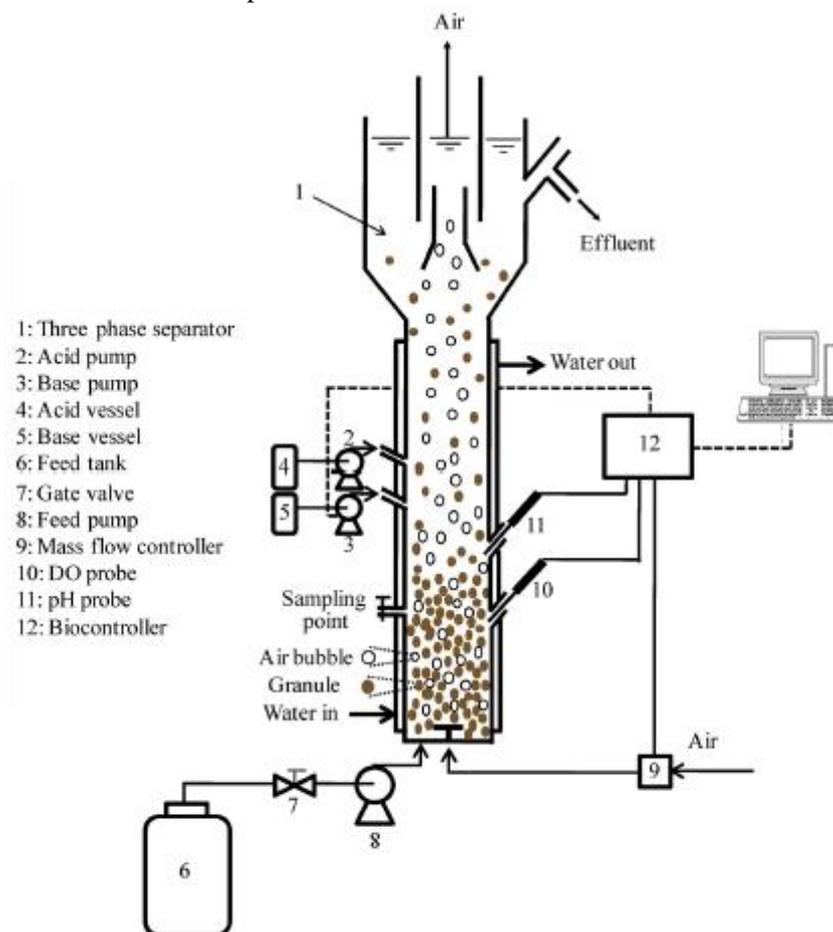
Il ruolo delle EPS nella formazione del fango granulare è ben noto. Esse infatti riducono la carica elettrostatica della parete cellulare dei batteri favorendone l'aggregazione l'una con l'altra. Un'eccessiva produzione di EPS in forma di EPS debolmente legate, determina tuttavia un peggioramento delle caratteristiche dei granuli, che si trasformano in aggregati fortemente gelatinosi, suscettibili a sfaldarsi e quindi risultando instabili strutturalmente. Ciò determina importanti conseguenze sulla filtrabilità del fango, specie in impianti MBR. È noto che le condizioni operative di un impianto MBR sono molto diverse a quelle di un sistema SBR, notoriamente favorevole per la formazione dei granuli. I microrganismi presenti all'interno dei granuli secernono una elevata quantità di EPS al fine di adattarsi agli stress metabolici indotti dalle condizioni ambientali avverse. La membrana blocca queste sostanze nel reattore, il che può costituire un vantaggio se i granuli devono formarsi, ma allo stesso tempo causa il peggioramento delle caratteristiche dei granuli già formati. La maggiorparte delle EPS sono proteine, che essendo sostanze idrofobiche favoriscono l'adesione cellulare. Tuttavia, se il loro contenuto cresce in maniera eccessiva, può causare un effetto repulsivo tra le cellule batteriche danneggiando in tal modo il processo di granulazione. È chiaro dunque che il rapporto tra le proteine ed i carboidrati deve essere equilibrato. Negli impianti SBR l'alimentazione in discontinuo provoca una forte produzione di EPS nella fase iniziale del ciclo dove la concentrazione di substrato è molto elevata. La concentrazione di EPS si riduce progressivamente a causa del loro consumo da parte dei batteri che le utilizzano come fonte di carbonio durante la fase di respirazione endogena. In un impianto MBR il meccanismo di formazione dei granuli è differente. Gli autori constatarono che inoculando fango attivo nello stesso impianto utilizzato in precedenza, si sono formati granuli

aerobici nel corso di poche settimane. Tali granuli risultavano strutturalmente stabili a differenza degli altri. Tale risultato risulta apparentemente inspiegabile in quanto l'impianto era alimentato in continuo e di conseguenza la produzione di EPS non veniva incentivata. Tuttavia gli autori osservarono che il contenuto di EPS nel surnatante (SMP) aumentò in maniera significativa, probabilmente a causa dello stress metabolico dovuto al cambio di impianto (l'inoculo di biomassa proveniva da un impianto convenzionale) e alla loro quasi totale ritenzione per effetto della membrana. Quindi la formazione dei granuli si è verificata per fenomeni differenti rispetto all'alimentazione intermittente. In tale sistema non si osservava però la tipica diminuzione delle EPS che si osserva negli SBR in fase *famine*, per tanto il loro contenuto cresceva esponenzialmente. Chiaramente ciò determina alla lunga un graduale peggioramento delle caratteristiche del bulk. Il problema maggiore degli impianti MBR sembrerebbe essere dunque l'eccessivo accumulo di EPS nel bulk. La continua aerazione e la forte intensità degli sforzi di taglio necessari a ridurre il fouling della membrana, potrebbero essere le cause della formazione dei granuli. Come riportato da **Liu e Tay, (2001)** gli sforzi di tagli determinano la rapida formazione dei granuli e ne garantiscono il mantenimento delle proprietà strutturali, in quanto da un lato promuovono la produzione di EPS, e dall'altro prevengono la proliferazione dei batteri filamentosi. Un aspetto gestionale che va tenuto in considerazione è l'età del fango. Nei sistemi MBR, tale parametro è sempre elevato. Ciò influenza la struttura dei granuli, in quanto valori eccessivi favoriscono la crescita dei batteri filamentosi a causa della loro ridotta velocità di crescita. Sebbene moderati livelli di crescita di batteri filamentosi sono benefici per la struttura dei granuli, il loro eccessivo sviluppo ne causa la destabilizzazione strutturale e la rottura. Un frequente spurgo di fango può facilitare il mantenimento strutturale dei granuli in impianti MBR. Esso infatti consente da un lato l'allontanamento delle EPS, la riduzione della concentrazione di solidi e quindi il migliore trasferimento dell'ossigeno nel bulk, e infine consentirebbe di dilavare i batteri filamentosi.

## 5.5 La coltivazione in impianti colonnari operanti a flusso continuo

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che la granulazione in impianti caratterizzati da un elevato rapporto altezza diametro, altrimenti detti colonnari, produce granuli caratterizzati da eccellenti caratteristiche strutturali (**Liu e Tay, 2004**). Alcuni autori hanno prendendo spunto da tali osservazioni hanno analizzato la coltivazione dei granuli aerobici in impianti colonnari. In particolare, **Hosseini et al. (2014)** hanno analizzato la formazione di granuli aerobici in un impianto con tale configurazione. L'obiettivo del loro studio era quello di ottenere granuli in grado di garantire elevate efficienze di nitratazione, ovvero di ottenere una

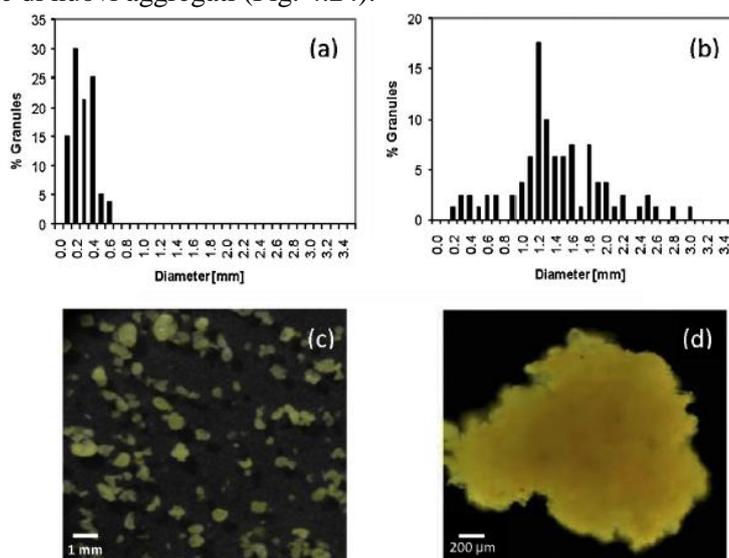
nitrificazione parziale con il nitrito come prodotto finale del processo ossidativo dell'ammonio. Tuttavia, nel presente paragrafo si focalizzerà l'attenzione sulla granulazione e non sulle performance.



**Fig.4.23:** Schema dell'impianto colonnare a flusso continuo (Hosseini et al., 2014).

L'impianto utilizzato come già detto era del tipo colonnare. In particolare, nella sommità della colonna è stato previsto un tratto divergente avente la funzione di rallentare il flusso idrico e permettere in tal modo la facile separazione dei granuli dall'effluente. Un ulteriore elemento cilindrico coassiale alla colonna posto nella sommità della stessa, permetteva di veicolare l'aria verso l'esterno e di creare una zona anulare di calma destinata allo scarico del chiarificato. La velocità del flusso in tale zona era di  $0,5 \text{ m h}^{-1}$ , pertanto solo le particelle che sedimentavano con velocità maggiori venivano mantenute nel reattore, mentre le restanti venivano

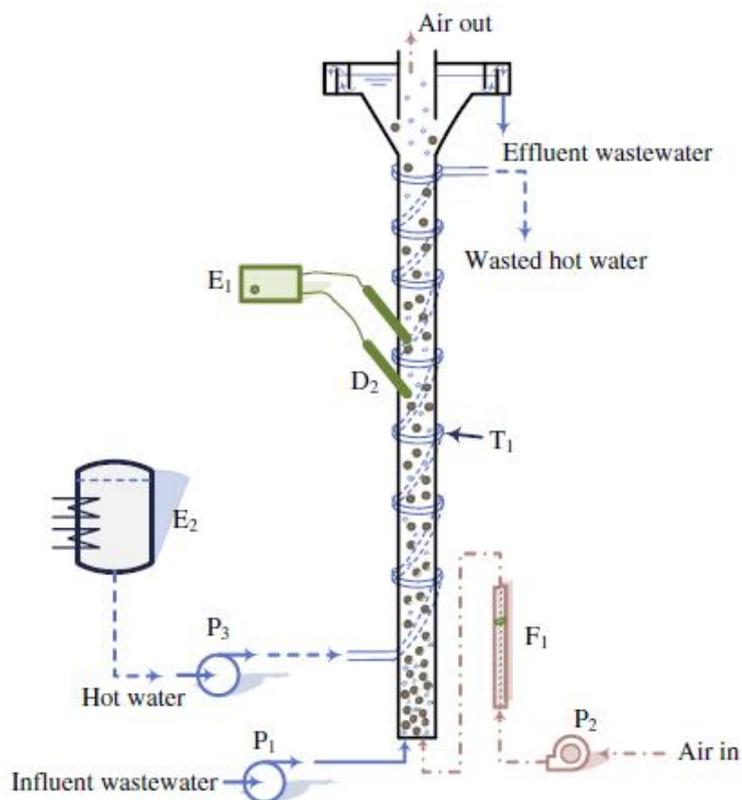
allontanate con l'effluente. Il flusso d'aria veniva controllato mediante un flussimetro in modo che la velocità ascensionale fosse di  $1,9 \text{ cm sec}^{-1}$ . Il tempo di permanenza idraulica è stato invece imposto pari a 2,5 ore. I granuli si cominciarono a sviluppare dopo circa 40 giorni. Gli elevati sforzi di taglio e i bassi valori di HRT furono, secondo gli autori, i parametri che più di tutti hanno inciso sul processo di granulazione. Gli sforzi di taglio infatti hanno promosso una sensibile produzione di EPS, mentre i bassi valori di HRT hanno consentito di dilavare la biomassa che non era in grado di aggregarsi in biofilm consentendo così di applicare una pressione di selezione metabolica sulla biomassa. Nel corso delle prime tre settimane i granuli erano pressoché assenti, e solo dopo 4 settimane iniziarono ad osservarsi i primi aggregati con diametri compresi tra 0,2 e 0,4 mm. In seguito gli autori riportarono che fu osservato un rapidissimo sviluppo di nuovi granuli il cui numero cresceva in maniera sensibile. Grazie al sistema di separazione solido-liquido che gli autori hanno adottato, i densi granuli che si erano formati venivano completamente, mantenuti nel reattore, mentre i piccoli e irregolari fiocchi di fango furono del tutto dilavati con l'effluente. Dopo 112 giorni la dimensione media dei granuli era di circa 1,4 mm. I granuli tuttavia non crebbero oltre, nonostante la concentrazione di solidi aumentasse, evidente segno della formazione di nuovi aggregati (Fig. 4.24).



**Fig.4.24:** Distribuzione granulometrica e immagini dei granuli al 42° e 112° giorno (Hosseini et al., 2014).

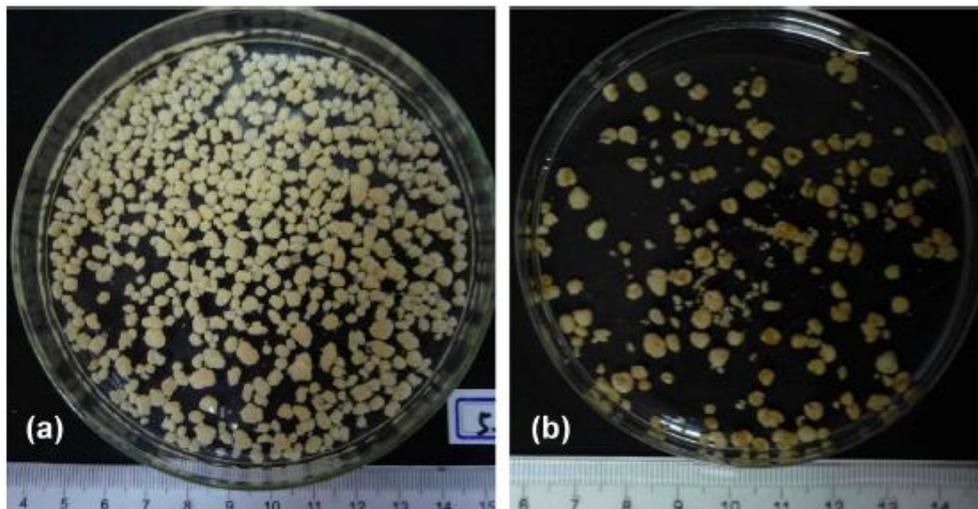
I granuli avevano un'elevatissima velocità di sedimentazione, prossima a  $55 \text{ m h}^{-1}$ . I granuli erano morfologicamente regolari e le osservazioni microscopiche non evidenziavano proliferazione di batteri filamentosi.

Un'altra esperienza, per certi versi affine, è stata condotta da **Wan et al. (2013)**. Gli autori utilizzarono un impianto colonnare analogo all'altro utilizzato dagli autori dello studio precedentemente riportato. In questo caso però, l'impianto venne inoculato con granuli coltivati in un impianti SBR. Gli autori osservarono che nell'impianto in continuo, sebbene il numero di granuli diminuì sensibilmente, la loro integrità strutturale si mantenne invariata per effetto degli elevati sforzi di taglio assicurati dalla configurazione del reattore (Fig. 4.25).



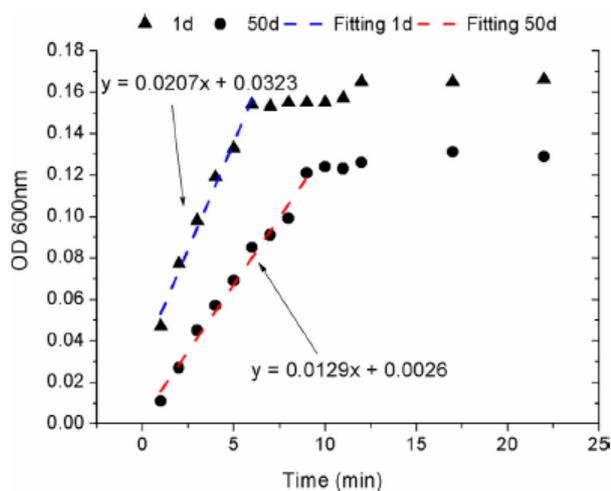
**Fig.4.25:** Schema dell'impianto colonnare in continuo (**Wan et al., 2013**).

Inoltre, dopo circa 50 giorni, sebbene il numero di granuli fosse sensibilmente inferiore rispetto a quello dell'inoculo, i granuli mostravano una resistenza strutturale significativamente maggiore (Fig. 4.26).



**Fig.4.26:** Fotografia dei granuli di inoculo e dopo 50 giorni nel reattore a flusso continuo (Wan et al., 2013).

Sottoponendo i granuli a ultrasuoni (20-25 kHz, 65W) con cicli regolari di 3 secondi, e misurando successivamente la torbidità del surnatante a 600 nm, gli autori osservarono che l'assorbanza risultava minore nei granuli dopo 50 giorni rispetto a quella dell'inoculo. Ciò metteva in evidenza una maggiore resistenza strutturale dei granuli.



**Fig.4.27:** Torbidità del surnatante del fango granulare dopo il trattamento con ultrasuoni (Wan et al., 2013).

Tutti questi studi sopra riportati, evidenziano la necessità di effettuare una efficace separazione tra la biomassa fioccosa e granulare, l'applicazione di bassi valori di HRT e degli sforzi di taglio idrodinamici per far sì che la granulazione, ovvero il mantenimento strutturale dei granuli, possa aver luogo anche in impianti a flusso continuo.

## 5.6 Bibliografia

- Angela, M., Beatrice, B., Mathieu, S., 2011. Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process. *Water Res* 45, 3776-3786.
- Beun, J.J., Hendriks, A., van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A., Heijnen, J.J., 1999. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor, *Water Research* 33, 2283-2290.
- Chen, X., Yuan, L., Lu, W., Li, Y., Liu, P., Nie, K., 2015. Cultivation of aerobic granular sludge in a conventional, continuous flow, completely mixed activated sludge system. *Front. Environ. Sci. Eng.* 9(2), 324-333.
- Chudoba, J., 1985. Control of activated sludge filamentous bulking VI formulation of basic principle, *Water Research* 19, 1017.
- Di Bella, G., Torregrossa, M., 2013. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. *Bioresource Technology*, 142, 706-713.
- Figuerola, M., Val Del Río, A., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., 2011. Treatment of high loaded swine slurry in an aerobic granular reactor, *Water Science and Technology* 63, 1808-1814.
- Hosseini, M., Baradar, A., Sahraei, E., & Ebrahimi, S., 2013. Continuous nitrifying granular sludge bioreactor: Influence of aeration and ammonium loading rate. *Process Safety and Environmental Protection*, 92 (6), 869-878.
- Hu, L., J. Wang, X. Wen, and Y. Qian, 2005. The formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactor (SBR) by seeding anaerobic granules. *Process Biochemistry* 40, 5-11.
- Juang, Y.C., Aday, S., Lee, D.J., Tay, J.H., 2010. Stable aerobic granules for continuous-flow reactors: Precipitating calcium and iron salts in granular interiors. *Bioresource and Technology*, 101, 8051-8057.
- Li, W.W., Wang, Y., K., Sheng, G.P., Yu, H.Q., 2012. Integration of aerobic granular sludge and mesh filter membrane bioreactor for cost-effective wastewater treatment. *Bioresource Technology* 122, 22-26.
- Li, X. F., Li, Y.J., Liu, H., Hu, Z.Z., Du, G.C., Chen, J., 2008. Correlation between extracellular polymeric substances and aerobic biogranulation in membrane bioreactor: *Separation and Purification Technology*, 59, 26-33.
- Li, X.F., Gao, F.S., Hua, Z.Z., Du, G.C., Chen, J., 2005. Treatment of synthetic wastewater by a novel MBR with granular sludge developed for controlling membrane fouling, *Sep. Purif. Technol.* 46, 19-27.
- Liu, H., Li, Y., Yang, C., Pu, W., He, L., Bo, F., 2012. Stable aerobic granules in continuous-flow bioreactor with self-forming dynamic membrane. *Bioresource Technology*, 121, 111-118.
- Liu, Y., Tay, J.H., 2001. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36, 1653-1665.

- Liu, Y., Tay, J.H., 2004. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22, 533-563.
- Liu, Y., Yang, S.F., Tay, J.H., 2003. Elemental compositions and characteristics of aerobic granules cultivated at different substrate N/C ratios, *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 556–561.
- Liu, Y.Q., Tay, J.H., 2007. Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 99, 980-985.
- Mishima, K., Nakamura, M., 1991. Self-immobilization of aerobic activated sludge: a pilot study of the aerobic upflowsludge blanket process in municipal sewage treatment. *Water Science & Technology* 23, 981-990.
- Morales, N., Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Mendez, R. 2012. Aerobic granular-type biomass development in a continuous stirred tank reactor. *Sep. Purif. Technol.* 89, 199-205.
- Mosquera-Corral, A., de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., 2005. Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Research* 39, 2676-2686.
- Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y., 2001. Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *J Appl Microbiol* 91, 168-175.
- Tijhuis, L., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1994. Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors, *Biotechnology and Bioengineering* 44, 595-608.
- Wan, C., Yang, X., Lee, D., Liu, X., Sun, S., Chen, C., (2014). *Bioresource Technology* Partial nitrification of wastewaters with high NaCl concentrations by aerobic granules in continuous-flow reactor. *Bioresource Technology* 152, 1–6.
- Wang, Z.W., Li, Y., Liu, Y., 2007 Mechanism of calcium accumulation in acetate-fed aerobic granule. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 467–473.
- Zhou, D., Niu, S., Xiong, Y., Yang, Y., Dong, S., 2014. Microbial selection pressure is not a prerequisite for granulation: Dynamic granulation and microbial community study in a complete mixing bioreactor. *Bioresource and Technology*, 161, 102-108.

## Capitolo 5

### Analisi sperimentale sul trattamento di slops

#### 5.1 Introduzione e obiettivi dello studio

Uno degli obiettivi di questa tesi è stato quello di valutare la trattabilità di reflui prodotti dalle attività navali, mediante sistemi biologici a biomassa granulare. Nella fattispecie, tali reflui provengono prevalentemente dal lavaggio delle cisterne delle petroliere e vengono comunemente denominati slops. Il lavaggio delle cisterne avviene con acque di mare additivate con tensioattivi, e per tale motivo le acque che derivano da tale attività risultano essere contaminate da idrocarburi, tensioattivi appunto, metalli che derivano dall'usura dei serbatoi, e chiaramente da elevate quantità di cloruri, contenuti nell'acqua di mare (Figura 5.1).



**Figura 5.1:** Operazione di lavaggio della cisterna di una petroliera.

Lo scarico in mare di tali reflui è proibito da normative internazionali (**IMO/MARPOL 73/78**) e, in particolare, la norma impone che per lo scarico in mare sia rispettato il limite per gli idrocarburi totali (TPH) di 5 ppm. Per gli altri parametri di qualità, quali il COD, il BOD<sub>5</sub> e i solidi sospesi totali, si fa riferimento

al D.Lgs 152/06. Di conseguenza, gli slops necessitano di trattamenti specifici in appositi impianti di trattamento, ma a causa della scarsa biodegradabilità della matrice organica e la contestuale presenza di cloruri, il cui effetto inibitorio sulla biomassa è ben noto, il loro trattamento mediante un sistema biologico risulterebbe di difficile applicabilità.

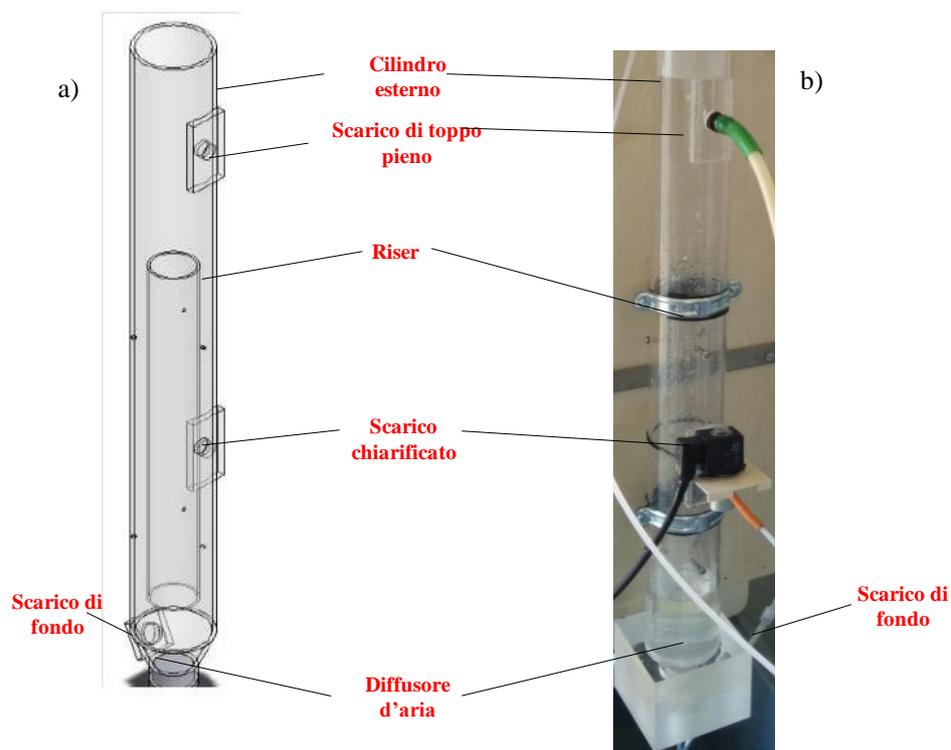
Nella letteratura scientifica di settore vengono proposte differenti soluzioni per il trattamento biologico degli slops con o senza pretrattamenti. Solitamente i pretrattamenti sono sempre applicati a monte dell'impianto biologico vero e proprio, e consistono in un trattamento di disoleatura seguito da un processo chimico-fisico di chiariflocculazione finalizzato a rimuovere in gran parte le sostanze più leggere come gli idrocarburi e parte del materiale particolato difficilmente biodegradabile. La contestuale presenza di agenti emulsionanti fa sì che una significativa aliquota di idrocarburi passa in soluzione, rimandando di fatto ai trattamenti a valle il compito di ridurre la concentrazione nel rispetto dei limiti normativi. Tra i sistemi biologici maggiormente adottati ci sono gli MBR e MBBR eventualmente integrati, particolarmente adatti a tale scopo da un lato per la loro compattezza, che permetterebbe la loro installazione direttamente a bordo delle navi stesse (**Di Bella et al., 2013**), e dall'altro per la qualità dell'effluente che tali sistemi sono in grado di assicurare. Entrambi i sistemi infatti, assicurano elevate efficienze depurative nei confronti delle sostanze più difficilmente biodegradabili grazie all'elevato tempo di contatto tra la biomassa e gli inquinanti stessi e, inoltre, la filtrazione su membrana è in grado di assicurare elevatissimi standard qualitativi dell'effluente. Tuttavia tali sistemi presentano alcune problematiche gestionali, quali il *fouling* della membrana, aggravato pesantemente dalla presenza del sale, e l'attecchimento della biomassa sui supporti mobili. Tra le tecnologie di ultima generazione nell'ambito del trattamento delle acque reflue, e in particolare di quelle di origine industriale, quella dei fanghi granulari si è dimostrata essere molto efficace proprio nel trattamento di complesse matrici organiche, mostrando elevate performance depurative e al contempo un'elevata resistenza ai composti tossici (**Abdullah et al., 2013; Di Bella e Torregrossa, 2014**). Tra l'altro, le eccellenti caratteristiche di sedimentabilità dei granuli aerobici, la loro struttura stratificata che consente il contestuale sviluppo al loro interno di reazioni aerobiche/anossiche/anaerobiche e l'elevata ritenzione di biomassa, fa sì che tali sistemi richiedano minori volumi di reazione, risultando in impianti molto compatti.

L'obiettivo della sperimentazione che viene descritta in questo capitolo è stato quello di analizzare la trattabilità degli slops con biomassa aerobica granulare. Nel dettaglio, è stato analizzato lo start-up (o fase di coltivazione) di un impianto a biomassa granulare a partire da un inoculo di fango attivo, focalizzando l'attenzione sulle caratteristiche morfologico-strutturali dei granuli, nonché le performance biologiche una volta raggiunte le condizioni di stazionarietà. Al fine di valutare gli effetti di eventuali variazioni di composizione dello slop, sia sulle

rese depurative che sulla stabilità dei granuli, sono state studiate due differenti condizioni operative in termini di carico organico e di idrocarburi totali (TPH).

## 5.2 Materiali e Metodi

Per la sperimentazione è stato utilizzato un reattore di tipo colonnare con configurazione ad airlift (SBAR) (Figura 5.2). Tale tipo di configurazione, come già detto nei precedenti capitoli, favorisce una più rapida formazione dei granuli aerobici che oltretutto risultano strutturalmente più resistenti e che quindi meglio si prestano al trattamento di reflui di origine industriale. Il reattore in questione era costituito da un cilindro esterno dal diametro esterno di 100 mm e interno di 94 mm alto 1 metro, e da un ulteriore cilindro interno coassiale al precedente, di diametro esterno di 60 mm e interno di 54 mm e altezza 0,55 m, avente la funzione di riser. Il volume operativo era pari a 3,5 L, di conseguenza l'altezza della colonna idrica nel reattore era pari a 70 cm. A metà dell'altezza della colonna è stata posta la quota di scarico dell'effluente. A tal fine è stato predisposto un foro del diametro di  $\frac{3}{4}$ " opportunamente filettato a cui è stato collegato un portagomma su cui è stato a sua volta inserito un tubicino al silicone di diametro interno pari a 8 mm. Tale tubo è stato collegato ad un'elettrovalvola del tipo "pinza-tubo", che se non alimentata elettricamente schiacciava il tubo impedendo l'uscita della miscela aerata, mentre quando riceveva l'impulso elettrico si apriva consentendo lo scarico del chiarificato. In asse al riser, sul fondo del reattore, è stato collocato un diffusore a bolle fini in pietra porosa, necessario da un lato a garantire il necessario livello di ossigenazione alla biomassa, e dall'altro per consentire lo sviluppo dell'idrodinamica tipica degli impianti SBAR. Nel riser è stato realizzato un foro del diametro di circa 1,5 cm al fine di consentire lo scarico della colonna d'acqua, interna al riser stesso, sovrastante la quota dello scarico. Il riser è stato posizionato perfettamente in asse al cilindro esterno per mezzo di viti di supporto. Inoltre, la sezione interna del riser era uguale a quella della corona circolare formata dal cilindro esterno ed il riser stesso, al fine di mantenere uguali gli sforzi idrodinamici sia all'interno del riser nel flusso ascensionale, che nella corona circolare nel flusso discensionale (downcomer). Il reattore è stato equipaggiato con due valvole a sfera di  $\frac{1}{2}$ " poste una sul fondo e una al di sopra del livello di massimo riempimento, aventi rispettivamente la funzione di scarico di fondo e campionamento la prima e scarico di troppo pieno l'altra. La prima delle due era normalmente chiusa, mentre la seconda è stata mantenuta sempre aperta e collegata tramite un tubo ad un serbatoio.



**Figura 5.2:** Assonometria (a) e foto del reattore colonnare (b).

L'alimentazione del refluo avveniva mediante pompe peristaltiche collegate idraulicamente ad un serbatoio di carico dove il refluo sintetico veniva periodicamente preparato. Al fine di mantenere il campione omogeneo ed evitare la separazione gravimetrica degli idrocarburi, il serbatoio di alimentazione è stata dotata di un agitatore meccanico, che manteneva in lenta e continua miscelazione l'alimento. Lo scarico, invece, veniva raccolto in un altro serbatoio dove si accumulava un volume pari a circa 14 litri. Da quest'ultimo, previa miscelazione manuale, si prelevava un campione medio composito, utilizzato successivamente per le analisi chimico-fisiche.

L'aerazione avveniva per mezzo di una soffiante e di un diffusore poroso posto, come già detto, sul fondo del reattore e in asse al riser. In linea con il circuito dell'aria compressa è stato inserito un flussimetro necessario a regolare la portata d'aria da alimentare alla colonna.

Il layout generale dell'impianto è riportato in Figura 5.3.

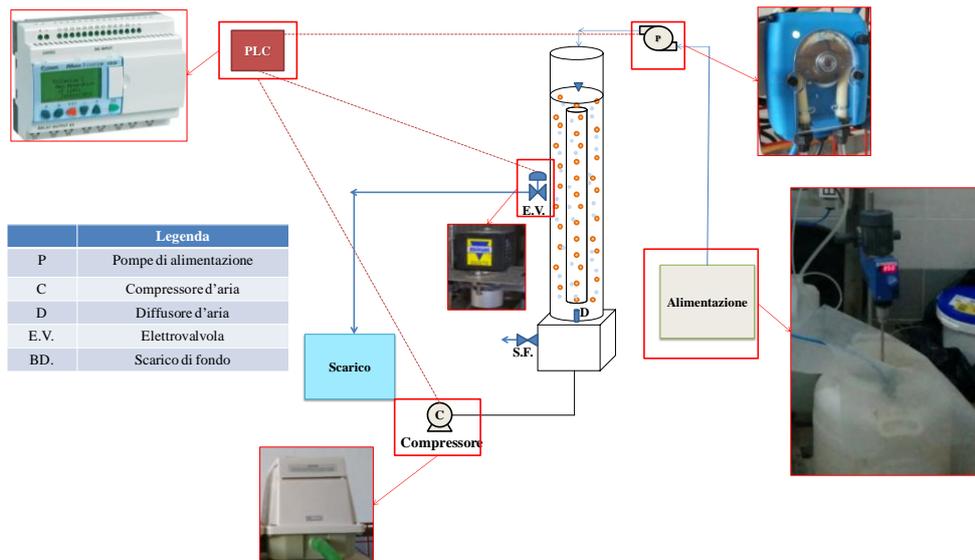


Figura 5.3: Layout generale dell'impianto e utenze elettriche utilizzate.

Tutte le utenze elettriche sono state collegate ad un PLC che opportunamente programmato ne comandava l'accensione e lo spegnimento in accordo alla temporizzazione del ciclo (Figura 5.4).

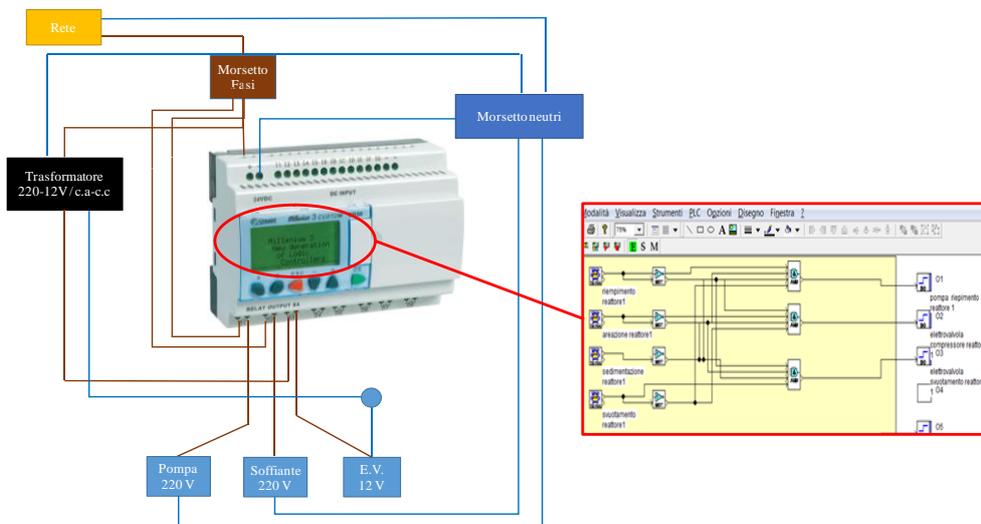


Figura 5.4: Schema di cablaggio e interfaccia grafica del software di programmazione.

### 5.3 Campagna di analisi e metodiche analitiche

Nel corso della campagna sperimentale sono state effettuate analisi chimico-fisiche sia sulla miscela aerata, al fine di analizzare le caratteristiche strutturali dei granuli aerobici, nonché la loro evoluzione nel tempo, che sull'influente ed effluente, in modo da studiare le performance depurative del sistema, entrambe con una frequenza di due volte alla settimana.

#### 5.3.1 Analisi sulla miscela aerata

Per quanto riguarda la caratterizzazione della miscela aerata, sono state effettuate analisi di solidi sospesi totali e volatili, del contenuto d'acqua e di EPS, di idrofobicità, densità e di sedimentabilità dei granuli. Infine sono state effettuate analisi granulometriche e microscopiche volte ad analizzare l'evoluzione delle dimensioni medie degli aggregati nonché della loro morfologia. I solidi sospesi totali e volatili sono stati determinati mediante filtrazione di un noto volume di fango su membrana a 0,45  $\mu\text{m}$  e successiva essiccazione (105°C) ed incenerimento (550°C) in stufa e forno a muffola in accordo alle metodiche **APHA, (2005)**. A causa dell'elevata salinità, il filtro è stato lavato con acqua deionizzata al fine di favorire il dilavamento di eventuali sali intrappolati nel bulk. Il contenuto d'acqua invece è stato calcolato come la differenza relativa tra il peso del fango separato dall'acqua tramite centrifugazione a 4000 rpm, e il peso dello stesso dopo essiccazione in stufa a 105°C (**Liu et al., 2012**).

Per l'analisi delle EPS è stata eseguita la stessa procedura di estrazione riportata da **Le-Clech et al. (2006)** e mostrata in Figura 5.5, che consiste in una doppia procedura di estrazione delle EPS solubili (SMP) mediante centrifugazione a 5000 rpm per 5 minuti, seguita da una seconda per l'estrazione delle EPS legate (EPS bound) mediante metodo un metodo combinato, termico (riscaldamento in bagno termostato a 80°C per 10 minuti) e meccanico (centrifugazione a 7000 rpm per 10 minuti). In entrambi i casi le fasi liquide ottenute vengono filtrate a 0,2  $\mu\text{m}$  per essere certi che il campione sia privo di biomassa. Successivamente per ciascuna delle due frazioni, SMP ed EPS, è stato determinato il contenuto di proteine e carboidrati secondo rispettivamente il metodo del Folin (**Lowry et al., 1951**) e dell'Antrone (**Dubois et al., 1956**).

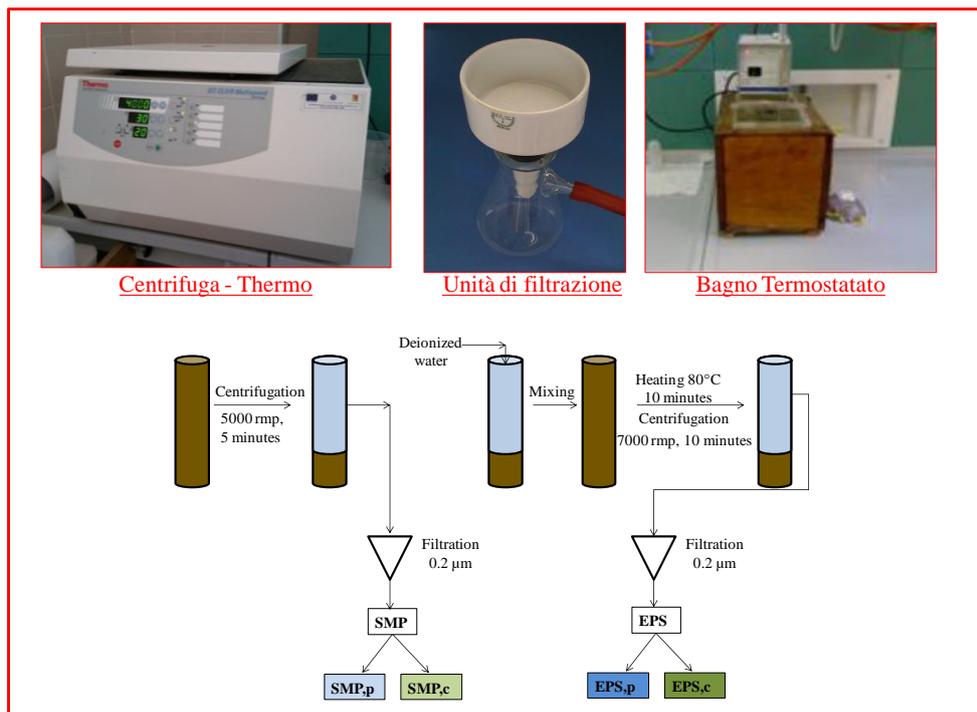


Figura 5.5: Schema per l'estrazione delle EPS secondo l'heating-method.

L'idrofobicità è stata calcolata in accordo alla metodica proposta da **Rosenberg, (1980)** che consiste in successivi passaggi di centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti finalizzati alla rottura dei fiocchi/granuli per la liberazione dei batteri filamentosi e lavaggi con una soluzione tampone (Pum Buffer), al termine della quale si legge l'assorbanza a 540 nm che fornisce un valore iniziale. Successivamente, a una parte di campione (4 mL) viene aggiunto 1 mL di n-Esadecano e il campione risultante è incubato a 30°C per 10 minuti e dopo agitazione lasciato a sedimentare per 60 minuti. In questo tempo, i batteri filamentosi si legano all'esadecano per via della loro affinità verso le matrici idrocarburiche, e nel campione si separano una fase contenente l'idrocarburo e i filamenti, e la restante parte del campione priva di essi. Di questa si rilegge l'assorbanza a 540 nm, e l'idrofobicità viene calcolata come differenza relativa del valore precedentemente iniziale con quest'ultimo, secondo l'equazione 5.1.

$$Idrofobicità = \frac{Abs, iniziale - Abs, finale}{Abs, iniziale} \times 100 \quad [eq. 5.1]$$

La densità è stata calcolata in accordo al metodo proposto da **Beun et al. (2002)**. Nel dettaglio è stata utilizzata una soluzione a  $1 \text{ g L}^{-1}$  di Blu Destrano di cui era nota l'assorbanza a  $620 \text{ nm}$ . L'analisi consiste nel miscelare  $100 \text{ mL}$  di soluzione di Blu destrano a  $1 \text{ g L}^{-1}$  con  $100 \text{ mL}$  di fango per un paio di minuti, successivamente si lascia sedimentare il fango per una decina di minuti e, infine, si legge l'assorbanza del surnatante (frazione  $F_1$ ). Il principio di tale metodica consiste nel fatto che il Blu Destrano miscelato con il fango, si lega con l'acqua contenuta al suo interno diluendosi. Di conseguenza la sua assorbanza si riduce in misura tanto maggiore quanta è l'acqua contenuta nel fango. In buona sostanza dunque, consiste in una misura diretta del contenuto d'acqua del fango per cui indirettamente si risale alla misura del peso del fango senza acqua per unità di volume, ovvero alla sua densità, secondo l'equazione 5.2.

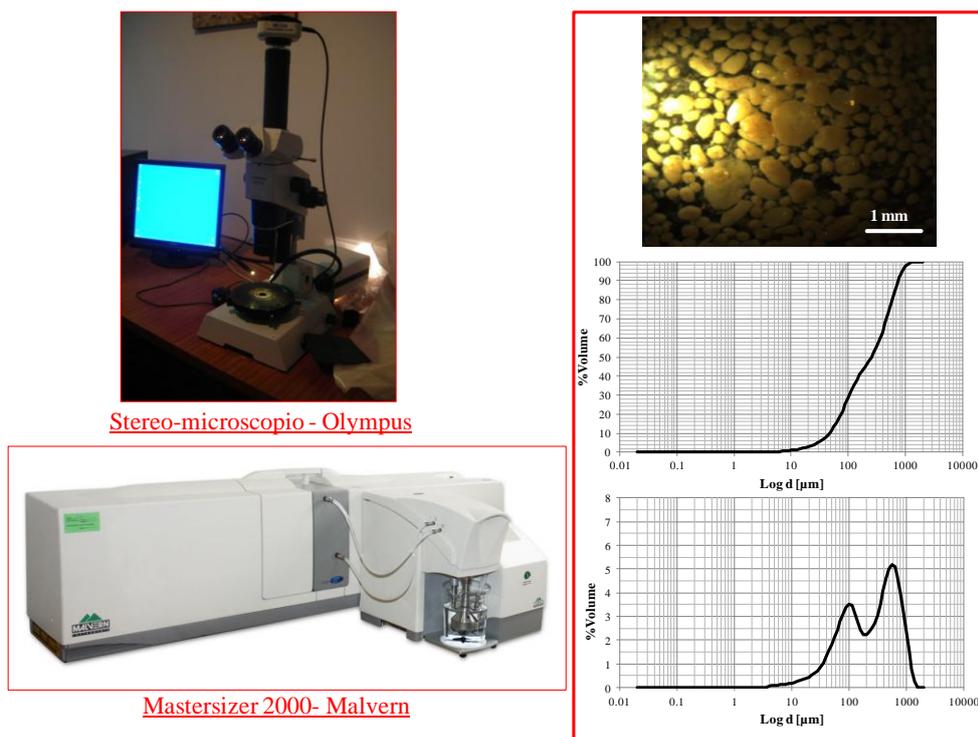
$$\rho = \frac{SST(V_{DB} + V_{ML})}{V_{fb}} \quad [eq. 5.2]$$

dove  $\rho$  è la densità del fango ( $\text{gTSS L}_{\text{fango}}^{-1}$ ), SST è la concentrazione di solidi sospesi totali ( $\text{gTSS L}^{-1}$ ),  $V_{DB}$  e  $V_{ML}$  sono rispettivamente il volume di Blu Destrano e di mixed liquor utilizzati per la prova.  $V_{fb}$  è invece calcolata mediante la seguente espressione:

$$V_{fb} = V_{DB} + V_{ML} - \left( V_{DB} \cdot \frac{\alpha_{DB}}{\alpha_{F1}} \right) \quad [eq. 5.3]$$

La sedimentabilità dei granuli è stata valutata mediante il calcolo dello Sludge Volume Index (SVI) a 5 e 30 minuti.

Le analisi granulometriche sono state effettuate in una prima fase con un granulometro laser della Malvern (Mastersizer 2000), in grado di restituire la distribuzione granulometrica delle particelle da  $0$  a  $2$  millimetri. Per tale ragione, in un secondo momento, ovvero quando le dimensioni dei granuli superavano appunto i  $2$  millimetri di diametro, le dimensioni medie dei granuli sono state calcolate mediante analisi statistica condotta a partire dalle misure dei granuli effettuate tramite un software (Leica IM50) su immagini ottenute da uno stereomicroscopio (ingrandimenti  $7\times$ ). Le immagini sono state altresì utilizzate come fonte per l'analisi morfologica dei granuli. Le apparecchiature utilizzate sono illustrate in Figura 5.6.



**Figura 5.6:** Apparecchiature utilizzate per l'analisi granulometrica e morfologica dei granuli.

### 5.3.2 Analisi chimiche sull'influente/effluente

Nell'alimento e nello scarico sono state effettuate, con cadenza bisettimanale, analisi relative al contenuto organico (TOC, COD, BOD), ai nutrienti ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ , TN, Ptot) e infine agli idrocarburi (TPH). Relativamente alla sostanza organica si è scelto di utilizzare come indicatori sia parametri indiretti come COD e BOD che diretti come il TOC.

Per quanto riguarda il COD è stato determinato utilizzando i kit Spectroquant della Merck, su un campione precedentemente filtrato a  $0,45 \mu\text{m}$ , per tanto da ora in avanti con COD si farà riferimento al COD solubile. Relativamente a questo parametro, la presenza del sale, e dei cloruri in particolare, può avere significative interferenze positive. Al fine di limitare il più possibile tali interferenze, il campione da analizzare veniva diluito in modo che la concentrazione dei cloruri venisse ridotta ad un valore inferiore al limite di interferenza della metodica.

Per la determinazione del  $\text{BOD}_5$  è stato utilizzato un metodo respirometrico mediante l'utilizzo del misuratore di BOD Velp. Un noto volume di campione, in funzione del range di lettura adottato, veniva messo all'interno di bottiglie in vetro

scuro e mantenuto in lenta agitazione. Su queste bottiglie vengono avvitati dei particolari tappi filettati, che permettono di rilevare la pressione nell'intercapedine tra lo spazio vuoto e l'interfaccia del liquido, mediante un piccolo trasduttore collegato ad un microprocessore. In un apposito tappo di gomma venivano inserite delle pastiche di idrossido di sodio, al fine di bloccare la CO<sub>2</sub> prodotta dal metabolismo batterico. L'apparecchio di misura rilevava la riduzione della pressione dovuta dal consumo dell'ossigeno da parte dei batteri e calcolava in automatico il valore del BOD del campione.

Per la misura dei composti azotati, eccetto che per i nitrati, e per il fosforo, non sono state applicate diluizioni, in quanto le rispettive metodiche non riportavano significative interferenze con i cloruri. Per la misura dei nitrati invece è stato utilizzato uno specifico kit per acque saline.

La determinazione dell'azoto totale (TN) e del carbonio organico totale è stata condotta mediante l'utilizzo dell'analizzatore TOC-VCSN della Shimadzu. Per l'analisi del TOC, tale apparecchio effettua una pirolisi del campione e successivamente mediante la lettura a infrarosso del biossido di carbonio prodotto risale alla misura del carbonio totale nel campione. Successivamente, mediante acidificazione e successiva lettura sempre del biossido di carbonio, lo strumento misura la frazione inorganica del campione. In questo modo, per differenza tra il carbonio totale e quello inorganico si risale alla misura del carbonio organico totale.

Per l'analisi dei TPH è stato necessario per prima una fase di estrazione dei composti idrocarburici con esano, successivamente la misura è stata effettuata con un gas-cromatografo dotato di un rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID). I TPH sono stati misurati solo nel primo periodo e a partire dal 33° giorno. Contestualmente, con cadenza settimanale, sono state effettuate analisi sugli idrocarburi aromatici. Per tale misura si è utilizzato un campionatore HC METER della 3S A S.r.l. Il principio di funzionamento di questo campionatore si basa sulla fluorescenza: quando colpite da un raggio a una lunghezza d'onda specifica (eccitazione), alcune sostanze chimiche riemettono ad una lunghezza d'onda più lunga. L'emissione della luce viene, quindi, rilevata da un fotomoltiplicatore ad elevata sensibilità in grado di rilevare anche concentrazioni di pochi ppm. Prima di effettuare la misura, in caso di campioni estremamente torbidi, è risultato necessario un pre-trattamento per la rimozione della torbidità.

#### 5.4 Caratterizzazione degli slops

Per la sperimentazione si sono utilizzati slops reali e sintetici. Gli slops reali provenivano dall'aerea portuale di Augusta, in provincia di Siracusa, e subivano un trattamento preliminare di disoleatura (Fig.5.7).



**Figura 5.7:** Foto degli slops prelevati presso l'area portuale di Augusta (SR) (Di Bella et al., 2014).

Le caratteristiche medie degli slop a valle di tale pretrattamento, e relative ai due campionamenti effettuati nel corso della tesi, sono riportati in Tabella 5.1.

**Tabella 5.1:** Caratteristiche medie degli slops a valle del sistema di disoleatura

Parametro	Concentrazione [ $\text{mg L}^{-1}$ ]
<b>COD</b>	3215
<b>BOD</b>	2225
<b>TC</b>	928
<b>IC</b>	238
<b>TOC</b>	690
<b>NH<sub>4</sub>-N</b>	10
<b>Cl<sup>-</sup></b>	23455
<b>Br<sup>-</sup></b>	411
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	3541
<b>TPH</b>	18.2
<b>Tensioattivi</b>	20
<b>SST</b>	1230
<b>SSV</b>	456

A causa della difficoltà di reperire i volumi di slop reali richiesti per la sperimentazione, è stato necessario produrre una parte di essi in laboratorio. Previa caratterizzazione dei principali composti dello slop reale, quali metalli, tensioattivi, TPH, COD, azoto e fosforo, si è provveduto alla preparazione di una ricetta sintetica che avesse le medesime concentrazioni dello slop reale almeno per gli inquinanti di riferimento. Lo slop sintetico era costituito da una soluzione di metalli, tensioattivi e gasolio, con le concentrazioni appresso riportate.

- 2 mg/L di Pb sotto forma di  $\text{PbSO}_4$
- 2 mg/L di Cu sotto forma di  $\text{CuSO}_4$
- 2 mg/L di Mn sotto forma di  $\text{MnSO}_4$
- 2 mg/L di Zn sotto forma di  $\text{ZnSO}_4$
- 2 mg/L di Mg sotto forma di  $\text{MgCl}_2$
- Tensioattivo SDBS: 18mg/L
- Gasolio: 20 mg/L
- 90 mg/L di Azoto sotto forma di  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 30 mg/L di Fosforo sotto forma di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

L'aggiunta di azoto e fosforo è stata necessaria al fine di evitare fenomeni inibitori per la biomassa, dovuti alla carenza di nutrienti, diversi da quelli che potessero essere esercitati dal sale e dagli idrocarburi. Come fonte di carbonio organico è stato utilizzato acetato di sodio. Lo slop sintetico veniva preparato in due soluzioni concentrate separate, una contenente i metalli e l'altra il tensioattivo, al fine di evitare la formazione di precipitati insolubili. Successivamente le due soluzioni concentrate venivano diluite con acqua di rete fino al raggiungimento della concentrazione desiderata.

Al fine di creare un refluo con caratteristiche quanto più simili possibile a quello reale, lo slop reale è stato miscelato a quello sintetico con differenti rapporti in volume nel corso della sperimentazione. Nel dettaglio, come verrà spiegato nel successivo paragrafo, in una prima fase della sperimentazione, ovvero in quella di coltivazione, si è preparata una miscela al 20% di slop reale, e all'80% di sintetico, mentre nella successiva, in concomitanza con un nuovo rifornimento di refluo reale, si è incrementata la percentuale di slop reale al 40%, al fine di valutare gli effetti della variazione, e soprattutto dell'incremento di carico, sulla stabilità dei granuli nonché sulle performance del sistema.

## 5.5 Set-up sperimentale

La sperimentazione ha avuto una durata complessiva di 158 giorni, di cui i primi 100 dedicati alla coltivazione del fango granulare e al raggiungimento delle condizioni stazionarie, mentre nei secondi 58 giorni, si sono valutati gli effetti dell'incremento di carico sulla stabilità strutturale dei granuli e sulle performance biologiche del sistema. L'impianto è stato inoculato con fango attivo prelevato da un impianto pilota BF-MBR che trattava slop (**Campo et al., 2016**), che era stato precedentemente acclimatato agli slops nel corso di circa 7 mesi, incrementando in maniera progressiva la percentuale di refluo nell'alimento. Come accennato nel precedente paragrafo, al fine di ottenere un refluo influente che avesse caratteristiche più simili possibili al refluo reale, è stata preparata una miscela di slop reale e sintetico con differenti rapporti volumetrici nel corso dell'intera

sperimentazione. In dettaglio, nel primo periodo, l'influente era costituito da una miscela di slop reale e sintetico rispettivamente pari al 20% e 80% in volume, mentre nel successivo periodo sperimentale, la percentuale di alimento reale nell'alimento è stata incrementata al 40%, e in concomitanza con un nuovo carico di slop, si è aumentato il carico influente. In Tabella 5.2 sono riassunte le caratteristiche del refluo in ingresso al reattore nei due periodi della sperimentazione.

**Tabella 5.2:** Caratteristiche degli influenti nei due periodi sperimentali

Parametro	Fase I	Fase II	U.M.
<b>COD</b>	1350±50	1850±50	mg L <sup>-1</sup>
<b>BOD<sub>5</sub></b>	1150±50	1250±50	mg L <sup>-1</sup>
<b>TOC</b>	550±25	650±25	mg L <sup>-1</sup>
<b>N-NH<sub>4</sub></b>	105±5	405±5	mg L <sup>-1</sup>
<b>N<sub>tot</sub></b>	115±10	105±5	mg L <sup>-1</sup>
<b>P<sub>tot</sub></b>	25±3	25±3	mg L <sup>-1</sup>
<b>TPH</b>	6.8±1.5	13±1.5	mg L <sup>-1</sup>
<b>Idrocarburi aromatici</b>	1.18±0.25	2±0.25	mg L <sup>-1</sup>
<b>Cloruro</b>	25000	25000	mg L <sup>-1</sup>
<b>Pb</b>	< 2	< 2	mg L <sup>-1</sup>
<b>Cu</b>	< 2	< 2	mg L <sup>-1</sup>
<b>Mn</b>	< 2	< 2	mg L <sup>-1</sup>
<b>Zn</b>	< 2	< 2	mg L <sup>-1</sup>
<b>Tensioattivi (SDBS)</b>	30±3	30±3	mg L <sup>-1</sup>

In accordo con altri studi di letteratura relativi al trattamento di reflui industriali, al fine di favorire la degradazione dei composti difficilmente biodegradabili, e per ragioni legate alla stabilità dei granuli, la durata del ciclo di reazione è stata imposta pari a 12 ore. In dettaglio, il ciclo prevedeva una fase di alimentazione di 30 minuti, una successiva di aerazione della durata di 680 minuti e, infine, le fasi di sedimentazione e scarico entrambe pari a 5 minuti (Tab. 5.3). Solitamente nei sistemi a biomassa granulare, si è soliti imporre pressioni di selezione idraulica maggiori, che, tenendo conto della geometria del reattore, corrisponderebbero a tempi di sedimentazione inferiori, nell'ordine di 2-3 minuti. In questo caso, si è scelto di adottare tempi di sedimentazione maggiori per via della maggiore densità del bulk liquido dato dalla presenza di elevate concentrazioni saline, che determinavano l'incremento della spinta di galleggiamento sulle particelle solide e

di conseguenza aumentavano indirettamente la pressione di selezione idraulica. L'altezza idrica che sovrastava la quota dello scarico era pari a 35 cm, di conseguenza la selezione idraulica imposta era tale da consentire il mantenimento nel sistema delle sole particelle che sedimentavano con velocità superiori a  $4,2 \text{ m h}^{-1}$

**Tabella 5.3:** Suddivisione del ciclo di reazione

Ciclo	Alimentazione	Aerazione	Sedimentazione	Scarico
[min]	[min]	[min]	[min]	[min]
720	30	680	5	5

L'alimento veniva caricato dall'alto con una portata di 1,75 L per ciclo ( $3,5 \text{ L giorno}^{-1}$ ). Il chiarificato veniva scaricato mediante l'elettrovalvola del tipo "pinza-tubo" posta a metà della colonna idrica. In tal modo il rapporto di scambio volumetrico era pari al 50%, e di conseguenza il tempo di residenza idraulico (HRT) era pari a 24 ore. I principali parametri operativi sono sinteticamente riportati in tabella 5.4. Il carico organico volumetrico (OLR) era pari a  $1,3 \text{ KgCOD KgVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $1,8 \text{ KgCOD KgVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  rispettivamente nel periodo 1 e 2. Il carico del fango ( $C_f$ ) invece risultava essere funzione della concentrazione di biomassa nel sistema. A causa delle continue fluttuazioni di quest'ultima, derivante dall'instabilità strutturale dei granuli che verrà appresso discussa, al fine di mantenere questo parametro pressoché costante venivano effettuati degli spurghi controllati di biomassa in accordo a quanta ne veniva dilavata con l'effluente. Per tanto si è operato con un valore del carico del fango mediamente pari a  $0,41 \pm 0,25 \text{ KgBOD KgVSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Tab.5.4).

L'aria veniva introdotta dal fondo del reattore mediante il diffusore a bolle fini con una portata d'aria pari  $3,5 \text{ L min}^{-1}$  in modo che l'intensità degli sforzi di taglio, espressi in termini di velocità del flusso d'aria ascensionale, risultasse pari a  $2,4 \text{ cm sec}^{-1}$ . Anche in questo caso, sebbene il valore degli sforzi di taglio applicato risulta essere superiore a quello minimo necessario per la granulazione pari a  $1,2 \text{ cm sec}^{-1}$  (Tay et al., 2004), risulta essere inferiore a quello applicato nella maggiorparte degli studi presenti in letteratura. Tale scelta è stata determinata dalla presenza di elevate quantità di tensioattivo che producevano una grandissima quantità di schiuma la quale trascinava della colonna trasportando con se ingenti quantità di biomassa. Al fine di limitare la formazione di schiume, il flusso d'aria è stato imposto pari a  $3,5 \text{ L min}^{-1}$ , valore che da un lato permetteva il mantenimento di sforzi di taglio di intensità sufficienti, e dall'altro limitava la formazione di schiume in quantità eccessive. Come anticipato nel precedente paragrafo, gli slops erano caratterizzati da un forte sbilanciamento di nutrienti. Al fine di evitare fenomeni di inibizione alla biomassa che non fossero riconducibili alla presenza dei cloruri e agli idrocarburi, alla miscela influente sono stati aggiunti cloruro di

ammonio e fosfato di potassio rispettivamente come fonte di azoto e fosforo, in modo che nel refluo il rapporto tra i nutrienti risultasse pari a 100:10:1 (C:N:P).

**Tabella 5.4:** Parametri operativi nei due periodi

VER	OLR	$C_r$	Sforzi di taglio	C:N:P
[%]	[KgCOD m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ]	[KgBOD KgVSS <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	[cm sec <sup>-1</sup> ]	[-]
50	1,3(I) – 1,8 (II)	0.41±0.25	2.4 (I) – 1.6 (II)	10:1

## 5.6 Risultati e discussioni

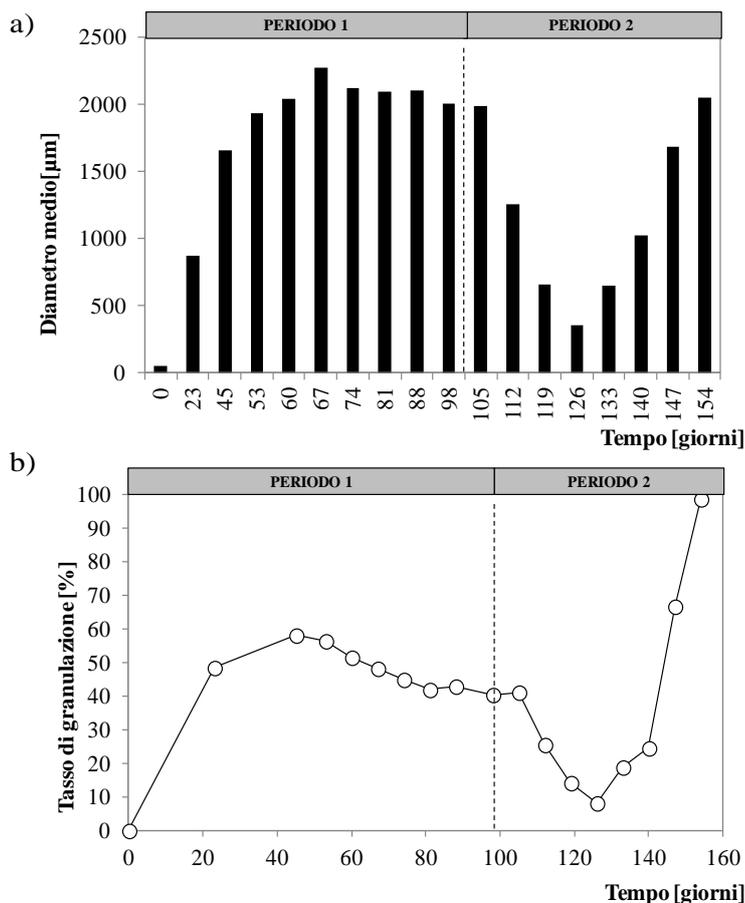
Nel seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti nei due periodi sperimentali. Nel dettaglio sono analizzate le caratteristiche dei granuli aerobici formati a partire da una matrice molto complessa, e le performance depurative, focalizzando l'attenzione, in particolare, sulla rimozione dei composti idrocarburici. Infine, alla luce dei risultati esposti, sono tratte le considerazioni conclusive in merito alla potenzialità dei granuli aerobici per il trattamento degli slops.

### 5.6.1 Coltivazione e caratteristiche dei granuli aerobici

#### 5.6.1.1 Formazione e morfologia dei granuli aerobici

Come anticipato nell'introduzione a questo capitolo, la biomassa utilizzata per l'inoculo dell'impianto è stata prelevata da un impianto BF-MBR che trattava la stessa matrice. La biomassa in tale impianto era stata acclimatata agli slop in maniera progressiva, incrementando la frazione di slop nell'alimento nel corso di circa 7 mesi. Per ulteriori dettagli si rimanda il lettore al lavoro svolto da **Campo et al. (2016)**. Tale biomassa aveva operato con un carico organico inferiore rispetto a quello previsto per l'impianto granulare, pertanto al fine di evitare disfunzioni di processo connesse a shock di carico, nel corso dei primi 25 giorni il carico organico è stato gradualmente aumentato dal valore a cui la biomassa operava in precedenza (0,8 KgCOD m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>) al valore di 1,3 KgCOD m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>.

I primi granuli sviluppati a partire dal 15° giorno, erano caratterizzati da una dimensione di poco superiore a millimetro, e gradualmente il loro diametro raggiunse valori nell'ordine dei 2 millimetri dopo 30 giorni. Da questo giorno in poi, i granuli erano prevalenti nel reattore, con un tasso di granulazione di poco inferiore al 60% (Figura 5.8 a,b).

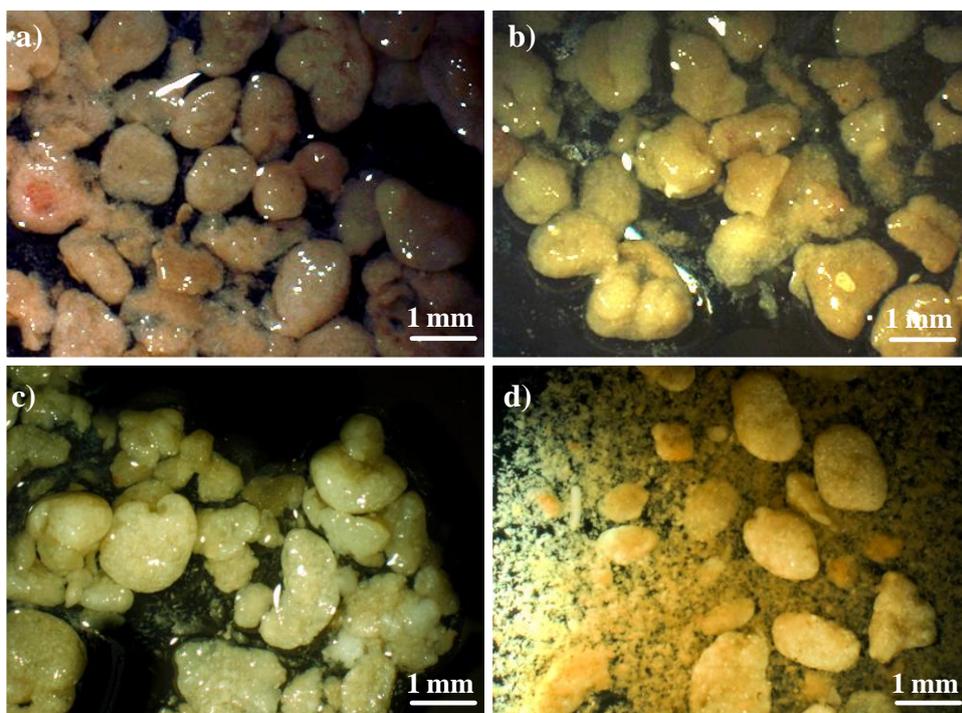


**Figura 5.8:** Andamento del diametro medio dei granuli (a) e del tasso di granulazione (b) nei due periodi sperimentali.

Il tasso di granulazione si ridusse gradualmente nel corso dei successivi giorni, attestandosi su un valore stazionario prossimo al 45% al termine del primo periodo, anche se la dimensione dei granuli rimase pressoché inalterata nello stesso periodo. La ragione di tale osservazione è da ricercare nel concetto di dimensione critica dei granuli teorizzato da **Verawaty et al. (2013)**, secondo i quali, i granuli aerobici, raggiunta una certa dimensione, diventano strutturalmente meno stabili e maggiormente suscettibili di sfaldamento rispetto a granuli di minori dimensioni. Di conseguenza, a causa di urti tra gli stessi aggregati, la parte esterna del granulo subisce un graduale processo di deterioramento che comporta la perdita degli strati dei granuli a contatto diretto col bulk. Contemporaneamente a ciò, si verifica la crescita di nuovi strati e di conseguenza crescita e sfaldamento si bilanciano. Ciò

evidentemente comportava che la dimensione media dei granuli rimanesse pressoché la stessa. Tuttavia, ciò che cambiava era il tasso di granulazione, in quanto, il materiale che si distaccava dagli stessi granuli, e che per lo più riusciva a sedimentare, determinava l'aumento della percentuale di fango fioccoso nel reattore e di conseguenza la riduzione del tasso di granulazione.

Dal punto di vista morfologico i granuli erano caratterizzati da una superficie liscia e regolare e da un colore tendente al marrone, probabilmente a causa dell'adsorbimento di materiale particolato contenuto nell'alimento (Figura 5.9).



**Figura 5.9:** Foto degli granuli al 21° (a), 42° (b), 60° (c) e 98° (d) giorno.

Nel secondo periodo, a seguito dell'incremento del carico organico alimentato (dopo il 100° giorno), i granuli subirono un severo fenomeno di sfaldamento. Gran parte degli aggregati infatti si disintegrarono, risultando nella riduzione sia del tasso di granulazione fino al 10%, che nella dimensione media dei granuli che si ridusse rapidamente fino a 0,4 mm nel corso di circa 20 giorni. Lo sfaldamento dei granuli aerobici a seguito dell'incremento del carico organico è stato precedentemente osservato in altri lavori (**Di Bella e Torregrossa, 2013**). L'incremento di carico infatti, determina la maggiore disponibilità di substrato per i microrganismi che, in ragione di ciò, come verrà successivamente dimostrato,

producono una minore quantità di prodotti di stoccaggio (EPS), la cui funzione nel mantenimento strutturale degli granuli è ben nota (Zhu et al., 2012). Successivamente, il sistema si è gradualmente adattato alle nuove condizioni operative e la nuova significativa produzione di EPS ha favorito la formazione di nuovi granuli che si sono sviluppati molto rapidamente. Il tasso di granulazione ha in breve tempo raggiunto valori prossimi al 98%, evidenziando dunque la completa maturazione del sistema granulare, mentre i granuli avevano dimensioni nell'ordine dei 2 millimetri. Rispetto al precedente periodo, in questo caso i granuli si sono riformati ancora più rapidamente, come è stato riportato da sia da Pijuan et al. (2011) che da Long et al. (2014), i quali osservarono che la granulazione da fango risultante da sfaldamento di altri granuli, è molto più rapida rispetto alla granulazione del fango attivo convenzionale. Inoltre, sebbene il carico organico non è ritenuto essere un parametro decisivo nella formazione dei granuli, infatti, come si è visto i granuli si sono formati con successo anche nel primo periodo sperimentale, può risultare decisivo nell'ottenere la completa granulazione del fango attivo. Sebbene il fenomeno dello sfaldamento dovuto al raggiungimento del diametro critico sia sempre da tenere in considerazione, è possibile che per carichi elevati, il materiale fioccoso derivante dal processo di deflocculazione si aggregi in nuovi granuli in maniera molto più rapida.

Dal punto di vista morfologico i granuli ottenuti nel secondo periodo erano caratterizzati da una superficie meno regolare rispetto a quelli del primo (Figura 5.10).

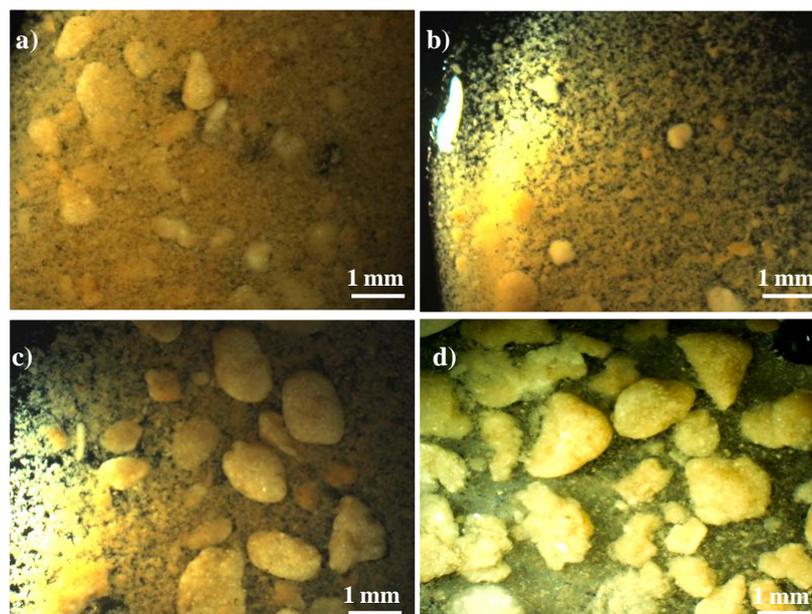
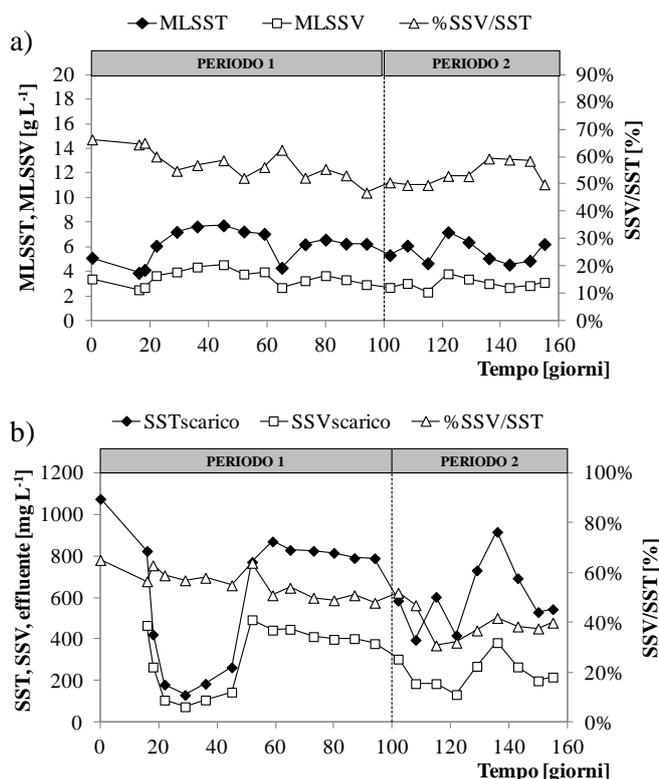


Figura 5.10: Foto degli granuli al 117° (a), 142° (b), 153° (c) e 167° (d) giorno.

Questo è presumibilmente legato alla modificazione della matrice polimerica dei granuli, che come si discuterà in seguito, era caratterizzata da una maggiore componente non legata rispetto a quella del primo periodo.

### 5.6.1.2 Analisi dei solidi sospesi nella miscela aerata e nell'effluente

In Figura 5.11 è mostrato l'andamento dei solidi sospesi volatili e totali e il loro rapporto nei due periodi sperimentali, sia nella miscela aerata (a) che nell'effluente (b).

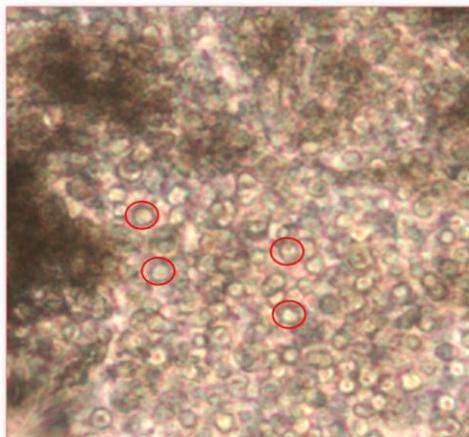


**Figura 5.11:** Concentrazione dei solidi sospesi totali e volatili nella miscela aerata (a) e nell'effluente (b).

Nel primo periodo sperimentale, la concentrazione di solidi sospesi totali, eccetto il periodo iniziale caratterizzato da un massiccio washout di biomassa dovuto alla pressione di selezione idraulica, crebbe da 4 gSST L<sup>-1</sup> a circa 8 gSST L<sup>-1</sup>, per poi stabilizzarsi intorno a 6,5 gSST L<sup>-1</sup> verso la fine del periodo osservato. Al contrario, la concentrazione di solidi sospesi volatili si mantenne pressoché costante, evidenziando anzi un lieve trend decrescente fino a circa 3,25 gSSV L<sup>-1</sup>.

In ragione di tali valori, al termine del primo periodo il rapporto SSV/SST si ridusse gradualmente fino al 50%, e sebbene lo spurgo selettivo di biomassa avrebbe dovuto prevenire l'accumulo di materiale inerte all'interno del reattore, ciò si è verificato lo stesso.

Come osservato infatti da **Pendashteh et al. (2012)**, l'adsorbimento di particelle disperse di idrocarburo all'interno dei fiocchi di fango, e in questo caso dei granuli, comporta un graduale aumento della frazione inerte nel fango. Osservazioni microscopiche hanno infatti permesso di osservare delle inclusioni di particelle di idrocarburi all'interno dei granuli aerobici (Figura 5.12).



**Figura 5.12:** Inclusione di idrocarburi all'interno dei granuli.

Non è tuttavia da escludere, anzi va probabilmente considerato come processo parallelo, l'effetto dell'adsorbimento di materiale particolato inerte all'interno dei granuli. **De Kreuk et al. (2010)** hanno osservato che i granuli hanno eccellenti capacità adsorbenti nei confronti di sostanze particolate, stante la loro elevata superficie specifica nonché l'intricato sistema di interconnessioni di canali al loro interno che li rende delle matrici adsorbenti quasi ideali. Il materiale particolato infatti tende ad aderire sulla superficie dei granuli per forze di superficie, e, in virtù di gradienti di concentrazione e della turbolenza idraulica che caratterizza i reattori granulari, tali composti lentamente migrano verso gli strati più interni attraverso la microporosità degli aggregati. È verosimile che gli idrocarburi venissero adsorbiti secondo un meccanismo simile a quanto appena descritto. Come verrà più nel dettaglio descritto nel paragrafo relativo alla rimozione degli idrocarburi, tale fenomeno non era solo di tipo fisico, anzi può essere definito come un adsorbimento di tipo reattivo, nel senso che il materiale adsorbito era soggetto, una

volta che era aderito alle superfici interne ed esterne dei granuli, a fenomeni di decadimento, presumibilmente di natura biologica.

In ogni caso, tale meccanismo ha progressivamente comportato l'aumento della frazione inerte dei granuli aerobici. Va anche considerato il fatto che lo spessore dei granuli aveva raggiunto una notevole dimensione, e come tale opponeva una discreta resistenza al trasporto diffusivo di nutrienti dal bulk verso l'interno dei granuli stessi. La conseguenza di ciò è stata con ogni probabilità l'instaurarsi di condizioni endogene/anaerobiche e la conseguente morte delle cellule batteriche presenti nel nucleo dei granuli. Ciò ha comportato la progressiva mineralizzazione del nucleo e, da un lato, l'aumento della frazione inerte e dall'altro la destabilizzazione strutturale degli aggregati. Tale meccanismo è quello che precede lo sfaldamento dei granuli in seguito al raggiungimento del loro diametro critico di cui si è in parte già discusso.

La concentrazione dei solidi sospesi allo scarico è mostrata in Figura 5.11b. Come è possibile osservare, nei primi giorni l'applicazione della pressione di selezione idraulica ha determinato un massiccio dilavamento di solidi, che si è gradualmente attenuato nelle successive settimane. In corrispondenza del raggiungimento della massima percentuale di granulazione, i solidi sospesi totali allo scarico erano circa pari a  $190 \text{ mgSST L}^{-1}$ , e successivamente, la loro concentrazione aumentò in maniera significativa fino a circa  $800 \text{ mgSST L}^{-1}$ . La perdita di stabilità dei granuli ha comportato, come precedentemente detto, da un lato l'aumento del materiale fioccoso nel reattore, e dall'altro la riduzione del tasso di granulazione, di conseguenza, parte di questo materiale fioccoso veniva dilavato, risultando nell'aumento di solidi sospesi allo scarico. La riduzione del tasso di granulazione, invece, determinava la minore capacità adsorbente del sistema nei confronti del materiale particolato influente che, pertanto, veniva in gran parte scaricato con l'effluente.

Nel secondo periodo, la concentrazione di solidi sospesi totali nel bulk si mantenne stazionaria intorno ai  $6 \text{ gSST L}^{-1}$ , mentre il rapporto SSV/SST mostrò un lieve trend crescente fino a stabilizzarsi intorno al 60% al termine del periodo osservato. La formazione di nuovi granuli in questo caso non comportò l'aumento del contenuto inerte degli aggregati. È possibile che la minore intensità degli sforzi di taglio abbia comportato la formazione di granuli meno densi rispetto al precedente periodo sperimentale. Di conseguenza, la microporosità interna risultava essere maggiore e in ragione di ciò la diffusione dei nutrienti verso l'esterno risultava meno ostacolata. Va anche detto che, a causa del massiccio sfaldamento dei granuli, gran parte degli idrocarburi precedentemente rimossi dal bulk sono stati desorbiti. Con ogni probabilità la presenza di tali composti contribuiva ad ostacolare la diffusione dei nutrienti negli strati più interni. Quindi il loro desorbimento favorì in tal senso l'aumento della frazione volatile dei granuli.

La concentrazione dei solidi allo scarico aumentò in modo significativo dopo il 100° giorno, a causa dello sfaldamento dei granuli. Verso la fine del periodo si

raggiunse una condizione di pseudo-stazionarietà, dove la concentrazione di solidi allo scarico diminuì in modo sensibile rispetto al periodo successivo allo sfaldamento. La contemporanea formazione di nuovi granuli in questo periodo favoriva l'adsorbimento di parte della frazione inerte e particolata dell'influente. Nel dettaglio i solidi allo scarico presentavano concentrazioni di circa 400 mgSST L<sup>-1</sup>, valore superiore a quanto osservato nel primo periodo. Si fa osservare però, che il rapporto tra i solidi volatili e totali allo scarico era nell'ordine del 25%. Tale valore evidenzia il fatto che la maggiorparte del materiale solido allo scarico era di natura inerte e non organica, il che lascia presupporre che i granuli non riuscivano a rimuovere efficacemente il materiale inerte influente.

### 5.6.1.3 Contenuto di EPS: effetto della salinità e degli idrocarburi sulla produzione di polimeri extracellulari

L'analisi del contenuto di EPS riveste un ruolo chiave in qualsiasi studio inerente i fanghi granulari, stante il loro ruolo di primordine sia nella formazione degli aggregati che nel loro mantenimento strutturale. È noto inoltre che in un ciclo SBR possono essere identificate dal punto di vista cinetico due fasi distinte: una prima, successiva all'alimentazione del refluo, caratterizzata dall'elevata disponibilità di substrati (fase *feast*) in cui i microrganismi degradano la sostanza organica producendo prodotti di stoccaggio sotto forma di EPS che verranno utilizzati come fonte di carbonio e di energia per la respirazione endogena che caratterizza la fase successiva di inedia (fase *famine*) (Adav et al., 2008; Zhu et al, 2012). Di conseguenza il contenuto di EPS è variabile durante il ciclo e le caratteristiche dei granuli aerobici possono essere influenzate da come questo contenuto si modifica nel tempo. Per tale motivo, le EPS sono state analizzate alla fine sia del periodo di *feast* che di *famine*. La fine del periodo di *feast* è stato individuato monitorando la concentrazione di ossigeno nel bulk: in particolare, come riportato da **Di Bella e Torregrossa, (2013)**, la fine della fase di consumo del substrato organico è identificabili da un gradino nel profilo di concentrazione dell'ossigeno, che evidenzia il minore consumo di ossigeno stesso per l'ossidazione del substrato organico. La fine della fase di *famine* è stata invece assunta come la fine del ciclo di reazione. L'andamento delle frazioni delle EPS al termine delle fasi di *feast* e *famine* è mostrato rispettivamente nelle Figure 5.13 a e b.

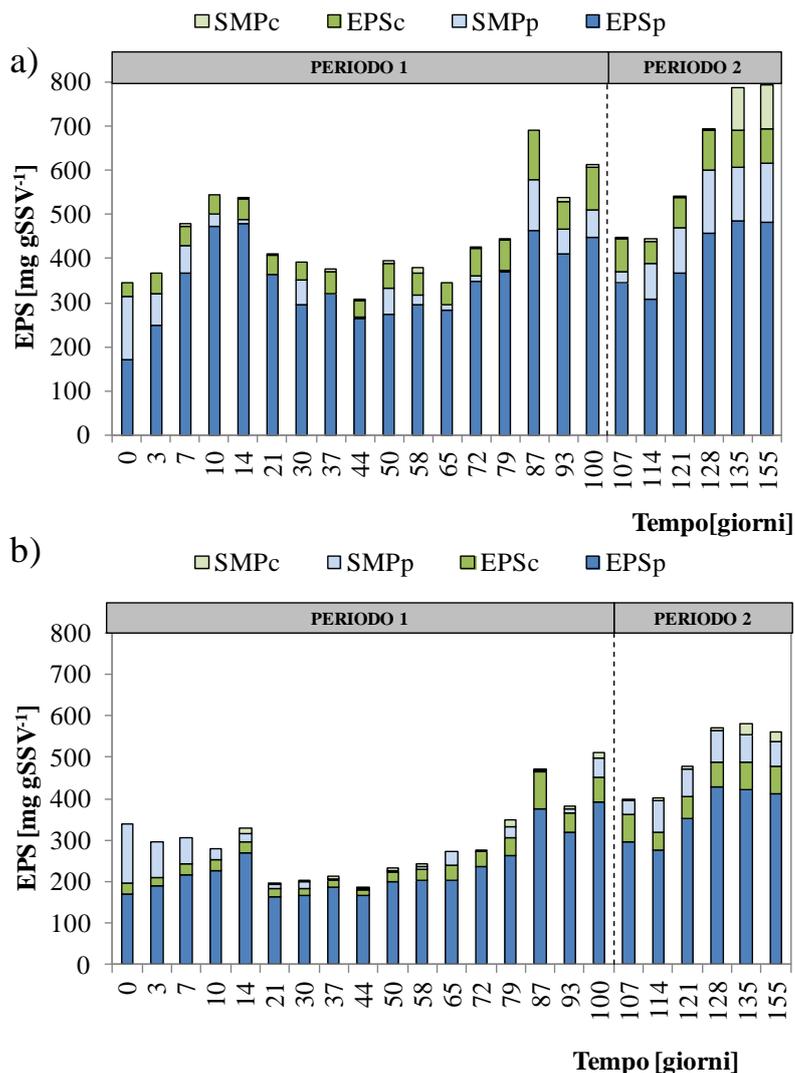


Figura 5.13: Andamento delle EPS nella fase di feast (a) e fame (b).

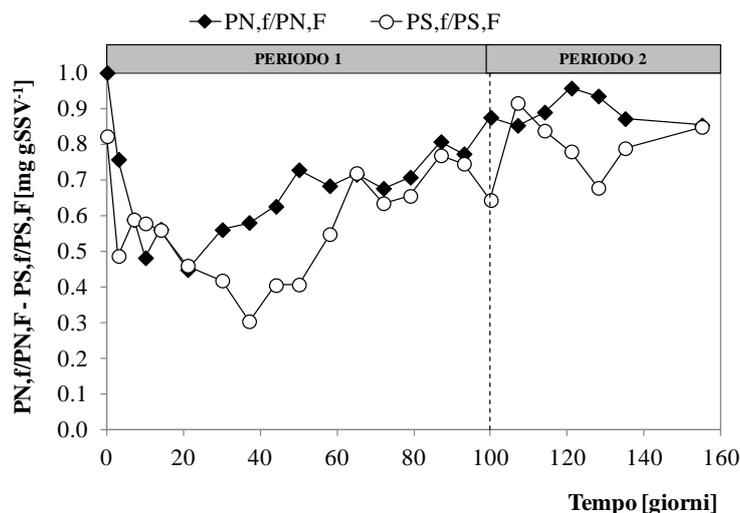
Il profilo di concentrazione delle EPS in fase feast, ha evidenziato un profilo a “sella”. Più in dettaglio, nei primi giorni del primo periodo si è osservata una sensibile produzione di EPS e di proteine in particolare, che raggiunto un picco intorno al 15° giorno, dopo il quale il contenuto di EPS si è lentamente ridotto attestandosi su un valore stazionario. Nei primi giorni, come riportato da **Zhu et al. (2012)**, i microrganismi si adattano al nuovo alimento, alle nuove condizioni

operative, agli sforzi di taglio e alla pressione di selezione idraulica, regolando in maniera opportuna il proprio metabolismo producendo un eccesso di polimeri extracellulari. Adattatisi alle nuove condizioni, progressivamente tale produzione si stabilizza, e si raggiungono le condizioni stazionarie. Rispetto ai valori di EPS comunemente osservati nei fanghi granulari aerobici, in questo caso i valori specifici, ovvero riferiti alla concentrazione di SSV nel reattore, sono risultati essere decisamente maggiori. Alcuni autori, tra cui **Adav et al. (2009)**, **Maszenan et al. (2011)** e **Zhang et al. (2011)**, hanno osservato che la maggiore produzione di EPS è legata all'aumento delle condizioni di stress metabolico per la biomassa, in taluni casi dovuto alle "avverse" condizioni ambientali. Nello specifico, le elevate concentrazioni saline da un lato, e la presenza degli idrocarburi dall'altro, hanno con ogni probabilità incrementato lo stress metabolico per la biomassa, che in risposta a tali condizioni, ha prodotto una maggiore quantità di EPS. Nella fase centrale del primo periodo il contenuto di EPS si è leggermente ridotto. A causa del parziale sfaldamento dei granuli, dovuto al raggiungimento della dimensione critica, e alla conseguente perdita di biomassa, il carico del fango tendeva ad aumentare, e di conseguenza la disponibilità di substrato per unità di biomassa aumentava. In tali condizioni, lo stress metabolico per la biomassa risultava essere leggermente inferiore rispetto alle precedenti settimane, ed è possibile per tanto che la produzione di EPS si riducesse proprio in ragione del fatto che i batteri, stante la maggiore disponibilità di substrato, non erano costretti ad accumulare riserve energetiche sottoforma di EPS. Al termine del primo periodo, la concentrazione di EPS aumentò nuovamente in seguito al raggiungimento di nuove condizioni stazionarie e si mantenne su valori costanti fino alla fine del periodo stesso. Nel successivo periodo sperimentale, l'aumento del carico provocò un effetto simile a quanto appena descritto. Un comportamento analogo è stato riportato in letteratura da altri autori (**Di Bella e Torregrossa, 2013**; **Long et al., 2015**) i quali osservarono che i granuli aerobici subiscono fenomeni di parziale de granulazione quando sono soggetti ad incrementi del carico organico. Nuovamente, dopo questa fase iniziale in cui il contenuto di EPS si ridusse in maniera drastica, ma lentamente questo aumentò nuovamente riportandosi su valori di poco superiori a quelli osservati nel primo periodo. I risultati evidenziano come il contenuto di EPS sia dunque strettamente connesso alla disponibilità di substrato. Minori quantità di alimento, relative alla quantità di biomassa presente nel sistema, stimolano i batteri a produrre più riserve energetiche; viceversa in condizioni di carico più elevato la biomassa non ha la necessità di produrre riserve e verosimilmente ossida direttamente il substrato organico anziché stoccarlo e ossidarlo in un secondo momento.

Dal punto di vista strutturale nel primo periodo le EPS erano prevalentemente presenti in forma legata (bound), mentre la frazione solubile (SMP) risultava inferiore al 5% delle EPS totali. Nel secondo periodo invece, la frazione solubile aumentò in maniera sensibile, attestandosi mediamente intorno al 30% del

contenuto totale di EPS. Tale risultato evidenziava un indebolimento della matrice polimerica dei granuli, che di conseguenza risultavano morfologicamente meno compatti rispetto a quelli del precedente periodo sperimentale. La ragione di tale risultato è verosimilmente legata all'aumento del carico organico nel secondo periodo, e più in particolare della componente particolata nell'influente. La sostanza organica particolata, secondo quanto riportato da **De Kreuk et al. (2010)**, viene dapprima adsorbita sui granuli e successivamente idrolizzata e quindi biodegradata. Tali processi si realizzano prevalentemente sulla superficie dei granuli, dove i microrganismi, in seguito ai processi di idrolisi, ricevono in continuo fonti di substrato. I prodotti dell'idrolisi vengono pertanto consumati localmente e non riescono a penetrare verso gli strati interni del granulo. Di conseguenza, i microrganismi all'interno del granulo non avendo fonti di carbonio esterno, iniziano a degradare le altre fonti di carbonio disponibili, quali le EPS, che per tanto vengono idrolizzate. Ciò determinava, con molta probabilità, l'aumento della loro frazione solubile come osservato al termine del secondo periodo. Questo meccanismo è stato prevalentemente osservato durante la fase di *feast*, durante la quale il substrato organico, presente in elevate concentrazioni all'interno del reattore, viene quasi del tutto consumato.

Il contenuto di EPS legate nel periodo di *famine* è risultato essere inferiore a rispetto a quanto misurato in fase *feast*, proprio in ragione del consumo metabolico che si realizza nella lunga fase di inedia in assenza di substrati esogeni. Nel dettaglio, è importante focalizzare l'attenzione non tanto sui valori assoluti osservati durante la fase di *famine*, quanto alla quantità di EPS consumate durante tale fase. In Figura 5.14 è mostrato il rapporto tra la concentrazione di proteine e carboidrati legate, ciascuna delle quali valutata rispettivamente al termine della fase di *famine* e di *feast*. Tali rapporti sono indici del consumo delle frazioni di EPS proteiche e carboidratiche durante il periodo di inedia nel corso dei due periodi sperimentali.



**Figura 5.14:** Andamento del rapporto rispettivamente tra proteine al termine della fase di fame e di feast e carboidrati.

Come è mostrato nel grafico in Figura 5.14, nelle prime settimane del primo periodo, nella fase di *famine* si è osservata una sensibile riduzione sia della componente proteiche che carboidratica delle EPS. In particolare, circa il 60% dei carboidrati veniva consumato nella fase di inedia, mentre le proteine si riducevano di circa il 40%. Il consumo di proteine, che sono sostanze strutturalmente molto più complesse dei carboidrati, evidenzia come l'elevata durata del ciclo, unitamente alla scarsa biodegradabilità dell'influenza, costringesse i microrganismi a dover ricorrere all'uso di sostanze di stoccaggio anziché a substrati esogeni. Tale consumo si è lentamente ridotto nel corso del primo periodo, al termine del quale mediamente il 25% di entrambe le frazioni veniva consumato nella fase di inedia aerobica. La causa di ciò può essere da un lato dovuta alla riduzione dell'attività metabolica della biomassa, presumibilmente dovuta ad un progressivo invecchiamento della biomassa stessa, ovvero, come si dirà in seguito, al progressivo consumo di substrati difficilmente biodegradabili come gli idrocarburi, che costituivano una fonte a lento rilascio di carbonio organico a seguito dei fenomeni di idrolisi che avvenivano all'interno dei granuli stessi. Nel secondo periodo, il consumo di proteine risultò modesto, mentre i carboidrati vennero consumati in modo apprezzabile, ma nel complesso in misura minore rispetto al periodo precedente (al massimo il 35%). Tuttavia, sebbene il consumo di proteine risultasse modesto, a vantaggio dunque della stabilità dei granuli aerobici, la loro presenza in forma non legata evidenziava un'intrinseca debolezza della struttura portante del granulo.

Riguardo la composizione delle EPS, la componente proteica è risultata essere di gran lunga maggiore rispetto a quella carboidratica. In Figura 5.15 è mostrato l'andamento del rapporto tra la frazione proteica e carboidratica delle EPS (calcolate come media tra il periodo di feast e famine) nel corso dei due periodi. Il sensibile consumo di proteine osservato a metà del primo periodo è coinciso con la parziale perdita di stabilità dei granuli. Ciò conferma come le proteine siano le sostanze polimeriche che rivestono il ruolo principale nella coesione dei granuli aerobici. A tal proposito è riportato in Figura 5.15 il rapporto tra il contenuto di proteine e carboidrati all'interno dei granuli.

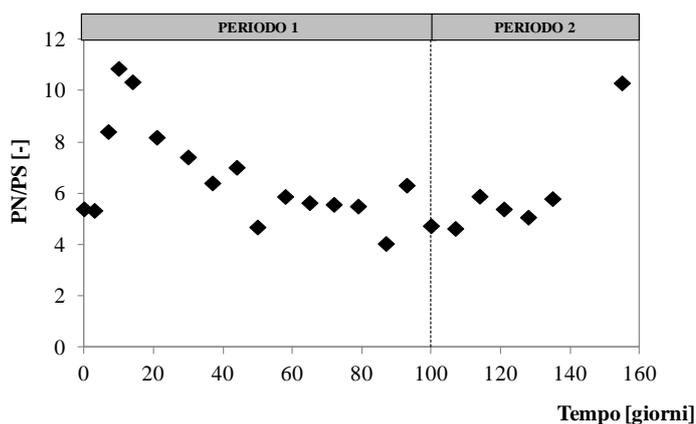
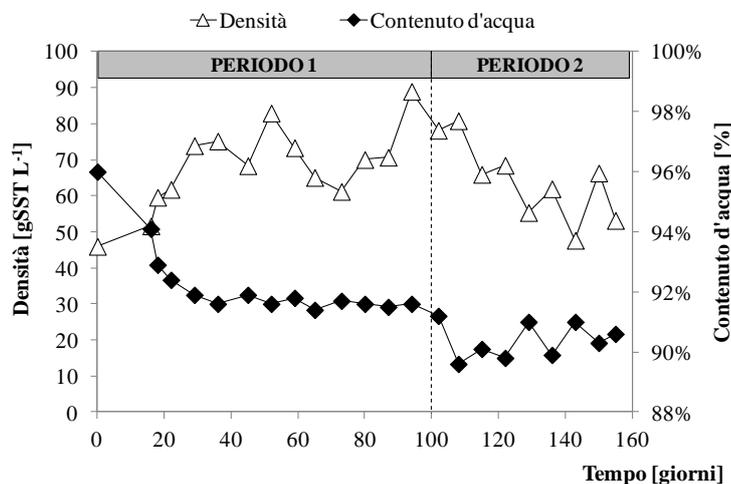


Figura 5.15: Andamento del rapporto PN/PS (fase feast).

Da tale figura si può osservare che il rapporto PN/PS è sensibilmente aumentato nei primi dieci giorni, e verso la fine del secondo periodo, in concomitanza con la formazione dei granuli. L'arricchimento di proteine come riportato da **Zhang et al. (2012)** determina la rapida formazione dei granuli. Dopo il picco osservato nel primo periodo, tale rapporto si è lentamente ridotto stabilizzandosi intorno a un valore di poco inferiore a 6. La riduzione del rapporto PN/PS è coincisa con la perdita di stabilità dei granuli. Le proteine dunque risultano fondamentali sia nella formazione che nel mantenimento strutturale dei granuli. Il raggiungimento di condizioni stazionarie, ovvero dalla raggiunta maturazione dei granuli è invece evidenziato dalla stabilizzazione di tale rapporto. In ragione delle osservazioni finora fatte, tale rapporto può essere dunque considerato un utile parametro operativo per prevedere la formazione o l'instabilità dei granuli, ovvero la maturazione del fango granulare aerobico.

#### 5.6.1.4 Caratteristiche fisiche dei granuli: analisi di densità, contenuto d'acqua, idrofobicità e sedimentabilità

In Figura 5.16 è riportato l'andamento della densità del fango granulare nei due periodi della sperimentazione.



**Figura 5.16:** Andamento della densità e del contenuto d'acqua dei granuli aerobici.

Nel corso dei primi 20 giorni del primo periodo, la densità del fango, da un valore di circa 46 gSST L<sup>-1</sup> di inoculo, è sensibilmente aumentata fino a 82 gSST L<sup>-1</sup>, indice del progressivo addensamento dei degli aggregati progressivamente andavano formandosi. L'aumento di densità osservato è anche dovuto alla configurazione impiantistica di tipo SBAR, nota per favorire la formazione di densi aggregati microbici. Tuttavia, si può notare come a partire dal 57° giorno la densità dei granuli ha iniziato a decrescere, indicando l'inizio della perdita di stabilità dei granuli. Tale periodo è coinciso, come precedentemente detto, col raggiungimento del diametro critico dei granuli e il conseguente sfaldamento e perdita di biomassa. In questo periodo la densità si è ridotta al valore di 70 gSST L<sup>-1</sup>, minore rispetto a quello osservato nei precedenti giorni ma comunque maggiore rispetto alla densità del fango di inoculo, indice che, sebbene stesse avvenendo lo sfaldamento dei granuli, questo era limitato agli strati più esterni dei granuli, i quali conservavano un buon grado di coesione. Dopo un temporaneo periodo in cui la densità dei granuli si è ridotta, essa è gradualmente aumentata oltre 90 gSST L<sup>-1</sup> al termine del primo periodo.

Nel secondo periodo, le nuove condizioni operative causarono la temporanea riduzione della densità dei granuli che ha avuto come effetto lo sfaldamento degli

stessi aggregati. Dopo questo periodo transitorio, si osservò che, contestualmente alla formazione di nuovi granuli, la densità del fango mostrò un lieve trend crescente, segno del nuovo addensamento del fango in granuli strutturalmente stabili.

Contestualmente alla misura della densità del fango, è stato misurato il loro contenuto d'acqua. Essendo le due misure assolutamente analoghe in quanto entrambe indici diretti e indiretti dell'addensamento dei granuli, si può osservare dalla figura che all'aumento della densità dei granuli corrispondeva la diminuzione del loro contenuto d'acqua. Infatti, man mano che i granuli si andavano addensando, diminuisce la loro porosità, e di conseguenza gli spazi entro i quali la fase liquida poteva essere contenuta.

In Figura 5.17 è mostrato l'andamento dell'idrofobicità del fango granulare nei due periodi sperimentali.

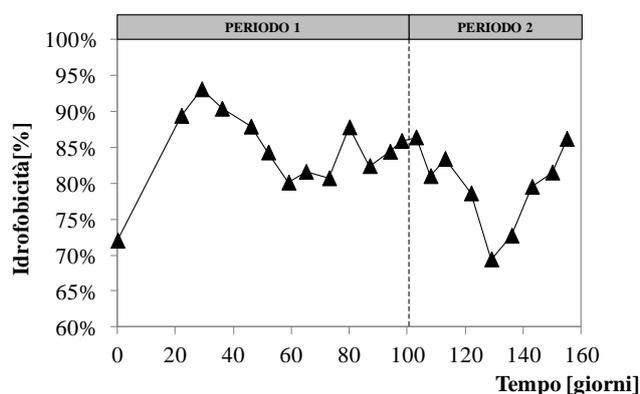


Figura 5.17: Andamento dell'idrofobicità dei granuli aerobici.

Nelle prime settimane del primo periodo sperimentale si è osservato un sensibile incremento fino al 93% di tale parametro che è poi diminuito nelle successive settimane attestandosi su un valore stazionario intorno all'80% verso il 50° giorno. Nelle successive settimane, l'idrofobicità ha mostrato un graduale trend crescente fino al termine del primo periodo, al termine de quale il valore dell'idrofobicità era pari a circa l'86%. Nel secondo periodo sperimentale, soprattutto nella fase iniziale, l'idrofobicità è drasticamente diminuita fino a un minimo del 68% intorno al 130° giorno. Ciò costituisce la conferma del fatto che in questo periodo la coesione del fango si era sensibilmente ridotta come evidenziato dalla rottura dei granuli. La riduzione dell'idrofobicità, determinava certamente il minore potere di adesione delle cellule batteriche, che di conseguenza ha comportato la parziale degranulazione. Quando il sistema si è adeguato alle nuove condizioni operative, l'idrofobicità è nuovamente aumentata fino a un valore di poco superiore all'85% al termine del secondo periodo. Nel complesso però, il contenuto di idrofobicità è

risultato mediamente minore rispetto al precedente periodo, confermando che i granuli nel secondo periodo erano meno stabili.

Tali risultati confermano quanto l'idrofobicità sia un parametro molto importante per la stabilità dei granuli aerobici. L'idrofobicità tuttavia, non può essere utilizzato come un parametro di controllo del processo in quanto risulta essere funzione di molti altri fattori. Oltre al contenuto di EPS proteiche dei granuli, che sono note sostanze idrofobiche, l'idrofobicità è stata certamente influenzata sia dalla salinità che dalla presenza di idrocarburi. La salinità gioca un ruolo contrastante, in quanto come evidenziato nel paragrafo relativo alla EPS, la presenza di elevate concentrazioni saline stimola la produzione di polimeri extracellulari e di proteine in particolare da parte della biomassa, in risposta alle forti pressioni osmotiche sulla membrana citoplasmatica delle cellule batteriche. A conferma di ciò, si è osservata una buona correlazione tra l'idrofobicità e il contenuto di EPS proteiche (Figura 5.18).

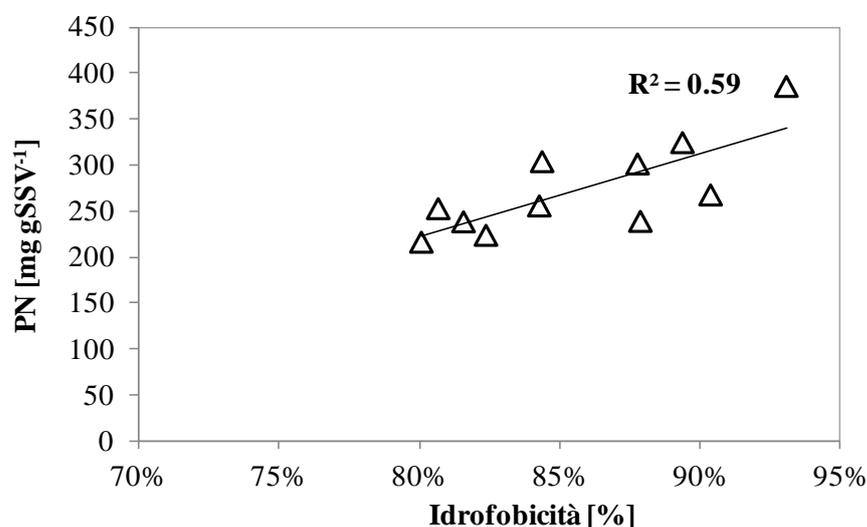


Figura 5.18: Correlazione tra l'idrofobicità e il contenuto di EPS proteiche.

L'indice di correlazione tra idrofobicità e contenuto di EPS proteiche è risultato minore rispetto a quanto normalmente si osserva in reattori aerobici granulari alimentati con refluo sintetico (Liu e Tay, 2001). Ciò sottolinea il fatto che altri parametri abbiano inciso sull'idrofobicità del fango oltre alle proteine extracellulari. Infatti, come in precedenza accennato, la salinità gioca un ruolo duplice sulle proprietà fisiche del fango. Se da un lato infatti la salinità stimola la produzione di proteine che fanno crescere l'idrofobicità, dall'altro, come osservato da Ismail et al. (2010), la presenza di elevate concentrazioni di ioni sodio riduce

l'idrofobicità stessa, a causa della progressiva sostituzione degli ioni sodio al posto degli ioni calcio nella matrice polimerica extracellulare. Ciò determinava l'indebolimento della struttura portante dei granuli in quanto veniva meno il potere di adesione delle cellule batteriche. È da sottolineare comunque come i valori osservati siano comunque superiori a quelli di un fango attivo convenzionale, per cui sebbene la struttura dei granuli risultasse indebolita, la loro integrità era comunque ugualmente garantita. L'altro fattore ad incidere significativamente sull'idrofobicità è sicuramente la presenza degli idrocarburi. Sebbene non vi siano evidenze sperimentali che dimostrino come la presenza di idrocarburi possa determinare l'aumento di idrofobicità del fango, è innegabile che si tratta di sostanze che per natura sono idrofobiche. L'adsorbimento degli idrocarburi all'interno della struttura porosa dei granuli ne ha sicuramente determinato un significativo aumento dell'idrofobicità, soprattutto nelle prime settimane del primo periodo, dove come si evidenzierà nei successivi capitoli, il fenomeno di adsorbimento era prevalentemente fisico. Progressivamente, la degradazione biologica degli idrocarburi da un lato, e il desorbimento dovuto alla loro rottura nel secondo periodo sperimentale, hanno determinato una significativa riduzione dell'idrofobicità cellulare. È chiaro però che salinità e presenza di idrocarburi abbiano agito in maniera sinergica nella modificazione delle proprietà fisiche del fango. Distinguere gli effetti dell'uno e dell'altro fattore per tanto risulta molto complicato e sicuramente richiede ulteriori indagini sperimentali per una migliore comprensione di tali osservazioni.

Le caratteristiche di sedimentabilità dei fango sono state valutate mediante il calcolo dello SVI (Sludge Volume Index). In particolare sono stati calcolati sia lo SVI<sub>30</sub> che lo SVI<sub>5</sub>.

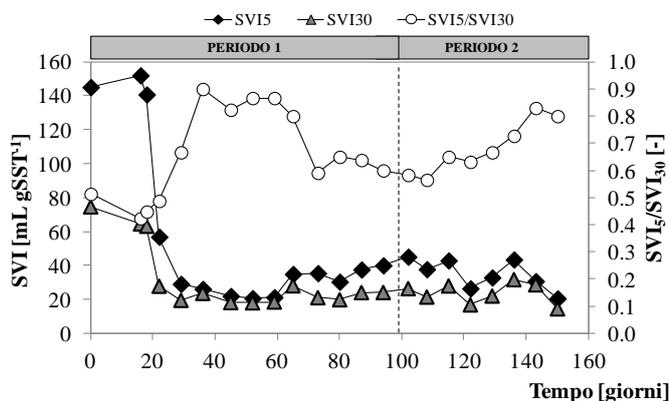


Figura 5.19: Andamento dello SVI<sub>5</sub>, SVI<sub>30</sub> e del loro rapporto nei due periodi sperimentali.

A partire dal 14° giorno i valori dello SVI<sub>30</sub> sono diminuiti sensibilmente, raggiungendo un minimo di a 14,4 mL gSST<sup>-1</sup>. Valori così bassi indicavano che

trasformazione del fango da fioccoso in fango granulare era in atto. Dal grafico in Figura 5.19, si può notare come i valori di  $SVI_5$  e  $SVI_{30}$  fossero di poco differenti. La pressione di selezione idraulica imposta consentiva infatti di selezionare solo la biomassa con migliori caratteristiche di sedimentabilità.

**Schwarzenbeck et al. (2004)** hanno riportato che la differenza tra lo  $SVI_5$  (o  $SVI_{10}$ ) e lo  $SVI_{30}$  dei fanghi granulari è inferiore rispetto a quella dei fanghi attivi. Pertanto, il rapporto di  $SVI_{30}/SVI_5$  può essere usato come un indicatore del processo di granulazione. Un rapporto vicino all'unità indica il fango è in forma prevalentemente granulare. **Liu et al., (2007)**, suggeriscono che il processo di granulazione può considerarsi completo quando il rapporto  $SVI_{30}/SVI_5$  risulta essere superiore a 0,90.

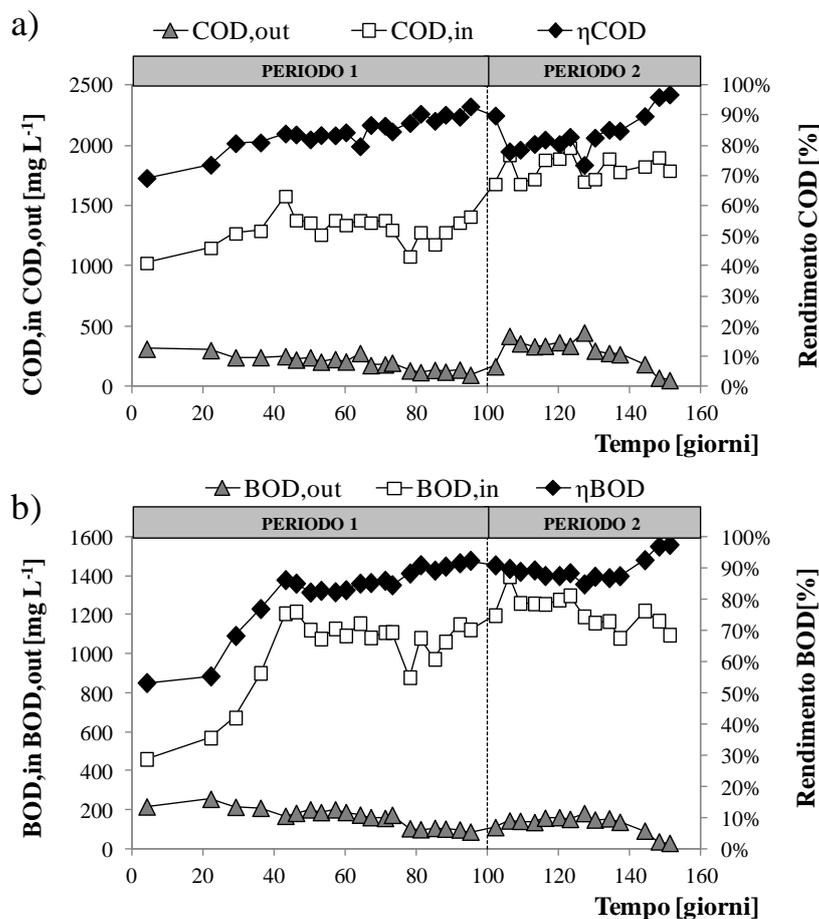
Analizzando il rapporto  $SVI_{30}/SVI_5$  riportato in figura 5.19, si può notare come questo partisse da valori estremamente bassi, relativi ai primi giorni della sperimentazione, ma che successivamente ha raggiunto un valore prossimo a 0,9 dopo soli 21 giorni. Tuttavia dal 44° giorno in poi, periodo che corrispondeva alla destabilizzazione già discussa dei granuli, questo rapporto è diminuito sensibilmente senza riuscire più a tornare a valori elevati per tutta la prima fase della sperimentazione. Sebbene non si è riusciti più a ottenere valori superiori allo 0,9, bensì un valore medio di 0,71, le osservazioni microscopiche ci hanno consentito di affermare che il fango era in forma prettamente granulare. Tale differenza rispetto ai dati di letteratura è da imputare alla salinità elevata del bulk. Nella sedimentazione va chiaramente tenuta in considerazione la spinta di galleggiamento dovuta al liquido in cui i granuli sedimentano. Il valore di 0,9 riportato da **Liu et al. (2007)**, fa riferimento ad un bulk non salino, dove la spinta di galleggiamento è certamente inferiore rispetto al caso di bulk con salinità prossima a quella dell'acqua di mare. Nel corso del secondo periodo della sperimentazione, tale rapporto ha ripreso a crescere raggiungendo il valore di 0,82 al 128° giorno, segno che la biomassa presente nel reattore aveva ottime caratteristiche di sedimentabilità e un'elevata tendenza alla granulazione.

### 5.6.2 Rimozione della sostanza organica

La rimozione della sostanza organica è stata valutata mediante il monitoraggio sia di parametri indiretti, come il BOD e il COD, che diretti ovvero il TOC. I dati di BOD e COD nell'influenza ed effluente, e l'andamento dei rendimenti depurativi sono mostrati in Figura 5.20.

Nel primo periodo sperimentale, nei giorni iniziali, c'è stato un progressivo aumento di carico, reso necessario per acclimatare la biomassa alle nuove condizioni operative. In tutto il primo periodo i rendimenti di rimozione della sostanza organica, espressa sia in termini di BOD che di COD, sono stati sempre

elevati e prossimi, se non per tratti superiori, al 90%. La biomassa eterotrofa dunque non risultava inibita né dalla presenza degli idrocarburi, né per la salinità.



**Figura 5.20:** Andamento delle concentrazioni di COD (a) e BOD (b) nell'influente ed effluente e relativi rendimenti depurativi.

Nel secondo periodo, con l'aumento della frazione di slop reale nell'alimento, e la conseguente riduzione di quella sintetica, il COD nell'alimento aumentò, mentre il BOD rimase pressoché invariato a causa della contemporanea riduzione del BOD nel nuovo carico di slop reale. Come era lecito attendersi, oltre al carico organico espresso in termini di COD dunque, è cambiata anche la biodegradabilità della miscela influente (65% in media), che risultava minore rispetto al precedente periodo (80% in media). Nonostante questa variazione, i rendimenti di rimozione del BOD rimasero pressoché invariati, e anzi, verso la fine del periodo, si osservò un significativo trend di crescita fino al 97% (valore massimo raggiunto).

Nonostante la rottura dei granuli occorsa in questa fase, il rendimento di rimozione del BOD non subì significative modifiche, segno che il fatto che la forma con cui la biomassa era presente nel reattore sia essa in forma fioccosa o granulare, non comportava alcun beneficio in termini di rimozione della frazione organica biodegradabile. Le elevate rese di rimozione del BOD sono invece attribuibili all'acclimatazione della biomassa alla complessa matrice organica. L'incremento delle rese verso la fine del periodo, invece, è verosimilmente dovuto alla degradazione delle frazioni più lentamente biodegradabili.

Per quanto concerne il COD invece, nel cambio di condizioni operative i rendimenti subirono un sensibile decremento dal 90% al 74%. In questa fase, sebbene la frazione biodegradabile venisse per la maggiorparte degradata, come dimostrano le elevate rese del BOD, è plausibile che la frazione particolata non subisse particolari modificazioni. Come già anticipato nei precedenti paragrafi, i granuli aerobici hanno un elevato potere adsorbente nei confronti delle frazioni organiche particolate. Nella prima parte del secondo periodo, la quasi totale disintegrazione degli aggregati, ha inevitabilmente determinato le minori rese di rimozione della frazione organica particolata di natura inerte, che non essendo adsorbita sui granuli, veniva per la maggiorparte scaricata prima di essere degradata. Il processo degradativo di tali sostanze, prevede infatti una prima fase di idrolisi, seguita da una successiva fase ossidativa (**De Kreuk et al., 2010**). Tale processo si esplica in un tempo certamente maggiore al tempo di residenza idraulico, infatti affinché le rese siano elevate è necessario che tali sostanze vengano dapprima adsorbite dai granuli, in modo che il loro tempo di permanenza nel reattore sia maggiore, e tendente al tempo di residenza cellulare piuttosto che a quello idraulico. Nel momento in cui i granuli si sono riaggregati, le rese di rimozione del COD sono aumentate nuovamente raggiungendo valori del 96% al termine del periodo osservato. È interessante sottolineare che in condizioni stazionarie le concentrazioni di COD allo scarico erano inferiori a  $125 \text{ mg L}^{-1}$  e quindi tali da garantire il rispetto del limite normativo.

Il grafico in Figura 5.21, mostra il tasso di biodegradabilità, espresso in termini di rapporto BOD/COD, dell'influente e dell'effluente. Nel primo periodo il tasso di biodegradabilità dell'influente e dell'effluente era pari a circa il 75% in condizioni stazionarie. Va ricordato che la frazione organica nell'alimento in questa fase era per lo più biodegradabile in forma solubile e che, per la maggiorparte, veniva rimossa. La restante parte era verosimilmente costituita da materiale particolato biodegradabile il quale veniva in gran parte adsorbito dai granuli che nel primo periodo erano predominanti nel reattore. In ragione di ciò, la frazione inerte allo scarico risultava bassa. La presenza di sostanza biodegradabile residua allo scarico è probabilmente dovuta all'invecchiamento della biomassa nel sistema. Si ricorda, infatti, che in questa fase la frazione inerte dei granuli era vicina al 50% e questo, con ogni probabilità, ha determinato la minore attività biologica della biomassa, col risultato che non tutto il materiale organico biodegradabile venisse ossidato. Va

comunque sottolineato come nonostante ciò, i rendimenti di rimozione del BOD risultarono superiori al 90%.

Nel secondo periodo, il tasso di biodegradabilità dell'influente si ridusse a circa il 65% in media. Nell'effluente, tale rapporto subì un brusco decremento, dovuto in buona parte alla mancata rimozione della frazione particolata inerte, a causa della rottura dei granuli, che di fatto ha determinato l'aumento della concentrazione di COD allo scarico. Al contrario, la concentrazione di BOD è rimasta invariata rispetto al periodo precedente, quindi come risultato il rapporto BOD/COD è diminuito fino al 35%. Man mano che i granuli si sono riaggregati, la frazione particolata inerte veniva nuovamente bioadsorbita, e di conseguenza il rapporto BOD/COD nell'effluente mostrò un trend di crescita fino al 50% al termine del periodo osservato. Rispetto al periodo precedente, il valore stazionario di tale rapporto risultò inferiore, in ragione sia della minore biodegradabilità dell'influente, che per l'aumento della frazione inerte del refluo.

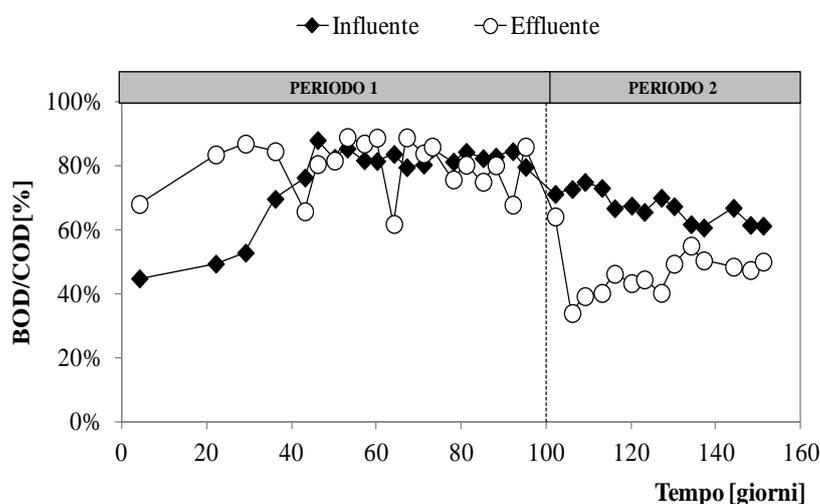
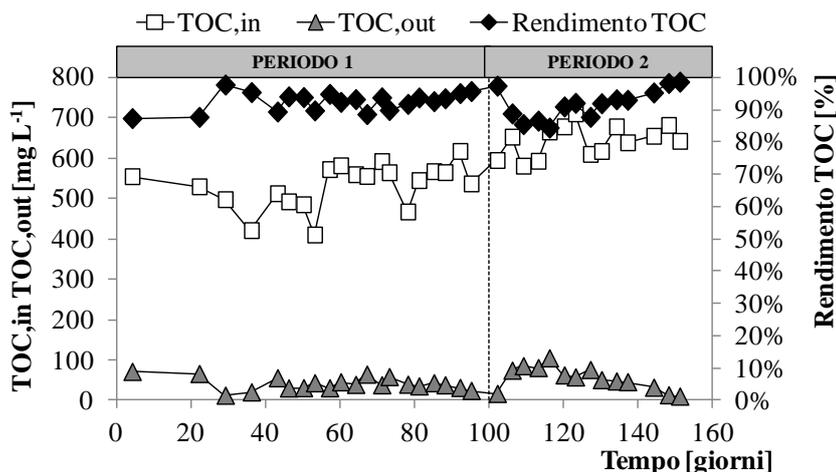


Figura 5.21: Andamento del rapporto BOD/COD nell'influente ed effluente.

In Figura 5.22 sono mostrate le concentrazioni di TOC nell'influente e nell'effluente e i rendimenti depurativi. Nel caso di matrici organiche complesse come gli slops, stante anche le possibili interferenze nelle metodiche analitiche, dovute al sale ad esempio, il ricorso a misure di sostanza organica dirette sono consigliabili. Nel caso in esame, i risultati del TOC confermano quanto osservato per il COD e BOD.



**Figura 5.22:** Andamento delle concentrazioni di TOC nell'influente ed effluente e rendimenti depurativi.

### 5.6.3 Rimozione dei nutrienti

L'azoto è presente negli slop in basse concentrazioni. In questa sperimentazione l'aggiunta di azoto in forma di cloruro di ammonio fu necessaria per evitare l'insorgenza di fenomeni inibitori per la biomassa causa sbilanciamento di nutrienti. In quel caso sarebbe stato difficile distinguere se eventuali effetti di inibizione fossero derivati dalla presenza degli idrocarburi o dei cloruri, quanto dalla mancanza di nutrienti. Si sottolinea comunque che l'azoto non è il contaminante obiettivo degli slops, ma in ogni caso, il suo studio può fornire interessanti informazioni per fini scientifici, riguardo da un lato, la stratificazione dei granuli aerobici, e dall'altro gli effetti inibitori dei cloruri e degli idrocarburi sulla biomassa autotrofa.

Come risulta dall'analisi del grafico in Figura 5.23, nel primo periodo i rendimenti di rimozione dell'azoto totale non superarono quasi mai il 30%, a testimonianza della totale inibizione della biomassa autotrofa. La rimozione dell'azoto osservata è stata, pertanto, addebitata alla sintesi di biomassa eterotrofa, la quale come osservato nel precedente paragrafo, non è risultata essere inibita. È allora possibile che, in questo caso, l'effetto combinato della presenza di elevate concentrazioni di cloruri e di idrocarburi abbiano determinato la completa inattività biologica della biomassa autotrofa. Nel secondo periodo, i rendimenti di rimozione dell'azoto sono aumentati fino al 50% al termine del periodo osservato, ma anche in questo caso, tale resa è stata del tutto addebitata al metabolismo eterotrofo, in quanto l'azoto rimosso risultava più o meno pari al 5% del BOD rimosso.

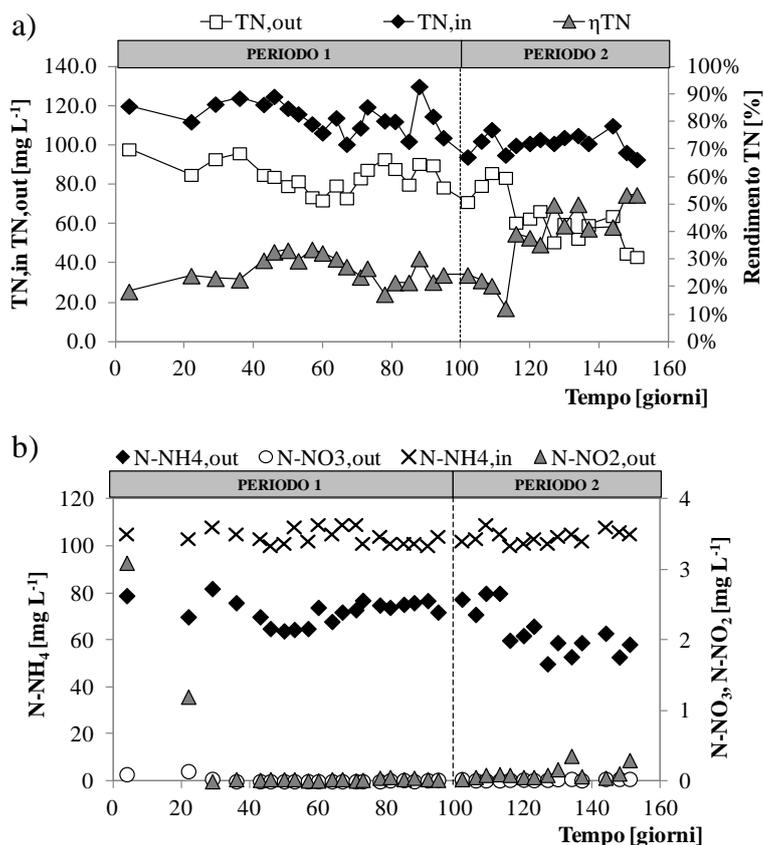
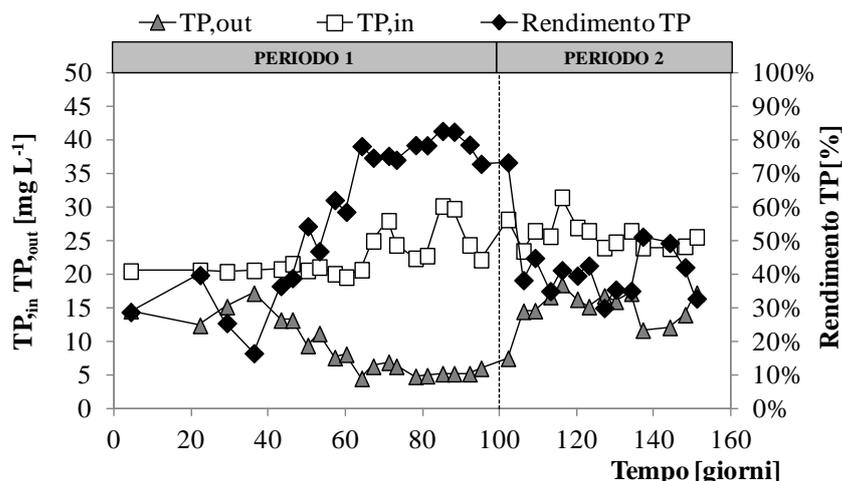


Figura 5.23: Andamento delle concentrazioni di TN nell'influenza ed effluente e rendimenti depurativi (a); andamento delle forme azotate nell'alimento e nello scarico nei due periodi.

I bassi rendimenti osservati sull'azoto sono quasi certamente connessi alla mancata acclimatazione della biomassa autotrofa agli slops. Sebbene evidenze sperimentali (Lochmatter e Holliger, 2013) dimostrano che l'acclimatazione dei batteri autotrofi nei fanghi granulari richiede un tempo solitamente maggiore rispetto a quello necessario per la formazione degli aggregati, in questo caso tale ipotesi non è adeguatamente sostenuta dai risultati. Nel caso in esame sono state garantite tutte le condizioni necessarie per il corretto sviluppo della biomassa autotrofa nel sistema, quali elevate concentrazioni di ossigeno, lunghi tempi di residenza cellulare, pH. È evidente dunque che l'acclimatazione della biomassa autotrofa non si sia verificata per la presenza di sostanze in concentrazioni tali da risultare inibenti per il loro metabolismo. Dati riportati nella letteratura evidenziano che i ceppi batterici nitrito-ossidanti risultano essere inibiti da concentrazioni saline

superiori a 10-15 gNaCl L<sup>-1</sup>, mentre i batteri ammonio ossidanti (AOB) risultano metabolicamente attivi fino a concentrazioni superiori a 30 g NaCl L<sup>-1</sup> (**Bassin et al., 2011; Pronk et al., 2013**). Altri studi riportano invece che se opportunamente acclimatati, i batteri AOB riescono ad ossidare completamente l'ammonio fino a 50 g NaCl L<sup>-1</sup> (**Wan et al., 2014**). Alla luce di queste osservazioni, se gli idrocarburi non avessero determinato l'inibizione dei batteri ammonio ossidanti, allo scarico la forma di azoto prevalente sarebbe dovuta essere quella nitrosa, circostanza che non si è verificata. È verosimile allora che gli idrocarburi abbiano giocato un ruolo più importante nell'inibizione dei ceppi AOB rispetto alla salinità, come confermano anche i risultati ottenuti da **Hu et al. (2005)**. Ulteriori studi più specifici potrebbero essere utili a scindere gli effetti dell'una e dell'altra sostanza potenzialmente inibente. Inoltre, sarebbe opportuno indagare circa la concentrazione di idrocarburi limite che tali microrganismi riescono a tollerare.

Riguardo il fosforo valgono le stesse considerazioni generali fatte per l'azoto. Nelle prime settimane del primo periodo, l'efficienza di rimozione del fosforo è risultata modesta (figura 5.24). Dopo il 40° giorno, ovvero quando i granuli erano già formati e le loro dimensioni erano sufficienti a garantire un adeguato spessore dello strato anaerobico, i rendimenti aumentarono fino all'80% nonostante l'elevata salinità dell'influenza. **Pronk et al. (2013)** osservarono che elevate concentrazioni saline determinano la totale inibizione dei batteri fosforo-accumulanti (PAO). Tuttavia, l'effetto inibitorio non è diretto, in quanto la loro inibizione è per lo più dovuta alla presenza di nitriti, che è a sua volta determinato dall'inibizione dei batteri NOB a causa della salinità. L'accumulo di nitriti nel bulk, determina l'insorgenza di fenomeni competitivi tra i batteri PAO e i batteri glicogeno accumulanti (GAO), i quali alla lunga prevalgono sui primi. Di conseguenza, nel trattamento di reflui salini, il rendimento di rimozione del fosforo risulta solitamente modesto in virtù della presenza di nitriti. In questo caso, la completa inibizione dei ceppi batterici autotrofi e la conseguente assenza di nitriti (ovvero nitrati), ha indirettamente favorito l'attività dei batteri PAO, come dimostrano le buone rese depurative sul fosforo. Nel secondo periodo, il rendimento si è drasticamente ridotto, a causa della rottura dei granuli che non permetteva lo sviluppo di condizioni anaerobiche negli strati più interni dei granuli. Nonostante la nuova formazione dei granuli, il rendimento di rimozione del fosforo si mantenne alquanto modesto soprattutto in confronto con la precedente fase. È verosimile, che il massiccio dilavamento di biomassa occorso al cambio di periodo, abbia determinato un severo washout dei ceppi batterici PAO, che essendo microrganismi a crescita lenta, necessitano di un tempo maggiore per potersi acclimatare all'interno degli aggregati granulari. Dunque, il mancato raggiungimento di elevati standard depurativi nel secondo periodo probabilmente sarà stato causato proprio alla sua breve durata.



**Figura 5.24:** Andamento delle concentrazioni di fosforo totale nell'influente ed effluente e rendimenti depurativi.

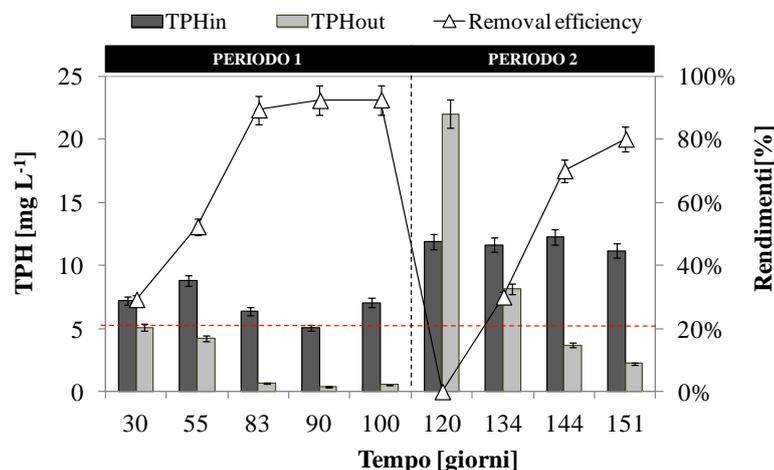
In ogni caso, il fosforo come l'azoto, non rappresentano i contaminanti obiettivo negli slops, e il loro dosaggio può essere fatto in modo che la concentrazione nell'alimento risulti quella strettamente necessaria per la sintesi eterotrofa, in modo da evitare da un lato fenomeni di inibizione causati da limitazione di nutrienti, e dall'altro il superamento dei limiti normativi previsti per lo scarico in acque superficiali.

#### 5.6.4 Rimozione degli idrocarburi

La misura dei TPH nell'effluente è stata effettuata quando i granuli aerobici si erano già formati, quindi a partire dal 30° giorno. L'andamento delle concentrazioni di idrocarburi totali nell'alimento e nello scarico, nonché l'efficienza di rimozione, sono mostrati in Figura 5.25.

Al 30° giorno, l'efficienza di rimozione degli idrocarburi totali era prossima al 30%. I rendimenti aumentarono quindi al 55% al 55°giorno quando il tasso di granulazione raggiunse il suo massimo valore. La rimozione degli idrocarburi in questa fase è stata prevalentemente dovuta a fenomeni di adsorbimento fisico. Come mostrato già nella Figura 5.12, osservazioni microscopiche hanno permesso di evidenziare la presenza di particelle di idrocarburi all'interno della porosità dei granuli, evidente segno del loro adsorbimento. Successivamente al 55° giorno, come precedentemente osservato, si è verificato da un lato una lieve riduzione del tasso di granulazione, e dall'altro delle dimensioni medie dei granuli. La riduzione delle dimensioni dei granuli ha certamente determinato un aumento della loro

superficie specifica esterna disponibile per l'adsorbimento, il che giustificherebbe un lieve incremento nell'efficienza di rimozione degli idrocarburi. A tal fine avrebbero anche potuto contribuire le EPS, le quali svolgono un ruolo importante anche dell'adsorbimento di materiale sospeso (Xiong et al., 2013). Tuttavia, nei giorni successivi al 55°, l'incremento dell'efficienza di rimozione degli idrocarburi è stato molto significativo, e solo in minima parte giustificabile per fenomeni di natura fisica.



**Figura 5.25:** Andamento delle concentrazioni di idrocarburi totali (TPH) nell'influente ed effluente e rendimenti depurativi.

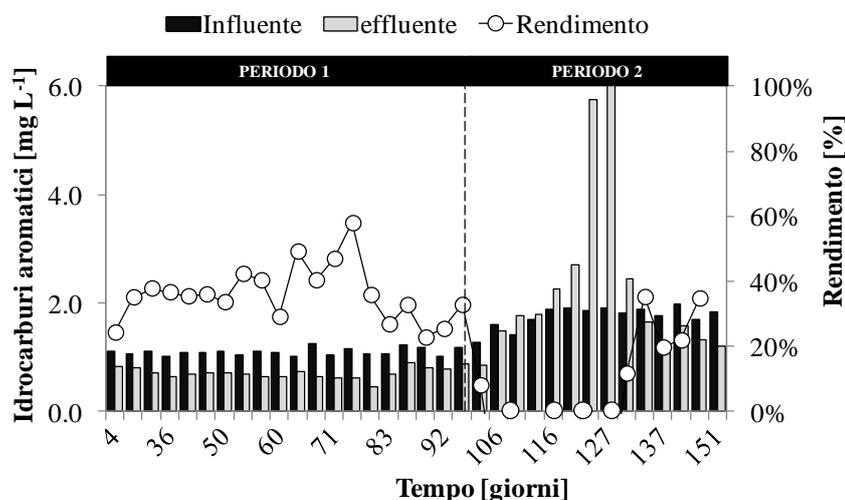
Sebbene infatti i granuli mostrino notevoli capacità adsorbenti nei confronti di varie sostanze, la continua alimentazione di tali sostanze porterebbe al progressivo esaurimento di tale proprietà. Di conseguenza i granuli saturandosi perderebbero la capacità di adsorbire ulteriori sostanze e le stesse verrebbero scaricate con l'effluente. Alcuni studi in letteratura (Amorim et al. 2014; Moreira et al., 2015) riportano che l'adsorbimento degli inquinanti è rapido nelle fasi iniziali, dove i siti attivi dei granuli sono tutti disponibili ad adsorbire le sostanze presenti nel bulk, ma tale processo gradualmente raggiunge una condizione stazionaria, per la quale la quantità di materiale che si adsorbe è uguale a quella che si desorbe. Per tanto se il fenomeno dell'adsorbimento fosse prettamente di natura fisica, gradualmente la resa di rimozione dei contaminanti tenderebbe a zero. Ovviamente questo ragionamento è valido nel caso in cui non avvenga uno spurgo selettivo dei granuli aerobici, che comunque non è stato effettuato nel presente studio. Analizzando i risultati ottenuti in questa sperimentazione, è chiaro che il rendimento sempre crescente osservato nel primo periodo, lascia presupporre la presenza di altri fenomeni paralleli all'adsorbimento fisico. È dunque possibile pensare che il

meccanismo di rimozione degli idrocarburi che si è instaurato nel corso della sperimentazione, fosse un adsorbimento di tipo reattivo. Nel dettaglio, è verosimile che gli idrocarburi adsorbiti fisicamente all'interno della microporosità dei granuli, venissero lentamente idrolizzati e successivamente biodegradati dalle numerose colonie batteriche che popolano i granuli. Di conseguenza la loro trasformazione in cataboliti che per diffusione migrano verso il bulk, liberava i siti attivi dei granuli che erano nuovamente disponibili ad adsorbire altri idrocarburi. Il contributo biologico alla rimozione degli idrocarburi tuttavia non è risultato quantificabile. Come osservato da **Sun et al. (2010)** e da **Pendashteh et al. (2012)**, i microrganismi, se acclimatati alla presenza degli idrocarburi, sono capaci di degradarli biologicamente. Le condizioni necessarie affinché ciò avvenga sono, da un lato, l'elevata quantità di biomassa necessaria a idrolizzare e rimuovere composti recalcitranti e, dall'altro, elevati tempi di contatto tra inquinante e batteri, solitamente garantiti da elevati tempi di residenza idraulica. Entrambe le condizioni risultavano essere verificate nei sistemi a biomassa granulare, in quanto i granuli aerobici, hanno come caratteristica peculiare l'elevatissima concentrazione di specie microbiche all'interno della densa struttura microbica. Inoltre, gli idrocarburi adsorbiti rimanevano all'interno del reattore per un tempo prossimo al tempo di residenza cellulare, che risulta essere di ordini di grandezza maggiore rispetto a quello idraulico. Ciò implica che le rese che si possono ottenere nei sistemi biologici convenzionali, si possono ottenere anche coi sistemi a biomassa granulare ma in volumi molto minori.

Nel secondo periodo sperimentale, in seguito alla rottura dei granuli si è osservato un sensibile rilascio degli idrocarburi che erano stati in precedenza adsorbiti, ma evidentemente non ancora biodegradati. Di conseguenza, la concentrazione di TPH nell'effluente risultò essere maggiore rispetto a quella alimentata con l'influente. Successivamente, quando i granuli si sono riformati, il trend di rimozione degli idrocarburi seguì fedelmente quello già osservato nel precedente periodo, confermando, pertanto, che il meccanismo di rimozione degli idrocarburi constava di due fasi successive di adsorbimento e di biodegradazione. Appare chiaro tuttavia, che una efficiente rimozione degli idrocarburi non possa prescindere dalla stabilità strutturale dei granuli, stante che i fenomeni di degranulazione causano non solo scarse rese depurative ma anche il rilascio di idrocarburi in quantità elevate. Contestualmente alle misure di TPH, sono state effettuate misure di idrocarburi aromatici. L'andamento delle loro concentrazioni nell'influente e nell'effluente sono mostrati nel grafico in Figura 5.26.

La concentrazione di idrocarburi aromatici nell'effluente è risultata prossima a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , pari cioè a circa il 90% della concentrazione dei TPH allo scarico. Ciò indicava che la prevalente frazione idrocarburica allo scarico era costituita proprio dai composti aromatici. È possibile che tale frazione degli idrocarburi totale, venisse rimossa prevalentemente per fenomeni fisici, mentre modesta era il contributo biologico alla loro rimozione, il che è plausibile vista l'estrema

complessità della struttura molecolare che caratterizza i composti aromatici, e di conseguenza i granuli lentamente si saturavano di tali composti. A conferma di ciò, è possibile evidenziare due differenti trend nel profilo del rendimento di rimozione degli idrocarburi aromatici. Nella prima parte del primo periodo infatti, il trend è risultato crescente fino al 75° giorno, dove le rese di rimozione hanno raggiunto un valore prossimo al 50%. Successivamente, il trend è risultato opposto, e al termine del primo periodo i rendimenti sono diminuiti a circa il 10%. I risultati osservati confermano dunque che il meccanismo di rimozione degli idrocarburi aromatici era di tipo prettamente fisico. Infatti, all'inizio quando i granuli si erano appena formati e la loro capacità di adsorbimento era massima, il rendimento aumentò gradualmente. Man mano che i granuli si andavano saturando, non essendoci uno spurgo selettivo dei granuli "esausti" le rese depurative sono progressivamente diminuite.



**Figura 5.26:** Andamento delle concentrazioni di idrocarburi aromatici nell'influenza e effluente nei due periodi sperimentali.

Come già precedentemente detto, nel secondo periodo, a seguito della quasi totale rottura dei granuli, la concentrazione dei composti aromatici allo scarico era maggiore rispetto a quella nell'alimento, evidente segno del desorbimento degli idrocarburi precedentemente adsorbiti e non biodegradati. Con la nuova formazione dei granuli nella seconda metà del secondo periodo, la concentrazione di idrocarburi aromatici nell'effluente diminuì in seguito al verificarsi di nuovi fenomeni di adsorbimento.

I risultati osservati dimostrano come i granuli aerobici consentano di rimuovere in maniera efficace gli idrocarburi, anche se tale processo presuppone e non può

prescindere dalla loro stabilità strutturale. Riguardo la frazione più recalcitrante, ovvero quella aromatica, il meccanismo di rimozione evidenziato è l'adsorbimento fisico, che nel lungo termine, porta alla saturazione dei granuli, riducendone la capacità adsorbente e di conseguenza le rese depurative. Per ovviare a tale fenomeno, occorrerebbe allontanare i granuli "esausti", applicando al sistema tempi di residenza cellulari più bassi, che tuttavia dovrebbero essere tali da garantire la degradazione biologica dei composti idrocarburici più facilmente degradabili. A tal proposito, sarebbero necessari ulteriori studi per stabilire il valore ottimale dell'età del fango che garantisca da un lato il necessario tempo per la degradazione degli idrocarburi meno recalcitranti, e che dall'altro eviti la totale saturazione dei granuli.

## 5.7 Conclusioni

Nel corso dei 158 giorni della sperimentazione sono state valutate le performance di un sistema biologico a biomassa granulare nel trattamento di reflui prodotti dal lavaggio delle cisterne delle navi petroliere, comunemente denominati slops.

La granulazione del fango attivo, precedentemente acclimatato alla matrice da trattare, è risultata molto rapida e il fango risultava in prevalenza granulare dopo appena 40 giorni. La presenza di sostanze idrofobiche e gli elevati livelli di salinità, stimolavano infatti la produzione di grandi quantità di EPS proteiche che hanno favorito la rapida formazione dei granuli aerobici. D'altra parte, le elevate concentrazioni di ioni sodio nel bulk, e il basso carico organico, hanno favorito la formazione di granuli debolmente addensati e strutturalmente poco stabili. La variazione di uno dei parametri operativi, quale il carico organico, ne ha causato infatti il quasi totale sfaldamento, evidenziando quindi una debolezza strutturale intrinseca dei granuli in precedenza ottenuti. Sebbene i granuli aerobici si sono nuovamente formati dopo un periodo transitorio di circa 20 giorni, le caratteristiche strutturali non migliorarono in maniera significativa, risultando molto simili a quelli osservati nel precedente periodo.

Nei periodi in cui la stabilità dei granuli era buona, le rese di rimozione del COD e dei TPH erano eccellenti e dell'ordine del 90%, tali dunque da consentire il rispetto degli standard normativi riportati rispettivamente nel D.Lgs. 152/06 e nella direttiva IMO-MARPOL 73/78. In particolare, è stato ipotizzato un meccanismo di rimozione fisico-biologico degli idrocarburi, favorito da un lato dalla struttura microporosa dei granuli che consentiva l'adsorbimento degli idrocarburi, e dall'altro dagli elevati tempi di residenza cellulare che ne permettevano la lenta idrolisi e la successiva biodegradazione. La perdita di stabilità dei granuli ha avuto effetti negativi anche sulla rimozione degli idrocarburi, causando in particolare il rilascio degli stessi precedentemente adsorbiti e non ancora degradati. Durante tutta

la sperimentazione, inoltre, non sono stati evidenziati effetti inibitori per la biomassa eterotrofa, infatti la sostanza organica è stata rimossa con rese superiori al 90% per quasi tutta la durata della sperimentazione. È stato ipotizzato invece un effetto di inibizione verso la biomassa autotrofa ad opera degli idrocarburi.

Le elevate rese depurative nei confronti della sostanza organica e soprattutto verso composti recalcitranti come gli idrocarburi, sottolineano comunque le grandi potenzialità di tale tecnologia soprattutto nel trattamento di reflui di origine industriale. I granuli aerobici si sono dimostrati essere una valida tecnologia per il trattamento dei reflui prodotti dalle attività navali. Tuttavia, la perdita di stabilità dei granuli nel lungo periodo si conferma dunque essere uno dei principali ostacoli alla diffusione di tale tecnologia nel trattamento dei reflui in impianti in piena scala. La perdita di stabilità potrebbe essere minimizzata garantendo una qualità del refluo influente poco variabile nel breve periodo, che potrebbe facilmente ottenersi dotando l'impianto di un buon sistema di omogeneizzazione a monte. Lo spurgo selettivo del fango potrebbe inoltre favorire l'allontanamento dal sistema da un lato di quei granuli che hanno già raggiunto una dimensione critica e che come tali risultano più suscettibili a fenomeni di sfaldamento, e dall'altro di quelli che hanno perso le capacità adsorbenti in quanto saturi. Futuri studi dovrebbero essere finalizzati alla ricerca delle condizioni operative che minimizzino le disfunzioni evidenziate in questo studio.

## 5.8 Bibliografia

- Abdullah, N., Yuzir, A., Curtis, T.P., Yahya, A. and Ujang, Z., 2013. Characterization of aerobic granular sludge treating high strength agro-based wastewater at different volumetric loadings. *Bioresource Technology* 127, 181-187.
- Adav, S.S. and Lee, D.J., 2008. Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *Journal of Hazardous Materials* 154(1-3), 1120-1126.
- Amorim, C.L., Maia, A.S., Mesquita, R.B.R., Rangel, A.O.S.S., van Loosdrecht, M.C.M., Tiritan, M.E. and Castro, P.M.L., 2014. Performance of aerobic granular sludge in a sequencing batch bioreactor exposed to ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin. *Water Research* 50, 101-113.
- APHA, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, nineteenth ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Bassin, J.P., Pronk, M., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Dezotti, M. and van Loosdrecht, M.C.M., 2011. Effect of elevated salt concentrations on the aerobic granular sludge process: Linking microbial activity with microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 77(22), 7942-7953.
- Beun, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J., 2002. Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research* 36(3), 702-712.
- Campo, R., Di Prima, N., Gabriella Giustra, M., Freni, G., Di Bella, G., 2016. Performance of a moving bed-membrane bioreactor treating saline wastewater contaminated by hydrocarbons from washing of oil tankers. *Desalin. Water Treat.* 3994, 1–10.
- De Kreuk, M.K., Pronk, M. and Van Loosdrecht, M.C.M., 2005. Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. *Water Research* 39(18), 4476-4484.
- De Kreuk, M., Kishida, N., Tsuneda, S., van Loosdrecht, M.C.M. 2010. Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. *Water Research*, 44, 5929-5938.
- Di Bella, G., Di Trapani, D., Torregrossa, M. and Viviani, G., 2013. Performance of a MBR pilot plant treating high strength wastewater subject to salinity increase: Analysis of biomass activity and fouling behaviour. *Bioresource Technology* 147, 614-618.
- Di Bella, G., Giustra, M.G. and Freni, G., 2014. Optimisation of coagulation/flocculation for pre-treatment of high strength and saline wastewater: Performance analysis with different coagulant doses. *Chemical Engineering Journal* 254, 283-292.

- Di Bella, G. and Torregrossa, M., 2013. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. *Bioresource Technology* 142, 706-713.
- Di Bella, G. and Torregrossa, M., 2014. Aerobic granular sludge for leachate treatment, pp. 493-498. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 493-498.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3), 350-356.
- Hu, Z., Ferraina, R.A., Ericson, J.F., MacKay, A.A. and Smets, B.F., 2005. Biomass characteristics in three sequencing batch reactors treating a wastewater containing synthetic organic chemicals. *Water Research* 39(4), 710-720.
- Ismail, S.B., de La Parra, C.J., Temmink, H. and van Lier, J.B., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors operated under high salinity conditions. *Water Research* 44(6), 1909-1917.
- Le-Clech, P., Chen, V., Fane, T.A.G., 2006. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science* 284(1-2), 17-53.
- Liu, H.J., Tay, H.T., 2001. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* Vol.36, pp.1653-1665
- Liu, Y.Q., Tay, J.H. 2007 Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 99, 980-985
- Liu, H., Li, Y., Yang, C., Pu, W., He, L. and Bo, F., 2012. Stable aerobic granules in continuous-flow bioreactor with self-forming dynamic membrane. *Bioresource Technology* 121, 111-118.
- Lochmatter, S. and Holliger, C., 2014. Optimization of operation conditions for the startup of aerobic granular sludge reactors biologically removing carbon, nitrogen, and phosphorous. *Water Research* 59, 58-70.
- Long, B., Yang, C.Z., Pu, W.H., Yang, J.K., Jiang, G.J., Dan, J.F., Li, C.J., Liu, F.B., 2015. Rapid cultivation of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor. *Bioresource and Technology* 166, 57-63.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193(1), 265-275.
- Maszenan, A.M., Liu, Y., Ng, W.J., 2011. Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. *Biotechnol. Adv.* 29, 111-123.
- Moreira, I.S., Amorim, C.L., Ribeiro, A.R., Mesquita, R.B.R., Rangel, A.O.S.S., van Loosdrecht, M.C.M., Tiritan, M.E. and Castro, P.M.L., 2015. Removal of

- fluoxetine and its effects in the performance of an aerobic granular sludge sequential batch reactor. *Journal of Hazardous Materials* 287, 93-101.
- Pendashteh, A.R., Abdullah, L.C., Fakhru'L-Razi, A., Madaeni, S.S., Zainal Abidin, Z. and Awang Biak, D.R., 2012. Evaluation of membrane bioreactor for hypersaline oily wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection* 90(1), 45-55.
- Pijuan, M., Werner, U. and Yuan, Z., 2011. Reducing the startup time of aerobic granular sludge reactors through seeding floccular sludge with crushed aerobic granules. *Water Research* 45(16), 5075-5083.
- Pronk, M., Bassin, J.P., De Kreuk, M.K., Kleerebezem, R. and Van Loosdrecht, M.C.M., 2014. Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(3), 1339-1348.
- Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9(1), 29-33.
- Schwarzenbeck, S., Erley, S., Wilderer, P.A., 2004. Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. *Water Science and Technology* 49(11-12), 41-46
- Sun, C., Leiknes, T., Weitzenböck, J. and Thorstensen, B., 2010. Salinity effect on a biofilm-MBR process for shipboard wastewater treatment. *Separation and Purification Technology* 72(3), 380-387.
- Tay JH, Liu QS, Liu Y., 2004. The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001b; 57, .227- 33.
- Verawaty, M., Tait, S., Pijuan, M., Yuan, Z. and Bond, P.L., 2013. Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Research* 47(14), 5338-5349.
- Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Liu, X., Sun, S. and Chen, C., 2014. Partial nitrification of wastewaters with high NaCl concentrations by aerobic granules in continuous-flow reactor. *Bioresource Technology* 152, 1-6.
- Xiong, Y., Liu, Y., 2013. Importance of extracellular proteins in maintaining structural integrity of aerobic granules. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*, 112, 435-440.
- Zhang, H., He, Y., Jiang, T. and Yang, F., 2011. Research on characteristics of aerobic granules treating petrochemical wastewater by acclimation and co-metabolism methods. *Desalination* 279(1-3), 69-74.
- Zhu, L., Qi, H.Y., Lv, M.L., Kong, Y., Yu, Y.W. and Xu, X.Y., 2012. Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies. *Bioresource Technology* 124, 455-459.



## Capitolo 6

# Analisi sperimentale sul trattamento di reflui ittico-conservieri

### 6.1 Introduzione e obiettivi dello studio

Le industrie che operano nel settore alimentare, e in particolare nella conservazione del pesce, utilizzano grandi quantità di acqua in tutte le fasi del processo produttivo, a partire dal lavaggio, dall'eventuale cottura, alla conservazione e infine per il lavaggio dei locali di produzione (**Cristovao et al., 2015**). A seconda della tipologia di pesce, tali industrie utilizzano grandi quantità di sale per la produzione di salamoie che utilizzano per la conservazione del pesce stesso. Di conseguenza, tali acque sono caratterizzate da elevate concentrazioni di sale, che per la quasi totalità è cloruro di sodio. Inoltre, soprattutto durante il periodo di lavorazione del pesce fresco, tali reflui hanno un elevatissimo contenuto di solidi sospesi fino a  $5.000 \text{ mg L}^{-1}$ , di sostanza organica fino a  $90.000 \text{ mgCOD L}^{-1}$  in prevalenza presente in forma particolata, e infine concentrazioni di azoto superiori ai  $3.000 \text{ mgTKN L}^{-1}$  (**Chowdhury et al., 2010**). A causa dell'elevata salinità, il trattamento biologico di tali reflui richiederebbe l'applicazione di specifici ceppi alofili che sono in grado di vivere ad elevate concentrazioni di sali. Al contrario, l'utilizzo di ceppi batterici non-alofili non è consono a tale scopo, a causa del gradiente di pressione osmotica attraverso la loro parete cellulare che ne causa la rottura e la perdita dell'acqua cellulare (plasmolisi) (**Dincer e Kargi, 2001**). Tuttavia, l'utilizzo di microrganismi non-alofili è possibile in quanto, come osservato da diversi autori tra i quali **Lefebvre e Moletta, (2006)**, tali batteri se opportunamente acclimatati, riescono ad acquisire un modesto grado di alotolleranza. Grazie alle caratteristiche dei fanghi aerobici granulari espone nei precedenti capitoli, questi hanno attratto un sempre più crescente interesse per il trattamento di reflui industriali (**Maszenan et al., 2011; Zhang et al., 2011; Abdullah et al., 2013; Long et al., 2015**) e in particolare per il trattamento di reflui salini di natura sintetica. **Taheri et al. (2012)** hanno ottenuto granuli aerobici strutturalmente stabili fino a  $10 \text{ gNaCl L}^{-1}$ , mentre **Wang et al. (2015)** hanno adattato i granuli con successo fino a  $80 \text{ gNaCl L}^{-1}$ . Gli autori riportano che alcuni microrganismi si adattano progressivamente alla salinità e diventano alla lunga le

specie dominanti all'interno dei granuli. Tutti questi studi però sottolineano l'esistenza di alcune problematiche operative, specie per quanto riguarda la rimozione dell'azoto. **Bassin et al. (2011)** osservarono che i batteri ammonio ossidanti (AOB) riescono a tollerare concentrazioni saline fino a 33 gNaCl L<sup>-1</sup>, mentre **Pronk et al. (2013)** riportano che gli stessi batteri risultano totalmente inibiti per concentrazioni superiori a 20 gNaCl L<sup>-1</sup>. Al contempo, **Wan et al. (2014)** scoprirono che fino a 50 gNaCl L<sup>-1</sup> è possibile ottenere la totale conversione dell'azoto ammoniacale ad azoto nitroso. Alla luce di questi risultati si evince che nel trattamento di tali reflui nella quasi totalità dei casi si verifica o l'accumulo di azoto ammoniacale o nitroso. A parte i sopracitati studi, nella letteratura sono riportate poche esperienze con refluo salino reale. **Figueroa et al. (2008)** hanno trattato refluo prodotto da un industria ittico-conserviera con salinità dell'ordine dei 30 gNaCl L<sup>-1</sup>. Gli autori osservarono che sebbene la rimozione della sostanza organica fosse pressoché completa, le rese di rimozione dell'azoto risultavano inferiori al 40% e per lo più addebitabili alla sintesi della biomassa eterotrofa. Risultati simili sono stati ottenuti da **Val del Rio et al. (2013)**, che osservarono inoltre la rottura dei granuli per valori del carico organico volumetrico superiori a 4,4 kgCOD m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>. Un altro problema di tali reflui è l'elevatissima presenza di sostanza organica presente soprattutto in forma particolata (**Jemli et al., 2015**). I granuli aerobici sono noti per le loro capacità bioadsorbenti (**De Kreuk et al., 2010**), per tale motivo la loro applicazione nel trattamento dei reflui ittico-conservieri potrebbe essere una soluzione alla risoluzione delle problematiche inerenti il loro trattamento per via biologica.

L'obiettivo di questa sperimentazione è stato quello di valutare la trattabilità dei reflui ittico-conservieri con un sistema biologico a biomassa granulare. Nel dettaglio, si è cercato di trovare le migliori condizioni operative che massimizzassero le performance depurative, valutate in termini di rimozione della sostanza organica e dell'azoto, a concentrazioni di sale e di carico organico progressivamente crescenti da 30 a 75 gNaCl L<sup>-1</sup>. In particolare, si è focalizzata l'attenzione sulla massima concentrazione di sale e di carico organico che i granuli sono in grado di tollerare, tenendo in considerazione non solo le performance biologiche quanto le caratteristiche strutturali dei granuli stessi. Sono state condotte inoltre specifiche analisi per analizzare il meccanismo di rimozione della sostanza organica, anche in questo caso finalizzate all'individuazione delle migliori condizioni operative. Infine sono state condotte specifiche analisi sulla caratterizzazione delle EPS e sull'idrofobicità dei granuli al fine di analizzare il fango granulare dal punto di vista strutturale al variare della salinità.

## 6.2 Origine e caratterizzazione del refluo ittico-conserviero

Il refluo ittico-conserviero è stato prelevato presso una locale azienda che produce conserve di acciughe (Balistreri Girolamo srl, Aspra, Palermo). Il ciclo di produzione è riassunto in maniera sommaria in Figura 6.1. La produzione inizia nel momento in cui il pesce fresco arriva in azienda. All'arrivo del pesce questo viene subito lavato con la salamoia e successivamente vengono tolte le teste e le viscere e il pesce viene quindi salato e stoccato all'interno recipienti pressati. In questa fase si utilizzano elevati volumi di salamoia e il refluo che si produce è ricco di sangue, grassi, scaglie e sale. Le acque reflue prodotte durante il periodo di lavorazione del pesce fresco sono caratterizzate da elevati valori di COD ( $80.000 \text{ mgCOD L}^{-1}$ ) e da salinità nell'ordine di  $300 \text{ gNaCl L}^{-1}$ .



**Figura 6.1:** Ciclo di produzione delle acciughe salate

Dopo un periodo di durata variabile in funzione delle richieste di mercato in cui il pesce viene stoccato in salamoia, questo passa alla fase di lavorazione e confezionamento. In questa fase il pesce viene lavato con acqua salata ma a concentrazioni di sale nell'ordine di  $50-100 \text{ gNaCl L}^{-1}$ , successivamente è privato delle scaglie e, infine, dopo centrifugazione per l'eliminazione dell'acqua residue passa al reparto di inscatolamento. In questa fase il refluo prodotto è meno carico rispetto alla fase precedente, e il contenuto di sostanza organica è nell'ordine di  $16.000 \text{ mgCOD L}^{-1}$ . Inoltre, durante la fase di lavorazione del pesce già salato, si utilizzano elevate quantità di acqua dolce per il lavaggio dei pavimenti e dei banchi di lavoro, che vanno ulteriormente a diluire il refluo. Le acque di produzione, comprendenti dunque quelle della lavorazione del pesce fresco e di quello già salato, vengono stoccate all'interno di vasche di raccolta. Il refluo prodotto ha dunque caratteristiche qualitative molto variabili a seconda della fase di produzione, sia in termini quantitativi che qualitativi, soprattutto con riferimento alla salinità.

### 6.3 Materiali e Metodi

La sperimentazione è stata suddivisa in 5 periodi (78 giorni in totale) ciascuno dei quali caratterizzato da differenti concentrazioni di sale e di carico organico. Il reattore del tipo SBAR utilizzato per la sperimentazione era geometricamente identico a quello descritto al capitolo 5 (Figura 6.2).



**Figura 6.2:** Immagini del reattore SBAR utilizzato per la sperimentazione

Dalla fase I alla IVa, l'impianto ha operato secondo cicli di 12 ore, suddivisi nelle varie fasi tipiche dei reattori SBR secondo quanto riportato in tabella 6.1. Al fine di variare il valore del carico organico senza modificare la salinità, nella quinta fase, che verrà da ora in poi chiamata fase IVb, la durata del ciclo è stata aumentata a 24 ore, lasciando inalterata la durata di tutte le fasi eccetto quella di aerazione.

**Tabella 6.1:** Suddivisione del ciclo di reazione

Ciclo	Alimentazione	Aerazione	Sedimentazione	Scarico
[min]	[min]	[min]	[min]	[min]
720	45	665	5	5

A causa della scarsa disponibilità di substrato rapidamente biodegradabile, per favorire le reazioni di denitrificazione, a partire dalla seconda fase è stata aggiunta una quantità nota di acetato di sodio come fonte di carbonio esterna, dopo la decima ora del ciclo. Tale quantità inizialmente pari a 200 mg L<sup>-1</sup> è stata raddoppiata nella terza fase per far fronte da un lato al maggiore carico di azoto, e dall'altro al consumo dell'acetato per ossidazione diretta, visto che durante tale fase non veniva interrotta l'aerazione. L'età del fango è stata mantenuta pari a 45-50 giorni mediante spurgo giornaliero di una nota quantità di fango.

A causa dell'estrema variabilità del refluo prodotto dall'industria ittica, al fine di valutare le performance biologiche di un refluo con caratteristiche qualitative pressoché costanti, è stato prelevato un significativo volume di refluo durante il periodo di lavorazione del pesce fresco (periodo di massimo carico organico e salino) ed è stato conservato a 4°C per tutto il periodo sperimentale. Le caratteristiche del refluo grezzo sono riportate in Tabella 6.2.

**Tabella 6.2:** Caratteristiche del refluo grezzo

COD <sub>(TOT)</sub>	COD <sub>(SOL)</sub>	COD <sub>(PART)</sub>	TOC	BOD <sub>5</sub>	TN	N-NH <sub>4</sub>	NaCl	Conducibilità
[mg L <sup>-1</sup> ]	[g L <sup>-1</sup> ]	[mS cm <sup>-1</sup> ]						
16.984	11.362	5.622	2.108	7.060	1.152	288	152	160

Tale refluo veniva successivamente diluito al fine di ottenere le concentrazioni saline desiderate. Il carico organico non veniva fissato a priori, ma risultava essere funzione del fattore di diluizione applicato. I principali parametri operativi sono riportati in Tabella 6.3.

Tabella 6.3: Condizioni operative nei cinque periodi sperimentali

Fase	Giorno	Diluizione	Salinità (gNaCl L <sup>-1</sup> )	Conducibilità (mS cm <sup>-1</sup> )	OLR (kgCOD m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )
I	0-23	5	30	48.2	3,22 ± 0,064
II	24-39	4	38	52.8	4,11 ± 0,108
III	40-53	3	50	64	5,39 ± 0,067
IVa	51-61	2	75	87	8,02 ± 0,082
IVb	62-78	2	75	87	4,00 ± 0,101

## 6.4 Campagna d'analisi e metodiche analitiche

Nei successivi paragrafi vengono descritte le procedure analitiche applicate per la caratterizzazione del refluo influente ed effluente, nonché per l'analisi delle caratteristiche morfologico-strutturali dei granuli aerobici durante le cinque fasi sperimentali.

### 6.4.1 Analisi sulla miscela aerata

Nel corso della campagna sperimentale sono state effettuate specifiche analisi chimico-fisiche sulla miscela aerata al fine di caratterizzare strutturalmente i granuli aerobici e per valutarne la loro evoluzione nel tempo al crescere delle concentrazioni saline. A tal fine sono state effettuate analisi di solidi sospesi totali e volatili, misure del contenuto di EPS, di idrofobicità, del contenuto d'acqua e infine osservazioni microscopiche per l'analisi morfologica e granulometrica. Tali analisi sono state eseguite secondo i protocolli già descritti al paragrafo 5.3.1. Inoltre, sono state effettuate specifiche prove di sedimentazione sui granuli, che consistevano nel far sedimentare singolarmente i granuli in un cilindro graduato e nel calcolarne la velocità di Stokes per le varie concentrazioni saline.

### 6.4.2 Analisi sull'influente/effluente

Nel corso dei 5 periodi sperimentali sono state eseguite analisi chimiche, fisiche e respirometriche sia sull'influente che sull'effluente dell'impianto. Nel dettaglio è stata monitorata la concentrazione di solidi sospesi totali e volatili nei due flussi al fine di valutare le capacità adsorbenti dei granuli aerobici. La metodica standard (APHA, 2005) è stata modificata in funzione delle elevate salinità dei campioni. In particolare, dopo la filtrazione di un noto volume di campione, il filtro veniva lavato con un volume di acqua deionizzata pari a circa il doppio rispetto a quello del campione, al fine di favorire il dilavamento del sale non disciolto e intrappolato

sul filtro stesso. Analogamente a quanto discusso nel paragrafo 5.3.2, per le misure della sostanza organica si è scelto di utilizzare come indicatori sia parametri indiretti come COD e BOD che diretti come il TOC. Nel caso del COD, il campione è stato diluito in modo che la concentrazione di cloruri risultasse inferiore rispetto al limite di interferenza dei kit utilizzato per l'analisi spettrofotometrica del COD. Inoltre, sono state effettuate analisi sia sul campione tal quale per la determinazione del COD totale, che sul campione filtrato a 0,45 µm per la determinazione del COD solubile. Il COD particolato è stato quindi calcolato per differenza tra il COD totale e solubile. Per quanto riguarda l'azoto, sono state effettuate misure di azoto totale e delle forme ioniche, quali ammonio, nitriti e nitrati in accordo a quanto già riportato al paragrafo 5.3.2. Sia il TOC che il TN (e le forme azotate) sono stati determinati su campioni filtrati a 0,45 µm, pertanto i valori ottenuti relativamente al carbonio e all'azoto e in seguito discussi sono da considerare solubili.

### 6.4.3 Prove di frazionamento del refluo

Al fine di caratterizzare la natura del carico organico del refluo e di stabilire su quali frazioni di essa il processo risultasse più o meno efficace, sono state effettuate delle prove di frazionamento del COD sia dell'influente che dell'effluente. Il COD di un refluo può essere frazionato in una componente solubile e in una particolata. A loro volta tali frazioni possono essere scomposte nella frazione solubile inerte ( $S_I$ ) e rapidamente biodegradabile ( $S_S$ ) la prima, e nelle frazioni lentamente biodegradabile/idrolizzabile ( $X_S$ ), particolata inerte ( $X_I$ ), e biomassa attiva ( $X_H$ ) la seconda (Figura 6.3).

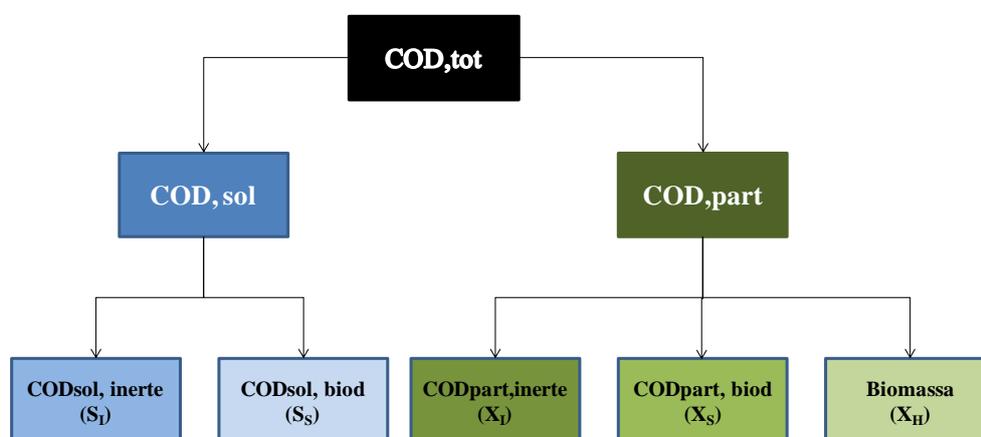


Figura 6.3: Schema di frazionamento del COD

Per la determinazione della frazione rapidamente biodegradabile ( $S_S$ ) e per la frazione biodegradabile totale ( $S_S+X_S$ ) sono state condotte prove respirometriche per le quali è stata utilizzata una biomassa fioccosa risultante dal dilavamento della colonna, in modo che essa fosse ben acclimatata al refluo in esame.

Dopo la determinazione del COD totale e solubile, la cui differenza fornisce la misura del COD particolato, si passava a determinare le singole frazioni. La determinazione delle varie frazioni che compongono il COD totale è stata effettuata mediante test respirometrici, che consistono nella misura del consumo di ossigeno durante l'ossidazione dei substrati organici da parte della sola biomassa eterotrofa. La misura del consumo di ossigeno viene poi correlata al COD mediante delle relazioni stechiometriche (**Andreottola et al., 2002**).

La misura del COD solubile prontamente biodegradabile si basa invece su un assunto, ovvero quello secondo cui tale substrato viene consumato con la stessa velocità con cui viene ossidato l'acetato di sodio. Pertanto è necessario costruire una curva di calibrazione tra OD utilizzato e COD consumato che si ottiene attraverso l'esecuzione di circa 4-5 test i quali restituiscono altrettanti punti sperimentali, ognuno dei quali ottenuto con un diverso dosaggio di acetato. Il procedimento seguito è stato il seguente: dopo aver aerato il campione per circa 2-3 ore e aggiunta l'Alliltiurea (per inibire la biomassa autotrofa), si porta la concentrazione di ossigeno a saturazione; dopo di che l'aerazione viene interrotta e si osserva un breve tratto di respirazione endogena; dopo qualche minuto viene dosata una quantità nota di acetato, variabile tra 0,5 e 2 mL, e si osserva un netto cambio di pendenza nella retta dell'OD dovuta al consumo del substrato esogeno; quando tutto l'acetato aggiunto viene consumato si osserva una riduzione della pendenza della retta dell'OD che diventa parallela al tratto di respirazione endogena prima osservato; raggiunta questa condizione la prova si considera completata. A questo punto si determina la quantità di ossigeno consumato in ragione della quantità di acetato aggiunto (Figura 6.4). La prova è stata ripetuta variando la quantità di acetato aggiunta, fino ad ottenere 4 punti sperimentali.

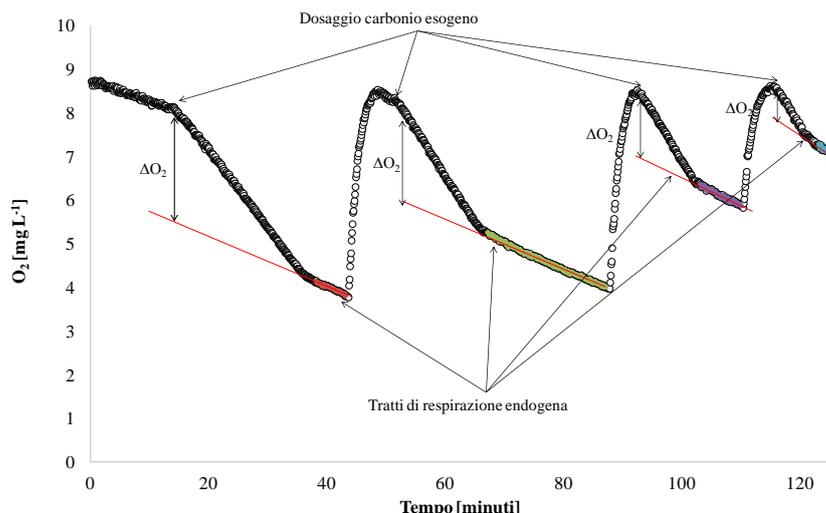


Figura 6.4: Prova per la determinazione della retta di taratura  $\Delta O_2$ - $S_S$ COD

Riportando i risultati ottenuti in un grafico in cui in ascissa è riportata la concentrazione di acetato aggiunta e in ordinata la concentrazione di ossigeno consumata, si è ottenuta, mediante interpolazione ai minimi quadrati, l'equazione della retta di calibrazione (Figura 6.5).

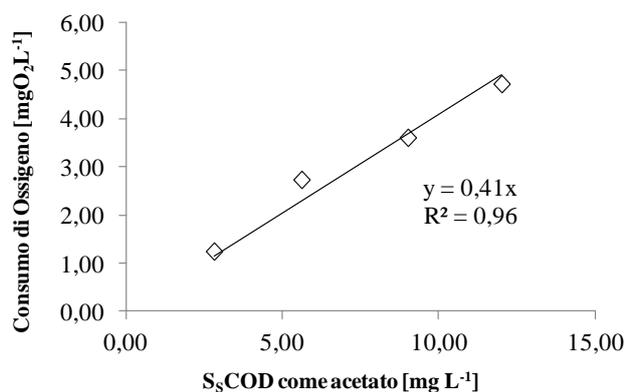
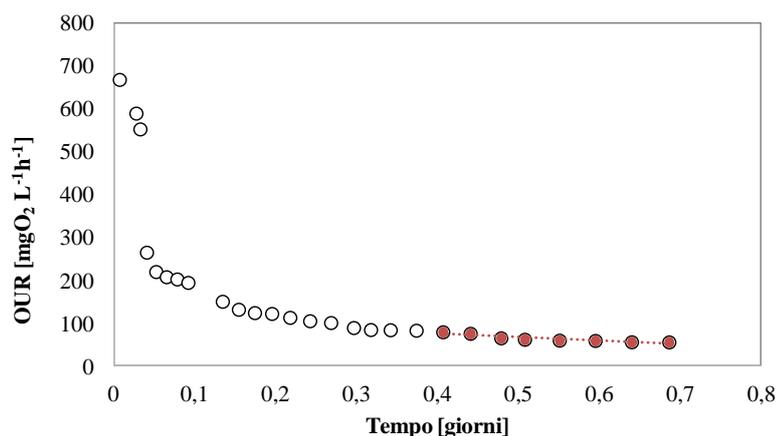


Figura 6.5: Regressione lineare dei punti per la determinazione delle retta  $\Delta O_2$ -RbCOD

Ricavata la curva di calibrazione (procedura eseguita una sola volta per tutta la durata della sperimentazione), si è proceduto al calcolo della quantità di  $S_S$ COD presente nel refluo. La modalità della prova è del tutto analoga a quella per la

costruzione della retta di calibrazione, ma è eseguita a partire dal dosaggio di una quantità nota di refluo. Nel dettaglio, si registra il valore di  $\Delta O_2$  e tramite la curva di calibrazione si ricava il valore di  $S_5\text{COD}$  che va poi riferito al volume di campione dosato.

La prova della misura del COD biodegradabile totale si ottiene mediante lo svolgimento di una prova respirometrica secondo la procedura riportata da **Andreottola et al. (2002)**. Tale prova consiste nel monitorare la velocità di consumo dell'ossigeno (OUR) fino alla totale ossidazione della sostanza biodegradabile presente nel campione. Il tipico respirogramma che si ottiene è mostrato in Figura 6.6. La quantità di bCOD è l'area sottesa dal respirogramma al netto della respirazione endogena.



**Figura 6.6:** Respirogramma per la determinazione della frazione di COD biodegradabile del refluo

Infine per la determinazione della frazione attiva eterotrofa le prove sono state effettuate su un campione di refluo di circa 0,5 litri a cui venivano aggiunti ATU (20 ml) e una quantità di acetato di sodio tale che il rapporto F/M risultasse maggiore di 4 (circa 200 ml di acetato concentrato a 10 g/l). Il respirogramma che si otteneva era crescente in quanto la biomassa del refluo, trovandosi in condizioni di substrato non limitante, si sviluppava nel respirometro e, infine, presentava una coda che si formava quando tutto l'acetato aggiunto è stato ossidato. I valori di OUR del respirogramma (Figura 6.7) venivano poi riportati in un grafico  $\ln\text{OUR}$ -tempo, e infine applicando una regressione lineare ai suddetti, si otteneva una retta dalla quale si ricava la frazione attiva utilizzando l'equazione 6.1 di seguito riportata:

$$X_{H0} = \frac{OUR(t_0)}{\left(\frac{1 - Y_H}{Y_H}\right) \cdot \mu_{maxH} + (1 - f_p) \cdot b_H} \tag{6.1}$$

dove,  $OUR(t_0)$  è l'intercetta della retta interpolante e  $b_H$  la sua pendenza.  $Y_H$ ,  $\mu_{maxH}$  e  $f_p$  sono rispettivamente il coefficiente di crescita cellulare, la massima velocità di crescita della biomassa eterotrofa e la frazione di residuo endogeno della biomassa. Tali parametri sono stati fissati in accordo a quanto riportato in letteratura (Spanjers et al., 1998).

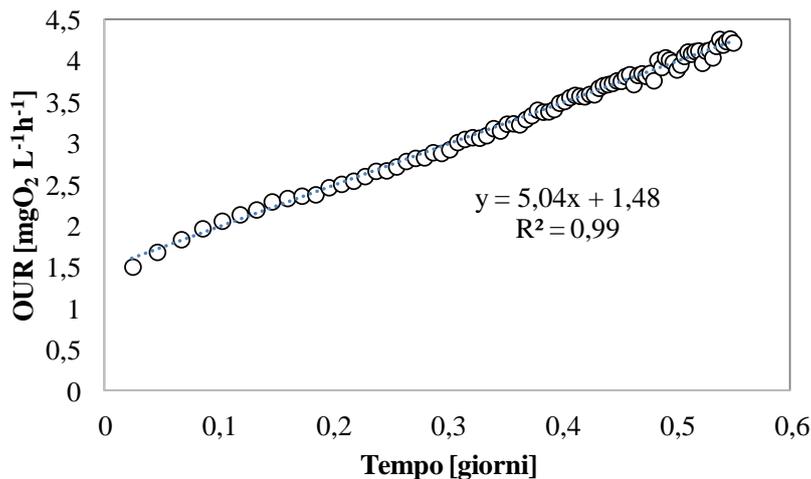


Figura 6.7: Regressione lineare per la determinazione della frazione attiva nel refluo

Eseguite queste tre prove, le singole frazioni si determinavano applicando le seguenti relazioni:

$$S_1 = COD_{sol} - S_s \tag{6.2}$$

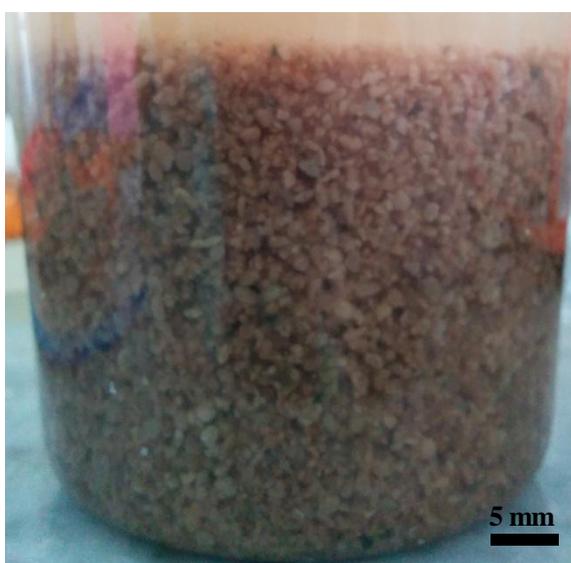
$$X_s = BCOD - S_s \tag{6.3}$$

$$X_1 = COD_{part} - X_s - X_s \tag{6.4}$$

Le analisi del frazionamento sono state condotte sia sull'influente che sull'effluente al termine di ciascuno dei periodi sperimentali, al fine di valutare su quali frazioni del COD i granuli aerobici fossero più o meno efficaci dal punto di vista depurativo.

## 6.5 Inoculo

Il reattore SBAR è stato inoculato con fango granulare coltivato in un altro reattore geometricamente identico a quello utilizzato per questo studio. Il fango granulare è stato coltivato a partire da un inoculo di biomassa granulare coltivata con refluo sintetico ed acclimatata gradualmente fino alla salinità di  $25 \text{ gNaCl L}^{-1}$ . Questo reattore è stato alimentato per 150 giorni con refluo sintetico salino con acetato come fonte di carbonio, fin quando i granuli aerobici erano strutturalmente maturi. Prima del loro inoculo nel nuovo reattore il fango è stato alimentato per circa due settimane con una miscela di refluo sintetico e refluo ittico-conserviero, al fine di consentire la graduale acclimatazione della biomassa alla nuova e più complessa matrice organica. In Figura 6.8 è mostrato un campione di fango granulare relativo all'inoculo.



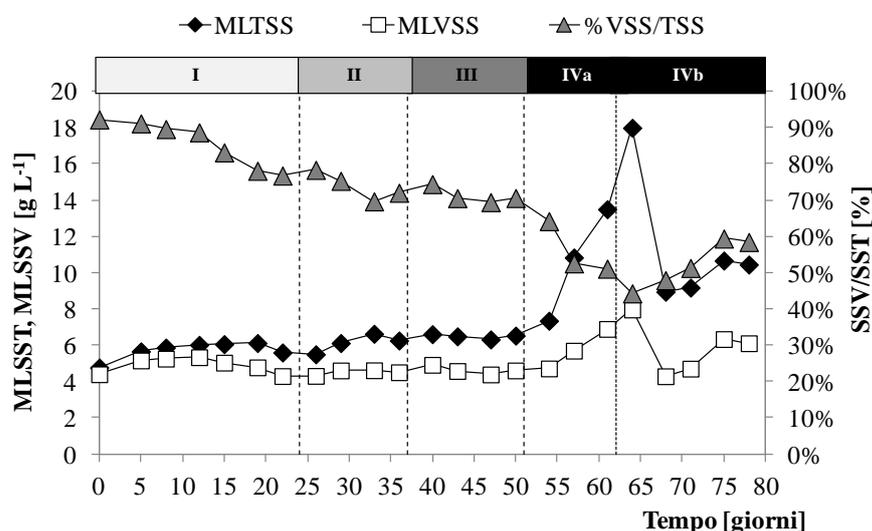
**Figura 6.8:** Immagine dei granuli aerobici

## 6.6 Caratteristiche dei granuli aerobici

Nei successivi paragrafi vengono riportati e discussi i risultati inerenti le caratteristiche morfologico strutturali dei granuli aerobici. In essi è stata focalizzata l'attenzione sugli effetti della salinità sull'evoluzione morfologico-strutturale dei granuli aerobici.

### 6.6.1 Analisi dei solidi sospesi totali e volatili

L'andamento dei solidi sospesi totali e volatili e il loro rapporto nei cinque periodi sperimentali è mostrato in Figura 6.9.



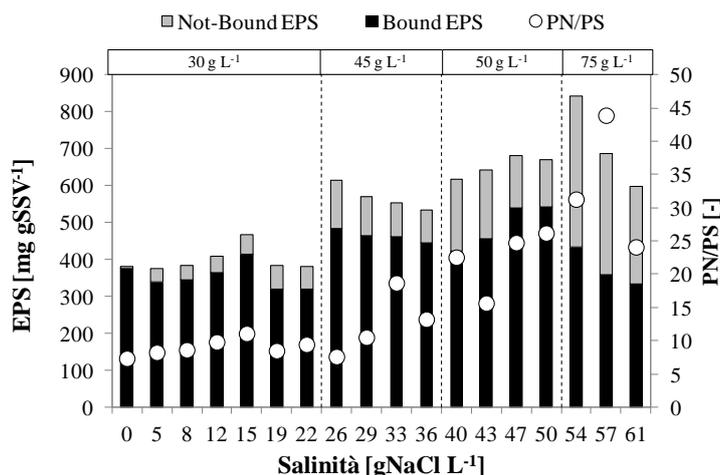
**Figura 6.9:** Andamento della concentrazione dei solidi sospesi totali, volatili e del loro rapporto nei 5 periodi.

Nei primi tre periodi i solidi sospesi totali hanno mostrato un lieve trend crescente: dal valore di inoculo di poco inferiore ai 5 gSST L<sup>-1</sup>, il valore dei solidi sospesi totali è aumentato fino a circa 6 gSST L<sup>-1</sup> alla fine del periodo III. I solidi volatili invece si sono mantenuti pressoché costanti intorno ai 4-4,5 gSSV L<sup>-1</sup>. In ragione di ciò, il rapporto tra i solidi volatili e totali è significativamente diminuito da circa il 90% del fango di inoculo a circa il 70% nel terzo periodo. Ciò indicava la progressiva inertizzazione dei granuli aerobici, dovuta in parte all'adsorbimento di sostanze inerti presenti nell'alimento, ma anche all'invecchiamento dei granuli stessi, che produceva la graduale mineralizzazione del loro nucleo (Verawaty et al. 2012). Tali dati evidenziavano nel complesso una modesta sintesi di nuova biomassa. Nel periodo IVa, la concentrazione di solidi totali è drasticamente aumentata fino a 18 gSST L<sup>-1</sup>, principalmente a causa del contestuale incremento dei solidi sospesi totali nell'alimento (come si dirà nel paragrafo 6.7). La concentrazione di solidi sospesi volatili è anch'essa aumentata, ma nel complesso il rapporto SSV/SST si è ulteriormente ridotto al di sotto del 50%, sottolineando un avanzato grado di inertizzazione dei granuli nel reattore. L'eccessiva quantità di materiale inerte contenuto nei granuli, oltre a non dare benefici in termini di

rimozione degli inquinanti, può provocare lo sfaldamento degli aggregati, in quanto la mineralizzazione del nucleo può far venir meno la struttura portante dei granuli stessi. Come si evidenzierà nel paragrafo 6.4.4, in questo periodo la stabilità strutturale dei granuli risultava compromessa, certamente anche a causa dell'elevata salinità e del carico organico. Al fine di rimuovere una parte della frazione inerte del fango, all'inizio della fase IVb, è stato effettuato uno spurgo selettivo dei granuli. Secondo quanto riportato da **Zhu et al. (2013)**, i granuli caratterizzati da una maggiore frazione inerte risultano essere più pesanti degli altri. Pertanto al fine di favorirne l'allontanamento dal reattore, è stato spurgato un certo volume di fango dal fondo del reattore successivamente alla fase di sedimentazione. Come si discuterà in dettaglio rispettivamente nei paragrafi 6.7 e 6.8, ciò ha dato benefici in termini di qualità dell'effluente sia per quanto riguarda la torbidità che per la rimozione della sostanza organica grazie appunto all'allontanamento della biomassa più vecchia e di conseguenza biologicamente meno attiva.

### 6.6.2 Caratterizzazione e composizione delle EPS

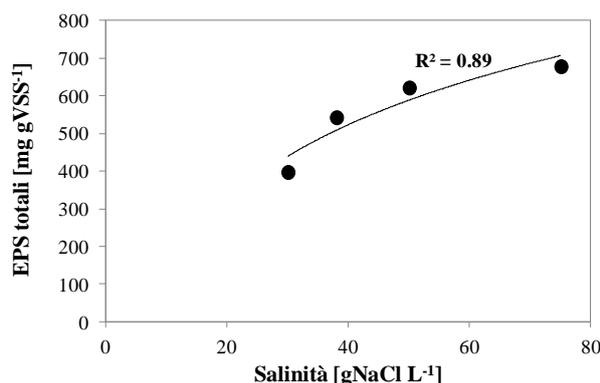
Il ruolo delle EPS nella formazione e mantenimento strutturale dei granuli aerobici è riconosciuto da molti autori (**Adav et al., 2008; Zhu et al., 2012; Xiong et al., 2013**). La loro analisi in impianti che trattano reflui complessi come possono essere quelli ad elevata salinità, risulta essere molto importante, in ragione del fatto che le EPS, essendo prodotti del metabolismo batterico, riflettono in qualche maniera lo stato dell'attività metabolica della biomassa. A maggior ragione in un sistema a biomassa granulare, la quantificazione del contenuto di EPS è molto importante in quanto è noto il ruolo delle EPS sulla formazione dei granuli aerobici. Inoltre, la distinzione tra EPS legate e non legate, ma anche la composizione delle EPS stesse, fornisce utili informazioni riguardo lo stato di aggregazione dei granuli, evidenziandone la tendenza allo sfaldamento, alla formazione di nuovi o ancora alla loro maturazione (**Zhang et al., 2012**). In questo lavoro l'analisi delle EPS ha rivestito un ruolo molto importante, in quanto è noto che per adattarsi in ambienti ad elevata salinità i batteri producano una maggiore quantità di polimeri extracellulari per fronteggiare le forti pressioni osmotiche attraverso la loro parete cellulare (**Taheri et al., 2012**). La quantificazione del contenuto di EPS dei granuli fornisce, dunque, da un lato informazioni circa lo stato di aggregazione dei granuli e dall'altro il meccanismo di adattamento dei microrganismi alla salinità. La concentrazione di EPS riferita alla concentrazione di solidi volatili nei cinque periodi sperimentali è mostrato in Figura 6.10.



**Figura 6.10:** Andamento della concentrazione di EPS legate (bound), non legate (not-bound) e del rapporto PN/PS nelle EPS totali.

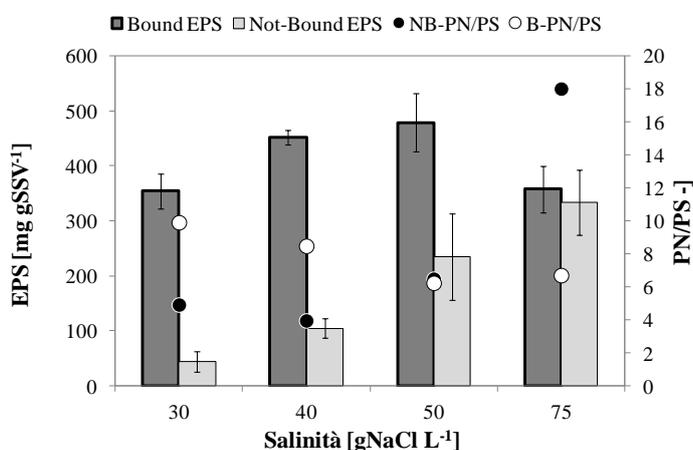
Il contenuto di EPS dei granuli è aumentato in ogni periodo sperimentale. Ad ogni cambio di fase, quindi ad ogni incremento di salinità, il contenuto medio di EPS aumentava, segno della risposta della biomassa all'aumento della pressione osmotica. Le EPS erano in prevalenza costituite da proteine (PN) che sono risultate essere di gran lunga più abbondanti rispetto ai carboidrati (PS). Il loro rapporto infatti da circa 7 dell'inoculo è aumentato in maniera esponenziale fino a raggiungere il valore di 45 nel periodo IVa. I risultati ottenuti confermano quelli già osservati nel capitolo 5, e quelli riportati da diversi altri autori, relativamente al trattamento di reflui salini (Ismail et al., 2010; Taheri et al., 2012; Wang et al., 2015), secondo cui in condizioni di elevata salinità il contenuto di EPS tende ad aumentare in modo significativo.

In Figura 6.11 invece è mostrata la correlazione tra il valore medio delle EPS in ciascun periodo e la salinità. La correlazione evidenzia come ad ogni incremento di salinità l'aumento del contenuto di salinità non risultava proporzionale a quest'ultimo. In particolare, la correlazione asintotica mostrava che oltre i 50 g NaCl L<sup>-1</sup>, il contenuto di EPS tendeva verso un valore stazionario, il che significa che un ulteriore incremento di salinità non avrebbe prodotto un corrispondente aumento della produzione di EPS. È possibile dunque che al di là di un certo livello di salinità i ceppi batterici alo-tolleranti perdono in maniera irreparabile le loro funzionalità metaboliche, poiché probabilmente la pressione osmotica diventa troppo alta. Livelli di salinità così estremi probabilmente non risultano compatibili con l'utilizzo di batteri alo-tolleranti, e in tali casi sarebbe consigliabile l'uso di ceppi alofili.



**Figura 6.11:** Correlazione tra il contenuto di EPS totali medio in ogni periodo e la salinità.

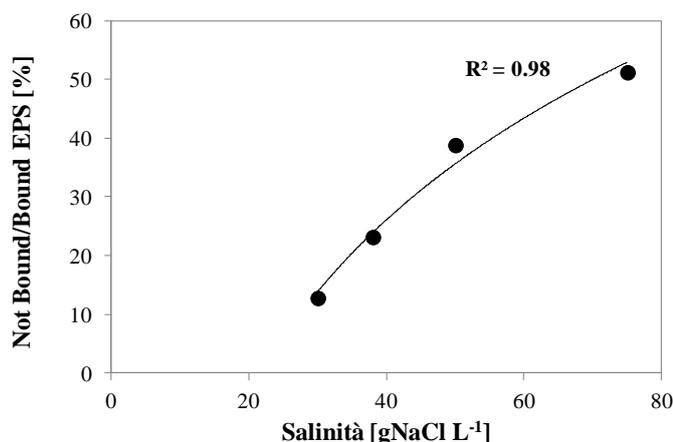
In Figura 6.12 sono riportate le concentrazioni di EPS medie in ogni periodo distinte nelle frazioni legate e non.



**Figura 6.12:** Andamento della concentrazione medie di EPS legate e non legate in funzione della salinità e del rapporto PN/PS per ciascuna frazione.

La struttura delle EPS si è modificata ad ogni incremento di salinità. Come mostrato in Figura 6.12, quando la salinità passò da 30 a 50 gNaCl L<sup>-1</sup>, la concentrazione di EPS legate aumentò anche se non in maniera lineare. In particolare, ad ogni aumento di salinità, l'incremento rispetto al valore precedente risultò essere via via inferiore, e addirittura a 75 gNaCl L<sup>-1</sup> il contenuto di EPS legate si ridusse. Al contrario, il contenuto di EPS non legate aumentò ad ogni incremento di salinità.

In Figura 6.13 è mostrata la correlazione tra il rapporto EPS non legate e legate e la salinità.



**Figura 6.13:** Correlazione tra il rapporto EPS non legate e legate e la salinità.

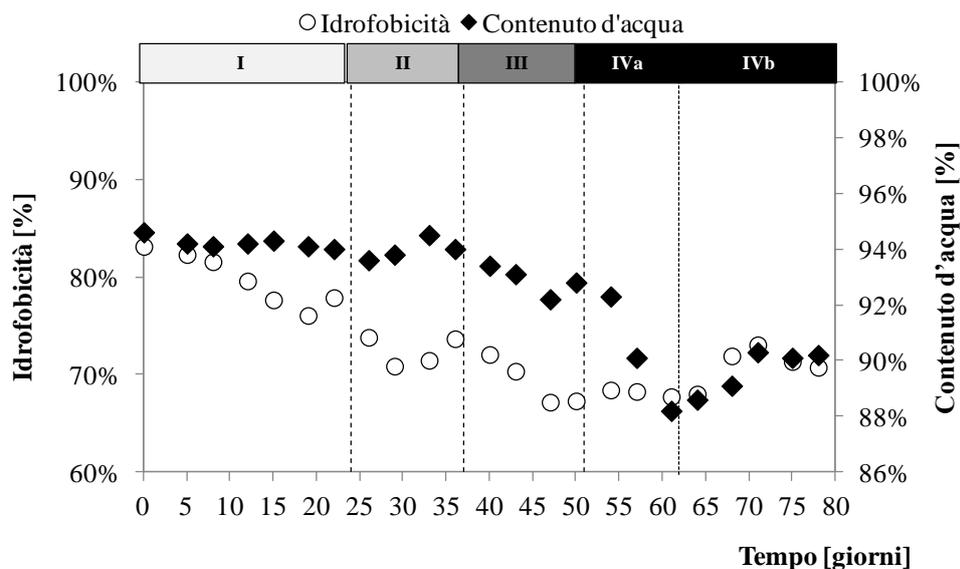
Come si può osservare, ad ogni incremento di salinità la componente non legata delle EPS aumentava in maniera significativa a scapito di quella legata, indicando che le elevate concentrazioni saline modificavano in maniera sensibile la struttura delle EPS. Al termine della sperimentazione, ovvero quando la concentrazione di sale era di 75 gNaCl L<sup>-1</sup> la frazione non legata era pari a circa il 50%, evidenziando l'indebolimento ormai in stato avanzato della matrice polimerica dei granuli. Questi risultati confermano quanto già osservato da **Ismail et al. (2010)** i quali ottennero analoghi risultati in sistemi a biomassa granulare anaerobici seppur per livelli di salinità inferiori.

È altresì interessante osservare come la composizione delle EPS si modificò in accordo con la salinità. Come mostrato in Figura 6.12, i rapporti tra la componente proteica e carboidratica nelle EPS legate e non legate hanno mostrato due trend opposti. Il rapporto PN/PS nelle EPS non legate infatti aumentò al crescere della salinità, mentre lo stesso rapporto relativo alle EPS legate si ridusse gradualmente. Quindi, sebbene nel complesso il rapporto PN/PS fosse aumentato con la salinità, come mostrato in Figura 6.10, il contenuto di proteine nelle EPS legate si ridusse. Ciò significava che in realtà il contenuto di EPS dei granuli diminuiva al crescere della salinità. Risultati analoghi furono ottenuti da **Wang et al. (2015)** in fanghi granulari aerobici coltivati con refluo sintetico salino. Gli stessi autori notarono inoltre che il rapporto PN/PS nelle EPS non legate diminuiva al crescere della salinità, in contrasto a quanto osservato in questo studio. L'aumento del contenuto di proteine nelle EPS non legate osservato nel presente studio potrebbero essere correlate alla natura del refluo trattato. Infatti, i reflui ittico-conservieri sono caratterizzati da un elevato contenuto solido, principalmente costituiti da interiora,

sangue, grassi e scaglie (Chowdhury et al., 2010). Tutti questi elementi sono in prevalenza costituiti da proteine, per cui venendo adsorbiti sui granuli, contribuivano all'aumento del loro contenuto proteico. Queste sostanze tuttavia si distaccavano dai granuli nel primo step di estrazione delle EPS e, pertanto, venivano conteggiate come EPS non legate. Ad ogni nuova fase sperimentale, il fattore di diluizione del refluo influente diminuiva, e pertanto, la concentrazione di solidi nell'influente aumentava e con essa la quantità di solidi adsorbita. Per tale motivo, la concentrazione di proteine nelle EPS non legate aumentò in maniera sensibile in ogni fase successiva. Quindi in conclusione, l'aumento del rapporto PN/PS nelle EPS non legate è stato dovuto ad un apporto esterno di proteine. La riduzione del contenuto di proteine nelle EPS legate è invece probabilmente dovuta alla riduzione dell'attività metabolica della biomassa, causata dagli elevati livelli di salinità come discusso nel seguito del capitolo.

### 6.6.3 Caratteristiche fisiche dei granuli: analisi del contenuto d'acqua, idrofobicità e sedimentabilità

Le proprietà fisiche dei granuli aerobici forniscono importanti informazioni sulle modalità con cui le condizioni operative incidono sulle caratteristiche degli aggregati, la cui stabilità può avere notevoli e pesanti ricadute sull'intero processo depurativo. Tra le proprietà fisiche dei granuli quelle che forniscono informazioni più utili sono la densità, l'idrofobicità e le caratteristiche di sedimentabilità. La prima indica lo stato di addensamento, e quindi è un indicatore della compattezza dei granuli aerobici; la seconda da indicazioni circa il potere di auto-adesione delle cellule batteriche e pertanto fornisce indicazioni riguardo la tendenza all'aggregazione o allo sfaldamento; infine le caratteristiche di sedimentabilità danno informazioni sia della compattezza dei granuli, essendo un indice indiretto della loro densità, che sulla tendenza del sistema a dilavare biomassa in virtù della pressione di selezione idraulica applicata. La densità si misura usualmente applicando un metodo fotometrico, come descritto nel paragrafo 5.3.1. Tuttavia in questo caso, stante l'elevatissima torbidità del refluo e di conseguenza del bulk, alla misura della densità si è sostituita quella del contenuto d'acqua, la quale misura è un altrettanto valido indicatore della compattezza dei granuli aerobici. L'andamento del contenuto d'acqua e dell'idrofobicità è riportato nel grafico in Figura 6.14.

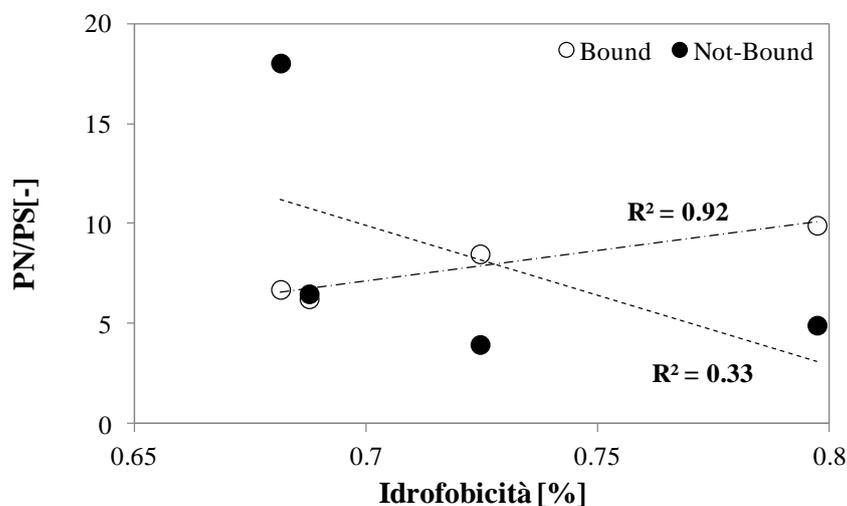


**Figura 6.14:** Andamento dell'idrofobicità e del contenuto d'acqua dei granuli.

L'idrofobicità ha mostrato un graduale decremento per quasi tutta la durata della sperimentazione. La ragione di tale decremento è addebitabile alle elevate concentrazioni di sale. Come osservato da **Ismail et al. (2010)**, infatti, in presenza di elevate concentrazioni di ioni sodio, l'idrofobicità del fango tende a ridursi in modo sensibile. A causa del gradiente di concentrazione infatti, gli ioni sodio presenti in elevate concentrazioni ( $> 30 \text{ g L}^{-1}$ ) tendono a spiazzare gli ioni calcio e in generale i cationi polivalenti dalla matrice polimerica, sostituendosi ad essi.

Nel dettaglio, la riduzione dell'idrofobicità (circa il 10%) è stata maggiore nel passaggio da 30 a 40  $\text{g NaCl L}^{-1}$ , ovvero dal primo al secondo periodo, mentre per il resto della sperimentazione si è ancora ridotta ma con un gradiente minore. Al termine del periodo IVa l'idrofobicità dei granuli raggiunse il valore minimo del 67%. In generale, il contenuto di idrofobicità dei granuli è strettamente correlato al contenuto di proteine della loro matrice polimerica, e più in particolare al rapporto tra proteine e carboidrati della stessa (**Dignac et al., 1998**). Come evidenziato in precedenza, tale rapporto si ridusse nella frazione delle EPS legate, contribuendo quindi alla riduzione dell'idrofobicità dei granuli. In Figura 6.15 è mostrata la correlazione tra il rapporto PN/PS nelle EPS legate e non legate e l'idrofobicità del fango granulare. Tale correlazione è risultata significativa solo con riferimento alla frazione legata delle EPS, a conferma del fatto che la frazione non legata non contribuisce alla modificazione delle proprietà fisiche dei granuli. La riduzione dell'idrofobicità cellulare ha prodotto la riduzione della capacità di adesione delle

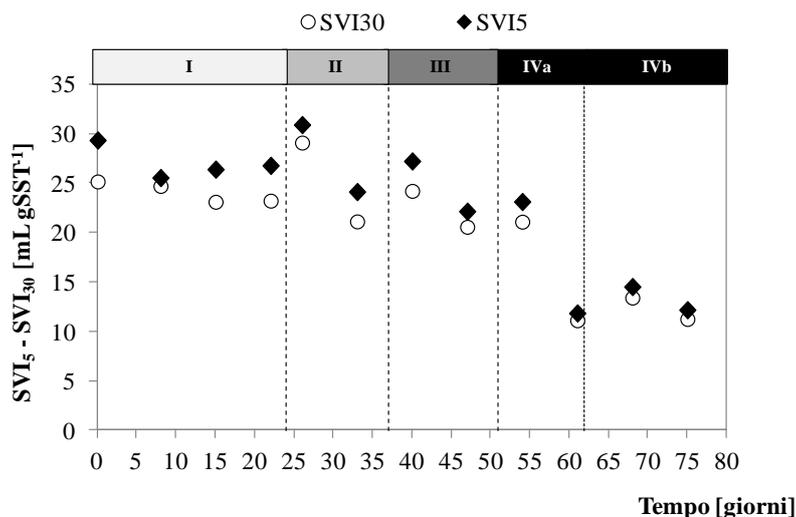
cellule, che insieme alle modificazioni occorse alla struttura delle EPS, hanno determinato la graduale perdita di stabilità dei granuli al crescere della salinità.



**Figura 6.15:** Correlazione tra il rapporto PN/PS nelle EPS legate (bound) e non legate (not-bound) e l'idrofobicità dei granuli.

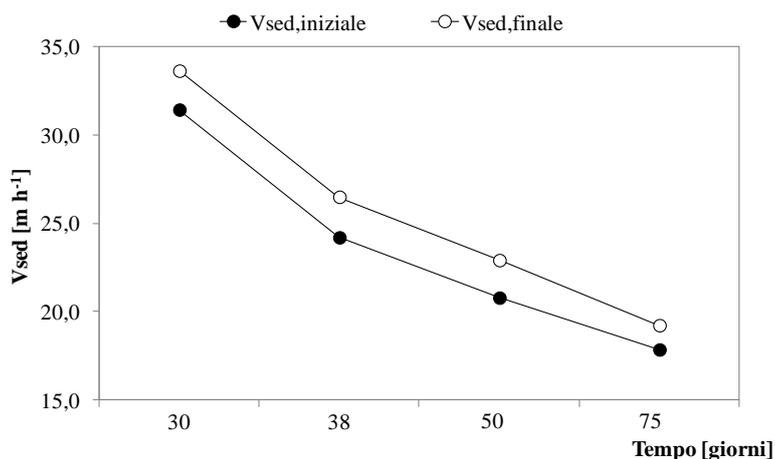
Riguardo al contenuto d'acqua, come riportato in Figura 6.14, esso diminuì ad ogni incremento di salinità, e tale decremento era maggiore quanto maggiore fosse l'incremento di salinità. Dal periodo III al IVa, quando la concentrazione di sale aumentò da 50 gNaCl L<sup>-1</sup> a 75 gNaCl L<sup>-1</sup>, il contenuto d'acqua si ridusse dal 92% all'88%, indicando un forte addensamento dei granuli aerobici. Ciò è in parte addebitabile all'aumento della pressione di selezione idraulica dato non dalla diminuzione del tempo di sedimentazione quanto dall'aumento della spinta di galleggiamento (Winkler et al., 2012), che come riportato da Qin et al. (2003) promuove la selezione dei granuli più densi. Tuttavia, è verosimile che ci sia un altro fenomeno fisico che abbia giocato un ruolo non trascurabile: l'aumento della salinità del bulk che ha certamente determinato l'aumento della sua densità, e con essa le spinte idrostatiche che si esercitavano sulla superficie dei granuli.

Le caratteristiche di sedimentabilità sono state valutate mediante il monitoraggio dei parametri SVI<sub>5</sub> e SVI<sub>30</sub>, oltre che alle misure della velocità di sedimentazione dei singoli granuli. Quest'ultima analisi è stata ripetuta due volte in ogni periodo, in particolare all'inizio e alla fine, per valutare le eventuali modificazioni occorse nel periodo osservato. L'andamento dei parametri SVI<sub>5</sub> e SVI<sub>30</sub> è mostrato in Figura 6.16.



**Figura 6.16:** Andamento dei parametri SVI<sub>5</sub> e SVI<sub>30</sub> durante i 5 periodi.

I valori dei due parametri sono risultati molto simili tra loro per tutta la durata della sperimentazione evidenziando la natura prettamente granulare del fango (Liu et al., 2007). Inoltre, in ciascun periodo osservato si è registrato un loro graduale decremento. Ciò è stato dovuto al graduale aumento della pressione di selezione idraulica, che come in precedenza accennato, è stato dovuto all'aumento della densità del bulk dato a sua volta dall'incremento della salinità, che causava in ogni nuovo periodo l'aumento della spinta di galleggiamento, che rallentava la sedimentazione dei granuli. Ciò aveva lo stesso effetto dell'aumento della pressione di selezione idraulica, che ha comportato la selezione di granuli con caratteristiche di sedimentabilità progressivamente migliori. All'inizio di ciascun periodo, lo SVI tendeva ad aumentare rispetto al precedente, probabilmente a causa del fatto che la biomassa non era stata ancora idraulicamente selezionata. La pressione di selezione idraulica da un lato, e l'adsorbimento di sostanze inerti e di sale dall'altro, hanno favorito il graduale miglioramento delle caratteristiche di sedimentabilità dei granuli. Winkler et al. (2012) osservarono che il fango granulare non acclimatato alla salinità tende inizialmente a flottare, fin quando il sale inizia a penetrare all'interno dei granuli appesantendoli. Gli autori osservarono inoltre che la velocità di sedimentazione dei granuli diminuiva, come è logico attendersi, al crescere della salinità del refluo. Tali risultati sono stati confermati anche in questo studio. Come si vede dal grafico in Figura 6.17, la velocità di sedimentazione dei granuli si riduceva quasi linearmente al crescere della salinità, e inoltre tra l'inizio e la fine di ogni periodo (il periodo IV è stato considerato unico) la velocità di sedimentazione dei granuli aumentava, seppur non in maniera significativa.

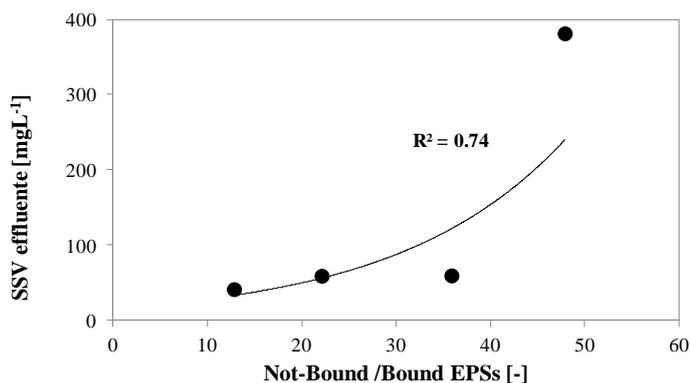


**Figura 6.17:** Andamento della velocità di sedimentazione dei granuli in funzione della salinità, all'inizio e alla fine dei periodi I, II, III e IV.

Ciò significa che effettivamente l'aumento della salinità produce lo stesso effetto dell'aumento della pressione di selezione idraulica, in quanto favorisce la selezione di particelle con velocità di sedimentazione maggiori.

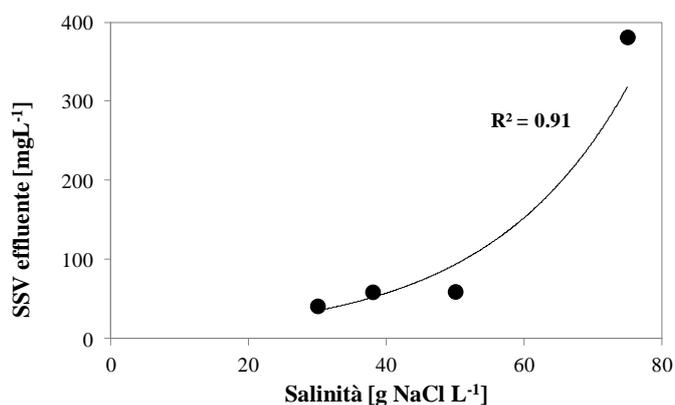
#### 6.6.4 Effetti della salinità sulla stabilità dei granuli

I risultati finora discussi hanno evidenziato una significativa modificazione delle proprietà fisiche dei granuli al crescere della salinità, e in particolare si è osservata la riduzione della frazione legata delle EPS e della idrofobicità dei granuli. La stabilità dei granuli è stata valutata misurando la concentrazione di solidi sospesi volatili nell'effluente (dati mostrati nel paragrafo 6.7). Si scelto di monitorare i SSV anziché i SST, poiché i solidi sospesi nell'inflente erano prevalentemente di natura inerte, l'eventuale aumento dei SSV allo scarico poteva essere facilmente correlato alla perdita di materiale organico dai granuli stessi. In Figura 6.18 è mostrata la correlazione tra le concentrazioni medie dei SSV nell'effluente in ciascun periodo e le concentrazioni medie del rapporto tra le EPS legate e non, negli stessi. La buona correlazione tra i due parametri confermava il ruolo delle EPS legate nel mantenimento strutturale dei granuli. Nel dettaglio, in Figura 6.18 si può osservare come al crescere della frazione non legata delle EPS, la concentrazione di SSV allo scarico aumentava. Tuttavia, un sensibile incremento si osservò per concentrazioni di sale superiore a 50 g NaCl L<sup>-1</sup>, quando la frazione di EPS non legata era pressoché uguale a quella legata.



**Figura 6.18:** Correlazione tra la concentrazione di SSV nell'effluente e il rapporto tra le EPS non legate e legate.

In Figura 6.19 è mostrata la correlazione tra la concentrazione di SSV nell'effluente e la salinità. Anche in questo caso la correlazione ha mostrato un andamento esponenziale, sottolineando come fino ad un certo livello di salinità, i granuli si mantenevano strutturalmente stabili.

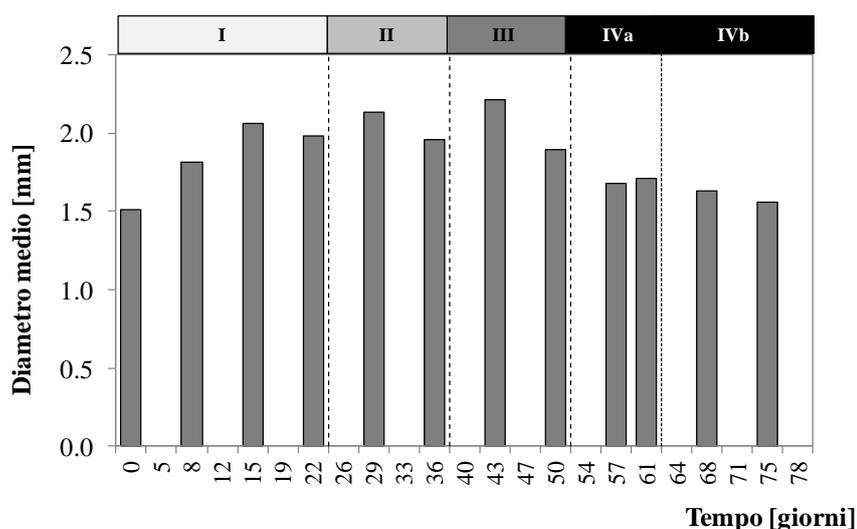


**Figura 6.19:** Correlazione tra la concentrazione di SSV nell'effluente e la salinità.

Nel complesso dunque, al crescere della salinità, sebbene si sia evidenziato un graduale indebolimento strutturale dei granuli confermato dai dati relativi alle EPS e all'idrofobicità, i granuli hanno mantenuto pressoché integra la loro struttura fino a 50 gNaCl L<sup>-1</sup>, superata la quale il deterioramento degli aggregati è stato molto evidente.

### 6.6.5 Dimensioni e morfologia dei granuli

L'andamento delle dimensioni medie dei granuli nei cinque periodi sperimentali è mostrato in Figura 6.20. Nel primo periodo la dimensione media dei granuli è aumentata dai circa 1,5 mm del fango di inoculo ai circa 2 mm alla fine del periodo. Ciò è stato addebitato all'aumento del carico organico che nel primo periodo era pari a  $3,2 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{d}^{-1}$ , ed era maggiore rispetto a quello applicato in fase di coltivazione dei granuli ( $1,8 \text{ KgCOD m}^{-3}\text{d}^{-1}$ ). Come riportato da alcuni autori, tra cui **Li et al. (2011)** e **Di Bella e Torregrossa, (2013)**, l'incremento del carico organico comporta un aumento della dimensione media dei granuli, e i risultati ottenuti confermano tali osservazioni.

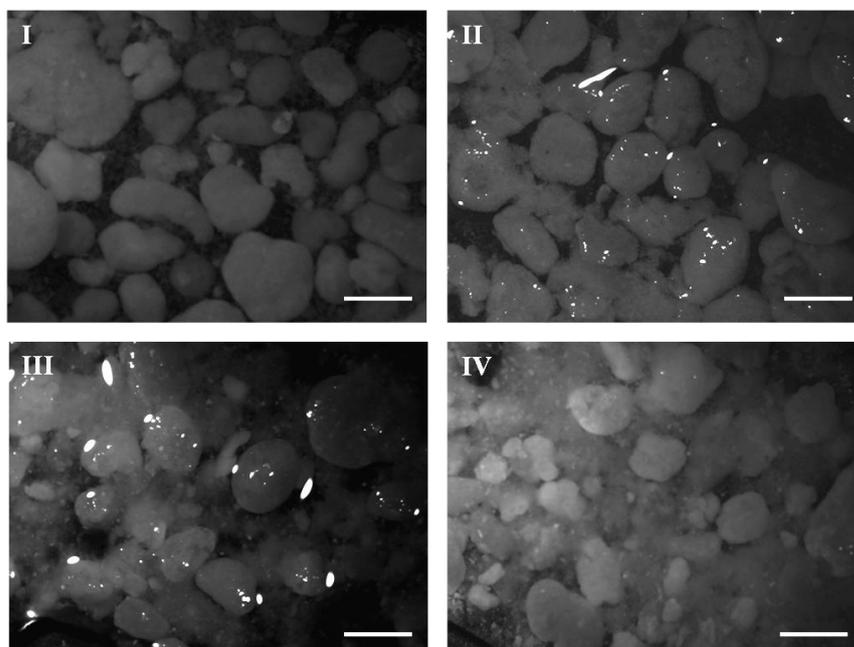


**Figura 6.20:** Andamento della dimensione media dei granuli

Nei successivi periodi tale tendenza non si è confermata, e l'andamento delle dimensioni medie dei granuli ha evidenziato un trend decrescente. Come è possibile osservare dal grafico in Figura 6.20, nel periodo III, ma in particolare modo nel IV, la componente fioccosa del fango era sensibilmente maggiore rispetto ai precedenti periodi. Questo è stato il risultato della parziale instabilità strutturale evidenziata nei precedenti paragrafi. L'aumento del carico organico e della salinità hanno determinato per i motivi già discussi una parziale perdita dell'integrità strutturale dei granuli, che risultavano maggiormente suscettibili alla degranulazione. Come sottolineato nel paragrafo 6.6.2, la riduzione del contenuto di EPS legate determinato dalle condizioni di estrema salinità, è stata una delle principali cause dell'indebolimento della struttura portante dei granuli aerobici. Nei

primi tre periodi, nei quali il contenuto di EPS legate era sufficientemente elevato, le dimensioni e la morfologia dei granuli non hanno subito significative modificazioni, mentre nel quarto, la drastica riduzione del contenuto di EPS legate e al contempo di proteine, ne hanno favorito il parziale sfaldamento. Inoltre, come è stato evidenziato nel paragrafo 6.2.3, la riduzione dell'idrofobicità ha certamente ridotto il potere di auto-adesione delle cellule, contribuendo anch'essa all'instabilità degli aggregati. Si ricorda inoltre come all'inizio del periodo IV, la frazione inerte del fango era prossima al 50%, e ciò indicava una graduale inertizzazione della struttura dei granuli. Come teorizzato da **Verawaty et al. (2012)**, l'aumento della frazione inerte dei granuli aerobici è il primo passo verso la loro perdita di stabilità. Lo spurgo selettivo praticato alla fine del periodo IVa, ha favorito l'allontanamento dal sistema dei granuli con una componente inerte maggiore, e ciò ha prevenuto che la loro rottura provocasse un'ulteriore aumento della componente fioccosa all'interno del reattore.

In Figura 6.21 sono riportate le immagini dei granuli al termine di ciascun periodo sperimentale. Come si può osservare, nel periodo IV, la frazione fioccosa del fango aumentò in maniera molto evidente, in conseguenza a quanto abbondantemente discusso finora.



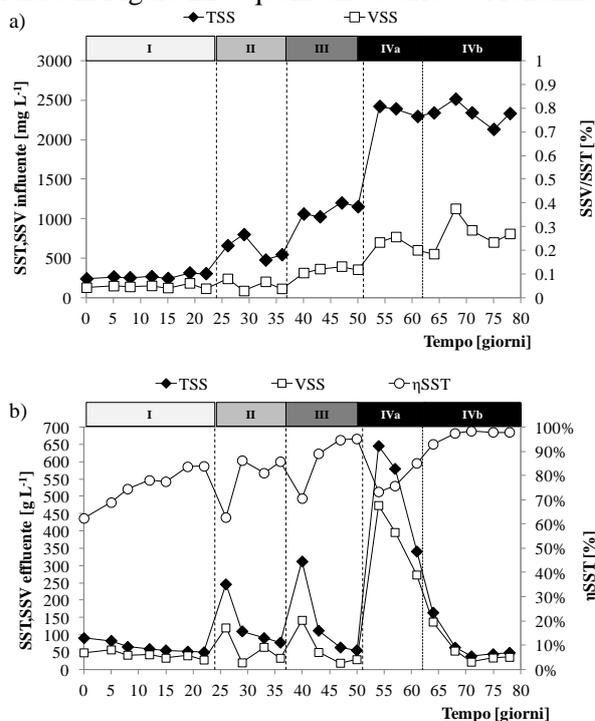
**Figura 6.21:** Fotografie dei granuli aerobici nei vari periodi sperimentali (barra = 2 mm).

Alla luce dei risultati finora esposti, le caratteristiche strutturali dei granuli aerobici si sono ben mantenute fino alla fine del periodo III, ovvero fin quando la salinità era nell'ordine dei  $50 \text{ gNaCl L}^{-1}$ . Valori maggiori di salinità hanno determinato sostanziali modificazioni dal punto di vista della stabilità strutturale dei granuli, anche se il loro totale sfaldamento non è stato osservato. La loro completa rottura potrebbe determinare un inevitabile peggioramento soprattutto delle rese depurative, e per tali motivi, non è consigliabile spingere il sistema verso condizioni operative più gravose rispetto a quelle applicate nel periodo III.

## 6.7 Rimozione dei solidi sospesi

I reflui ittico-conservieri sono caratterizzati dall'elevata presenza di contenuto solido, dato prevalentemente dalla presenza di squame, lische e materiale organico di natura particolata. Il refluo grezzo era caratterizzato da una concentrazione di solidi sospesi totali prossimi ai  $5000 \text{ mg L}^{-1}$ , di cui circa il 30% erano volatili e il restante 70% di natura inerte.

In Figura 6.22a è mostrato l'andamento dei solidi sospesi totali e volatili nell'alimento, mentre in Figura 22.b quelli allo scarico e i rendimenti.



**Figura 6.22:** Andamento dei solidi sospesi totali e volatili nell'alimento (a) e nell'effluente (b).

Naturalmente in ciascun periodo, per via del minore rapporto di diluizione, la concentrazione di solidi alimentata aumentava. Nel primo periodo, la resa di rimozione dei solidi totali aumentò in modo graduale fino all'85%, e i solidi sospesi allo scarico in questo periodo erano di poco superiori a  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . Il graduale incremento dei rendimenti di rimozione è stato in parte addebitato alla rimozione del materiale particolato di natura organica come verrà discusso ampiamente nel paragrafo 6.8. Come è stato osservato nel paragrafo 6.6.4, al crescere della salinità del bulk, a causa dell'aumento della spinta di galleggiamento, aumentava la pressione di selezione idraulica, che favoriva il dilavamento delle particelle più leggere. Pur non avendo modificato la durata del tempo di sedimentazione infatti, l'aumento della salinità aveva lo stesso effetto in termini di aumento della pressione di selezione idraulica. Quando i granuli si adattavano alle nuove condizioni operative, il dilavamento era minore e la concentrazione di solidi allo scarico si riduceva. Tale fenomeno si osservava all'inizio di ciascun nuovo periodo. Ad un picco iniziale di solidi sospesi allo scarico, seguiva sempre una coda che evidenziava il graduale adattamento del sistema alla nuova pressione di selezione idraulica. I granuli inoltre, adsorbendo materiale inerte e anche sale, risultavano essere sempre più pesanti riuscendo a sedimentare in maniera più veloce. Questo, insieme ai fenomeni di adsorbimento del materiale inerte, contribuiva all'avere un effluente di eccellenti qualità soprattutto dal punto di vista della torbidità (Figura 6.23).



**Figura 6.23:** Fotografia del campione influente (a sinistra) e dell'effluente (a destra).

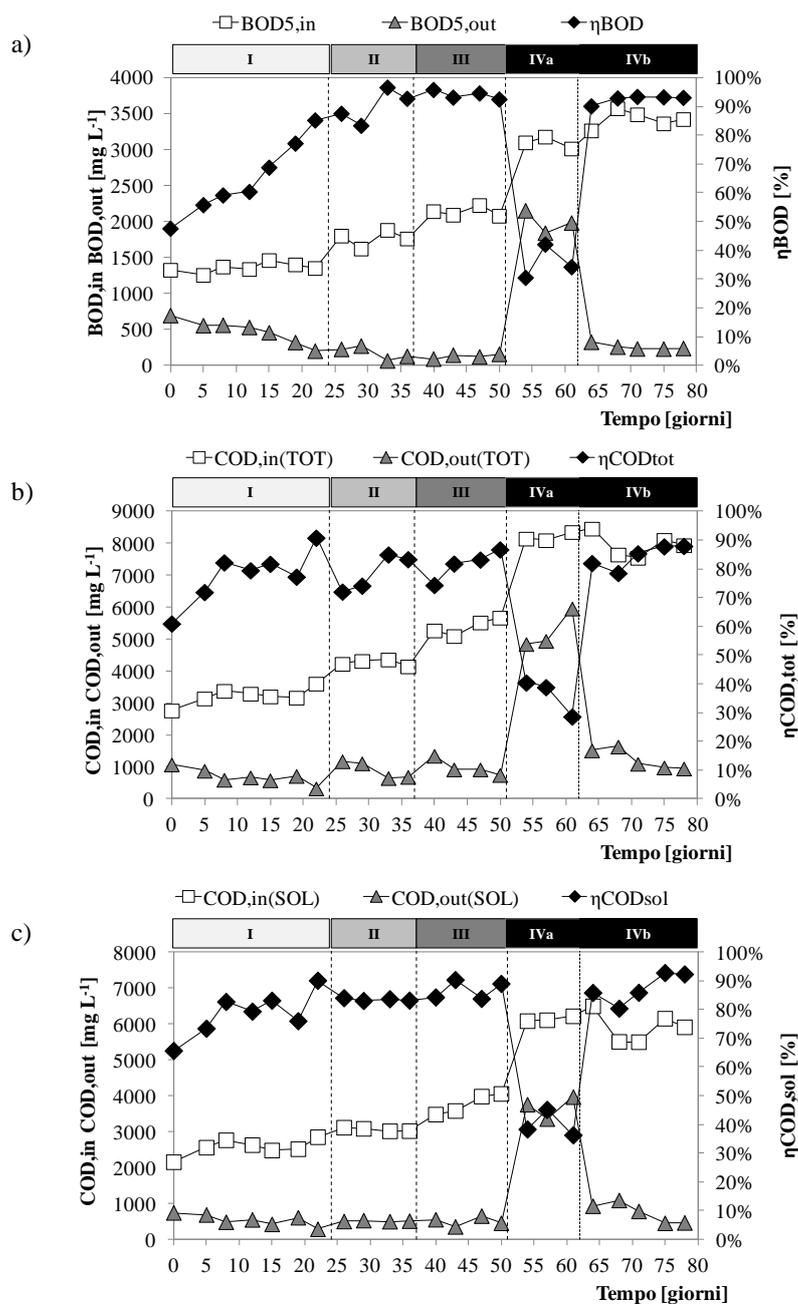
L'incremento dei solidi allo scarico all'inizio di ciascun periodo può essere stato dovuto anche all'incremento del carico organico che causava un parziale ma temporaneo sfaldamento dei granuli, con conseguente aumento dei solidi nell'effluente. Un comportamento analogo è stato anche osservato da **Di Bella e**

**Torregrossa, (2013)**. Quindi anche la variazione di carico organico può aver inciso nell'incremento dei solidi allo scarico all'inizio di ciascun nuovo periodo.

Nel periodo IVa, i solidi allo scarico aumentarono in maniera sensibile, anche a causa della presenza di ingenti quantità di sostanze polimeriche disciolte nell'effluente, che nel corso della procedura analitica per la determinazione gravimetrica dei solidi sospesi formava un denso gel sulla membrana utilizzata per la filtrazione e che per tanto venivano conteggiati come solidi sospesi. Infatti a differenza dei due precedenti periodi, la natura dei solidi allo scarico in questa fase era prevalentemente di natura organica. Il cambio di condizioni operative nel periodo IVb ha nuovamente riportato il sistema nelle condizioni precedentemente osservate. I solidi allo scarico si ristabilirono nuovamente al di sotto dei  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , e i rendimenti nell'ordine del 98%. È interessante osservare come ad ogni cambio di fase l'incremento dei solidi allo scarico fosse sempre maggiore rispetto a quello osservato nella precedente, ma allo stesso tempo quando il sistema raggiungeva le nuove condizioni stazionarie, i rendimenti di rimozione dei solidi erano sempre più elevati. Il primo aspetto è quasi del tutto addebitabile all'aumento della pressione di selezione idraulica. Come dimostrato da **Winkler et al. (2012)**, l'aumento della salinità del bulk causa un iniziale riduzione delle velocità di sedimentazione dei granuli, che solo dopo aver adsorbito il sale, si appesantiscono e riescono a sedimentare nei tempi imposti dal sistema. Tra la fase III e la IVa, l'aumento di salinità è stato maggiore rispetto a quello delle precedenti fasi, e ciò ha determinato un sensibile aumento della pressione di selezione idraulica. La selezione idraulica più spinta e l'adsorbimento di sostanze inerti ha certamente favorito il progressivo miglioramento della qualità dell'effluente. Come si dirà più avanti nel paragrafo 6.8.1, un ruolo molto importante nella rimozione dei solidi sospesi totali è stato svolto dalle EPS. Date le loro proprietà fisiche, tali sostanze, in prevalenza costituite da proteine, sono degli ottimi coagulanti naturali che possono giocare un ruolo molto importante nella rimozione della torbidità. Come mostrato nel paragrafo 6.2.2, l'incremento di salinità favoriva la produzione di EPS, e questo ha certamente favorito le rese di rimozione dei solidi, che sono aumentate gradualmente in ciascun periodo.

## 6.8 Rimozione della sostanza organica

A causa della complessa natura della matrice organica e delle possibili interferenze analitiche date dalla presenza di elevate concentrazioni di cloruri, sono stati monitorati diversi parametri per l'analisi delle rese di rimozione della sostanza organica. A tal proposito, sono stati monitorati parametri diretti come il TOC che indiretti come il BOD e COD, nelle sue tre principali forme ovvero totale, solubile e particolata. I rendimenti di rimozione del BOD e del COD nelle sue tre forme sono mostrati in Figura 6.24.



**Figura 6.24:** Andamento delle concentrazioni di BOD (a), COD totale (b) e solubile (c) nell'influente e nell'effluente e relative rese di rimozione.

Nel primo periodo è stato osservato un significativo incremento nelle rese depurative per entrambi i parametri, presumibilmente per la graduale acclimatazione della biomassa alla composizione del nuovo refluo influente e alla nuova salinità ( $30 \text{ gNaCl L}^{-1}$ ). Al raggiungimento delle condizioni stazionarie, le concentrazioni nell'effluente del COD totale e solubile erano rispettivamente pari a circa  $300 \text{ mg L}^{-1}$  e  $280 \text{ mg L}^{-1}$ , mentre la concentrazione di BOD era poco inferiore ai  $200 \text{ mg L}^{-1}$ . Nel secondo periodo, le concentrazioni di BOD, di COD totale e solubile nell'influente aumentarono, in accordo al minor rapporto di diluizione come riportato in Tabella 6.3. L'efficienza di rimozione per tutti e tre i parametri biologici diminuì leggermente. Come riportato da **Lefebvre e Moletta (2006)**, tali temporanei decrementi nelle rese depurative si verificano quando l'incremento del carico organico è seguito dall'aumento di salinità. Tuttavia, le rese depurative aumentarono rapidamente riportandosi fino a valori nell'ordine del 90% come nella precedente fase sperimentale. Nella terza fase i rendimenti rimasero invariati a testimonianza delle capacità dei granuli aerobici di resistere agli shock di carico. **Taheri et al. (2012)** sebbene con valori di salinità inferiori ottennero risultati simili. Gli autori dedussero che l'incremento delle rese di rimozione della sostanza organica aumentano al crescere della salinità per effetto della necessità dei microrganismi di adeguare il loro metabolismo alle alte pressioni osmotiche. Nel periodo IVa, si osservò un significativo peggioramento della qualità dell'effluente. Il carico organico in questa fase aumentò fino a  $8 \text{ kgCOD m}^{-3}\text{d}^{-1}$ , e la salinità fino a  $75 \text{ gNaCl L}^{-1}$ . Le concentrazioni di BOD e COD nell'effluente aumentarono, e di conseguenza le rese depurative si ridussero al 38% per il BOD e COD solubile, e al 28% per i COD totale. Risultati analoghi sono stati ottenuti da **Val del Rio et al. (2013)**, i quali osservarono che le rese di rimozione della sostanza organica nel trattamento di reflui ittico-conservieri diminuivano sensibilmente per valori del carico superiori a  $4,4 \text{ kgCOD m}^{-3}\text{d}^{-1}$ . In letteratura non sono riportate altre esperienze a questi valori di salinità, per cui, al fine di distinguere gli effetti della elevata salinità e del carico organico, nel periodo IVb, la durata del ciclo è stata raddoppiata, e di conseguenza sia la portata influente che il carico organico si sono dimezzati. In queste condizioni, l'efficienza di rimozione della sostanza organica aumentò gradualmente fino al 90% in linea con i precedenti periodi. Alla luce di questi risultati, sembrerebbe che i batteri eterotrofi non siano influenzati dalla salinità, a testimonianza del fatto che si sono ottenute rese nell'ordine del 90% a concentrazioni di sale molto elevate. Il carico organico, invece, determina sensibili peggioramenti nelle rese depurative, infatti quando è stato ridotto nel periodo IVb, i rendimenti depurativi sono aumentati nuovamente. In queste condizioni i batteri dovevano degradare una minore quantità di substrato, ovvero, in altre parole, avevano a disposizione un tempo più lungo. Ciò è particolarmente importante nel caso di trattamento di reflui industriali, in cui la presenza di sostanza organica lentamente biodegradabile e particolata, fa sì che siano necessari tempi di reazione più lunghi per la sua idrolisi e biodegradazione.

Per quanto riguarda il COD particolato (Figura 6.25), durante il primo periodo è stato osservato un graduale incremento nelle rese di rimozione. I microrganismi, infatti, iniziavano ad adattarsi alla nuova composizione del substrato caratterizzato da un tasso di biodegradabilità significativamente inferiore rispetto all'alimento sintetico con cui erano stati coltivati.

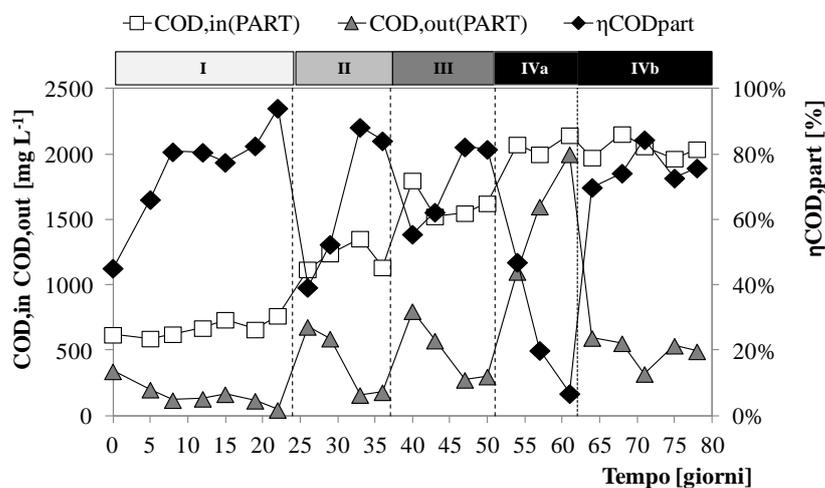
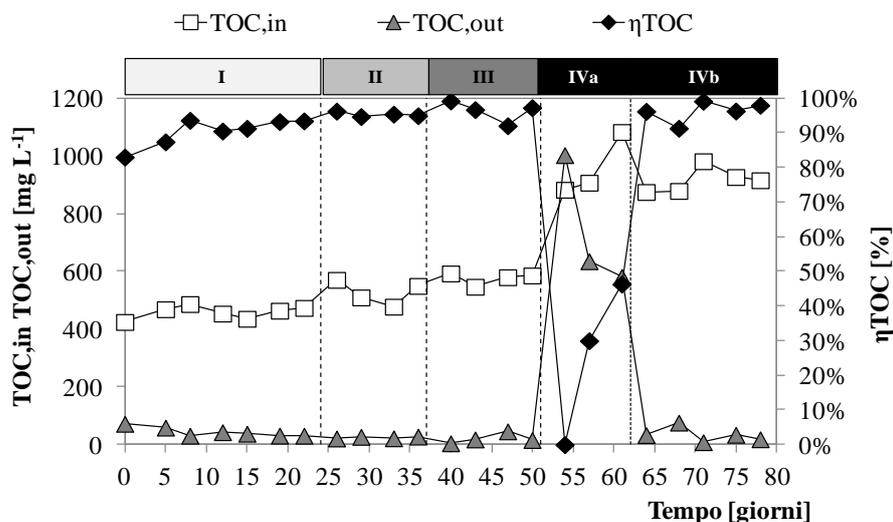


Figura 6.25: Andamento delle concentrazioni di COD particolato nell'alimento e nello scarico e rese depurative.

Quindi i microrganismi iniziavano ad idrolizzare e a degradare lentamente la sostanza organica particolata del refluo influente. **De Kreuk et al (2010)** osservarono che la sostanza organica particolata viene dapprima rimossa dai granuli aerobici mediante fenomeni di adsorbimento sulla loro superficie e nella microporosità interna, dopodiché essa viene idrolizzata e i prodotti di idrolisi vengono in seguito biodegradati. È interessante osservare come al cambio di ogni fase, la resa di rimozione del COD particolato si riducesse per poi riportarsi su valori simili ai precedenti periodi. Questa osservazione può avere diverse ragioni. Innanzitutto, a causa del minor rapporto di diluizione, nei periodi I, II, III e IV, il carico di COD particolato aumentò, e di conseguenza i batteri necessitavano di più tempo per adattarsi alle nuove condizioni e per idrolizzare e degradare una maggiore quantità di sostanza. In secondo luogo, come è stato discusso nel paragrafo 6.7. all'inizio di ogni periodo, si verificava un sensibile incremento della componente solida nell'alimento. Ciò potrebbe essere stato dovuto a un parziale sfaldamento dei granuli causato dall'incremento del carico organico, che come osservato da **Di Bella e Torregrossa, (2013)**, determina una temporanea perdita di stabilità dei granuli aerobici, che causa di conseguenza l'incremento di COD particolato allo scarico. Come osservato per il COD totale e solubile, nel periodo IVb le rese aumentarono in maniera significativa, a dimostrazione del fatto che

l'idrolisi e la biodegradazione di elevati carichi organici richiede tempi di reazione più lunghi. È altresì interessante osservare come alla fine di ciascun periodo, le rese di rimozione del COD particolato fossero seppur di poco inferiori rispetto a quelle osservate nei precedenti periodi. Ciò può essere attribuito alle minori rese di adsorbimento della frazione particolata. È verosimilmente ipotizzabile che il graduale adsorbimento di tali sostanze nei granuli riducesse la loro capacità adsorbente nel lungo periodo, a causa della loro progressiva saturazione. Al fine di aumentare le rese di rimozione della frazione particolata si potrebbe pensare di effettuare uno spurgo selettivo dei granuli, basandosi sul fatto che i granuli contenenti una maggiore frazione inerte risulterebbero più pesanti degli altri. Per quanto riguarda il TOC, le rese depurative furono quasi sempre superiori al 95%, eccetto che nel periodo IVa dove si ridussero in maniera significativa in accordo a quanto osservato per gli altri parametri (Figura 6.26).



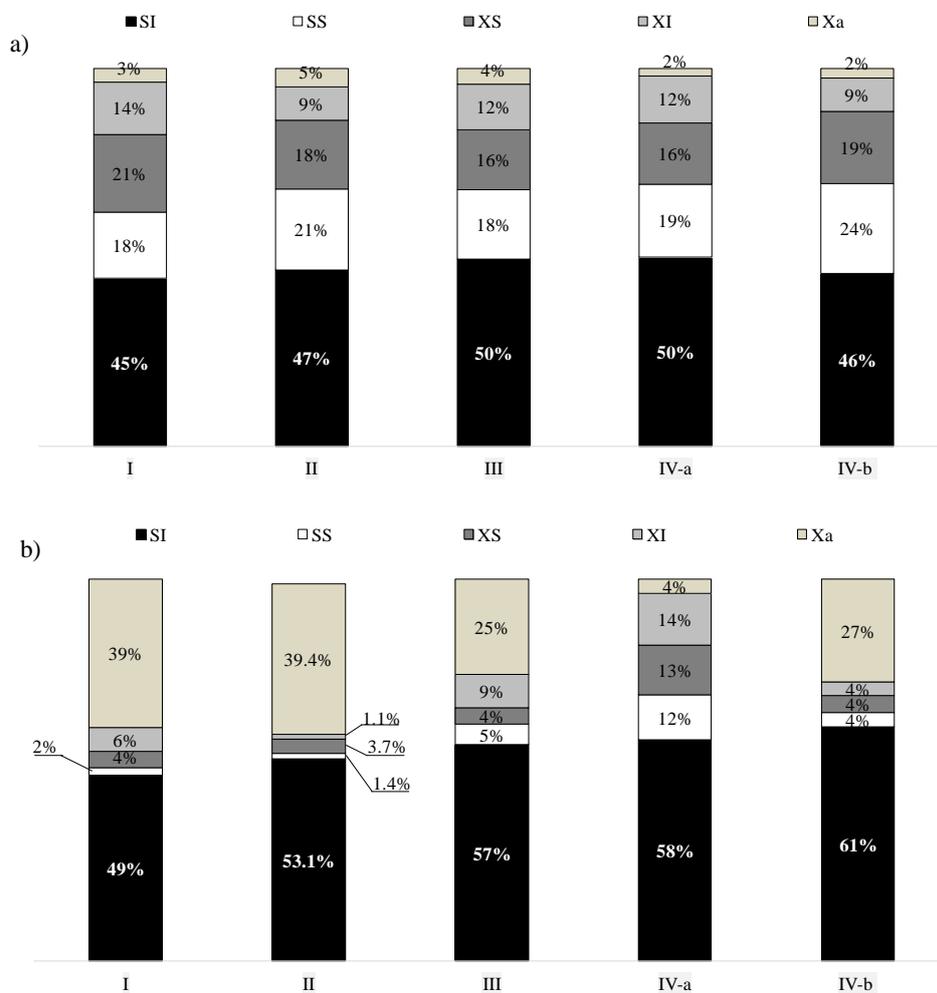
**Figura 6.26:** Andamento delle concentrazioni di TOC nell'alimento e nello scarico e rese depurative.

In questo caso, non si è risentito in modo sensibile degli incrementi della componente particolata in quanto l'analisi veniva effettuata su un campione filtrato. Nonostante ciò, nel periodo IVa le rese diminuirono sensibilmente, presumibilmente a causa dell'incremento delle concentrazioni delle sostanze polimeriche solubili nel bulk, come osservato nel paragrafo 6.2.2.

I granuli aerobici si dimostrano dunque essere molto abili nella rimozione della sostanza organica e in particolare della frazione particolata.

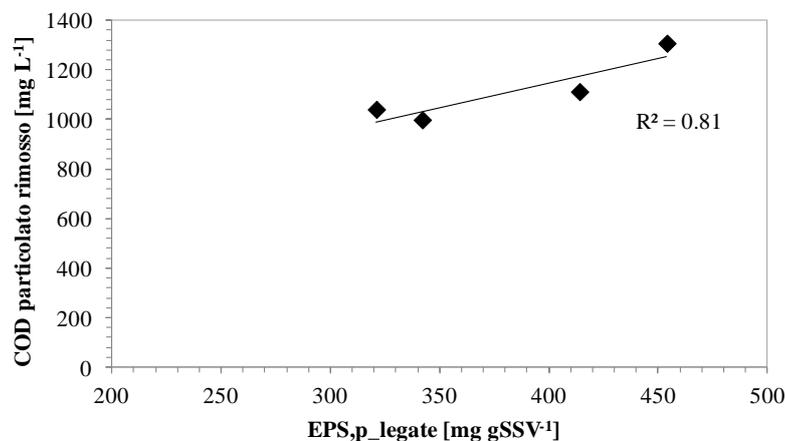
### 6.8.1 Risultati del frazionamento del COD

I risultati del frazionamento del COD sono mostrati in Figura 6.27. Come è possibile osservare, la frazione predominante dell'influyente era quella solubile inerte (circa il 50% in media), il 20% era quella solubile biodegradabile, il 18% era particolata lentamente biodegradabile, il 12% era la frazione particolata inerte e infine il 4% era la biomassa attiva.



**Figura 6.27:** Risultati delle prove di frazionamento di COD nell'alimento (a) e nello scarico (b) durante i vari periodi sperimentali.

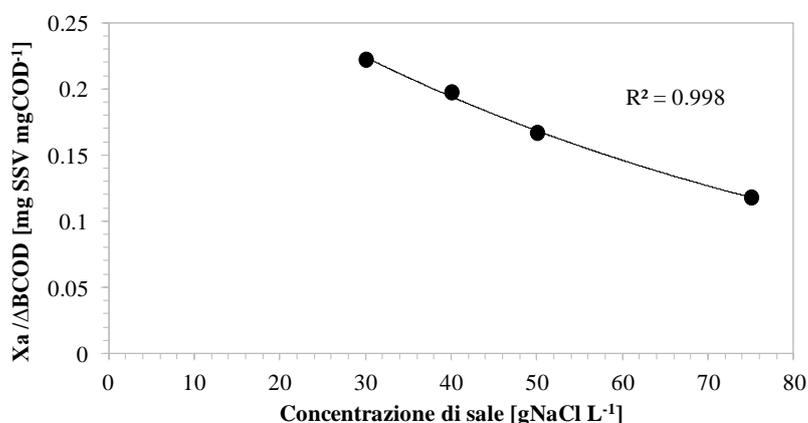
Il frazionamento del COD dell'effluente è stato effettuato al termine di ciascun periodo, dopo il raggiungimento delle condizioni stazionarie. Nel periodo I e II, il COD dell'effluente era prevalentemente costituito dalla frazione solubile inerte e dalla biomassa attiva (78%), mentre le percentuali di frazione lentamente biodegradabile ed inerte invece erano piuttosto basse. Nel periodo III e IVa, la frazione particolata aumentò rispettivamente al 9% e 14%, confermando la riduzione delle capacità adsorbenti dei granuli aerobici nel lungo periodo. Analogamente, la frazione solubile biodegradabile e quella particolata lentamente biodegradabile aumentarono, in ragione probabilmente del progressivo invecchiamento della biomassa, come dimostra il fatto che al termine del periodo IVa la frazione inerte dei granuli era prossima al 50%. All'inizio del periodo IVb, sono stati spurgati 500 mL di fango, e di conseguenza sia la frazione solubile biodegradabile che quella particolata lentamente biodegradabile diminuirono. Allo stesso tempo, come precedentemente ipotizzato, lo spurgo selettivo del fango e in particolare dei granuli esausti migliorò la capacità adsorbente dei granuli stessi e di conseguenza la frazione inerte allo scaricò diminuì sensibilmente. Tuttavia, va tenuto in considerazione anche l'aumento del tempo di residenza idraulico da 24 a 48 ore. In queste condizioni infatti i batteri avevano a disposizione un tempo maggiore per l'idrolisi della frazione particolata. Inoltre, la rimozione della frazione articolata può essere dovuta al contenuto di EPS dei granuli. Infatti, come mostrato in Figura 6.28, la quantità di sostanza particolata rimossa, calcolata come differenza tra la somma del substrato particolato lentamente biodegradabile ed inerte, è risultata ben correlabile al contenuto di EPS legate.



**Figura 6.28:** Correlazione tra il contenuto di EPS proteiche legate e la quantità di sostanza particolata rimossa.

Come è possibile vedere nel grafico, l'incremento del contenuto di proteine in forma legata, determinò un incremento quasi lineare della rimozione della sostanza articolata. Le proteine sono sostanze idrofobiche che formano una densa struttura gelatinosa che è alla base del processo di granulazione (Zhu et al., 2012). Le EPS, inoltre, possono formare legami ionici e ponti a idrogeno, riuscendo quindi ad intrappolare o imbrigliare sostanze particolate. Date queste proprietà. Le EPS possono essere considerate delle sostanze coagulanti naturali (Sheng et al. 2010). Quindi, in aggiunta ai fenomeni di adsorbimento osservati da De Kreuk et al. (2010), il ruolo delle EPS nella rimozione della frazione organica particolata deve essere tenuto in debita considerazione.

La frazione attiva di biomassa nell'effluente può essere ragionevolmente assunta come un buon indicatore della sintesi di biomassa nel sistema. Come si può osservare in figura, la sua frazione nell'effluente diminuì al crescere della concentrazione di sale nell'influente. Nel dettaglio, il rapporto tra la frazione attiva di biomassa e il COD biodegradabile rimosso, calcolato come somma del COD particolato biodegradabile e di quello solubile biodegradabile, era ben correlato alla concentrazione di sale nell'influente (Figura 6.29). I risultati del periodo IVb non sono stati presi in considerazione in quanto la durata del ciclo fu differente. Questa osservazione sottolinea come la sintesi di nuova biomassa per unità di sostanza organica biodegradabile rimossa, si riduce al crescere della concentrazione di sale. Taheri et al. (2012), conclusero che i principali parametri cinetici della biomassa eterotrofa non erano influenzate dalla salinità. In questo studio tuttavia, i risultati evidenziano una graduale diminuzione della loro attività metabolica al crescere della concentrazione di sale. La ragione di tale discordanza può essere legata alla concentrazione di sale del presente studio che risultava molto maggiore rispetto all'altro.



**Figura 6.29:** Correlazione tra la biomassa prodotta a fronte del COD biodegradabile rimosso e la concentrazione di sale nel reattore.

Pur nondimeno, è interessante osservare come la sintesi di nuova biomassa si verificasse nonostante le elevate concentrazioni di sale. Ciò significa che batteri specializzati, probabilmente ceppi alofili o alotolleranti, si sviluppavano all'interno del reattore e colonizzavano i granuli aerobici, facilitando la loro graduale acclimatazione alle nuove condizioni operative. Inoltre, la correlazione esponenziale decrescente sottolinea come la crescita di nuova biomassa si riduca al crescere della salinità, ma non si arresti. Ciò suggerisce che il sistema potrebbe tollerare concentrazioni saline più elevate, a condizione che si garantisca un tempo di acclimatazione maggiore per il raggiungimento di condizioni operative stazionarie.

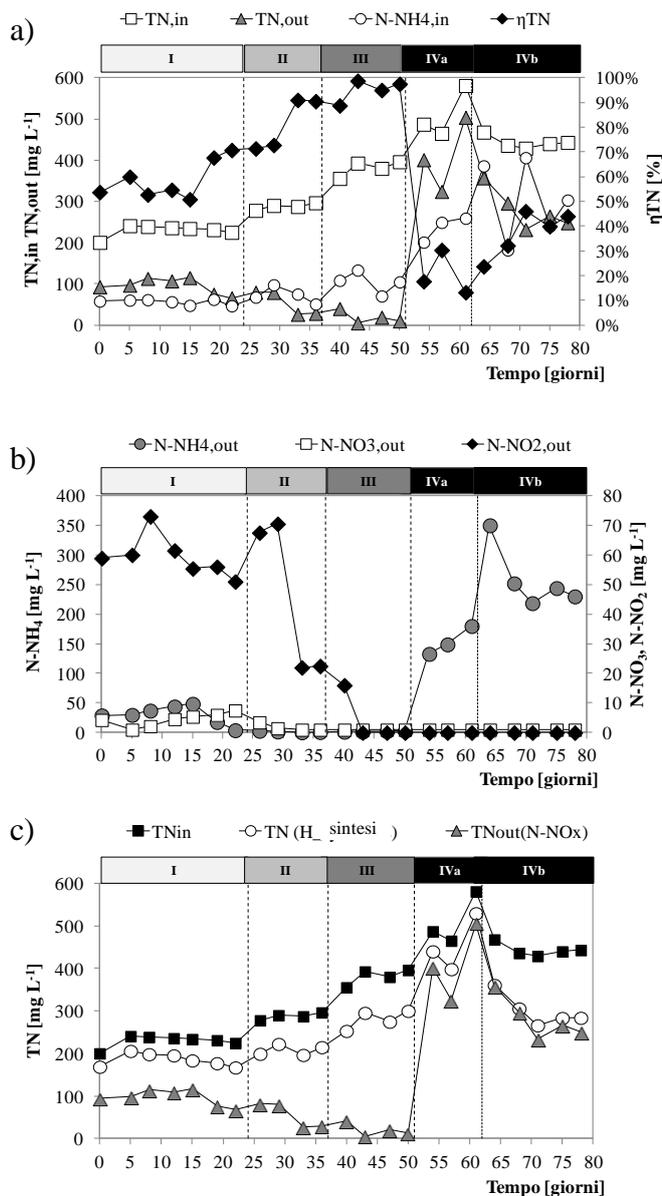
I risultati finora esposti confermano che i granuli aerobici sono una soluzione molto efficace per il trattamento di reflui salini con elevato contenuto di sostanza particolata. I ceppi eterotrofi non risultano essere particolarmente influenzati dalla salinità, quanto dal carico organico, principalmente a causa della scarsa biodegradabilità dell'influente che richiede lunghi tempi di reazione per la sua biodegradazione.

## 6.9 Rimozione dell'azoto

I risultati relativi alla rimozione dell'azoto sono riportati in Figura 6.30. Nel dettaglio, in Figura 6.30a, sono riportate le concentrazioni di azoto totale nell'influente e nell'effluente, nonché le performance di rimozione, in Figura 6.30b, invece sono riportate le concentrazioni dei composti dell'azoto nell'effluente. Infine la Figura 6.30c, riporta il bilancio di massa dell'azoto: nel dettaglio, l'area compresa tra la l'azoto totale nell'effluente e l'azoto influente al netto di quello rimosso per sintesi (5% del BOD rimosso) rappresenta l'azoto rimosso per nitrificazione e denitrificazione, per tanto può fornire utili informazioni in merito in assenza di misure di azoto dirette negli off-gas.

Nel primo periodo le rese di rimozione dell'azoto inizialmente diminuirono probabilmente a causa della complessità del nuovo substrato azotato, presente prevalentemente in forma organica. Gradualmente però l'efficienza di rimozione dell'azoto aumentò fino al 70% al termine del primo periodo. L'azoto allo scarico era presente prevalentemente sotto forma di nitriti, la cui concentrazione oscillava tra i  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e i  $70 \text{ mg L}^{-1}$ , mentre sia la concentrazione di ammonio che di nitrati erano poco significative. Le basse concentrazioni dell'ammonio allo scarico confermano che i batteri AOB non risultano essere inibiti per concentrazioni di sale fino a  $30 \text{ gNaCl L}^{-1}$  come osservato da **Bassin et al. (2011)**, mentre l'assenza di nitrati evidenziava la totale inibizione dei batteri NOB confermando i risultati riportati da **Pronk et al. (2013)**. Il principale meccanismo di rimozione dell'azoto era dunque la nitritazione e denitrificazione, che prevedeva l'ossidazione dell'ammonio a nitrito (nitrificazione parziale) e la loro successiva riduzione ad

azoto molecolare senza passare dallo stadio di massima ossidazione (short-cut denitrification).



**Figura 6.30:** Andamento della concentrazione di azoto totale (TN) e azoto-ammoniacale nell'alimento, e di azoto totale allo scarico con i relativi rendimenti depurativi (a); andamento dei composti dell'azoto allo scarico (b); bilancio di massa dell'azoto (c).

Nel primo periodo l'azoto rimosso secondo tale meccanismo fu circa il 37%. Precedenti studi hanno dimostrato che nei reattori a fanghi granulari, l'ossidazione dell'azoto inizia nel momento in cui la maggiorparte del carbonio organico è stata ossidata, mentre la riduzione dei nitrati o dei nitriti inizia simultaneamente all'ossidazione dell'ammonio negli strati più interni dei granuli (**Mosquera-Corral et al., 2005**). Inoltre, le reazioni di denitrificazione, o denitritazione, si sviluppano anche all'inizio del ciclo (fase di *feast*), poiché il concomitante consumo di ossigeno negli strati più esterni dovuto all'ossidazione della sostanza organica, e la presenza di composti ossidati dell'azoto derivanti dal precedente ciclo di reazione, determinano la formazione di condizioni anossiche all'interno dei granuli stessi (**Di Bella e Torregrossa, 2013**). Quindi il processo di denitrificazione si verifica all'inizio del ciclo SBR e durante la fase di reazione simultaneamente all'ossidazione dell'ammonio. Nel primo caso, i batteri eterotrofi utilizzano il carbonio organico presente nel refluo influente (carbonio interno), mentre nel secondo caso il carbonio utilizzato è quello presente nei prodotti di stoccaggio (carbonio endogeno) stante che la maggiorparte della frazione facilmente biodegradabile è stata rimossa. I risultati del frazionamento hanno dimostrato che nel primo periodo la quantità di substrato rapidamente biodegradabile allo scarico era molto bassa, quindi è possibile che la carenza di sostanza organica causasse le modeste rese di denitritazione. Al fine di promuovere la riduzione dei nitrati, da 28° giorno in poi (metà del periodo II) è stata aggiunta una nota quantità di acetato di sodio a fine ciclo (10<sup>a</sup> ora). L'aggiunta di un substrato facilmente biodegradabile creava nuove condizioni di *feast* che di solito si verificano all'inizio del ciclo (**De Kreuk et al., 2005**). In questo modo, l'ossigeno veniva consumato negli strati esterni e di conseguenza la sua concentrazione in quelli interni era minore. Qui i batteri eterotrofi utilizzavano i nitriti come accettori di elettroni per l'ossidazione della fonte di carbonio esterna. La concentrazione di ossigeno nel reattore non è stata controllata, poiché i granuli erano sufficientemente grandi da consentire la formazione di uno strato anossico sufficientemente ampio (**Di Bella e Torregrossa, 2013**). In queste condizioni, al termine del periodo II, i rendimenti di rimozione dell'azoto totale aumentarono fino al 90%. La concentrazione di nitrati nell'effluente risultava leggermente superiore a 20 mg L<sup>-1</sup>, e l'aliquota di azoto rimosso per nitrificazione-denitrificazione aumentò al 64%. Come anticipato nel paragrafo 6.3, una certa aliquota di acetato non quantificata veniva ossidata direttamente da parte dei batteri eterotrofi, di conseguenza il substrato aggiunto non veniva utilizzato esclusivamente per le reazioni di denitrificazione. Al fine di aumentare ulteriormente le rese di rimozione dell'azoto, all'inizio del periodo III la dose di acetato è stata raddoppiata. In questo modo la concentrazione di azoto nell'effluente si ridusse a meno di 5 mg L<sup>-1</sup> e i rendimenti aumentarono fino al 98%. All'inizio del periodo IVa, sia la concentrazione di azoto che di sale nell'influente aumentarono in ragione del minor rapporto di diluizione. Le rese di rimozione dell'azoto diminuirono al 20% in pochi giorni, sottolineando la completa

inibizione dei ceppi batterici AOB. Il dosaggio di acetato è stato interrotto in questo periodo. Nel successivo periodo IVb, l'efficienza di rimozione dell'azoto aumentò gradualmente senza però superare il 45%. Tuttavia, come è possibile osservare dalla Figura 6.30c, il principale meccanismo di rimozione dell'azoto era la sintesi eterotrofa. Quindi, il più lungo periodo di reazione non ha comportato significativi miglioramenti per quanto concerne l'ossidazione dell'ammonio. Questo risultato potrebbe avere due possibili spiegazioni. In primis, l'elevata salinità può aver certamente inibito l'attività dei ceppi AOB. Tra le esperienze riportate in letteratura, **Wan et al. (2014)** non osservarono significative inibizioni fino a  $50 \text{ gNaCl L}^{-1}$ , mentre **Wang et al. (2015)** riportano che l'attività degli AOB si arrestava per concentrazioni superiori ai  $75 \text{ gNaCl L}^{-1}$ . È dunque possibile che i ceppi AOB riescano a tollerare la salinità fino a un livello compreso tra i  $50 \text{ gNaCl L}^{-1}$  e i  $75 \text{ gNaCl L}^{-1}$ . In secondo luogo, nel periodo IVa, la concentrazione di azoto ammoniacale nell'influente aumentò da circa  $100 \text{ mg L}^{-1}$  a oltre  $250 \text{ mg L}^{-1}$ . Ciò ha comportato un significativo aumento della concentrazione di ammoniaca libera fino a  $40 \text{ mg L}^{-1}$ , concentrazione che può essere dannosa per l'attività dei batteri ammonio ossidanti (**Yang et al., 2004**). Nei precedenti periodi, la frazione di azoto ammoniacale nell'influente era all'incirca in 25% nell'azoto totale influente; probabilmente a seguito del processo di ammonificazione all'interno del reattore, la concentrazione di azoto ammoniacale aumentava in modo graduale e la sua contestuale ossidazione evitava l'accumulo di ammoniaca libera nel sistema.

Tuttavia, i risultati ottenuti sottolineano che fino a  $50 \text{ gNaCl L}^{-1}$ , l'azoto veniva rimosso con rese elevatissime, nonostante le elevate concentrazioni di azoto nell'influente (superiori a  $400 \text{ mg L}^{-1}$ ) e le condizioni ambientali avverse date dall'estrema salinità. La strategia della graduale acclimatazione dei ceppi autotrofi alla salinità è dunque possibile e ne evita l'inibizione. A dimostrazione dell'inibizione e non della morte cellulare dei batteri autotrofi, dopo il periodo IVb, l'impianto è stato alimentato nuovamente con una concentrazione di  $50 \text{ gNaCl L}^{-1}$ , e le rese di rimozione dell'azoto si sono nuovamente attestate sui valori del periodo III.

Infine, la combinazione dei processi di parziale nitrificazione e di denitrificazione via-nitrito si è dimostrata essere un'utile quanto efficace strategia per la rimozione dell'azoto in reflui ipersalini. Tuttavia, è possibile che per concentrazioni saline superiori a  $50 \text{ gNaCl L}^{-1}$ , per evitare shock metabolici per la biomassa autotrofa potrebbe essere necessario applicare gradienti salini inferiori, nell'ordine dell' $1\text{-}2 \text{ gNaCl L}^{-1}$ . Ciò naturalmente richiederà l'implementazione di una specifica campagna sperimentale.

## 6.10 Conclusioni

In questo lavoro è stata studiata la trattabilità di un refluo ittico-conserviero mediante un sistema biologico a biomassa granulare. I granuli aerobici coltivati in ambiente salino, si sono gradualmente adattati alle crescenti concentrazioni di sale, evidenziando una parziale perdita di stabilità solo per concentrazioni superiori ai 50 gNaCl L<sup>-1</sup>. Per concentrazioni superiori, sebbene non si sia osservato un drammatico sfaldamento, i valori di idrofobicità e del contenuto di EPS evidenziavano un serio indebolimento della struttura dei granuli, la cui stabilità nel lungo periodo potrebbe risultare compromessa per quelle precise condizioni operative. Contestualmente sono state ottenute eccellenti rese di rimozione sia della torbidità che dei nutrienti. Il carbonio è stato rimosso con rese superiori al 90%. In particolare, i granuli favorivano l'adsorbimento e simultaneamente la coagulazione del materiale organico particolato, il quale veniva idrolizzato e successivamente biodegradato dai batteri. La salinità non ha avuto effetti significativi sulla rimozione del carbonio, che invece è stata influenzata dal carico organico. Nonostante le elevatissime concentrazioni di sale, l'azoto veniva quasi del tutto rimosso mediante un processo simultaneo di nitrificazione e denitrificazione. Le rese anche in questo caso sono state eccellenti e nell'ordine del 98% fino a 50 gNaCl L<sup>-1</sup>. Valori di salinità maggiore hanno determinato l'inibizione dei ceppi autotrofi, anche se saranno necessarie ulteriori indagini sperimentali per valutare gli effetti di step incrementali di salinità inferiori.

## 6.11 Bibliografia

- Abdullah, N., Yuzir, A., Curtis, T.P., Yahya, A. and Ujang, Z., 2013. Characterization of aerobic granular sludge treating high strength agro-based wastewater at different volumetric loadings. *Bioresource Technology* 127, 181-187.
- Andreottola, G., Foladori, P., Ferrai, M., Ziglio, G. (2002) *Respirometria applicata alla depurazione delle acque. Principi e metodi*. Technical Report No. 3, Department of Civil and Environmental Engineering. University of Trento, Trento, Italy
- APHA, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, nineteenth ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Bassin, J.P., Pronk, M., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Dezotti, M. and van Loosdrecht, M.C.M., 2011. Effect of elevated salt concentrations on the aerobic granular sludge process: Linking microbial activity with microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 77(22), 7942-7953.
- Beun, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J., 2002. Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research* 36(3), 702-712.
- Chowdhury, P., Viraraghavan, T., Srinivasan, A., 2010. Biological treatment process for fish processing wastewater – A review. *Bioresource Technology* 101, 439-449.
- Cristovao, R., Botelho, C.M., Martins, R.J.E., Loureiro, J.M., Boaventura, R.A.R., 2015. Fish canning industry wastewater treatment for water reuse – a case study. *Journal of Cleaner Production* 87, 603-612.
- De Kreuk, M., Kishida, N., Tsuneda, S., van Loosdrecht, M.C.M., 2010. Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. *Water Research*, 44, 5929-5938.
- Di Bella, G., Torregrossa, M., 2013. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. *Bioresource Technology* 142, 706-713.
- Dignac, M.F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, a., Snidaro, D., Scribe, P., 1998. Chemical description of extracellular polymers: Implication on activated sludge floc structure. *Water Sci. Technol.* 38, 45–53.
- Dincer, A.R., Kargi, F., 2001. Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater. *Process Biochemistry* 36 (8–9), 901–906.
- Figuerola, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R., 2008. Treatment of saline wastewater in SBR aerobic granular reactors, *Water Science and Technology* 58, 479–485.
- Ismail, S.B., de La Parra, C.J., Temmink, H. and van Lier, J.B., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB)

- reactors operated under high salinity conditions. *Water Research* 44(6), 1909-1917.
- Jemli, M., Karray, F., Feki, F., Loukil, S., Mhiri, N., Aloui, F., Sayadi, S., 2015. Biological treatment of fish processing wastewater: A case study from Sfax City (Southeastern Tunisia). *Journal of Environmental Science* 30, 102-112.
- Lefebvre, O., Moletta, R., 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Research* 40, 3671-3682.
- Li, A., Li, X., Yu, H., (2011). Effect of the food-to-microorganism (F/M) ratio on the formation and size of aerobic sludge granules. *Process Biochemistry* 46, 2269-2276.
- Li-long, Y., Yu, .L, Yuan, R., Ying, Z., 2014. Analysis of the characteristics of short-cut nitrifying granular sludge and pollutant removal processes in a sequencing batch reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37(2), 125-32.
- Liu, Y.Q., Tay, J.H. (2007) Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*, 99, 980-985
- Long, B., Yang, C., Pu, W., Yang, J., Liu, F., Zhang, L., Zhang, J., Cheng, K., 2015. Tolerance to organic loading rate by aerobic granular sludge in a cyclic aerobic granular reactor. *Bioresource and Technology* 182, 314-322.
- Mosquera-Corral, A., de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., 2005. Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Research* 39, 2676-2686.
- Pronk, M., Bassin, J.P., De Kreuk, M.K., Kleerebezem, R. and Van Loosdrecht, M.C.M., 2014. Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(3), 1339-1348.
- Qin L., Liu, Y., Tay, J.H., (2003). Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochemical Engineering Journal* 21, 47-52
- Sheng, G.P., Yu, H.Q. and Li, X.Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances* 28(6), 882-894.
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A., Olsson, G., Dold, P.L. (1998). *Respirometry in control of the Activated Sludge process: Principles*, ISBN: 1900222043, 1998.
- Taheri, E., Khiadani Hajian, M.H., Amin, M.M., Nikaeen, M. and Hassanzadeh, A., 2012. Treatment of saline wastewater by a sequencing batch reactor with emphasis on aerobic granule formation. *Bioresource Technology* 111, 21-26.
- Val del Río, A., Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R., 2013. Stability of aerobic granular biomass treating the effluent from a seafood industry. *International journal of Environmental Research* 7(2), 265-276.

- Verawaty, M., Tait, S., Pijuan, M., Yuan, Z. and Bond, P.L., 2013. Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Research* 47(14), 5338-5349.
- Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Liu, X., Sun, S. and Chen, C., 2014. Partial nitrification of wastewaters with high NaCl concentrations by aerobic granules in continuous-flow reactor. *Bioresource Technology* 152, 1-6.
- Wang, Z., Gao, M., She, Z., Wang, S., Jin, C., Zhao, Y., Yang, S., Guo, L., 2015. Effect of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor. *Separation and Purification Technology* 144, 223-231.
- Winkler, M.K.H., Bassin, J.P., Kleerebezem, R., van der Lans, R.G.J.M., van Loosdrecht, M.C.M., (2012). Temperature and salt effects on settling velocity in granular sludge technology. *Water Research* 46, 3897-3902.
- Xiong, L., Liu, Y., (2013). Importance of extracellular proteins in maintaining structural integrity of aerobic granules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 112, 435-440
- Yang, S.F., Tay, J.H., Liu, Y., 2004. Inhibition of free ammonia to the formation of aerobic granules. *Biochemical Engineering Journal* 17, 41-48.
- Zhang, H., He, Y., Jiang, T. and Yang, F., 2011. Research on characteristics of aerobic granules treating petrochemical wastewater by acclimation and co-metabolism methods. *Desalination* 279(1-3), 69-74.
- Zhu, L., Qi, H.Y., Lv, M.L., Kong, Y., Yu, Y.W. and Xu, X.Y., 2012. Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies. *Bioresource Technology* 124, 455-459.
- Zhu, L., Yu, Y., Dai X., Xu X., Qi X., (2013). Optimization of selective sludge discharge mode for enhancing the stability of aerobic granular sludge process. *Chemical Engineering Journal* 217, 442-446.



## Capitolo 7

# Analisi sperimentale sul trattamento di reflui prodotti da birrifici

### 7.1 Introduzione e obiettivi dello studio

Le industrie birrarie costituiscono un importante segmento economico di molti paesi, essendo la birra una delle bevande più consumate a livello mondiale. Il processo di produzione della birra comprende due processi, la produzione della bevanda e l'imbottigliamento del prodotto finito. I sottoprodotti generati da tali attività, ovvero i resti dei grani di orzo e luppoli, il lievito in eccesso, e i prodotti utilizzati per il lavaggio delle bottiglie, dei macchinari e dei locali, sono responsabili della contaminazione delle acque utilizzate durante l'intero processo. È stato stimato che per la produzione di 1 litro di birra, vengono prodotti dai 3 ai 10 litri di refluo, in funzione del tipo di lavorazione del prodotto (**Fillaudeau et al., 2006**). Tali reflui sono caratterizzati da un elevatissimo contenuto di sostanza organica espresso in termini di BOD ( $> 20.000 \text{ mg L}^{-1}$ ), la cui natura soprattutto all'origine, è prevalentemente solubile, dato che il processo di produzione della birra prevede un lungo periodo di fermentazione che comporta l'idrolisi di sostanze molto complesse dal punto di vista molecolare (**Fillaudeau et al., 2006**). Non di meno, la componente particolata, seppur di minore impatto rispetto a quella solubile, costituisce una frazione non trascurabile ai fini dei processi depurativi. Tale frazione è per lo più costituita dai residui della macinazione dei grani e in minore quantità dal lievito in eccesso che viene scaricato dai fermentatori. Le concentrazioni di azoto e fosforo sono invece molto variabili, e dipendono dal punto di origine del refluo. Infatti, le fonti di azoto e fosforo provengono prevalentemente dalle attività di lavaggio delle bottiglie, in quanto sono contenuti nei detergenti che sono solitamente utilizzati nelle attività di pulizia. I valori usuali di azoto e fosforo sono rispettivamente nell'ordine di  $100 \text{ mgN L}^{-1}$  e di  $40\text{-}50 \text{ mgP L}^{-1}$  (**Fillaudeau et al., 2006**).

A causa degli elevati carichi organici di tali acque, il trattamento biologico che viene per lo più utilizzato è quello anaerobico, che consente di produrre significative quantità di biogas che può essere utilizzato per vari scopi all'interno dell'industria stessa. Tuttavia, il solo trattamento anaerobico non è sufficiente a

garantire il rispetto degli standard di qualità richiesti per lo scarico delle acque di origine industriale, sia per l'inquinamento organico residuo, ma in particolar modo perché esso risulta inefficace nei confronti dell'azoto e del fosforo. Per tali motivi, il trattamento anaerobico si configura come un pretrattamento di questi reflui, e nella maggiorparte dei casi viene integrato con uno stadio aerobico immediatamente a valle generalmente del tipo a fanghi attivi. I reflui pretrattati sono comunque caratterizzati da un elevato valore del carico organico, oltre che di azoto e fosforo, e quindi tali da rendere necessario il ricorso a trattamenti avanzati. Tuttavia, dato che il trattamento di questi reflui avviene per lo più in loco, si rende necessario ricorrere a sistemi efficienti e con limitato ingombro.

Nell'ambito dei trattamenti aerobici avanzati, quello dei fanghi granulari è stato con successo applicato al trattamento di reflui industriali caratterizzati dall'elevato carico organico e di nutrienti. Date le peculiari caratteristiche strutturali dei granuli, la loro applicazione al trattamento dei reflui prodotti dai birrifici consentirebbe il raggiungimento degli standard normativi richiesti per lo scarico e contestualmente di avere sistemi dal ridotto ingombro. In letteratura è riportato un caso di applicazione dei fanghi granulari per il trattamento dei reflui prodotti da un birrificio (Wang et al., 2007). Tuttavia, in questo studio non vengono fornite molte informazioni riguardo eventuali criteri di progetto, quali ad esempio la scelta di un carico organico ottimale e sulla stabilità dei granuli, quest'ultimo ritenuto essere il principale collo di bottiglia del sistema che ne limita le applicazioni in impianti a scala di laboratorio o al più pilota.

L'obiettivo di questo capitolo è quello di descrivere l'attività sperimentale condotta su tre impianti a biomassa granulare, a scala di laboratorio, operanti secondo differenti modalità. In particolare, l'obiettivo della sperimentazione è stato quello di analizzare le performance di processo, in termini di rimozione della sostanza organica e dei nutrienti, in differenti condizioni di carico, al fine di individuare eventuali criteri progettuali e gestionali per una corretta ottimizzazione del processo depurativo. Contemporaneamente alle performance, è stata studiata la stabilità dei granuli aerobici al variare delle condizioni operative, al fine di individuare, anche in questo caso, le migliori che consentissero l'ottimizzazione del processo.

## 7.2 Materiali e metodi

Nei successivi paragrafi sono descritte e discusse le principali scelte operative adottate nel corso della sperimentazione, nonché le metodiche utilizzate per l'esecuzione delle analisi chimiche.

### 7.2.1 Origine e caratterizzazione del refluo

Il refluo è stato prelevato presso il birrificio Fort Garry Brewery (Winnipeg, Ca). Per un periodo di circa 4 mesi, sono stati effettuati dei periodici campionamenti del refluo in uscita all'impianto al fine di effettuare una caratterizzazione quanto più completa del liquame in esame. Il refluo veniva campionato nel pozzetto di scarico del birrificio, dove confluivano sia gli scarti dei fermentatori e della lavorazione delle materie prime, che le acque provenienti dal reparto di imbottigliamento. Le concentrazioni medie dei principali inquinanti sono riassunte in tabella 7.1

**Tabella 7.1:** Caratteristiche medie del refluo in uscita dal birrificio

Parametro	Valore	Unità di misura
COD totale (TCOD)	5380±76	[mg L <sup>-1</sup> ]
COD solubile (SCOD)	4060±51	[mg L <sup>-1</sup> ]
COD particolato (PCOD)	1320±25	[mg L <sup>-1</sup> ]
BOD <sub>5</sub>	3054±46	[mg L <sup>-1</sup> ]
TN	167±16	[mg L <sup>-1</sup> ]
NH <sub>4</sub> -N	136±11	[mg L <sup>-1</sup> ]
TP	29±4	[mg L <sup>-1</sup> ]
PO <sub>4</sub> -P	24±3	[mg L <sup>-1</sup> ]
SST	1548±42	[mg L <sup>-1</sup> ]

Per l'attività sperimentale il refluo veniva prelevato dal fondo dei fermentatori, quindi a monte del pozzetto di raccolta delle acque reflue del birrificio (Fig.7.1).



**Fig.7.1:** Immagine del campionamento del refluo prelevato dal fondo dei fermentatori

Successivamente, tale refluo, caratterizzato da elevatissime concentrazioni di sostanza organica, veniva diluito con acqua di rete per simulare l'effetto di diluizione che si ha nella linea produttiva per effetto delle acque provenienti dal reparto di imbottigliamento, fino ad ottenere una concentrazione di COD totale prossima a quella riportata in tabella 7.1. Infine, al refluo veniva aggiunta una quantità nota di azoto e fosforo, che normalmente derivano dai prodotti di lavaggio utilizzati nella linea di imbottigliamento, per ottenere una concentrazione all'incirca pari a quella riportata in tabella 7.1.

Il refluo con queste caratteristiche veniva alimentato in un reattore anaerobico a biomassa adesa su supporti mobili (Anaerobic Moving Bed Biofilm Reactor, AMBBR), dove subiva un pre-trattamento finalizzato alla rimozione di una parte del carico organico e principalmente alla produzione di biogas. L'effluente dell'AMBBR veniva quindi alimentato infine all'impianto granulare aerobico (Aerobic Granular Sludge Reactor - AGS). Le concentrazioni medie dell'influente all'impianto granulare nel corso dell'intera campagna sperimentale sono riportate in tabella 7.2.

**Tabella 7.2:** Caratteristiche medie del refluo influente all'impianto granulare

Parametro	Valore	Unità di misura
COD totale (TCOD)	1380±63	[mg L <sup>-1</sup> ]
COD solubile (SCOD)	1036±45	[mg L <sup>-1</sup> ]
COD particolato (PCOD)	352±31	[mg L <sup>-1</sup> ]
BOD <sub>5</sub>	635±16	[mg L <sup>-1</sup> ]
TN	141±16	[mg L <sup>-1</sup> ]
NH <sub>4</sub> -N	128±11	[mg L <sup>-1</sup> ]
TP	24±6	[mg L <sup>-1</sup> ]
PO <sub>4</sub> -P	21±5	[mg L <sup>-1</sup> ]
SST	348±36	[mg L <sup>-1</sup> ]

### 7.2.2 Set-up della campagna sperimentale

La campagna sperimentale ha avuto una durata complessiva di 110 giorni suddivisi in due periodi di pari durata (55 giorni ciascuno). Per la sperimentazione sono stati utilizzati tre reattori aerobici granulari (R1, R2, R3), ciascuno dei quali avente un volume operativo di 4 litri, tutti operanti in modalità batch.

Nel primo periodo sperimentale, i reattori operavano secondo cicli di 6 ore, mentre nel secondo la durata dei cicli è stata incrementata a 12 ore, per valutare gli effetti dell'aumento del periodo di inedia aerobica sulla stabilità strutturale dei granuli. Inoltre, per studiare gli effetti di differenti valori del carico volumetrico alimentato, sia sulle performance del sistema che sulla stabilità dei granuli aerobici, essendo il refluo comune per i tre impianti, sono stati applicati tre differenti valori del rapporto di scambio volumetrico (VLR). In particolare, in R1 il valore del VLR era

pari al 75%, in R2 pari al 50%, e in R3 al 25%. In questo modo, in ciascun impianto veniva alimentato, e di conseguenza scaricato, un differente volume di refluo per ogni ciclo. Di conseguenza, poichè la zona di sedimentazione era diversa in ciascuno dei tre reattori, al fine di applicare la stessa pressione di selezione idraulica, sono stati imposti tre differenti tempi di sedimentazione, chiaramente maggiore nel reattore R1 e minore in R3 (Fig.7.2).

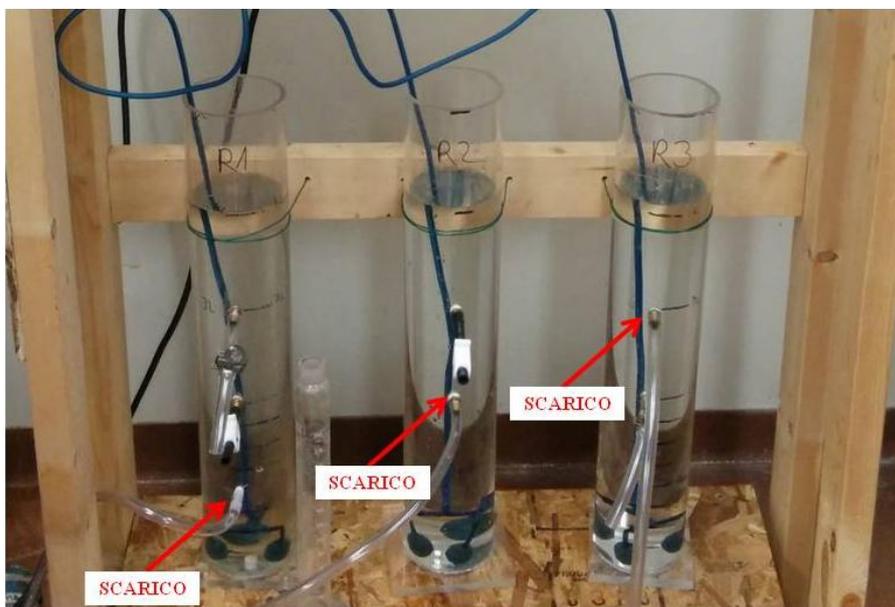


Fig.7.2: Immagine dei tre reattori SBR e particolare dello scarico a quote diverse

Il refluo veniva alimentato in modalità plug-flow dal fondo del reattore in condizioni anaerobiche, al fine di favorire una più efficace rimozione del fosforo (de Kreuk et al., 2005).

La suddivisione del ciclo di reazione è riportato in tabella 7.3.

Tabella 7.3: Durata delle fasi del ciclo di reazione nei due periodi sperimentali

Fase	Durata	Unità di misura
Alimentazione (anaerobica)	45	[min]
Aerazione (periodo I)	310	[min]
Aerazione (periodo II)	670	[min]
Sedimentazione	4.5-3-1.5	[min]
Scarico	5	[min]
Attesa	0.5-2-3.5	[min]
Durata totale del ciclo	6 (I) -12 (II)	[h]

I principali parametri operativi per ciascun reattore sono invece riassunti in tabella 7.4.

**Tabella 7.4:** Parametri operativi dei tre impianti granulari

Parametro	R1	R2	R3	Unità di misura
Durata del ciclo	6 (I) - 12 (II)	6 (I) - 12 (II)	6 (I) - 12 (II)	[h]
Rapporto di scambio volumetrico (VER)	75	50	25	[%]
Carico organico volumetrico (VLR)	4.1(I) - 2.1(II)	2.8(I)-1.5(II)	1.4(I) - 0.8(II)	[KgCODm <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ]
Tempo di detenzione idraulica (HRT)	8 (I) - 16 (II)	12 (I) - 24 (II)	24 (I) - 48 (II)	[h]
Pressione di selezione idraulica	10	10	10	[m h <sup>-1</sup> ]
Velocità del flusso d'aria	2.4	2.4	2.4	[cm s <sup>-1</sup> ]

### 7.2.3 Configurazione e start-up dei reattori

I reattori erano costituiti da cilindri in plexiglass aventi ciascuno un volume operativo di 4 litri. Ciascun cilindro era alto 1,5 metri e aveva un diametro interno di 100 mm. Tutti i reattori sono stati muniti di tre prese per lo scarico dell'effluente poste a tre differenti quote (Fig.7.2), al fine di applicare tre differenti valori del rapporto di scambio volumetrico. L'aria veniva introdotta dal fondo mediante tre diffusori a bolle fini posti a 120° l'uno dall'altro in modo da massimizzare gli sforzi idrodinamici, con una portata d'aria pari a 3 litri/minuto (Fig.7.3).



**Fig.7.3:** Particolare dei diffusori d'aria sul fondo dei reattori

L'influente veniva alimentato dal fondo del reattore in condizioni anaerobiche mediante una pompa peristaltica, mentre l'effluente veniva scaricato mediante una pompa peristaltica dedicata. L'influente veniva stoccato all'interno di un frigoriferi termostato settato alla temperatura di 4°C, e tramite una valvola a galleggiante il refluo era collettato in un serbatoio di carico nel quale il refluo veniva riportato a temperatura ambiente e alimentato nei tre impianti. Ciascuna utenza elettrica è stata collegata a un timer dedicato che ne regolava l'accensione e lo spegnimento consentendo in questo modo l'alternanza delle varie fasi del ciclo SBR. In figura 7.4 è mostrata una vista d'insieme dell'impianto sperimentale.



**Fig.7.4:** Vista d'insieme dell'impianto

I tre impianti sono stati inoculati con fango attivo prelevato dalla vasca di ossidazione dell'impianto di depurazione a servizio della città di Winnipeg. La miscela aerata era caratterizzata da una concentrazione di solidi sospesi totali pari a  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  e un valore dell'indice di sedimentabilità del fango ( $\text{SVI}_{30}$ ) di  $135 \text{ mL gSST}^{-1}$ . In Figura 7.5 è mostrata l'immagine dei tre reattori il giorno dell'inoculo. Si fa osservare come il differente livello del fango nei tre reattori era dovuto proprio al diverso rapporto di scambio volumetrico applicato a ciascuno di essi.



Fig.7.5: Fotografia degli impianti il giorno dell'inoculo

#### 7.2.4 Metodiche analitiche

Nel corso della sperimentazione sono state eseguite analisi chimico-fisiche sulla miscela aerata, sull'influente ed effluente, nonché specifiche analisi durante il ciclo. Per quanto riguarda le analisi sulla miscela aerata sono state effettuate misure di solidi sospesi totali e volatili in accordo alle metodiche standard (Apha, 2005) con frequenza di tre volte a settimana e misure del contenuto di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) al fine di effettuarne una caratterizzazione utile ad evidenziare eventuali legami di corrispondenza tra la struttura dei granuli e le varie condizioni operative applicate. La metodica utilizzata sia per l'estrazione che per la quantificazione di proteine e carboidrati è la stessa di quella descritta al capitolo 5 nel paragrafo 5.3.1. Le analisi delle EPS inoltre sono state effettuate nel corso di un intero ciclo di reazione con frequenza settimanale, al fine di analizzarne l'andamento durante il processo ed evidenziare anche in questo caso un possibile legame con la stabilità dei granuli. I campioni venivano prelevati con maggiore frequenza (15 minuti) nella fase iniziale del ciclo fin quando il COD solubile veniva del tutto consumato (fase di feast), mentre ogni 60/120 minuti durante la restante parte del ciclo.

Per quanto riguarda invece le analisi chimiche sull'influente ed effluente degli impianti granulari, sono state effettuate misure di COD totale e solubile, di azoto e fosforo totale, e delle loro forme disciolte, ovvero ammoniaca ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ), nitriti ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) e nitrati ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ), e ortofosfati ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ). Il COD è stato determinato applicando il metodo colorimetrico riportato dei metodi standard (Apha, 2005). Il COD totale è stato determinato sul campione tal quale, mentre quello solubile previa filtrazione su membrana a  $0,45\ \mu\text{m}$ . Il COD particolato infine è stato determinato per differenza tra quello totale e quello solubile. Le analisi sull'azoto e

sul fosforo totale sono state effettuate anche in questo caso sul campione tal quale, utilizzando dei kit commerciali (Hach). Le analisi di ammoniaca ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ), nitriti ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) e nitrati ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ), e ortofosfati ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) sono state effettuate sui campioni filtrati mediante un analizzatore spettrofotometrico automatico (Fluid Injection Analyzer - FIA) (Fig.7.6). Sia per il COD, che per l'azoto e il fosforo, sono stati condotti specifici test che consistevano nel monitoraggio delle concentrazioni dei vari inquinanti durante il ciclo di reazione.



**Fig.7.6:** Fotografia dell'analizzatore fotometrico automatico (FIA)

Inoltre, sono state effettuate periodiche osservazioni microscopiche dei granuli, al fine di valutarne la morfologia e le dimensioni. I granuli venivano osservati mediante uno stereomicroscopio (Zeiss) a ingrandimenti pari a 7x, e sulle immagini acquisite venivano effettuate le misure delle dimensioni medie di un numero significativo di granuli (>200) mediante un software analizzatore di immagini.

## 7.3 Risultati e discussioni

### 7.3.1 Formazione e morfologia del fango granulare

Nel primo periodo sperimentale la granulazione aerobica è stata ottenuta con successo in tutti e tre i reattori. Il processo di granulazione si è rivelato essere molto rapido, e già dopo la prima settimana i primi aggregati erano chiaramente visibili in ciascun reattore. La rapida granulazione del fango attivo è stata precedentemente osservata da altri autori, con particolare riferimento al trattamento di reflui industriali (**Abdullah et al., 2013; Rosman et al., 2013**), dove le avverse condizioni ambientali, date dall'elevato valore del carico organico e la presenza di composti difficilmente biodegradabili, stimolano la popolazione microbica a secernere una maggiore quantità di EPS il cui ruolo sulla formazione dei granuli aerobici è ben noto. Tuttavia, altri autori riportano altresì che la formazione di granuli stabili in reattori alimentati con refluo industriale è un processo lento (**Wagner et al., 2015**). Nel caso in esame, è possibile che la rapida formazione dei granuli sia stata dovuta al particolare schema di processo, che prevedeva il pretrattamento anaerobico del refluo mediante un sistema a biomassa adesa (AMBBR). Infatti, è verosimile, come confermato in letteratura (**Yu et al., 2013**), che la presenza della pellicola di spoglio proveniente dal sistema MBBR, abbia facilitato l'aggregazione del fango attivo in granuli, in quanto costituiva un nucleo di aggregazione pre-formato per gli altri batteri. I granuli aerobici erano caratterizzati da un colore giallo tendente al marrone, con una superficie esterna molto regolare e liscia. Nel primo periodo, i granuli erano dominanti dopo sole 4 settimane (28° giorno), quando le loro dimensioni medie raggiunsero 1,2 mm, 1,9 mm e 1,6 mm rispettivamente in R1, R2 ed R3. La struttura del fango granulare rimase stabile per circa il primo mese, durante il quale la distribuzione granulometrica risultò abbastanza omogenea e non si osservarono evidenti segni di deterioramento. A partire dal 35° giorno tuttavia, i primi granuli strutturalmente instabili iniziarono ad essere chiaramente visibili nel reattore; questi granuli erano caratterizzati da una struttura non omogenea, e inoltre strutture filamentose iniziarono ad essere chiaramente visibili sulla loro superficie. Nei giorni successivi, la miscela aerata risultava essere costituita sia da biomassa granulare che fioccosa, derivante dallo sfaldamento dei granuli stessi. Dal 42° giorno, la miscela aerata iniziò a tendere gradualmente verso un sistema ibrido in tutti e tre i reattori, nei quali la percentuale di fango granulare si andava inesorabilmente riducendo. Tuttavia, sebbene la percentuale del fango granulare nel reattore fosse drasticamente diminuita rispetto alle precedenti settimane, una discreta percentuale di granuli rimase all'interno dei reattori (20-30%). In Figura 7.7 sono mostrate le immagini dei granuli nel primo periodo sperimentale.

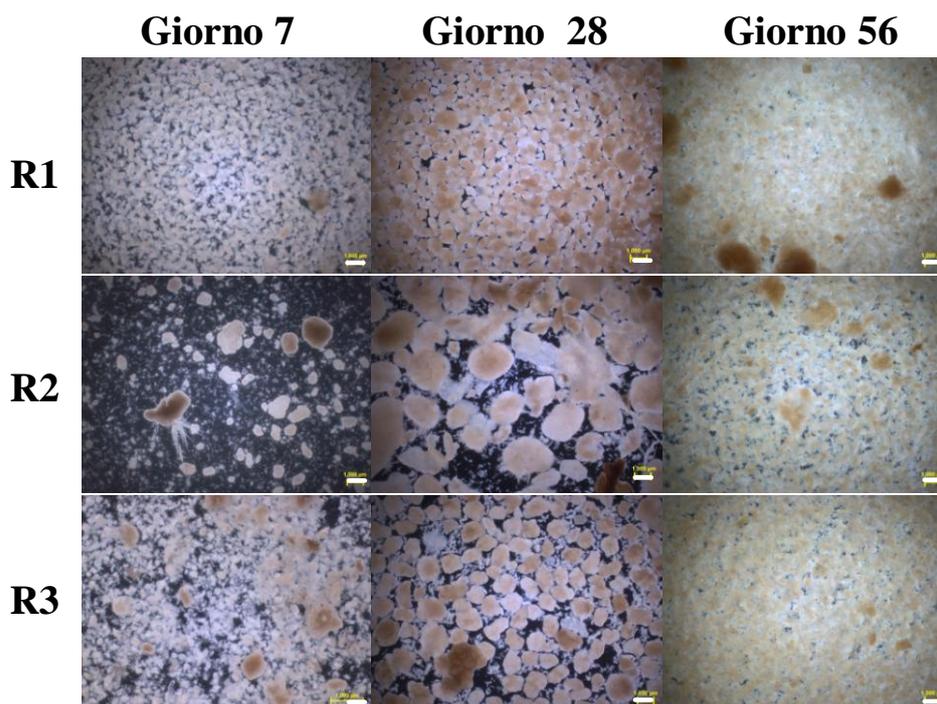


Fig.7.7: Immagini dei granuli nel primo periodo sperimentale (barra=1 mm).

Risultati analoghi sono stati ottenuti anche da alcuni autori (**de Kreuk et al., 2010**) i quali osservarono un graduale sfaldamento dei granuli in un sistema alimentato con refluo ricco di sostanza organica particolata lentamente biodegradabile. Gli autori osservarono che la progressiva trasformazione dei granuli in strutture a “fluff” era associabile all'idrolisi e alla degradazione del substrato particolato che veniva adsorbito sulla superficie dei granuli stessi; tale condizione comportava il continuo rilascio di substrato durante la fase di aerazione, circostanza che portava a una fase di feast cosiddetta "estesa". Tale circostanza era favorevole, secondo gli autori, dello sviluppo di batteri filamentosi che causavano, a loro volta, la formazione di granuli irregolari (**Martins et al., 2004**). Gli autori suggerirono che un più lungo periodo di alimentazione in condizioni anaerobiche potesse favorire la completa idrolisi e degradazione dei substrati più complessi, evitando in tal modo la proliferazione di batteri filamentosi e quindi lo sviluppo di strutture irregolari. Tuttavia, altri autori (**Wagner et al., 2015**) osservarono che un periodo di alimentazione in condizioni anaerobiche più lungo non risultava lo stesso sufficiente per evitare la proliferazione di batteri filamentosi. Sulla base di questi studi è risultato chiaro che la proliferazione dei suddetti batteri debba essere evitata applicando strategie differenti. È noto che un corretto bilanciamento delle fasi di

*feast* e *famine* in un sistema SBR favorisca lo sviluppo di batteri fiocco-formatori che sono in grado di creare prodotti di stoccaggio, a scapito dei batteri filamentosi che risultano privi di tale capacità (Val del Río et al., 2013). Di conseguenza, la continua disponibilità di substrato derivante dal processo di idrolisi causava un non corretto bilanciamento delle durate delle fasi di *feast* e *famine*, per cui i batteri fiocco-formatori non risultavano metabolicamente favoriti rispetto ai filamentosi, che di conseguenza, avendo una struttura cellulare più semplice, riuscivano a svilupparsi più rapidamente rispetto ai primi. Tale comportamento è stato osservato in tutti e tre i reattori, indicando dunque che né il valore del carico organico, né il tempo di ritenzione idraulica avevano influenza su questo fenomeno in un ciclo di breve durata.

Per assicurare la completa degradazione del substrato organico particolato e promuovere un corretto bilanciamento delle fasi di *feast* e *famine*, nel secondo periodo sperimentale, la durata della fase di *famine* è stata aumentata incrementando la durata del ciclo da 6 a 12 ore. In poche settimane, la granulazione è stata completamente recuperata e i nuovi granuli risultavano chiaramente visibili e dominanti in tutti e tre i reattori. Questi nuovi granuli risultavano essere morfologicamente molto omogenei, con un diametro medio prossimo a 1,5 mm, 1,2 mm e 1 mm in R1, R2 e R3 rispettivamente (Fig. 7.8).

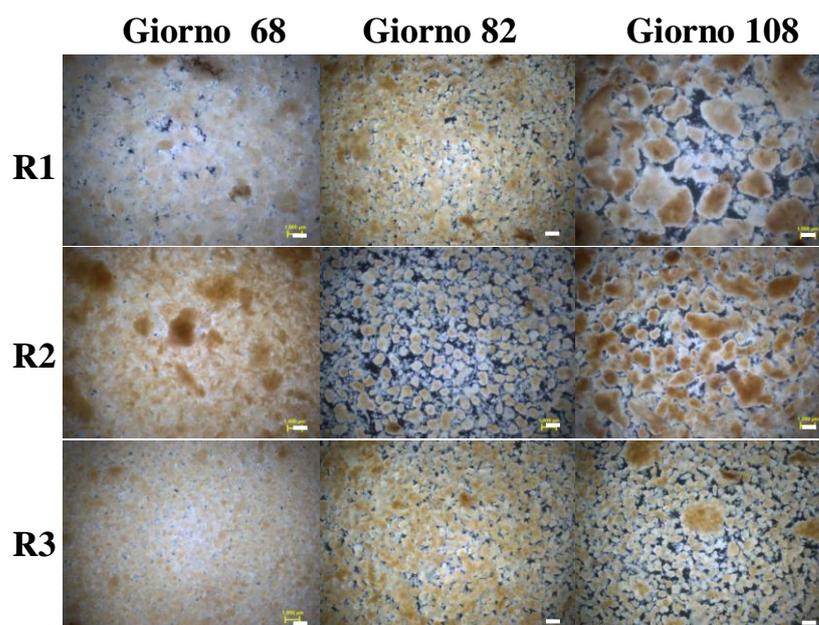
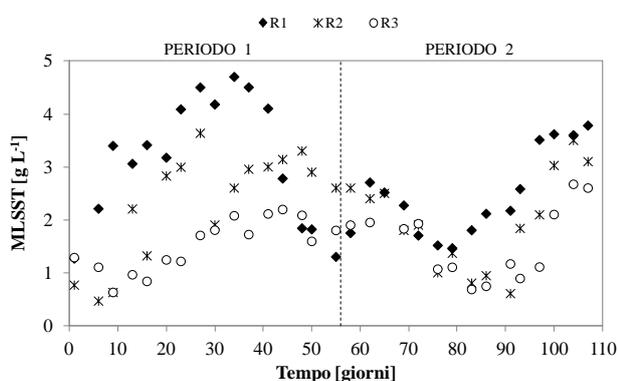


Fig.7.8: Immagini dei granuli nel secondo periodo sperimentale (barra=1 mm).

Rispetto al primo periodo, i granuli risultarono di dimensioni leggermente inferiori, a causa del minore valore del carico organico, come osservato da alcuni autori (**Di Bella and Torregrossa, 2013**) e, inoltre, i granuli si mantennero stabili fino al termine della sperimentazione, indicando che le nuove condizioni operative erano più appropriate per la loro stabilità.

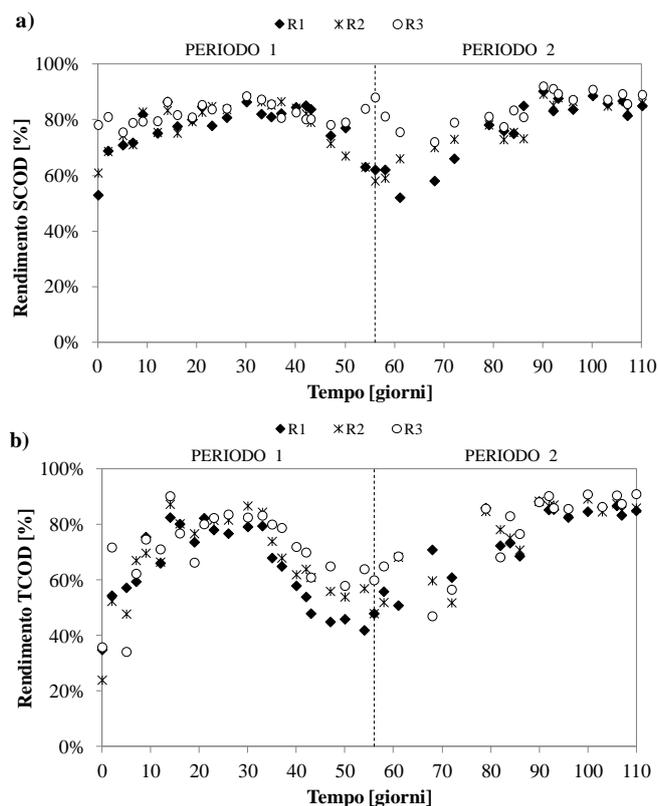
La concentrazione dei solidi sospesi totali è stata fortemente influenzata dalla stabilità dei granuli. Come è possibile osservare dal grafico in Figura 7.9, la concentrazione di solidi aumentò in maniera sensibile nel corso delle prime quattro settimane in cui raggiunse valori prossimi a  $4,5 \text{ gSST L}^{-1}$ ,  $3 \text{ gSST L}^{-1}$  e  $2 \text{ gSST L}^{-1}$  rispettivamente in R1, R2 ed R3. Successivamente, in seguito all'insorgere delle strutture filamentose, come in precedenza descritto, la perdita di stabilità dei granuli causò un significativo dilavamento di biomassa dal sistema e la concentrazione di solidi si ridusse in maniera drastica. Lo stesso trend si mantenne anche nel secondo periodo, almeno durante le prime tre settimane in tutti e tre i reattori. A partire dall'ottantesimo giorno invece il trend si è repentinamente invertito, e la concentrazione di solidi aumentò molto rapidamente riportandosi su valori prossimi ai  $4 \text{ gSST L}^{-1}$ . Per tutta la durata della sperimentazione la frazione di solidi volatili si mantenne prossima all'80%, per cui il loro andamento nel tempo risultò assolutamente identico a quello dei solidi totali.



**Fig.7.9:** Andamento della concentrazione di solidi sospesi totali in R1, R2 ed R3.

## 7.4 Rimozione della sostanza organica

I rendimenti di rimozione della sostanza organica sono stati valutati in termini di abbattimento del COD nelle forme totale e solubile, e del BOD. In Figura 7.10 a e b sono riportati i rendimenti di rimozione del COD solubile (Fig.7.10a) e totale (Fig.7.10b).



**Fig.7.10:** Andamento dei rendimenti di rimozione del COD solubile (a) e totale (b) R1, R2 ed R3.

Nel corso del primo periodo, i rendimenti di rimozione del COD solubile si sono mantenuti mediamente intorno all'80% in tutti e tre i reattori, e i valori delle concentrazioni di COD allo scarico erano di poco inferiori ai  $200 \text{ mg L}^{-1}$ . Solo verso la fine del periodo stesso, in seguito al verificarsi dello sfaldamento dei granuli, i rendimenti si sono ridotti fino al 60% soprattutto in R1 ed R2. Nel reattore operante con carico inferiore (R3) i rendimenti si sono mantenuti in linea con quelli osservati nelle settimane precedenti allo sfaldamento dei granuli. La causa della riduzione dei rendimenti è stata verosimilmente associabile al dilavamento di biomassa conseguente alla degranulazione verificatasi in questa fase, che ha comportato un significativo incremento del carico del fango, e di conseguenza la riduzione dei rendimenti depurativi. Nel reattore R3, poiché il carico organico volumetrico era inferiore, il dilavamento della biomassa non ha comportato una significativa riduzione dei rendimenti depurativi che si sono

mantenuti sufficientemente elevati. Nel secondo periodo, nel corso delle prime tre settimane, i rendimenti si sono mantenuti bassi in R1 ed R2, ma gradualmente, col raggiungimento di nuove condizioni stazionarie e la formazione di nuovi granuli, questi si sono riportati su valori prossimi all'80% e si sono mantenuti su tali valori fino al termine del periodo osservato. I valori del COD allo scarico in condizioni stazionarie erano compresi tra i 150 e i 250 mg L<sup>-1</sup>. I rendimenti sul BOD<sub>5</sub> sono risultati assolutamente analoghi, e per tale motivo non è stato riportato il relativo grafico. I valori in uscita erano mediamente pari a 50, 40 e 25 mg L<sup>-1</sup> in R1, R2 ed R3.

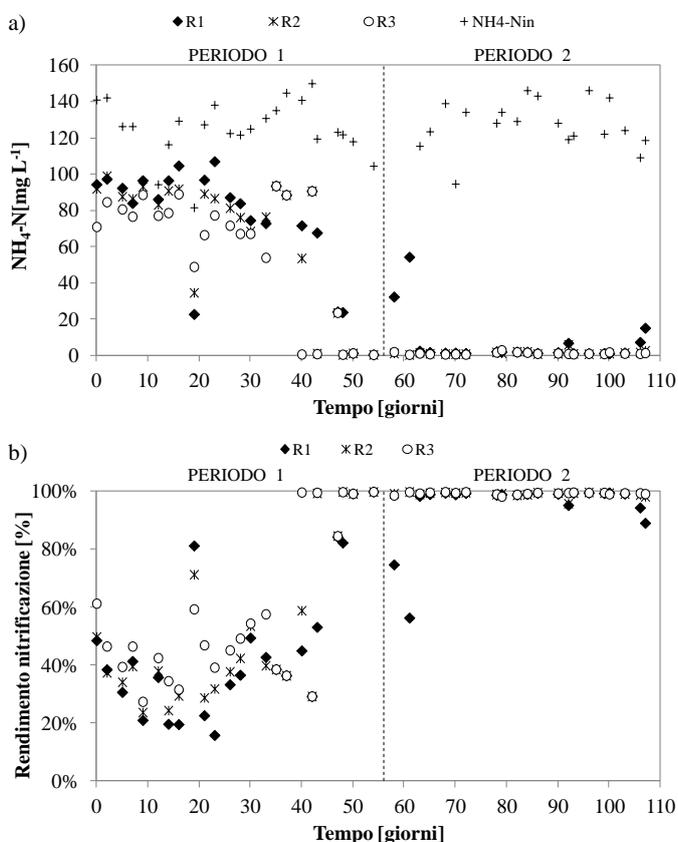
I risultati ottenuti sulla rimozione del COD solubile, e del BOD, evidenziavano come il sistema a biomassa granulare non fosse particolarmente influenzato dal carico organico volumetrico applicato, nel senso che quando i granuli aerobici erano stabili, il sistema era in grado di fornire elevate performance depurative indipendentemente dal carico organico. La riduzione dei rendimenti osservata in particolare in R1 ed R2, è stata associata all'aumento del carico del fango successiva al dilavamento di biomassa verificatosi dopo la degranulazione. In tal senso, operare con valori del carico organico minori, se da un lato comporta maggiori volumi di reazione, dall'altro consente di assicurare di avere rese sufficientemente elevate anche in caso di temporanea destabilizzazione strutturale dei granuli.

Riguardo la rimozione del COD totale, in seguito alla degranulazione del primo periodo, la riduzione dei rendimenti è stata molto più marcata rispetto a quella osservata con riferimento al COD solubile. In particolare, in R1 i rendimenti si sono pressoché dimezzati, passando da circa l'80% a poco più del 40%, in R2 si sono ridotti dall'80% al 50%, mentre in R3 dall'80% a poco più del 60%. I valori del COD allo scarico in condizioni stazionarie erano compresi tra i 200 e i 250 mg L<sup>-1</sup>. Tali risultati erano associati alla minore efficienza di rimozione della sostanza organica particolata che, come discusso in precedenza, avveniva mediante un processo di adsorbimento sulla superficie dei granuli e successiva idrolisi. Vendendo a mancare il mezzo adsorbente (i granuli), i rendimenti si sono ridotti in maniera significativa, e tanto più nei reattori in cui il carico era maggiore. Con la ripresa del processo di granulazione nel secondo periodo, i rendimenti sono aumentati in maniera piuttosto costante in tutti e tre i reattori, e si sono mantenuti stabili su valori compresi tra l'80 e l'85% fino al termine del periodo osservato. I rendimenti in condizioni stazionarie mostravano inoltre come il reattore R3 fornisse rendimenti leggermente superiori rispetto agli altri due impianti, seppur di qualche punto percentuale. La ragione di questo risultato potrebbe essere da un lato il minore valore del carico applicato, e dall'altro la minore dimensione media dei granuli, che comportava che questi avessero una maggiore superficie specifica e di conseguenza una maggiore capacità adsorbente nei confronti della sostanza organica particolata.

La stabilità dei granuli ha dunque in maniera significativa influenzato le performance di rimozione della sostanza organica e, in particolar modo, di quella di natura particolata. Il raggiungimento di performance soddisfacenti e, quindi, tali da garantire il rispetto degli standard normativi in materia di scarico, passa necessariamente attraverso l'ottenimento di granuli strutturalmente stabili. Ragion per cui, appurato che i sistemi a fanghi granulari siano in grado di fornire elevate performance indipendentemente dal carico organico applicato, la stabilità strutturale dei granuli diviene il reale collo di bottiglia dell'intero sistema.

## 7.5 Rimozione dell'azoto

In Figura 7.11 sono riportati gli andamenti delle concentrazioni di azoto ammoniacale nell'influyente ed effluente (Fig. 7.11a) e dei rendimenti di nitrificazione (Fig. 7.11b).

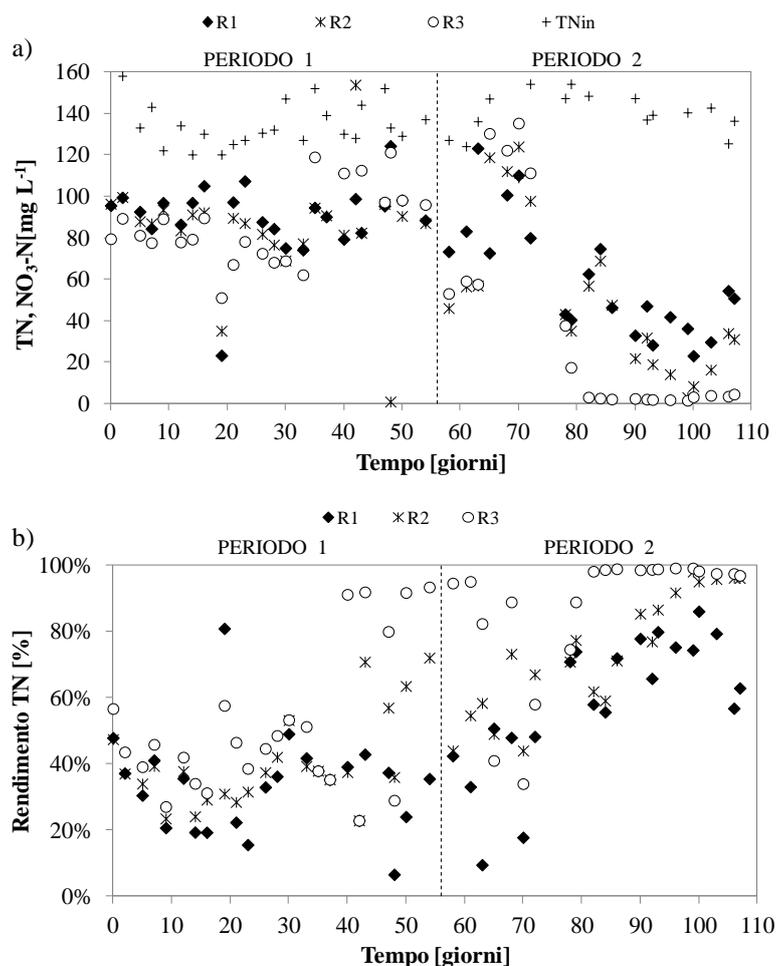


**Fig.7.11:** Andamento delle concentrazioni di azoto ammoniacale nell'influyente e negli effluenti di R1, R2 ed R3 (a) e rendimenti di nitrificazione (b) in R1, R2 ed R3.

Come è possibile osservare dal grafico in figura 7.11a, la concentrazione di azoto ammoniacale nell'effluente è risultata essere elevata per quasi tutta la durata del primo periodo. Risultati analoghi sono stati riportati anche da altri autori in letteratura (**Lochmatter and Holliger, 2014**), i quali osservarono che l'acclimatazione dei batteri nitrificanti in un sistema a biomassa granulare è un processo alquanto lento e si verifica solo dopo la formazione dei granuli, che consentono di ottenere un maggior tasso di ritenzione della biomassa all'interno del reattore. Al termine del primo periodo, nonostante il dilavamento di biomassa verificatosi in seguito allo sfaldamento dei granuli, la concentrazione di azoto ammoniacale allo scarico era prossima a  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , e i rendimenti di nitrificazione (Fig.7.11b) prossimi all'unità. Gli stessi risultati si sono osservati anche nel secondo periodo sperimentale e si sono mantenuti costanti per tutta la durata del periodo stesso. Tale risultato è apparentemente in contrasto con quanto osservato nei precedenti paragrafi, con riferimento allo sfaldamento dei granuli e al dilavamento di biomassa. Tuttavia, è importante sottolineare che, intanto non si è avuta una totale degranulazione del fango e una percentuale di granuli compresa tra il 20 e il 30% dell'intero volume del fango era costituito da granuli, inoltre, che nonostante il dilavamento della biomassa (prevalentemente quella fioccosa) il valore dell'età del fango era comunque nell'ordine degli 8-10 giorni. Infine, poiché la popolazione autotrofa si sviluppa non tanto negli strati più esterni dei granuli, dove sono maggiormente presenti i batteri eterotrofi, quanto in quelli immediatamente più all'interno, il loro dilavamento si è verificato in misura minore rispetto a quello della biomassa eterotrofa, in quanto lo sfaldamento ha riguardato in maniera maggiore gli strati più esterni del granulo, salvaguardando in tal modo il mantenimento di una buona frazione di biomassa autotrofa.

La stabilità dei granuli ha invece avuto effetti significativi sui rendimenti di denitrificazione e quindi sulla rimozione dell'azoto totale. In Figura 7.12a e b sono mostrati rispettivamente le concentrazioni di azoto totale nell'influenza e delle forme ossidate dell'azoto nell'effluente, e i rendimenti di rimozione dell'azoto totale nei tre reattori.

Come è possibile osservare dalla Figura 7.12a, durante il primo periodo la concentrazione di azoto totale nell'effluente era prossima ai  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , in tutti e tre i reattori. I rendimenti di rimozione dell'azoto totale sono risultati mediamente pari al 35-40% e per lo più addebitabili ai processi di sintesi della biomassa eterotrofa. Come discusso in precedenza, i rendimenti di nitrificazione sono iniziati ad aumentare in maniera significativa solo dopo il 35° giorno, a partire dal quale la principale forma di azoto nell'effluente era quella nitrica. In ragione di tali risultati si può dedurre che sebbene nella seconda parte del primo periodo l'azoto ammoniacale venisse interamente ossidato ad azoto nitrico in tutti e tre i reattori, i processi di denitrificazione non avevano luogo, ovvero erano piuttosto limitati, e di conseguenza l'azoto totale influente subiva un semplice processo ossidativo.



**Fig.7.12:** Andamento delle concentrazioni di azoto totale nell'influente e negli effluenti di R1, R2 ed R3 (a) e rendimenti di rimozione dell'azoto totale (b) in R1, R2 ed R3.

L'instabilità dei granuli osservata in questo periodo non ha consentito quindi lo sviluppo di uno strato anossico sufficientemente spesso da garantire elevate performance di denitrificazione. È altresì possibile che, poiché la denitrificazione in un sistema a biomassa granulare avviene durante la fase di *famine* simultaneamente alla nitrificazione, la fonte di carbonio per il processo di denitrificazione stesso fosse quella endogena, e ciò determinava un significativo rallentamento delle cinetiche batteriche. Come si dirà nei paragrafi successivi, nel primo periodo la fase di *famine* aveva una durata piuttosto limitata e questo,

congiuntamente alla ridotta percentuale di granuli, per altro di piccole dimensioni, ha comportato che l'efficienza di denitrificazione risultasse molto modesta.

Nel secondo periodo, man mano che il processo di granulazione riprendeva, i rendimenti di rimozione dell'azoto totale sono aumentati fino ad attestarsi intorno ad un valore stazionario al termine del periodo osservato. In particolare è interessante osservare come i rendimenti di rimozione dell'azoto totale, in condizioni stazionarie, siano risultati inversamente proporzionali al carico organico applicato. Infatti, i rendimenti maggiori sono stati ottenuti in R3, mentre in R2 ed R1 i rendimenti sono risultati progressivamente inferiori. In dettaglio, in R3 i rendimenti sono risultati quasi unitari, mentre in R2 si sono attestati intorno al 95%; in R1 infine, i rendimenti sono risultati minori e prossimi al 70%. Dato che in R1 la concentrazione di azoto ammoniacale allo scarico era prossima allo zero, e quindi l'azoto era prevalentemente nella forma nitrica, la ragione dei bassi rendimenti di rimozione dell'azoto totale può essere addebitata al maggiore carico di azoto nitrico da denitrificare. Infatti, come ribadito in precedenza, la denitrificazione avveniva utilizzando fonti di carbonio endogene e questo ne limitava fortemente le cinetiche, che congiuntamente al maggiore carico di nitrati, non consentiva il raggiungimento di performance più elevate.

Sulla base dei risultati osservati con riferimento alla rimozione dell'azoto, è possibile concludere che la stabilità dei granuli è essenziale per garantire l'ottenimento di elevate performance di rimozione dell'azoto, in quanto la coesistenza di strati aerobici ed anossici garantisce la nitrificazione e la denitrificazione simultanea. Inoltre, operare con carichi di azoto inferiori, garantisce migliori rendimenti, in quanto le lente cinetiche di denitrificazione limitano la velocità del processo.

## 7.6 Rimozione del fosforo

In Figura 7.13 sono riportati gli andamenti di rimozione del fosforo totale nei tre impianti. Come è possibile osservare dall'analisi del grafico, i rendimenti di rimozione del fosforo sono risultati assai modesti e in gran parte addebitabili ai processi di sintesi della biomassa eterotrofa in entrambi i periodi sperimentali. La causa di tali risultati non è univoca e le ragioni possono essere molteplici. Intanto, lo sviluppo dei batteri responsabili della rimozione del fosforo (PAO) richiede lunghi tempi di acclimatazione, anche maggiori a quelli necessari per l'acclimatazione dei ceppi autotrofi (**Lochmatter et al., 2013**). Le ridotte dimensioni dei granuli per gran parte della sperimentazione inoltre, non hanno consentito lo sviluppo di un ambiente anaerobico al loro interno, il che potrebbe aver limitato lo sviluppo dei suddetti microrganismi. La durata della fase di alimentazione in condizioni non aerate, pari a 45 minuti, non è risultata per altro sufficiente a garantire l'instaurarsi di condizioni anaerobiche nei reattori, stante la

presenza dei nitrati, derivanti dal ciclo precedente, che rendeva l'ambiente anossico anziché anaerobico. Di conseguenza, lo sviluppo dei batteri PAO era verosimilmente ostacolato da quello di un ceppo batterico a loro concorrente, ovveo i GAO (batteri glicogeno accumulanti) che si sviluppano in ambiente non aerato in presenza di nitrati. Il vantaggio competitivo dei PAO rispetto ai GAO si sarebbe potuto ottenere in due modi: il primo avrebbe comportato un aumento della durata della fase non aerata ad inizio ciclo, che tuttavia, come si dirà in seguito, avrebbe comportato ulteriori gravi danni strutturali ai granuli, mentre il secondo avrebbe richiesto l'ottenimento di condizioni stazionarie in termini di rimozione dell'azoto. Infatti, se la denitrificazione si fosse completata a fine ciclo, la fase non aerata iniziale sarebbe in condizioni anaerobiche anziché anossiche, tali quindi da permettere l'acclimatazione dei batteri PAO. Ciò si è verificato solo parzialmente in R2 ed R3 al termine del secondo periodo, ma è possibile che l'acclimatazione dei batteri PAO richiedesse tempi più lunghi e possibilmente granuli più grandi, nei quali la presenza di uno strato anaerobico sufficientemente grande favorirebbe lo sviluppo dei PAO stessi.

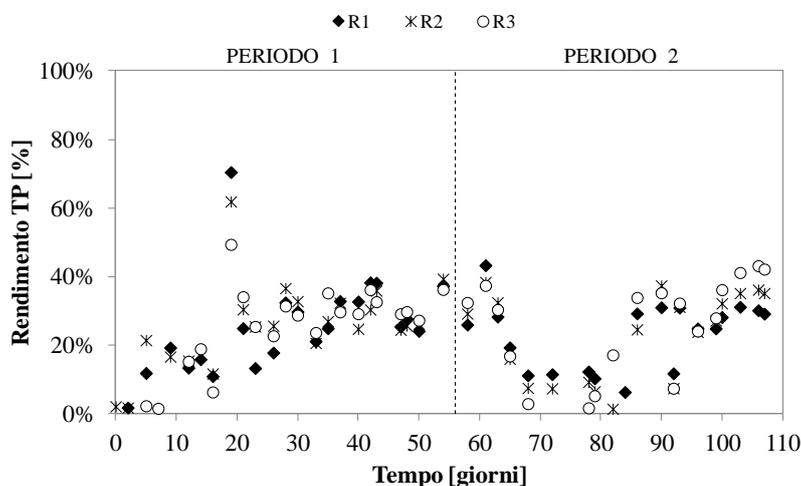
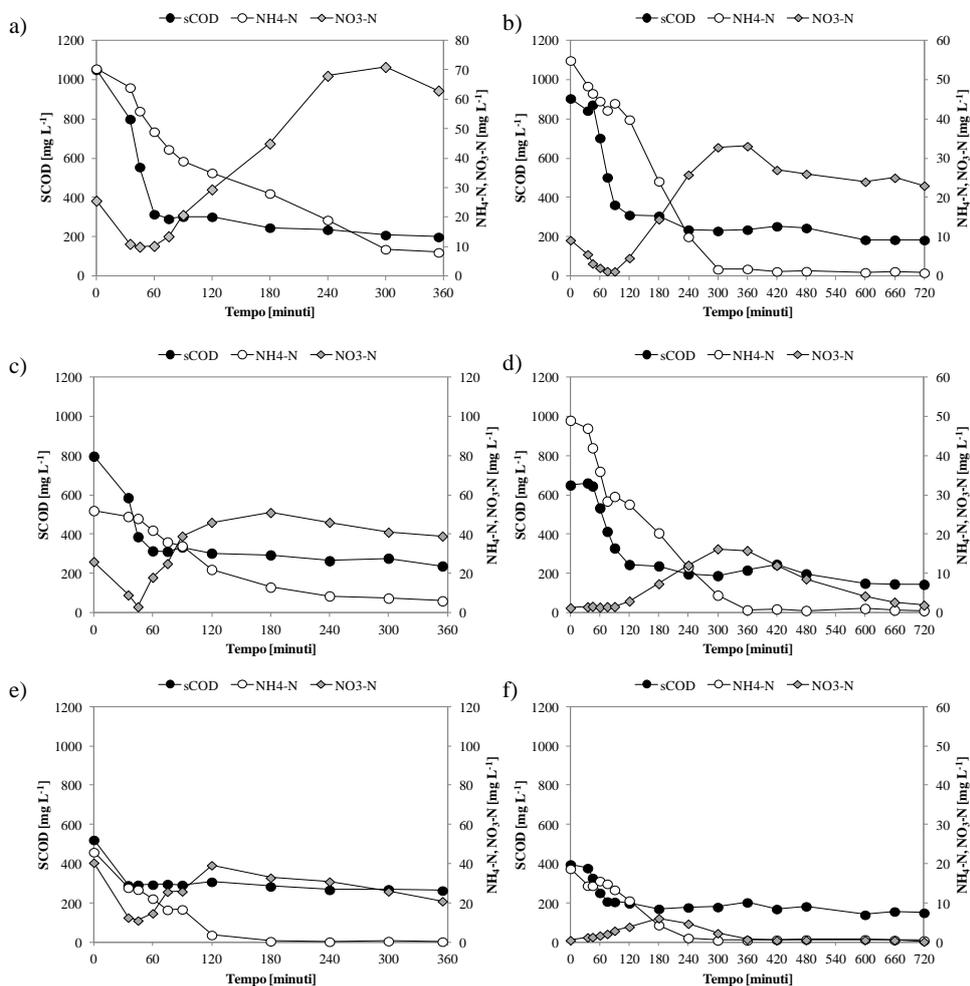


Fig.7.13: Andamento dei rendimenti di rimozione del fosforo totale in R1, R2 ed R3.

## 7.7 Processo di nitrificazione e denitrificazione simultanea

Nel corso dei due periodi sperimentali sono stati effettuati specifici test per valutare l'andamento delle concentrazioni del COD e delle forme azotate durante il ciclo di reazione. In Figura 7.14, sono riportati i risultati ottenuti per ciascuno dei tre impianti nei due periodi sperimentali. I grafici fanno riferimento ad un ciclo ideale, ottenuto mediando i valori ottenuti nel corso di tutti i test effettuati durante la

sperimentazione, considerando solo i periodi in cui gli impianti si trovavano in condizioni stazionarie. In Figura 7.14a e b, sono riportati i risultati dei test relativi al reattore R1.



**Fig.7.14:** Andamento delle concentrazioni di COD solubile, azoto ammoniacale e nitrico in R1 (a,b), R2 (c,d) ed R3 (e,f) nei due periodi sperimentali.

Dall'analisi dei grafici si osserva come il COD solubile venisse interamente consumato nel corso della prima ora nel primo periodo, e delle prime due ore nel secondo, evidenziando pertanto una riduzione della cinetica di ossidazione della sostanza organica, dovuto presumibilmente alla riduzione del carico organico applicato che ha causato un rallentamento nel metabolismo batterico. In entrambi i

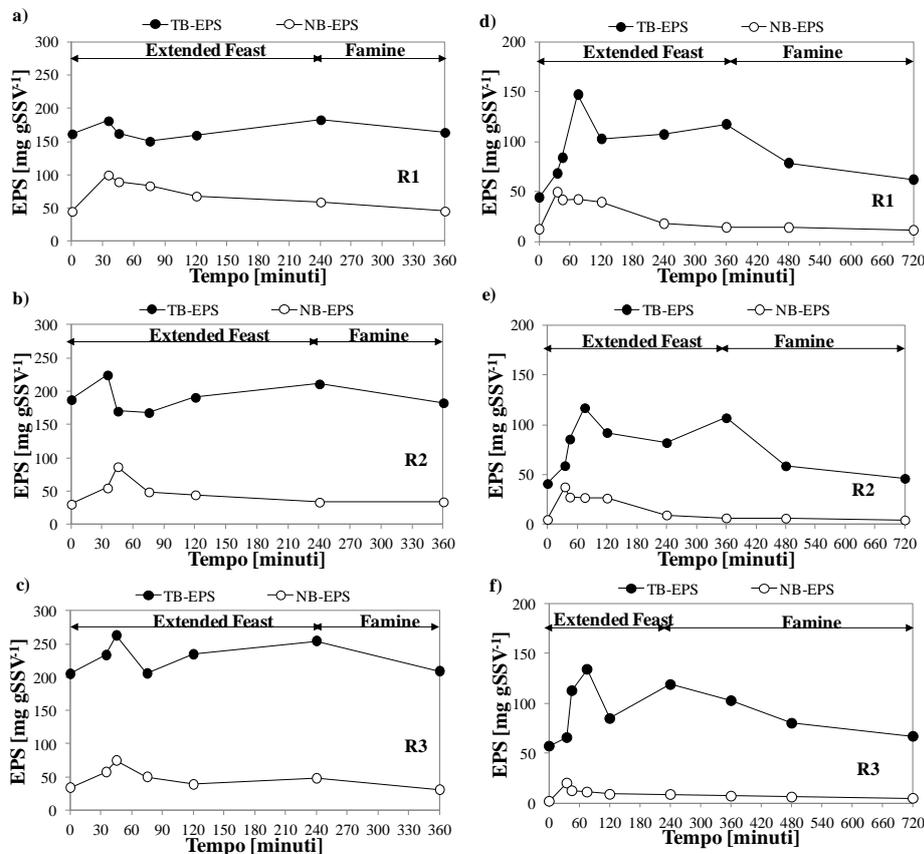
periodi, l'ossidazione dell'ammoniaca avveniva una volta esaurito il COD solubile. Tale risultato sottolineava come all'interno della struttura dei granuli vi fosse competizione tra le popolazioni autotrofe ed eterotrofe per l'ossigeno; infatti, una volta terminato il suo consumo da parte dei batteri eterotrofi, questo era disponibile anche per l'altro ceppo. In entrambi i periodi, la nitrificazione si completava intorno al 300° minuto (5 ora). Osservando il profilo di concentrazione dei nitrati riportato in Figura 7.14a e b, si osserva come questo inizialmente cresceva con una pendenza simile a quella di scomparsa dell'ammoniaca, e successivamente tale pendenza si andava riducendo sebbene quella dell'ammonio rimanesse costante. Questo cambio di pendenza è associabile all'inizio del processo di nitrificazione e denitrificazione simultanea, che comportava il fatto che i nitrati prodotti dal processo di nitrificazione venissero simultaneamente ridotti negli strati più interni dei granuli. Terminata la nitrificazione, si verificava la sola denitrificazione, e la concentrazione di nitrati si riduceva seppure con una cinetica alquanto modesta. La cinetica di denitrificazione si è mantenuta pressoché costante anche nel secondo periodo, dove la maggiore durata del ciclo, ha consentito di ottenere minori concentrazioni di nitrati nell'effluente.

In Figura 7.14c e 7.14d sono riportati gli stessi risultati finora discussi relativamente al reattore R2. In linea di massima è possibile fare le stesse osservazioni già fatte con riferimento a R1. In questo caso tuttavia, sono emerse significative differenze tra i due periodi sperimentali. Infatti, se nel primo periodo la scomparsa dell'ammoniaca coincideva con un'equivalente comparsa di nitrati, nel secondo periodo tale circostanza non si è più verificata. Tale risultato evidenziava il fatto che nel secondo periodo il processo di nitrificazione e denitrificazione simultanea avvenisse con maggiore efficacia. Ciò ha naturalmente comportato migliori performance di rimozione dell'azoto totale che si sono attestati su valori dell'ordine del 95%. Considerazioni del tutto analoghe possono essere fatte con riferimento al terzo reattore (Fig.7.14e,f). Sulla base dei risultati ottenuti è possibile osservare che la stabilità dei granuli ottenuta nel secondo periodo ha consentito di ottenere una buona stratificazione degli aggregati, che per tanto, riuscivano a fornire ottimi rendimenti di rimozione dell'azoto soprattutto in R2 ed R3.

## 7.8 Analisi del contenuto di EPS durante il ciclo

Il contenuto di EPS per unità di concentrazione di solidi volatili è stato misurato durante il ciclo di reazione in entrambi i periodi sperimentali. I campioni venivano prelevati con maggiore frequenza all'inizio del periodo, fino al completo esaurimento del COD solubile e, successivamente, con una minore frequenza, stante che la minore disponibilità di substrato solubile riduceva il tasso di produzione delle EPS stesse. In Figura 7.15 sono riportati gli andamenti delle

concentrazioni di EPS legate (TB-EPS) e non legate (NB-EPS) durante un ciclo caratteristico nei due periodi sperimentali in ciascuno dei tre reattori.



**Fig.7.15:** Andamento nel ciclo del contenuto di EPS legate (TB-EPS) e non legate (NB-EPS) in R1, R2 ed R3 nel primo (rispettivamente a,b,c) e secondo periodo (d,e,f).

Durante il primo periodo (Fig.7.15a,b,c) nel profilo delle TB-EPS, sono stati osservati due distinti trend crescenti. All’inizio infatti, il contenuto di TB-EPS aumentò fino al 45° minuto del ciclo, e tale incremento era dovuto alla conversione del COD solubile in prodotti di stoccaggio extracellulari. Successivamente, un altro trend crescente è stato dal 75° minuto fino alla 4<sup>a</sup> ora del ciclo, e tale incremento era verosimilmente dovuto alla conversione dei prodotti derivanti dall’idrolisi del COD particolato in EPS legate. Dopo la 4<sup>a</sup> ora, il contenuto di TB-EPS iniziò a diminuire in quanto i batteri, in assenza di substrato, iniziavano a degradare le EPS per il loro metabolismo. Questa fase segnava l’inizio della fase di *famine*, che

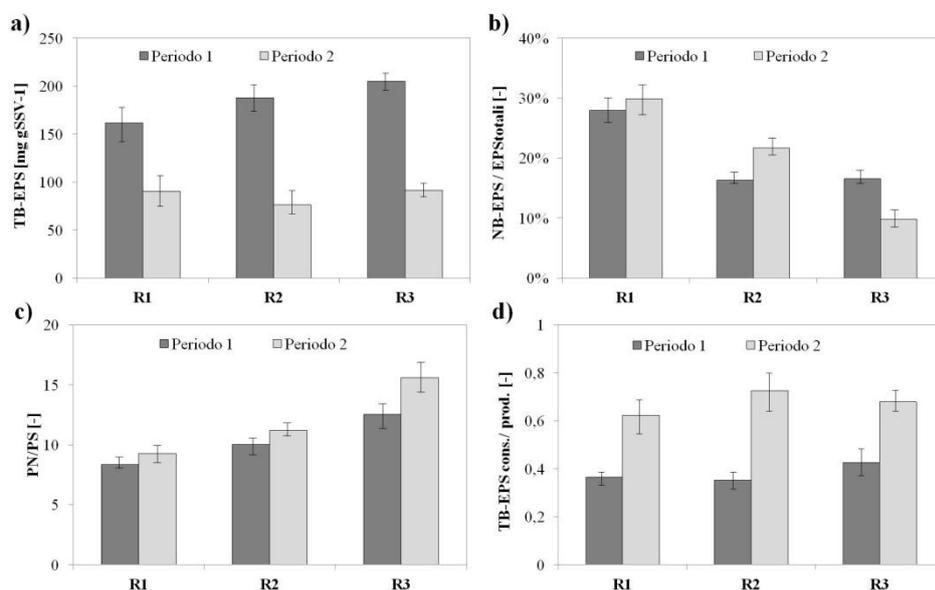
pertanto, almeno nel primo periodo sperimentale, aveva una durata prossima alle 2 ore. Nel primo periodo quindi, il profilo di concentrazione delle TB-EPS ha rivelato una breve durata della fase di inedia, e una durata della fase di *feast* prossima alle 4 ore. In generale, la durata della fase di *feast* è stata nell'ordine del 20-30% della durata del ciclo (López-Palau et al., 2012). Durante il primo periodo, la fase di *feast* durava circa il 60% del ciclo di reazione e ciò spiegava lo sbilanciamento della durata delle fasi di *feast* e *famine* che ha causato la destabilizzazione dei granuli. La breve durata della fase di *famine* infatti non ha consentito di poter realizzare un vantaggio per lo sviluppo dei batteri fioccoformatori a scapito dei filamentosi, causando di conseguenza la formazione di strutture molto irregolari ed instabili. In Figura 7.15a,b,c il profilo delle EPS non legate (NB-EPS) evidenziava un graduale aumento durante la fase di alimentazione anaerobica in tutti e tre i reattori, derivante presumibilmente dall'idrolisi delle EPS legate. In letteratura è riportato che le condizioni anaerobiche possono influenzare in maniera significativa la produzione di EPS (Sheng et al., 2010), in quanto in assenza di ossigeno i fiocchi di fango attivo tendono a deteriorarsi in seguito all'idrolisi delle EPS. Di conseguenza, un incremento della frazione non legata delle EPS nei granuli aerobici può comportare gravi problemi di instabilità degli aggregati stessi. Per tali ragioni, la durata della fase di alimentazione anaerobica è stata mantenuta costante anche nel secondo periodo sperimentale.

Durante il secondo periodo (Fig.7.15d,e,f), nei profili di concentrazione delle TB-EPS sono stati evidenziati gli stessi trend osservati nel precedente periodo. La fase di *feast* "estesa" aveva in questo caso una durata prossima alle 6 ore in R1 ed R2, mentre in R3 è risultata all'incirca pari a 4 ore, mentre la fase di *famine* durava circa 6 ore in R1 ed R2, mentre 8 ore in R3. Rispetto al precedente periodo, in questo caso è stata osservata una maggiore differenza tra il valore più basso e più alto di EPS nel ciclo, indicando pertanto che una maggiore durata della fase di inedia stimola la produzione di una maggiore quantità di polimeri extracellulari. Le differenti condizioni operative e in particolare la maggiore durata del ciclo di reazione, hanno consentito di ottenere un migliore bilanciamento della durata delle fasi di *feast* e *famine* durante il ciclo che a sua volta, ha consentito di ottenere granuli strutturalmente stabili che si sono mantenuti integri per tutta la durata della sperimentazione.

## 7.9 Caratterizzazione e composizione delle EPS

Le EPS, come detto nel precedente paragrafo, sono state frazionate nella componente legata (TB-EPS) e non legata (NB-EPS). In generale, le EPS hanno diverse funzioni all'interno della struttura del granulo (Yan et al., 2015), infatti le TB-EPS sono responsabili della struttura e della morfologia del granulo, mentre la frazione non legata (NB-EPS) influenza le proprietà della sola superficie del

granulo e non ha alcun ruolo strutturale (Sheng et al., 2010). In Figura 7.16a sono mostrate le concentrazioni medie delle TB-EPS nei tre reattori in entrambi i periodi.



**Fig.7.16:** Contenuto medio delle EPS specifiche legate (a); rapporto tra EPS non legate e totali (b), rapporto tra proteine e carboidrati (c) e consumo delle EPS legate (d) in R1, R2 ed R3.

Come è possibile osservare, all'interno dello stesso periodo non è stato evidenziato un legame significativo tra il contenuto specifico di EPS e il carico organico. Nel primo periodo, il contenuto medio di EPS variò tra i 160 mgEPS gSSV<sup>-1</sup> (R1) e i 200 mgEPS gSSV<sup>-1</sup> (R3), indicando un lieve trend crescente al diminuire del carico organico, legame che tuttavia non è stato confermato nel secondo periodo, dove, il contenuto specifico di EPS risultò confrontabile in tutti e tre i reattori e compreso tra i 75 mgEPS gSSV<sup>-1</sup> (R2) e i 90 mgEPS gSSV<sup>-1</sup> (R3). Confrontando i risultati ottenuti nei due periodi, è emerso che nel secondo si è avuta una sensibile riduzione del contenuto di EPS pari a circa il 50%. Dato che ne in letteratura, ne in questo studio non è stato evidenziato alcun legame tra la produzione di EPS e il carico organico, che nel secondo periodo si è dimezzato, è possibile che la riduzione del contenuto di EPS sia stato dovuto alla maggiore durata della fase di inedia, all'interno della quale le EPS venivano utilizzate come fonte di carbonio per dai batteri. Come già discusso nel precedente paragrafo, è stato osservato che durante la fase di *famine* si osservava una riduzione del contenuto di EPS che è

risultato di entità maggiore rispetto al primo periodo per via della maggiore durata di tale fase.

In Figura 7.16b è mostrato il rapporto tra la frazione di EPS non legate sul totale delle EPS stesse (NB-EPS/EPS). In entrambi i periodi la frazione di EPS non legate aumentò al crescere del carico organico e in particolare, in R1 essa risultò pari a circa il 30% delle EPS totali, mentre risultò rispettivamente pari al 20% e al 12% in R2 ed R3. I risultati ottenuti suggerivano quindi che la frazione di EPS non legate aumentava al crescere del carico organico. Tale correlazione è verosimilmente legata all'attività metabolica delle popolazioni batteriche che risultava maggiore nel caso dei reattori operanti ad alto carico e che causava una maggiore idrolisi delle EPS legate durante la fase di inedia aerobica. Le differenti condizioni operative nel secondo periodo causarono un ulteriore incremento delle NB-EPS in R1 ed R2, mentre queste si ridussero in R3.

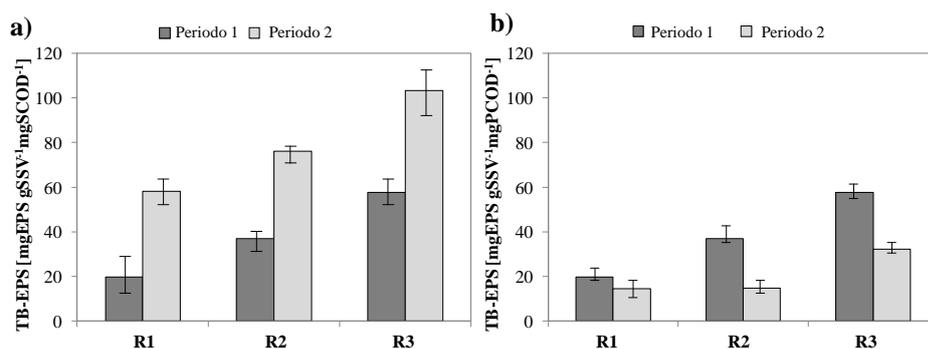
In Figura 7.16c è mostrata la composizione media delle EPS nei tre reattori in entrambi i periodi studiati. Come è possibile osservare, il contenuto di proteine (PN) è risultato essere preponderante rispetto a quello dei carboidrati (PS), e il rapporto PN/PS è risultato compreso tra 8 e 15. In questo caso è stato osservato un doppio legame con le condizioni operative, e in particolare, si è visto come il rapporto PN/PS aumentasse sia al crescere della durata del ciclo che al diminuire del carico organico. Un elevato valore di tale rapporto è stato dimostrato essere un fattore cruciale per la stabilità dei granuli, in quanto le proteine aumentano l'idrofobicità cellulare del fango e di conseguenza il potere di auto-adesione cellulare alla base del processo di granulazione (**Zhang et al., 2011**). Dal punto di vista strutturale quindi, i granuli ottenuti nel reattore R3 risultarono essere quelli dotati delle migliori caratteristiche fisiche.

In Figura 7.16d è mostrato il rapporto tra la quantità di EPS consumate durante la fase di *famine* e quelle prodotte in quella *feast*. Nel primo periodo, mediamente il 37% delle EPS veniva consumato dai batteri, indipendentemente dal carico applicato, mentre nel secondo tuttavia come prevedibile a causa dell'aumento della durata del ciclo, tale rapporto aumentò al 68%. In R1 circa il 60% delle EPS veniva consumato durante il periodo di *famine*, mentre in R2 ed R3 il consumo fu leggermente maggiore (circa il 70%), evidenziando un legame inversamente proporzionale al carico organico.

Nel complesso, il reattore operante con un carico organico più basso (R3) ha mostrato un minore contenuto di EPS non legate e di conseguenza un maggiore contenuto di EPS legate, costituite in prevalenza da proteine. Tale evidenza suggerisce che le condizioni di inedia "estesa" e bassi valori del carico volumetrico risultano essere fattori decisivi per ottenere granuli strutturalmente stabili e quindi adatti al trattamento di reflui industriali.

### 7.10 Conversione del substrato organico in EPS

Le EPS sono sostanze prodotte dal metabolismo batterico e vengono secrete all'esterno della parete cellulare da parte dei batteri eterotrofi che hanno la capacità di convertire il substrato organico sottoforma di polimeri. Molti sono i fattori che influenzano la produzione di EPS, quali la disponibilità di substrato, la forma con cui questo è presente (solubile o particolata), condizioni operative (VLR), ecc. (Zhu et al., 2012). Come precedentemente discusso al paragrafo 7.8, durante il ciclo sono state osservate due differenti fasi in cui le EPS venivano prodotte. La prima, durava dall'inizio del ciclo e terminava al 45° minuto nel periodo 1 e dopo circa il 75° minuto nel secondo periodo, mentre la seconda si collocava all'incirca a metà del ciclo di reazione. L'analisi degli andamenti delle concentrazioni di COD nel ciclo hanno permesso di evidenziare come la prima fase di produzione delle EPS coincideva con la scomparsa del COD solubile, mentre la seconda con quella del COD particolato lentamente biodegradabile. Quest'ultimo, essendo prima adsorbito sulla superficie dei granuli e quindi lentamente idrolizzato, costituiva, come già discusso, una lenta ma continua fonte di substrato che veniva utilizzato dai batteri per produrre ulteriori riserve extracellulari. In Figura 7.17 sono mostrate le quantità di EPS specifiche per unità di COD, solubile (Fig.7.17a) e particolato (Fig. 7.11b), rimosso.



**Fig.7.17:** Produzione di EPS specifiche per unità di COD solubile (a) e di COD particolato (b) rimosso.

La quantità di COD solubile convertito in EPS aumentò al crescere della durata del ciclo e al diminuire del carico organico. Nel primo periodo, la produzione di TB-EPS risultò infatti minima in R1 (20 mgTB-EPS/gVSS<sup>-1</sup>mgSCOD<sup>-1</sup>), mentre essa fu molto maggiore in R3 (60 mgTB-EPS/gVSS<sup>-1</sup>mgSCOD<sup>-1</sup>) e si attestò su un valore intermedio in R2 (35 mgTB-EPS/gVSS<sup>-1</sup>mgSCOD<sup>-1</sup>). Nel secondo periodo,

il legame con il carico organico è stato confermato e, inoltre, la quantità di TB-EPS prodotte per unità di COD solubile rimosso aumentarono in maniera sensibile.

I risultati ottenuti suggeriscono come sia l'aumento della durata della fase di *famine* che la riduzione del carico organico promuovevano una maggiore conversione del substrato organico in prodotti di stoccaggio, ovvero un maggiore sviluppo di batteri fiocco-formatori. In condizioni di inedia prolungata (secondo periodo), i microrganismi presenti all'interno dei granuli producevano una maggiore quantità di prodotti di stoccaggio per sostenere la loro attività metabolica durante i lunghi periodi di scarsità di fonti di carbonio esterne.

Le EPS prodotte per unità di COD particolato rimosso confermavano che nel reattore R3 la capacità di creare prodotti di stoccaggio era maggiore rispetto agli altri due reattori. Il processo di adsorbimento che coinvolge il substrato organico di natura particolata è infatti funzione della superficie specifica dei granuli, che risultavano più piccoli in R3 e di conseguenza caratterizzati da una maggiore superficie specifica. Di conseguenza, la produzione di EPS sul COD particolato è risultata essere maggiore in R3 dove i granuli avevano dimensioni medie inferiori. Nel secondo periodo, la frazione di COD particolato convertita in prodotti di stoccaggio diminuì in maniera significativa. In questo caso è possibile che la riduzione dell'attività metabolica della biomassa, in seguito alla riduzione del carico organico applicato, abbia ridotto la capacità di idrolisi della frazione organica particolata, risultando appunto nella minore produzione di EPS.

### 7.11 Effetti del bilanciamento delle fasi di *feast* e *famine* sulla stabilità dei granuli

Nel corso della sperimentazione è stato osservato che il fango granulare tendeva a deteriorarsi strutturalmente e a sfaldarsi se la durata della fase di *famine* nel ciclo aveva una durata breve, in rapporto chiaramente alla durata della fase di *feast*. Nel primo periodo sperimentale, si è osservato che la fase di *feast* aveva una durata pari a circa il 65% del ciclo, mentre la fase di *famine* occupava il restante 35%. In letteratura è riportato che la durata della fase di *feast* è all'incirca pari al 20-30% dell'intero ciclo di reazione (**López-Palau et al., 2012**), ed è inoltre noto come una fase di *feast* cosiddetta "estesa" crei notevoli problemi di instabilità nel fango granulare (**de Kreuk et al., 2010; Wagner et al., 2015**). Gli effetti della non uniforme distribuzione delle fasi di *feast* e *famine* sono stati osservati anche in questo studio, in particolare nel primo periodo, quando i granuli hanno evidenziato notevoli carenze strutturali e si sono col tempo sfaldati. Un'eccessiva durata della fase di *feast* comporta che il substrato organico è a disposizione della biomassa per un tempo maggiore. Questa condizione non è favorevole allo sviluppo di quei batteri capaci di accumulare il substrato organico sottoforma di polimeri intra ed

extra-cellulari, ovvero i batteri fiocco-formatori, a scapito naturalmente dei batteri filamentosi, la cui proliferazione ha ed ha avuto gravi effetti sulla destabilizzazione dei granuli. In letteratura è riportato che la strategia ottimale per ottenere una granulazione stabile sia la selezione di batteri a lenta crescita (GAO e PAO), che si ottiene assicurando una lunga fase di alimentazione in condizioni anaerobiche, in modo che, in questa fase, tutta la sostanza organica si esaurisca facendo quindi in modo che gli altri ceppi batterici non abbiano sufficiente substrato nella fase di aerazione successiva. Tuttavia, nel caso di reflui industriali, la presenza di importanti quantità di substrati lentamente biodegradabili, fa sì che la durata di questa fase risulti eccessivamente lunga. Come è stato dimostrato in questo studio, durante questa fase si ha un aumento della concentrazione delle EPS non legate, che derivano dall'idrolisi di quelle legate, che hanno un ruolo chiave nel mantenimento strutturale dei granuli. La durata della fase di *feast* "estesa" non può essere modificata in quanto essa dipende sia dalla concentrazione di substrato organico nell'influenza e dalle cinetiche di degradazione del substrato stesso che dipendono dall'attività metabolica della biomassa eterotrofa. Il corretto bilanciamento della durata delle fasi di *feast* e *famine* può essere quindi regolato scegliendo in maniera opportuna la durata del ciclo e il valore del carico organico alimentato. Nel secondo periodo, l'aumento della durata del ciclo ha comportato di fatto l'aumento della durata della sola fase di *famine*. In particolare, in R1 ed R2 il rapporto tra la fase di *feast* e *famine* era prossimo al 50%, mentre in R3 era circa il 30%. Tale differenza è presumibilmente la ragione della migliore qualità, in termini morfologico-strutturali, dei granuli di R3. Operare con cicli di durata maggiore e con valori del carico organico minori, comporta quindi un corretto bilanciamento delle fasi di *feast* e *famine* che si traduce in granuli strutturalmente più stabili. Le stesse condizioni, si è visto essere quelle ideali per ottenere elevati rendimenti di rimozione dell'azoto, che naturalmente necessitano anche di granuli strutturalmente stabili.

## 7.12 Conclusioni

In questo studio sono state analizzate le performance biologiche in termini di rimozione del carbonio, azoto e fosforo, di tre sistemi a biomassa granulare nel trattamento di reflui prodotti da un birrificio operanti in differenti condizioni di carico. Inoltre, sono stati studiati gli effetti delle durate delle fasi di *feast* e *famine* sulla stabilità dei granuli aerobici.

Per quanto riguarda la rimozione della sostanza organica, non sono state osservate particolari differenze tra i rendimenti ottenuti nei tre impianti. Quando i granuli erano stabili, i rendimenti di rimozione del COD, sia solubile che totale erano nell'ordine dell'80%, mentre quando si è verificata la degranulazione, i rendimenti si sono ridotti in particolar modo con riferimento al COD totale, a causa della non efficace rimozione della frazione organica particolata che normalmente veniva

adsorbita sulla superficie dei granuli. In condizioni stazionarie, si è osservato che i granuli in R3 erano in grado di rimuovere una quantità leggermente maggiore di COD particolato rispetto a quelli degli altri impianti, a causa della minore dimensione media dei granuli che ne garantiva una maggiore superficie specifica.

Riguardo l'azoto, è stato osservato che i rendimenti più elevati si sono osservati nel secondo periodo nei reattori operanti con un carico minore (R2 ed R3), mentre relativamente al fosforo non si sono ottenuti rendimenti soddisfacenti probabilmente a causa della mancata acclimatazione dei batteri PAO.

Per quanto riguarda la stabilità dei granuli è possibile concludere che nel ciclo di 6 ore i granuli che si sono formati risultavano strutturalmente instabili indipendentemente dal carico organico, a causa del non corretto bilanciamento delle durate delle fasi di *feast* e *famine*. Quando queste sono state bilanciate (secondo periodo) i granuli che si sono formati risultavano maggiormente stabili e inoltre, quelli ottenuti nel reattore operante con un carico minore erano quelli più compatti, presentavano un minore contenuto di EPS non legate e quelle legate erano in prevalenza costituite da proteine. Nel reattore R3 si è infatti riuscito ad ottenere un migliore rapporto delle durate delle fasi *feast* e *famine*, rispettivamente pari al 30% e al 70% della durata del ciclo e questo ha consentito di avere granuli di elevata qualità.

Sulla base dei risultati ottenuti in questa sperimentazione è possibile affermare che per garantire elevate rese di rimozione dei nutrienti e al contempo un fango granulare strutturalmente stabile, è necessario scegliere in maniera adeguata la durata del ciclo di reazione e del carico organico da applicare sulla base delle caratteristiche del refluo influente. Nel caso di reflui prodotti da birrifici, stante la loro particolare natura, risulterebbe conveniente operare con bassi valori del carico e con elevate durate del ciclo di reazione.

## 7.13 Bibliografia

- Abdullah, N., Yuzir, A., Curtis, T.P., Yahya, A., Ujang, Z., 2013. Characterization of aerobic granular sludge treating high strength agro-based wastewater at different volumetric loadings. *Bioresour. Technol.* 127, 181–187.
- Apha, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*, American Public Health Association.
- de Kreuk, M.K., Kishida, N., Tsuneda, S., van Loosdrecht, M.C.M., 2010. Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. *Water Res.* 44, 5929–5938.
- de Kreuk, M.K., Pronk, M., van Loosdrecht, M.C.M., 2005. Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. *Water Res.* 39, 4476–4484.
- Di Bella, G., Torregrossa, M., 2013. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. *Bioresour. Technol.* 142, 706–713.
- Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P., Daufin, G., 2006. Water, wastewater and waste management in brewing industries. *J. Clean. Prod.* 14, 463–471.
- Lochmatter, S., Gonzalez-Gil, G., Holliger, C., 2013. Optimized aeration strategies for nitrogen and phosphorus removal with aerobic granular sludge. *Water Res.* 47, 6187–6197.
- Lochmatter, S., Holliger, C., 2014. ScienceDirect Optimization of operation conditions for the startup of aerobic granular sludge reactors biologically removing carbon, nitrogen, and phosphorous. *Water Res.* 59, 58–70.
- López-Palau, S., Pinto, A., Basset, N., Dosta, J., Mata-Álvarez, J., 2012. ORP slope and feast-famine strategy as the basis of the control of a granular sequencing batch reactor treating winery wastewater. *Biochem. Eng. J.* 68, 190–198.
- Martins, A.M.P., Picioreanu, C., Heijnen, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M., 2004. Three-dimensional dual-morphotype species modeling of activated sludge flocs. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5632–5641.
- Rosman, N.H., Nor Anuar, A., Othman, I., Harun, H., Sulong Abdul Razak, M.Z., Elias, S.H., Mat Hassan, M.A.H., Chelliapan, S., Ujang, Z., 2013. Cultivation of aerobic granular sludge for rubber wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 129, 620–3.
- Sheng, G., Yu, H., Li, X., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 882–894.
- Val del Río, A., Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R., 2013. Stability of Aerobic Granular Biomass Treating the Effluent from A Seafood Industry. *Environ. Res.* 7, 265–276.

- Wagner, J., Weissbrodt, D.G., Manguin, V., Ribeiro da Costa, R.H., Morgenroth, E., Derlon, N., 2015. Effect of particulate organic substrate on aerobic granulation and operating conditions of sequencing batch reactors. *Water Res.* 85, 158–166.
- Wang, S.G., Liu, X.W., Gong, W.X., Gao, B.Y., Zhang, D.H., Yu, H.Q., 2007. Aerobic granulation with brewery wastewater in a sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* 98, 2142–2147.
- Yan, L., Liu, Y., Wen, Y., Ren, Y., Hao, G., Zhang, Y., 2015. Role and significance of extracellular polymeric substances from granular sludge for simultaneous removal of organic matter and ammonia nitrogen. *Bioresour. Technol.* 179, 460–466.
- Yu, Y.C., Gao, D.W., Tao, Y., 2013. Anammox start-up in sequencing batch biofilm reactors using different inoculating sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6057–6064.
- Zhang, H., He, Y., Jiang, T., Yang, F., 2011. Research on characteristics of aerobic granules treating petrochemical wastewater by acclimation and co-metabolism methods. *Desalination* 279, 69–74.
- Zhu, L., Lv, M., Dai, X., Yu, Y., Qi, H., Xu, X., 2012. Role and significance of extracellular polymeric substances on the property of aerobic granule. *Bioresour. Technol.* 107, 46–54.

## Capitolo 8

# Analisi sperimentale sulla stabilità dei granuli aerobici nel lungo periodo

### 8.1 Introduzione e obiettivi dello studio

L'obiettivo di questo capitolo è quello di descrivere e discutere i risultati ottenuti nel corso di una sperimentazione il cui scopo era quello di analizzare il comportamento dei granuli aerobici nel lungo periodo, nonché quello di individuare le cause che portano alla loro perdita di stabilità e le soluzioni atte a garantire il mantenimento della loro integrità strutturale.

È noto che i granuli aerobici raggiunta una certa dimensione, che alcuni autori definiscono critica (**Verawaty et al., 2012**), tendono a sfaldarsi e il materiale risultante dalla loro frammentazione in parte si riaggrega in nuovi granuli (**Pijuan et al., 2011**) mentre la restante parte viene dilavata con l'effluente. Il fenomeno della granulazione a un certo punto si trasforma in un processo dinamico che vede il continuo sfaldarsi e formarsi di nuovi granuli. Ciò chiaramente impedisce il raggiungimento di condizioni stazionarie, a scapito delle performance biologiche del sistema e di conseguenza sulla qualità dello scarico. Secondo alcuni autori la causa della rottura dei granuli è legata sia alla mineralizzazione del nucleo (**Lemaire et al., 2008; Lee et al., 2010**), che all'occlusione (*clogging*) della porosità dei granuli stessi che limita il trasporto diffusivo di nutrienti dal bulk verso l'interno dei granuli e quello inverso dei cataboliti di reazione verso l'esterno. L'instaurarsi di condizioni anaerobiche negli strati più interni e l'accumulo dei prodotti della fermentazione sarebbero, secondo **Zheng et al. (2006)**, le cause della fessurazione dei granuli che ne determinano in extremis lo sfaldamento. **Lu et al. (2012)**, in accordo con **Lemaire et al. (2008)**, ritengono che la causa principale del *clogging* della porosità, che a sua volta porta all'instaurarsi delle condizioni anaerobiche all'interno degli aggregati, siano le EPS, che in quantità molto elevate, a causa della loro prevalente natura idrofobica, limiterebbero la diffusione dei nutrienti all'interno dei granuli causandone la progressiva morte. Tuttavia in letteratura mancano evidenze sperimentali che mostrino effettivamente come l'eccesso di EPS possa determinare la rottura dei granuli. Tra l'altro, le EPS sono considerate sostanze essenziali al fine di ottenere la granulazione del fango attivo,

in quanto è noto che basse quantità di polimeri extracellulari non sono sufficienti per consentire l'aggregazione del fango. Pertanto, sembrerebbe che la stabilità dei granuli aerobici richieda un certo equilibrio in termini di contenuto di EPS. Oltre a variabili come il carico organico, gli sforzi di taglio idrodinamici e la pressione di selezione idraulica, ad incidere sul contenuto di EPS è anche l'alternanza di condizioni di *feast* e *famine*, e più nel dettaglio la durata delle suddette fasi. In genere una maggiore durata del ciclo e, quindi della fase di inedia, stimola i batteri a produrre più EPS (Liu e Tay, 2008), ma al contempo il loro consumo durante la fase di *famine* aumenta per effetto dei lunghi tempi di respirazione in condizioni endogene (Adav et al., 2008).

L'obiettivo di questa parte della tesi è stato quello di valutare gli effetti della durata del ciclo di reazione e del contenuto di EPS sulla stabilità dei granuli sul lungo periodo, focalizzando l'attenzione sul presunto "effetto *clogging*" esercitato dalle EPS stesse.

## 8.2 Materiali e Metodi

Il reattore utilizzato per la sperimentazione era geometricamente identico agli altri utilizzati per quelle già descritte nei precedenti capitoli. L'impianto è stato alimentato con refluo sintetico a base di acetato di sodio secondo la ricetta indicata da Beun et al. (2002).

La sperimentazione ha avuto una durata complessiva di 741 giorni suddivisi in due periodi, distinti soltanto in funzione della durata del ciclo di reazione. Nel primo periodo (0-252° giorno) l'impianto ha operato secondo cicli di 3 ore, di cui 10 minuti di alimentazione, 5 minuti di sedimentazione, 5 minuti di scarico e i restanti 160 minuti di aerazione, mentre nel secondo periodo (253°-741° giorno) la durata del ciclo è stata aumentata a 12 ore, lasciando invariata la durata di tutte le fasi eccetto quella di aerazione che è stata incrementata fino a 700 minuti. In entrambi i periodi dunque la pressione di selezione idraulica era la stessa ( $4,8 \text{ m h}^{-1}$ ), così come gli sforzi di taglio idrodinamici ( $2,4 \text{ cm s}^{-1}$ ), il carico organico volumetrico ( $3,6 \text{ kgCOD m}^{-3}\text{d}^{-1}$ ), il rapporto tra carbonio e azoto nell'alimento (10:1) e il rapporto di scambio volumetrico (50%). Poiché lo studio era finalizzato a valutare l'effetto *clogging* causato dalle EPS, alcuni parametri operativi quali la pressione di selezione idraulica, il carico organico e gli sforzi di taglio idrodinamici sono stati scelti in modo da massimizzare la loro produzione (Zhu et al., 2012b).

Le metodiche analitiche utilizzate per le analisi sono le stesse descritte nei precedenti capitoli. Più nel dettaglio, le analisi sulle EPS sono state eseguite su campioni di miscela aerata prelevati in due momenti ben precisi del ciclo, ovvero alla fine della fase di *feast* e di quella di *famine*. La fine della fase di *famine* coincideva con la fine della fase di aerazione, mentre la fine della fase di *feast* coincideva con la fine del gradino nel profilo di concentrazione dell'ossigeno

dovuto alla degradazione di gran parte del substrato organico alimentato. La fine di questa fase veniva per tanto determinata monitorando la concentrazione di ossigeno nel bulk (**Di Bella e Torregrossa, 2013**). Sul campione di miscela aerata prelevato, si determinava il contenuto di EPS e sul surnatante veniva fatta un'analisi di COD, per valutare il consumo di substrato organico in suddetta fase e al contempo per determinare la velocità di ossidazione del substrato organico in questa fase. Periodicamente la concentrazione di ossigeno è stata monitorata per tutto il ciclo, al fine di evidenziare eventuali variazioni del consumo dell'ossigeno al progredire del processo di granulazione. Riguardo le misure granulometriche, oltre al calcolo del diametro medio dei granuli, è stata costruita la curva granulometrica e da questa si sono ricavati i valori dei percentili al 10, 60 e 90%. Tali parametri indicati come  $d_{10}$ ,  $d_{60}$  e  $d_{90}$  rappresentano rispettivamente il diametro cui corrisponde una percentuale di particelle di dimensioni maggiori rispettivamente del 10%, 60% e 90%. Tali parametri forniscono utili informazioni riguardo la natura del fango in termini di eterogeneità delle dimensioni dei granuli (**Winkler et al., 2012**). Ad esempio il  $d_{90}$  è il diametro della distribuzione per il quale il 90% di particelle hanno dimensioni superiori a quel diametro stesso. Le osservazioni microscopiche per l'analisi morfologica dei granuli sono state effettuate tramite uno stereomicroscopio, con ingrandimento pari a 7x.

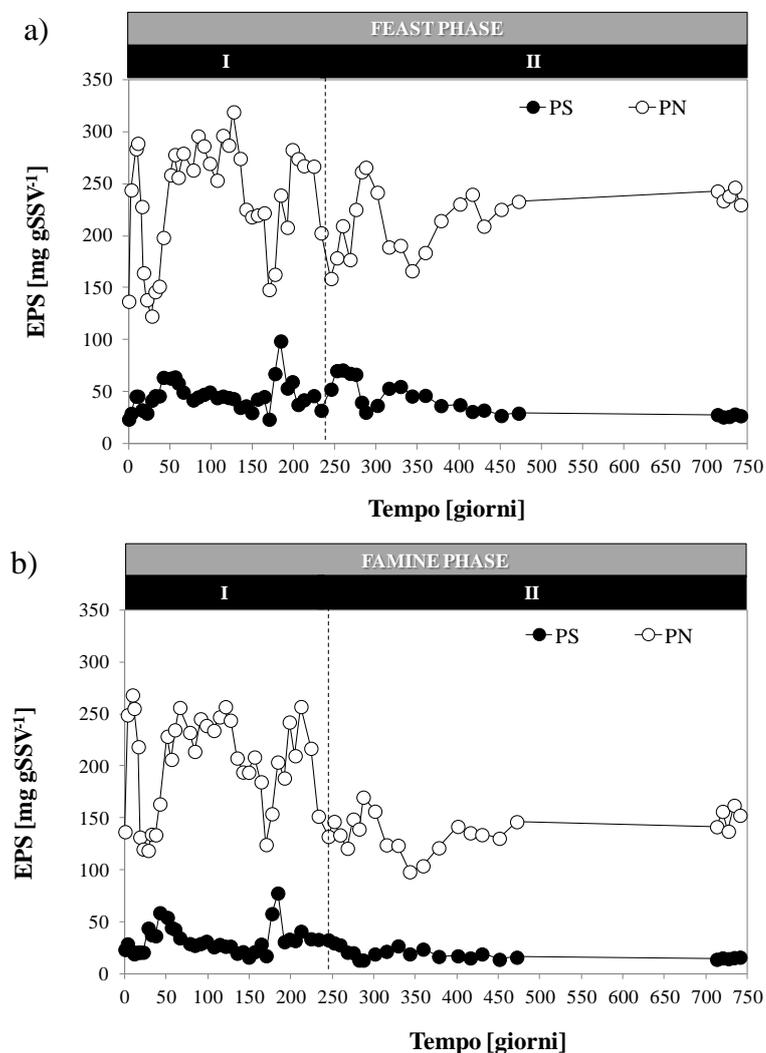
### 8.3 Risultati e Discussioni

Nei successivi paragrafi sono mostrati e discussi i risultati ottenuti nei due periodi sperimentali, con riferimento alle caratterizzazione fisica dei granuli e alle performance biologiche.

#### 8.3.1 Analisi del contenuto di EPS

Il contenuto di EPS nei granuli è stato determinato sia al termine della fase di *feast* che di *famine*. In questo modo è stato possibile valutare sia il consumo di EPS durante la fase di inedia (*famine*), che la loro produzione durante la fase di abbondanza di substrato (*feast*). Nel primo periodo sperimentale, il contenuto di EPS, e delle proteine (PN) in particolare, valutate al termine della fase di *feast*, ha subito delle periodiche oscillazioni (Fig. 8.1a). Il contenuto di carboidrati (PS) si è mantenuto pressoché costante, per cui nel seguito quando si indica la variazione di EPS, si fa riferimento prevalentemente alla variazione del contenuto di proteine. All'inizio del periodo, in concomitanza con l'avvio del processo di granulazione, si osservò un sensibile incremento del contenuto di EPS, dovuto all'adattamento dei batteri alle nuove condizioni operative, alla pressione di selezione idraulica e biologica e, in generale, alle condizioni di stress imposte dal sistema. Come riportato da altri autori (**Zhu et al., 2012a**), nella fase iniziale del processo di

granulazione, i batteri adattano il loro metabolismo alle nuove condizioni ambientali, e in ragione dello stress metabolico cui sono soggetti, producono una maggiore quantità di polimeri extracellulari per l'adattamento alle condizioni ambientali avverse.



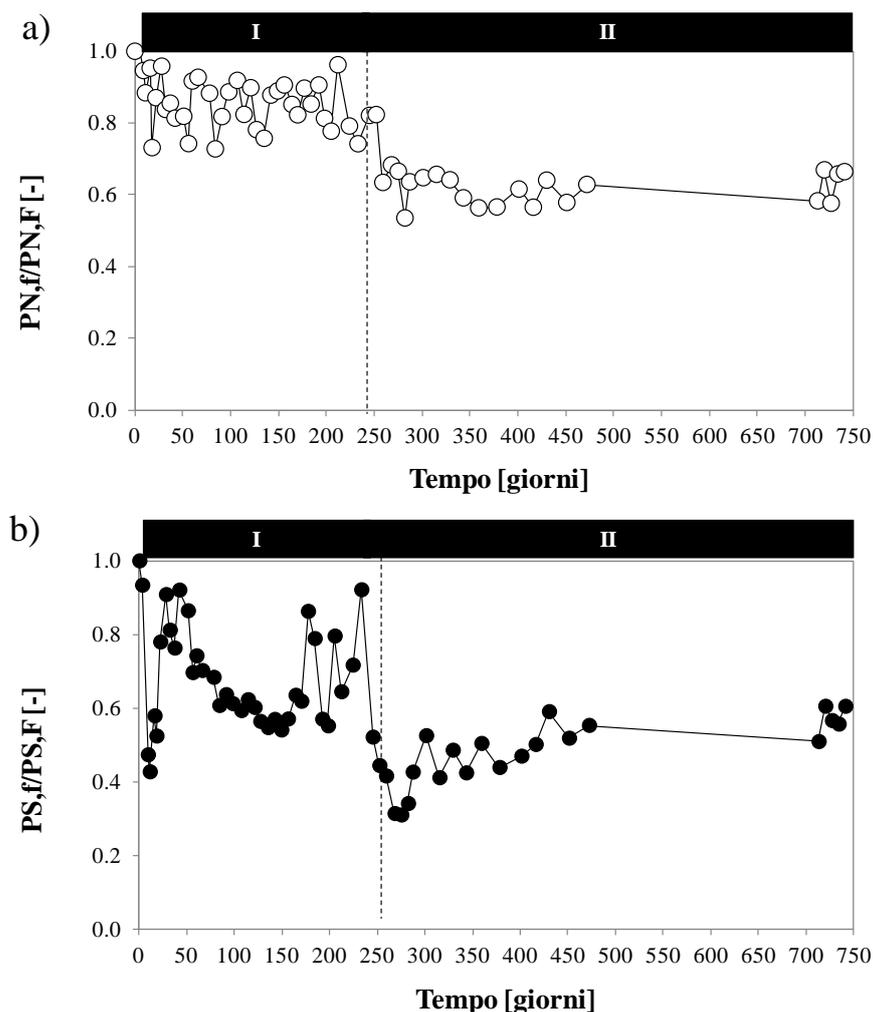
**Figura 8.1:** Andamento delle concentrazioni di EPS specifiche al termine della fase di feast (a) e fame (b).

I primi periodi del processo di granulazione sono, tuttavia, caratterizzati da un sensibile dilavamento di biomassa per effetto della pressione di selezione idraulica; di conseguenza, il contenuto di EPS si riduce, in quanto la maggiore disponibilità di substrato per unità di biomassa aumenta e i microrganismi, già in parte adattati alle condizioni ambientali, non necessitano di ricorrere alla produzione di prodotti di stoccaggio, essendo il substrato presente in quantità non limitante. Così si spiega la riduzione del contenuto di EPS subito dopo il raggiungimento del primo picco. Quando la biomassa con scarse caratteristiche di sedimentabilità è stata del tutto dilavata, e il reattore si arricchì di biomassa con buone caratteristiche di sedimentabilità, la concentrazione di biomassa iniziò a ricrescere e la produzione di EPS aumentò nuovamente. Ciò ha prodotto un nuovo aumento del contenuto di EPS fino a un valore stazionario dove, secondo alcuni autori (**Adav et al., 2008, Zhu et al., 2012**), si ha la maturazione del fango granulare, con la completa trasformazione del fango in granuli stabili. La maggiorparte degli studi in letteratura si limitano tuttavia all'osservazione di questo periodo e poco viene detto su ciò che si verifica nel lungo periodo. Il contenuto di EPS si mantenne stabile su un valore pressoché stazionario per circa 80 giorni, dopo i quali il contenuto di EPS si ridusse in maniera drastica, raggiungendo un valore minimo intorno al 170° giorno. Dopo questo periodo, il contenuto di EPS tornò a crescere come osservato nei primi giorni, e il loro andamento nei successivi giorni ricalcò lo stesso trend evidenziato nei primi giorni della sperimentazione. In particolare, al raggiungimento di ogni picco si verificava la successiva riduzione della produzione di EPS, e successivamente il raggiungimento di un plateau indicativo di una condizione pseudo-stazionaria, cui seguiva la nuova riduzione. Il primo periodo sperimentale è stato dunque caratterizzato da queste continue oscillazioni che periodicamente si ripetevano, evidenziando il mancato raggiungimento di una reale condizione stazionaria.

Nel secondo periodo sperimentale, l'andamento del contenuto di EPS, almeno nella fase iniziale ha ricalcato esattamente quanto osservato nel precedente periodo, ovvero l'aumento del contenuto di polimeri extracellulari fino al raggiungimento di un picco e la successiva riduzione. Ciò è stato dovuto alla nuova formazione di granuli osservata all'inizio di questa fase, come è discusso nel seguito del capitolo. In questo caso tuttavia, le condizioni stazionarie sono state effettivamente raggiunte e il contenuto di EPS si è mantenuto stabile per oltre un anno fino al termine del periodo osservato. L'analisi delle EPS anche al termine della fase di *famine* (Fig. 8.1b) ha permesso di fare delle interessanti osservazioni riguardo il loro consumo durante la fase di respirazione endogena che caratterizza il suddetto periodo.

Con riferimento al primo periodo, il contenuto di proteine al termine della fase di *famine* è stato pressoché simile a quello della precedente fase di *feast*. Confrontando il contenuto di proteine tra le due fasi, si è osservato che in tutto il primo periodo sperimentale, circa il 15-20% delle proteine veniva consumato (Fig.

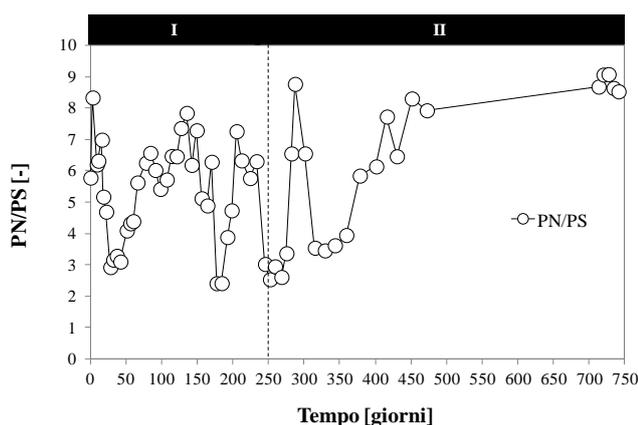
8.2a), mentre il consumo di carboidrati è stato molto maggiore in particolare in corrispondenza di alcuni precisi periodi (Fig. 8.2b).



**Figura 8.2:** Andamento del rapporto tra proteine (a) e carboidrati (b) al temine della fase *famine* ( $PS_f$ ,  $PN_f$ ) e *feast* ( $PS_F$ ,  $PN_F$ ).

Il consumo di carboidrati in fase di *famine* infatti oscillava dal 15 al 50%, e in particolare, il minimo consumo si osservava nel momento di minimo contenuto delle EPS proteiche e viceversa il massimo consumo nei periodi in cui il contenuto di EPS proteiche era massimo. Il maggiore consumo di carboidrati rispetto a quello delle proteine, evidenzia il fatto che i microrganismi in condizioni di respirazione endogena che caratterizzano la fase di *famine*, utilizzano le EPS come fonte di

carbonio e di energia per il loro metabolismo e, nel dettaglio, degradano i carboidrati in maniera prioritaria rispetto alle proteine probabilmente in ragione della loro minore complessità strutturale. Nel secondo periodo sperimentale, il consumo di EPS è stato maggiore per effetto della maggiore durata del ciclo di reazione che sottoponeva la biomassa a un più lungo periodo di respirazione in condizioni endogene, costringendo i microrganismi a dover consumare una maggiore quantità di prodotti di stoccaggio. In questo caso, oltre ai carboidrati, il cui consumo era nell'ordine del 50%, anche il contenuto di proteine si riduceva in maniera sensibile. Le proteine infatti si riducevano mediamente di circa il 40-45%, e il loro consumo si è mantenuto stabile per tutto il periodo. Il consumo di carboidrati invece ha evidenziato lo stesso andamento del precedente periodo, infatti il consumo è stato massimo (circa il 70%) in corrispondenza del picco di EPS, mentre si è ridotto a circa il 50% quando si sono raggiunte le condizioni stazionarie. La composizione delle EPS, espressa dal rapporto PN/PS, variava in accordo alle oscillazioni sia della produzione che del consumo di proteine e carboidrati. Nel complesso l'andamento di tale rapporto è stato molto simile a quello delle proteine in fase di *feast* (Fig. 8.3). Si evidenziavano dunque periodi in cui i granuli si arricchivano di proteine, mentre altri in cui il loro contenuto di riduceva in maniera sensibile. Anche in questo caso, la ciclicità osservata nel primo periodo, non si è mantenuta nel secondo, dove il rapporto PN/PS ha mostrato un trend crescente asintotico verso un valore stazionario prossimo a 8.



**Figura 8.3:** Andamento del rapporto tra proteine (PN) e carboidrati (PS).

Il confronto tra i dati osservati nei due periodi sperimentali, evidenzia come la produzione e allo stesso tempo il consumo di EPS, aumenti al crescere della durata del ciclo di reazione. Nel caso di cicli di reazione molto lunghi, l'alternanza di condizioni di abbondanza e carenza di substrato viene estremizzata e i batteri, dovendo affrontare lunghi periodi di carenza del substrato, producono una

maggior quantità di prodotti di stoccaggio, che poi vanno ad utilizzare nel lungo periodo di inedia aerobica. In termini di stabilità strutturale dei granuli ciò ha portato notevoli benefici, infatti nel secondo periodo non si sono evidenziate le stesse oscillazioni osservate nel primo, il che ha consentito il raggiungimento di condizioni stazionarie stabili.

### 8.3.2 Analisi delle cinetiche metaboliche

L'analisi del contenuto di EPS ha evidenziato la ciclica alternanza di periodi di massima e minima produzione di polimeri extracellulari. La produzione di EPS è strettamente connessa all'attività batterica, e in particolare alle cinetiche del loro metabolismo. Nel paragrafo relativo alle EPS, si è detto che dopo il raggiungimento del primo plateau, indicativo del raggiungimento di condizioni pseudo-stazionarie, la produzione EPS si riduceva e seguiva un andamento ciclico. Dapprima il contenuto di EPS aumentava (fase I), fino al raggiungimento di un nuovo plateau più o meno esteso temporalmente (fase II), al termine del quale (fase III) faceva seguito una nuova riduzione fino al raggiungimento di un minimo (IV) e una nuova fase di crescita, fino a che il contenuto di EPS raggiungeva una condizione nuovamente pseudo-stazionaria (Fig.8.1).

In Figura 8.4 sono riportati i profili di concentrazione dell'ossigeno durante il ciclo di reazione e i valori delle velocità di ossidazione del substrato organico nei giorni sopra evidenziati.

In questi quattro casi analizzati le cinetiche batteriche sono risultate profondamente differenti. Nel dettaglio, la velocità di ossidazione del substrato seguiva ciclicamente le oscillazioni prima osservate. Del resto, sia la produzione di EPS che la velocità di ossidazione del substrato sono entrambi degli indicatori dell'attività metabolica della biomassa. Nella fase I (90° giorno), ovvero quella in cui il contenuto di EPS aumentava, la fase di *feast* aveva una durata di circa 25 minuti e la velocità di ossidazione del substrato era pari a 5,25 mgCOD gSSV<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (Fig.8.4a), risultato indicativo di un'elevata attività metabolica. Nella fase II (120° giorno), ovvero quella in cui iniziava il plateau delle EPS, la durata della fase di *feast* risultava maggiore rispetto alla precedente, pari a 40 minuti, e la velocità di ossidazione del substrato era pari a 3,36 mgCOD gSSV<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (Fig.8.4b). Nella fase III (175° giorno), prima dell'inizio del tratto decrescente, la durata del periodo di *feast* era aumentata in maniera sensibile fino a circa 90 minuti. In questa fase la velocità di ossidazione del substrato era molto bassa e pari a 1,44 mgCOD gSSV<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (Fig.8.4c). Infine nella fase IV (205°giorno) la durata della fase di *feast* risultava minore, attestandosi sui 50 minuti e la velocità di ossidazione del substrato era pari a 4,18 mgCOD gSSV<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (Fig.8.4d), evidenziando comunque una tendenza all'aumento. L'aumento della fase di *feast* è spesso indice della perdita di stabilità dei granuli. L'aumento del tempo necessario per l'ossidazione del

substrato organico favorisce infatti la proliferazione di batteri filamentosi che causano l'indebolimento della struttura dei granuli (McSwain et al., 2004).

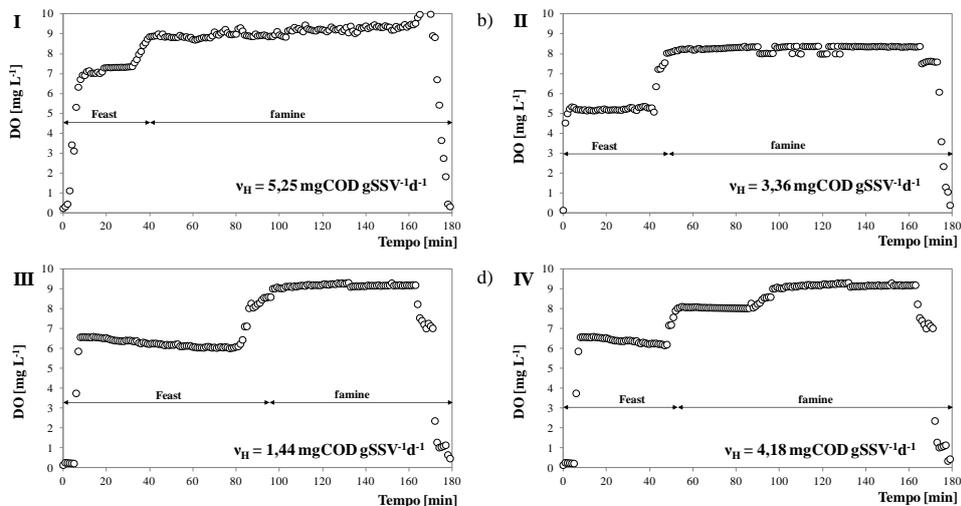
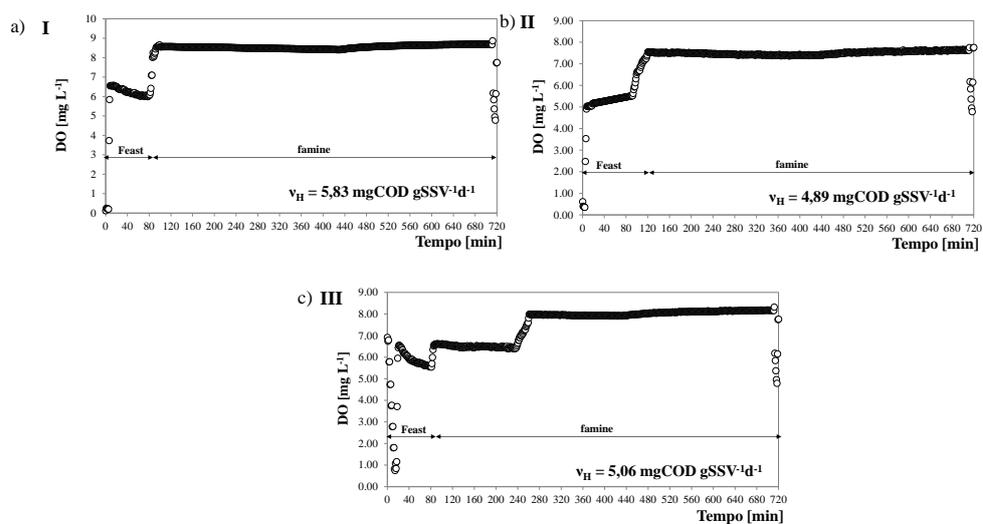


Figura 8.4: Profili di concentrazione dell'ossigeno durante i cicli di reazione nei giorni 90 (a), 120 (b), 175 (c), 205 (d).

Nel secondo periodo sperimentale sono state evidenziate solo tre fasi, coincidenti con le prime tre del primo periodo. Infatti, come già discusso, dopo il raggiungimento delle condizioni stazionarie non si è evidenziata un'ulteriore riduzione del contenuto delle EPS e i granuli si sono mantenuti stabili fino al termine della sperimentazione.

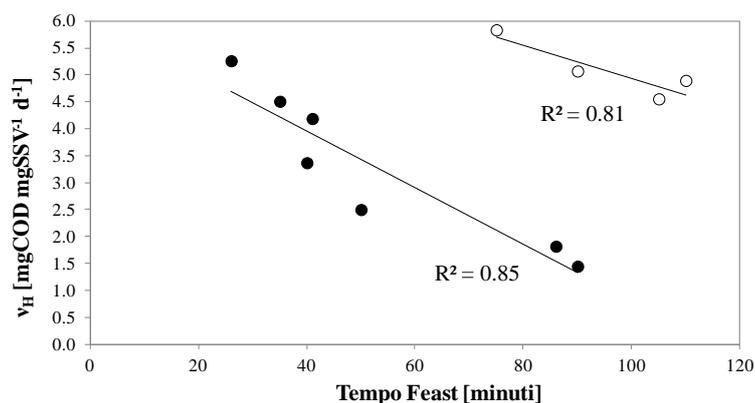
In Figura 8.5 sono riportati i profili di concentrazione dell'ossigeno ottenuti in alcuni giorni sperimentali caratteristici del periodo.

A differenza del precedente periodo sperimentale, la durata della fase di *feast* è stata maggiore, ovviamente a causa della maggiore concentrazione di substrato influente (Fig.8.5), così come le cinetiche che sono state mediamente maggiori di circa il 75%. La ragione di tale risultato è da addebitare anche in questo caso alla maggiore concentrazione di substrato che induceva una maggiore attività metabolica da un lato, e ad una maggiore penetrazione del substrato all'interno dei granuli dall'altro per effetto del gradiente più elevato rispetto al precedente periodo. Nel complesso, sia la durata della fase di *feast* che la velocità di degradazione del substrato, hanno subito minori oscillazioni rispetto al precedente periodo, confermando la maggiore stazionarietà del sistema in questo periodo rispetto al precedente.



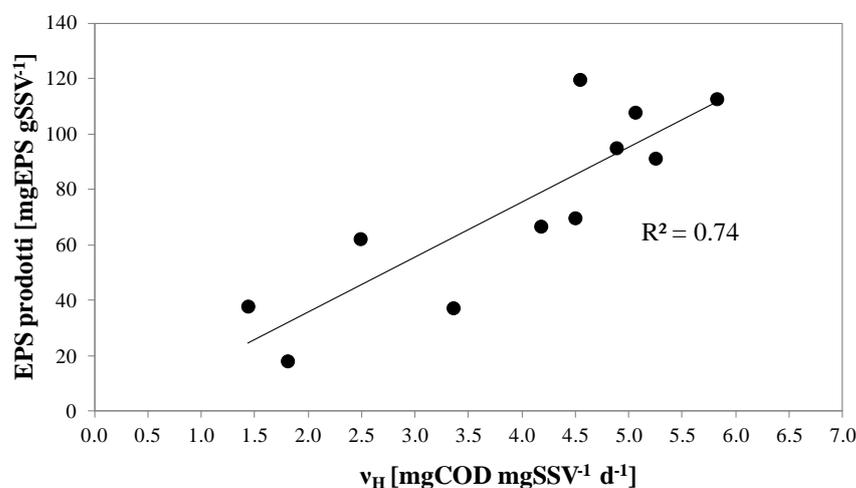
**Figura 8.5:** Profili di concentrazione dell'ossigeno durante i cicli di reazione nei giorni 240 (a), 380 (b), 48 (c), 720 (d).

I risultati ottenuti evidenziano come da un lato la durata della fase di *feast* rifletta lo stato del metabolismo batterico, infatti all'aumento del tempo necessario ad ossidare il substrato organico, corrisponde la riduzione dell'attività metabolica della biomassa (Fig. 8.6).



**Figura 8.6:** Correlazione tra la durata della fase di feast e la velocità di ossidazione del substrato organico.

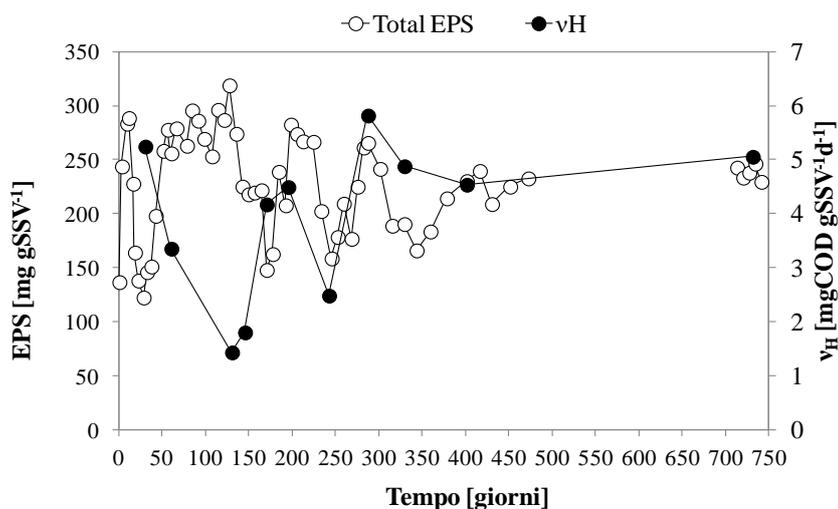
In Figura 8.7 è mostrata la relazione che intercorre tra la velocità di ossidazione del substrato e la produzione di EPS, calcolata come differenza tra il contenuto di EPS al termine della fase di *famine* e della fase di *feast* del successivo ciclo.



**Figura 8.7:** Correlazione tra la velocità di ossidazione del substrato organico e la quantità di EPS prodotte.

Alla luce dei risultati sopra esposti, si è evidenziato come quando l'attività metabolica della biomassa tende a ridursi, il contenuto di EPS inizia a diminuire, mentre quando la velocità di ossidazione del substrato aumenta, la quantità di EPS prodotte tende ad aumentare anch'essa.

È altresì interessante da osservare come il punto di massimo della velocità di rimozione del substrato coincida con l'inizio del plateau del contenuto di EPS, e che da questo momento in poi le cinetiche batteriche si andavano riducendo sempre di più fino al raggiungimento di un punto di minimo che si è verificato in corrispondenza del minimo contenuto di EPS (Fig.8.8).



**Figura 8.8:** Confronto tra il contenuto di EPS proteiche e la velocità di ossidazione del substrato organico.

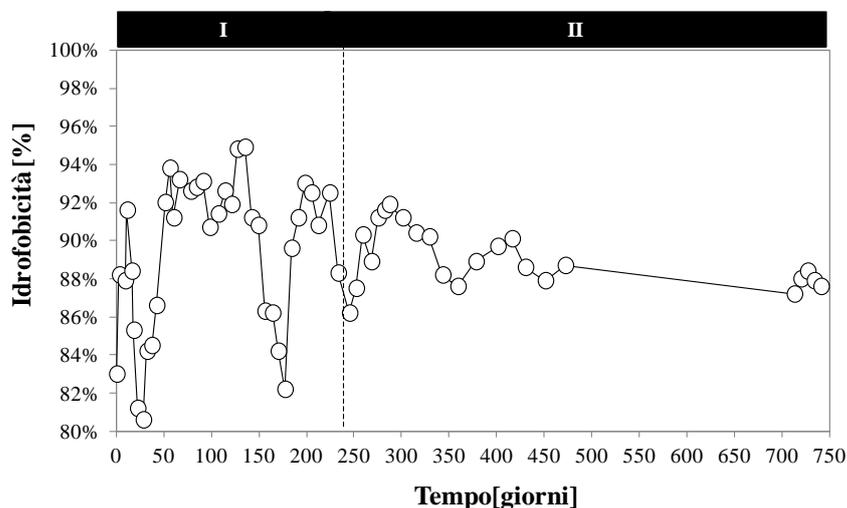
**Li et al. (2007)** osservarono che l'aumento del contenuto di EPS nei granuli tendeva a trasformarli in strutture gelatinose. L'elevata quantità di polimeri extracellulari sulla superficie degli aggregati formava infatti una densa patina di aspetto traslucido caratterizzata da un'elevata viscosità che riduceva il trasferimento di ossigeno verso gli strati più interni. La diretta conseguenza di ciò fu la lenta riduzione della loro attività metabolica.

I risultati ottenuti evidenziano il fatto che le forti oscillazioni di EPS osservate soprattutto nel primo periodo, sono il prodotto di una modificazione del metabolismo batterico, ovvero della minore attività biologica dei granuli dovuta o all'invecchiamento dei batteri al loro interno o in maniera analoga alla riduzione della frazione granulo che risulta attiva.

### 8.3.3 Caratteristiche fisiche dei granuli: andamento di idrofobicità, contenuto di solidi sospesi totali e volatili, densità, caratteristiche di sedimentabilità e della resistenza strutturale.

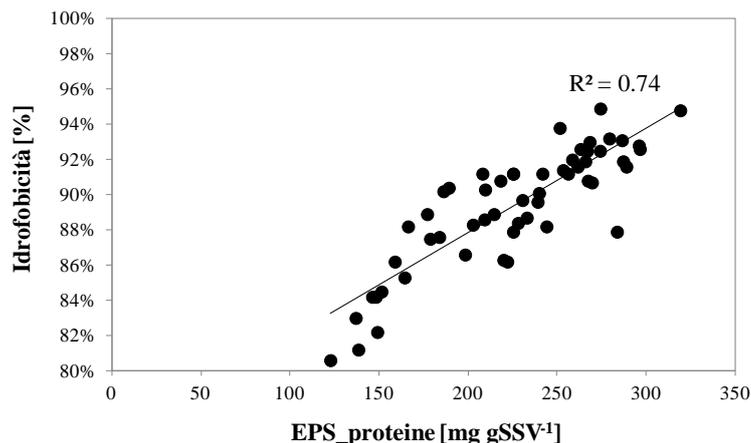
Le caratteristiche fisiche dei granuli sono state analizzate mediante l'analisi dell'idrofobicità, del contenuto di solidi sospesi volatili e totali, nonché del loro rapporto, della densità, delle caratteristiche di sedimentabilità e infine della resistenza strutturale valutata in maniera indiretta mediante l'osservazione della concentrazione di solidi sospesi totali nell'effluente.

Così come già evidenziato nel paragrafo 8.3.1, anche l'idrofobicità ha mostrato un trend alquanto simile a quello del contenuto di EPS proteiche. L'idrofobicità infatti, è cresciuta in maniera rapida nei primi giorni della sperimentazione, per poi decrescere velocemente nei successivi, in accordo a quanto osservato per le EPS (Fig. 8.9). Il trend dell'idrofobicità ha dunque ricalcato quello delle EPS proteiche per tutta la durata della sperimentazione in entrambi i periodi.



**Figura 8.9:** Andamento dell'idrofobicità relativa del fango granulare

Ciò è spiegabile col fatto che le proteine erano la componente principale delle EPS, e il loro contenuto era pari ad almeno 5-8 volte rispetto a quello dei carboidrati. Le proteine sono sostanze idrofobiche, per cui come evidenza la buona correlazione ottenuta tra i due parametri (Fig.8.10), la loro abbondanza all'interno della matrice polimerica ne favoriva l'aumento dell'idrofobicità e di conseguenza il potere di auto-adesione delle cellule.



**Figura 8.10:** Correlazione tra la l'idrofobicità del fango e il contenuto di EPS proteiche.

I valori di idrofobicità nei due periodi risultavano comunque leggermente differenti. Al di là delle forti oscillazioni che hanno caratterizzato il primo periodo, si evinceva che in condizioni pseudo-stazionarie, nel primo periodo il valore dell'idrofobicità risultava prossimo al 93%, mentre nel secondo l'idrofobicità si stabilizzò intorno all'88%. La differenza è certamente legata al diverso contenuto di proteine. La maggiore durata del ciclo nel secondo periodo, comportava un consumo di proteine maggiore durante la fase di inedia, per cui il valore dell'idrofobicità risultava essere minore. Ciò tuttavia, come verrà discusso in seguito, non ha comportato significative perdite di stabilità dei granuli, che anzi come detto hanno mantenuto integra la loro struttura per un tempo molto maggiore rispetto a quelli del precedente periodo. È possibile dunque che valori troppo elevati dell'idrofobicità, sebbene favoriscano il rapido addensamento degli aggregati microbici, ne limitano al contempo la stabilità nel lungo periodo. Si fa osservare comunque che i valori di idrofobicità osservati nel secondo periodo, sebbene di qualche punto percentuale inferiori rispetto al primo, risultavano essere maggiori rispetto ai valori tipici di un fango attivo fioccoso (**Chao et al., 2014**).

Andamento del tutto analogo a quello dell'idrofobicità è stato osservato con riferimento alla densità dei granuli (Fig.8.11). Lo stesso andamento fortemente variabile è stato osservato nel primo periodo sperimentale e, in particolare, si può osservare come i picchi dei valori di densità coincidessero esattamente con quelli dell'idrofobicità. Anche in questo caso si evidenzia il forte legame tra i due parametri, che sottolinea come l'aumento dell'idrofobicità cellulare aumentasse il potere di auto-adesione delle cellule batteriche nella formazione degli aggregati microbici che, in virtù degli elevati sforzi di taglio idrodinamici, si compattavano aumentando di diverse unità il proprio peso specifico.

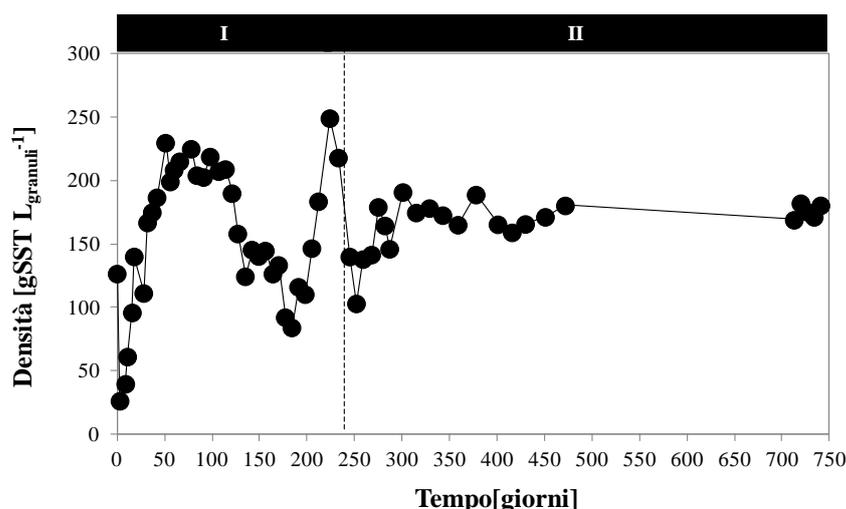


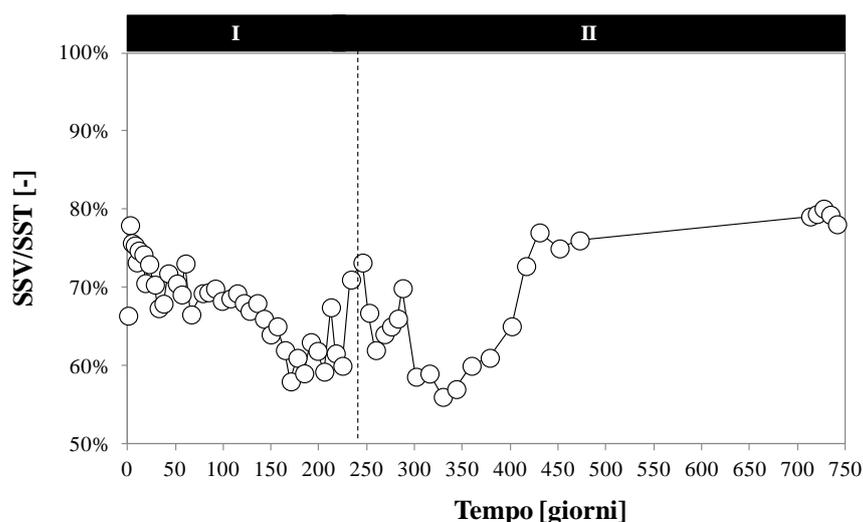
Figura 8.11: Andamento della densità del fango granulare.

Anche in questo caso i valori stazionari di densità osservati nel primo periodo sono risultati essere maggiori rispetto a quelli del secondo. Come si è discusso però, valori elevati di densità non sono necessariamente indice di granuli strutturalmente stabili, anzi come si è in parte detto e che verrà meglio discusso in seguito, granuli eccessivamente addensati oppongono una maggiore resistenza al trasporto di materia dal bulk verso l'interno dei granuli. Ciò presumibilmente conduce ad una progressiva perdita di stabilità dei granuli, in quanto negli strati più interni la mancanza di substrato spinge i microrganismi a consumare gli stessi polimeri extracellulari che costituiscono la struttura portante dei granuli. Non solo, la mancata diffusione dell'ossigeno può determinare l'instaurarsi di un metabolismo di tipo anaerobico, e i prodotti della fermentazione che naturalmente tenderebbero a essere diffusi verso il bulk, potrebbero rimanere intrappolati all'interno dei granuli sempre a causa della forte resistenza ai flussi di materia, determinando il rigonfiamento e la successiva rottura dei granuli (Zhang et al., 2006; Lee et al., 2010). Valori minori della densità, come quelli osservati nel secondo periodo, verosimilmente assicuravano al contempo una buona resistenza strutturale e la buona diffusione dei nutrienti all'interno dei granuli.

A conferma di quanto detto prima relativamente alla mancata diffusione di nutrienti all'interno dei granuli, è interessante discutere l'andamento del rapporto tra i solidi sospesi volatili e totali dei granuli (Fig.8.12).

In tutto il primo periodo sperimentale, il rapporto tra i solidi sospesi volatili e totali ha mostrato un trend nel complesso decrescente. L'aumento del contenuto inerte dei granuli evidenziava la graduale mineralizzazione della loro struttura (Adav et

**al., 2010**). Secondo quanto riportato da **Isanta et al. (2012)** nel lungo periodo la frazione inerte dei granuli aumenta a causa della precipitazione di sali inorganici al loro interno. Nel complesso, in alcuni brevi periodi il trend è stato crescente, in particolar modo verso la fine del primo periodo, in controtendenza rispetto alla densità. Ciò conferma come l'eccessivo addensamento dei granuli costituisse un effettivo limite al trasporto di materia all'interno dei granuli. Nel secondo periodo, il rapporto tra i solidi sospesi volatili e totali si stabilizzò intorno al 75%, indicando che la frazione inerte dei granuli era minore e che, pertanto, la loro frazione biologicamente attiva risultava essere maggiore rispetto a quella del precedente periodo, confermando dunque la maggiore attività metabolica di questo periodo già sottolineata nel paragrafo 8.3.2.



**Figura 8.12:** Andamento del rapporto tra SSV/SST del fango granulare.

Le forti oscillazioni della densità ha avuto evidenti effetti anche dal punto di vista delle caratteristiche di sedimentabilità dei granuli. I valori di  $SVI_{30}$  si sono mantenuti su valori tipici dei fanghi granulari (30-40 mL gSST<sup>-1</sup>, **Schwarzenbeck et al., 2004**) principalmente per l'effetto della costante pressione di selezione idraulica applicata al sistema (Fig.8.13).

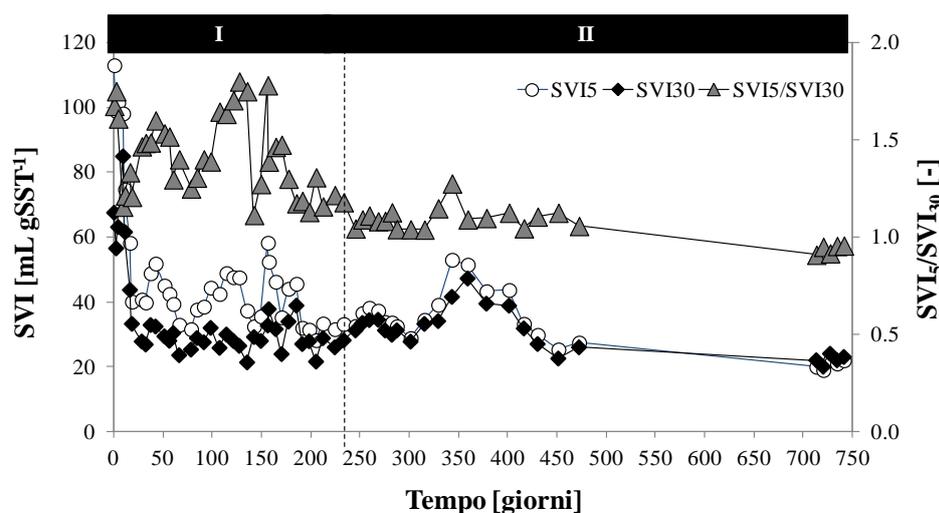
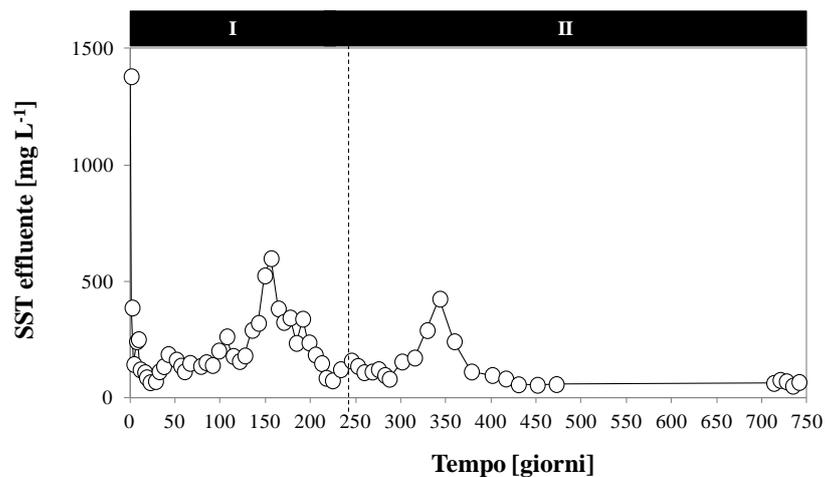


Figura 8.13: Andamento dei parametri SVI<sub>5</sub> e SVI<sub>30</sub> e del loro rapporto.

Oscillazioni maggiori sono state osservate con riferimento allo SVI<sub>5</sub>, che evidenziava dei valori di massimo negli stessi periodi in cui i valori di densità risultavano minimi. Ciò potrebbe suggerire che l'instaurarsi di fenomeni di fermentazione all'interno dei granuli e il conseguente accumulo dei gas al loro interno, ne determinavano un parziale alleggerimento e la conseguente riduzione della loro velocità di sedimentazione. Il rapporto tra lo SVI<sub>5</sub> e lo SVI<sub>30</sub> viene indicato come un indice di granulazione del fango (Schwarzenbeck et al., 2004). In tutto il primo periodo tale rapporto ha mostrato continue oscillazioni in accordo agli altri parametri prima discussi (Fig.8.13). Solo alla fine del primo periodo e in quasi tutto il secondo, si è stabilizzato intorno ad un valore prossimo all'unità, evidenziando la totale trasformazione in fango granulare e il raggiungimento delle condizioni stazionarie.

La stabilità strutturale dei granuli è stata valutata indirettamente attraverso l'analisi dei solidi sospesi allo scarico. Essendo il refluo di natura sintetica e quindi privo di solidi sospesi, la loro presenza nell'effluente può derivare solo dallo sfaldamento dei granuli stessi. Nei primi giorni della sperimentazione la concentrazione dei solidi allo scarico è stata molto elevata per effetto della selezione idraulica della biomassa (Fig.8.14). Eccetto tale breve periodo durante il quale il dilavamento dei solidi non è da correlare alla destrutturazione dei granuli, sono stati evidenziati altri due picchi intorno al 150° giorno nel primo periodo, e al 340° giorno nel secondo. Entrambi i picchi coincidevano con il minimo valore della densità dei granuli. L'indebolimento strutturale evidenziato in precedenza trova appunto conferma nell'aumento dei solidi sospesi allo scarico. Il minore contenuto di EPS, la minore

idrofobicità e densità hanno insieme determinato la perdita di stabilità dei granuli che risultavano essere maggiormente soggetti allo sfaldamento.



**Figura 8.14:** Andamento della concentrazione di solidi sospesi allo scarico.

### 8.3.4 Analisi granulometrica dei granuli aerobici

Il continuo modificarsi delle caratteristiche fisiche del fango e il mancato raggiungimento di condizioni stazionarie, hanno avuto significativi effetti sulla granulometria del fango soprattutto nel primo periodo sperimentale. L'andamento sia delle dimensioni medie dei granuli che del tasso di granulazione sono risultati molto simili a quelli già osservati per le EPS, idrofobicità e densità, evidenziando per tanto l'importanza dei suddetti parametri nel processo di granulazione. In Figura 8.15 è riportato l'andamento del tasso di granulazione nei due periodi osservati.

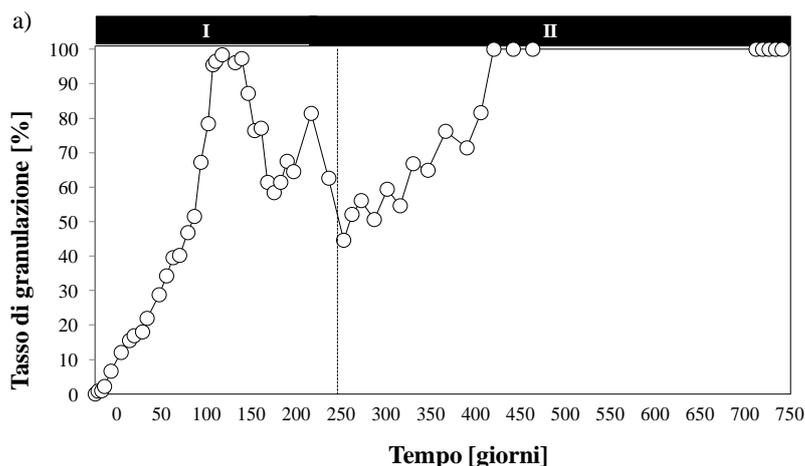


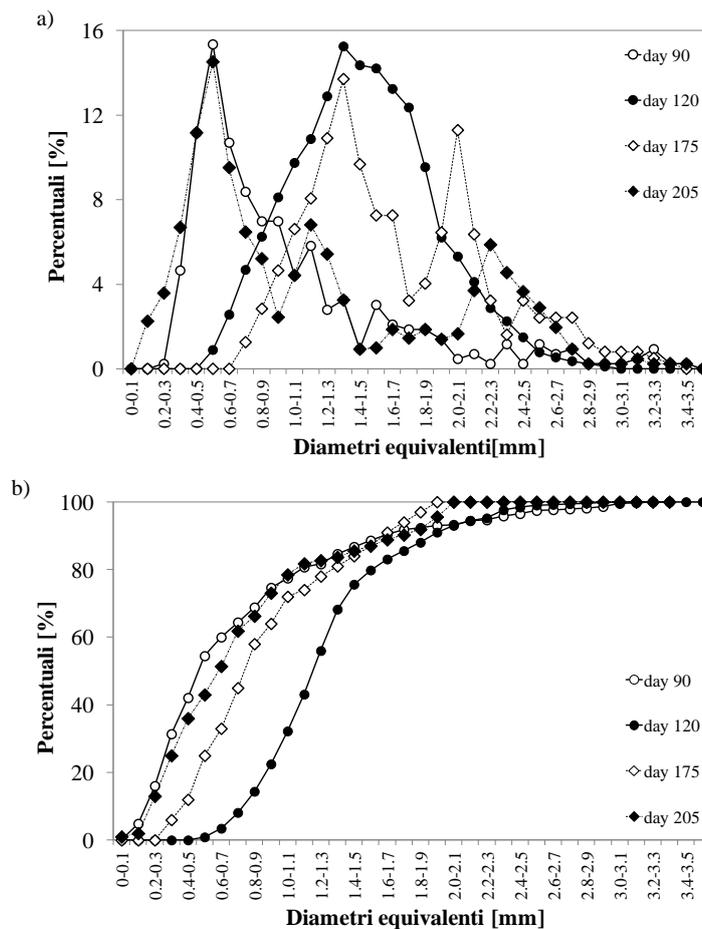
Figura 8.15: Andamento del tasso di granulazione.

La completa granulazione del fango si è ottenuta dopo circa 120 giorni, al termine dei quali i granuli avevano una dimensione media di circa 1,6 mm, e successivamente per circa 40 giorni i granuli si sono mantenuti stabili. Tuttavia, come evidenziato dall'andamento di parametri come l'idrofobicità, il contenuto di EPS e la densità, in questo periodo le caratteristiche strutturali dei granuli sono sensibilmente peggiorate e, infatti, dal 160° giorni al 200° giorno, una buona percentuale dei granuli si è sfaldata e il tasso di granulazione si è così ridotto al 55%, evidenziando la formazione di un bulk ibrido composto da fango fioccoso e granulare. Nei successivi 30 giorni, il tasso di granulazione ha mostrato un nuovo lieve trend di crescita come precedentemente osservato per le EPS proteiche in particolare, ma nuovamente dopo aver raggiunto un picco di poco superiore all'80%, il tasso di granulazione ha subito un brusco decremento fino al 40% al termine del primo periodo sperimentale. È interessante osservare come l'andamento del tasso di granulazione risultasse simile a quello del rapporto PN/PS riportato nel paragrafo 8.3.1 (Fig.8.3). Nei periodi in cui tale rapporto cresceva, la percentuale di granuli aerobici nel reattore aumentava e viceversa, quando lo stesso rapporto si riduceva, si evidenziavano fenomeni di sfaldamento e la percentuale di granuli nel reattore si riduceva. Tali risultati sottolineano l'importanza delle proteine nella stabilità strutturale dei granuli aerobici. Come evidenziato anche da **Zhang et al. (2012)**, l'aumento di tale rapporto è indice della formazione di nuovi granuli, così come la sua riduzione è indice di indebolimento strutturale dei granuli. Tale parametro potrebbe essere utile ai fini gestionali, per evidenziare fenomeni di sfaldamento e mettere a punto delle opportune strategie finalizzate a evitare la perdita di stabilità del fango granulare.

L'andamento del tasso di granulazione è il risultato del mancato raggiungimento di reali condizioni stazionarie nel primo periodo. I granuli infatti non hanno mai

raggiunto un reale stadio di maturazione, come dimostra il fatto che non appena il tasso di granulazione tendeva a stabilizzarsi nel corso di qualche settimana diminuiva in maniera drastica, sottolineando l'intrinseca instabilità strutturale del fango.

Nel primo periodo sono state effettuate delle analisi di dettaglio sulla caratterizzazione granulometrica del fango in quattro punti ben precisi in corrispondenza della fase di granulazione (90°giorno), quando si è raggiunta la completa granulazione (120°giorno), a metà della prima fase di sfaldamento (175°giorno) e infine prima della ripresa della nuova granulazione (205° giorno). Il dettaglio dell'analisi granulometrica è mostrato in Figura 8.16.



**Figura 8.16:** Distribuzione granulometrica (a) e curve granulometriche (b) dei campioni nei giorni 90, 120, 175 e 205.

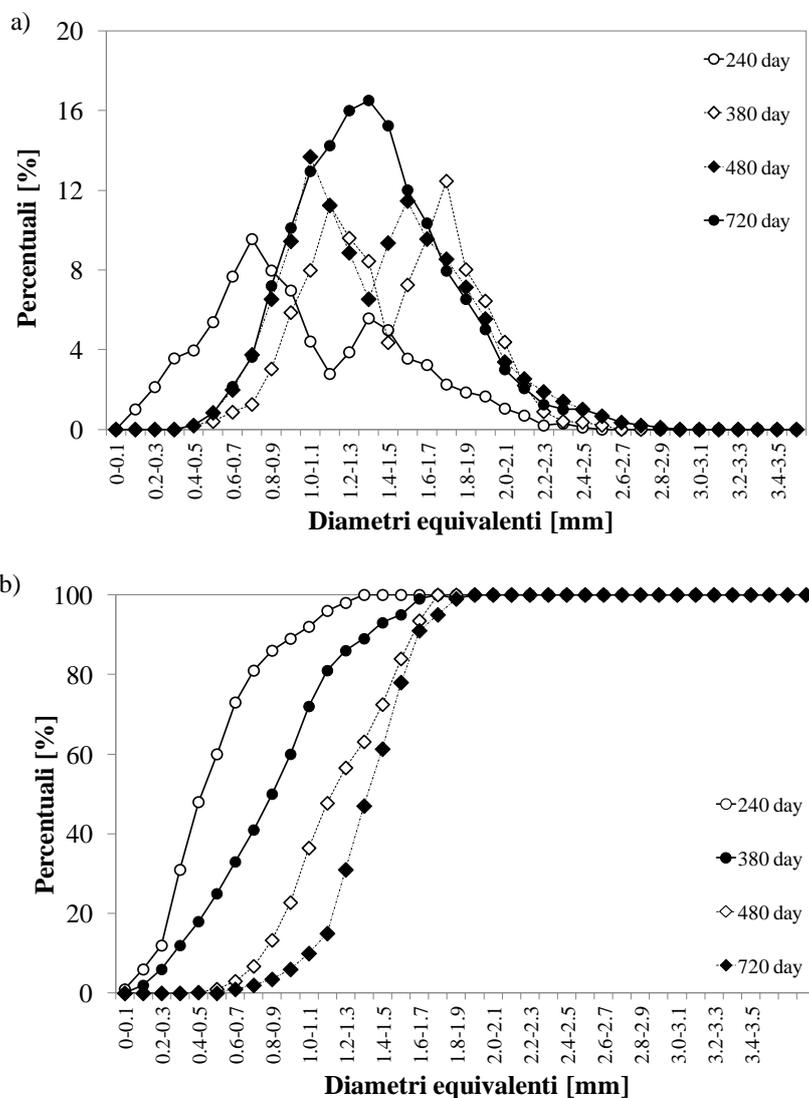
Al 90° giorno, i granuli già presenti avevano dimensioni modeste, tali da ricadere in gran parte nella classe di dimensioni 0,6-0,7 mm. Granuli di dimensioni maggiori erano già presenti, ma la loro percentuale era inferiore al 10%.

Quando è stata ottenuta la completa granulazione del fango (120°giorno), la distribuzione granulometrica evidenziava la natura molto omogenea del fango. I granuli di dimensioni maggiori ai 3 mm erano scomparsi probabilmente a causa del loro sfaldamento, e i piccoli granuli osservati nella precedente fase si erano accresciuti fino a circa 1,6 mm. Rispetto al punto precedente, in questo caso aumentarono in maniera sensibile il  $d_{10}$  e il  $d_{60}$  della distribuzione granulometrica, sottolineando la crescita di dimensioni dei granuli più piccoli e, quindi, la maturazione del fango granulare. Il 175°giorno è quello rappresentativo dell'inizio dello sfaldamento. Dalla distribuzione granulometrica tale processo è facilmente identificabile dalla formazione di due distinti picchi, in corrispondenza dei diametri equivalenti di 1,4 e 2 mm. Contestualmente si è osservata una lieve riduzione del  $d_{60}$  e un contemporaneo aumento sia del  $d_{10}$  che del  $d_{90}$ . Tale dato suggerisce che alcuni granuli rispetto alla fase precedente sono continuati a crescere e sono quelli rappresentativi del secondo picco, mentre altri si sono sfaldati, facendo aumentare il picco della distribuzione in corrispondenza dei diametri minori e il  $d_{10}$ . La distribuzione granulometrica evidenziava, inoltre, la natura alquanto eterogenea del fango granulare, costituito da granuli di dimensioni superiori ai 2 mm ma in gran parte da aggregati di dimensioni minori, che mostravano evidenti segni di sfaldamento. Al 205° giorno infine, il fango è diventato ancora di più eterogeneo. I due picchi evidenziati nel precedente periodo si sono ulteriormente spostati verso sinistra indicando il protrarsi dei fenomeni di sfaldamento prima evidenziati. Contestualmente però si è osservata la formazione di un nuovo picco nella distribuzione in corrispondenza dei diametri 2,1-2,2 mm. Quest'ultimo è da attribuire molto probabilmente alla formazione di nuovi granuli, mentre gli altri due picchi sono relativi a granuli di età maggiore maggiormente esposti ai fenomeni di sfaldamento.

Il processo di granulazione così osservato è stato dunque il risultato di un processo dinamico che vedeva il continuo formarsi e sfaldarsi dei granuli senza che però si raggiungesse una condizione di equilibrio per la quale lo sfaldamento e la formazione di nuovi granuli si equilibrassero. Come dimostra infatti il trend decrescente del tasso di granulazione, in questo caso lo sfaldamento era prevalente rispetto alla formazione di nuovi granuli.

Nel secondo periodo così come nel primo è stato effettuato uno studio di dettaglio sulla granulometria in altri quattro giorni, corrispondenti al punto di minimo della tasso di granulazione (240°giorno) al periodo in cui i granuli si stavano riformando (380°giorno), al raggiungimento della completa granulazione (480° giorno) e al termine del periodo sperimentale (720°giorno) (Fig.8.17).

All'inizio del periodo (240°giorno) il fango si presentava come una miscela eterogenea di piccoli granuli e fiocchi ben addensati, similmente a quanto osservato al giorno 204 del precedente periodo. Anche in questo caso erano ben visibili due picchi nella distribuzione granulometrica, il primo corrispondente alla componente fioccosa, mentre il secondo a quella granulare .



**Figura 8.17:** Distribuzione granulometrica (a) e curve granulometriche (b) dei campioni nei giorni 240, 380, 480, 720.

Al 380° giorno, si osservò che entrambi i picchi erano aumentati e, che inoltre, risultarono leggermente traslati a destra rispetto al punto precedente, sottolineando che i granuli erano diventati più grandi. Rispetto al punto precedente inoltre tutti e tre i diametri caratteristici della distribuzione granulometrica aumentarono confermando quindi lo sviluppo del processo di granulazione. Al 480° giorno, la situazione era molto simile a quelle del precedente punto, con la differenza che le frazioni di dimensioni inferiori a 0,6 mm scomparvero del tutto, probabilmente perché nel frattempo erano cresciute, così il tasso di granulazione crebbe ancora fino al 100%, indicando la completa maturazione del fango granulare. Sia la distribuzione granulometrica che le immagini, evidenziavano come la natura del fango fosse alquanto eterogenea. Erano ben distinguibili infatti granuli di dimensioni minori con diametro medio di circa 1,2 mm e granuli di dimensioni maggiori con diametri nell'ordine dei 2 mm. È possibile che la pressione di selezione idraulica non troppo elevata (5 minuti di tempo di sedimentazione) abbia consentito il mantenimento nel reattore di entrambi i fanghi. Al termine del periodo sperimentale (720°giorno) la distribuzione granulometrica appariva molto uniforme, evidenziando che i granuli si erano mantenuti stabili per un periodo superiore ad un anno.

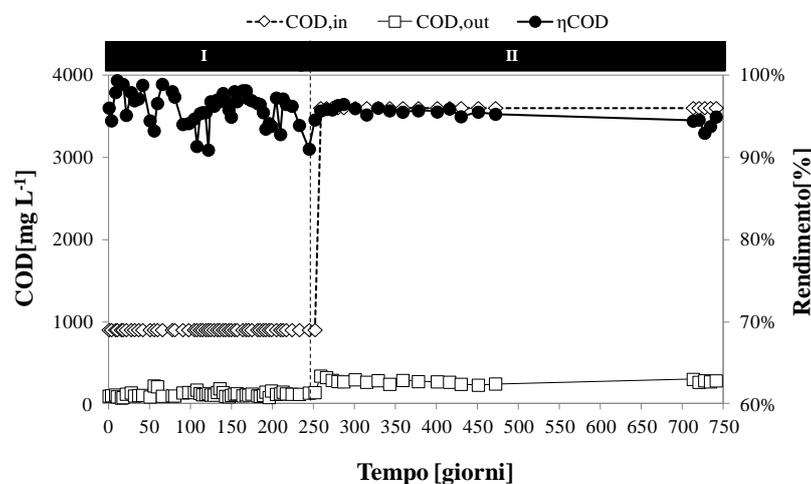
Dal confronto dei risultati ottenuti nei due periodi, si possono trarre significative considerazioni riguardo l'effetto della durata del ciclo di reazione sulla formazione dei granuli. Innanzitutto non è possibile confrontare in termini di valori assoluti la velocità di trasformazione del fango fioccoso in granulare, in quanto nel primo periodo l'inoculo era costituito da fango attivo di natura fioccosa, mentre nel secondo periodo il fango di inoculo derivava da fango granulare sfaldato che tra l'altro aveva un tasso di granulazione nell'ordine del 40%. Alcuni autori hanno dimostrato che a parità di condizioni l'inoculo con una miscela di fango fioccoso e granulare, ovvero con fango fioccoso derivante dallo sfaldamento di altri granuli, riduce sensibilmente i tempi di granulazione, in quanto il contenuto di EPS e le caratteristiche fisiche di questo fango risultano essere migliori al fine di ottenere la completa granulazione (**Pijuan et al., 2011; Long et al., 2014**). Tenuto conto di queste considerazioni, si evince che le condizioni più favorevoli alla rapida formazione dei granuli si avevano nel secondo periodo, almeno per quanto riguarda la composizione del fango di inoculo. Tuttavia, come si evince dalla pendenza del tasso di granulazione in Figura 8.15, la formazione dei granuli è stata più rapida nel primo periodo. Avendo mantenuto costanti gli altri parametri operativi che influenzano la formazione dei granuli come la pressione di selezione idraulica e il carico, è evidente quindi che la minore durata del ciclo promuova una più rapida formazione dei granuli. Come visto nei precedenti paragrafi, in tali condizioni il contenuto medio delle EPS e dell'idrofobicità è risultato maggiore rispetto a quanto osservato nel secondo periodo, e ciò favoriva una più rapida formazione degli aggregati. Tuttavia, questa sperimentazione ha dimostrato che le stesse condizioni

che portano alla rapida formazione dei granuli, non ne consentono al contempo il mantenimento dell'integrità nel lungo periodo, circostanza che invece è stata garantita nel secondo periodo, dove il minore contenuto di EPS ha da un lato rallentato il processo di granulazione, ma ha dall'altro favorito il loro mantenimento strutturale e il raggiungimento di condizioni stazionarie anche nel lungo periodo. È ipotizzabile dunque che, al fine di velocizzare la fase di start-up ma allo stesso tempo di evitare l'insorgenza di frequenti disfunzioni di processo, la soluzione migliore sia quella di adottare brevi tempi di reazione nella fase di start-up e di allungare la durata del ciclo una volta ottenuta la completa granulazione del fango. Al fine di evitare variazioni di carico, specie nell'ipotesi di trattamento di un refluo le cui caratteristiche qualitative non possono essere cambiate come nel caso di un refluo sintetico, una soluzione percorribile potrebbe essere quella di operare con differenti valori del rapporto di scambio volumetrico, in modo da agire sul carico regolando la portata influente.

#### 8.4 Performance biologiche: rimozione del carbonio

Nei due periodi sperimentali il carico organico alimentato è stato mantenuto costante, al fine di analizzare l'effetto della sola durata del ciclo di reazione sulla formazione e stabilità nel lungo periodo dei granuli aerobici. Avendo ridotto il numero di cicli giornalieri è stata aumentata la concentrazione di COD nell'alimento che dai 900 mgCOD L<sup>-1</sup> del primo periodo è cresciuta a 3600 mgCOD L<sup>-1</sup> nel secondo.

L'andamento della concentrazione di COD nell'influente, effluente e le rese depurative sono mostrate in Figura 8.18.



**Figura 8.18:** Andamento della concentrazione di COD nell'alimento e nello scarico, e rendimenti depurativi.

Nel primo periodo il rendimento di rimozione della sostanza organica ha mostrato un andamento poco regolare, caratterizzato da periodiche variazioni che riflettevano l'instabilità del sistema già evidenziato e discusso nei precedenti paragrafi. Nonostante ciò le rese depurative erano abbondantemente superiori al 90% anche nei periodi in cui queste raggiungevano il loro valore minimo. Ciò è da addebitare al tipo di reflujo alimentato, che essendo di natura sintetica era caratterizzato da un elevatissimo tasso di biodegradabilità e, pertanto, veniva quasi del tutto biodegradato anche nei periodi di instabilità del sistema. Si fa osservare come nel secondo periodo i rendimenti di rimozione del COD si sono mantenuti su valori costanti intorno al 95%, sottolineando il raggiungimento delle condizioni stazionare.

Come già parzialmente discusso in precedenza, il COD è stato determinato anche al termine della fase di *feast*. In Figura 8.19 sono riportati i rendimenti di rimozione del COD in suddetta fase.

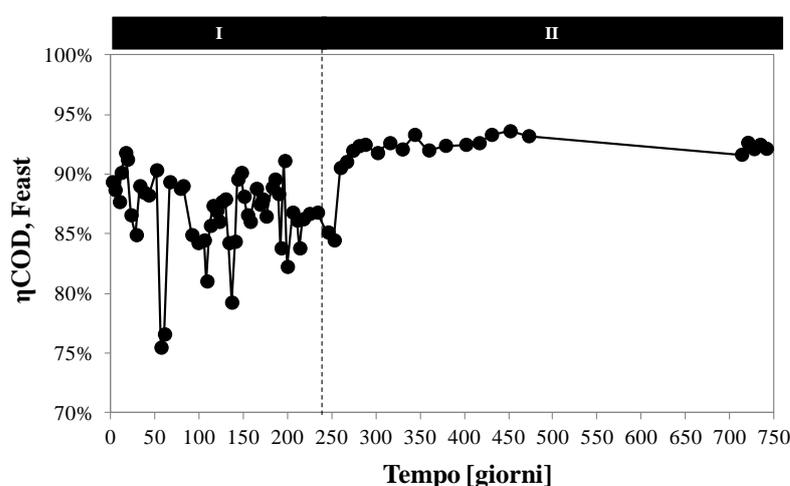


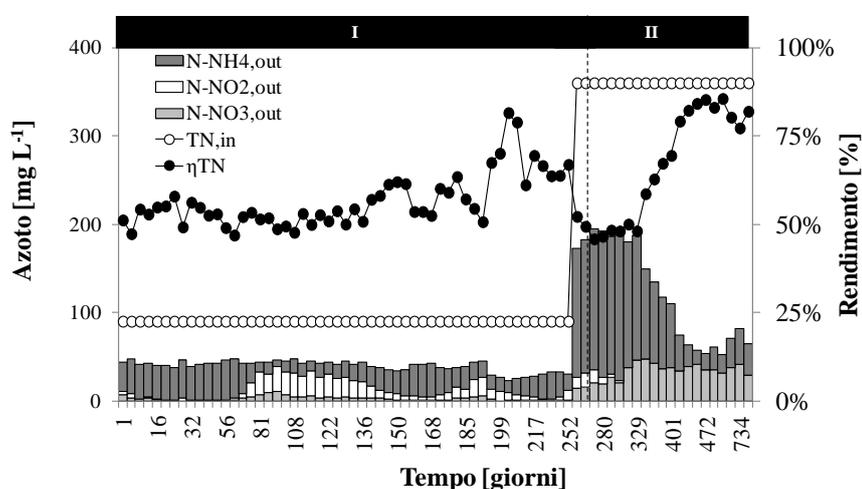
Figura 8.19: Andamento della rimozione del COD nella fase di *Feast*.

Nel primo periodo mediamente l'85% del COD veniva rimosso nella prima fase del ciclo di reazione, mentre nel secondo il COD veniva rimosso per oltre il 92%. I rendimenti così elevati nel secondo periodo sono probabilmente dovuti alla maggiore concentrazione di COD nel bulk ( $3600 \text{ mgCOD L}^{-1}$ ). Infatti, in tali condizioni il gradiente di concentrazione tra il bulk e gli strati interni dei granuli, e quindi la forza spingente del flusso di materia, era maggiore, consentendo pertanto una maggiore penetrazione del substrato nei granuli. Come già per altro discusso, ciò accelerava le cinetiche batteriche, favorendo la maggiore attività metabolica della biomassa. Il maggiore consumo di substrato determinava il sensibile aumento

della fase di *famine*, e di conseguenza il protrarsi delle condizioni di respirazione endogena. Ciò ha contribuito all'aumento della stabilità strutturale dei granuli aerobici e di conseguenza anche sulle rese di rimozione della sostanza organica che si è mantenuta su livelli alti e molto stabili a differenza del precedente periodo caratterizzato da frequenti oscillazioni.

### 8.4.1 Performance biologiche: rimozione dell'azoto

Al contrario di quanto osservato relativamente alla rimozione del carbonio, le rese di rimozione dell'azoto hanno fortemente risentito dell'instabilità strutturale dei granuli. L'andamento della concentrazione di azoto totale nell'influyente e nell'effluente, delle forme ossidate allo scarico e del rendimento di rimozione dell'azoto sono mostrati in Figura 8.20.



**Figura 8.20:** Andamento della concentrazione di azoto totale nell'alimento, delle forme ossidate allo scarico e rendimenti depurativi sul TN.

Nel primo periodo sperimentale i rendimenti di rimozione dell'azoto risultarono piuttosto modesti. Nel dettaglio, per oltre 140 giorni raramente le rese raggiunsero il 60%, mentre solo verso la fine del periodo esse aumentarono fino a raggiungere un picco pari all'80% in corrispondenza del 200° giorno. Nel secondo periodo, invece, le rese si mantennero piuttosto basse per i primi 100 giorni, presumibilmente a causa sia del forte dilavamento che aveva caratterizzato la fine del precedente periodo, che per le elevate concentrazioni di ammonio influenti, che potevano causare la formazione di ammoniaca libera in concentrazioni tali da

risultare tossica per la popolazione autotrofa. Dopo il 320° giorno, quando il sistema raggiunse la stazionarietà, soprattutto in termini di struttura dei granuli, le rese di rimozione dell'azoto aumentarono fino all'85% al termine del periodo osservato. Le forme di azoto prevalenti allo scarico nel primo periodo erano quella ammoniacale e nitrica, mentre l'azoto nitroso risultò presente in modeste concentrazioni. È interessante sottolineare come l'accumulo di nitriti allo scarico si sia verificato in due precisi momenti, ovvero tra il 70° e il 130° giorno, e successivamente tra il 175° e 210° giorno. In entrambi i periodi si ricorda che il contenuto di EPS e l'idrofobicità del fango erano entrambi molto elevati. È possibile dunque che il forte addensamento dei granuli e l'effetto barriera esercitato dalle EPS che probabilmente causavano anche l'occlusione della microporosità interna dei granuli, limitavano la diffusione dell'ossigeno al loro interno, al punto che la nitrificazione risultava ossigeno limitata, con la conseguenza che il processo di ossidazione dell'ammonio si bloccava a nitrito anziché completarsi del tutto. Nel secondo periodo invece la causa della presenza di azoto nitroso allo scarico è da attribuirsi alla presenza di ammoniaca libera, data sia dalle elevate concentrazioni di ammonio nell'influenza, che dal pH che risultava prossimo a 9.

Dall'analisi dei bilanci di massa dell'azoto si è dedotto che in entrambi i periodi il principale meccanismo di rimozione dell'azoto è stata la sintesi eterotrofa. Nel primo periodo per oltre 170 giorni esso è stato l'unico meccanismo di rimozione dell'azoto, mentre da allora in avanti si è osservato un minimo di abbattimento dell'azoto per nitrificazione e denitrificazione simultanea (SND), quantificabile intorno al 25-30%. Le rese seppur non basse sono risultate decisamente inferiori rispetto a quelle riportate nella letteratura. La causa di tale discordanza è quasi certamente legata al mancato raggiungimento di condizioni stazionarie, che non hanno consentito la piena maturazione dei granuli che di conseguenza non hanno potuto sviluppare la loro classica struttura stratificata che consente di ottenere eccellenti rese di nitrificazione e denitrificazione simultanea. Nel secondo periodo anche per i primi 100 giorni l'azoto veniva rimosso per sintesi eterotrofa (40%), confermando che l'acclimatazione dei batteri autotrofi all'interno del fango granulare è un processo più lento rispetto alla loro formazione. A partire dal 325° giorno in poi, si verificava anche la SND, che consentiva un ulteriore abbattimento dell'azoto di circa il 40%. Si fa osservare inoltre come l'inizio di tali reazioni siano coincise con l'inizio della fase stazionaria, dove i granuli avevano raggiunto una dimensione tale da risultare ben stratificati. Nonostante le buone rese osservate in questo periodo, la concentrazione di azoto allo scarico era nell'ordine dei 30 mg L<sup>-1</sup>, e la forma prevalente era quella dei nitriti. Ciò indicava che le reazioni di nitrificazione non riuscivano a completarsi a causa dell'ammoniaca libera ma, allo stesso tempo, neanche la denitrificazione era completa. Quest'ultima osservazione può essere in parte dovuta alle dimensioni medie dei granuli e, in particolare, al fatto che la frazione di granuli con dimensioni superiori ai 2 mm era prossima al 15%. Come osservato da **Di Bella e Torregrossa, (2013)**, solo in

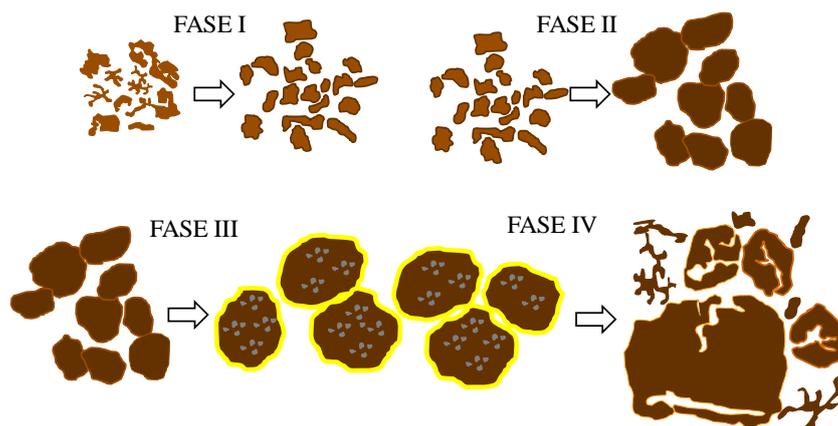
granuli di dimensioni superiori ai 2 mm si ha la formazione di uno strato anossico tale da consentire l'ottenimento di elevate rese di denitrificazione. Tuttavia, ciò non è stato l'unico fattore ad aver ridotto i rendimenti di denitrificazione. Come evidenziato nel paragrafo performance, nel secondo periodo più del 95% del carbonio veniva ossidato in fase di *feast* e, pertanto, in quella di *famine*, dove si realizzano le reazioni di SND (**Mosquera-Corral et al., 2005**), la quantità di substrato organico era davvero modesta, tale da risultare con ogni probabilità limitante per la riduzione dei nitrati prodotti dalla nitrificazione.

## 8.5 Modello concettuale: ruolo delle EPS nella perdita di stabilità dei granuli

I risultati finora discussi hanno evidenziato come i fenomeni di rottura e formazione dei granuli si sono ripetuti ciclicamente, così come l'aumento e la riduzione del contenuto di EPS, dell'idrofobicità, del rapporto tra i solidi sospesi totali e volatili, delle cinetiche. In altri studi in letteratura è stato ipotizzato che una delle cause della rottura ciclica dei granuli nel lungo periodo fossero proprio le EPS, le stesse sostanze che vengono ritenute essere cruciali per la formazione e il mantenimento strutturale dei granuli (**Chen et al., 2010; Lu et al., 2012**).

Tali autori ritengono che col tempo le EPS determinano la progressiva occlusione della microporosità interna dei granuli che mette in comunicazione l'interno del granulo con il bulk esterno e che per tanto costituisce la via d'accesso e di uscita dei nutrienti e dei cataboliti di reazione. L'accumulo di questi ultimi all'interno dei granuli è anche causa dell'instaurarsi di reazioni di fermentazione al loro interno, il cui accumulo di gas è a sua volta causa dell'implosione dei granuli stessi che si fratturano e successivamente si sfaldano in maniera definitiva (**Lemaire et al., 2008**). L'analisi di dettaglio sulle EPS condotto in questo studio consente di spingersi oltre e di spiegare più nel dettaglio lo sviluppo di questo processo. Nel corso dell'intero processo di granulazione osservato nel primo periodo, sono distinguibili quattro fasi come riportato in Figura 8.21:

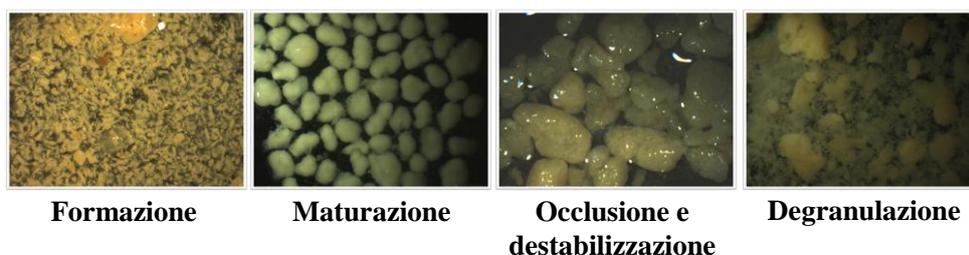
- formazione dei granuli;
- maturazione;
- occlusione della porosità e destabilizzazione dei granuli;
- rottura.



**Figura 8.20:** Modello concettuale sulla formazione e rottura dei granuli aerobici.

La prima è quella che porta alla formazione dei primi aggregati ed è quella che è stata osservata nei primi 30 giorni della sperimentazione. La seconda è quella caratterizzata, dall'aumento del contenuto di EPS caratterizzata dalla rapida formazione dei granuli, che nel corso di qualche settimana raggiungono il loro grado di maturazione evidenziato dal raggiungimento del plateau delle EPS. Da questo momento in poi inizia la terza fase, in cui le EPS iniziano a occludere la porosità interna dei granuli e a limitare in questo modo non solo il flusso dei cataboliti di reazione verso l'esterno, ma anche, e soprattutto, quello dei nutrienti in verso opposto. Ciò è chiaramente visibile dalle immagini al microscopio, nelle quali si vede che i granuli sono avvolti da una densa patina gelatinosa di natura polimerica fortemente idrofobica (Fig. 8.21). L'inizio di questa fase coincideva verosimilmente con la parte finale del plateau delle EPS. La minore disponibilità di substrato che raggiunge gli strati più interni, produce una parzializzazione del granulo, la cui parte esterna a contatto col bulk rimane biologicamente attiva, mentre quella interna no.

### Periodo I



**Figura 8.21:** Immagini dei granuli nelle quattro fasi evidenziate nel modello concettuale

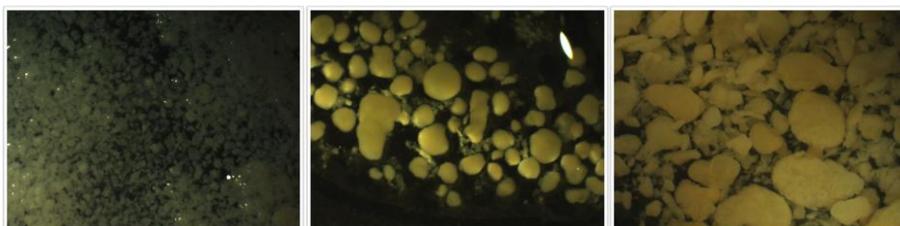
Nel complesso, il metabolismo batterico subisce un brusco decremento, come testimoniano da un lato l'aumento della fase di *feast* e dall'altro la conseguente riduzione della velocità di ossidazione del substrato. La minore frazione attiva del granulo riduce di conseguenza la velocità coi cui il substrato viene rimosso dal bulk e, allo stesso tempo, determina una minore produzione di EPS in ragione della ridotta attività metabolica. In assenza di substrati esogeni inoltre, negli strati più interni l'unica fonte di carbonio sono le EPS stesse che, quindi, vengono lentamente mineralizzate. Ciò comporta da un lato l'ulteriore riduzione del contenuto di EPS e dall'altro l'aumento della frazione inerte dei granuli. Ciò è evidenziato dalla presenza di piccole chiazze biancastre e da altre scure che evidenziano la formazione di vuoti all'interno dei granuli. La riduzione del contenuto di EPS riduce a sua volta l'idrofobicità del fango e, di conseguenza, il potere di auto-adesione tende a venire sempre meno e i granuli iniziano a fessurarsi. Nella quarta fase, corrispondente alla parte decrescente del contenuto di EPS, la perdita del potere di auto-adesione, e l'indebolimento strutturale dei granuli ne determinava il graduale sfaldamento e la progressiva trasformazione del bulk da un sistema granulare a uno ibrido, costituito da biomassa granulare e fioccosa. I fenomeni di sfaldamento più evidenti si sono osservati nei granuli di dimensioni maggiori, come dimostra la sensibile riduzione della frazione  $d_{90}$ , di entità maggiore rispetto sia alla  $d_{60}$  che  $d_{10}$ . Ciò è spiegabile col fatto che la maggiore dimensione dei granuli costituiva un ulteriore ostacolo al trasporto di materia già di per se ridotto dall'effetto barriera costituito dalle EPS.

Tutto ciò si riflette chiaramente sulle performance biologiche. Se da un lato la natura facilmente biodegradabile del substrato organico influente non ha consentito di evidenziare significativi cali nei rendimenti di rimozione del COD, lo stesso non si può dire relativamente all'azoto. La ridotta diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli a causa dell'occlusione della porosità, determinava il mancato completamento delle reazioni di nitrificazione che risultava ossigeno-limitata e che, pertanto, portava all'accumulo di nitriti. A dimostrazione di ciò si evidenzia come il picco di produzione dei nitriti (Fig.8.20) coincideva con il massimo contenuto di EPS, ovvero con il massimo grado di occlusione dei granuli. Nel momento in cui le EPS si riducevano e i pori si liberavano la nitrificazione si completava. Sembrerebbe dunque che, se da un lato le EPS determinino la formazione dei granuli, nel lungo periodo ne causano la rottura e la perdita dell'efficienza depurativa. Ciò è chiaramente legato al mancato raggiungimento di una condizione di equilibrio, nel senso che una quantità troppo bassa o troppo alta di EPS può comportare o la mancata formazione dei granuli aerobici, ovvero la loro rottura.

Nel secondo periodo sperimentale, dopo la maturazione del fango granulare non si sono osservate le stesse disfunzioni evidenziate nel precedente. Dopo la completa granulazione del fango infatti, i granuli aerobici si sono mantenuti strutturalmente stabili per oltre un anno fino alla fine del periodo osservato. Rispetto al primo

periodo sperimentale, in questo caso, come è stato già discusso nel paragrafo 8.3.1, sebbene da un lato la produzione di polimeri extracellulari fosse incentivata dalla più estremizzata alternanza di condizioni di *feast* e *famine*, dall'altro il consumo di EPS e di proteine in particolare nel ciclo era molto maggiore rispetto a quanto osservato prima. Infatti, nel lungo periodo di inedia, i batteri consumavano circa il 50% delle proteine e oltre il 60% dei carboidrati. Il maggiore consumo di polimeri extracellulari determinava il fatto che, nel complesso, il contenuto medio di EPS risultasse di oltre il 50% più basso rispetto al primo periodo. Ciò con ogni probabilità è stato il motivo per cui i granuli hanno raggiunto quelle condizioni di stazionarietà che nel primo periodo si sono raggiunte in maniera parziale e temporanea. Se è vero che le EPS determinavano l'occlusione dei pori dei granuli, in questo caso, proprio grazie al loro consumo, questi venivano liberati, permettendo la diffusione dei substrati dal bulk verso gli strati interni e il percorso inverso ai cataboliti. A conferma di ciò si fa notare come le cinetiche batteriche sono risultate innanzitutto pressoché costanti e, inoltre, mediamente più elevate rispetto a quanto osservato nell'altro periodo proprio in ragione del fatto che la frazione attiva del granulo risultava essere maggiore. Le osservazioni microscopiche non hanno evidenziato la formazione di granuli gelatinosi che, seppur dal punto di vista morfologico erano meno regolari e strutturalmente risultavano essere molto più resistenti (Fig.8.22).

## Periodo II



**Figura 8.22:** Immagini dei granuli nel secondo periodo.

È da sottolineare infine come a parità di contenuto di EPS e quindi ipotizzando il medesimo grado di occlusione della porosità, una durata maggiore del ciclo sia comunque favorevole al trasporto diffusivo di materia all'interno dei granuli. Con riferimento all'ossigeno, a parità di gradiente di concentrazione tra il bulk e gli strati interni dei granuli, il tempo per cui tale gradiente sussiste ed è massimo (periodo coincidente con la fase di *famine*) aumenta al crescere della durata del ciclo; pertanto la massa di ossigeno che si trasferisce all'interno del granulo in queste condizioni è maggiore.

È chiaro dunque che una minore durata dei cicli di reazione produca nel complesso un più rapido arricchimento di EPS da parte dei granuli che si traduce nel minore tempo di start-up, ma è anche vero che le stesse condizioni ne determinano il rapido soffocamento e la perdita di stabilità. Dall'altra parte, durate del ciclo maggiori rallentano il tempo di start-up ma alla fine producono granuli strutturalmente più stabili nel lungo periodo.

## 8.6 Conclusioni

In questo studio è stata analizzata la stabilità strutturale dei granuli nel lungo periodo e gli effetti della durata del ciclo di reazione. Un impianto SBR granulare è stato tenuto in funzione per 741 giorni, suddivisi in due periodi, di cui il primo caratterizzato da una breve durata del ciclo (3 ore), mentre il secondo da una elevata (12 ore). I risultati ottenuti mostrano che la granulazione del fango è stata più rapida nel primo periodo ma, al contempo, sono state evidenziate significative problematiche gestionali, dovute al periodico sfaldamento dei granuli. Nel secondo, sebbene i granuli si siano formati più lentamente, questi si sono dimostrati strutturalmente molto più stabili. È stato ipotizzato che la causa dell'instabilità strutturale dei granuli sono le EPS, che in quantità eccessive determinano l'occlusione della porosità interna (*clogging*) limitando la diffusione dei nutrienti dal bulk verso il loro interno e in verso opposto quello dei cataboliti di reazione. Ciò determina la progressiva mineralizzazione del nucleo dei granuli e la diminuzione della frazione attiva dei granuli stessi. La riduzione dell'attività metabolica produce la minor produzione di EPS e la perdita della struttura portante del granulo stesso che, pertanto, inizia a fessurarsi e successivamente a sfaldarsi del tutto. Al crescere della durata del ciclo, il protrarsi delle condizioni di respirazione endogena induce i batteri da un lato a produrre più EPS ma, allo stesso tempo, a consumarne di più. In questo modo l'effetto *clogging* non si verifica e i granuli riescono a mantenere la loro integrità per un periodo più lungo.

## 8.7 Bibliografia

- Adav, S.S. and Lee, D.J. (2008). Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *Journal of Hazardous Materials* 154(1-3), 1120-1126.
- Adav, S.S., Lee, D.J., Lai, J.Y. (2010). Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1601–1610.
- Beun, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (2002). Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research* 36(3), 702-712.
- Chao, Y., Guo, F., Fang, H.H.P., Zhang, T. (2014). Hydrophobicity of diverse bacterial populations in activated sludge and biofilm revealed by microbial adhesion to hydrocarbons assay and high-throughput sequencing. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 114, 379–385.
- Chen, J.W., Ji, Q.X., Zheng, P., Chen, T.T., Wang, C.H., Mahmood, Q. (2010). Floatation and control of granular sludge in a high-rate anammox reactor. *Water Research* 44, 3321–3328.
- Di Bella, G., Torregrossa, M. (2013). Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. *Bioresource Technology* 142, 706-713.
- Isanta, E., Suarez-Ojeda, M., Val del rio, A., Morales, N., Perez, J., Carrera, J. (2012). Long term operation of a granular sequencing batch reactor at pilot scale treating a low-strength wastewater. *Chemical Engineering Journal* 198-199, 163-170.
- Lee, D.J., Chen, Y.Y., Show, K.Y., Whiteley, C.G., Tay, J.H. (2010). Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation. *Biotechnology Advances* 28, 919–934.
- Lemaire, R., Webb, R., Yuan, Z. (2008). Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater. *The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal* 2, 528-541.
- Li, X., Li, Y., Liu, H., Hua, Z., Du, G., Chen, J. (2007). Characteristics of aerobic biogranules from membrane bioreactor system. *Journal of membrane science* 287, 294-299.
- Liu, Y.Q., Tay, J.H. (2008). Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresource and Technology* 99, 980-985.
- Long, B., Yang, C.Z., Pu, W.H., Yang, J.K., Jiang, G.S., Dan, J.F., Li, C.Y., Liu, F.B. (2014). Rapid cultivation of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* 166, 57–63.

- Lu, H., Zheng, P., Ji, Q., Zhang, H., Ji, J., Wang, L., Ding, S., Chen, T., Zhang, T., Tang, C., Chen, J. (2012). The structure, density and settleability of anammox granular sludge in high-rate reactors. *Bioresource Technology* 123, 312–317.
- Mosquera-Corral, A., de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., 2005. Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Research* 39, 2676-2686.
- Pijuan, M., Werner, U., Yuan, Z. (2011). Reducing the startup time of aerobic granular sludge reactors through seeding floccular sludge with crushed aerobic granules. *Water Research* 45, 5075-5083.
- Schwarzenbeck, S., Erley, S., Wilderer, P.A. (2004). Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. *Water Science and Technology* 49(11–12), 41–46.
- Verawaty, M., Tait, S., Pijuan, M., Yuan, Z. and Bond, P.L. (2013). Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Research* 47(14), 5338-5349.
- Winkler, M.K.H., Bassin, J.P., Kleerebezem, R., van der Lans, R.G.J.M., van Loosdrecht, M.C.M., (2012). Temperature and salt effects on settling velocity in granular sludge technology. *Water Research* 46, 3897-3902.
- Zhang, H., He, Y., Jiang, T. and Yang, F. (2011). Research on characteristics of aerobic granules treating petrochemical wastewater by acclimation and co-metabolism methods. *Desalination* 279 (1-3), 69-74.
- Zheng, Y.M., Yu, H.Q., Liu, S.J., Liu, X.Z. (2006). Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere* 63, 1791–1800.
- Zhu, L., Lv, M., Dai, X., Yu, Y., Qi, H., Xu, X. (2012a). Role and significance of extracellular polymeric substances on the property of aerobic granule. *Bioresource Technology* 107, 46–54.
- Zhu, L., Qi, H.Y., Lv, M.L., Kong, Y., Yu, Y.W. and Xu, X.Y. (2012b). Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies. *Bioresource Technology* 124, 455-459.

## Capitolo 9

# Stabilità strutturale dei granuli aerobici in un impianto MBR a flusso continuo

### 9.1 Introduzione e obiettivi dello studio

La tecnologia dei fanghi granulari aerobici si sta sensibilmente sviluppando nel corso degli ultimi anni al fine di migliorare le performance degli impianti convenzionali a fanghi attivi. Non solo, tali sistemi richiedono minori volumetrie dei reattori biologici in quanto la concentrazione di biomassa che è possibile mantenere all'interno del sistema è dell'ordine di 10-20 gSST L<sup>-1</sup>. Inoltre, i fanghi granulari grazie alla loro struttura stratificata riescono a rimuovere in maniera simultanea il carbonio e i nutrienti all'interno di un unico bacino di reazione, senza la necessità di operare in più unità in serie, ovvero alternare fasi di aerazione e miscelazione all'interno della stessa unità. Le loro eccellenti caratteristiche di sedimentabilità, inoltre, fanno sì che la fase di sedimentazione non sia più il collo di bottiglia del sistema biologico. Fino ad oggi i fanghi granulari aerobici sono stati ampiamente studiati in impianti operanti in batch (SBR), nei quali l'alimentazione, le reazioni biochimiche, la sedimentazione e lo scarico dell'effluente si susseguono temporalmente. Molti autori sostengono che le condizioni ideali per la granulazione del fango attivo si sviluppano in tali tipi di sistemi. Infatti, l'alternanza di periodi di *feast* e *famine* (Val del Rio et al., 2012), la pressione di selezione idraulica data dai bassi tempi di sedimentazione (Adav et al., 2009a; Liu e Tay, 2015) e, infine, gli sforzi idrodinamici (Liu e Tay, 2015) sono ritenuti parametri chiave per il successo della granulazione. Molti di questi sono prerogative dei sistemi ad alimentazione discontinua, poiché l'alternanza di periodi di abbondanza e scarsità di substrato, e i bassi tempi di sedimentazione, si verificano naturalmente ovvero possono essere facilmente controllati contemporaneamente in questi sistemi. L'alternanza di periodi di *feast* e *famine*, oltre ad essere un parametro cruciale per la formazione dei granuli aerobici, è fondamentale per la loro stabilità. Val del Rio et al. (2012) riportano infatti che durante le condizioni di inedia, solo i batteri che hanno accumulato sufficienti prodotti di stoccaggio nella precedente fase di abbondanza riescono a sopravvivere. Tale capacità è esclusivamente tipica dei batteri fiocco-formatori, di conseguenza,

la proliferazione di batteri filamentosi è inibita. In tal senso, l'alternanza di periodi di *feast* e *famine* è una forma di selezione per i batteri che hanno capacità di aggregazione. In maniera analoga, gli sforzi di taglio idrodinamici hanno un ruolo decisivo nella formazione dei granuli in quanto compattano e modellano morfologicamente gli aggregati, dando loro una struttura densa e regolare. Riguardo la pressione di selezione idraulica invece, non ci sono esperienze in letteratura che esplicitano la loro funzione sulla stabilità dei granuli una volta che gli stessi si sono formati.

I reattori sequenziali sono difficilmente applicabili in grandi impianti, poiché richiedono elevati volumi di compenso a monte altrimenti diverse unità operanti in parallelo. Sebbene non necessitino di unità di chiarificazione separate, il loro funzionamento a livello variabile, che comporta notevoli spese energetiche per il sollevamento di grossi volumi, e la scarsa inerzia nei confronti di eventuali sostanze tossiche influenti, fanno sì che i reattori a flusso continuo siano ancora preferibili in impianti di medio-grandi potenzialità, stante i minori costi gestionali e la più semplice gestione (**Juang et al., 2010**). Poiché la formazione dei granuli aerobici richiede precise condizioni di processo, la loro coltivazione in impianti a flusso continuo è alquanto difficile da ottenere. Tuttavia, la stabilità strutturale dei granuli precedentemente coltivati in impianti in discontinuo, in sistemi operanti a flusso continuo non è stata ancora studiata in modo dettagliato. Sebbene alcuni autori riportano che la granulazione del fango attivo può ottenersi anche in impianti a flusso continuo in precise condizioni operative, la loro stabilità nel lungo periodo ne risulta notevolmente compromessa. **Chen et al. (2009)** riportano che in granuli aerobici negli impianti a flusso continuo perdono stabilità nel lungo periodo più facilmente di quanto accada negli impianti sequenziali. Tuttavia, non c'è assoluta certezza sulle cause della rottura dei granuli, poiché negli impianti a flusso continuo, i parametri cruciali per la granulazione vengono meno in modo simultaneo.

Inoltre, una volta che i granuli aerobici si sono formati, essi crescono fino a raggiungere una dimensione cosiddetta critica, raggiunta la quale, i granuli perdono stabilità (**Verawaty et al., 2013**). Di conseguenza, per fenomeni di attrito e per le collisioni con le altre particelle, tendono a sfaldarsi, determinando da un lato, il peggioramento della qualità dell'effluente e, dall'altro, perdite di importanti quantità di biomassa. In questi casi un efficiente sistema di separazione solido-liquido potrebbe essere utile ad evitare tali disfunzioni. In questo contesto, l'utilizzo di moduli di membrane di filtrazione potrebbe essere una soluzione ottimale per evitare massicci dilavamenti di biomassa e per migliorare ulteriormente la qualità dell'effluente.

L'obiettivo di questa parte della tesi è stato quello di valutare la stabilità strutturale dei granuli aerobici in un impianto MBR a flusso continuo caratterizzato da una particolare configurazione idrodinamica. Nel dettaglio, lo scopo era quello di

realizzare una unità in cui l'alternanza di condizioni di *feast* e *famine* avvenisse nello spazio piuttosto che nel tempo e dove gli sforzi di taglio idrodinamici fossero quanto più simili possibile a quelli che si sviluppano negli impianti colonnari. Inoltre, è stato effettuato uno studio sul fouling della membrana, seppur questo non fosse il principale obiettivo dello studio.

## 9.2 Materiali e Metodi

L'impianto utilizzato per la sperimentazione aveva un volume operativo di 7,5 L, e ha lavorato con una portata costante pari a  $0,7 \text{ L h}^{-1}$ . La configurazione del reattore è mostrata in Figura 9.1.

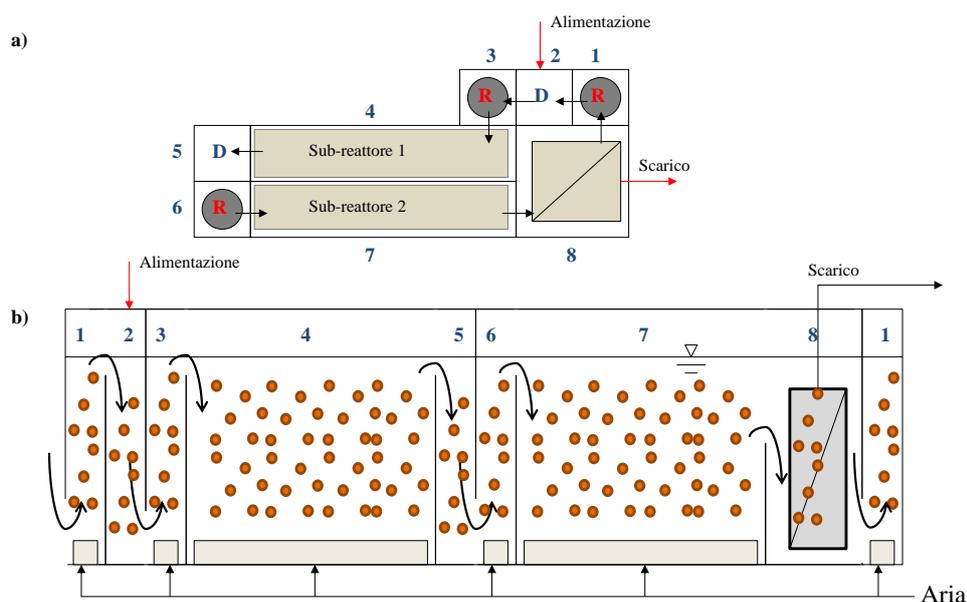
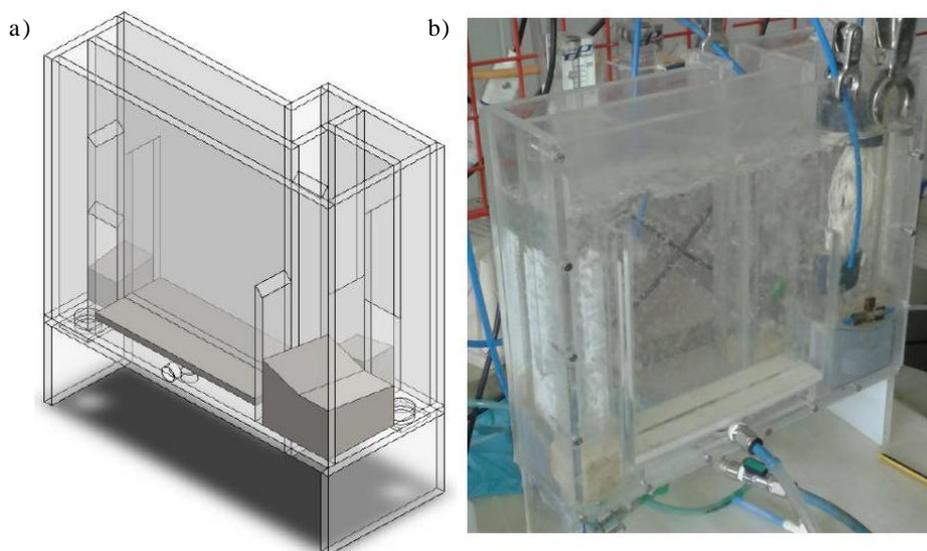


Figura 9.1: Schema dell'impianto (a) e sviluppo longitudinale del flusso (b).

Nel dettaglio, l'impianto è stato progettato in modo da ricreare le stesse condizioni idrodinamiche che si realizzano negli impianti colonnari operanti in discontinuo. Dal punto di vista geometrico, il reattore era costituito da due comparti principali con sviluppo prevalentemente longitudinale, di dimensioni  $4 \times 16 \text{ cm}$ , e da un comparto finale di sezione quadrata, di dimensioni  $8 \times 8 \text{ cm}$ , all'interno del quale è stata collocata una membrana a fibre cave della GE Zenon ZW10 (superficie nominale  $0,093 \text{ m}^2$ , dimensione dei pori  $0,04 \mu\text{m}$ ). Questi comparti erano idraulicamente collegati da altri 5 comparti di sezione quadrata ma più piccoli ( $4 \text{ cm}$ ), funzionanti alternativamente da riser (R) e da downcomer (D). All'interno dei

comparti funzionanti da riser sono stati posizionati dei diffusori d'aria che tramite l'insufflazione di aria consentivano il pompaggio idraulico della miscela nei compartimenti successivi tramite stramazzi superficiali. Nei downcomer, il fondo è stato opportunamente sagomato in modo da evitare l'accumulo di granuli. Sul fondo di tali unità sono state previste delle luci sotto-battenti che li mettevano in comunicazione con i riser (Fig.9.2).



**Figura 9.2:** Vista assonometrica dell'impianto (a) e foto del reattore durante una prova idraulica (b).

L'impianto è stato alimentato con refluo sintetico a base di acetato di sodio, secondo la ricetta indicata da **Beun et al. (2002)**. Una vista globale dell'impianto è riportata in Figura 9.3. L'alimentazione avveniva mediante una pompa peristaltica, mentre per lo scarico sono state utilizzate due pompe peristaltiche operanti rispettivamente per la suzione e il controlavaggio della membrana. Entrambe le pompe sono state collegate ad un timer che ne comandava l'accensione e lo spegnimento secondo la durata del ciclo di suzione-controlavaggio imposta. Il ciclo di suzione e controlavaggio aveva una durata complessiva di 6 minuti, di cui 4,5 minuti era il tempo di suzione del permeato, mentre il restante tempo era utilizzato per il pompaggio di un'aliquota di permeato attraverso le fibre della membrana. Il permeato veniva accumulato all'interno di un'apposita vaschetta (CIP). La membrana è stata collegata ad un vacuometro che segnava le pressioni transmembrana (TMP) che venivano monitorate giornalmente per l'analisi del fouling. L'erogazione dell'aria avveniva attraverso un compressore identico a quello utilizzato per la sperimentazione descritta al capitolo 5. Infine l'impianto è stato

equipaggiato di una coppia di sensori di livello necessari ad evitare la tracimazione in caso di interruzione o riduzione del flusso di permeato in uscita.

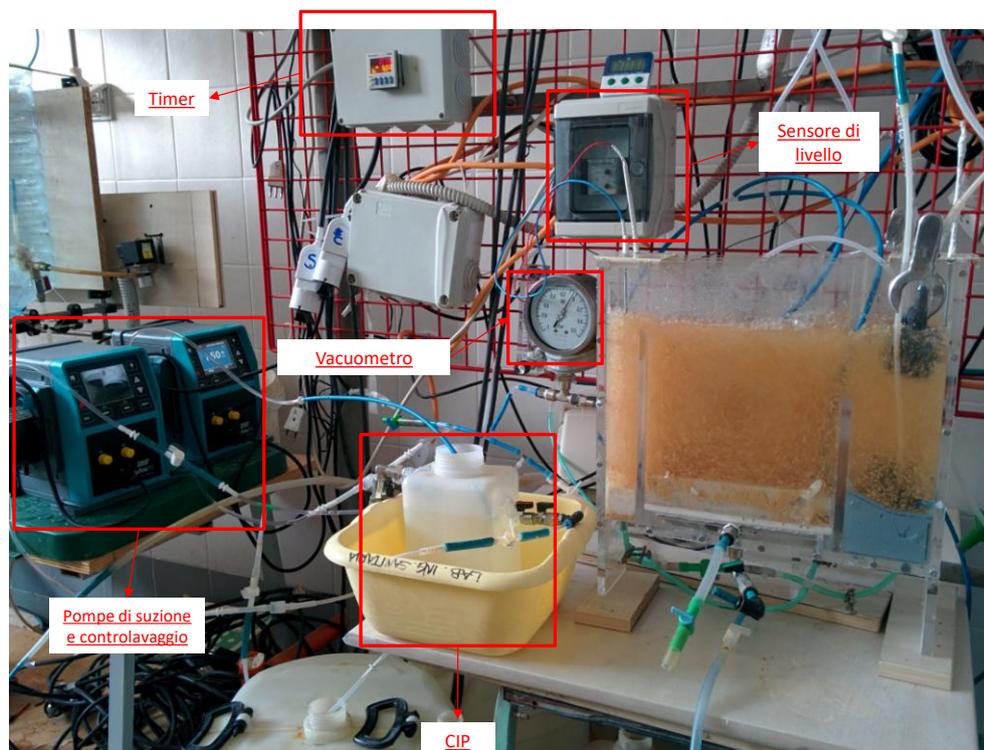


Figura 9.3: Vista globale dell'impianto

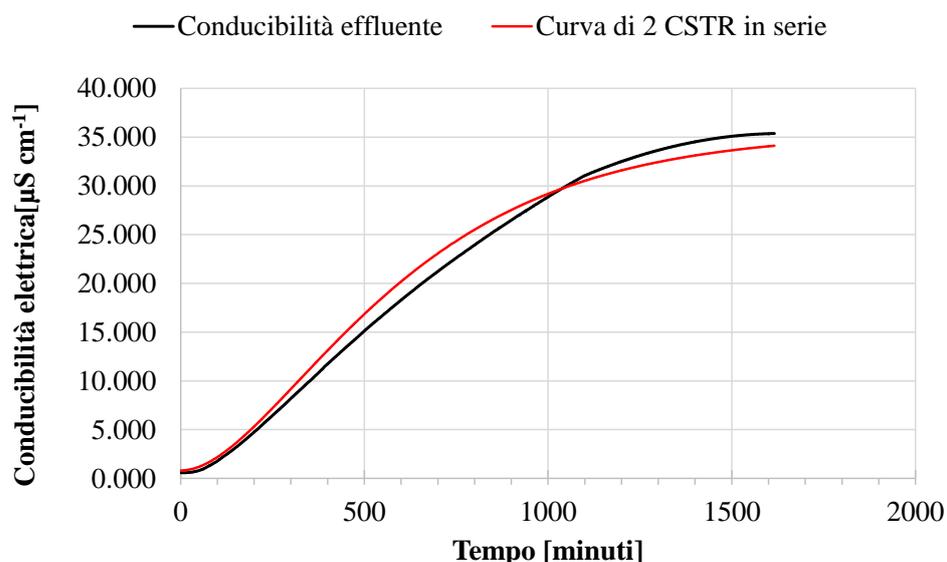
### 9.3 Verifica idrodinamica

Prima di procedere all'inoculo dell'impianto, è stata effettuata una verifica sull'idrodinamica del reattore. Per lo svolgimento di questo test è stata utilizzata una soluzione di cloruro di sodio a  $350 \text{ g L}^{-1}$  come tracciante idraulico (conducibilità pari a  $140 \text{ mS cm}^{-1}$ ). Nel dettaglio, il reattore è stato preventivamente riempito con acqua di rete, di cui è stata registrata la conducibilità (conducibilità di base), successivamente il tracciante è stato alimentato con segnale a gradino con un flusso pari alla portata di progetto ( $0,7 \text{ L h}^{-1}$ ) per 24 ore. È stata poi misurata la conducibilità nell'effluente fino al raggiungimento di condizioni stazionarie. Quindi la curva della conducibilità nell'effluente è stata confrontata con diversi modelli idrodinamici (Collivignarelli et al., 1995). Il miglior fitting si

è avuto con la curva rappresentativa di due reattori a completa miscelazione posti in serie:

$$C = C_b + C_0 i_b + C_0 \left[ 1 - e^{\frac{-N_t(1-i_b)}{TDI(1-i_d)}} \sum_{i=0}^{N_t-1} \frac{N_t^i}{i!} \left( \frac{t(1-i_b)}{TDI(1-i_d)} \right)^i \right] (1-i_b) \quad (\text{eq. 9.1})$$

Dove,  $C$ ,  $C_b$  e  $C_0$  sono rispettivamente la conducibilità dell'effluente, dell'acqua di rete e della soluzione di tracciante;  $i_b$ ,  $i_d$  e  $N_t$  sono in ordine, l'indice di by-pass, l'indice di volume morto e il numero di reattori in serie. Infine TDI è il tempo di detenzione idraulico teorico dato dal rapporto tra il volume del reattore ( $L$ ) e la portata ( $L h^{-1}$ ). Il fitting tra le due curve è mostrato in Figura 9.4.



**Figura 6.4:** Risultato della verifica idrodinamica

Dal punto di vista idrodinamico il reattore risultava costituito da due sub-reattori posti in serie, di cui il primo, prossimo alla zona di immissione (sub-reattore 1) operava come unità ad alto carico, mentre l'altro, prossimo alla zona di estrazione del permeato (sub-reattore 2) operava come unità a basso carico. In questo modo, l'alternanza di fasi ad alto e basso carico che negli impianti SBR si susseguono temporalmente, in questo caso avvengono nello spazio. Inoltre, da un lato la presenza dei riser e dei downcomers, e dall'altro la configurazione geometrica dei due comparti principali, garantivano elevati sforzi di taglio idrodinamici.

## 9.4 Metodiche analitiche

Nel corso della campagna sperimentale sono state effettuate analisi finalizzate alla caratterizzazione fisica dei granuli e all'analisi delle performance di processo. Nel dettaglio, per quanto riguarda il primo tipo di analisi sono state effettuate misure di solidi sospesi totali e volatili nella miscela aerata, misure di EPS, idrofobicità, densità e contenuto d'acqua dei granuli, e infine specifiche misure granulometriche. Per le performance biologiche sono state monitorate le concentrazioni nell'influenza e nell'effluente di COD, delle forme azotate e del fosforo. Le metodiche analitiche utilizzate sono state identiche a quelle descritte nel capitolo 5 al paragrafo 2, in accordo alle metodiche **APHA (2005)**. Riguardo le misure granulometriche, oltre al calcolo del diametro medio dei granuli, è stata costruita la curva granulometrica, e da questa si sono ricavati i valori dei percentili al 10, 60 e 90%. Tali parametri indicati come  $d_{10}$ ,  $d_{60}$  e  $d_{90}$  rappresentano rispettivamente il diametro cui corrisponde una percentuale di particelle di dimensioni maggiori rispettivamente del 10%, 60% e 90%. Ad esempio il  $d_{90}$  è il diametro della distribuzione per il quale il 90% di particelle hanno dimensioni superiori a quel diametro stesso.

Per quanto riguarda la caratterizzazione della membrana questo è stato eseguito valutando le variazioni di TMP a flusso costante tramite un vacuometro analogico a glicerina collegato alla testa superiore della membrana. Il vacuometro è stato collocato in modo da far coincidere il suo baricentro con la quota media assunta dal pelo libero all'interno del comparto della membrana; così facendo la pressione misurata dal vacuometro è coincisa con la TMP.

L'analisi del fenomeno di sporramento è stata prevalentemente basata sulla valutazione della permeabilità in relazione all'incremento delle TMP, alla diminuzione del flusso di permeato  $o$ , in senso più globale, alla variazione della resistenza idraulica alla permeazione valutata mediante l'equazione:

$$R = \frac{TMP}{\mu \cdot J} \quad (eq. 9.2)$$

Dove:

- TMP è la pressione transmembrana;
- $\mu$  è la viscosità del permeato, assunta pari a 0,001 Pa·s;
- J è il flusso di permeato estratto calcolato mediante l'equazione:

$$J = \frac{Qp}{A} \quad (\text{eq. 9.3})$$

essendo  $Qp$  è la portata di permeato misurata mediante prove in cilindro graduato e  $A$  è la superficie della membrana.

Ai fini della determinazione della resistenza totale occorre considerare innanzitutto la resistenza intrinseca della membrana ( $R_m$ ) che può essere valutata applicando semplicemente la relazione (eq.9.2) durante la filtrazione di acqua pulita per un valore del flusso (costante) pari a quello di progetto (**Meng et al., 2005; Busch et al., 2007**).

La resistenza  $R_m$  è stata misurata prima dell'inoculo del primo periodo risultando pari a  $3,91 \cdot 10^{11} \text{ m}^{-1}$ . Le altre resistenze sono state valutate basandosi sull'osservazione quotidiana di un ciclo di filtrazione preso come riferimento, definito "*ciclo d'interesse*", in cui è stata analizzata la variazione di TMP durante il periodo di suzione a flusso costante. Il valore di resistenza totale è dovuto alla resistenza intrinseca della membrana ( $R_m$ ) più la resistenza del fouling, a sua volta classificabili in fouling reversibile  $R_{rev}$  ed irreversibile  $R_{irr}$ . Il fouling reversibile è quello dovuto al deposito superficiale sulla membrana che viene rimosso tramite l'operazione di controlavaggio ("*cake reversibile*"). Il fouling irreversibile è dovuto in parte al deposito di materiale sulla superficie della membrana che il controlavaggio non riesce a rimuovere, denominato come "*cake irreversibile*" rimuovibile solo tramite lavaggio fisico, e alle sostanze accumulate all'interno dei pori della membrana nei cicli precedenti che costituiscono il cosiddetto "*pore blocking*" rimuovibile a mezzo di lavaggi chimici.

$$R_{tot} = R_m + R_{rev} + R_{irr} = R_m + R_{cake, rev} + R_{cake, irr} + R_{pb} \quad (\text{eq. 9.4})$$

La resistenza totale veniva calcolata tramite l'equazione 1, previa misura del flusso di permeato e della TMP all'interno del reattore. Successivamente si procedeva al lavaggio fisico della membrana che provvedeva all'eliminazione del cake reversibile ed irreversibile. Dopo il lavaggio fisico veniva monitorato un ciclo di interesse all'interno del refluo sintetico e si calcolava la  $R_{tot}^*$ , nota la quale e quella intrinseca della membrana, si calcolava per differenza la resistenza del "*pore blocking*":

$$R_{pb} = R_{tot}^* - R_m \quad (\text{eq. 9.5})$$

Infine, la membrana veniva riposizionata all'interno del reattore e si monitorava il primo ciclo, durante il quale si aveva la deposizione del solo cake reversibile. Di conseguenza, la differenza tra la resistenza misurata dopo il ciclo nel refluo

sintetico ( $R^*$ ) e quella nel reattore dopo il lavaggio fisico ( $R^{**}$ ) forniva il valore della resistenza del “*cake reversibile*”:

$$R_{\text{cake, rev}} = R^{**\text{tot}} - R^{*\text{tot}} \quad (\text{eq. 9.6})$$

Infine, la resistenza del “*cake irreversibile*” si calcolava come differenza tra la resistenza della membrana nel reattore prima e dopo il lavaggio fisico:

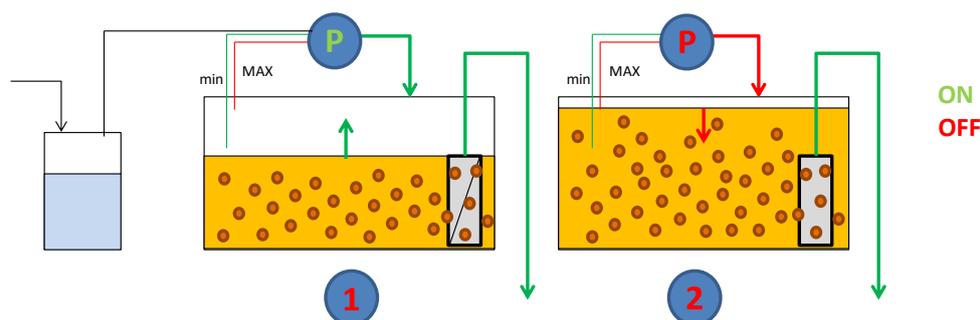
$$R_{\text{cake, irr}} = R_{\text{tot}} - R^{**\text{tot}} \quad (\text{eq. 9.7})$$

## 9.5 Set-up sperimentale

L'impianto è stato inoculato con granuli aerobici coltivati in un impianto SBR colonnare operante con una portata di 14 L d<sup>-1</sup> e un carico volumetrico giornaliero di 3.6 kgCOD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. I granuli erano caratterizzati da una superficie regolare, una struttura densa e compatta e una dimensione media di circa 1,9 mm.

L'impianto pilota ha operato complessivamente per 72 giorni, divisi in due periodi distinti. Durante il primo periodo (42 giorni), l'impianto ha operato con alimentazione in continuo. Tuttavia, l'alternanza di condizioni di *feast* e *famine* non è stata osservata. Ciò è stato addebitato da un lato alla geometria del primo comparto di reazione, e dall'altro all'idrodinamica dei granuli all'interno del sistema. In particolare, il primo comparto di reazione aveva un volume di circa 2,5 L, e di conseguenza il tempo di permanenza idraulico era pari a 3,5 ore. Nei reattori SBR, la durata della fase di *feast* è solitamente minore e raramente supera i 40-45 minuti, soprattutto se il refluo è sintetico a base di acetato di sodio (**Di Bella e Torregrossa, 2013**). Da questo punto di vista è possibile che tale comparto risultasse sovradimensionato, il che determinava il fatto che i batteri ossidassero direttamente il substrato organico anziché creare dei prodotti di stoccaggio come solitamente accade nei reattori SBR in tale periodo (**Zhu et al., 2012**). Inoltre, si è osservato che i granuli compivano l'intero percorso mostrato in figura, in breve tempo (circa 10 minuti). Di conseguenza, il tempo di permanenza nell'unità a basso carico era decisamente minore a quanto preventivato, col risultato che, da un lato la fase di *inedia* durava troppo poco, e dall'altro che i granuli giungevano nel comparto ad alto carico non sufficientemente “affamati”. In tali condizioni, l'alternanza delle condizioni di *feast* e *famine* non si verificava come previsto. A conferma di ciò, misure di ossigeno disciolto nelle due unità in serie non evidenziavano significative differenze (7 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>), cosa che invece accade nei sistemi SBR, dove nella fase di *feast* la concentrazione è solitamente nell'ordine dei 2-4 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, mentre in quella di *famine* raggiunge valori prossimi alla saturazione (7-8 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) (**Mosquera-Corral et al., 2005**).

Al fine di promuovere l'alternanza di condizioni di *feast* e *famine*, nel secondo periodo sperimentale (30 giorni), l'impianto fu alimentato in discontinuo. In dettaglio, lo scarico dell'effluente avveniva sempre in maniera continua, mentre l'alimento veniva caricato in modo discontinuo con una portata maggiore rispetto a quella dello scarico. Di conseguenza l'impianto operava a volume variabile. Nel dettaglio, è stata installata una coppia di sensori di livello, posizionati a un livello di minimo e massimo riempimento, che comandavano rispettivamente l'accensione e lo spegnimento della pompa di alimentazione. Un tipico ciclo di reazione avveniva come illustrato in Figura 9.5. La pompa di alimentazione si accendeva quando il sensore di livello minimo era scoperto. Poiché la portata influente era maggiore rispetto a quella di estrazione del permeato, il livello in vasca saliva rapidamente, fin quando si copriva il sensore di livello massimo che comandava lo spegnimento della pompa di alimentazione. Quindi il livello idraulico diminuiva in virtù della suzione del permeato, fin quando si scopriva nuovamente il sensore di livello minimo. Il volume compreso tra il livello di minimo e di massimo era di circa 2 L. La portata influente era pari a  $4 \text{ L h}^{-1}$ , mentre quella di estrazione del permeato al netto di quella di controlavaggio era pari a  $0,7 \text{ L h}^{-1}$ . Di conseguenza, la fase di riempimento aveva una durata di circa 35 minuti, mentre quella di svuotamento durava circa 3 ore. A monte del reattore è stato previsto una vasca di carico del volume di 3 L che veniva continuamente alimentata. Tale vasca aveva ruolo di compenso idrico. Nel dettaglio, durante la fase di svuotamento del reattore tale vasca si riempiva, mentre essa veniva rapidamente svuotata durante la fase di riempimento del reattore.



**Figura 9.5:** Schema di funzionamento del reattore durante il secondo periodo della sperimentazione: fase 1- riempimento, fase 2 – svuotamento.

Con questa modalità di funzionamento, durante la fase di carico il carico organico influente era alto e si riproducevano le condizioni di *feast*, mentre durante la fase di scarico il reattore non essendo alimentato era in fase di *famine*. A conferma della corretta alternanza delle due fasi, sono state effettuate misure di ossigeno disciolto nella miscela aerata (Figura 9.6). I risultati ottenuti hanno evidenziato che durante

la fase di carico la concentrazione di ossigeno era pari a circa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  mentre durante la fase di scarico aumentava fino a  $8 \text{ mg L}^{-1}$ , a testimonianza dell'effettiva alternanza di condizioni di alto e basso carico.

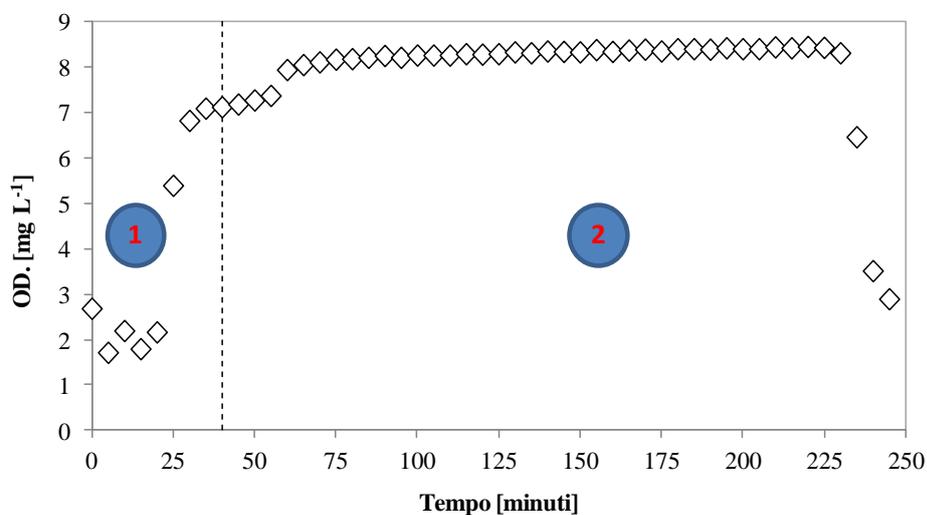


Figura 9.6: Andamento della concentrazione dell'ossigeno disciolto in un ciclo di funzionamento del secondo periodo.

Nella Tabella 9.1 sono riassunti i principali parametri operativi dell'impianto e le concentrazioni di carbonio e nutrienti nell'alimento sintetico.

Tabella 9.1: Parametri operativi e concentrazioni di carbonio e azoto nell'influyente

Parametro	Valore	Unità di misura
Volume	8	L
Portata	16,8	$\text{L d}^{-1}$
HRT	11	h
OLR	2,52	$\text{KgCOD m}^{-3}\text{d}^{-1}$
COD	1200	$\text{mg L}^{-1}$
N-NH <sub>4</sub>	60	$\text{mg L}^{-1}$
P-PO <sub>4</sub>	15	$\text{mg L}^{-1}$

## 9.6 Risultati e Discussioni

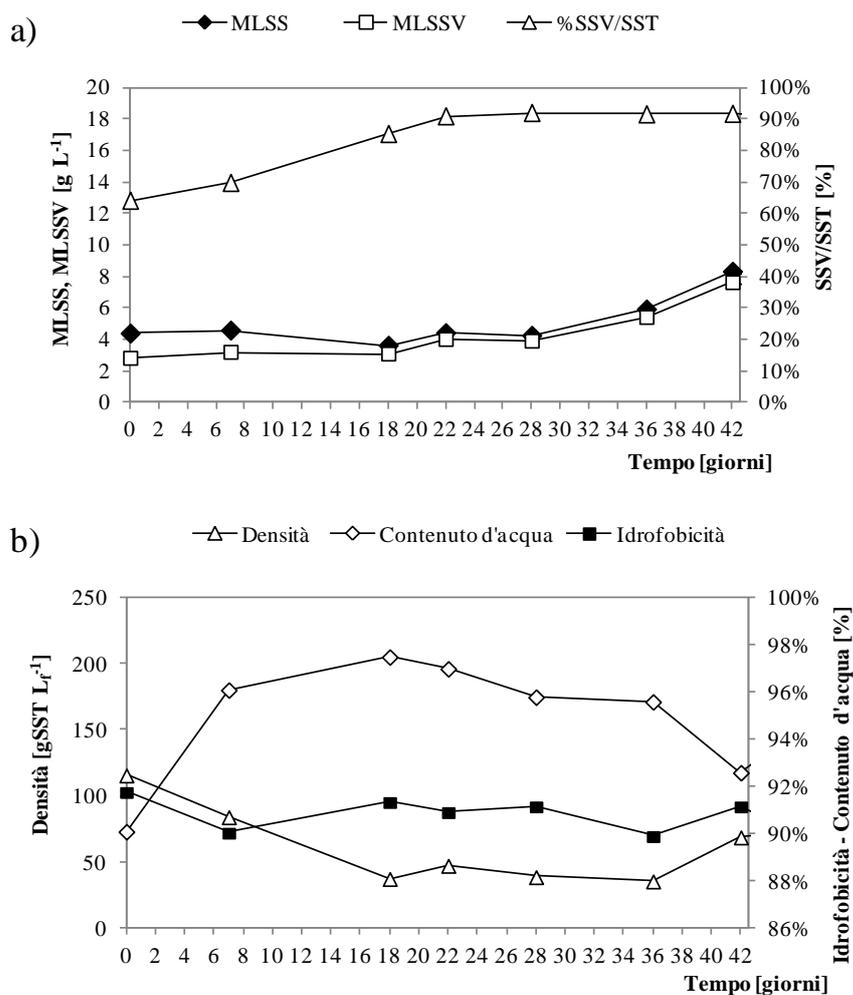
Nei successivi paragrafi sono mostrati e discussi i risultati ottenuti nei due periodi sperimentali. In particolare, sono evidenziate le modificazioni occorse alla struttura

e alla morfologia dei granuli, valutate mediante misure granulometriche e tramite analisi di densità, idrofobicità e contenuto di EPS. Successivamente vengono illustrate prima le performance depurative e dopo quelle idrauliche del sistema.

### 9.6.1 Analisi della stabilità strutturale dei granuli

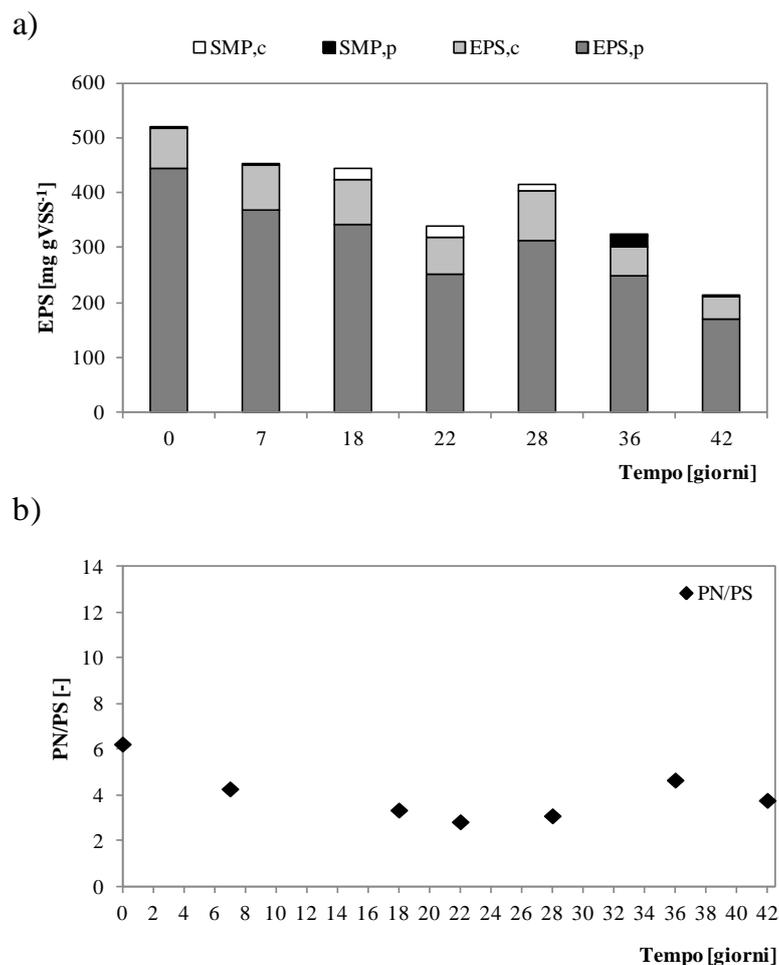
Come più volte menzionato in questa tesi, diversi sono i parametri che forniscono utili informazioni in merito alle condizioni strutturali dei granuli. Se da un lato la densità e il contenuto d'acqua danno indicazioni circa lo stato di addensamento dei granuli aerobici, dall'altro l'idrofobicità e il contenuto di EPS danno indicazioni rispettivamente circa la tendenza all'autoadesione cellulare e alla tendenza alla granulazione o allo sfaldamento degli aggregati. In questo paragrafo è mostrato come la configurazione impiantistica e processistica del reattore a flusso continuo abbia inciso sull'evoluzione di questi parametri nel corso dei due periodi osservati, e come gli stessi abbiano influenzato la struttura e la morfologia dei granuli aerobici.

Come già detto, il reattore è stato inoculato con fango granulare precedentemente coltivato in un impianto SBR e la dimensione dei granuli inoculati era pari a circa 1,9 mm; inoltre questi erano caratterizzati da una struttura compatta e morfologicamente regolare. Nel corso del primo periodo sperimentale, i granuli persero rapidamente la loro integrità strutturale, risultando in aggregati poco addensati e strutturalmente instabili. Il contenuto di solidi sospesi totali rimase pressoché stabile nella prima parte del primo periodo, mentre aumentò leggermente verso la fine dello stesso (Figura 9.7a). Ciò fu dovuto alla elevata frequenza di esecuzione di lavaggi fisici della membrana (dati discussi in seguito) che comportava l'allontanamento di significativi volumi di biomassa. Contestualmente, il rapporto tra i solidi volatili e totali aumentò in maniera significativa dal 65% dei granuli di inoculo, fino al 90% dopo 20 giorni. Tale sensibile riduzione del contenuto inerte, era indice della progressiva perdita di compattezza dei granuli. Come osservato da **Verawaty et al. (2013)**, granuli con minore compattezza strutturale sono caratterizzati da un maggiore rapporto SSV/SST, in quanto la loro struttura oppone minore resistenza al flusso di materia verso gli strati più interni che di conseguenza limita l'instaurarsi di condizioni endogene e la conseguente mineralizzazione del nucleo. A conferma di ciò, la densità dei granuli diminuì da circa 100 gSST L<sup>-1</sup> (valore dell'inoculo) fino a 50 gSST L<sup>-1</sup>, proprio in corrispondenza dell'aumento del rapporto SSV/SST. In maniera analoga il contenuto d'acqua aumentò dal 90% al 97%, in ragione della maggiore porosità interna dei granuli (Figura 9.7b).



**Figura 9.7:** Andamento della concentrazione dei solidi sospesi totali e volatili e loro rapporto nel primo periodo sperimentale (a); variazione della densità, idrofobicità e contenuto d'acqua dei granuli nel periodo 1 (b).

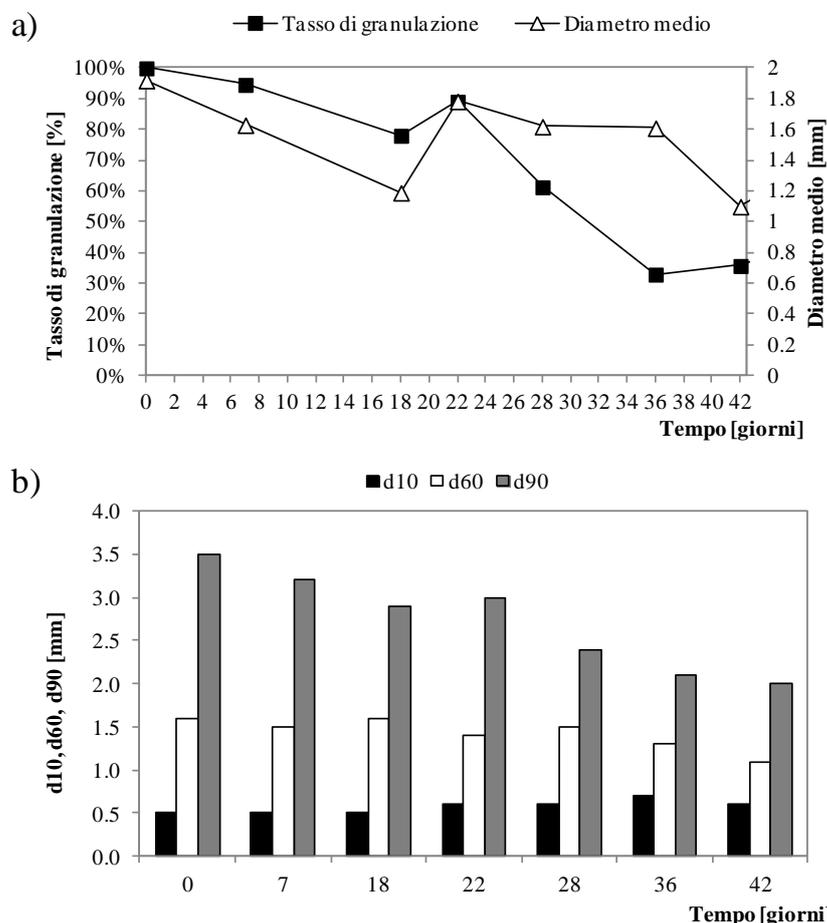
Contestualmente, il contenuto di EPS dei granuli si ridusse da circa 500 mgEPS gSSV<sup>-1</sup> a meno di 200 mgEPS gSSV<sup>-1</sup> (Figura 9.8a). Più nel dettaglio, il contenuto di proteine si ridusse in maniera più sensibile rispetto a quello dei carboidrati, e di conseguenza il rapporto PN/PS diminuì da 6 a circa 2,5 (Figura 9.8b). Tale rapporto viene indicato da diversi autori come un ottimo indicatore della stabilità strutturale dei granuli. Valori elevati infatti sono indice di granuli strutturalmente densi e compatti, mentre valori bassi, inferiori a 4, sottolineano l'imminente perdita di stabilità degli aggregati (Cydzik-Kwiatkowska et al., 2014)



**Figura 9.8:** Andamento della contenuto di EPS legate (EPS) e solubili (SMP) dei granuli (a); variazione del rapporto tra EPS proteici e carboidratici (b).

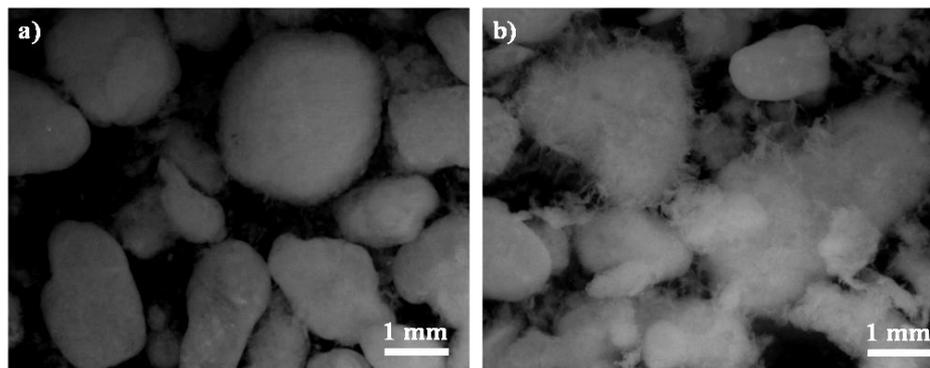
Tutti questi risultati evidenziavano e confermavano la progressiva perdita di stabilità dei granuli. La minore densità, l'aumento del contenuto d'acqua e del rapporto SSV/SST sono tutti indici di una minore compattezza strutturale degli aggregati aerobici. Inoltre, come riportato da diversi autori, le EPS, e le proteine in particolare, sono l'elemento strutturante dei granuli aerobici, per cui la riduzione della frazione proteica delle EPS, determinava la perdita della struttura portante dei granuli stessi (Zhang et al., 2012, Xiong et al., 2013). In ragione a queste modificazioni strutturali, le dimensioni medie dei granuli diminuirono fino a 1,2 mm, e l'accumulo di materiale fioccoso determinato dall'assenza della pressione di

selezione idraulica causò la riduzione del tasso di granulazione al 30% (Figura 9.9a). Nel dettaglio, la frazione maggiormente instabile fu la  $d_{90}$ , che si ridusse da circa 3,5 mm a poco più di 2 mm. La frazione  $d_{60}$  si ridusse anche se in misura minore, mentre la  $d_{10}$  aumentò in virtù dell'accumulo nel reattore di particelle di minori dimensioni (Figura 9.9b).



**Figura 9.9:** Andamento della dimensione media dei granuli e del tasso di granulazione (a); variazione dei valori dei percentili  $d_{90}$ ,  $d_{60}$  e  $d_{10}$  nel primo periodo sperimentale (b).

Dal punto di vista morfologico invece, i granuli risultavano meno regolari, e strutturalmente simili a “fluff” con significative escrescenze filamentose in prossimità della loro superficie (Figura 9.10).



**Figura 9.10:** Fotografie dei granuli di inoculo (a) e dopo 30 giorni (b).

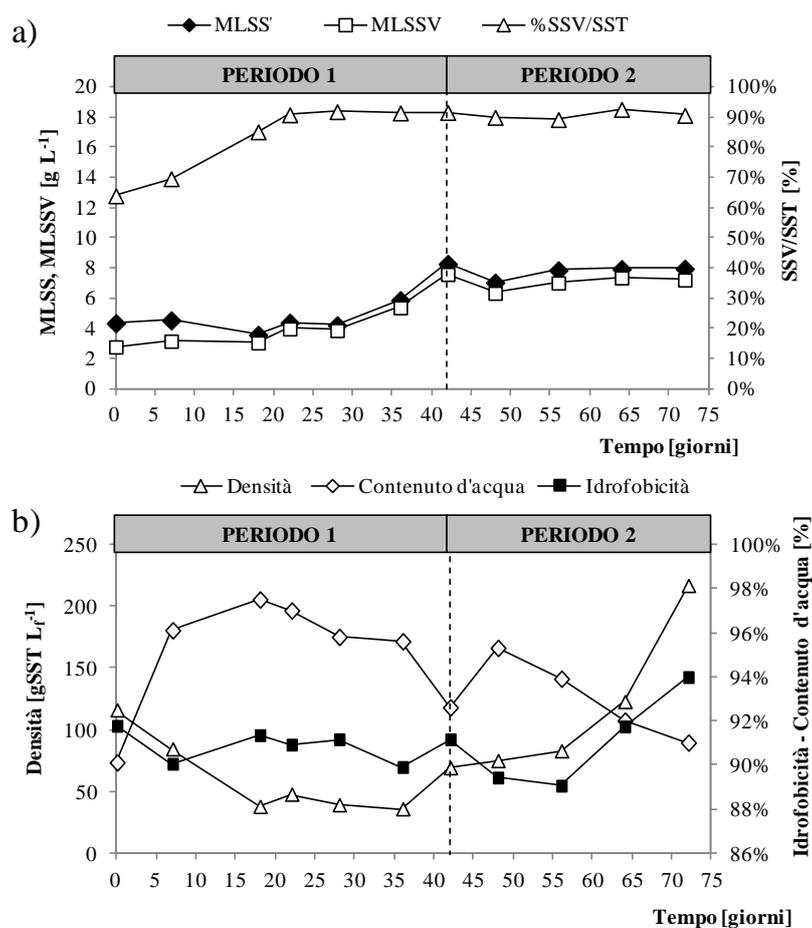
I risultati ottenuti nel primo periodo sperimentale confermarono quanto riportato in letteratura. **Liu et al. (2012)** riportano che in impianti a flusso continuo i granuli aerobici hanno dimensioni relativamente piccole. Gli stessi autori ritengono che, a causa dell'idrodinamica a completa miscelazione, la concentrazione dei nutrienti nel bulk è pari a quella allo scarico, per tanto risulta modesta. A causa di ciò, la forza spingente che regola il processo diffusivo all'interno dei granuli si riduce, pertanto la diffusione dei nutrienti verso gli strati più interni risulta minore. Ciò determina il fatto che i granuli adeguino le loro dimensioni alle nuove condizioni operative, in particolare riducendo le loro dimensioni in modo da opporre minore resistenza al flusso di materia verso il loro interno. La riduzione della forza spingente ha avuto effetti più marcati nei granuli di dimensioni maggiori, dove la resistenza al flusso diffusivo era maggiore in ragione dello spessore più grande. In questi granuli, i batteri filamentosi erano predominanti, come dimostra la struttura a "fluff". Lo sviluppo di batteri filamentosi è stata presumibilmente la causa della rottura dei granuli. **De Kreuk et al. (2010)** dedussero che i batteri filamentosi prevalgono sulle altre specie in sistemi caratterizzati da micro-gradienti di concentrazioni di substrato. Negli impianti a flusso continuo, il substrato è sempre disponibile e, con ogni probabilità, esso è consumato negli strati più esterni. Ciò determina la formazione di micro-gradienti tra l'esterno e l'interno dei granuli che promuove la proliferazione dei batteri filamentosi (**Zhou et al., 2014**). Inoltre, è noto che l'alternanza di condizioni di *feast* e *famine* inibisce la proliferazione di batteri filamentosi, in quanto funziona da selettore dei batteri fiocco-formatori (**Val del Rio et al., 2012**). La formazione dei micro-gradienti di concentrazione, la mancata alternanza di condizioni di *feast* e *famine*, e ancora la barriera idraulica esercitata dalla membrana, hanno probabilmente in maniera sinergica favorito la proliferazione di batteri filamentosi nei granuli che ne hanno determinato la rapida deflocculazione. **Morales et al. (2012)** suggeriscono che per evitare l'accumulo di microrganismi non in grado di aggregarsi in fiocchi, il tempo di residenza idraulico

(HRT) deve essere minore di 3 ore, in modo che esso risulti comunque minore al massimo tasso di crescita dei batteri in forma sospesa ( $3,0 \div 13,2 \text{ d}^{-1}$ , **Henze et al., 1987**). Il valore di HRT applicato in questo studio era superiore alle 10 ore, e non è stato possibile ridurlo in quanto si sarebbe dovuta aumentare la portata dell'effluente a un valore decisamente superiore al flusso critico della membrana. L'effetto dell'HRT sulla stabilità strutturale dei granuli andrebbe pertanto attenzionato in successivi studi.

I risultati ottenuti nel primo periodo evidenziano dunque che l'alternanza di condizioni di alto e basso carico è essenziale per il mantenimento strutturale dei granuli aerobici. Tale condizione se non sufficientemente garantita nello spazio, va implementata necessariamente nel tempo.

Per tale ragione, nel secondo periodo, come già introdotto nel paragrafo, l'impianto ha operato ad alimentazione intermittente, sebbene l'effluente venisse prodotto in modo continuo. Tale modifica ha ricreato con successo l'alternanza di condizioni di alto e basso carico, come evidenziato dal profilo di concentrazione dell'ossigeno in figura, e gli effetti sulla stabilità dei granuli sono stati positivi.

Il contenuto di solidi aumentò fino a circa  $8 \text{ gSST L}^{-1}$  e  $7.5 \text{ gSST L}^{-1}$ , a indicazione dell'elevata sintesi metabolica della biomassa (Figura 9.11a). Sia la densità che l'idrofobicità mostrarono un trend crescente in questo secondo periodo sperimentale a dimostrazione della rinnovata tendenza all'adesione e all'addensamento degli aggregati. Il contenuto d'acqua in ragione di ciò si ridusse come diretta conseguenza del nuovo addensamento dei granuli (Figura 9.11b), ma nonostante ciò il rapporto SSV/SST rimase inalterato rispetto al precedente periodo.



**Figura 9.11:** Confronto tra l'andamento della concentrazione dei solidi sospesi totali e volatili e loro rapporto nei due periodi sperimentali (a); confronto tra la variazione della densità, idrofobicità e contenuto d'acqua dei granuli nei periodi 1 e 2 (b).

Il contenuto di EPS riprese nuovamente a crescere, in risposta al corretto verificarsi dell'alternanza di condizioni di alto e basso carico, che spingeva i batteri a creare sostanze di stoccaggio da utilizzare come fonte di energia nei periodi di inedia. In maniera significativa aumentò il contenuto di proteine, e il rapporto PN/PS raggiunse valori superiori a 10 (Figura 9.12 a,b). L'arricchimento di proteine spiega anche l'aumento dell'idrofobicità del fango, che come evidenziato in precedenza raggiunse valori nell'ordine del 94%.

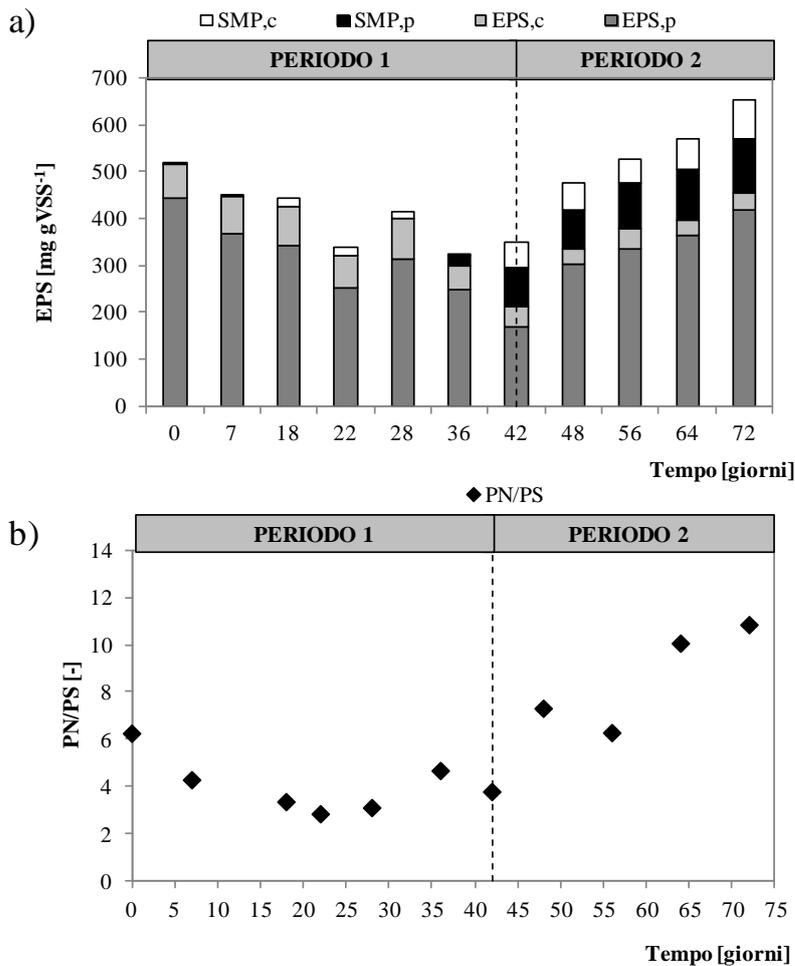
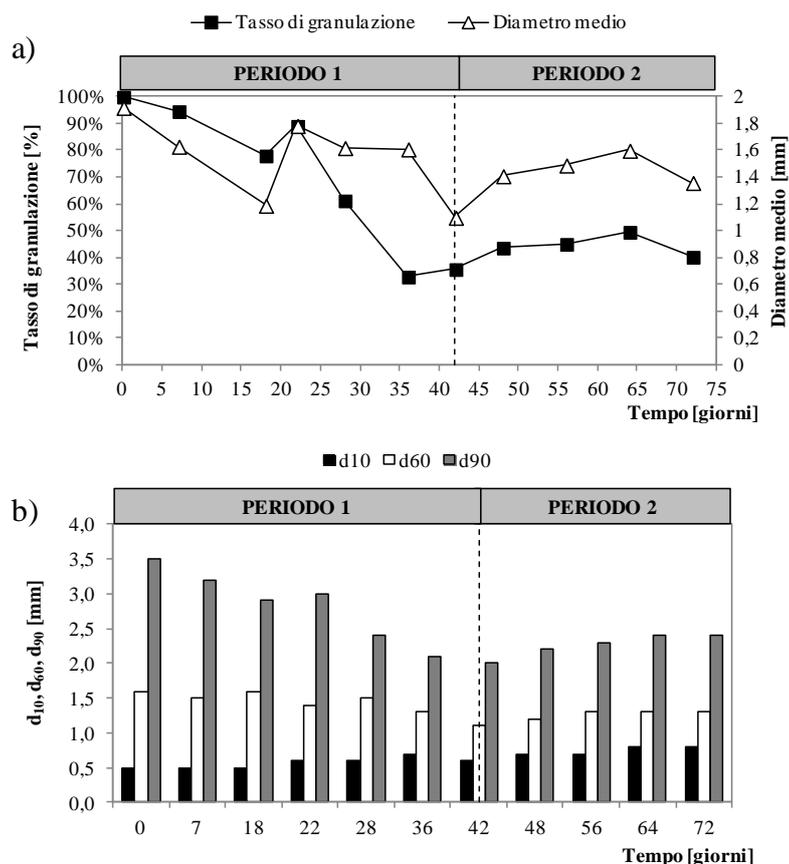


Figura 9.12: Confronto tra il contenuto di EPS nei granuli nei due periodi sperimentali (a); confronto tra il rapporto tra proteine e carboidrati nei periodi 1 e 2 (b).

Le dimensioni dei granuli rimasero però nel complesso stabili, così come il tasso di granulazione. Sebbene entrambi mostrassero un timido trend crescente, visivamente non si osservò una sostanziale modificazione nella struttura del mixed liquor che rimaneva costituito in parti pressoché simili da fango granulare e fioccoso (Figura 9.13 a,b).



**Figura 9.13:** Confronto tra le dimensioni medie dei granuli e del tasso di granulazione nei due periodi sperimentali (a); confronto tra la distribuzione granulometrica del fango nei due periodi (b).

L'alternanza di condizioni di *feast* e *famine* risulta essere necessaria per il mantenimento della struttura dei granuli anche in impianti a flusso continuo. Tuttavia, l'assenza della pressione di selezione idraulica non ha favorito una significativa ripresa del processo di granulazione in quanto gran parte, se non tutto, il materiale fioccoso che non si aggregava in nuovi granuli rimaneva all'interno del reattore (Figura 9.14).

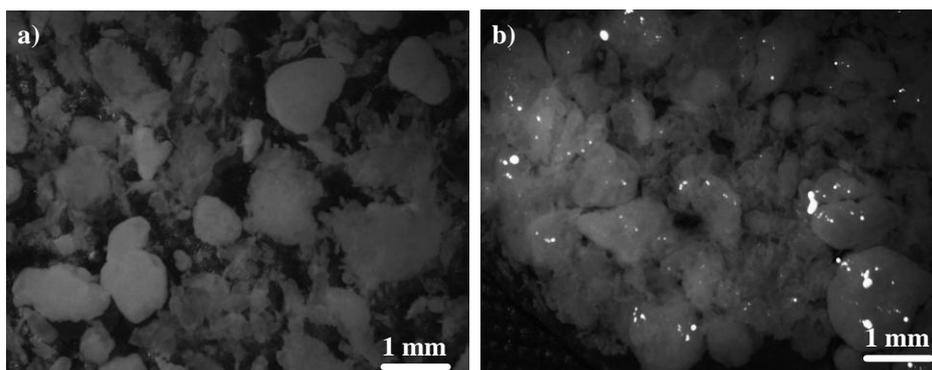
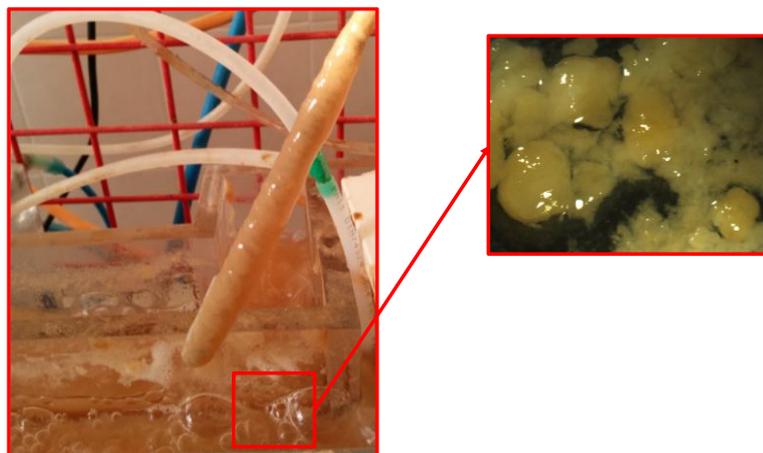


Figura 9.14: Fotografie dei granuli al 50° giorno (a) e al termine della sperimentazione (b).

La mancanza della pressione di selezione idraulica, unita all'effetto barriera esercitato dalla membrana, ha causato un lento ma inesorabile peggioramento delle caratteristiche del bulk. Gradualmente infatti, il mixed liquor si è modificato in un sistema ibrido fioccoso-granulare, nel quale i fiocchi tendevano a creare dei ponti tra i granuli causandone la progressiva fusione in strutture irregolari. L'elevata produzione di EPS inoltre, se da un lato favorì il miglioramento strutturale dei granuli, causò un grave peggioramento della qualità del bulk, che risultava scarsamente sedimentabile e filtrabile. L'arricchimento di proteine, che sono sostanze notoriamente idrofobiche, causò la trasformazione del bulk in una matrice molto densa a consistenza gelatinosa, che tendeva a intrappolare fiocchi e granuli al suo interno. Simili risultati vennero osservati anche da **Li et al. (2008)**. Anche in questo caso, la presenza della membrana contribuì al peggioramento della qualità del bulk, in quanto molte di queste sostanze, seppur in forma solubile (SMP) si depositavano sulla sua superficie, causando da un lato la loro permanenza nel reattore, ma allo stesso tempo notevoli problemi per il fouling della membrana stessa.

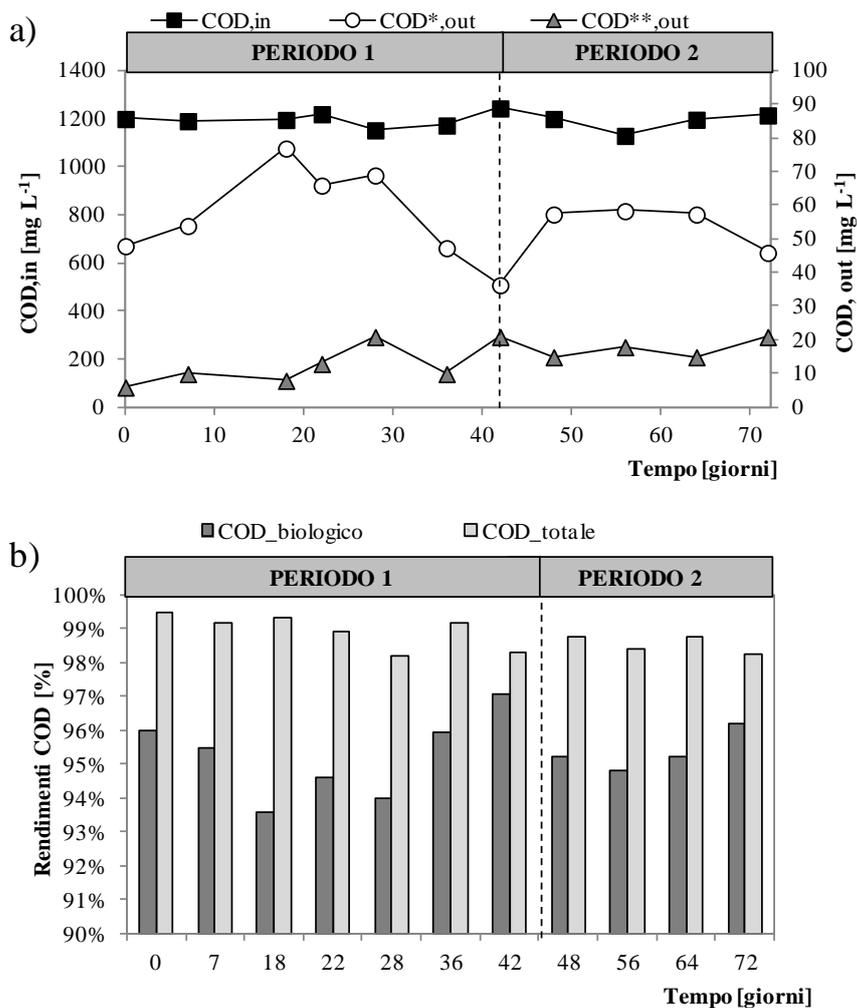


**Figura 6.15:** Immagine del bulk al termine del periodo 2.

Alla luce dei risultati finora esposti, si evince come l'alternanza delle condizioni di *feast* e *famine* siano necessari per il mantenimento strutturale dei granuli aerobici, ma allo stesso tempo tale condizione pur essendo necessaria non è sufficiente, in quanto in assenza di un'adeguata pressione di selezione idraulica sulla biomassa, il bulk tende a rimanere in prevalenza fioccoso e ad avere caratteristiche di sedimentabilità/filtrabilità peggiori a causa dell'aumento incontrollato del contenuto di proteine e dell'idrofobicità come conseguenza. È possibile che un minore tempo di residenza cellulare sia più consono alla gestione di un sistema del genere. Ciò tuttavia richiederebbe nuove indagini sperimentali per verificare se nelle medesime condizioni operative, l'applicazione di minori SRT potrebbe apportare significativi miglioramenti nella qualità del bulk.

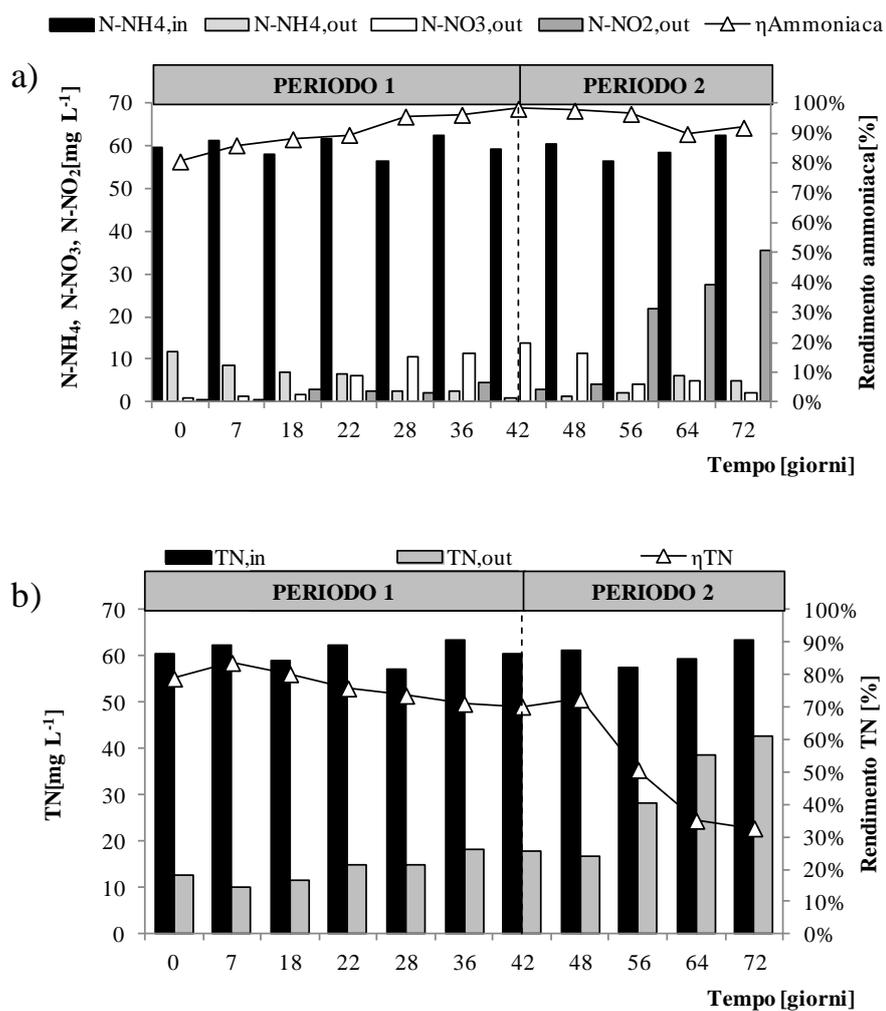
### 9.6.2 Performance biologiche del sistema

Al fine di valutare in maniera separata il contributo del sistema biologico e quello della membrana sui rendimenti di rimozione della sostanza organica, le misure di COD sono state eseguite sul surnatante della miscela aerata prelevata dal comparto membrana e sul permeato prodotto dalla stessa. Le rese di rimozione della sostanza organica sono state eccellenti e sempre superiori al 96%. Il rendimento depurativo a monte della membrana, non è quasi mai sceso al di sotto del 90%, a dimostrazione della buona efficacia del processo biologico (Figura 9.15 a,b). Né la configurazione impiantistica, né tanto meno le condizioni operative hanno influenzato dunque il processo di biodegradazione della sostanza organica. Nonostante la deflocculazione occorsa nel primo periodo in particolare, la presenza della membrana ha evitato il massiccio dilavamento di biomassa che è spesso accompagnato da significative perdite di efficienza depurativa.



**Figura 9.15:** Concentrazioni di COD nell'influente, nel surnatante della miscela aerata (\*) e nel permeato (\*\*) (a); rendimenti biologici e fisici di rimozione del COD (b).

Gli effetti della destabilizzazione strutturale dei granuli sono stati invece evidenziati per quanto concerne la rimozione dei nutrienti.



**Figura 9.16:** Concentrazioni delle forme azotate nell'influyente e nell'effluente (a); rendimenti rimozione dell'azoto totale (b).

Nel primo periodo, si è osservato un lieve trend decrescente nelle rese di rimozione dell'azoto. Da un rendimento globale di circa l'83%, al termine del primo periodo sperimentale, le rese di rimozione dell'azoto si ridussero a circa il 70%. Il cambiamento significativo si osservò nella forma dell'azoto presente allo scarico. Se inizialmente, la forma prevalente era quella ammoniacale, al termine del periodo osservato erano i nitrati (Figura 9.16 a,b). La deflocculazione e la conseguente riduzione delle dimensioni medie dei granuli favorì infatti le migliori

rese di ossidazione dell'ammonio, in quanto è noto che i granuli di dimensione minore, in virtù della maggiore superficie specifica, abbiano rese di nitrificazione maggiori rispetto a quelle di granuli di maggiori diametri (De Kreuk et al., 2005). Tuttavia, la riduzione della frazione  $d_{90}$  determinò il peggioramento delle rese di denitrificazione, in quanto come riportato da Di Bella e Torregrossa, (2013), solo nei granuli di dimensioni maggiori si ha uno strato anossico sufficientemente grande da consentire la nitrificazione e denitrificazione simultanea.

Analogamente, le rese per il fosforo si ridussero in maniera drastica, proprio per effetto della perdita di stratificazione dei granuli (figura 9.17).

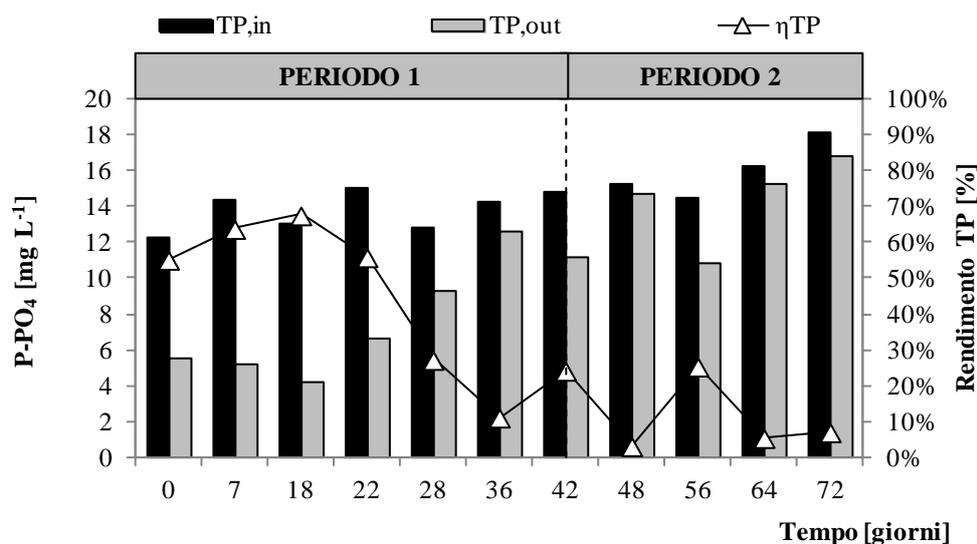


Figura 9.17: Concentrazioni di fosforo nell'influente e nell'effluente e rendimenti rimozione.

A maggior ragione, stante la minore densità dei granuli, con ogni probabilità l'ossigeno riusciva a penetrare fino al nucleo dei granuli, annullando di fatto la zona anaerobica al loro interno. La mancata alternanza delle condizioni di *feast* e *famine*, che come è riportato da diversi autori regola la diffusione dell'ossigeno all'interno dei granuli, ha fatto sì che la stratificazione dei granuli gradualmente si perdesse, vanificando uno dei principali vantaggi della tecnologia dei fanghi granulari ovvero la rimozione simultanea di carbonio e nutrienti in un unico bacino di reazione.

Nel secondo periodo, sebbene le condizioni di *feast* e *famine* siano state ripristinate con successo, le rese di rimozione dei nutrienti non migliorarono, anzi subirono un sensibile peggioramento. Come illustrato nel paragrafo, il peggioramento della qualità del bulk, ne determinò un significativo aumento della densità e della

viscosità (dato non misurato). In tali condizioni, la diffusione e il trasferimento dell'ossigeno nel bulk peggiorarono in modo sensibile (**Germain et al., 2007**). L'ossigeno disciolto infatti risultava essere pari a circa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  in fase di carico dell'alimento (*feast*), e pari a  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  nella fase di scarico (*famine*), almeno nei primi giorni del secondo periodo. Col peggioramento della qualità del bulk, durante la fase di scarico la concentrazione di ossigeno raramente superava i  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . Ciò determinò il sensibile accumulo di nitriti nel reattore, a causa del mancato completamento della reazione di nitrificazione che probabilmente risultava ossigeno limitata. Le rese di denitrificazione non migliorarono neanche in questo periodo, probabilmente a causa delle ridotte dimensioni dei granuli che non avevano uno strato anossico sufficientemente esteso. Anche i rendimenti sul fosforo rimasero invariati, probabilmente sia a causa delle modeste dimensioni dei granuli che per l'accumulo di nitriti che favoriva lo sviluppo di batteri GAO al posto dei PAO.

È verosimile che gli scarsi rendimenti di rimozione dei nutrienti osservati siano da addebitare in maniera esclusiva alla perdita di stabilità dei granuli. La scelta di parametri operativi e gestionali finalizzati a risolvere tale aspetto dunque potrebbe produrre benefici anche per il miglioramento delle performance biologiche del sistema.

### 9.6.3 Performance idrauliche: analisi del fouling della membrana

L'obiettivo principale di questo studio è stato quello di valutare la stabilità strutturale dei granuli aerobici in un impianto a flusso continuo, focalizzando l'attenzione sull'importanza dell'alternanza di condizioni di *feast* e *famine* e della pressione di selezione idraulica. L'analisi delle performance idrauliche del sistema è stato uno studio *a latere*, pertanto alcuni parametri operativi come l'SRT, o la concentrazione di SST, non sono stati gestiti con la finalità di mitigare il fenomeno del fouling. Tuttavia, l'analisi dello sporcamento della membrana in un sistema a biomassa granulare è un tema alquanto interessante e oltretutto poco discusso in letteratura, e pertanto, il suo studio seppur non dettagliato, può fornire utili spunti per future ricerche.

Nel corso del primo periodo sperimentale il fenomeno del fouling della membrana è stato molto evidente (Figura 9.18). La resistenza totale alla filtrazione infatti risultava essere di un ordine di grandezza superiore rispetto a quella che generalmente si osserva negli impianti MBR con fango attivo (**Judd, 2011**). Valori di resistenza così elevati, nell'ordine di  $7\div 8 \cdot 10^{13} \text{ m}^{-1}$ , evidenziavano un grave fenomeno di sporcamento della membrana, che rendeva necessaria l'esecuzione di lavaggi fisici con frequenza giornaliera. Inizialmente, i valori di resistenza aumentarono drasticamente nei primi 10 giorni, nonostante la quotidiana

esecuzione di lavaggi fisici, a causa di fenomeni di impaccamento della membrana, dovuti ad una non buona miscelazione del comparto dedicato (Figura 9.18 a). Molti dei granuli che venivano intrappolati all'interno delle fibre della membrana finivano con essere rotti a causa della pressione esercitata sulla loro superficie. Tale aspetto fu ancora aggravato dall'instabilità intrinseca dei granuli causata dalle non idonee condizioni operative al loro mantenimento strutturale.

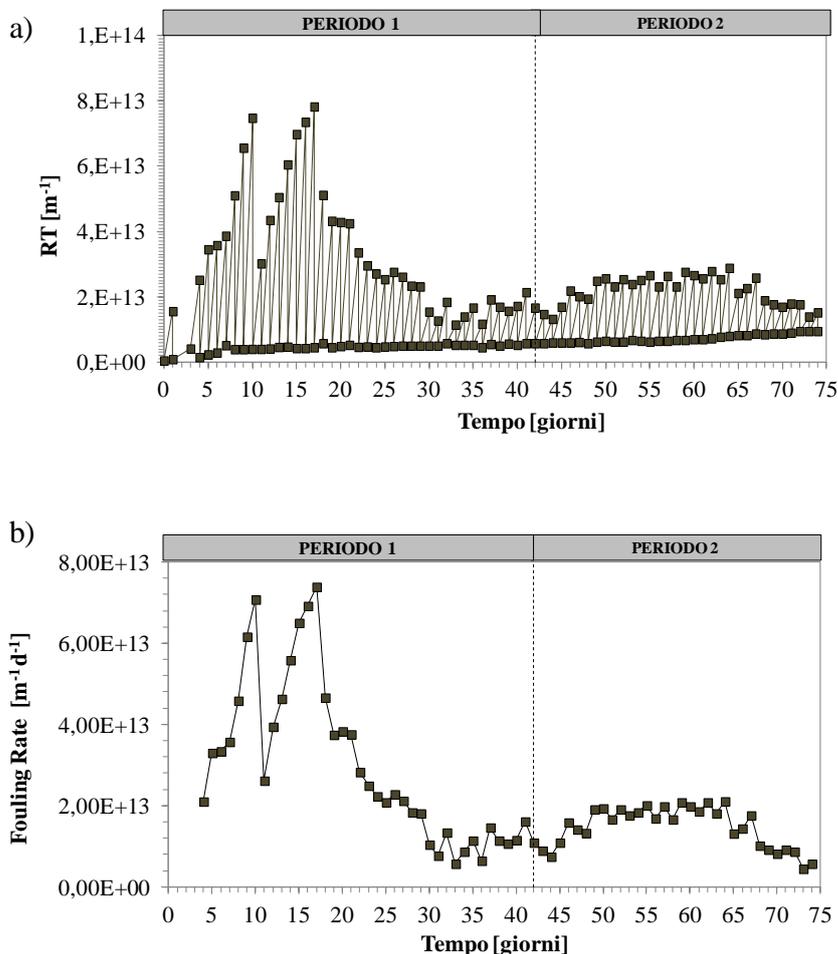


Figura 9.18: Andamento della resistenza totale (a) e del tasso di sporcamento della membrana (b) nei due periodi sperimentali.

Tali problemi vennero in parte mitigati inserendo un apposito sistema di insufflazione d'aria al di sotto della membrana, che limitava, seppur in maniera non decisiva, il deposito di fango all'interno delle sue fibre.

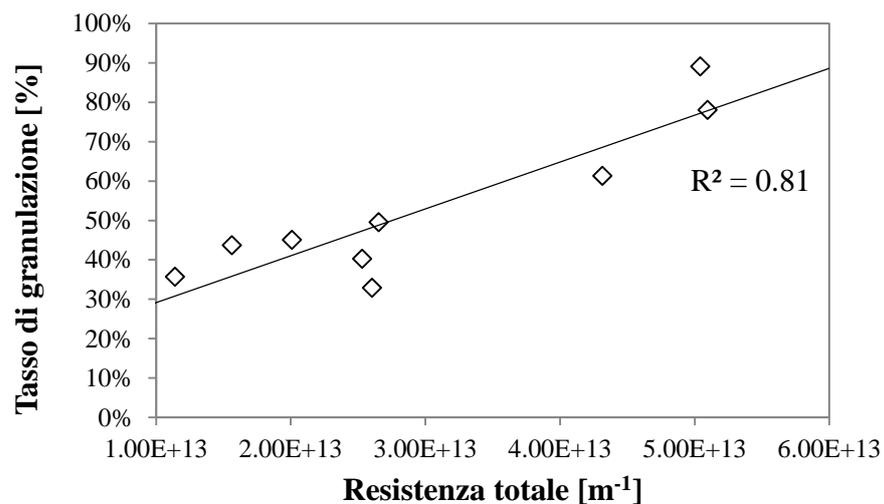
Nonostante tali modifiche, la resistenza totale e il tasso di sporcamento della membrana aumentarono nei successivi giorni in modo del tutto analogo a quanto osservato nei precedenti. Si osservò che sulla superficie della membrana si verificava la formazione di una matrice gelatinosa a base di sostanze polimeriche extracellulari (Figura 9.19 b).



**Figura 9.19:** Immagini della membrana al 10° giorno (a) e al 27° giorno (b).

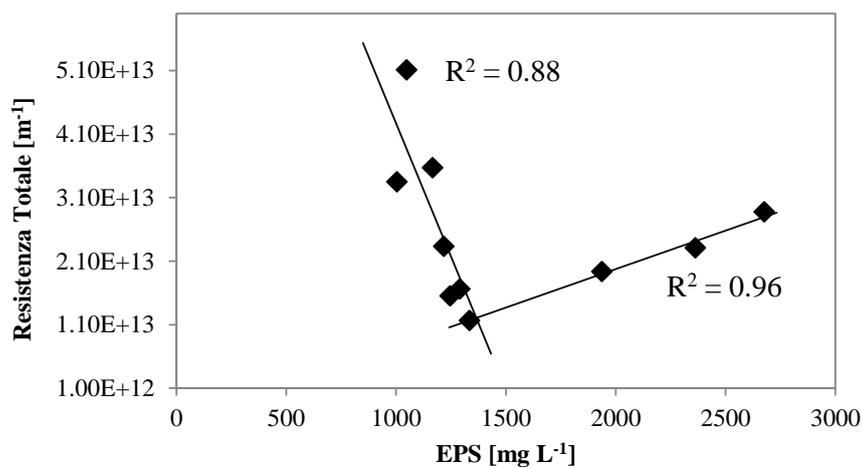
L'elevata quantità di polimeri extracellulari contenuti all'interno dei granuli, a causa del loro sfaldamento, finivano per accumularsi direttamente sulla superficie della membrana. La particolare natura del fango granulare ha determinato la mancata formazione del cosiddetto "pre-filtro", ovvero la formazione di uno strato di fango sulla superficie della membrana, che ne rallenta i fenomeni di sporcamento dovuti soprattutto alle sostanze disciolte. La natura fortemente idrofobica di tali sostanze, che come già detto erano per lo più costituite da proteine, costituiva un notevole ostacolo alla filtrazione. La loro deposizione sulle

fibre della membrana avveniva in maniera molto rapida. Dopo il lavaggio fisico della membrana infatti, i valori di TMP aumentavano fino a 0,6 bar dopo appena 4-5 ore, e dopo circa 7-8 ore non si perdeva la linearità tra TMP e flusso di permeato. Gradualmente, il fenomeno del fouling si è attenuato e, dopo la metà del primo periodo, i valori di resistenza erano sensibilmente minori rispetto a quanto osservato nei precedenti giorni. Tuttavia, i valori assoluti di resistenza e il tasso di sporcamento della membrana rimanevano sempre elevati soprattutto se confrontati con i valori usuali riportati in letteratura. La perdita di linearità tra la TMP e il flusso di permeato avveniva dopo circa 20-24 ore, e ciò evidenziava un minore sporcamento della membrana. Al fine di garantire la continuità idraulica del sistema però, i lavaggi fisici della membrana sono stati effettuati sempre con frequenza giornaliera. Sebbene in altri studi viene riportato che con il fango granulare il ricorso ai lavaggi fisici della membrana sia meno frequente (**Tay et al., 2007**), in questo caso l'instabilità strutturale dei granuli la rendeva strettamente necessaria con una frequenza molto alta. **Thanh et al (2010)** osservarono che il fenomeno del fouling si acuisce in sistemi a biomassa granulare a causa degli elevati tassi di aerazione a causa dell'elevata produzione di sostanze solubili le cui dimensioni nell'ordine dei Dalton, causano lo sporcamento irreversibile delle fibre. All'inizio del secondo periodo i valori di resistenza totale e del tasso di sporcamento si mantennero pressoché in linea a quanto osservato nella precedente fase. Un lieve aumento si osservò nella prima metà presumibilmente a causa del sensibile incremento di EPS che caratterizzò tale periodo, occorso a sua volta per il ripristino dell'alternanza di condizioni di feast e famine. La resistenza totale e il tasso di sporcamento diminuirono in maniera sensibile verso la fine del periodo osservato. Dall'analisi dei risultati ottenuti, emerge che il fenomeno di sporcamento della membrana diminuiva al decrescere del tasso di granulazione (Figura 9.20). Come mostrato nel grafico in figura, al crescere della percentuale di granuli all'interno del sistema, ovvero al diminuire della frazione di fango fioccoso, la resistenza alla filtrazione aumentava in maniera quasi lineare. Ciò è probabilmente legato al ruolo svolto dal pre-filtro biologico svolto dal fango fioccoso. La mancata deposizione di tale strato di "protezione" della membrana, favoriva il deposito di sostanze polimeriche sulla superficie delle fibre, che causava il sensibile peggioramento della filtrazione.



**Figura 9.20:** Correlazione tra il tasso di granulazione e la resistenza del fouling..

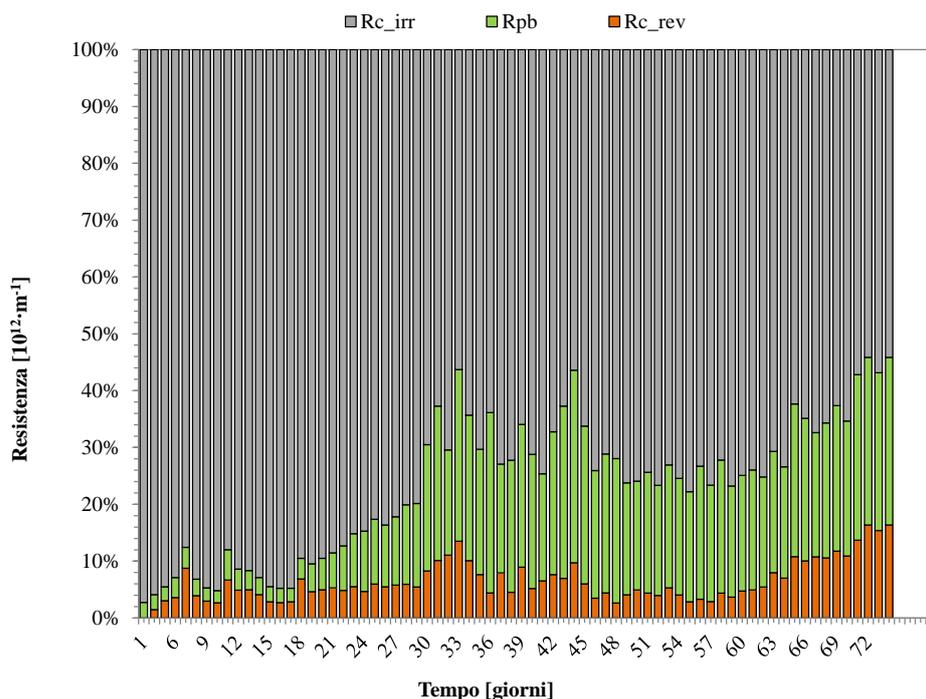
La relazione tra il contenuto di EPS totali e la resistenza totale, evidenzia un dato interessante. Per valori inferiori ad un certo contenuto di EPS, la resistenza totale del fouling tende a ridursi, mentre per valori superiori essa tende ad aumentare (Figura 9.21).



**Figura 9.21:** Correlazione tra la resistenza totale e il contenuto di EPS.

Ciò non è tanto dovuto alla presenza di un valori discriminante delle EPS, tanto quanto alla loro natura. Infatti, i valori di EPS superiori a  $1500 \text{ mg L}^{-1}$  sono quelli relativi al secondo periodo, dove le sostanze polimeriche erano in gran parte in forma solubile e non legata e, inoltre, il loro contenuto in proteine era maggiore rispetto al precedente periodo. È dunque plausibile, che il legame tra il fouling della membrana e il contenuto di EPS dipenda sia dalla natura di queste ultime, ovvero se esse sono in forma solubile o legata (Yu et al., 2009) e infine dalla loro composizione chimica, quindi se risultano prevalentemente costituite da proteine ovvero da carboidrati. È chiaro che questo dipende indirettamente dalla natura del fango granulare. La presenza di EPS in forma disciolta è con ogni probabilità dovuto allo sfaldamento dei granuli che determina il rilascio nel bulk di ingenti quantità di polimeri extracellulari.

I risultati della caratterizzazione del fouling evidenziarono come questo fosse di natura prevalentemente irreversibile, contrariamente a quanto osservato da Wang et al. (2013) in un impianto MBR con biomassa granulare (Figura 9.22). Soprattutto nella prima parte del primo periodo, la resistenza del cake irreversibile era più del 90% di quella totale. Col tempo questa frazione si ridusse a circa il 70% in seguito dell'aumento della resistenza da "pore blocking" causata dalla produzione di sostanze polimeriche in forma solubile che essendo di dimensioni minori rispetto ai pori della membrana, si depositavano al loro interno. Fino al termine della sperimentazione, si osservò che l'aliquota di resistenza dovuta al "pore blocking" rimase pressoché costante, mentre aumentò la resistenza del cake reversibile. La modificazione occorsa alla miscela aerata che col tempo si trasformò da un sistema prettamente granulare a uno ibrido costituito da una miscela di fango granulare e fioccoso, favorì la formazione di un pre-filtro di natura biologica che ha prevenuto lo sporcamento irreversibile della membrana. A fronte dei numerosi lavaggi fisici necessari per la rimozione del cake irreversibile, infatti non è mai stato necessario effettuare dei lavaggi chimici, segno che il fouling da "pore blocking" risultava essere marginale rispetto agli altri meccanismi di sporcamento della membrana. Questo risultato è in opposizione rispetto a quanto osservato da Zhou et al. (2007). Ciò potrebbe essere un aspetto positivo in ottica dell'aumento della vita utile della membrana, stante che i lavaggi chimici ne danneggiano inevitabilmente la struttura.



**Figura 9.22:** Risultati della caratterizzazione del fouling.

Il fenomeno del fouling in tale studio è stato estremizzato dalla scarsa stabilità strutturale dei granuli aerobici. È altresì vero che, la mancata ottimizzazione di alcuni parametri chiave per la gestione del fouling ne abbia determinato un sensibile peggioramento. L'analisi di un sistema così complesso dal punto di vista gestionale richiederebbe dapprima l'ottimizzazione dei parametri operativi che garantiscano la stabilità strutturale dei granuli, e solo dopo si può pensare di ottimizzare il processo dal punto di vista della minimizzazione del fouling.

## 9.7 Conclusioni

Lo studio condotto sull'impianto MBR a flusso continuo con fango granulare, ha mostrato da un lato grandi le potenzialità dell'abbinamento delle due tecnologie, che potrebbero assicurare effluenti con standard qualitativi eccellenti, ma dall'altro ha evidenziato innegabili difficoltà gestionali, prettamente connesse alla perdita di stabilità dei granuli o ad essa riconducibili. I risultati ottenuti hanno comunque evidenziato che anche in sistemi ad alimentazione continua, l'alternanza di fasi di alto e basso carico (*feast* e *famine*) risultano essenziali per il mantenimento dei

granuli aerobici. Tali condizioni, se non adeguatamente garantite nello spazio, mediante la realizzazione di due reattori idraulicamente collegati in serie, ovvero in un unico bacino con idrodinamica a flusso a pistone, devono necessariamente essere garantite nel tempo, circostanza che implica la necessità di operare con reattori a livello idrico variabile. Tale soluzione tuttavia, sarebbe realizzabile nel caso in cui i reattori stessi avessero capacità di compenso, ovvero andrebbe prevista un'unità di accumulo a monte dell'impianto stesso. L'aspetto idrodinamico comunque appare essere un fattore altrettanto decisivo alla pari di altri per i sistemi a fanghi granulari. I risultati ottenuti hanno altresì evidenziato la necessaria presenza della pressione di selezione idraulica, da un lato per consentire il dilavamento della biomassa fioccosa e dall'altro per evitare il peggioramento della qualità del bulk come evidenziato nello studio finora esposto.

Per tali motivi sarebbero necessarie nuove sperimentazioni che potrebbero far luce su gli aspetti non indagati in questo lavoro e ancora poco chiari nella letteratura scientifica. Lo spurgo del fango, e quindi la gestione del SRT rientra tra questi obiettivi, e analogamente l'indagine sul ruolo dell'HRT potrebbe fornire ulteriori importanti informazioni. Infine, l'analisi del fouling della membrana richiederebbe dapprima l'ottimizzazione del processo per quanto riguarda la stabilità strutturale dei granuli, e solo dopo valutare quali soluzioni operative, nel ventaglio di scelte che garantiscono il buon mantenimento del fango granulare, minimizzino il fenomeno dello sporciamento della membrana.

## 9.8 Bibliografia

- Adav, S., Lee, D.J., Lai, J.Y. (2009). Aerobic granulation in sequencing batch reactors at different settling times. *Bioresource and Technology*, 100, 5359-5361.
- APHA, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, nineteenth ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Beun, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (2002). Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research* 36(3), 702-712.
- Busch, J., Cruse, A., Marquardt, W. (2007). Modeling submerged hollow-fiber membrane filtration for wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, Vol. 288, pp. 94 – 111.
- Chen, C.Y., Lin, C.J., Chen, L.H., Fu, S.Y., Zhan, H.Y. (2009). Cultivation of Biogranules in a Continuous Flow Reactor at Low Dissolved Oxygen. *Water Air Soil Pollut: Focus*, 9, 213–221.
- Collivignarelli, C., Bertanza, G., Bina, S. (1995). *La verifica idrodinamica nel trattamento delle acque – Basi teoriche, procedure di applicazione, esempi*. Collana Ambiente, Vol.8, ISSN 1121-8215.
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Rusanowska, P., Zielińska, M., Bernat, M., Wojnowska-Baryła, I. (2014). Structure of nitrogen-converting communities induced by hydraulic retention time and COD/N ratio in constantly aerated granular sludge reactors treating digester supernatant. *Bioresource Technology*, 154, 162-170.
- De Kreuk, M.K., Pronk, M., Van Loosdrecht, M.C.M., 2005. Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. *Water Research* 39(18), 4476-4484.
- De Kreuk, M., Kishida, N., Tsuneda, S., van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. *Water Research*, 44, 5929-5938.
- Di Bella, G., Torregrossa, M. (2013). Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. *Bioresource Technology*, 142, 706-713.
- Germain, E., Nellels, F., Drews, A., Pearce, P., Kraume, M., Reid, E., Judd, S.J., Stephenson, T. (2007). Biomass effects on oxygen transfer in membrane bioreactors. *Water Research*, 51(5), 1038-1044.
- Henze, M., Grady Jr, C.P.L., Gujer, W. (1987). A general model for single-sludge wastewater treatment systems. *Water Research*, 21, 505–515.
- Juang, Y.C., Adav, S., Lee, D.J., Tay, J.H. (2010). Stable aerobic granules for continuous-flow reactors: Precipitating calcium and iron salts in granular interiors. *Bioresource and Technology*, 101, 8051-8057.
- Judd, S.J. (2011). *The MBR Book* (Second edition). Elsevier, Oxford, UK.

- Li, F., Jun, L.Y., Hea, L., Zhe, H.Z., Cheng, D.G., Jian, C. (2008). Correlation between extracellular polymeric substances and aerobic biogranulation in membrane bioreactor. *Separation and Purification Technology*, 59, 26-33.
- Liu, H., Li, Y., Yang, C., Pu, W., He, L., Bo, F. (2012). Stable aerobic granules in continuous-flow bioreactor with self-forming dynamic membrane. *Bioresource Technology*, 121, 111-118.
- Liu, Y.Q., Tay, J.H. (2015). Fast formation of aerobic granules by combining strong hydraulic selection pressure with overstressed organic loading rate. *Water Research*, 80, 256-266.
- Meng, F.G., Zhang, H.M., Li, Y.S., Zhang, X.W., Yang F.L., Xiao, J.N. (2005). Cake layer morphology in microfiltration of activated sludge wastewater based on fractal analysis. *Separation and Purification Technology*, vol. 44, pp. 250 – 257.
- Morales, N., Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R. (2012). Aerobic granular-type biomass development in a continuous stirred tank reactor. *Separation and Purification Technology*, 89, 199–205.
- Mosquera-Corral, A., de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., 2005. Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Research* 39, 2676-2686.
- Val del Río, A., Figueroa, M., Arrojo, B., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., García-Torriello, G., Méndez, R., 2012. Aerobic granular SBR systems applied to the treatment of industrial effluents. *Journal of Environmental Management* 95(SUPPL.), S88-S92.
- Verawaty, M., Tait, S., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P.L., 2013. Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Research* 47(14), 5338-5349.
- Tay, J.H., Yang, P., Zhuang, W.Q., Tay, S.T.L., Pan, Z.H. (2007). Reactor performance and membrane filtration in aerobic granular sludge membrane bioreactor. *Journal of membrane science* 304, 24-32.
- Thanh, B.X., Sperandio, M., Guigui, C., Aim, R.B., Wan, J., Visvanathan, C. (2010). Coupling sequencing batch airlift reactor (SBAR) and membrane filtration: Influence of nitrate removal on sludge characteristics, effluent quality and filterability. *Desalination* 250, 850-854.
- Wang, Y., Zhong, C., Huang, D., Zhu, J., 2013. The membrane fouling characteristics of MBRs with different aerobic granular sludges at high flux: *Bioresource Technology*, 136, 488-495.
- Xiong, Y., Liu, Y. (2013). Importance of extracellular proteins in maintaining structural integrity of aerobic granules. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*, 112, 435–440.
- Yu, G.H., Juang, Y.C., Lee, D.J., He, P.J., Shao, L.M. (2009). Filterability and extracellular polymeric substances of aerobic granules for AGMBR process. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40, 479-483.

- Zhang, H., He, Y., Jiang, T., Yang, F., 2011. Research on characteristics of aerobic granules treating petrochemical wastewater by acclimation and co-metabolism methods. *Desalination* 279(1-3), 69-74.
- Zhou, J., Yang, F., Meng, F., An P., Wang, D. (2007). Comparison of membrane fouling during short-temp filtration of aerobic granular sludge and activated sludge.
- Zhou, D., Liu, M., Wang, J., Dong, S., Cio, N., Gao, L. (2013). Granulation of Activated Sludge in a Continuous Flow Airlift Reactor by Strong Drag Force. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18, 289-299.
- Zhou, D., Niu, S., Xiong, Y., Yang, Y., Dong, S. (2014). Microbial selection pressure is not a prerequisite for granulation: Dynamic granulation and microbial community study in a complete mixing bioreactor. *Bioresource and Technology*, 161, 102-108.
- Zhu, L., Qi, H.Y., Lv, M.L., Kong, Y., Yu, Y.W., Xu, X.Y. (2012). Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies. *Bioresource Technology*, 124, 455-459.

## Conclusioni

In questa tesi è stata studiata la trattabilità di alcuni reflui industriali per mezzo di sistemi biologici a biomassa granulare aerobica. Oltre alla capacità di rimozione degli inquinanti, è stata analizzata l'incidenza di alcuni parametri operativi, nonché di alcune caratteristiche peculiari di ciascun refluò trattato, sulla stabilità strutturale del fango granulare. In dettaglio, nel corso delle campagne sperimentali oggetto di questa tesi, sono stati trattati gli slop, il refluò prodotto da un'industria ittico-conserviera, e di un birrificio. Parallelamente è stata studiata la stabilità del fango granulare nel lungo periodo in un impianto SBR alimentato con refluò sintetico, e infine in un sistema a MBR flusso continuo.

Nella sperimentazione relativa agli slop, il fango granulare ha dimostrato di essere una valida soluzione per il trattamento di tali reflui. Sia che il COD che il BOD<sub>5</sub> venivano rimossi con rendimenti superiori al 90% quando il sistema era in condizioni stazionarie. Inoltre, la concentrazione degli idrocarburi, quantificati in termini di TPH, allo scarico risultava inferiore al limite previsto dalla normativa in materia di smaltimento di queste acque. Gli idrocarburi venivano rimossi attraverso un meccanismo combinato di adsorbimento e degradazione biologica, che prevedeva un iniziale adsorbimento di tali composti all'interno della microporosità dei granuli e la loro successiva lenta degradazione da parte delle comunità batteriche in essi presenti. Quest'ultimo processo è risultato favorito sia per via dei lunghi tempi di residenza degli idrocarburi all'interno del sistema, favorito appunto dal loro adsorbimento all'interno dei granuli, che dalla graduale acclimatazione della biomassa a tali composti. Tuttavia, è stato anche notato che la struttura dei granuli, al termine della sperimentazione, risultò fortemente compromessa, a causa della compresenza degli idrocarburi e della salinità del refluò che hanno causato una significativa modificazione strutturale della matrice polimerica dei granuli.

Nella sperimentazione relativa al trattamento del refluò ittico conserviero è stato dimostrato che, per concentrazioni di sale non superiori a 50 gNaCl L<sup>-1</sup>, sono ottenibili rendimenti di rimozione del carbonio e dell'azoto ben superiori al 90%. Per salinità più elevate invece, oltre a una drammatica riduzione delle performance in particolare nei confronti dell'azoto, si è evidenziato un serio indebolimento della struttura dei granuli, seppure non si è giunti al loro completo sfaldamento.

Nella sperimentazione relativa al trattamento dei reflui provenienti dai birrifici, sono stati ottenuti elevati rendimenti di rimozione sia del carbonio che dell'azoto indipendentemente dalle condizioni di carico. Tuttavia, la stabilità dei granuli nel

lungo periodo si è ottenuta soltanto per determinate condizioni operative, che prevedevano l'applicazione di carichi organici ridotti e lunghi tempi di *famine*.

Analogamente, nella sperimentazione relativa alla stabilità dei fanghi granulari nel lungo periodo è stato confermato che l'applicazione di lunghi tempi di *famine* sia un requisito fondamentale per ottenere granuli aerobici stabili e meno suscettibili allo sfaldamento.

La necessità dell'alternanza delle fasi di *feast* e *famine*, e il loro corretto bilanciamento, è stato un fattore chiave per la stabilità dei granuli in anche in sistemi ad alimentazione continua. L'alternanza di fasi di alto (*feast*) e basso carico (*famine*) sono risultati, anche in questo caso, essenziali per il mantenimento dei granuli aerobici. Tali condizioni, se non adeguatamente garantite nello spazio, o reattori in serie o in un unico reattore con idrodinamica con flusso a pistone, devono necessariamente essere garantite nel tempo, circostanza che implica la necessità di operare con reattori a livello idrico variabile.

Nel complesso, in questa tesi è stato dimostrato che i fanghi granulari si prestano bene al trattamento di varie tipologie di reflui industriali, anche di natura molto complessa. È emerso, in particolare, che la formazione dei granuli alimentati con reflui industriali, e quindi i tempi necessari per la fase di start-up, sono risultati abbastanza più rapidi rispetto a impianti granulari alimentati con refluo civile reale (o sintetico).

I risultati ottenuti suggeriscono che tale tecnologia potrebbe essere applicata in piano campo, possibilmente in impianti realizzati all'interno dello stesso stabilimento industriale. È stato anche evidenziato che uno degli aspetti maggiormente delicati è la stabilità e il potenziale sfaldamento dei granuli. Tale disfunzione non solo comporterebbe il venir meno dei vantaggi tipici dei fanghi granulari nei confronti delle altre tecnologie convenzionalmente applicate nell'ambito dei trattamenti delle acque, ma anche la riduzione delle performance e il conseguente mancato rispetto dei limiti allo scarico. In questa tesi, sono stati investigati differenti condizioni finalizzate al mantenimento strutturale dei granuli. In generale, la stabilità dei granuli è risultata migliore quando il fango granulare veniva sottoposto a elevati tempi di inedia (*famine*), circostanza che richiedeva che i cicli di reazione fossero abbastanza lunghi (in genere superiore alle 6 ore).

Tuttavia, in taluni casi e in particolare nel caso dei reflui salini, l'instabilità dei granuli è più legata alle caratteristiche intrinseche del refluo stesso che alle condizioni operative. Sebbene non sia stato osservato un drammatico sfaldamento in nessuna delle sopradiscusse sperimentazioni, in alcune di esse le caratteristiche strutturali dei granuli, al termine del periodo osservato, risultavano essere compromesse. Ciò comportava che i granuli erano quindi maggiormente suscettibili allo sfaldamento, che si sarebbe potuto verificare nel caso di repentine variazioni delle condizioni al contorno, quali ad esempio la composizione dell'influente, circostanza questa assai probabile nell'ambito dei reflui industriali. In questi casi, è ipotizzabile l'utilizzo di elementi di supporto strutturale per i

granuli, che possano aumentarne la resistenza e ridurre il rischio di incorrere in gravi disfunzioni.

Infine, la scelta e la definizione dei parametri gestionali e di progetto, quali in particolare il carico organico volumetrico da applicare e la durata dei cicli, dipendono dalle caratteristiche del refluo da trattare. Essendo ciascuno di questi, soprattutto nell'ambito di quelli industriali, caratterizzati da caratteristiche peculiari, non è possibile definire criteri di progettazione generali. Questi non dovranno solamente tenere conto del raggiungimento di determinate performance di processo, ma anche, in misura paritaria, della stabilità dei granuli.