

COLTIVAZIONE DI FANGO AEROBICO GRANULARE PER IL TRATTAMENTO DI REFLUI INDUSTRIALI SALINI

Riccardo Campo^{1,*}, Santo Fabio Corsino², Michele Torregrossa², Gaetano Di Bella¹

¹ Università degli studi di Enna "Kore" – Facoltà di Ingegneria e Architettura, Enna.

² Università degli Studi di Palermo – Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale, Aerospaziale, dei Materiali, Palermo.

Sommario – Questo lavoro è finalizzato allo studio della coltivazione di fango aerobico granulare sottoposto ad un graduale incremento della salinità. Il reattore aerobico granulare, denominato GSBAR (Granular Sequencing Batch Airlift Reactor), ha operato per 164 giorni ed è stato alimentato con un influente sintetico caratterizzato da un carico organico volumetrico (OLR) di $1,6 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, e da un aumento graduale della salinità. Essa è stata incrementata, nell'arco di sei fasi sperimentali, da circa $0,2 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ a circa $24 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ per favorire una graduale acclimatazione di microrganismi all'ambiente salino. Al termine del periodo di coltivazione, sono stati ottenuti granuli stabili e compatti aventi un diametro prossimo a 2 mm ed un indice di sedimentabilità dei fanghi (SVI) approssimativamente pari a $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$. L'analisi delle sostanze polimeriche extracellulari (EPS) ha rivelato che le proteine (PN) sono risultate maggiori dei polisaccaridi (PS), e la loro produzione è diminuita con la formazione di granuli maturi. Quando la salinità è stata incrementata da $3 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ a $24 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$, la concentrazione specifica di EPS in fase *feast* di abbondanza di substrato, è risultata spesso inferiore rispetto alla fase *famine* di carenza del substrato. Ciò è stato probabilmente dovuto al trasporto di osmoli dall'interno della cellula verso l'esterno e viceversa, dovuto al processo di acclimatazione alla salinità. Tale processo ha richiesto più energia rispetto a quella ottenibile dal solo consumo del substrato esogeno, pertanto i microrganismi hanno metabolizzato le EPS, come fonte di carbonio supplementare, in misura maggiore in fase *feast* che in fase *famine*. Tuttavia, i microrganismi hanno continuato a produrre EPS anche in fase *famine* per far fronte alla pressione osmotica. Dal punto di vista delle performance, non sono stati osservati significativi peggioramenti nella rimozione della sostanza organica. Tuttavia è stato notato un leggero accumulo di nitriti nell'effluente, in corrispondenza delle fasi con salinità di $7 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ e $14 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$, a testimonianza dell'inibizione salina dei batteri nitrito-ossidanti (NOB). Il completo azzeramento dei nitriti, a una concentrazione salina di $24 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$, ha suggerito una possibile acclimatazione dei NOB all'ambiente salino. Infine, l'elevata salinità e il temporaneo accumulo dei nitriti hanno ostacolato i batteri fosforo accumulanti (PAO) nella rimozione di fosfati.

Parole chiave: fango aerobico granulare, granulazione, acqua reflua salina, sostanze polimeriche extracellulari, EPS.

CULTIVATION OF AEROBIC GRANULAR SLUDGE FOR THE TREATMENT OF INDUSTRIAL SALINE WASTEWATER

* Per contatti: Via delle Olimpiadi, 94100, Enna.
E-mail: riccardo.campo@unikore.it.

Abstract – This study focuses on the cultivation of aerobic granular sludge subjected to step-wise increase of salinity. A bench scale Granular Sequencing Batch Airlift Reactor (GSBAR) worked for 164 days. The reactor was fed with a synthetic influent characterized by an Organic Loading Rate (OLR) of $1,6 \text{ kg COD}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ and with a step-wise increase of salinity during six experimental periods (from 0.2 to $24 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$), to promote a gradual acclimation of microorganisms to the saline environment. Stable and compact granules with a diameter close to 2 mm and a sludge volume index (SVI) approximately of $20 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ were obtained at the end of cultivation period. The Extracellular Polymeric Substances (EPS) analysis revealed that proteins (PN) were higher than polysaccharides (PS) and their production was decreasing as mature granules were forming. When salinity was increased from $3 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ to $24 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$, the specific EPS concentration in the feast phase was often lower than in famine one, because the transport of osmolytes from and into the cell for the acclimation to salinity required more energy and microorganisms metabolized EPS as additional carbon source in a greater extent in feast phase than in famine phase. Moreover, microorganisms continued to produce EPS also in famine phase to face the high osmotic pressure. No significant worsening in the main biological processes were observed throughout the whole experimental study. A slight accumulation of nitrites in the effluent occurred at $7 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ and at $14 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ indicating the inhibition of Nitrite-Oxidizing Bacteria (NOB) due to the salinity. The full depletion of nitrites at $24 \text{ gCl} \cdot \text{L}^{-1}$ suggested that the acclimation of NOB to the saline environment successfully occurred. Finally, high salt and nitrite accumulation hampered the polyphosphate accumulating organisms (PAO), for phosphorous removal.

Keywords: aerobic granular sludge, granulation, saline wastewater, extracellular polymeric substances, EPS.

Ricevuto il 2-10-2016. Correzioni richieste il 15-11-2016. Accettazione il 21-12-2016.

1. INTRODUZIONE

Al giorno d'oggi, svariati settori industriali quali l'agro-alimentare (in particolare le attività ittico-conserviere), il petrolchimico, il tessile, il cartiero, il chimico, i percolati di discarica da rifiuti solidi urbani (RSU), comportano una produzione ingente di acque reflue saline (Lefebvre e Moletta, 2006). Tali rifiuti liquidi contengono sali come cloruri, carbonati, solfati e, spesso, composti organici particolarmente recalcitranti quali i composti aro-

matici (Ramos et al., 2015). Lo scarico di simili acque caratterizzate da elevata salinità ed elevato carico organico senza alcun trattamento preventivo, genererebbe un considerevole impatto ambientale. I processi fisico-chimici sono considerati i processi elettivi per il trattamento di reflui industriali; tuttavia essi presentano, da un lato, elevati costi gestionali derivanti dall'utilizzo di particolari reagenti chimici e dai considerevoli consumi energetici, dall'altro implicano la produzione di fanghi chimici e sottoprodotti pericolosi che necessitano di un adeguato smaltimento (Lefebvre e Moletta, 2006).

I sistemi biologici per il trattamento di acque reflue saline costituiscono un tema prioritario per la ricerca del settore. Attualmente, i sistemi a fanghi attivi rappresentano i processi principalmente adoperati e diffusi su grande scala. Tuttavia, la loro applicazione per il trattamento di reflui industriali complessi è piuttosto limitata poiché i microorganismi sono molto esposti all'inibizione dovuta alla presenza di composti tossici e recalcitranti o all'elevata salinità. Elevate concentrazioni saline, infatti, generano un'elevata pressione osmotica che può causare la riduzione delle attività biologiche o la plasmolisi delle cellule batteriche (Muda et al., 2010). Di conseguenza, l'elevata salinità influenza la rimozione della sostanza organica, dell'azoto e del fosforo nei cosiddetti sistemi di depurazione convenzionali (Pronk et al., 2014).

Una tecnologia avanzata tra le più promettenti per il trattamento delle acque reflue, è rappresentata dal processo a fanghi aerobici granulari (*Aerobic Granular Sludge* – AGS). In esso i fiocchi di fango attivo sono sostituiti da granuli meccanicamente robusti, compatti e dalle elevate caratteristiche di sedimentabilità (Pronk et al., 2014). I granuli aerobici vengono generalmente coltivati in reattori sequenziali (*Sequencing Batch Reactor* – SBR) poiché in tali sistemi, l'alternanza di fasi di abbondanza (*feast*) di substrato e di inedia (*famine*), favorisce l'aggregazione microbica e la granulazione. Inoltre, la diffusione limitata dell'ossigeno all'interno degli strati dei granuli assicura l'instaurazione simultanea di differenti condizioni redox (aerobiche, anossiche e anaerobiche) nella struttura dei granuli stessi. Per tali ragioni, la tecnologia AGS risulta molto interessante dal momento che riesce a concentrare differenti processi biologici, quali la rimozione della sostanza organica, la nitrificazione, la denitrificazione e la rimozione del fosforo, in un unico reattore (de Kreuk e van Loosdrecht, 2006). In letteratura è stato manifestato un notevole interesse nel trattamento di acque reflue

saline mediante AGS (Figueroa et al., 2008; Li e Wang, 2008; Bassin et al., 2011; Val del Río et al., 2012; Pronk et al., 2014; Ramos et al., 2015; Corsino et al., 2016) e tale tecnologia si è rivelata molto efficace in presenza di sali inorganici.

Il principale obiettivo dello studio è analizzare la coltivazione di fango aerobico granulare in un reattore SBR soggetto a un incremento graduale della salinità del refluo influente. Particolare attenzione è stata prestata alle proprietà fisiche della biomassa granulare e alla produzione di sostanze polimeriche extracellulari. In aggiunta, l'acclimatazione dei microorganismi all'ambiente salino è stata valutata mediante l'analisi delle performance depurative del sistema.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Descrizione dell'impianto e delle condizioni operative

Il reattore granulare, denominato “*Granular Sequencing Batch Airlift Reactor*” (GSBAR), ha avuto una forma colonnare con un volume di lavoro pari a 3,5 L e un rapporto altezza/diametro (H/D) pari a 10. Il rapporto di scambio volumetrico è stato imposto pari al 50%, posizionando una valvola di scarico solenoideale a metà altezza di riempimento. L'aria è stata introdotta dal basso per mezzo di un diffusore a bolle fini con una velocità del flusso pari a $3,3 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, tale da garantire elevati sforzi di taglio. La successione dei cicli del reattore GSBAR è stata gestita da un controllore logico programmabile (PLC). Il reattore ha operato con cicli della durata di 6 ore, suddivisi in 20 minuti di alimentazione del refluo, 333 minuti di aerazione/reazione, 2 minuti di sedimentazione e 5 minuti di scarico dell'effluente. Si è utilizzato un influente sintetico, preparato in laboratorio miscelando le seguenti soluzioni in accordo con Beun et al., (2002): $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ 97.7mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.7mM, K_2HPO_4 20mM, KH_2PO_4 10mM, KCl 4.8mM, NH_4Cl 30mM. Tali soluzioni sono state diluite con acqua di rete al fine di ottenere un carico organico volumetrico (*Organic Loading Rate* – OLR) pari a circa $1,6 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. In maniera separata, è stato gradualmente aggiunto cloruro di sodio in modo da ottenere la salinità voluta, misurata sia indirettamente mediante l'acquisizione del segnale di conducibilità elettrica ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), che direttamente come cloruri. Il reattore è stato inoculato con 1,75 L di fango attivo fioccoso prelevato dall'impianto di depurazione municipale del comune di Enna, avente un indice di sedimentabilità, dopo

Tabella 1 – Composizione media del refluo influente

Parametro	Unità	Fase 0	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
		(29 giorni)	(15 giorni)	(30 giorni)	(30 giorni)	(30 giorni)	(30 giorni)
COD	mgO ₂ · L ⁻¹	1020 ± 127	893 ± 88	889 ± 65	803 ± 95	844 ± 32	879 ± 11
TOC	mgC · L ⁻¹	249 ± 19	272 ± 16	276 ± 23	266 ± 47	265 ± 26	282 ± 16
N-NH ₄	mg · L ⁻¹	48 ± 12	60 ± 5	62 ± 2	61 ± 4	60 ± 4	59 ± 2
Fosfati	mgP-PO ₄ · L ⁻¹	10 ± 3	9 ± 1	11 ± 1	9 ± 1	9 ± 2	10 ± 2
Cloruri	mgCl · L ⁻¹	181 ± 54	1.089 ± 446	2.956 ± 420	7.012 ± 189	14.894 ± 1693	23.919 ± 793
pH	-	7,75 ± 0,40	7,82 ± 0,50	7,71 ± 0,40	7,62 ± 0,50	7,68 ± 0,60	7,76 ± 0,50

30 minuti di sedimentazione (*Sludge Volume Index* – *SVI*₃₀), pari a circa 111 mL·g⁻¹ e una concentrazione di solidi sospesi totali di circa 2,12 g·L⁻¹. Nel corso dei primi 29 giorni di operatività (Fase 0), l'OLR è stato gradualmente incrementato da 0,4 a 1,6 kgCOD·m⁻³·d⁻¹ e il tempo di sedimentazione è stato gradualmente ridotto da 15 min a 2 min (15 min – 8 min – 4 min – 2 min), al fine di evitare sia uno *shock* di carico organico che un eccessivo dilavamento iniziale della biomassa di inoculo. Successivamente il reattore è stato soggetto a un graduale incremento di salinità secondo le seguenti fasi operative: Fase I (5mS·cm⁻¹ – 1gCl·L⁻¹); Fase II (10mS·cm⁻¹ – 2,9gCl·L⁻¹); Fase III (20mS·cm⁻¹ – 7gCl·L⁻¹); Fase IV (35mS·cm⁻¹ – 14,8gCl·L⁻¹); Fase V (50mS·cm⁻¹ – 24gCl·L⁻¹). In Tabella 1 sono mostrate le principali caratteristiche del refluo influente.

2.2. Procedure analitiche

Il refluo influente e l'effluente depurato sono stati campionati e analizzati due volte a settimana secondo metodiche standard (APHA, 2005). In particolare sono stati analizzati i seguenti parametri: solidi sospesi totali e volatili (SST e SSV); solidi sospesi totali scaricati con l'effluente (SST_{out}), domanda chimica di ossigeno (COD); carbonio organico totale (TOC); azoto ammoniacale (NH₄-N); azoto nitroso (NO₂-N); azoto nitrico (NO₃-N); fosfati (PO₄-P); cloruri (Cl). Inoltre sono state eseguite le seguenti misure sulla biomassa granulare, con frequenza settimanale al fine di limitare l'estrazione di fango granulare dal reattore: dimensioni dei granuli mediante un analizzatore dinamico di immagini (Sympatec QICPICTM); morfologia dei granuli mediante stereomicroscopia; tasso di granulazione valutato come la percentuale di particelle avente diametro medio superiore a 600 µm, in accordo a Liu et al. (2012); velocità di sedimenta-

zione determinata su singoli granuli misurando il tempo di percorrenza di un cilindro graduato (Bartoli et al., 2010); indice di sedimentabilità a 5 min (SVI₅) e a 30 min (SVI₃₀); sostanze polimeriche extracellulari (EPS). Quest'ultime sono espresse come somma di sostanze polimeriche legate (EPS_{bound}) e prodotti microbici solubili (SMP) nelle frazioni proteiche e carboidratiche. Gli SMP sono stati estratti per centrifugazione a 5000 rpm per 5 min, mentre le EPS_{bound} per via termica (Zhang et al., 1999). I carboidrati sono stati determinati secondo il metodo "Phenol-Sulphuric acid" adoperando il glucosio come standard (Dubois et al., 1956), mentre le proteine sono state determinate mediante il metodo "Folin", adoperando l'albumina di siero bovino come standard (Lowry et al., 1951). I campioni per le analisi delle EPS sono stati prelevati al termine della fase *feast*, quando la maggior parte del substrato veniva ossidato, e al termine della fase *famine*, in accordo a (Corsino et al., 2015). Inoltre sono state eseguite misure di ossigeno disciolto e di pH durante il ciclo di reazione per identificare la fine della fase *feast* all'interno del ciclo.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Processo di granulazione e caratteristiche fisiche dei granuli

Nelle Figure 1 e 2a sono mostrate rispettivamente la morfologia dei granuli e le loro dimensioni nel corso di tutto il periodo di osservazione. La biomassa di inoculo è stata caratterizzata da fiocchi molto piccoli aventi dimensione media di 80-100 µm. Nel corso dei primi 14 giorni (Fase 0), sono apparsi piccoli aggregati all'interno del reattore (Figura 1a) che rapidamente hanno raggiunto un diametro medio di circa 300-400 µm. Nella Fase I (1g Cl·L⁻¹), sono apparsi granuli di colore giallo (Figura 1b) aventi diametro medio di 1100-1200 µm e

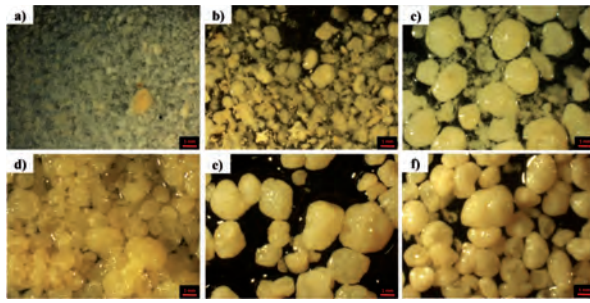


Figura 1 – Granuli aerobici osservati allo stereomicroscopio (Ingrandimento-7X): Fase 0 – 14° giorno (a); Fase I – 38° giorno (b); Fase II – 73° giorno (c); Fase III – 102° giorno (d); Fase IV – 131° giorno (e); Fase V – 157° giorno (f)

una forma irregolare. Durante la Fase II, i granuli hanno mantenuto un diametro medio di circa 1300 μm fino al 59° giorno e successivamente la loro dimensione è cresciuta fino a 1700-1800 μm in corrispondenza del 73° giorno. Come mostrato in Figura 1c, i granuli sono apparsi arrotondati e con una superficie levigata; tuttavia lo stress causato dall'incremento di salinità ha comportato la formazione di granuli dall'aspetto lanuginoso ("fluffy"), come osservato anche da Taheri et al., (2012). Nella Fase III, l'ulteriore incremento di salinità al valore di 7 $\text{gCl}\cdot\text{L}^{-1}$, ha causato una modifica sostanziale dell'aspetto dei granuli, che sono divenuti traslucidi (Figura 1d). In questo periodo, il

giorno 102°, il diametro medio dei granuli è diminuito da circa 1800 μm a 1500 μm ; la ragione di ciò è probabilmente dovuta a un più accentuato fenomeno della plasmolisi, strettamente connesso allo stress osmotico, che in fase di granulazione ha comportato un parziale sfaldamento degli strati più esterni dei granuli, riducendone il diametro medio. Nel corso della Fase IV, nonostante l'ulteriore incremento di salinità (circa 15 $\text{gCl}\cdot\text{L}^{-1}$), i granuli formati nelle precedenti fasi sono stati soggetti a un processo di maturazione con un incremento del diametro medio fino a circa 1700 μm (Figura 1e) e assumendo una struttura molto compatta e strutturalmente stabile. La stabilità dei granuli si è mantenuta anche nella Fase V (24 $\text{gCl}\cdot\text{L}^{-1}$), in cui il diametro medio è cresciuto fino a circa 2000 μm in corrispondenza del 157° giorno e i granuli sono apparsi compatti, e di forma regolare e arrotondata. In questo contesto, è utile sottolineare che, sebbene alcuni autori (Ismail et al., 2010) abbiano riscontrato che in ambiente salino la sostituzione dei cationi Ca^{2+} con i cationi Na^{+} nella matrice delle EPS possa causare una perdita di robustezza/stabilità del granulo, nel presente lavoro è stato osservato che l'elevata salinità ha reso i granuli maggiormente compatti in seguito sia all'elevata spinta di galleggiamento ("buoyancy") che ha accentuato il dilavamento delle particelle lentamente sedimentabili, sia all'elevata concentrazione di ca-

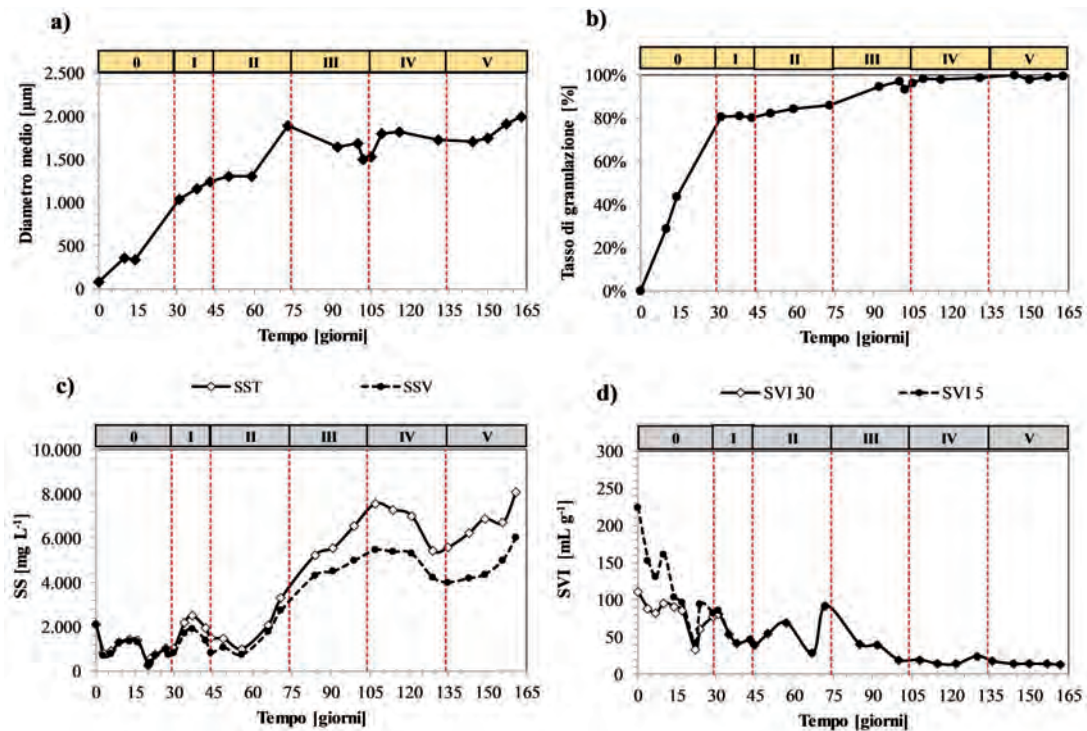


Figura 2 – Dimensioni dei granuli aerobici (a); tasso di granulazione (b); contenuto di solidi nel reattore (c); indici di sedimentabilità del fango granulare (d)

tioni Na^+ che ha fisicamente ridotto il doppio strato elettrostatico sulla superficie dei granuli, favorendo l'aggregazione microbica in maniera analoga a quanto osservato da Li e Wang, (2008).

Osservando il tasso di granulazione in Figura 2b, è possibile notare che esso è cresciuto molto rapidamente da 0% a circa il 30%, in meno di 10 giorni, e il 30° giorno la percentuale di granuli nel reattore è risultata prossima all'80%. Successivamente, il valore del tasso di granulazione è progressivamente cresciuto fino al 99% al termine del periodo studiato, confermando la totale formazione di granuli stabili e maturi. La riduzione del diametro medio occorsa in Fase III, non ha comportato una conseguente diminuzione del tasso di granulazione poiché la dimensione media del granulo si è mantenuta superiore a 600 μm .

In Figura 2c sono riportati i trend della concentrazione di SST e di SSV all'interno del reattore.

Superata la Fase 0 di start-up in cui si è registrato un andamento irregolare dei solidi sospesi totali e volatili a causa delle variazioni delle condizioni operative (variazione del tempo di sedimentazione e del carico organico volumetrico), in Fase I e in Fase II l'incremento di salinità dell'influente ha causato una parziale plasmolisi con conseguente diminuzione dei SST fino al 57° giorno. Pertanto, al fine di favorire l'acclimatazione dei microrganismi all'ambiente salino, si è deciso di raddoppiare la durata delle successive fasi operative, da 15 a 30 giorni.

Successivamente la concentrazione di SST è cresciuta fino al raggiungimento di un valore stazionario di circa 7,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Fase III. Tuttavia, il cambiamento della morfologia dei granuli occorsa in Fase III, discussa in precedenza, ha comportato un incremento dei solidi sospesi dilavati dal sistema (con concentrazione media pari a circa 450 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), senza un apprezzabile diminuzione dei SST. Durante la Fase IV, la maggiore spinta di galleggiamento dovuta alla maggiore concentrazione salina nel *bulk*, ha accresciuto la concentrazione di solidi allo scarico fino a 540 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in corrispondenza del 130° giorno. Ciò ha comportato una diminuzione dei SST da 7,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a 5,4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Infatti, come osservato da Winkler et al., (2012), l'elevata concentrazione salina ha comportato un incremento della densità del *bulk* e, di conseguenza, della spinta di galleggiamento, contribuendo a ridurre la velocità di sedimentazione dei granuli. In altre parole, è possibile affermare che la salinità abbia esercitato un effetto aggiuntivo di pressione di selezione idraulica nei confronti dei granuli aerobici, ostacolandone il mo-

to verso il fondo del reattore. Infine, nell'ultima Fase V, la costituzione di granuli più compatti ha implicato un incremento dei solidi sospesi totali fino a circa 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, confermando il raggiungimento di una maggiore stabilità strutturale.

Il trend dei solidi sospesi volatili è risultato simile a quello dei solidi sospesi totali (Figura 2c). Tuttavia, dal 35° giorno è stata osservata una graduale diminuzione dell'aliquota dei solidi volatili poiché, l'adsorbimento dei sali quali composti inorganici all'interno della porosità dei granuli, ha contribuito ad accrescere la frazione non volatile della biomassa.

Dal punto di vista delle caratteristiche di sedimentabilità dei granuli aerobici, in Figura 2d sono riportati gli andamenti dello SVI_5 e dello SVI_{30} . Come riportato da diversi autori (inter alia Liu e Tay, 2004; Adav et al., 2008), la completa granulazione si ha quando il rapporto tra lo SVI_5 e lo SVI_{30} è prossimo all'unità. Tale condizione è stata osservata a partire dal 35° giorno, quando sia lo SVI_5 che lo SVI_{30} hanno raggiunto valori prossimi a 55 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$. In Fase II, i valori di SVI_5 e SVI_{30} sono risultati pari a 90 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ suggerendo un leggero peggioramento delle caratteristiche di sedimentabilità legato sia alla crescente spinta di galleggiamento, che alla presenza di granuli non ancora del tutto maturi costituiti in parte da *fluff* (Figura 1c). A partire dalla Fase III e fino al termine della sperimentazione, il raggiungimento delle condizioni di stabilità dei granuli è stato confermato dalla graduale diminuzione dello SVI_5 e dello SVI_{30} fino a 20 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ e dal raggiungimento di una velocità di sedimentazione mediamente pari a 75 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$.

3.2. Aspetti biologici

Durante l'intero periodo sperimentale, sono state analizzate le sostanze polimeriche extracellulari (EPS) in forma proteica e carboidratica. Le EPS sono principalmente costituite da proteine (PN), polisaccaridi (PS), acidi umici e lipidi prodotti dai microrganismi. La loro produzione è strettamente legata alle condizioni operative a cui la biomassa è sottoposta ed è particolarmente stimolata quando i microrganismi si ritrovano in talune condizioni di stress fisico-ambientale. Inoltre, le proteine sono ritenute le principali sostanze polimeriche responsabili del mantenimento strutturale dei granuli e sono maggiormente presenti negli strati più interni del granulo, mentre i carboidrati sono generalmente situati nelle superfici più esterne (McSwain et al., 2005).

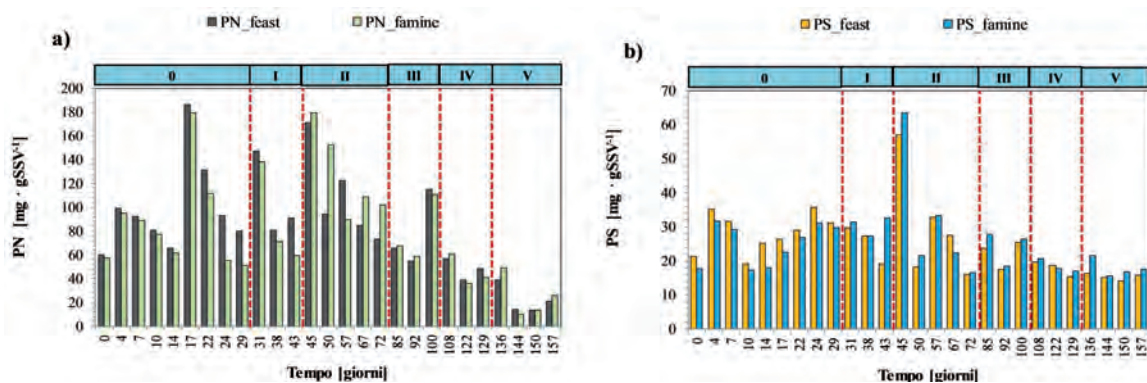


Figura 3 – Sostanze polimeriche extracellulari in forma proteica (a) e carboidratica (b)

La Figura 3a mostra il trend del contenuto proteico dei granuli riferito all'unità di SSV, durante l'intero periodo sperimentale. In Fase 0, in assenza di sale, è stato registrato un incremento di proteine rispetto al valore di inoculo poiché la biomassa prelevata dall'impianto convenzionale a fanghi attivi, ha subito uno stress fisico correlato alle nuove condizioni operative (alimentazione in batch, sforzi di taglio, pressione di selezione idraulica, etc.). Successivamente, una volta raggiunte condizioni pseudo-stazionarie, è stata osservata una diminuzione della concentrazione specifica delle proteine, poiché i granuli hanno raggiunto una discreta condizione di stabilità strutturale.

In corrispondenza della riduzione del tempo di sedimentazione da 4 min a 2 min (il 17° giorno), la concentrazione delle proteine è cresciuta rapidamente fino a circa 180 mg·gSSV⁻¹. Ciò è stato dovuto alla notevole pressione di selezione idraulica che ha comportato un elevato stress fisico sui granuli, stimolando una maggiore produzione di proteine al fine di accrescerne la forza strutturale. La successiva diminuzione del contenuto proteico ha confermato ulteriormente l'adattamento dei granuli alle nuove condizioni operative.

In corrispondenza dell'inizio delle Fasi I e II, l'incremento della concentrazione dei cloruri rispettivamente a 1 gCl·L⁻¹ e 3 gCl·L⁻¹, ha generato uno stress osmotico che ha comportato un'elevata produzione di proteine specifiche. Infatti, in un ambiente salino, le cellule batteriche tendono a produrre sostanze polimeriche extracellulari per bilanciare la pressione osmotica esterna, come osservato da altri studiosi (Wan et al., 2014; Corsino et al., 2015). In tal modo, la produzione di EPS nei granuli aerobici ne rafforzerebbe la struttura in condizioni di elevata salinità.

Dalla Fase III in poi, la concentrazione delle proteine è risultata decrescente, eccetto che per un piccolo osservato il 100° giorno dovuto alla modifica

della morfologia e della struttura dei granuli discussa in precedenza. L'andamento decrescente delle proteine ha indicato che la biomassa non è risultata più affetta dall'ulteriore incremento della salinità, sintomo di adattamento dei granuli aerobici all'ambiente salino del *bulk* liquido.

Per quanto concerne i polisaccaridi (Figura 3b), la loro concentrazione è risultata compresa nel range tra 20÷30 mg·gSSV⁻¹ fino al 43° giorno, in Fase I. Tuttavia, all'inizio della Fase II, la concentrazione è cresciuta fino a 60 mg·gSSV⁻¹ in accordo con il trend delle proteine.

Inoltre, la produzione di polisaccaridi in corrispondenza di ogni incremento di salinità, è risultata di gran lunga inferiore rispetto alla produzione di proteine. È pertanto possibile asserire che i microrganismi hanno bilanciato la pressione osmotica principalmente attraverso la produzione di sostanze di natura proteica.

Nel corso di tutto il periodo sperimentale, le EPS sono state misurate al termine delle fasi *feast* e *famine*. La durata della fase *feast* è risultata mediamente compresa tra 20÷40 min, mentre la durata della fase *famine* tra 290÷310 min. Analizzando le EPS durante le prime due fasi operative, è stato osservato che nelle Fasi 0 e I, le concentrazioni delle proteine sono risultate maggiori nella fase *feast*. Infatti quando il substrato è risultato disponibile in grande quantità, i batteri hanno stoccato prodotti sottoforma di proteine, contribuendo alla formazione dei granuli stessi. Nella seguente fase *famine*, le proteine sono state utilizzate come fonte di carbonio dai microrganismi e ciò ha contribuito ad accrescere l'idrofobicità superficiale e la capacità dei granuli di far fronte agli *shock* (McSwain et al., 2005; Wang et al., 2006; Zhu et al., 2012). Per quanto riguarda i carboidrati, anch'essi sono risultati sempre maggiori in fase *feast* piuttosto che in fase *famine*, nel corso della Fase 0. Ciò è risultato in accordo con altri autori (Van

Loosdrecht et al., 1997; Corsino et al., 2015) i quali hanno notato che la strategia *feast/famine* implica uno stoccaggio di polimeri (principalmente carboidrati) quando il substrato è presente in maggiore quantità, che vengono utilizzati per la crescita dei microrganismi stessi quando il substrato esogeno è stato degradato.

Tuttavia, per i rimanenti giorni di operatività, è stato osservato che la maturazione dei granuli e il miglioramento della loro stabilità strutturale ha comportato una minore produzione di proteine e carboidrati in fase *feast* piuttosto che in fase *famine*. Ciò è apparentemente in contrasto con quanto osservato dagli stessi autori in uno studio precedente (Corsino et al., 2015), in cui tuttavia la biomassa di inoculo era già acclimatata alla salinità. Diversamente, nel presente lavoro, la biomassa ha subito un processo di acclimatazione all'ambiente salino durante il quale i microrganismi hanno probabilmente continuato a produrre EPS, anche durante la fase *famine*, per far fronte alla pressione osmotica del *bulk*.

Come appare evidente dai risultati fin qui mostrati, la salinità ha condizionato tutti i processi biologico-fisici coinvolti nel fenomeno della granulazione. A tal proposito, un aspetto che non può essere ignorato riguarda la modifica della comunità microbica nel processo di adattamento all'elevata salinità (Wan et al., 2014). Pertanto i microrganismi alotolleranti selezionati in condizioni saline, presentano differenti cinetiche metaboliche (comunque non analizzate nel presente studio) se comparate a quelle dei comuni ceppi batterici dei sistemi convenzionali. Taheri et al. (2012) hanno osservato che la costante di semisaturazione (K_S) per il trattamento di acque reflue saline è significativamente maggiore del valore determinato per le acque reflue domestiche. Infatti quando i batteri attivano il meccanismo di adattamento alla salinità at-

traverso il trasporto di osmoliti dall'esterno verso l'interno della cellula e viceversa, richiedono più energia e, di conseguenza, una maggiore sorgente di carbonio che implica necessariamente un valore di K_S maggiore. Pertanto, siccome nel presente lavoro il COD è stato mantenuto pressoché costante per ogni fase, è probabile che, al crescere della salinità, i microrganismi abbiano consumato sia le proteine che i polisaccaridi come substrato aggiuntivo. Inoltre tale consumo è risultato essere maggiore in fase *feast*, in cui le cinetiche di rimozione del substrato sono più rapide, rispetto alla fase *famine*. Questo spiegherebbe il trend inusuale delle EPS osservato durante le fasi *feast* e *famine* in presenza di salinità evidenziando, al contempo, l'adattamento dei microrganismi all'ambiente salino.

3.3. Performance depurative

Al fine di valutare l'acclimatazione alla salinità dei ceppi batterici formanti i granuli aerobici, sono stati monitorati i principali processi biologici attraverso l'analisi dell'efficienza di rimozione della sostanza organica e dei nutrienti. Durante la Fase 0 e la Fase I, il sistema ha rimosso più del 95% del COD influente (Figura 4a). Nelle successive Fasi II e III, i microrganismi eterotrofi sono stati probabilmente influenzati dalla salinità e l'efficienza di rimozione si è ridotta fino all'85% il 67° giorno e fino al 75% il 92° giorno. In seguito, nel corso delle fasi IV e V, l'efficienza di rimozione del COD si è mantenuta abbastanza stabile intorno al valore dell'85%, denotando l'adattamento dei ceppi eterotrofi all'ambiente salino. Per quanto riguarda il TOC, le efficienze di rimozione nella Fase 0 e nella Fase I sono risultate anche in questo caso, come osservato per il COD, prossime al 95%.

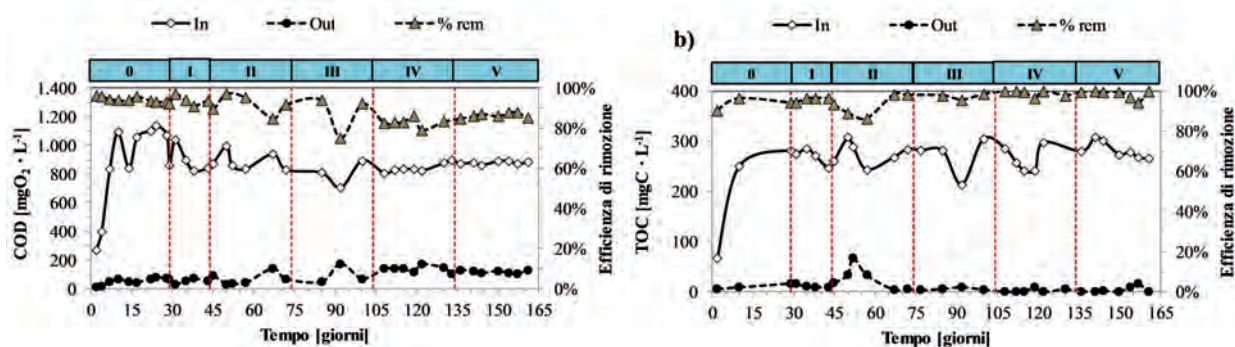


Figura 4 – Andamento temporale del COD (a) e del TOC (b) nell'influente, nell'effluente e relative efficienze di rimozione

Tuttavia, il 57° giorno in Fase II, l'efficienza di rimozione del TOC è inizialmente diminuita fino all'85% e, in un secondo momento, si è ristabilita su valori maggiori del 90% confermando un probabile effetto inibitorio della salinità verso i microrganismi eterotrofi e un susseguente sviluppo e adattamento di microorganismi alotolleranti all'interno del bioreattore.

Per quanto riguarda la rimozione dell'azoto, è possibile notare come la riduzione graduale del tempo di sedimentazione da 15 min a 2 min nel corso della Fase 0, abbia comportato un peggioramento significativo della nitrificazione (Figura 5a) dovuto al considerevole *washout* dei batteri autotrofi a lenta crescita cellulare, sottoposti ad un'elevata pressione di selezione idraulica. Successivamente, fino al termine della Fase II, è stato osservato un graduale incremento dell'ammonio allo scarico dovuto all'inibizione del processo di nitrificazione in ambiente salino. A partire dalla Fase III (7 gCl·L⁻¹) e fino al termine dell'attività sperimentale, è stato osservato un trend opposto dell'ammonio allo scarico, che è gradualmente diminuito. Infatti, l'efficienza di nitrificazione è cresciuta dal 10% a circa il 40%, suggerendo un progressivo adattamento dei batteri autotrofi all'ambiente salino. È possibile ancora una volta asserire che la Fase III del presente studio si è rivelata cruciale, non solo per i sostanziali cambiamenti morfologici e strutturali dei granuli, come discusso precedentemente, ma anche per la selezione e lo sviluppo di batteri alotolleranti specializzati.

Osservando le concentrazioni di nitriti e nitrati nell'effluente e le efficienze di denitrificazione ottenute (Figura 5b), nel presente studio si è verificato il processo di nitrificazione e denitrificazione simultanea (SND) (Di Bella e Torregrossa, 2013), che ha indicato un'avvenuta stratificazione dei granuli. Discutendo i risultati successivi alla Fase 0 non stazionaria di *start-up* del sistema, in Fase I sia la scarsa efficienza di nitrificazione che la crescente dimensione dei granuli aerobici, e del relativo strato anossico, hanno fatto in modo che l'esigua porzione di ammonio nitrificato fosse quasi del tutto denitrificata con un'efficienza prossima al 98%. A partire dalla Fase II e fino all'inizio della Fase V, è stato osservato un progressivo incremento dei nitriti da circa 1 mg·L⁻¹ a circa 9.6 mg·L⁻¹ e una conseguente diminuzione dell'efficienza di denitrificazione da circa il 90% a circa il 45%. Tale accumulo di nitriti è stato dovuto all'inibizione dei batteri autotrofi nitrito ossidanti (NOB) in accordo con altri autori (Figueroa et al., 2008; Bassin et al., 2011; Pronk et al., 2014) i quali hanno notato che i NOB sono più sensibili alla salinità rispetto ai batteri ammonio ossidanti (AOB). Successivamente, il quasi azze-

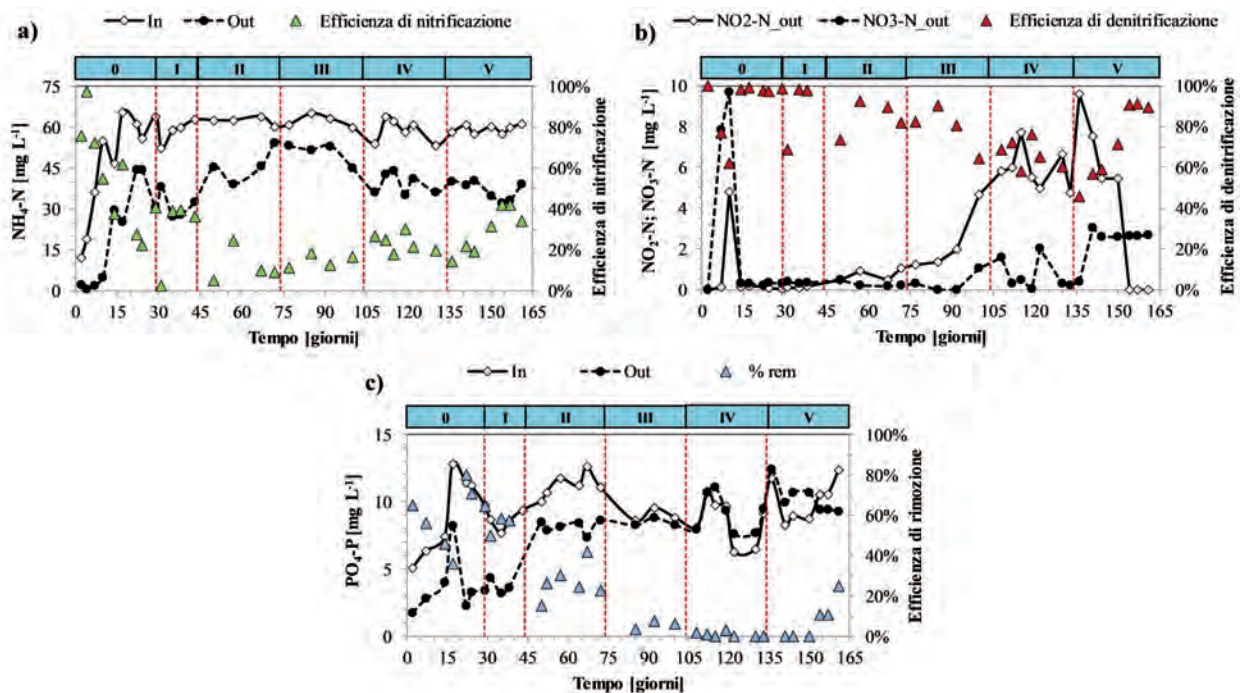


Figura 5 – Andamento temporale dell'ammonio nell'influente, nell'effluente ed efficienza di nitrificazione (a); andamento dei nitriti e dei nitrati nell'effluente ed efficienza di denitrificazione (b); andamento dei fosfati nell'influente, nell'effluente ed efficienza di rimozione (c)

ramento dei nitriti e il corrispondente incremento dei nitrati fino al valore pressoché costante di $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ha indicato un miglioramento della denitrificazione (dal 45% al 90%) e l'adattamento dei NOB all'ambiente salino. Per quanto concerne l'evoluzione del pH, nell'arco dell'intero periodo sperimentale tale parametro ha assunto prevalentemente i valori medi del refluo influente riportati in Tabella 1. Tuttavia, in concomitanza del processo di nitrificazione-denitrificazione simultanea (SND), è stato osservato un aumento del pH di circa 0,30 dall'inizio di un ciclo di reazione fino al termine della fase *feast*. Ciò ha confermato l'occorrenza di un'attività denitrificante per la quale, come è noto, si ha un aumento di alcalinità. Infatti in fase *feast*, vista l'abbondanza di substrato carbonioso presente, è stata osservata un'attività denitrificante per opera di batteri eterotrofi che hanno utilizzato il carbonio disponibile come donatore di elettroni e il nitrato/nitrito presenti, come accettore di elettroni.

D'altra parte, dall'inizio della fase *famine* e fino al termine del ciclo di reazione, si è osservata una diminuzione del pH di circa 0,30. Ciò è stato dovuto all'attività nitrificante che, avendo prodotto acido carbonico, ha implicato un abbassamento del pH.

Tali trend di pH si sono ripetuti ciclicamente durante tutto il periodo sperimentale e, dal punto di vista strutturale dei granuli, non hanno influenzato negativamente le caratteristiche biologico-fisiche dei granuli stessi.

Infine, osservando i risultati relativi alla rimozione del fosforo (Figura 5c), nel corso della Fase I l'efficienza di rimozione dei fosfati ha raggiunto valori intorno al 60% poiché, in seguito al raggiungimento del diametro medio dei granuli di circa 1.2 mm (Figura 2a), si è probabilmente formato un nucleo anaerobico (Corsino et al., 2015) che ha favorito la crescita di batteri fosforo-accumulanti (PAO). A partire dalla Fase II e fino al 150° giorno di operatività, è stato osservato un incremento di fosfati nell'effluente e un annullamento dell'efficienza di rimozione probabilmente dovuto alla comparsa di nitriti nel reattore. Come ben noto in letteratura (Bassin et al., 2011; Pronk et al., 2014), i nitriti possono inibire l'attività dei PAO a vantaggio dei batteri glicogeno-accumulanti (GAO). Tuttavia, in seguito alla scomparsa dei nitriti dal mixed liquor, il trend di rimozione dei fosfati ha ripreso a crescere fino a un valore prossimo al 30%, indicando un recupero dell'attività metabolica dei batteri PAO.

4. CONCLUSIONI

In questo lavoro sono stati studiati gli effetti del graduale incremento della salinità sulla coltivazione di fango aerobico granulare. Granuli compatti e stabili sono stati ottenuti al termine del periodo sperimentale ad una concentrazione salina pari a circa $24 \text{ g Cl}\cdot\text{L}^{-1}$. Tuttavia, la concentrazione salina che ha condizionato l'intero processo di granulazione è risultata essere pari a circa $7 \text{ g Cl}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fase III), in cui i granuli hanno sensibilmente modificato la loro morfologia e struttura riducendo le loro dimensioni, pur mantenendo una produzione di EPS proteiche che ne hanno accresciuto la stabilità. Inoltre, nel corso delle Fasi da 3 a $24 \text{ g Cl}\cdot\text{L}^{-1}$, il contenuto di EPS in fase *feast* è risultato minore rispetto alla fase *famine*. Inizialmente, in fase *feast* i microrganismi hanno immagazzinato polimeri da poter essere utilizzati come sorgente di carbonio nella successiva fase *famine*; in un secondo momento essi hanno richiesto una quantità maggiore di energia per attivare il meccanismo di acclimatazione mediante il trasporto di osmoliti da e verso la parete cellulare, per far fronte alla pressione osmotica del *bulk*. Ciò ha comportato un consumo di EPS prodotti, come sorgente di carbonio aggiuntiva, in misura maggiore in fase *feast* rispetto alla fase *famine*. Le efficienze di rimozione del carbonio, dell'azoto e del fosforo hanno rivelato che è gradualmente occorsa una stratificazione del granulo e una modificazione microbiologica con sviluppo di microrganismi altotolleranti. Non è stato osservato nessun significativo peggioramento della rimozione della sostanza organica. D'altra parte, un iniziale accumulo di nitriti nell'effluente, seguito dalla quasi totale scomparsa, ha suggerito un'iniziale inibizione e un susseguente adattamento dei NOB all'ambiente salino. L'effetto combinato dell'incremento della salinità e dell'accumulo dei nitriti ha causato un graduale peggioramento dell'efficienza di rimozione dei fosfati che è tornata a crescere non appena i nitriti sono stati ridotti ad azoto molecolare. Infine, il presente contributo è propedeutico all'applicazione della tecnologia a fango aerobico granulare per il trattamento di reflui industriali salini. Il problema principalmente connesso al trattamento di tali reflui, oltre alla elevata salinità, è rappresentato dalla composizione del substrato che, il più delle volte, presenta delle frazioni lentamente biodegradabili e recalcitranti. Tuttavia, l'eventualità di poter otte-

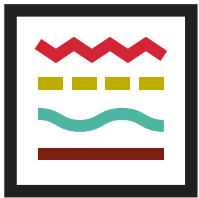
nere granuli maturi e stabili in presenza di elevata salinità e refluo sintetico, confermata dai risultati del presente lavoro, suggerisce la concreta possibilità di applicare la tecnologia al trattamento di acque reflue saline industriali.

5. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, nineteenth ed. American Public Health Association, Washington DC, USA.
- Adav, S.S., Lee, D.-J., Show, K.-Y., Tay, J.-H. (2008). Aerobic granular sludge: Recent advances. *Biotechnol. Adv.* 26, 411-423.
- Bartrolí, A., Pérez, J., Carrera, J. (2010). Applying ratio control in a continuous granular reactor to achieve full nitrification under stable operating conditions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8930-8935.
- Bassin, J.P., Pronk, M., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Loosdrecht, M.C.M. Van, Bassin, J.P., Pronk, M., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Dezotti, M., Loosdrecht, M.C.M. Van (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., Heijnen, J.J. (2002) Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Res.* 36, 702-712.
- Corsino, S.F., Campo, R., Di Bella, G., Torregrossa, M., Viviani, G. (2015) Cultivation of granular sludge with hypersaline oily wastewater. *Int. B99iodeterior. Biodegrad.* 105, 192-202.
- Corsino, S.F., Capodici, M., Morici, C., Torregrossa, M., Viviani, G. (2016) Simultaneous nitrification-denitrification for the treatment of high-strength nitrogen in hypersaline wastewater by aerobic granular sludge. *Water Res.* 88, 329-336.
- De Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M. (2006) Formation of aerobic granules with domestic sewage. *J. Environ. Eng.* 132, 694-697.
- 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.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R. (2008) Treatment of saline wastewater in SBR aerobic granular reactors. *Water Sci. Technol.* 58(2), 479-485.
- 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, 1909-1917.
- Lefebvre, O., Moletta, R. (2006) Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Res.* 40, 3671-3682.
- Li, Z.H., Wang, X.C. (2008) Effects of salinity on the morphological characteristics of aerobic granules. *Water Sci. Technol.* 58(12), 2421-2426.
- 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. *Bioresour. Technol.* 121, 111-118.
- Liu, Y., Tay, J. (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment 22, 533-563.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 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. Microbiol.* 71, 1051-1057.
- Muda, K., Aris, A., Salim, M.R., Ibrahim, Z., Yahya, A., van Loosdrecht, M.C.M., Ahmad, A., Nawahwi, M.Z. (2010) Development of granular sludge for textile wastewater treatment. *Water Res.* 44, 4341-4350.
- 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1339-1348.
- Ramos, C., Suárez-Ojeda, M.E., Carrera, J. (2015) Long-term impact of salinity on the performance and microbial population of an aerobic granular reactor treating a high-strength aromatic wastewater. *Bioresour. Technol.* 198, 844-851.
- 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. *Bioresour. Technol.* 111, 21-26.
- Val del Río, A., Figueroa, M., Arrojo, B., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Garcia-Torriello, G., Méndez, R. (2012) Aerobic granular SBR systems applied to the treatment of industrial effluents. *J. Environ. Manage.* 95, S88-S92.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Pot, M.A., Heijnen, J.J. (1997) Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses, in: *Water Sci. Technol.* 35(1), 41-47.
- 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. *Bioresour. Technol.* 152, 1-6.
- Wang, Z.W., Liu, Y., Tay, J.H. (2006) The role of SBR mixed liquor volume exchange ratio in aerobic granulation. *Chemosphere* 62, 767-771. Doi:10.1016/j.chemosphere.2005.04.081.
- 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 Res.* 46, 5445-5451.
- Zhang, X., Bishop, P.L., Kinkle, B.K. (1999) Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Sci. Technol.* 39(7), 211-218.
- Zhu, L., Lv, M.-L., Dai, X., Yu, Y.-W., Qi, H.-Y., Xu, X.-Y. (2012) Role and significance of extracellular polymeric substances on the property of aerobic granule. *Bioresour. Technol.* 107, 46-54.

RINGRAZIAMENTI

Questo articolo riprende parte di un contributo presentato a SIDISA 2016.



INGEGNERIA DELL'AMBIENTE

per il 2016 è sostenuta da:

