

Interazioni tra fattori ambientali e batteri filamentosi in un impianto di depurazione di reflui urbani

Enrico Bruzzone^{1*}, Alessandro Moscatelli²

¹ Publicacqua S.p.a., Via Villamagna 90/c - 50126 Firenze

² Libero professionista, Via Vittorio Veneto 11 - 50013 Campi Bisenzio (FI)

* Referente per la corrispondenza (fax 0574/676004; e.bruzzone@publicacqua.it)

Pervenuto 9.2.2005; accettato 31.5.5

Riassunto

I risultati di due anni di osservazioni microscopiche e di altre analisi effettuate sui fanghi attivi dell'impianto di depurazione centrale di Pistoia, interessato da fenomeni di bulking, sono stati valutati in relazione a misurazioni relative alla fase di ossidazione.

I dati relativi al periodo in questione sono stati oggetto di un'analisi di correlazione non parametrica e, successivamente, esplorati mediante la tecnica dell'analisi delle componenti principali.

Gli esiti delle analisi effettuate indicano che il fenomeno di bulking che si è verificato è stato causato dal batterio filamentoso tipo 0581 (analogo di *Microthrix parvicella*), la cui abbondanza è legata in modo particolare all'andamento della temperatura dei fanghi nella vasca di ossidazione.

PAROLE CHIAVE: batteri filamentosi / depurazione / bulking / analisi delle componenti principali / correlazione di Spearman

Interactions between environmental factors and filamentous bacteria in a wastewater treatment plant

The results of two years of microscopic observations of activated sludge from the wastewater treatment plant of Pistoia (Italy) are summarised. The data were correlated with plant operations and with other analysis on the sludge, regarding important measures from process point of view.

Findings point out a clear conclusion (such as in previous works by other authors): bulking phenomenon caused by filamentous bacteria type 0581 (similar to *Microthrix parvicella*) is linked to sludge temperature trend.

KEY WORDS: filamentous bacteria / wastewater treatment / bulking / Principal Components Analysis / Spearman correlations

INTRODUZIONE

A partire dal novembre 1999, nell'impianto di depurazione S. Agostino di Pistoia è stato evidenziato un problema di schiume nei sedimentatori secondari che si è protratto fino alla primavera inoltrata (aprile-maggio 2000) e che, in alcuni sporadici casi, ha provocato il trascinarsi di fanghi con aumento dei solidi sedimentabili e sospesi nell'effluente.

Tale fenomeno in seguito è comparso solo raramente e comunque non si è mai verificato in modo così critico.

Nel presente lavoro sono analizzate e discusse importanti relazioni tra il fenomeno riscontrato e misurazioni relative alla fase di ossidazione.

MATERIALI E METODI

L'ambiente studiato

L'impianto di depurazione S. Agostino di Pistoia tratta liquami principalmente di tipo domestico (nel 1999 complessivamente 3.064.810 m³, nel 2000

3.306.934 m³ e nel 2001 4.498.323 m³), con valori giornalieri intorno ai 10.000 m³. Ha una potenzialità di circa 120.000 abitanti equivalenti ed un carico effettivo di circa 70.000 abitanti equivalenti.

Lo schema di funzionamento è quello convenzionale a fanghi attivi: grigliatura e sollevamento iniziale, disoleatura e dissabbiatura, vasca di pretrattamento dei reflui conferiti su gomma (scarichi di vuotatura di fosse biologiche, percolati di discarica, materiali provenienti dalla pulizia della rete fognaria e delle stazioni di sollevamento, fanghi biologici da piccoli depuratori, in quantità medie giornaliere complessive di circa 27.000 kg), sedimentazione primaria, denitrificazione, ossidazione, sedimentazione secondaria e vasca di clorazione (quest'ultima non attiva). Il depuratore è inoltre dotato di una linea fanghi (ricircolo miscela aerata, ricircolo fanghi secondari, pre-ispessimento, digestione anaerobica, post-ispessimento, disidratazione mediante centrifuga) e di una linea biogas con cogenerazione.

Al fine di valutare i rendimenti depurativi e il rispetto dei limiti di legge, nelle acque in ingresso e in uscita dall'impianto sono mantenuti sotto osservazione i seguenti parametri: pH, conducibilità, COD, BOD₅, solidi sospesi e sedimentabili, azoto ammoniacale, nitroso, nitrico e totale, fosforo totale e, con minor frequenza, grassi e oli, tensioattivi, sostanze tossiche (quali metalli pesanti). In generale, le analisi dei liquami in ingresso condotte nel periodo novembre 1999-dicembre 2000 hanno evidenziato un rapporto BOD₅:N:P piuttosto sbilanciato, per eccessi di azoto ammoniacale e di fosforo totale rispetto al BOD₅ (Tab. I).

Le caratteristiche qualitative dell'effluente sono risultate permanentemente entro i limiti tabellari imposti dalle normative nazionali e regionali vigenti, ad eccezione di alcuni episodi di fughe di solidi sedimentabili e sospesi, in conseguenza di fenomeni di bulking (Tab. II).

MISURE E ANALISI EFFETTUATE

Uno degli strumenti utilizzati per l'indagine analitica è stato l'indice biotico del fango (Sludge Biotic Index, SBI: MADONI, 1994). Tramite questo parametro vengono conteggiate le specie totali di protozoi e gli individui appartenenti a ciascuna di esse, osservate al microscopio a 200 ingrandimenti in 25 µL di fango attivo. L'indice varia da 0 a 10 ed esprime il grado di depurazione biologica del fango.

Come altro metodo biologico è stata utilizzata la valutazione dell'abbondanza totale dei batteri filamentosi (riferita all'osservazione di tutte le specie nel fango a 1.000 ingrandimenti in contrasto di fase, con riferimenti numerici da 1 a 6, indicanti la classe di abbondanza: pochi, alcuni, moderati, frequenti, abbondanti,

eccessivi). Inoltre è stata valutata anche l'abbondanza relativa: ad ogni singola specie riscontrata veniva assegnato un valore numerico da 1 a 4, indicante rispettivamente presenza rara, modesta, abbondante, dominante (JENKINS *et al.*, 1993; AGAC, 1992; AGAC e UNIV. PARMA, 1996). Si è utilizzato un microscopio Nikon Eclipse E400, equipaggiato con contrasto di fase. Sono inoltre state effettuate le colorazioni di Gram e di Neisser per il riconoscimento dei microrganismi filamentosi e, più sporadicamente, l'S-test, per l'osservazione dei granuli di zolfo inclusi nei filamenti.

Nella sezione di ossidazione sono stati monitorati pH, temperatura fanghi, ossigeno disciolto (OD), solidi sedimentabili in 30 minuti in cono Imhoff da 1.000 mL (Cono), Mixed Liquor Suspended Solids (MLSS), Sludge Volume Index (SVI). Tali parametri sono stati raccolti contemporaneamente all'analisi microscopica del fango attivo e sono quindi stati utilizzati come serie di dati da mettere in correlazione nell'analisi statistica.

Allo scopo di comprendere meglio alcuni fenomeni legati alla sedimentabilità dei fanghi, sono state eseguite prove di velocità di sedimentazione, nonché determinazioni dell'indice di bioflocculazione (IB) e di galleggiamento degli stessi (AGAC, 1992). Il primo indice è dato dal rapporto tra la concentrazione dei solidi sospesi nel surnatante dopo 2 ore di sedimentazione statica in cono Imhoff ed il valore di MLSS in vasca di ossidazione; tanto più piccolo è il valore, tanto migliore è la sedimentabilità (un fango con IB minore di 5, ad esempio, ha elevata capacità di rendere limpido l'ef-

Tab. I. Valori medi, massimi, minimi e deviazioni standard di alcuni parametri monitorati relativi al liquame in ingresso al depuratore nell'anno 2000.

Parametri	Media	Max	Min	Deviaz. stand.
COD (mg/L O ₂)	536	1208	132	281
BOD ₅ (mg/L O ₂)	282	450	80	91
Azoto ammon. (mg/L NH ₄)	71,2	115,6	16	22,9
Fosforo totale (mg/L P)	5,5	12,5	1,8	2,6

Tab. II. Valori medi, massimi, minimi e deviazioni standard di alcuni parametri monitorati relativi al liquame in uscita dal depuratore nell'anno 2000.

Parametri	Media	Max	Min	Deviaz. Stand.
COD (mg/L O ₂)	33	59	12	11
BOD ₅ (mg/L O ₂)	7	21	2	5
Solidi sospesi totali (mg/L)	20	118	1	26
Azoto ammon. (mg/L NH ₄)	0,7	6,0	Nr	1,28
Fosforo totale (mg/L P)	1,9	5,8	0,2	1,5

fluente). Anche l'indice di galleggiamento dà una misura dei solidi nel surnatante, in particolare quelli dovuti a flottazione e risalita dei fanghi, e si ottiene dal rapporto tra il tempo necessario al verificarsi di una risalita di almeno 3 mm di spessore all'interno del cilindro in condizioni statiche, ed i 120 minuti di durata della sedimentazione: tanto più piccolo è il valore, tanto maggiore è la tendenza al galleggiamento dei fanghi.

Le condizioni di sedimentabilità del fango sono state seguite costantemente anche attraverso la produzione di curve relative alla velocità di sedimentazione. In questo tipo di prova 2 litri di fango attivo vengono posti in cilindro graduato, quindi ne viene annotato l'abbassamento di livello nel tempo (2 ore). I grafici che si ottengono forniscono un immediato riscontro delle condizioni di sedimentabilità dei fanghi; tali condizioni sono ritenute accettabili quando si ha una diminuzione repentina del livello dei fanghi nel cilindro utilizzato per la prova nei primi minuti, seguita da un decremento più lento e costante nel tempo.

La tabella III riassume le grandezze rilevate e le strumentazioni utilizzate per la loro determinazione.

Per le altre analisi inerenti la fase di ossidazione si è fatto ricorso ad una sonda biparametrica per temperatura ed ossigeno disciolto (OD); il parametro MLSS è stato determinato per via gravimetrica dopo filtrazione su filtri in carta del diametro di 150 mm.

I risultati ottenuti mediante l'osservazione microscopica dei microrganismi presenti in vasca di ossidazione e nel sedimentatore, e le variabili monitorate nella fase di ossidazione sono stati utilizzati come set di variabili da sottoporre ad un'analisi statistica. In particolare, per individuare l'esistenza o meno di un legame di dipendenza tra i ranghi delle coppie di serie, è stato utilizzato l'indice di correlazione non parametrica di Spearman.

Successivamente, allo scopo di analizzare statisticamente la struttura interna delle variabili disponibili, è stata utilizzata l'Analisi delle Componenti Principali (ACP). Tale metodologia, finalizzata ad estrarre la

massima informazione possibile contenuta in una struttura di dati multivariati, trova applicazione in tutti i campi di ricerca e può essere considerata la base dell'analisi statistica multivariata.

L'ACP, oltre ad essere una tecnica di riduzione della dimensionalità, è anche un efficace strumento di analisi e di indagine relativamente al sistema di correlazioni che si ha tra le variabili, espresso dalla matrice di covarianza o di correlazione. Questa metodologia inoltre mette in evidenza le variabili che maggiormente guidano il fenomeno descritto dall'insieme di dati a disposizione (MOSCATELLI, 2003).

RISULTATI

Nel periodo considerato è stato possibile appurare che l'osservazione della microfauna attraverso l'indice SBI, pur essendo di una certa utilità per il monitoraggio della qualità generale dell'effluente, non forniva informazioni aggiuntive riguardo la risoluzione del fenomeno di bulking. Infatti tale indice assumeva valori di 8 o 9 anche in presenza di abbondanti schiume e non sembrava correlabile con la loro massiccia formazione.

L'osservazione dei batteri filamentosi nel periodo compreso tra l'inverno 1999 e la primavera 2000 riscontrava quasi permanentemente una classe di abbondanza totale pari a "eccessiva" o "abbondante".

Durante il periodo di indagine, l'osservazione microscopica dei microrganismi filamentosi presenti in vasca di ossidazione e nel sedimentatore, e le prove di velocità di sedimentazione, di bioflocculazione e di galleggiamento del fango, hanno evidenziato scarsa tendenza alla sedimentazione e presenza di bulking filamentoso dovuto a proliferazione di batteri classificati come *Tipo 0581* che, dal punto di vista morfologico, presentano caratteristiche analoghe a *Microthrix parvicella*. La differenziazione tassonomica tra le due entità è stata realizzata tramite la diversa risposta alla colorazione Gram: Gram + *M. parvicella*, Gram - *Tipo 0581*. L'esecuzione della colorazione di Neisser

Tab. III. Parametri misurati e metodiche utilizzate.

Parametro	Strumentazione e metodica utilizzata
pH	Elettrodo (Hanna Instruments)
Conducibilità	Sonda (Hanna Instruments)
COD	Kit commerciale in cuvetta con reagenti pronti (Merck), metodo al bicromato di potassio
BOD ₅	Sistema basato sulla registrazione della differenza di pressione dovuta alle variazioni di O ₂ disciolto ("Oxitop" WTW)
Solidi sospesi	Determinazione per via gravimetrica dopo filtrazione del campione su filtri di porosità 0,45 µm e di diametro 47 mm
Solidi sedimentabili	Sedimentazione statica in cono Imhoff per 2 ore
Azoto ammoniacale	Metodo colorimetrico al blu indofenolo
Azoto nitroso	Metodo colorimetrico che impiega il reattivo di "Griess" (sulfonilammide e α-naftiletildiammina)
Azoto nitrico	Doppia misura spettrofotometrica a 220 e 275 nm
Fosforo totale	Metodo fotometrico al blu di molibdeno

in alcune delle osservazioni ha fugato inoltre ogni eventuale dubbio tra *M. parvicella* e *Nostocoida limicola* I, confermando la presenza del *Tipo 0581* (RICHARD, 1989).

Individuato il tipo di microrganismo filamentoso responsabile del fenomeno di bulking, è stato analizzato il set di dati formato dalle variabili misurate pertinen-

ti alla sezione di ossidazione e l'abbondanza relativa dello stesso.

L'andamento delle serie temporali studiate è rappresentato in figura 1; per brevità, ai dati relativi al parametro solidi sedimentabili in 30 minuti in cono Imhoff da 1.000 mL ci si riferisce con la dicitura "cono".

La tabella IV riporta le statistiche descrittive dei dati

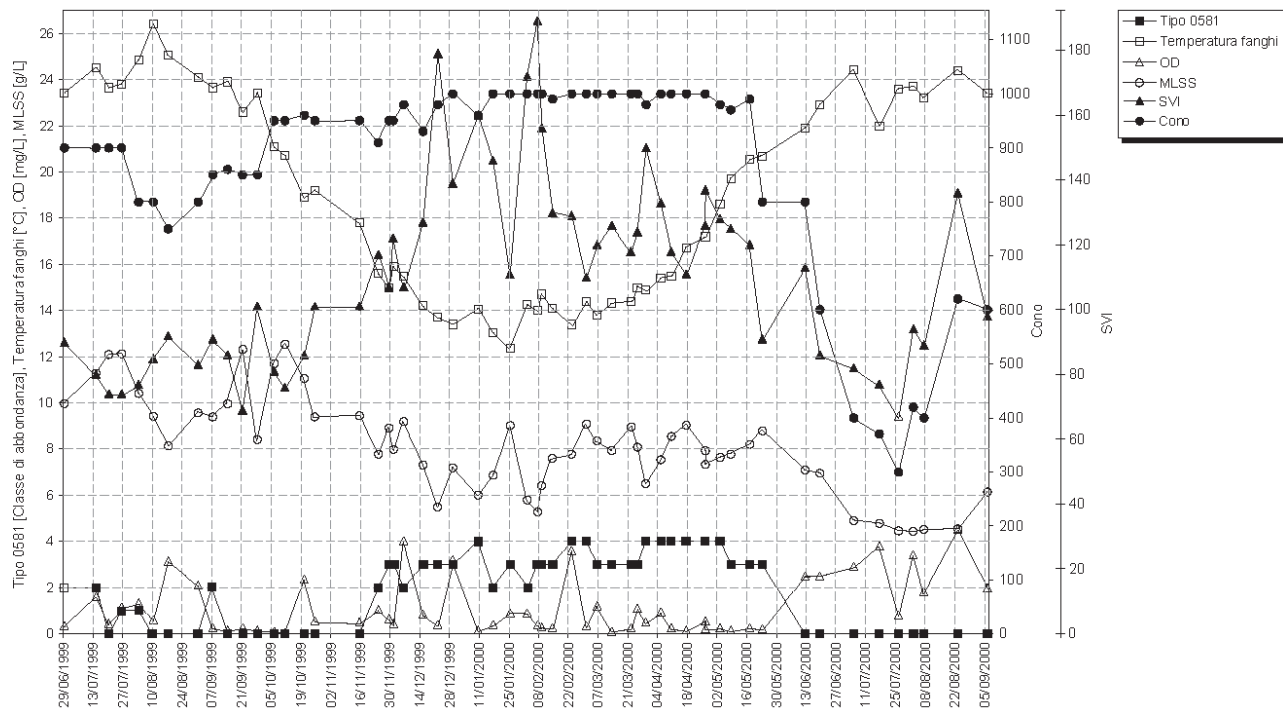


Fig. 1. Andamento delle variabili utilizzate per le analisi statistiche.

Tab. IV. Rapporto di statistica descrittiva univariata per le variabili in esame.

	Media	Mediana	Moda	Dev. standard	Range	Minimo	Massimo
Tipo 0581	1,9	2	0	1,6	4	0	4
Temperatura fanghi	18,9	18,8	23,4	4,3	14,1	12,4	26,4
OD	1,1	0,6	0,3	1,2	4,5	0,1	4,5
SVI	111	110,5	86	28,8	122	67	189
Cono	871,4	950	1000	186,1	700	300	1000
MLSS	8,1	8	9,4	2,1	8,1	4,4	12,5

Tab. V. Matrice di correlazione non parametrica dei dati in esame.

	Abbondanza tipo 0581	Temperatura	OD	SVI	Cono	MLSS
Abbondanza tipo 0581	1					
Temperatura	-0,72	1				
OD	-0,35	0,21	1			
SVI	0,70	-0,76	-0,14	1		
Cono	0,76	-0,81	-0,36	0,67	1	
MLSS	-0,18	0,25	-0,29	-0,53	0,07	1

in esame.

In via preliminare è stata effettuata un'analisi di correlazione tra le variabili a disposizione. Con lo scopo di individuare l'esistenza o meno di un legame di dipendenza tra i ranghi delle serie come misura della correlazione è stato utilizzato l'indice di Spearman. La scelta di utilizzare una misura non parametrica della correlazione è stata operata in ragione delle forti non linearità che operano alla base del processo. La robustezza della correlazione di rango in condizioni di non linearità delle relazioni tra le variabili è infatti la caratteristica che rende particolarmente utile l'applicazione di questo tipo di coefficiente. I risultati dell'analisi di correlazione non parametrica sono rappresentati in tabella V.

Il risultato più interessante che si desume dall'analisi della matrice di correlazione non lineare è la forza del legame che si ha tra l'abbondanza del batterio filamentoso identificato come *Tipo 0581* e le variabili temperatura dei fanghi nella vasca di ossidazione, solidi sedimentabili in 30 minuti in cono Imhoff da 1.000 mL (Cono) e "Sludge Volume Index" (SVI). In particolare, la temperatura dei fanghi in vasca di ossidazione risulta essere inversamente correlata, contrariamente alle grandezze cono e SVI, che mostrano un indice di correlazione positivo. Il parametro che risulta essere meno correlato con l'abbondanza del batterio filamentoso Tipo 0581 è MLSS.

Per il parametro ossigeno disciolto (OD) non si riscontra una proporzionalità inversa accettabile, vale a

dire che all'aumento della concentrazione relativa del batterio filamentoso tipo 0581 non corrisponde una effettiva diminuzione dei valori di ossigeno disciolto. È comunque doveroso osservare che la misura effettuata con le sonde in alcuni casi può non rendere la diffusione effettiva dell'ossigeno all'interno del fiocco di fango.

Più difficilmente si spiega la bassa correlazione con la grandezza MLSS, soprattutto in ragione del fatto che esiste una forte correlazione positiva con lo SVI (che deriva come noto dal rapporto tra solidi sedimentabili in 30' e MLSS). È possibile ipotizzare, almeno in questo caso, che la presenza di un fango "gonfio" non dipenda essenzialmente dalla concentrazione della sostanza secca del fango stesso.

Per completare l'elaborazione dei dati disponibili è stata utilizzata la tecnica dell'Analisi delle Componenti Principali (ACP), allo scopo di individuare le variabili che maggiormente guidano il fenomeno.

L'ACP è stata applicata alle variabili standardizzate (media zero e varianza unitaria) in modo tale da dare a tutte la stessa importanza in termini di variabilità. Da un primo esame emerge infatti che le deviazioni standard dei dati (tabella IV), e quindi le loro varianze, non sono omogenee: la standardizzazione diventa dunque necessaria per avere dei risultati che non siano influenzati dalla gerarchia che si ha in termini di variabilità nelle grandezze originali.

I risultati dell'ACP applicata ai dati standardizzati sono sintetizzati nel grafico rappresentato in figura 2,

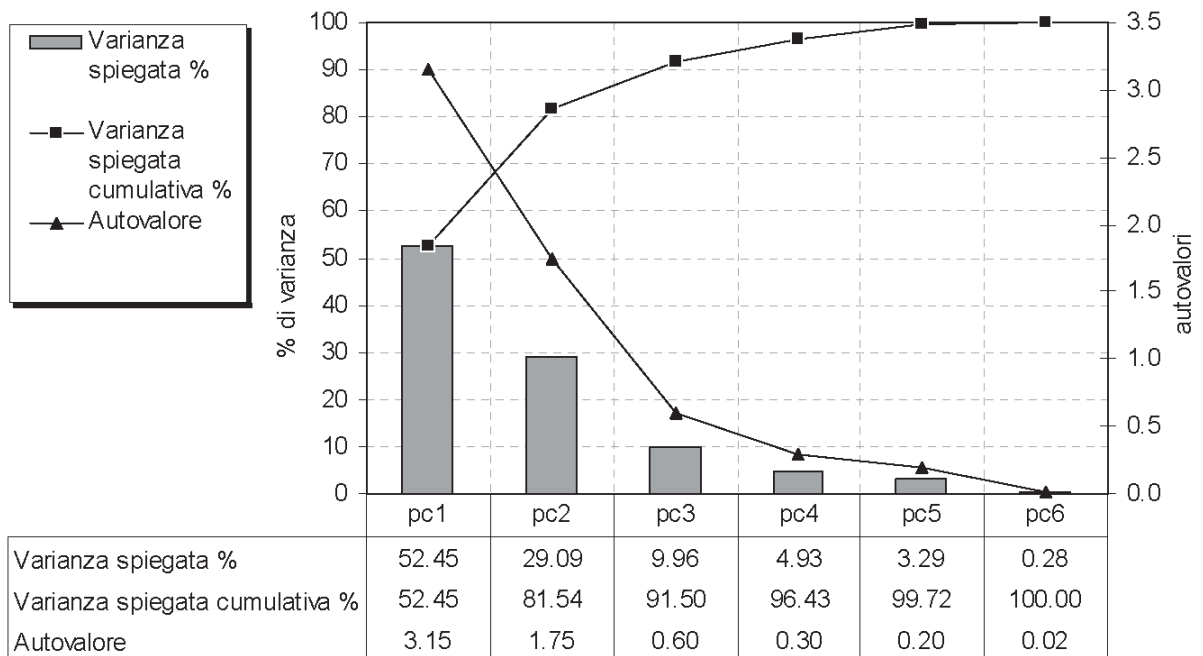


Fig. 2. Risultati dell'Analisi delle Componenti Principali.

nel quale si riportano, per ogni componente principale, l'autovalore e la varianza percentuale spiegata; viene inoltre riportata anche la varianza percentuale spiegata cumulativa.

Dai risultati si desume come le prime due componenti principali siano in grado di spiegare oltre l'80% della varianza complessiva: l'analisi dunque di queste due componenti, ed in particolare i coefficienti attraverso i quali le variabili originali le generano, sono in grado di fornirci informazioni riguardo al processo che stiamo studiando. Il grafico mostrato in figura 3 evidenzia l'importanza relativa delle variabili originali nelle prime due componenti principali.

Dall'esame di tale grafico risulta evidente che le variabili abbondanza relativa del batterio filamentoso *Tipo 0581* e temperatura dei fanghi nella vasca di ossidazione siano le più importanti per il contributo che danno alla prima componente principale e le meno importanti per quello apportato alla seconda; risultano inoltre inversamente correlate tra di loro. Il parametro MLSS, irrilevante per il contributo che dà alla prima componente principale, risulta il più influente nella seconda.

La prima componente principale, che spiega da sola il 52,45% della varianza totale, può essere interpretata come un indice sintetico in grado di cogliere e evidenziare in modo efficace il comportamento inversamente proporzionale che si ha tra la temperatura dei fanghi da un lato e le variabili abbondanza del batterio filamentoso *Tipo 0581*, cono e SVI dall'altro. In particolare emerge il forte comportamento inversamente proporzionale che si ha tra la temperatura dei fanghi nella vasca di ossidazione e l'abbondanza del batterio filamentoso tipo 0581, responsabile del fenomeno di bulking riscontrato nell'impianto nel periodo in esame.

CONCLUSIONI

In questo lavoro sono state espone le metodiche utilizzate per l'individuazione, mediante l'analisi microscopica del fango attivo, del batterio filamentoso responsabile del fenomeno di bulking verificatosi nell'impianto centrale di depurazione di Pistoia. L'abbondanza del batterio responsabile del fenomeno, risultato il *Tipo 0581*, ed alcuni parametri relativi alla fase di ossidazione hanno costituito una base di dati multivariati che sono stati in seguito oggetto di studio.

I dati sono stati in via preliminare analizzati valutandone l'indice di correlazione di Spearman. Gli esiti della correlazione non parametrica effettuata hanno rivelato una forte correlazione inversamente proporzionale tra la temperatura dei fanghi nella vasca di ossidazione e l'abbondanza relativa del batterio fila-

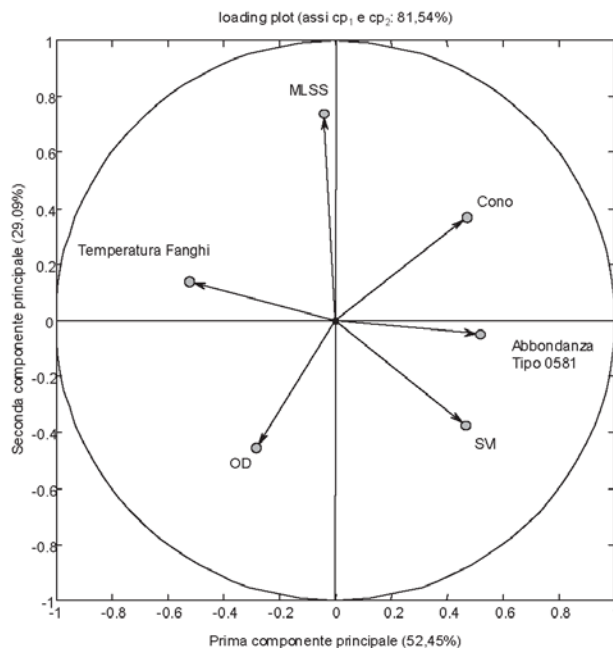


Fig. 3. Loading plot: importanza relativa delle variabili originali nello spazio individuato dalle prime due componenti principali.

mentoso *tipo 0581*. Successivamente l'insieme di dati a disposizione è stato analizzato mediante l'analisi delle componenti principali. A conferma dei risultati ottenuti attraverso la misura non parametrica della correlazione, l'ACP ha rilevato il forte legame inversamente proporzionale tra la temperatura dei fanghi in vasca di ossidazione e l'abbondanza del batterio filamentoso *tipo 0581* (SODDELL e SEVIOR, 1990).

Le relazioni evidenziate dall'elaborazione statistica confermano ciò che altri lavori avevano già precedentemente riportato. Tuttavia, mentre la proporzionalità diretta con i solidi sedimentabili in 30' in cono Imhoff –e conseguentemente con lo SVI– si può considerare come una conseguenza dell'innesco del fenomeno di bulking, la proporzionalità inversa con la temperatura dei fanghi ne è sicuramente una causa. Dal punto di vista gestionale il parametro temperatura dei fanghi può essere quindi utilizzato come "mezzo predittivo" del fenomeno in esame, anche allo scopo di adottare tempestivamente contromisure per debellarlo.

Ringraziamenti

Un ringraziamento particolare va al sig. Roberto Filoni ed a tutti i colleghi dell'impianto di depurazione di Pistoia, attualmente gestito da Publiacqua S.p.a. (gestore del ciclo idrico integrato nel bacino del Medio Valdarno) per la preziosa collaborazione e per i consigli durante varie fasi del lavoro.

Si ringrazia inoltre la dr.ssa Daniela Burrini del Servizio Controllo, Ricerca e Sviluppo di Publiacqua S.p.a. per i consigli forniti in fase di stesura.

BIBLIOGRAFIA

- AGAC, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA, 1996. *Guida all'analisi microscopica del fango attivo*. AGAC, Reggio Emilia. 108 pp.
- AGAC, 1992. *I principali microrganismi filamentosi del fango attivo*. AGAC, Reggio Emilia, 102 pp.
- JENKINS D., RICHARD M.G., DAIGGER G.T., 1993. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan. 193 pp.
- MADONI P., 1994. La microfauna nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi. AGAC, Reggio Emilia, 48 pp.
- RICHARD M.G., 1989. *Activated sludge microbiology*. W.P.C.F., Alexandria, Virginia.
- SODDELL J.A., SEVIOUR R.J., 1990. Microbiology of foaming in activated sludge plants. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**: 165-176.
- MOSCATELLI A., 2003. Diagnostica del processo di chiariflocculazione mediante tecniche di intelligenza artificiale. Tesi di Laurea in Ingegneria per l'ambiente ed il territorio, Università degli studi di Firenze.