

ISTITUTO
PER L'AMBIENTE

FANGHI ATTIVI: ASPETTI MICROBIOLOGICI NELLA GESTIONE DI PROCESSO*

66/76115

V. Tandoi **

Sommario—L'osservazione microscopica del fango attivo rappresenta un indispensabile strumento per valutare la presenza di alcune popolazioni microbiche importanti per il loro ruolo negativo, come quello svolto dai batteri filamentosi e dagli attinomiceti che producono schiume "biologiche" oppure per il loro ruolo positivo, come quello svolto dai "Bio-P bacteria" o specie batteriche fosforo-accumulanti. E' possibile identificare su base morfologica i numerosi batteri filamentosi che causano il problema del bulking o delle schiume e con tali informazioni, pur disponendo al momento di una casistica limitata, delineare una modifica operativa dell'impianto al fine di sfavorire la crescita della specie microbica responsabile e quindi della disfunzione causata. Vengono inoltre esaminati i vari metodi per la stima dell'attività e della biomassa, misure complementari che consentono una valutazione della capacità depurativa del fango attivo.

ACTIVATE SLUDGE: MICROBIOLOGICAL ASPECTS IN PROCESS MANAGEMENT

Summary—Microscopic investigation of activated sludge is a useful tool to evaluate the presence of microbial populations, important both for their negative role (such as filamentous bacteria and actinomycetes which produce biologic foam) and for their positive role (such as "bio-P-bacteria" or phosphorus accumulating species). It is possible to identify on morphological basis the numerous filamentous bacteria which cause bulking or foam problems. Such information can allow plant alterations to adverse the responsible microbial species growth and therefore the related drawbacks. The various methods for evaluating bulking activity as well as complementary measures to estimate the activated sludge cleansing capacity are examined.

1. INTRODUZIONE

Il processo di trattamento biologico consiste essenzialmente nell'azione di microrganismi che utilizzano le sostanze contenute nello scarico per le proprie esigenze metaboliche, dando origine a nuovi microrganismi (biomassa) e prodotti del catabolismo, acqua e anidride carbonica oppure metano ed anidride carbonica a secondo se la biodegradazione avviene in presenza o in assenza di ossigeno (processi aerobici ed anaerobici). L'azione di biodegradazione è in ogni caso prevalentemente svolta dai batteri, ai quali la natura procariota conferisce estrema versatilità nell'utilizzo di un'ampia gamma di substrati e ridottissimi tempi di duplicazione, mentre una profonda differenza si presenta nella natura delle popolazioni microbiche coinvolte.

* *Relazione presentata al Seminario internazionale di studi: "Progettazione e gestione degli impianti di trattamento delle acque di rifiuto"; Istituto per l'Ambiente e Istituto Europeo delle Acque, luglio 1991*

** *Dott. Valter Tandoi, CNR, Istituto di Ricerca sulle Acque; Via Reno 1 - 00198 Roma - tel. 06.8841451*

Nei processi aerobici operano prevalentemente batteri aerobi ed anaerobi facoltativi mentre in quelli anaerobici in senso stretto, batteri anaerobi facoltativi e anaerobi obbligati (come ad esempio quelli coinvolti nella formazione del metano). Nel caso inoltre di impianti per la rimozione dei nutrienti operano oltre a batteri aerobi ed anaerobi facoltativi anche batteri aerobi con possibilità di respirazione anaerobia (i classici batteri denitrificanti che conducono nei reattori anossici la riduzione dissimilativa dei nitrati).

Tradizionalmente il processo biologico aerobico, ed in particolare quello a fanghi attivi, è stato oggetto di maggiore attenzione e di numerosi studi sistematici che, nonostante i numerosi aspetti ancora da chiarire, consentono un corretto approccio per la gestione del processo. In particolare è possibile tramite una opportuna osservazione microscopica, avere sufficienti indicazioni su alcune popolazioni microbiche presenti nel fango attivo.

Il trattamento biologico anaerobico, invece, ha registrato un notevole interesse più di recente e al momento il principale strumento di caratterizzazione delle biomasse anaerobiche consiste nella stima mediante analisi microbiologiche (che richiedono tra l'altro perizia e attrezzature particolari) delle principali popolazioni microbiche presenti.

2. POPOLAZIONI MICROBICHE DEGLI IMPIANTI A FANGHI ATTIVI

Il processo a fanghi attivi consiste essenzialmente in una coltura microbica mista che cresce aerobicamente sui componenti (organici ed inorganici) delle acque di scarico producendo una biomassa che normalmente si separa nei sedimentatori dall'acqua trattata. Il ruolo primario del processo è svolto dai batteri sebbene protozoi e piccoli metazoi possano contribuire a determinare la purezza dell'effluente.

La composizione microbica della biomassa (una microcomunità presente sotto forma di fiocchi biologici) e la sua attività (considerata prevalentemente svolta dai soli batteri) dipendono da molti fattori: le costanti cinetiche delle varie specie, disponibilità e natura del substrato carbonioso, condizioni fisiche (pH, temperatura, ossigeno disciolto, modo di agitazione, configurazione dell'impianto, etc.) e dalle resistenze diffusionali dei substrati nei fiocchi. Inoltre devono essere considerate anche le interazioni tra le varie componenti la microcomunità, come la predazione, il commensalismo, la competizione alimentare etc..

Considerando la variabilità dei vari parametri in gioco e la complessità del sistema a fanghi attivi, risulta veramente arduo condizionare e mantenere stabile la composizione degli aggregati biologici e assicurare specifici risultati in termini di depurazione.

Durante gli ultimi decenni, l'attenzione è stata focalizzata su alcune specifiche popolazioni batteriche importanti o per la loro azione positiva (nitrificanti, denitrificanti, fosforo accumulanti) o per il loro ruolo negativo, come quello svolto dai batteri filamentosi e da quelli produttori di schiume.

Nonostante i passi avanti fatti nello studio dell'ecologia microbica dei fanghi attivi si è ancora lontani dall'aver disponibile una sufficiente conoscenza della fisiologia delle specie batteriche coinvolte e soprattutto dei rimedi e degli interventi da adottare sugli impianti in piena scala quando insorgono problemi come il bulking o l'abnorme produzione di schiume.

2.1 Bulking e batteri filamentosi

Il fenomeno del bulking consiste nell'improvviso deterioramento delle caratteristiche di sedimentabilità dei fanghi attivi al punto che essi non si separano adeguatamente nelle vasche di sedimentazione secondarie, ma anzi cominciano ad uscire copiosamente con l'effluente trattato. I danni sono immediati comportando un marcato peggioramento delle caratteristiche dell'effluente sia per il notevole contributo in termini di COD e BOD dovuti ai solidi sospesi sia alla concomitante perdita di efficacia del reattore aerobio a causa del depauperamento della biomassa attiva.

E' ormai accertato che la causa del fenomeno risiede nella abnorme proliferazione di batteri di tipo filamentoso, normalmente presenti in modesta quantità nel fiocco biologico, che provocano appunto il caratteristico rigonfiamento dei fiocchi ("bulking") con conseguente peggioramento delle caratteristiche di sedimentabilità.

Mentre un tempo si riteneva che un solo microorganismo filamentoso, *Sphaerotilus natans*, fosse l'unico responsabile del fenomeno, grazie al lavoro svolto sul finire degli anni 70 e i primi degli 80, è stato possibile porre maggiore ordine nell'argomento. Un lavoro resta di capitale importanza, il manuale per la caratterizzazione microscopica del fango attivo realizzato da D. Eikelboom nel 1981 e successivamente disponibile in una edizione più aggiornata (D.H. Eikelboom, 1983). Tale manuale occupandosi della classificazione di un gran numero di microrganismi filamentosi riscontrati in impianti di trattamento biologici, ne riporta 29 gruppi di cui alcuni già più o meno noti e riportati anche nel *Bergey's Manual* (*Sphaerotilus natans*, *Haliscomenobacter hydrossis*, *Beggiatoa* sp., *Microthrix parvicella*, *Thiothrix* sp., *Nostocoida limicola*, *Flexibacter*, *Streptococcus*, *Cyanophyceae*), ed altri quindici al momento indicati soltanto con delle sigle (type 021 N, type 1701, type 0041 etc.) perchè non ancora adeguatamente studiati dal punto di vista microbiologico.

Tali microrganismi in altri termini sono stati classificati su base esclusivamente morfologica mediante tecniche microscopiche, in quanto poco o nulla si sa delle loro caratteristiche genetiche e biochimiche. Esistono inoltre difficoltà per il loro isolamento e mantenimento in coltura pura per la carenza di informazioni relativamente ad idonei terreni di coltura.

Successivamente numerosi studi sono stati indirizzati sullo studio sistematico di forme filamentose causa di problemi negli impianti di trattamento (Strom & Jenkins 1984, Williams & Unz 1985, Horan et al. 1988, Blackbeard et al. 1988).

Intanto gli anni trascorsi avevano permesso di disporre di una notevole casistica sulla frequenza del fenomeno del bulking, tale da poter osservare che il fenomeno si presentava nelle condizioni più disparate, sia ad alto che basso tenore di ossigeno disciolto, alto o basso carico, basso pH etc. (Albertson, 1987).

2.2 Strategie di controllo del "bulking"

Uno dei testi fondamentali che si occupano delle cause e delle metodologie di controllo del bulking può essere considerato il Manuale omonimo redatto dal prof. David Jenkins (1986), che si è a lungo occupato dell'argomento presso il Department of Sanitary and Environmental Engineering, California University, Berkeley.

Le strategie di controllo indicate sono di vario tipo, ma esse consistono essenzialmente o nell'aggiunta di sostanze chimiche oppure in modificazioni o delle condizioni operative (quando possibile) o dello schema dell'impianto con l'introduzione di zone con la funzione di selettori.

Tra le prime c'è l'impiego di sostanze ad azione coagulante come il cloruro ferrico o il latte di calce o polimeri sintetici cationici. Risulta chiaro come l'obiettivo di tali aggiunte, da ottimizzare tramite tests specifici, consista nel tentativo di intrappolare la biomassa. Tale approccio però se da un lato può servire a risolvere momentaneamente il problema contingente, dall'altro si presenta piuttosto costoso e soprattutto non consente di affrontare il problema alla radice.

Parimenti costosi si presentano gli interventi effettuati con sostanze ad azione tossica nei confronti dei batteri filamentosi che hanno comunque il vantaggio di promuovere una notevole azione distruttiva prima, rigeneratrice poi, sui microrganismi componenti il fiocco. Tra le sostanze impiegate a tale scopo rientrano l'acqua ossigenata e l'ipoclorito con preferenza per quest'ultimo.

Nello stesso manuale sono riportati vari casi di interventi su impianti in piena scala coronati da successo, ma appare anche evidente come essi siano suggeriti solo in casi di necessità immediate essendo di gran lunga preferibile, almeno dal punto di vista ipotetico, un tipo di intervento basato sulla possibilità di sfavorire la crescita del microorganismo filamentoso rispetto a quella dei normali microrganismi o "floc forming".

L'approccio indicato si basa sull'ipotesi che due microrganismi, uno floc forming e uno filamentoso, competano per lo stesso substrato carbonioso che funge da substrato limitante. Inoltre il floc forming presenta un tasso massimo di crescita ed una costante di saturazione del substrato più alte di quelle del microrganismo filamentoso. Tale situazione è riportata nella Fig. 1, che evidenzia come operando a basse concentrazioni di substrato sia il filamentoso a prevalere. Una situazione del genere potrebbe verificarsi in un impianto a basso carico. L'introduzione di una zona di dimensioni ridotte a monte della vasca di aerazione principale (v. Fig. 2), consentirebbe quindi di creare una zona a più alta concentrazione di substrato tale da determinare il prevalere della specie floc forming. Nel già citato manuale viene riportato come alcuni casi del genere siano stati affrontati con successo (Jenkins et al. 1986), impiegando appunto un selettore aerobio. La strategia è però del tutto nuova e gli stessi autori

sottolineano la necessità di ulteriori studi volti a chiarire il destino del substrato carbonioso metabolizzato all'interno del selettore:

Uno studio successivo (van Niekerk et al. 1987), entra nel merito della questione ed operando su colture pure di un floc forming (*Zooglea ramigera*) e di un filamentoso (Type 021 N) mostra come i due batteri abbiano una diversa capacità di assimilare il substrato carbonioso una volta posti in presenza di un suo eccesso, ed inoltre come tale capacità dipenda dal loro tasso di crescita. Le Figg. 3 e 4 riportano l'assimilazione del substrato carbonioso (acetato) da parte delle due specie microbiche in prove condotte in condizioni batch in corrispondenza dei valori relativi alla crescita in stato stazionario.

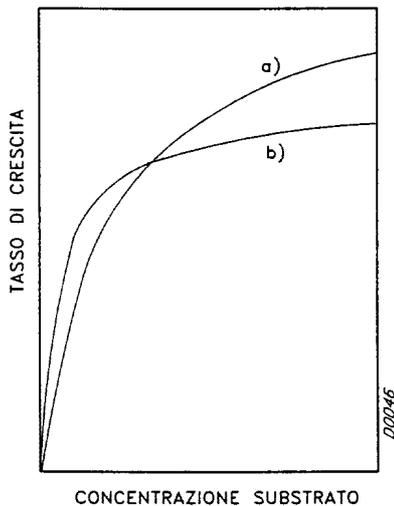


Fig. 1 - Competizione tra un floc forming (a) e un filamentoso (b) in funzione della concentrazione di substrato

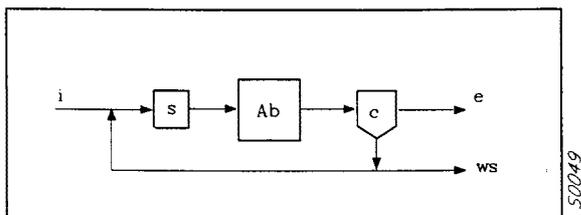


Fig. 2 - Schema di impianto con selettore aerobico: i = influente; s = selettore; Ab = aeratore; c = sedimentatore; e = effluente; WS = fango di spurgo

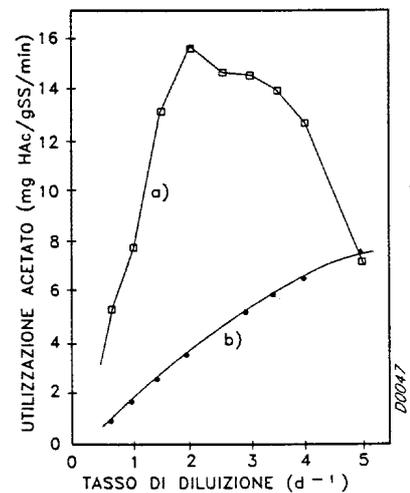


Fig. 3 - Assimilazione di acetato da parte di *Zooglea Ramigera* in condizioni di crescita non bilanciata (a) e bilanciata (b)

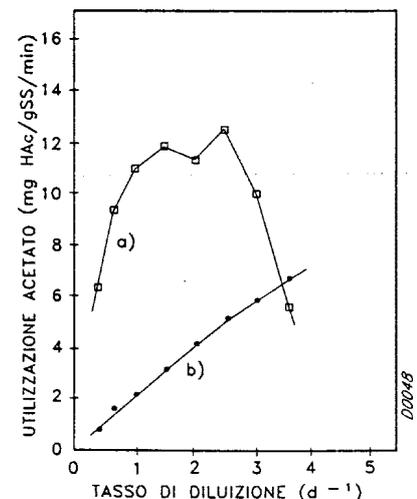


Fig. 4 - Assimilazione di acetato da parte di Type 021 N in condizioni di crescita non bilanciata (a) e bilanciata (b)

Appare evidente come *Zooglea ramigera* in condizioni di crescita non bilanciata, nelle condizioni quindi rapportabili a quelle esistenti in un settore aerobio, possieda una maggiore capacità di assimilare substrato acetato in confronto al battere filamentoso. Tale elevata metabolizzazione è spiegabile osservando che parte del substrato carbonioso è stata convertita in acido poli-idrossi-butirrico all'interno delle cellule. In altri termini tale capacità conferisce a *Zooglea ramigera* un vantaggio selettivo sul filamentoso Type 021 N che alla fine gli permette di prevalere su quest'ultimo, come avvenuto nelle prove con le due specie batteriche poste insieme in condizioni intermittenti di alimentazione del substrato.

Al lavoro illustrato ne è seguito un altro su un modello matematico relativo a tale approccio (van Niekerk et al. 1988).

Un'altra interessante implicazione nell'uso dei selettivi riguarda la possibilità che essi siano costituiti da zone mantenute in condizioni di anaerobiosi o di anossia (assenza di ossigeno ma presenza di azoto nitrico). In tali situazioni si realizza una pressione selettiva simile alla precedente nella quale altri microrganismi riescono a metabolizzare il substrato carbonioso presente a spese delle specie indesiderate.

2.3 I batteri "P-accumulating"

Un settore che ha portato numerose novità su questi aspetti è indubbiamente quello della rimozione biologica del fosforo, nella quale l'alternanza dei fanghi in condizioni di anaerobiosi (in presenza di substrato carbonioso) ed aerobiosi determina elevate rimozioni di fosforo grazie al metabolismo di particolari batteri noti genericamente con il termine "P accumulating", o fosforo accumulanti (Tandoi et al. 1986).

La Fig. 5 illustra il possibile meccanismo di azione di tali microrganismi.

Secondo tale modello le specie batteriche fosforo accumulanti, molto probabilmente *Acinetobacter* spp., sono in grado in anaerobiosi di ricavare energia dall'idrolisi dei polifosfati intracellulari: tale energia mediata sotto forma di ATP consente loro di assimilare il carbonio organico disponibile che viene immagazzinato sotto forma di acido poli-beta-idrossi-butirrico. Il mani-

festarsi di tale particolare metabolismo è infatti segnalato dall'aumento nel reattore anaerobico della concentrazione di fosfato solubile derivante dall'idrolisi appunto dei polifosfati. Appena pervenuti nel reattore aerobico tali batteri provvedono ad ossidare la riserva di PHB costituita precedentemente ripristinando il contenuto originale di polifosfati. Nei reattori aerobici in tal caso si assiste ad una riassunzione di fosfato.

La numerosa mole di lavoro svolta sull'argomento soprattutto nell'ultimo decennio ed i numerosi convegni scientifici specifici, di cui l'ultimo a Roma (Ramadori, 1987), hanno ormai definitivamente accertato il ruolo determinante svolto da tali specie batteriche nel promuovere elevate rimozioni di fosforo dalle acque di scarico urbane, ed un modello biochimico è stato elaborato per interpretare adeguatamente tutte le osservazioni sperimentali (Comeau, 1986)

2.4 Schiume e batteri responsabili

Un altro dei problemi associati con gli impianti a fanghi attivi è associato alla formazione di schiume altamente viscosi e molto stabili. A differenza delle schiume dovute ai detergenti, queste schiume, di natura biologica, conducono ad una vera e propria separazione di fasi.

Quando nel reattore biologico esistono le condizioni per la crescita di alcuni batteri dalla forma filamentosa (*Nocardia* spp., *Microthrix parvicella*, *Rhodococcus* spp.) l'aria inviata tende a farli fluttare nell'interfaccia acqua-aria. In brevissimo tempo tali batteri, di natura idrofoba, si accumulano sulla superficie e la progressiva perdita d'acqua dovuta all'evaporazione conduce ad un graduale aumento di solidi ed in breve ad uno strato di schiuma rigida. La miscela aerata (fase liquida sottostante) ha composizione notevolmente diversa dalla schiuma (fase semi-solida soprastante).

Tali schiume generano odori e aerosoli, si propagano poi facilmente nel sedimentatore, trascinando da entrambi i bacini, creano condizioni di lavoro pericolose per gli operatori. In aggiunta a questi problemi gestionali, le schiume non trattate dal sedimentatore secondario escono con l'effluente finale con risultati analoghi a quelli di disfunzioni da bulking.

Notizie relative a tali disfunzioni provengono praticamente da ogni parte del mondo (USA, Nord Europa, Sud Africa, Australia). Inoltre il principale responsabile della schiuma biologica sembra essere *Nocardia* spp. (Jenkins et al. 1986) ed in particolare *Nocardia amarae* (Blackall, 1986).

Nocardia, infatti, oltre ad essere un battere fortemente idrofobo sembra capace di produrre sostanze tensioattive durante la metabolizzazione di idrocarburi (Mc Donald et al. 1981). *Nocardia*, battere aerobico, è inoltre capace di utilizzare e decomporre una ampia varietà di idrocarburi compresi quelli ad elevato peso molecolare. Tale caratteristica favorirebbe la loro crescita negli impianti trattanti liquami domestici dove gli olii e i grassi costituiscono una frazione rilevante.

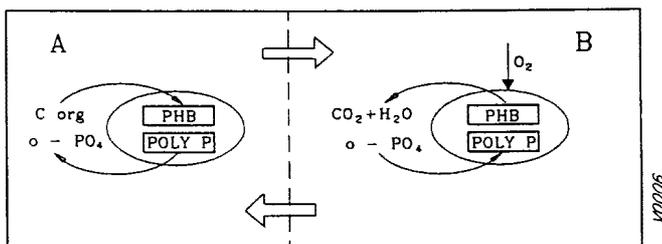


Fig. 5 - Meccanismo di selezione delle specie batteriche fosforo accumulanti; A = anaerobiosi, B = aerobiosi

Uno studio piuttosto recente (Blackall et al. 1989) ha preso in esame gli aspetti cinetici della crescita di un ceppo di *Nocardia amarae*, isolato dalle abbondanti schiume dell'impianto di San Francisco, secondo lo stesso approccio utilizzato nello studio del filamentoso e del floc forming precedentemente descritto. Esso ha evidenziato come *Nocardia amarae* possieda un contenuto tasso di crescita su acetato ($2,8 \text{ d}^{-1}$) ed, una relativamente alta costante di saturazione del substrato acetato ($0,5 \text{ mg/l}$), dati confrontabili con quelli di ceppi batterici provenienti da impianti simili.

Particolarmente interessante si è rivelato il grafico delle assunzioni di substrato in condizioni di crescita non bilanciata (Fig. 6), che evidenzia come *Nocardia amarae* presenti una capacità di assimilazione del substrato in eccesso con un andamento diverso sia da *Zooglea ramigera* che da Type 021 N. *Nocardia amarae* infatti aumenta tale capacità al decrescere del dilution rate e addirittura presenta al più basso valore investigato ($0,64 \text{ d}^{-1}$) una assimilazione di $8,8 \text{ mg}$ di acetato/g SS/min, maggiore di quella presentata dagli altri due batteri precedentemente studiati presso lo stesso laboratorio.

Ciò in altri termini preclude l'impiego di un selettore aerobio, che potrebbe addirittura favorire la crescita di *Nocardia amarae*. Al momento sembra più indicato l'impiego di una zona anossica o anaerobia, in quanto tale attinomicete non è in grado di assimilare la benchè minima quantità di substrato carbonioso in tali condizioni.

Lo studio è comunque ancora in corso in quanto resta da esaminare la possibilità, da non trascurare affatto, che la ragione della presenza di tale microrganismo dipenda soprattutto dalla sua nota capacità di utilizzare substrati particolari, come appunto gli olii.

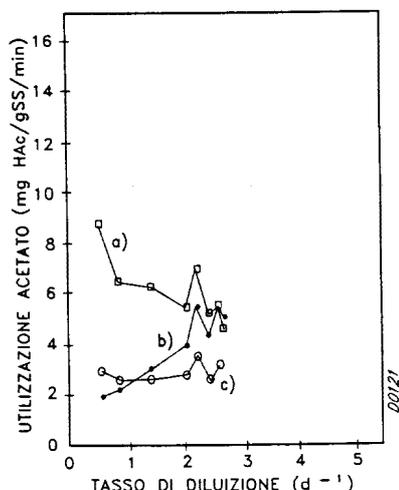


Fig. 6 - Assimilazione di acetato da parte di *Nocardia amarae* in condizioni di crescita non bilanciata (a), bilanciata (b) e attività respiratoria massima (c), al variare del tasso di diluizione

C'è da sottolineare come anche impianti contenenti varie zone anaerobie ed anossiche, come quelli per la rimozione dei nutrienti, siano notori presentare problemi di bulking e schiume. Per quanto riguarda il bulking, Wanner (1988) ipotizza che la crescita dei batteri filamentosi negli impianti single sludge (quelli che alternano zone anaerobie, anossiche ed aerobie), possa essere spiegata grazie al ruolo svolto in aerobiosi dalle sostanze provenienti dall'idrolisi del substrato particellato.

3. OSSERVAZIONI MICROSCOPICHE DEL FANGO ATTIVO

Appare evidente da quanto esposto in precedenza come una conoscenza delle popolazioni microbiche coinvolte nel processo depurativo sia di primaria importanza ai fini di una corretta conduzione e gestione dell'impianto. Sfortunatamente la complessità dell'ecosistema costituito dal fiocco biologico impedisce una esatta determinazione di tutte le specie coinvolte e del loro numero.

Ferma restando la possibilità di determinare indirettamente la capacità complessiva della biomassa a svolgere il lavoro depurativo, si può concentrare l'attenzione sulla presenza di particolari popolazioni microbiche importanti per la loro azione, negativa come i batteri filamentosi o produttori schiume, o positiva come le specie batteriche fosforo accumulanti.

Quanto visto precedentemente ha evidenziato come a tutt'oggi le informazioni su molte delle specie filamentose siano ancora frammentarie ed incomplete, ma ciò non toglie che soltanto un'indagine di tipo microbiologico possa fornire un valido strumento di intervento quanto meno come descrizione del fenomeno ed osservazione dell'efficacia degli eventuali interventi correttivi applicati. Al riguardo è tipica la confusione che ancora si fa tra bulking e schiume al punto che molti li considerano dovuti alla stessa causa. Appare evidente come una frequente e continua osservazione del fango attivo possa portare ad una definizione delle caratteristiche generali dei fiocchi, della loro compattezza, sull'abbondanza di particolari specie microbiche.

Inoltre possono essere agevolmente osservati ed enumerati microrganismi di maggiori dimensioni, come i protozoi che possono svolgere una funzione di indicatori dello stato del fango attivo (Madoni P., 1981).

Le osservazioni microscopiche hanno ricevuto un notevole impulso nell'ultimo decennio e alcune informazioni sono disponibili per individuare la causa del problema del bulking e il rimedio. La Tab. 1 (Jenkins et al. 1986) riporta una correlazione tra alcuni microrganismi filamentosi presenti massivamente nel fango attivo e delle cause che ne hanno determinato lo sviluppo.

Tab. 1 - *Microorganismi filamentosi indicatori delle condizioni che causano bulking*

CONDIZIONI	BATTERIO FILAMENTOSO
basso ossigeno disciolto	type 1701, <i>Sphaerotilus natans</i> <i>Haliscomenobacter hydrossis</i>
basso carico	<i>Microthrix parvicella</i> , <i>Nocardia</i> <i>H. hydrossis</i> , types 021N, 0041, 0675, 0092, 0581, 0961, 0803
acque settiche, solfuri	<i>Thiothrix</i> , <i>Beggiatoa</i> , type 021N
carenza di nutrienti	<i>Thiothrix</i> , <i>S. natans</i> , type 021N, <i>H. hydrossis</i> , types 0041, 0675
basso pH	funghi

3.1 Il Microscopio ottico

La capacità di un microscopista di ottenere informazioni utili da un'immagine ampliata da un microscopio dipende da tre fattori: il numero degli ingrandimenti, il contrasto e il potere risolvete. Tenendo conto della luce utilizzata, del potere risolvete dell'occhio umano (la capacità di vedere due punti come distinti e separati e che è di 0,2 mm con luce normale), il microscopio normalmente utilizzato comprende un sistema di ingrandimenti da 60-100 a 1000 volte (ottenibili con oculari 6 o 10 x, ed obiettivi 10, 20, 40 e 100 x).

Un microscopio è essenzialmente costituito da uno stativo, un sistema di illuminazione, un tavolino porta-preparati, un tamburo portaobiettivi, un condensatore della luce, un sistema di oculari. Altri componenti sono costituiti dal sistema di contrasto di fase, dagli accessori per l'esecuzione delle fotomicrografie o dell'osservazione in fluorescenza etc.

Esistono due tecniche fondamentali di osservazione, a luce diretta ed in contrasto di fase. La prima viene utilizzata per preparati colorati, nei quali il campione viene alterato mediante l'aggiunta di coloranti che aumentano la luce assorbita. L'osservazione in contrasto di fase è utilizzata per preparati osservati a fresco: tramite opportuni diaframmi inseriti nel sistema ottico del microscopio è possibile magnificare i modesti assorbimenti di luce da parte della sospensione microbica, con il risultato di osservare più agevolmente particolari strutture, senza le modificazioni dovute alle colorazioni. Le osservazioni effettuate con obiettivo 100 x richiedono l'inserimento di una goccia di olio per microscopia tra l'obiettivo ed il vetrino.

3.2 Osservazione a fresco

Una goccia di fango attivo (circa 0,050 ml), è disposta su un vetrino e ricoperta rapidamente con un vetrino coprioggetti avendo cura di evitare l'intrappolamento di bolle d'aria. Il preparato è pronto per l'osservazione in contrasto di fase. Le informazioni che si possono

ottenere da questo tipo di osservazioni, riguardano la compattezza del fiocco, l'influenza dei batteri filamentosi sulla sua struttura, l'abbondanza relativa di questi ultimi (nessuno, scarsi, alcuni, comuni, molto comuni, abbondanti, eccessivi). Inoltre è possibile rilevare (a 1000 X) importanti caratteristiche dei batteri filamentosi utili per la loro identificazione, come la presenza di setti, di inclusioni di zolfo, forma delle cellule, dimensioni, presenza di guaina, etc.

3.3 Colorazioni della sospensione microbica

A causa della limitatezza delle informazioni che si possono ottenere dalle cellule microbiche in luce diretta, il campione viene trattato con dei particolari coloranti, che consentono di aumentarne il contrasto. Esistono essenzialmente due tipi di coloranti, positivi e negativi. Un colorante negativo aumenta il contrasto, aumentando l'opacità del fondo; pochi di questi sono però usati nella microscopia ottica (uno è l'inchiostro di India che si lega con la cellule batteriche ma non con la loro capsula).

I coloranti positivi, di più largo impiego, non sono un semplice aiuto nella visualizzazione dei microrganismi ma danno anche informazioni circa la natura e la localizzazione delle strutture cellulari, e sono pertanto un valido aiuto nella identificazione batterica. Queste informazioni sono una conseguenza della specificità della colorazione in quanto la combinazione di un colorante con la cellula è una reazione chimica, che occorre solo nei siti dove sono presenti le opportune condizioni biochimiche.

La capacità di un colorante a combinarsi o meno con una struttura cellulare può quindi dare informazioni circa il possesso di particolari strutture, come avviene nella colorazione di Gram (collegata alla struttura della parete cellulare), o in quelle legate a strutture intracellulari, come la volutina (granuli di polifosfato) o il PHB (acido poli beta idrossi butirrico).

Vengono di seguito riportate solo alcune delle più comuni colorazioni (Jenkins et al. 1986), rimandando ai già citati manuali per una più completa trattazione, interpretazione ed esecuzione.

Resta chiaro che tali colorazioni hanno un senso soltanto per un organismo od un gruppo di essi chiaramente distinguibili al di fuori del fiocco.

Colorazione di Gram

Reagenti	
Soluzione A):	cristal violetto : 2 g
	etanolo 95 % : 20 ml
Soluzione B):	ammonio ossalato : 0,8 g
	acqua distillata : 80 ml

Mescolare A) e B) per ottenere il colorante cristal violetto (soluz. 1).

Soluzione 2

iodio	:	1	g
potassio ioduro	:	2	g
acqua distillata	:	300	ml

Soluzione 3

safranina 0 (2,5 % in etanolo)	:	10	ml
acqua distillata	:	100	ml

Procedura

- 1 - Preparare i vetrini con una goccia di fango e lasciare essiccare all'aria.
- 2 - Colorare 1 minuto con la soluzione 1, quindi sciacquare con acqua di rete per 1 secondo.
- 3 - Colorare 1 minuto con la soluzione 2, quindi sciacquare bene con acqua di rete.
- 4 - Mantenendo i vetrini per un angolo, decolorizzare con etanolo al 95 % aggiunto goccia a goccia per circa 25 secondi. Fare attenzione a non decolorizzare troppo. Fare asciugare.
- 5 - Colorare con la soluzione 3 per 1 minuto: sciacquare bene con acqua di rete, fare asciugare.
- 6 - Esaminare ad immersione in olio a 1000 ingrandimenti a luce diretta: le cellule che appaiono blu-violetto sono Gram positive, quelle rosse sono Gram negative.

Colorazione di Neisser

Questa colorazione è necessaria per mettere in evidenza i granuli intracellulari di polifosfati che sono importanti non solo come carattere distintivo di molti microrganismi filamentosi, ma anche per evidenziare ammassi ("clusters") di importanti batteri quali i fosforo accumulanti.

Reagenti

Soluzione 1

Soluzione A):	blu di metilene	:	0,1	g
	etanolo 95 %	:	5	ml
	acido acetico glaciale	:	5	ml
	acqua distillata	:	100	ml

Soluzione B):	cristal violetto	:	3,3	ml
	(10 % p/v in etanolo)			
	etanolo 95 %	:	6,7	ml
	acqua distillata	:	100	ml

Mescolare due parti di A) e 1 di B); preparare fresca almeno una volta al mese.

Soluzione 2

Bruno Bismark	33,3	ml
(1 % p/v in acqua distillata)		
acqua distillata	66,7	ml

Procedura

- 1 - Preparare un vetrino con una goccia di fango attivo: lasciare asciugare all'aria.

- 2 - Colorare 30 secondi con la soluzione 1; sciacquare 1 secondo con acqua di rete.
- 3 - Colorare 1 minuto con la soluzione 2; sciacquare bene con acqua e lasciare asciugare.
- 4 - Esaminare sotto immersione ad olio a 1000 x con luce diretta: conformazioni intracellulari blu-violetto sono positive mentre una colorazione giallo-marrone è negativa.

Colorazione all'inchiostro d'India

Questa semplice colorazione (una colorazione di tipo negativo), consente di evidenziare all'interno del fiocco parti costituite da ammassi di materiale esocellulare prodotto dai batteri, normalmente indice di un fango attivo in crescita in carenza di nutrienti (azoto o fosforo), caso che può presentarsi quando nello scarico è presente una considerevole frazione di provenienza industriale.

Reagenti

Inchiostro d'India (il comune inchiostro nero per penne stilografiche)

Procedura

- 1 - Mescolare una goccia di inchiostro e una goccia di fango attivo su un vetrino. A seconda del tipo di inchiostro usato può rendersi necessario ridurre il volume.
- 2 - Porre il vetrino coprioggetti e osservare a 1000 x in contrasto di fase.
- 3 - In fanghi attivi normali l'inchiostro penetra uniformemente il fiocco, lasciando minuscole zone chiare.
- 4 - In fanghi attivi contenenti larghi ammassi di materiali esocellulari, saranno invece evidenti larghe aree chiare con scarsa densità di cellule.

4. STIME DI ATTIVITA' E BIOMASSA

Numerosi metodi sono stati proposti per caratterizzare il sistema biologico di un impianto di trattamento a fanghi attivi. Accanto infatti al tradizionale peso secco volatile e ai metodi microscopici, che consentono di ottenere informazioni sulla presenza di particolari popolazioni microbiche come visto in precedenza si pone l'esigenza di determinare la capacità del fango attivo in toto a svolgere l'opera di depurazione. Molto frequente è il caso infatti di intossicazioni del fango (o supposte tali), che evidenziano una perdita della capacità depurativa dello stesso. Vengono di seguito descritti e commentati i numerosi metodi disponibili.

4.1 Analisi batteriologiche

Sebbene, come si è già detto, i batteri siano gli organismi alla base dell'attività depurativa dell'impianto a

fanghi attivi, lo studio volto a determinarli qualitativamente e quantitativamente presenta numerose difficoltà. A parte la necessità di disporre di un laboratorio con un minimo di attrezzatura microbiologica, esistono due ordini di problemi, connessi con l'omogeneizzazione del fiocco e con la scelta del terreno di coltura. I batteri infatti vivono aggregati nel fiocco e tutte le manipolazioni volte a smembrare il fiocco nei suoi costituenti comporta un danno più o meno quantificabile. In secondo luogo un terreno di coltura in grado di supportare la crescita di tutti i batteri non è disponibile. Al momento la metodica che è impiegata allorché si vuole esprimere la carica microbica eterotrofa di un fango attivo, è quella messa a punto da Pike et al. (1972), che prevede una omogeneizzazione del fango con ultrasuoni, diluizioni successive in soluzione di tripolifosfato, ed infine semina su piastre contenenti casitone, glicerolo, estratto di lievito ed agar. Altri metodi sono poi disponibili nel caso si volesse stimare alcune popolazioni microbiche considerate dal punto di vista della loro attività funzionale (ammoinizzanti, nitrificanti, denitrificanti, cellulolitici etc.) (Allievi et al., 1983)

4.2 Acido desossiribonucleico

L'acido desossiribonucleico è il materiale trovato in tutte le cellule viventi ed è responsabile dell'immagazzinamento e della trasmissione di tutte le informazioni necessarie alla riproduzione e alla crescita cellulare. La concentrazione del DNA nei microrganismi è stata dimostrata essere abbastanza costante al variare dello stato fisiologico e della specie batterica. L'analisi di questo costituente cellulare, che sembra avere un lungo tempo di sopravvivenza dopo la morte della cellula, prevede un'estrazione con l'impiego di una centrifuga refrigerata, ed una successiva lettura spettrofotometrica. Questa misura è stata impiegata come stima della biomassa in fanghi attivi, presentando valori intorno al 4 % (Irgens, 1971)

4.3 Proteine

Anche il contenuto in proteine è relativamente costante nelle cellule in normali condizioni di crescita, ma deficienze nutrizionali possono comportare ampie fluttuazioni di questo valore. Pur se la determinazione delle proteine non è correlata alla sola frazione vivente, in quanto include anche detriti organici e cellule morte, essa rappresenta una stima della sostanza organica particellata. La determinazione analitica consiste in una estrazione a caldo e in una lettura spettrofotometrica (Antonietti, 1983)

4.4 Adenosin Trifosfato

Il costituente cellulare che non presenta lo svantaggio di persistere anche dopo la morte della cellula e che

si presenta in concentrazioni più o meno costanti nelle cellule viventi di differenti specie batteriche e stati di crescita è l'adenosin trifosfato (ATP), l'intermedio energetico comune a tutta la materia vivente.

Il metodo (Pagnotta et al., 1983), è basato sulla reazione bioluminescente degli enzimi contenuti nella lanterna della lucciola, che comporta una emissione luminosa proporzionale alla quantità di ATP presente. La metodica prevede una estrazione a caldo ed una lettura della luce emessa tramite un bioluminometro, un apparecchio alquanto costoso, e per questo di limitato impiego presso impianti di trattamento.

La misura dell'ATP, rappresenta comunque una buona stima della frazione vitale dei fanghi attivi ed è stata impiegata con successo, come parametro alternativo al peso secco su un impianto in piena scala, fissandone il valore in vasca di ossidazione a 2 mg/l (EPA, 1972)

4.5 Attività deidrogenasica

Rappresenta una misura dell'attività ossidativa della biomassa, essendo connessa con l'azione delle deidrogenasi, gli enzimi che promuovono insieme ai coenzimi il trasferimento di atomi di idrogeno dai substrati organici all'ossigeno.

La metodica (Pagnotta et al., 1983), si basa sulla reazione del trifenil-tetrazolo (TTC, incolore) che si comporta da accettore inorganico di idrogeno al posto dell'ossigeno, trasformandosi in trifenil-formazano (TF), un composto di colore rosso. Il metodo consiste quindi nell'incubare il fango attivo in presenza di TTC, substrato e in assenza di ossigeno; la reazione viene quindi bloccata tramite etanolo ed il TF estratto determinato spettrofotometricamente.

4.6 Attività respiratoria

Rappresenta una misura di facile esecuzione, che può fornire informazioni sia sulla quantità di biomassa presente che sulla sua attività. Infatti la quantità di ossigeno che un fango consuma è in relazione, in grandi linee, con tutte le funzioni collegate alle cellule batteriche in crescita se in presenza di substrato, oppure in stato di quiete in sua assenza. In altri termini è possibile avere una stima della popolazione batterica presente determinando il consumo di ossigeno del fango attivo tal quale preso dalla vasca di aerazione (avendo accertato il basso valore del substrato carbonioso in vasca) e una stima della sua attività eseguendo la stessa determinazione in presenza di substrato in eccesso (al riguardo è consigliabile operare a 50-100 mg/l di COD sia impiegando lo scarico stesso che un substrato riproducibile come un sintetico composto ad esempio da estratto di carne e glucosio o acetato). La determinazione consiste (Pagnotta et al., 1983) nel seguire il decremento dell'ossigeno disciolto in bottiglie chiuse tramite un apparecchio per la misura dell'ossigeno disciolto con sonda di tipo polarografico.

Valori di 2-10 mg ossigeno / g SS / h rappresentano la normale attività endogena, mentre valori di 10-80 sono tipici dell'attività ossidativa per vari tipi di fango. La facilità di esecuzione, la disponibilità dell'attrezzatura (un apparecchio per la misura dell'ossigeno disciolto deve comunque essere presente presso un impianto di depurazione), le varie informazioni che possono essere ottenute (da non trascurare una valutazione della eventuale tossicità dello scarico in particolari momenti della giornata ottenuta con le stesse modalità), suggeriscono l'opportunità dell'inserimento di questa misura tra quelle di routine dell'impianto.

BIBLIOGRAFIA

- Albertson O.E.** (1987) *The control of bulking sludges: from the early innovators to current practice*, Journal WPCF, 59, 4
- Allievi L., Ferrari A., Sorlini C., Treccani V., De Bertoldi M.** (1983) *Valutazione dei raggruppamenti funzionali di microrganismi*, Metodi Analitici per i fanghi, Parametri biochimici e biologici, Quaderno 64, IRSA
- Antonietti R.** (1983) *Determinazione del contenuto proteico*, Metodi Analitici per i Fanghi, Parametri biochimici e biologici, Quaderno 64, IRSA
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** (1984), Noel R. Krieg & John G. Holt Editors, Williams & Wilkins
- Blackall L.L.** (1987) *Actinomyces scum problems in activated sludge plants*, Thesis (Ph.D.), Univ. of Queensland, Australia
- Blackall L.L., Tandoi V., Jenkins D.** (1989) *The Physiology of Nocardia Amarae isolated from foaming activated sludge*, 13th Federal Convention, Canberra, 6-10 Marzo, Australia
- Blackbeard J.R., Gabb D.M.D., Ekama G.A. and Marais G.v.R.** (1988) *Identification of filamentous organisms in nutrient removal activated sludge plants in South Africa*, Water SA, 14, 1, 1988
- Comeau Y., Hail K.J., Hancock R.E.W., Oldham W.K.** (1986) *Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal*, Water Research, 20, 1511
- Eikelboom D.H. & van Buijssen H.J.J.** (1983) *Microscopic sludge investigation manual*, Report A 94, TNO Research Institute for Environmental Hygiene, Delft, The Netherlands
- EPA** (1972) *Biomass determination. A new Technique for Activated Sludge Control*, Water Pollution Control Research Series, EOY 01/72
- Horan N.J., Bu' Ali A.M. and Eccles C.R.** (1988) *Isolation, Identification and Characterization of filamentous and floc forming bacteria from activated sludge flocs*, Environmental Technology Letters, 9, 449
- Irgens R.L.** (1971) *DNA concentration as an estimate of sludge biomass*, Water Pollution Control Series, PB 203 070 EPA
- Jenkins D., Richard M.G., Daigger G.T.** (1986) *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*, Water Research Commission P.O. box 824 Pretoria, Republic of South Africa
- Madoni P.** (1981) *I protozoi ciliati degli impianti biologici di depurazione*, Collana del Progetto Finalizzato Qualità dell'Ambiente, CNR AQ/1/167
- Mac Donald C.R., Cooper D.G., Zajic J.E.** (1981) *Surface active lipids from Nocardia erythropolis grown on hydrocarbons*, Appl. Environ. Microbiol., 41, 117
- Pagnotta R., Tandoi V.** (1983) *Determinazione dell'adenosin-trifosfato nei fanghi biologici*, Metodi analitici per i fanghi, Parametri biochimici e biologici, Quaderno 64, IRSA CNR
- Pagnotta R., Tandoi V.** (1983) *Determinazione dell'attività deidrogenasica*, Metodi analitici per i fanghi, Parametri biochimici e biologici, Quaderno 64, IRSA CNR
- Pagnotta R., Tandoi V.** (1983) *Richiesta di ossigeno. Metodi analitici per i fanghi*, Parametri biochimici e microbiologici, Quaderno 64 IRSA CNR.
- Pike E.B., Carrington E.G., Ashburner P.A.** (1972) *An evaluation of procedures for enumerating bacteria in activated sludge*, J. Appl. Bact., 35
- Ramadori R.** (Editor) (1987) *Biological Phosphate removal from wastewaters*, Advances in Water Pollution Control, Pergamon Press
- Strom P.F.** (1984) *Identification and significance of filamentous microorganisms in activated sludge*, Journal WPCF, 56, 5
- Tandoi V., Sebastiani Annicchiarico L., Andreoni V., Sorlini C.** (1986) *Ruolo dei batteri fosforo accumulanti nella rimozione biologica del fosforo: esperienze preliminari*, Ingegneria Sanitaria, 24, 3
- van Nierek A.M., Jenkins D., Richard M.G.** (1987) *The competitive growth of Zooglea ramigera and Type 021 N in activated sludge and pure culture. A model for low F:M bulking*, Journal WPCF, 59, 5
- van Nierek A.M., Jenkins D., Richard M.G.** (1988) *A mathematical model of the carbon limited growth of filamentous and floc forming organisms in low F:M sludge*, Journal WPCF, 60, 1
- Wanner J., Grau P.** (1988) *Filamentous bulking in nutrient removal activated sludge systems*, Wat. Sci. Tech., 45, 1
- Williams T.M. and Unz F.** (1985) *Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 273, 22

CURRICULUM

Valter Tandoi - Ricercatore presso l'Irsa del CNR. Nel 1976 consegue la laurea in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Roma, discutendo una tesi sperimentale dal titolo: "Aspetti biologici di un impianto di trattamento a fanghi attivi". Inserito nel Settore Trattamenti delle Acque, cura gli aspetti microbiologici e biochimici di tematiche riguardanti la rimozione biologica dell'azoto, il bulking degli impianti a fanghi attivi, la rimozione biologica del fosforo. Trascorre il 1987 come Visiting Researcher presso il Department of Civil and Environmental Engineering dell'Università della California a Berkeley e presso il Department of Microbiology della stessa Università a Davis. In tale ambito, collaborando con il Prof. David Jenkins, conduce una sperimentazione mediante chemostato su ceppi di *Nocardia amarae*, degli attinomiceti che causano gravi problemi di schiume biologiche agli impianti di trattamento di San Francisco e Sacramento. Nel corso del 1989 collabora con la Dr.ssa Linda Blackall del Department of Microbiology della Queensland University per la messa a punto della micromanipolazione, una tecnica raffinata che consente l'isolamento diretto, mediante microscopio ottico e microanse di vetro, di microrganismi da campioni composti quale i fanghi attivi.