

## ANALISI DELLA MICROFAUNA NELLA VALUTAZIONE DI EFFICIENZA DEPURATIVA DEI FANGHI ATTIVI

a cura di Madoni P.

Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Parma

### RIASSUNTO

Viene presentato un metodo basato sull'analisi qualitativa e quantitativa della microfauna che colonizza il fango attivo, utilizzato come stima dell'efficienza di depurazione nel reattore biologico. Il metodo, denominato Sludge Biotic Index (SBI), fornisce valutazioni numeriche sulla base di analisi microscopiche tese alla identificazione delle varie unità sistematiche e alla stima della loro densità numerica. L'identificazione del gruppo dominante permette all'operatore di stimare il grado di efficienza e di avere indicazioni sulle cause di eventuali disfunzioni. Lo scrupoloso rispetto delle procedure di analisi al microscopio diventa indispensabile al fine della corretta valutazione dello SBI.

### INTRODUZIONE

L'analisi microscopica del fango attivo è un eccellente mezzo per ottenere indicazioni sulla qualità biologica di depurazione che i controlli convenzionali (osservazioni visive, determinazioni chimiche, test vari) non sempre possono fornire. L'osservazione microscopica del fiocco di fango (forma, dimensioni) e dei suoi costituenti quali i microrganismi filamentosi e la microfauna, è un utile strumento di monitoraggio, diagnosi e gestione del processo depurativo dei liquami, ormai utilizzato, per la sensibilità e l'efficacia dimostrata, nei principali paesi industrializzati. Come è noto, il ruolo della biomassa nel processo a fanghi attivi è duplice: metabolizzare la sostanza organica contenuta nei liquami e costruire dei fiocchi di fango capaci di sedimentare per gravità dall'acqua depurata all'interno del sedimentatore finale. L'efficacia di rimozione della sostanza organica è strettamente correlata alla struttura della microfauna che colonizza il fango (Madoni, 1994a). Il riconoscimento delle varie forme di protozoi che costituiscono la microfauna è di fondamentale importanza al fine della valutazione di "performance" del reattore biologico. Naturalmente, più l'osservazione è precisa e particolareggiata, più le informazioni che si ricavano sono complete e articolate.

Negli impianti di trattamento biologico dei liquami appartenenti alla tipologia del processo a fanghi attivi, l'analisi della microfauna come indicatore di efficienza depurativa è diventata quindi una pratica assai utilizzata tra le analisi di routine. In alcuni casi, la microfauna è stata utilizzata per elaborare valutazioni di performance di specifici impianti (Al-Shahwani e Horan, 1991; Esteban et al., 1991); tuttavia questi metodi non possono essere applicati direttamente ad altri impianti, anche se appartenenti alla stessa tipologia. Altri metodi invece (Drakides, 1978; Madoni, 1981), anche se applicabili a tutti gli impianti sono basati su interpretazioni soggettive e quindi mancano di precisione. Madoni (1994b) ha elaborato un indice obiettivo per la stima della qualità biologica del fango attivo nella vasca di aerazione denominato SBI (Sludge Biotic Index). Il pregio di tale indice è rappresentato dal fatto che esso è applicabile a tutti i tipi di impianti basati sul processo a fanghi attivi e fornisce valutazioni numeriche a cui corrispondono differenti classi di qualità.

### 1 - PRINCIPIO DEL METODO

L'indice biotico del fango (SBI), illustrato in Tab. 1-2, si basa sia sulla struttura che sull'abbondanza della microfauna che colonizza il fango attivo ed è stato messo a punto per il monitoraggio dell'efficienza biologica di depurazione. Questo metodo si basa su due principi:

- la dominanza dei gruppi chiave cambia in relazione alle condizioni operative e ambientali della vasca di aerazione;
- densità numerica e diversità di *taxa* diminuiscono al diminuire dell'efficienza biologica di depurazione.

L'indice biotico del fango consente all'operatore di definire la qualità biologica del fango attraverso valori convenzionali da 0 a 10 (Tab. 1) che sono raggruppati in quattro classi di qualità (Tab. 2). I gruppi che costituiscono la microfauna sono distinti in "positivi" e "negativi" a seconda del tipo di correlazione esistente tra essi e i parametri fisico-chimici e operativi dell'impianto. I gruppi positivi sono i ciliati batteriofagi mobili, i ciliati batteriofagi sessili e le amebe tectate; i gruppi negativi sono i piccoli flagellati, i ciliati batteriofagi natanti e i peritrichi *Vorticella microstoma*, *V. infusorium* e *Opercularia* spp. (Madoni, 1994b). La Tab. 1 a due entrate, inoltre, considera l'abbondanza della microfauna (escluso i piccoli flagellati) e dei piccoli flagellati.

Per la determinazione dello SBI è necessario selezionare l'ingresso orizzontale in tabella scegliendo prima la riga corrispondente al gruppo dominante e poi tenendo in considerazione la densità totale della microfauna ( $< o \geq 10^6 \cdot L^{-1}$ ). In caso di due o più gruppi co-dominanti, la scelta cadrà sul gruppo che occupa la posizione più bassa. L'ingresso verticale in tabella è determinato dal numero totale di unità sistematiche di cui è composta la microfauna e dalla densità numerica dei piccoli flagellati.

### 1.1 - Amebe tectate

Questi protisti sono molto abbondanti o dominanti nei fanghi caratterizzati da basso carico, lunga età ed elevato tenore di ossigeno disciolto nella vasca di aerazione, condizioni che favoriscono la completa nitrificazione (Poole, 1984; Madoni et al., 1993) e il raggiungimento di un'alta efficienza depurativa. Le amebe tectate crescono solo in impianti operanti con lunghe età del fango dato che essi hanno bassi tassi di crescita. Inoltre, quando il carico del fango raggiunge alti valori ( $> 1 \text{ kgBOD/kgMLSS-d}$ ) e il COD nell'effluente finale è elevato, questi protisti sono sostituiti dal peritrico *Opercularia* e dai ciliati batteriofagi natanti (Sasahara e Ogawa, 1983).

### 1.2 - Ciliati batteriofagi mobili e sessili

Questi due gruppi funzionali normalmente co-dominano la comunità dei protisti del fango attivo a seguito della loro differente nicchia ecologica che impedisce la competizione. Infatti, mentre le forme sessili si nutrono di batteri dispersi e di piccoli flagellati filtrando la fase liquida della miscela aerata, le forme mobili si spostano sul fiocco di fango aspirando o raschiando i batteri adagiati sul substrato. Tuttavia, il rapporto di abbondanza tra questi due gruppi tende a modificarsi con il carico del fango. Le forme mobili diminuiscono al crescere del carico del fango sino a ridursi in modo critico a valori superiori a  $0,6 \text{ kgBOD/kgMLSS-d}$  (Curds e Cockburn, 1970). Una eccessiva presenza di forme batteriofaghe sessili ( $> 80\%$  dell'intera microfauna), osservabile in condizioni transitorie, si accompagna ad una ridotta performance del reattore biologico (Drakides, 1978; Madoni e Antonietti, 1984). Tali condizioni transitorie sono: il discontinuo input di carico organico dall'influente e il repentino incremento del carico del fango a seguito di perdite e/o estrazioni di fango.

I ciliati sessili sono in grado di crescere sotto un ampio spettro di condizioni di carico del fango, tuttavia è tra  $0,3-0,6 \text{ kgBOD/kgMLSS-d}$  che si osserva la loro dominanza, mentre a valori più elevati ( $0,6-0,9 \text{ kgBOD/kgMLSS-d}$ ) essi co-dominano con i piccoli flagellati (Curds e Cockburn, 1970).

### 1.3 - *Opercularia* spp.

Questi ciliati peritrichi sessili sono spesso presenti a basse densità numeriche nei fanghi attivi, tuttavia la loro abbondanza aumenta quando l'impianto produce effluenti di scarsa qualità con alti valori di BOD e azoto ammoniacale (Poole, 1984; Madoni et al., 1993). *Opercularia* può sopravvivere in ambienti stressati meglio di altre forme sessili; infatti, la dominanza di questi ciliati è stata riscontrata in impianti riceventi liquami industriali contenenti sostanze tossiche (Aeschl e Foissner, 1992; Becares et al., 1994), sali metallici (Antonietti et al., 1982; Madoni et al., 1996).

### 1.4 - *Vorticella microstoma* e *V. infusioformis*

Queste due specie di peritrichi sessili sono molto simili sia dal punto di vista morfologico che ecologico e sono comunemente presenti nella vasca di aerazione durante le prime fasi di avviamento dell'impianto. Esse sono poi sostituite da altri ciliati sessili che si dimostrano più competitivi nel filtrare i batteri dispersi nella fase liquida. Tuttavia, in occasione di drastiche e prolungate riduzioni nei valori di ossigeno disciolto nella vasca di aerazione, è possibile riscontrare all'osservazione microscopica la presenza dominante di *V. microstoma* o *V. infusioformis*, a causa dell'elevata tolleranza di queste specie alla carenza di ossigeno (Madoni e Antonietti, 1984).

### 1.5 - Ciliati batteriofagi natanti

I ciliati batteriofagi natanti insieme ai piccoli flagellati sono le prime forme della microfauna a colonizzare la vasca di aerazione durante le fasi di avviamento. Essi sono poi rimpiazzati dalle forme batteriofaghe sessili a seguito della competizione per i batteri dispersi nella miscela aerata. Le forme sessili, infatti, sono filtratori assai più efficienti delle forme natanti e con il formarsi dei fiocchi di fango, indispensabili substrati su cui far aderire i loro peduncoli, incrementano le loro popolazioni sino ad escludere completamente le forme natanti.

In impianti funzionanti a regime, la presenza dominante delle forme batteriofaghe natanti si riscontra in condizioni di fanghi con età troppo breve e/o con alto carico del fango (0,6-0,9 kgBOD/kgMLSS-d) e carenza di ossigenazione (Martin-Cereceda et al., 1966). Questi ciliati, infatti, necessitano di alte concentrazioni di batteri dispersi ma possono sopravvivere meglio di altri protisti in presenza di sostanze tossiche provenienti dal liquame o in condizioni di inadeguata aerazione del fango attivo.

### 1.6 - Piccoli flagellati

Questi piccoli protisti eterotrofici entrano in continuo attraverso il liquame da depurare che ne contiene in alte concentrazioni. I flagellati si nutrono di batteri dispersi e a loro volta sono sostituiti dai ciliati batteriofagi. Nei fanghi attivi a regime, infatti, questi protisti subiscono la competizione da parte dei ciliati batteriofagi, molti dei quali sono anche loro predatori. Queste pressioni biotiche limitano la presenza dei piccoli flagellati a pochi individui. Al contrario, la presenza di grandi quantità di questi protisti in un sistema a fanghi attivi a regime è associata ad una scarsa efficienza depurativa nella vasca di aerazione, causata da determinate condizioni ambientali o operative quali la scarsa ossigenazione, il sovraccarico organico e l'ingresso di sostanze in fermentazione (Drakides, 1978; Madoni, 1986). In tali casi l'effluente finale conterrà alte concentrazioni di BOD e sarà torbido a causa dell'alta densità di piccoli flagellati in sospensione. I piccoli flagellati diventano le forme dominanti in occasione di fanghi altamente caricati (> 0,9 kgBOD/kgMLSS-d) (Curds e Cockburn, 1970; Aescht e Foissner, 1992). Flagellati di dimensioni superiori a 20-25  $\mu\text{m}$ , appartenenti ai generi *Euglena* e *Peranema*, possono colonizzare il fango attivo. Questi grandi flagellati, infrequenti e quasi mai abbondanti, sono associati a fanghi attivi ricevuti liquami con carico organico diluito (Klimowicz, 1970; Salvadò e Gracia, 1993).

### 1.7 - Densità e diversità della microfauna

Il numero di elementi della microfauna che colonizzano un normale fango attivo a regime è dell'ordine di  $10^6 \cdot \text{L}^{-1}$ , e quando la densità scende sotto  $10^5 \cdot \text{L}^{-1}$  essa indica una insufficiente depurazione (Drakides, 1980). In questo caso i batteri dispersi proliferano e rendono torbido l'effluente finale con conseguente innalzamento del BOD in uscita.

Al contrario, alte densità della microfauna ( $\geq 10^7 \cdot \text{L}^{-1}$ ) indicano una buona purificazione e un'ottima performance biologica dell'impianto. La densità della microfauna diminuisce con il decrescere del carico del fango. Nella vasca di aerazione di impianti che operano la nitrificazione, è attesa una microfauna meno abbondante rispetto ai fanghi attivi convenzionali. La microfauna di un fango attivo a regime è anche ben diversificata, composta da un alto numero di specie (> 10); in questo caso nessuna specie è numericamente dominante sulle altre oltre ad un fattore 10. Una microfauna dominata da una specie è indice di scompensi trofici dovuti all'esistenza di fattori limitanti che impediscono lo sviluppo delle altre specie favorendo le forme più tolleranti a quei fattori.

Il numero e la diversità della microfauna cambia secondo la qualità del liquame da depurare e le condizioni operative dell'impianto (Esteban et al., 1991; Esteban e Tellez, 1992). La ricchezza in specie tende a cambiare normalmente con il carico del fango. Il più alto numero di specie è stato osservato a carichi del fango compresi tra 0,2 e 0,3 kgBOD/kgMLSS-d (Curds e Cockburn, 1970).

## 2 - CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo è in grado di stimare la efficienza biologica di depurazione all'interno della vasca di aerazione degli impianti di trattamento ascrivibili al processo a fanghi attivi (contatto stabilizzazione, convenzionale, aerazione prolungata). La microfauna utilizzata per la determinazione dello SBI ha una distribuzione cosmopolita; è ragionevole asserire, quindi, che l'indice è applicabile ai fanghi attivi di tutti i continenti.

## 3 - CAMPIONAMENTO E TRASPORTO DEL CAMPIONE

La raccolta della miscela aerata va effettuata esclusivamente all'interno della vasca di aerazione il più lontano possibile da turbine e dalle pareti della vasca. Il campionatore deve essere immerso sufficientemente in profondità in modo da evitare la raccolta di eventuali schiume. L'analisi microscopica della microfauna non richiede grandi volumi di miscela aerata; è sufficiente, quindi, versare dal recipiente campionatore un modesto quantitativo (250-500 ml) di fango attivo in un contenitore di plastica da 1 litro. Prima di effettuare il travaso è necessario omogeneizzare (mescolando) la miscela aerata contenuta nel campionatore al fine di evitare la decantazione del fango che influirebbe negativamente sulla rappresentatività del campione.

Normalmente, l'ossigeno disciolto nella miscela aerata viene completamente utilizzato per le attività metaboliche dei microrganismi in un breve arco di tempo (20-30 minuti). Dopo tale periodo possono manifestarsi profonde alterazioni nella comunità microbica.

L'aria contenuta nella bottiglia da 1 litro, lasciata semivuota dall'esiguo campione, è più che sufficiente (se il tragitto tra impianto e laboratorio è breve) ad evitare che durante il trasporto si verifichino situazioni di anossia del fango. In caso di percorsi più lunghi è necessario tenere aerato il campione durante il trasporto utilizzando un insufflatore d'aria con setto poroso alimentato da una batteria. In quest'ultimo caso bisogna assicurarsi che l'aria insufflata in eccesso possa liberamente fuoriuscire attraverso l'imboccatura della bottiglia.

#### 4 - PROCEDIMENTO

La determinazione del valore dell'indice biotico del fango e della rispettiva classe di qualità, passa attraverso due fasi. La prima fase del metodo consiste nell'analisi della microfauna al microscopio ottico al fine di ottenere le seguenti informazioni:

- Gruppo funzionale dominante o prevalente
- Densità totale della microfauna
- Numero di taxa della microfauna
- Numero di piccoli flagellati

Le procedure da seguire per l'ottenimento delle informazioni richieste sono indicate nel successivo paragrafo 4.1.

La seconda fase del metodo richiede l'utilizzo della tabella 1.

##### 4.1 – Analisi qualitativa: identificazione della microfauna

L'identificazione dei vari taxa che compongono la microfauna e il loro successivo conteggio richiedono un sollecito esame del campione al microscopio. Queste due analisi devono essere completate nel più breve tempo possibile, comunque entro 5 ore dal prelievo per ridurre al minimo certi inconvenienti come l'alta mortalità di alcune specie o il forte incremento numerico di altre. E' indispensabile, comunque, ricreare le condizioni ambientali del campione raccolto mantenendolo ossigenato e mescolato per tutta la durata delle analisi mediante l'impiego di un aeratore a setto poroso.

Sebbene molti organismi possano più o meno frequentemente essere osservati nei fanghi attivi, alcune forme quali le amebe nude e gli organismi di *drift* (alghe, crostacei, insetti) non sono considerati in questo metodo. Gli organismi da includere nella microfauna sono:

piccoli flagellati  
grandi flagellati  
ciliati  
amebe con teca  
rotiferi  
nematodi  
gastrotrichi  
tardigradi  
oligocheti

Tutte le specie di protozoi ciliati e di amebe tecate contribuiscono alla determinazione della diversità della microfauna (ingresso verticale in Tab. 1). Per quanto riguarda gli altri gruppi, non è richiesta l'identificazione a livello di genere o specie e ciascuno di essi contribuisce con una sola unità sistematica.

Per quanto riguarda i gruppi dominanti o prevalenti (ingresso orizzontale in Tab. 1), deve essere sottolineato che solo i ciliati batteriofagi contribuiscono a formare i tre gruppi funzionali (natanti, mobili, sessili). Le specie di ciliati carnivori od onnivori contribuiscono solamente alla densità e diversità totale della microfauna a prescindere dal loro tipo di movimento. L'identificazione delle varie specie di protisti è quindi molto importante al fine di ottenere un accurato valore di SBI; a questo proposito è opportuno riferirsi a specifiche monografie per la classificazione della microfauna dei fanghi attivi (Foissner e Berger, 1996; Madoni, 2005).

Per predisporre la lista delle specie presenti nel fango in osservazione attenersi alla seguente procedura:

- versare una piccola goccia (100-200  $\mu$ L) di miscela aerata sul vetrino portaoggetti utilizzando una pipetta pasteur; coprire con un vetrino coprioggetto delle dimensioni 24x24 mm o 24x32 mm;
- osservare al microscopio ottico in campo chiaro a 100x (usare ingrandimenti superiori solo per evidenziare particolari utili all'identificazione) sino ad esplorare gradualmente tutta l'area coperta dal vetrino coprioggetto; ripetere l'osservazione con un nuovo vetrino.

Solo in casi di fanghi scarsamente colonizzati (ad esempio, impianti operanti a bassi carichi del fango e lunghe età del fango) è opportuno esplorare un terzo vetrino al fine di predisporre la lista delle specie presenti;

- inserire nella lista solo le specie di cui si sono osservati almeno 2 individui nello stesso vetrino oppure 1 individuo in ciascuno dei due vetrini analizzati. Le amebe con teca presenti nel vetrino devono essere chiaramente vive (presenza della cellula all'interno della teca). Le teche vuote non devono essere considerate né per la compilazione della lista, né per il successivo conteggio.

#### 4.2 - Quantificazione della microfauna

Due tipi di conteggi si rendono necessari:

- 1) la stima di densità della microfauna (escluso i piccoli flagellati)
- 2) la stima di abbondanza dei piccoli flagellati.

Il primo tipo di conteggio è necessario per stabilire sia la classe di abbondanza della microfauna ( $<$  oppure  $\geq 10^6 \cdot L^{-1}$ ) sia l'abbondanza relativa (%) tra gruppi e specie. Dato che la dimensione del subcampione da analizzare riveste notevole importanza ai fini di una stima attendibile, ci si è avvalsi di studi effettuati in questa direzione (Madoni, 1984) per definire il volume da analizzare e il numero di repliche richiesto in rapporto alla densità di popolazione e al grado di precisione richiesto.

Per una stima accurata della microfauna del fango attivo, essendo elevata la sua densità di popolazione in questo ambiente, è sufficiente effettuare 2 analisi su volumi di 25  $\mu L$  ciascuno. La procedura è la seguente:

- si prelevano 25  $\mu L$  di miscela aerata mediante una micropipetta automatica a pistone (a volume variabile da 0 a 25  $\mu L$  oppure da 0 a 50  $\mu L$ ) e, dopo aver posto il campione sul vetrino portaoggetto, si ricopre con coprioggetto della dimensione di 18x18 mm (la dimensione del vetrino coprioggetto riveste la massima importanza ai fini di una corretta stima; l'impiego di vetrini più larghi, infatti, determina una distribuzione del campione più laminare favorendo una più rapida evaporazione del liquido);

- dopo aver collocato il vetrino sulla piattaforma del microscopio lo si ispeziona interamente a piccolo ingrandimento (100x) contando e segnando su di un foglio gli individui delle varie specie (precedentemente identificate) che si presentano via, via all'osservazione. Il vetrino deve essere analizzato a fasce verticali partendo da una estremità sino a giungere a quella opposta; questo al fine di evitare di passare più volte nello stesso punto e di commettere, quindi, errori di stima. È necessario prestare attenzione affinché non venga esclusa dall'osservazione l'eventuale frazione di liquido che fuoriesce dal vetrino coprioggetto;
- si effettua la replica del conteggio utilizzando un nuovo vetrino. Ad analisi ultimata i dati ottenuti per ciascuna specie e gruppo vengono espressi sia in n° individui/mL e/o n° individui/litro di fango attivo, sia in rapporto percentuale sull'intera microfauna;
- quando si osservano specie coloniali (*Carchesium*, *Epistylis*, *Opercularia*, *Vaginicola*, *Zoothamnium*) tutti gli individui della colonia devono essere contati;
- le forme natanti o mobili che entrano nel campo visivo dalla parte del vetrino già ispezionata non devono essere contate;
- se in uno dei due vetrini si è verificata la presenza di una colonia particolarmente numerosa tale da creare evidenti differenze nei rapporti di densità, è necessario effettuare 2 conteggi supplementari da 25  $\mu L$  ciascuno della specie coloniale in questione. La sua stima di densità sarà data dalla media dei quattro conteggi effettuati;
- può succedere che di una specie osservata nei vetrini dedicati alla identificazione, nessun individuo sia rinvenuto durante il conteggio. E' comunque necessario considerare sia la sua presenza che la sua scarsa densità di popolazione. In questo caso si assegnerà alla specie un valore convenzionale di densità pari a 1 individuo per ogni ml di fango (1.000 individui in un litro). Al contrario, se una specie non elencata nella lista viene rinvenuta durante il conteggio, essa deve essere aggiunta alla lista e la sua densità sarà quella risultante dal conteggio.

La stima di densità dei piccoli flagellati richiede una tecnica di conteggio appropriata sia per la loro ridotta dimensione sia per la loro alta densità che spesso raggiunge  $10^7 - 10^8$  ind.  $L^{-1}$ .

A questo scopo la camera di Fuchs-Rosenthal da 3,2  $\mu L$  si è dimostrata particolarmente adatta. Questa camera ha due reticoli di dimensioni 4x4x0,2 mm ciascuno suddivisi in 256 quadrati di 250  $\mu m$  di lato. Devono essere contati i piccoli flagellati che si trovano all'interno dei 16 quadrati disposti su di una delle due diagonali del reticolo. Quando i piccoli flagellati contati lungo la diagonale del reticolo sono meno di 10, la loro presenza nel fango attivo è molto modesta e quindi trascurabile ( $< 50.000$  per mL); quando il loro numero nella diagonale è superiore a 100, essi devono essere considerati come gruppo dominante (densità di  $5 \cdot 10^8 L^{-1}$ ). La procedura è la seguente:

- Porre due gocce di miscela aerata su uno dei due reticoli della camera di Fuchs-Rosenthal e coprire con un normale vetrino coprioggetto di dimensioni 24x32 mm. Non esercitare nessuna pressione sul vetrino coprioggetto; l'eccesso di liquido scende autonomamente nelle canalette laterali di scolo.
- Porre la camera al microscopio ottico (a 100-200x in campo chiaro) ed esaminare i quadrati posti sulla diagonale partendo da un estremo per giungere all'altro.
- Ripetere l'operazione analizzando una delle due diagonali del secondo reticolo. Il numero di piccoli flagellati presenti nella diagonale sarà dato dalla media dei due conteggi.
- I flagellati posizionati sulla linea di demarcazione del quadrato in esame devono essere contati.

## 5 - RISULTATI

L'ingresso orizzontale in Tab. 1 sarà dato dal gruppo dominante o prevalente risultante dall'analisi microscopica (in caso di co-dominanza, la scelta deve cadere sul gruppo che occupa la posizione più bassa) e successivamente dalla densità della microfauna ( $\geq$  oppure  $< 10^6$  ind. $\cdot L^{-1}$ ).

L'ingresso verticale in tabella è dato dal numero di unità sistematiche di cui è costituita la microfauna e poi dal numero di piccoli flagellati  $F$  contati nella diagonale della camera di Fuchs-Rosenthal ( $F < 10$  oppure  $10 < F \leq 100$ ). Va sottolineato che solo quando i piccoli flagellati risultano superiori a 100, essi diventano il gruppo dominante. In tal caso, essi determinano l'ingresso orizzontale in tabella (ultima riga in basso). Il punto di intersezione tra la riga e la colonna selezionate determinano il valore di SBI corrispondente al fango attivo analizzato.

### 5.1 – Giudizio di qualità

Il valore di SBI ricavato dalla tabella 1 permette di risalire alla classe di qualità del fango attivo, attraverso l'utilizzo della tabella 2. In questa tabella i valori di SBI sono stati raggruppati all'interno di quattro classi di qualità marcate da numeri romani. Tali classi permettono di rappresentare la qualità biologica del fango attivo attraverso quattro ordini di giudizi piuttosto ampi e quindi di valore diagnostico affidabile.

## 6 – VERIFICA DEL METODO

La stretta applicabilità del metodo è stata verificata attraverso l'analisi di oltre 300 fanghi attivi.

In ciascun campione sono stati analizzati, oltre alla microfauna, i principali parametri fisici, chimici e operativi come: rimozione del  $BOD_5$ , O.D., rimozione dell'azoto, MLSS, nitrificazione, tempo di contatto del liquame, età del fango, etc.. Tutti i test condotti hanno dato valutazioni corrette sull'efficienza biologica di depurazione.

La tabella a due entrate mostra 88 differenti situazioni potenzialmente osservabili, e questi eventi cadono all'interno delle quattro classi di qualità nella proporzione di 9, 18, 24 e 37, rispettivamente. I test effettuati, ovviamente, non sono stati in grado di verificare tutte le situazioni; tuttavia, dato che è stata verificata l'affidabilità del metodo ai valori estremi di ciascuna classe di qualità, sembra ragionevole attendersi la piena affidabilità del metodo anche ai valori intermedi di SBI.

Tab. 1 - Tabella a due entrate per il calcolo dell'indice biotico del fango SBI

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

\* *Opercularia* e *V. microstoma* non prevalenti; † numero di flagellati nella diagonale della camera di Fuchs-Rosenthal

Tab.2 - Conversione dei valori di SBI in classi di qualità del fango con relativo giudizio.

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

**BIBLIOGRAFIA**

- AESCHT E., FOISSNER W. (1992): "Biology of a high-rate activated sludge plant of a pharmaceutical company", *Arch. Hydrobiol./suppl.*, **90**, 207-251.
- AL-SHAHWANI S., HORAN N.J. (1991): "The use of protozoa to indicate changes in the performance of activated sludge plants", *Wat. Res.*, **25**, 633-638.
- ANTONIETTI R., BROGLIO P., MADONI P. (1982): "Valutazione di parametri biologici come indici di efficienza di depurazione in impianti a fanghi attivi", *Ingegneria Ambientale*, **11**, 472-477.
- BECARES E., ROMO S., VEGA A. (1994): "Organic pollutants and microfauna in an industrial wastewater treatment system", *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, **25**, 2051-2054.
- CURDS C.R., COCKBURN A. (1970): "Protozoa in biological sewage treatment processes. II. Protozoa as indicators in the activated sludge process", *Wat. Res.*, **4**, 237-249.
- DRAKIDES C. (1978): "L'observation microscopique des boues activées appliquée à la surveillance des installations d'épuration: Technique d'étude et interpretation", *T.S.M.-L'Eau*, **73**, 85-98.
- DRAKIDES C. (1980): "La microfaune des boues activées. Etude d'une méthode d'observation et application au suivi d'un pilote en phase de demurrage", *Wat. Res.*, **14**, 1199-1207.
- ESTEBAN G., TELLEZ C., BAUTISTA L.M. (1991): "Dynamics of ciliated protozoa communities in activated-sludge process", *Wat. Res.*, **25**, 967-972.
- ESTEBAN G., TELLEZ C. (1992): "The influence of detergents on the development of ciliate communities in activated sludge", *Water Air Soil Pollut.*, **61**, 185-190.
- FOISSNER W., BERGER H. (1996): "A user-friendly guide to the ciliates (protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology", *Freshwat. Biol.*, **35**, 375-482.
- KLIMOWICZ H. (1970): "Microfauna of activated sludge. Part I. Assemblage of microfauna in laboratory modes of activated sludge", *Acta Hydrobiol.*, **12**, 357-376.
- MADONI P. (1981): "I protozoi ciliati degli impianti biologici di depurazione", CNR, AQ/1/167, Roma, pp. 1-134.
- MADONI P. (1986): "Protozoa in waste treatment systems". In: F. Megusar e M. Gantar (eds.) *Perspectives in Microbial Ecology*, Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, pp. 86-90.
- MADONI P. (1994a): *La microfauna nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi*. Università di Parma, AGAC Reggio Emilia, pp. 1-48.
- MADONI P. (1994b): "A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge based on the microfauna analysis", *Wat. Res.*, **28**, 67-75.
- MADONI P. (2005): "La microfauna del fango attivo". In: P. Madoni (ed.), *Depurazione Biologica nei Fanghi Attivi*, Enia, Reggio Emilia, Università di Parma, pp. 235-288.
- MADONI P., ANTONIETTI R. (1984): "Colonization dynamics of ciliated protozoa populations in an activated sludge plant", *Atti IV Simposio di Dinamica di Popolazioni*, Parma, pp. 105-112.
- MADONI P., DAVOLI D., CHIERICI E. (1993): "Comparative analysis of the activated sludge microfauna in several sewage treatment works", *Wat. Res.*, **27**, 1485-1491.
- MADONI P., DAVOLI D., GORBI G., VESCOVI L. (1996): "Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community", *Wat. Res.*, **30**, 135-141.
- MARTIN-CERECEDA M., SERRANO S., GUINEA A. (1996): "A comparative study of ciliated protozoa communities in activated-sludge plants", *FEMS Microbiol. Ecol.*, **21**, 267-276.
- POOLE J.E. (1984): "A study of the relationship between the mixed liquor fauna and plant performance for a variety of activated sludge sewage treatment works", *Wat. Res.*, **18**, 281-287.
- SALVADÒ H., GRACIA M.P. (1993): "Determination of organic loading rate of activated sludge plants based on protozoan analysis", *Wat. Res.*, **27**, 891-895.
- SASAHARA T., OGAWA T. (1983): "Treatment of brewery effluent. Part VIII: Protozoa and metazoa found in the activated sludge process for brewery effluent", *Monatsschrift Brauwissenschaft*, **11**, 443-448.