



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

Tesi Di Laurea Magistrale
In
Progetto Di Opere Di Ingegneria Sanitaria

*Biodegradation of micropollutants with
Aerobic Granular Sludge*

Relatore:

Prof. Maurizio Mancini

Correlatrice:

Dr. Nídia Lourenço

Candidato:

Alessio De Stefano

Marzo 2024
Anno Accademico 2022-2023

*A Nonna Teresa,
Vorrei portarti in tasca
e non solo nel cuore.*

Abstract

Le acque sotterranee costituiscono il 97% delle risorse di acqua dolce nel mondo e la loro qualità è influenzata dai cambiamenti climatici e globali, compresa l'introduzione di contaminanti emergenti attraverso i reflui. D'altro canto, le acque reflue trattate possono essere utilizzate come risorsa per la ricarica gestita degli acquiferi (MAR). Tuttavia, è ancora necessario lo sviluppo di trattamenti affidabili, robusti ed economicamente efficienti mirati all'eliminazione selettiva di microinquinanti emergenti, come farmaci e sostanze perfluorurate alchiliche (PFAS), dalle acque reflue prima del loro utilizzo per il MAR. La tecnologia del fango granulare aerobico (AGS) nei reattori a batch sequenziali (SBR) è stata ampiamente studiata sia per il trattamento delle acque reflue domestiche che industriali, con significative riduzioni della superficie d'impronta e dei consumi energetici rispetto al tradizionale fango attivo (CAS), essendo indicata come la prossima generazione di tecnologie di trattamento delle acque reflue. I sistemi AGS presentano diverse caratteristiche uniche: eccellenti proprietà di sedimentazione, consentendo un'elevata ritenzione di biomassa, valori elevati di tempo di ritenzione del fango (SRT) e volumi ridotti del reattore; capacità di resistere alla tossicità e a carichi elevati; zone aerobiche, anossiche ed anaerobiche all'interno di ciascun granulo, consentendo la rimozione di materia organica, azoto e fosforo nello stesso bioreattore. Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche per valutare l'efficacia dei sistemi AGS per la rimozione di microinquinanti come farmaci e PFAS.

Indice

Abstract	3
1. Introduzione.....	0
2. Overview.....	1
2.1 Diclofenac.....	2
2.1.1 Adsorbimento	4
2.1.2 Biodegradazione	6
Comunità microbiche a fanghi attivi	6
Biodegradazione del DCF nella rimozione biologica avanzata del fosforo (EBPR).....	7
DCF nella fermentazione anaerobica dei fanghi di scarto.....	8
2.1.3 Degradazione chimica.....	9
Fotocatalisi combinata con perossido di idrogeno.....	9
Ozonizzazione e sonolisi	10
Degradazione Photo-Fenton	12
3. Fanghi aerobici granulari	12
3.1 La matrice EPS.....	14
3.2 Meccanismi di granulazione	16
3.3 Microbiologia dell'AGS	18
3.3.1 PAO/DPAO e GAO/DGAO	18
3.3.2 AOB, NOB e <i>Anammox</i>	20
3.4 Parametri di coltivazione	21
3.4.1 Sforzi di taglio	21
3.4.2 Cicli SBR e tempo di assestamento.....	23
3.4.3 Periodo di feast-famine	24
3.5 Parametri di mantenimento	24
3.5.1 Composizione delle acque reflue influenti.....	24
3.5.2 Rapporto F/M e fattori correlati.....	25
3.5.3 Tempo di ritenzione SRT.....	26
3.5.4 pH e temperatura	26
3.6 Meccanismi di rimozione	27
3.6.1 Nitrificazione e denitrificazione.....	28
3.6.2 Rimozione del fosforo.....	29
3.7 Recupero delle risorse e gestione dei fanghi in eccesso.....	29
3.8 AGS e fanghi attivi	30

4. Materiali e metodi.....	33
4.1 Preparazione e funzionamento del reattore	33
4.2 Monitoraggio delle prestazioni dell'SBR	35
4.3 Caratterizzazione degli EPS.....	39
4.4 Caratterizzazione microscopica della biomassa.....	41
4.5 FISH analysis - Dinamiche della comunità microbica.....	41
5 Risultati	41
5.1 Proprietà della biomassa.....	41
5.2 Performance di trattamento acque	46
6. Discussioni.....	50
6.1 Impatto del diclofenac sulle proprietà della biomassa.....	50
6.2 Impatto del diclofenac sulle performance di trattamento acque.....	53
7. Conclusioni.....	55
Bibliografia.....	57

1. Introduzione

La crescente preoccupazione legata alla presenza di contaminanti farmaceutici nelle risorse ha incoraggiato la ricerca di soluzioni all'avanguardia e sostenibili per il trattamento delle acque reflue. Tra le tecnologie a disposizione, i fanghi aerobici granulari hanno dimostrato una prospettiva promettente nell'efficientamento del trattamento biologico. Tra i vantaggi che questo tipo di tecnologia offre figurano un maggiore tasso di rimozione dei contaminanti, una gestione più funzionale delle biomasse in eccesso e la riduzione del foot print di impianto grazie alla necessità di volumi minori di trattamento.

Il diclofenac, un farmaco antinfiammatorio non steroideo largamente impiegato, ha attirato evidente attenzione da parte della comunità scientifica data la sua presenza diffusa nelle acque reflue. La sua persistenza e resistenza alla degradazione negli impianti tradizionali di trattamento ha reso essenziale la ricerca di nuove soluzioni tecnologiche.

Questo lavoro analizza la capacità dei fanghi aerobici granulari di rimuovere il diclofenac dalle acque. Tramite la gestione di un reattore dedicato, sarà esaminata l'efficacia del suddetto metodo nel trattamento delle acque contaminate da diclofenac, tenendo in considerazione la formazione, la struttura e la funzione dei granuli aerobici.

L'indagine è mirata alle potenzialità dei fanghi aerobici granulari, valutando l'efficienza di rimozione del diclofenac e analizzando le dinamiche legate al processo di rimozione. Lo studio e l'implementazione di tale tecnologia potrebbe portare, un giorno, a nuove conoscenze nell'ambito del trattamento delle acque reflue farmaceutiche ed all'ottimizzazione e all'impiego dei fanghi aerobici granulari su vasta scala.

L'obiettivo della ricerca è quello di fare luce sui meccanismi di rimozione del diclofenac mediante fanghi aerobici granulari, ricercando prospettive e soluzioni nuove alla preoccupante contaminazione farmaceutica delle risorse idriche.

2. Overview

Il termine microinquinanti organici emergenti sorge da due aspetti fondamentali comuni ad un gruppo eterogeneo di sostanze: la presenza, nei comparti ambientali, in ridotte concentrazioni ($\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1}) e la scarsa disponibilità di informazioni riguardanti gli effetti negativi che tali sostanze hanno sull'ambiente e sugli organismi viventi. La mancanza di informazioni rende i microinquinanti difficilmente inquadrabili in un appropriato contesto normativo. Figurano nella definizione di microinquinanti organici emergenti una estesa serie di composti chimici artificiali quali pesticidi, prodotti farmaceutici, interferenti endocrini e prodotti per l'igiene personale e per la cura della casa. Ormai indispensabili per l'odierna società, le suddette sostanze vengono prodotte e impiegate in massicce quantità in tutto il mondo. Secondo il World Wildlife Fund (WWF), tra gli anni '30 del secolo scorso e l'inizio di questo, la produzione globale di prodotti chimici antropogenici ha subito un incremento da 1 ad oltre 400 milioni di tonnellate l'anno ed è ormai chiaro che tali prodotti stiano arrecando danno all'ambiente e agli organismi viventi (WWF, s.d.). Il potenziale impatto ambientale e il rischio per la salute causati dall'esposizione della popolazione a tali contaminanti emergenti, sono un argomento di grande interesse per la comunità scientifica; in quest'ottica l'UE, in attuazione della Direttiva 2008/105/CE, ha emanato la Decisione di Esecuzione (UE) 2015/495, all'interno della quale è sancito un elenco delle sostanze da sottoporre a monitoraggio negli ambienti acquatici. L'elenco ha successivamente subito un aggiornamento con la Decisione di Esecuzione (UE) 2018/840. La Tabella 1 riporta l'elenco degli inquinanti emergenti oggetto di monitoraggio a livello europeo.

SOSTANZA O GRUPPO DI SOSTANZE	TIPOLOGIA/UTILIZZO	WATCH LIST
17-Alfa-Etinilestradiolo (EE2)	Estrogeno di sintesi	2015
17-Beta-Estradiolo (E2)	Estrogeno naturale	2015
Estrone (E1)	Estrogeno naturale	2015
Diclofenac	Sostanza farmaceutica	2015
2,6-Di-terz-butil-4-metilfenolo (BHT)	Antiossidante	2015
4-Metossicinnamato di 2-etilene (EHMC)	Filtro UV	2015
Antibiotici macrolidi:		
Eritromicina	Sostanza farmaceutica	2015
Claritromicina	Sostanza farmaceutica	2015
Azitromicina	Sostanza farmaceutica	2015
Metiocarb	Insetticida	2015
Insetticidi neonicotinoidi:		
Acetamiprid	Insetticida	2015
Clotianidin	Insetticida	2015
Imidacloprid	Insetticida	2015
Thiacloprid	Insetticida	2015
Thiametoxam	Insetticida	2015
Metaflumizone		2018
Amoxicillina	Sostanza farmaceutica	2018
Ciprofloxacina	Sostanza farmaceutica	2018
Bisfenolo A	Composto industriale	/
Sostanze perfluoroalcaliche (PFAS)	Composto industriale	/

Tabella 2-1: Elenco di controllo delle sostanze sottoposte a monitoraggio (adattato dalla Decisione di Esecuzione UE 2015/495).

Le Decisioni sopracitate impongono, per un gran numero di inquinanti, il metodo analitico da impiegare e la preparazione del campione che permette di ottenere i risultati migliori (Hernandez, F., Sancho, & J. V., & Pozo, O. J., 2005) (Zhang, Chang, C. H., Lou, J. L., Zhao, M. R., & Lu, C., 2018) (Buscher, et al., 2015).

I contaminanti presenti nell'elenco generalmente sono bioattivi e bioaccumulativi e possono essere mobili o persistenti in acqua, aria, suolo, sedimenti e recettori ecologici anche a basse concentrazioni. Esposizioni a lungo termine ai microinquinanti possono causare rischi significativi per la salute umana e per gli ecosistemi, in particolar modo per quelli acquatici. Sono molteplici i fattori di stress che interagiscono sull'ecosistema e ciò li rende di difficile determinazione e caratterizzazione comportando serie difficoltà nell'applicazione di adeguate misure correttive (Gavrilescu, Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F., 2015).

I prodotti per la cura fisica e personale come saponi, creme e soprattutto farmaceutici sono in grado di garantire la loro massima efficacia e resistenza all'inattivazione fin quando non svolgono completamente la funzione prevista. Particolari preoccupazioni scaturiscono per via della loro propensione ad indurre alterazioni del sistema endocrino e incremento della resistenza microbica ai farmaci (Belgiorno, V. Naddeo, M. F. N. Secondes, L. Borea, & F. c. Ballesteros, 2016). I microinquinanti sono escreti dal corpo umano tramite feci e, poiché non vengono da esso completamente metabolizzati, i metodi classici di trattamento delle acque reflue non riescono a degradarli completamente, di conseguenza sono presenti negli effluenti delle acque reflue, in fiumi e laghi ed in acque sotterranee e superficiali (Naddeo, V. Belgiorno, D. Ricco, & D. Kassinos, 2009).

2.1 Diclofenac

Il diclofenac, un membro del gruppo di farmaci antinfiammatori non steroidei associati all'azione antidolorifica, è stato utilizzato per il bestiame e per uso domestico dal 1970 (Caracciolo, opp, & T, 2015). È considerato un "contaminante di preoccupazione emergente" ed è stato incluso nella watch list sopra riportata (Lonappan, Brar, Das, Verma, & Surampalli, 2016) per raccogliere informazioni sufficienti sul monitoraggio delle acque superficiali. In generale, l'introduzione continua di diclofenac è il risultato delle attività industriali, ospedaliere e domestiche (Cardoso, Porcher, & Sanchez, 2014).

Quasi il 75% del diclofenac utilizzato entra negli ambienti acquatici e del suolo (Schmidt, Hoffmann, Garbe, & Schneider, 2018). Inoltre, è più probabile che persista in ambienti acquatici a causa della sua idrofilia e stabilità (Madikizela, Tavengwa, & Chimuka, 2017). Durante questa espansione, la presenza di diclofenac nelle acque superficiali potrebbe portare a livelli rilevabili nell'acqua potabile anche in condizioni trattate (Loos, et al., 2017). È probabile che lo stesso scenario si ripeta a vari livelli trofici della catena alimentare, come rilevato dall'esposizione a lungo termine al diclofenac delle specie che vivono nell'ambiente acquatico, e ciò potrebbe rappresentare un aumento del rischio ecologico (Mezzelani, 2018a)

Inoltre, studi recenti hanno scoperto che il diclofenac si accumula in frutta e verdura commestibili (Bartrons & Peñuelas, 2017), influenzando direttamente sulla salute umana. Tuttavia, molteplici fattori, come l'aumento generale del consumo di farmaci, lo scarico di acque reflue non trattate nell'ambiente, l'inefficienza degli impianti di trattamento delle acque reflue e la deconiugazione dei metaboliti del diclofenac, hanno contribuito ad un aumento della concentrazione dello stesso nel ciclo dell'acqua (Charuaud, et al., 2019a).

Per quanto riguarda gli scopi sanitari umani, il consumo nazionale annuale (di 86 nazioni) di diclofenac dal 2010 al 2013 varia da 2 a 60 tonnellate, mentre il consumo annuale globale è in media di 1443 tonnellate. Riguardo alla distribuzione di diclofenac, il 39,5% è consumato in Asia ed il 28,7% in Europa, con una media di consumo pro capite di 0,33 grammi per persona all'anno (Acuña, et al., 2015). Il diclofenac è stato rilevato in molti ecosistemi di acqua dolce in tutto il mondo. In effetti, 142 pubblicazioni scientifiche hanno riportato dati sulla presenza del farmaco in acque dolci, includendo 1264 campioni analizzati, coprendo 38 paesi, con una concentrazione mediana di $21 \pm 722 \text{ ngL}^{-1}$ (Acuña, et al., 2015).

La presenza del diclofenac è quella maggiormente segnalata a causa della sua diffusa disponibilità in commercio e dell'inefficienza dei convenzionali metodi di trattamento delle acque reflue (F. Han, Long, +, Q. Chen, & X. Ye, 2020). Il diclofenac, come altri farmaci, è un composto organico aromatico ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_2$) e rappresenta un potenziale rischio per la salute umana e animale dovuto soprattutto alla persistenza, al bioaccumulo ed alla non biodegradabilità e tossicità (Wang & H. Chen., 2020).

Inoltre, dato che gli effetti si manifestano anche per concentrazioni molto basse è necessario ridurre ulteriormente la sua presenza negli effluenti. Nonostante non si riscontrino particolari effetti negativi sull'uomo se assunto singolarmente, sono sconosciuti gli effetti che il diclofenac potrebbe produrre se miscelato con altri contaminanti (Naddeo, V. Belgiorno, D. Ricco, & D. Kassinos, 2009).

Recenti studi hanno dimostrato che il diclofenac è in grado di arrecare danni come perdita di biodiversità, infertilità e cancro (P. A. Fowler, M. Bellingham, K. D. Sinclair, N. P. Evans, P. Pocar, B. Fischer, K. Schaedlich, J-S. Schmidt, M. R. Amezaga, S. Bhattacharya, S. M. Rhind, P. J. O'Shaughnessy, 2012), bioaccumulo nella catena alimentare (Jean, et al., 2012) e sviluppo della resistenza dell'organismo ai farmaci (Andersson & D. Hughes, 2012).

Gli impianti di depurazione svolgono un ruolo chiave nella limitazione della diffusione del diclofenac nell'ambiente. Tuttavia, il diclofenac è uno dei farmaci meno rimossi negli impianti convenzionali (Gerbersdorf, et al., 2015). Inoltre, la rimozione complessiva del diclofenac varia in modo significativo (5-81%) tra i vari impianti di depurazione su larga scala (Tran, Reinhard, & Gin, 2018), suggerendo che la rimozione del diclofenac non è solo insoddisfacente ma anche imprevedibile.

Molte tecniche biologiche sono state proposte per rimuovere antibiotici mediante bioreattori a membrana, digestione anaerobica, fanghi attivi, biodegradazione con colture pure e fito-risanamento (Yang, et al., 2016) (Gurung, Ncibi, & Sillanpää, 2019) (Marchlewicz, Domaradzka, Guzik, & Wojcieszynska, 2016) (Baazeem, et al., 2021). Anche tecniche fisico-chimiche come l'ossidazione

chimica, l'accoppiamento a carbone attivo e l'adsorbimento di carbonio sono state ampiamente utilizzate (Gil, Taoufik, García, & Korili, 2018) (Khazri, Ghorbel-Abid, Kalfat, & Trabelsi-Ayadi, 2017) (Chedeville, Di Giusto, Delpeux, & Cagnon, 2016).

2.1.1 Adsorbimento

Il processo di adsorbimento può essere un trattamento ottimale data la sua versatilità, semplice applicabilità ed elevata efficienza quando viene scelto un adsorbente appropriato per la classe di composti da rimuovere. A questo proposito sono state proposte molte opzioni diverse, tra cui adsorbenti commerciali e naturali. Il carbone attivo (AC) risulta una delle opzioni migliori, in quanto ha dimostrato di poter essere impiegato in maniera efficiente per rimuovere diversi inquinanti dall'acqua, come coloranti, metalli pesanti, composti farmaceutici e parassiti (Gupta & A. Rastogi, 2008) (A.M. Redding, Cannon, Snyder, & Vanderford, 2009). Diversi studi che analizzano l'applicazione del carbone attivo come adsorbente per rimuovere vari inquinanti organici hanno dimostrato che è caratterizzato da eccellenti prestazioni e può essere di interesse per applicazioni industriali reali (Le-Minh, Khan, Drewes, & Stuetz, 2010). Svariati sono i metodi di rimozione che possono essere potenzialmente adottati per rimuovere i composti farmaceutici dall'acqua, come l'estrazione, la filtrazione e i processi di ossidazione avanzata (Haginaka & H. Sanbe, 2000); tuttavia, la loro rimozione tramite adsorbimento è vantaggiosa dato che si tratta di un processo semplice e che richiede poca energia ma che fornisce una elevata efficienza di rimozione, anche per basse concentrazioni come quelle comunemente correlate ai composti farmaceutici (Gupta, Jain, Mittal, Mathur, & Sikarwar, 2007).

La quantità di adsorbato in un determinato materiale è legata alle sue caratteristiche, alla sua concentrazione e alla temperatura. Le caratteristiche dell'adsorbato di cui tenere conto ai fini del processo di adsorbimento sono la solubilità, la struttura molecolare, il peso molecolare e la polarità. La quantità di materiale adsorbito viene determinata per dati valori di temperatura, e la relazione analitica che rappresenta tale dipendenza è l'isoterma di adsorbimento. Queste ultime vengono determinate mettendo a contatto un certo numero di specie da adsorbire all'interno di un dato volume di liquido con varie quantità di materiale adsorbente. Generalmente vengono impiegati dieci dosaggi di materiale adsorbente, attendendo il raggiungimento della condizione di equilibrio per circa sette giorni; al termine di ogni prova si misura la quantità di specie residua in soluzione, mentre la concentrazione di adsorbato è ricavata a mezzo della seguente relazione:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m}$$

In cui:

- q_e è la concentrazione all'equilibrio della specie in esame nel materiale adsorbente;
- C_0 è la concentrazione iniziale della specie di interesse in soluzione;
- C_e è la concentrazione della specie di interesse in soluzione all'equilibrio;

- V è il volume di liquido nel reattore di adsorbimento;
- m è la massa di materiale adsorbente.

(Metcalf & Eddy, 2003)

Per quanto riguarda il diclofenac i fattori che influenzano maggiormente l'efficacia dei trattamenti di adsorbimento sono i tempi di incubazione, la concentrazione del contaminante, il tempo di contatto, la superficie dei fanghi di depurazione, la cinetica ed il pH.

L'efficacia di adsorbimento del diclofenac sui fanghi di depurazione è stata valutata a vari tempi di incubazione; infatti fissata una concentrazione iniziale di 1 mg/l, il contenuto di diclofenac sembrerebbe diminuire bruscamente entro 8 giorni dall'incubazione a 30 °C (Figura 1) (S., Elshikh, Al-khattaf, El-Naggar, & Almaary, 2022).

Inizialmente, l'adsorbimento si verifica in maniera rapida fino ai primi 2 giorni diminuendo considerevolmente entro 8 giorni con il raggiungimento dell'equilibrio. Nel tempo sono stati proposti diversi metodi di rimozione del diclofenac ma l'adsorbimento e la biodegradazione sembrano essere tra i più efficienti (Nikolaou, Meric, & Fatta, 2007).

Sono stati sperimentati ulteriori metodi di rimozione al variare della concentrazione del diclofenac; tali sperimentazioni hanno mostrato che a concentrazioni più elevate di diclofenac l'efficienza di adsorbimento è più elevata.

A concentrazioni più elevate di farmaci, infatti, la distanza tra le specie adsorbenti e i farmaci si riduce, questo aumenta considerevolmente la capacità di adsorbimento (Quintelas, Costa, & Tavares, 2013).

Sono state osservate riduzioni significative per intervalli di contatto di 5 minuti, raggiungendo un'efficacia superiore al 98% dopo 50 e 60 minuti (Yu, et al., 2011).

Inoltre la superficie dei fanghi di depurazione risulta essere un fattore fondamentale nell'adsorbimento del diclofenac; infatti, è stato scoperto che adsorbenti carboniosi come l'ossido di grafene, mediante varie interazioni, permette un adsorbimento molto più efficace (S., Elshikh, Al-khattaf, El-Naggar, & Almaary, 2022).

La solubilità del diclofenac è bassa a valori di pH inferiori al suo valore di pKa; la capacità di adsorbimento, dunque, aumenta a valori di pH più bassi rispetto ai pH alcalini (Sathishkumar, et al., 2015).

Il diclofenac viene assorbito efficacemente dalla superficie dei fanghi di depurazione e l'efficienza di adsorbimento dipende dalla dose, oltre che dal pH.

Riportando il valore di pKa del diclofenac come 4,7 gli si consente di interagire in maniera maggiore con i fanghi a valori di pH acidi (Kamal, M.A.H.M., Iimura, Nabekura, & Kitagawa, 2007).

In conclusione, l'efficienza di rimozione del diclofenac per adsorbimento è dell'80%; è stato riscontrato un aumento proporzionale di rimozione dell'inquinante all'aumentare della concentrazione dello stesso, fino a superare un'efficienza superiore al 90%. Il fenomeno resta fortemente legato ai tempi di incubazione, di contatto ed al pH, massimizzando l'efficienza con valori di pH acido.

I fanghi attivi potrebbero essere un mezzo di rimozione del diclofenac efficiente; tuttavia, è necessaria la conduzione di ulteriori studi per valutarne il prodotto di degradazione e il suo impatto sull'ambiente (S., Elshikh, Al-khattaf, El-Naggar, & Almaary, 2022).

2.1.2 Biodegradazione

Comunità microbiche a fanghi attivi

Studi recenti hanno dimostrato che, nonostante il diclofenac non sia particolarmente biodegradabile, è possibile la degradazione microbica impiegando colture pure e fungine (Aissaoui & Ouled-Hadd, 2017) (Bessa, Moreira, Tiritan, & Castro, P.M.L, 2017) (Nguyen, et al., 2013). L'*Enterobacter* dei fanghi attivi (AS) è in grado di degradare il diclofenac (rimozione >50%) utilizzando quest'ultimo come unica fonte di carbonio e di energia; la degradazione si intensifica (>80%) con una ulteriore fonte di carbonio (Aissaoui & Ouled-Hadd, 2017). Il *brevibacterium* isolato da fanghi attivi, ad esempio, potrebbe rimuovere più del 30% di diclofenac ad una concentrazione di 10 mg/l per 30 giorni e incrementare la rimozione fino al 90% quando si impiega acetato come fonte di carbonio supplementare (Bessa, Moreira, Tiritan, & Castro, P.M.L, 2017). È stato dimostrato che funghi come *Trameters* (Bessa, Moreira, Tiritan, & Castro, P.M.L, 2017) e *Ascomycota* (Gonda, Kiss-Szikszai, Szűcs, Balla, & Vasas, 2016) degradano rispettivamente fino al 60% e al 10% del diclofenac. Questi studi, basati su organismi isolati, hanno permesso determinanti passi avanti nella comprensione della biodegradazione del diclofenac individuando i ceppi, la cinetica di degradazione e i sottoprodotti che ne scaturiscono. Nonostante ciò, resta da chiarire se questi microrganismi abbiano un ruolo altrettanto fondamentale quando sono in comunità microbiche complesse di fanghi attivi.

Vari studi, infatti, mostrano che il diclofenac non viene rimosso efficacemente dal processo a fanghi attivi. La scarsa rimovibilità del diclofenac, compresa tra il 12 ed il 43% e per un ampio intervallo di concentrazioni (50-5000 µg/l) è prevedibile date le caratteristiche di non biodegradabilità dell'inquinante (Luo, et al., 2014).

Si è visto che l'efficienza del processo è fortemente influenzata dalla quantità di diclofenac in ingresso ai reattori. I dati in output mettono in luce come il livello di diclofenac in ingresso sia un parametro importante per la rimozione della sostanza, insieme ad altri fattori come la concentrazione di biomassa ed il tempo di ritenzione. Ciò indica che la concentrazione in ingresso del farmaceutico è un valore determinante da considerare in fase di progettazione e gestione di processi biologici associati ai fanghi attivi. La rimozione del diclofenac mediante idrolisi, volatilizzazione, fotolisi, adsorbimento e biodegradazione è rispettivamente del 1,4-2,3%, 1,4-2,5%, 2,1-3,2%, 1,5-6,5% e 7,3-21,3%. Ciò suggerisce che la rimozione avviene principalmente (28% circa) attraverso la biodegradazione e l'adsorbimento, mentre altri metodi abiotici (idrolisi, volatilizzazione e fotolisi) ricoprono un ruolo marginale (8% circa) (Nguyen, Nghiema, Pramanik, & Oh, 2019).

La biodegradazione del diclofenac nei fanghi attivi può essere dovuta al co-metabolismo. Il co-metabolismo è la trasformazione di un substrato non di crescita in presenza di un substrato di crescita. Il termine “substrato non di crescita” descrive i composti che non sono in grado di supportare la crescita cellulare come unica fonte di carbonio (Tobajas, Monsalvo, Mohedano, & Rodriguez, 2012). In effetti, il farmaceutico potrebbe non fungere da fonte primaria di carbonio ed energia per la crescita microbica. Invece, la degradazione co-metabolica potrebbe rivelarsi il mezzo di rimozione biologica di maggiore impatto. La rimozione del diclofenac potrebbe essere implementata da una comunità microbica nitrificante aggiungendo una fonte di carbonio (acetato, ad esempio) (Tran, Uruse, & Kusakabe, The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds, 2009). Nonostante diversi studi abbiano indagato sulla biodegradazione del diclofenac negli impianti di depurazione senza considerare i processi co-metabolici, il contributo del co-metabolismo per la sua rimozione nei sistemi a fanghi attivi necessita di ulteriori sperimentazioni per comprenderne meglio il coinvolgimento.

I nitrato-riduttori sono batteri gram-negativi aerobi in grado di ossidare il nitrato a nitrito in condizioni anossiche (Manickam, Pareek, Kaur, Singh, & Mayilraj, 2012); gli *Pseudoxanthomonas* sono metabolicamente versatili e hanno capacità di fissazione dell'azoto (Wang, et al., 259-265). Nitrato-riduttori e *Pseudoxanthomonas* sono presenti in siti contaminati e sono associati alla detossificazione di inquinanti organici (Manickam, Pareek, Kaur, Singh, & Mayilraj, 2012). Sebbene gli *Asticcacaulis* siano distribuiti in ambienti naturali d'acqua dolce e del suolo, poco si sa sulle loro caratteristiche fisiologiche e sulle interazioni biotiche/abiotiche nelle loro nicchie ecologiche. Vari studi hanno identificato la degradazione diretta e co-metabolica del diclofenac da parte di colture pure di *Enterobacter* e *Brevibacterium*, ma i risultati rivelano che questi organismi sono particolarmente rari nelle comunità esposte all'inquinante. Pertanto, gli organismi isolati potrebbero avere un basso potenziale di applicazione biotecnologica nei sistemi di trattamento delle acque reflue per il diclofenac, nonostante abbiano una capacità metabolica verificata. Invece, l'impiego di comunità batteriche ha dimostrato che Nitrato-riduttori, *Pseudoxanthomonas* e *Asticcacaulis* hanno ottenuto risultati competitivi nell'ambito della rimozione del farmaceutico. L'isolamento di queste specie dai fanghi attivi dopo un'esposizione di lunga durata potrebbe, inoltre, fornire alcune comunità batteriche che possono essere utilizzate come fonte di inoculo nella tecnica di bio-aumento.

Biodegradazione del DCF nella rimozione biologica avanzata del fosforo (EBPR)

Da non trascurare è la biodegradazione del diclofenac nel processo di rimozione biologica avanzata del fosforo (EBPR). Ad oggi, l'efficienza di questo processo di biodegradazione e i metaboliti da esso generati non sono ben chiari.

Mentre il diclofenac nei processi di nitrificazione e denitrificazione è stato frequentemente studiato, sono disponibili meno informazioni sull'impatto dell'EBPR sulla trasformazione del farmaceutico.

Nel processo EBPR gli organismi accumulatori di fosfato (PAO) crescono in condizioni anaerobiche e aerobiche (Kolakovic, Freitas, Reis, Carvalho, & Oehmen, 2021). Alcuni studi hanno indagato sulla rimozione di altri prodotti farmaceutici da parte dei PAO (Muz, Ak, Komesli, & Gokcay, 2014) (Ogunlaja & Parker, 2018), altri hanno studiato l'impatto della tossicità del diclofenac sulle prestazioni dell'EBPR dimostrando l'assenza di impatti negativi sulla rimozione del fosforo (Zhao, et al., 2020).

Il PAO più noto nell'EBPR è *Accumulibacter*, il quale condiziona fortemente l'attività metabolica (Camejo, Oyserman, McMahon, & Noguera, 2019) (Kolakovic, Freitas, Reis, Carvalho, & Oehmen, 2021) (Rubio-Rincón, et al., 2019).

Le sperimentazioni hanno dimostrato una rimozione media del fosforo superiore del 98%, con un elevato consumo di ammonio e produzione di nitrati, indicando che l'attività nitrificante ha accompagnato l'assorbimento aerobico di fosforo. La biotrasformazione del diclofenac ha mostrato un grado di varianza più elevato rispetto alla rimozione del fosforo.

Ciò dimostra che le condizioni anaerobiche e anossiche sono meno efficaci di quelle aerobiche per la trasformazione dei microinquinanti. I PAO di *Accumulibacter* possono contribuire alla biotrasformazione del diclofenac nei processi convenzionali a fanghi attivi. Quanto detto suggerisce che, sebbene essi non eseguano la biotrasformazione dell'inquinante in modo efficiente rispetto ai nitrificanti, potrebbero comunque contribuire alla sua degradazione complessiva formando prodotti di trasformazione meno pericolosi per l'ambiente rispetto al composto originario. Nello studio citato la biotrasformazione del diclofenac ha mostrato una trasformazione di circa 7 µg/g di biomassa, mostrando successivamente una riduzione legata al decremento dell'attività di nitrificazione (Kolakovic, et al., 2022).

DCF nella fermentazione anaerobica dei fanghi di scarto

Sono state eseguite analisi sperimentali sulla biodegradazione del diclofenac nelle acque reflue domestiche mediante l'impiego di un reattore batch anaerobico e un reattore anaerobico-aerobico continuo con biomassa immobilizzata ed è stato scoperto che il diclofenac viene degradato principalmente nelle camere anaerobiche dove il tasso di degradazione può potenzialmente raggiungere il 72% (da Silva, Furtado, Zaiat, & Azevedo, 2020). Il tasso di degradazione, come in altri casi, può essere influenzato dalla concentrazione iniziale dell'inquinante ed il pretrattamento dei fanghi (ad esempio, il pretrattamento termofilo) potrebbe portare ad un tasso di rimozione più elevato nel processo anaerobico (Yang, et al., 2022). Uno studio ha rilevato gli intermedi di reazione, proponendo le possibili vie di trasformazione del diclofenac, ovvero la clorurazione (I), la declorurazione (II) e l'idrossilazione (III) (Yang, et al., 2022). Nel Pathway I, il diclofenac può essere attaccato da cloro altamente attivo nei fanghi formando un composto di clorurazione con m/z 330 (rapporto massa su carica). Quindi sono ottenuti composti a basso peso molecolare con m/z 315 ed m/z 162 rispettivamente mediante reazione di riduzione e reazione di rimozione degli anelli aromatici. Nel Pathway II si forma un composto di declorazione (m/z 360) dal quale potrebbe generarsi un prodotto con m/z 246 tramite reazione di

riduzione. Si tenga conto che la dechlorazione riduttiva è una reazione comune tra microinquinanti e alogeni nel trattamento biologico delle acque reflue (Jewell, Falas, Wick, Joss, & Ternes, 2016). Nel Pathway III, il diclofenac viene inizialmente trasformato in diclofenac idrossilato con m/z 312. Ciò è dovuto al fatto che l'atomo è vulnerabile al radicale $\cdot\text{OH}$, che porta all'idrossilazione sull'anello benzenico. È stato documentato che con l'aggiunta di radicale $\cdot\text{OH}$ un radicale centrale del carbonio stabile sostituisce il radicale idrogeno formando prodotti fenolici (Scheurell, Franke, Shah, & Hühnerfuss, 2009). Per idrossilazione del diclofenac, m/z 312 potrebbe essere ulteriormente trasformato in m/z 328. È stato riportato che i prodotti metabolici delle sostanze organiche sono influenzati dal loro contenuto iniziale (Luo, et al., 2020), pertanto i principali prodotti ad altre dosi e le possibili vie di trasformazione del diclofenac devono essere ulteriormente identificati.

2.1.3 Degradazione chimica

La fase biologica degli impianti di trattamento delle acque reflue non è in grado di degradare completamente contaminanti come il diclofenac, di conseguenza la comunità scientifica è alla ricerca di metodi più efficienti per la loro rimozione dalle acque. Sono stati compiuti sforzi significativi per sviluppare nuovi ed efficienti processi di degradazione chimica per l'abbattimento dei microinquinanti. Ad esempio, sono state effettuate ricerche sui processi di ossidazione avanzata (AOP) del diclofenac come ozonizzazione, UV/H₂O₂ e processi foto/Fenton (SVESTKOVA, 2019). Tuttavia, tali processi riscontrano un forte limite negli elevati costi operativi, nella complessità delle apparecchiature tecnologiche e nei tempi di degradazione relativamente lunghi (BELTRÁN, 2009); inoltre, diversi sottoprodotti tossici ed altamente tossici possono scaturire dai processi menzionati. I processi di ossidazione avanzata sono in grado di abbattere i microinquinanti e la materia organica dalle acque. Numerosi semiconduttori sono stati utilizzati per l'AOP, tra cui Fe₂O₃, ZnO, TiO₂ e CdS. Gli AOP sono processi di ossidazione che producono radicali liberi reattivi, principalmente radicali ossidrilici. Il radicale ossidrilico $\cdot\text{OH}$ reagisce con i composti organici per convertirli in intermedi di reazione e infine in CO₂ e H₂O.

Fotocatalisi combinata con perossido di idrogeno

L'AOP a base di H₂O₂ migliora il tasso di deterioramento fino a cinque volte quando viene utilizzato in combinazione con gli UV. (S. Esplugas, Giménez, Pascual, & Rodríguez, 2002). Nel processo fotocatalitico, il perossido di ossidrilico aumenta i tassi di ossidazione delle molecole organiche, di conseguenza H₂O₂ ha un effetto benefico sul processo fotocatalitico grazie alle sue capacità di produrre radicali ossidrilici e prevenire la ricombinazione di elettroni (Irmak & Erbatır, 2004). Van Tung et al. hanno eseguito test batch per valutare la rimozione del diclofenac tramite i singoli processi, tra cui l'adsorbimento sulla superficie di TiO₂, la degradazione da parte della luce UV, di H₂O₂ ed il processo UV/ H₂O₂.

I risultati sperimentali mostrano che il processo di adsorbimento su TiO_2 ha permesso una riduzione della concentrazione di inquinante modesta solo nei primi 30 minuti, continuando a diminuire trascurabilmente per il resto del tempo. Una degradazione maggiore è stata ottenuta tramite gli UV-A, ma solo dopo un certo tempo di reazione. La fotolisi UV del diclofenac dipende da diversi parametri, ad esempio il coefficiente di assorbimento molare, flusso di fotoni incidenti, intensità della radiazione emessa e lunghezza d'onda della radiazione. I raggi UV vengono assorbiti dal diclofenac ad una lunghezza d'onda massima di assorbimento di 276 nm. Il diclofenac non è stato quasi ossidato da H_2O_2 . Durante il tempo di reazione, la concentrazione di inquinante è diminuita solo leggermente. Il processo risultato più efficiente è l'UV/ H_2O_2 . L'efficienza di rimozione del diclofenac mediante tale processo è stata dell'85,08% dopo 150 minuti. Durante il processo si forma un forte radicale ossidrilico che partecipa direttamente all'ossidazione della molecola comportando un miglioramento dell'efficienza del processo stesso (Tra, Pham, Tran, Tran, & Tran, Enhance diclofenac removal in wastewater by photocatalyst process combination with hydrogen peroxide, 2023).

I risultati hanno mostrato che la concentrazione di diclofenac ha un impatto non trascurabile sull'efficacia del processo di fotocatalisi. L'efficienza di rimozione diminuisce con l'aumentare dei livelli iniziali di diclofenac. Pertanto, l'efficienza di rimozione risulta maggiore (77% circa) a concentrazioni iniziali più basse di inquinante. L'aumento di concentrazione di diclofenac induce un aumento della densità ottica interna ed un effetto filtro. Di conseguenza, la soluzione diventa sempre più impermeabile all'irradiazione UV (Aleboye, Moussa, & Aleboye, 2005).

La combinazione di H_2O_2 con il processo fotocatalitico tramite UV migliora l'efficienza di rimozione del diclofenac rispetto ad un processo unico. L' H_2O_2 sotto irradiazione UV ha mostrato una degradazione più rapida rispetto al processo fotocatalitico UV/ TiO_2 (Tra, Pham, Tran, Tran, & Tran, Enhance diclofenac removal in wastewater by photocatalyst process combination with hydrogen peroxide, 2023).

Ozonizzazione e sonolisi

Lo sforzo della ricerca mira a trattamenti avanzati, quali la sonolisi e l'ozonizzazione, nonché il loro impiego combinato. I trattamenti citati sembrano essere consoni alla degradazione del diclofenac; il confronto dei risultati ha portato a valutare indicatori quali la dose di O_3 , la potenza specifica degli ultrasuoni, il pH e la temperatura, da cui è emerso un buon grado di rimozione dell'inquinante (Naddeo, et al., 2020).

La tecnologia ad ultrasuoni, più recente, causa la formazione di radicali ossidrilici altamente reattivi e, quindi, particolarmente efficaci. Altri studi hanno mostrato un'alta reattività del diclofenac verso l'ozonizzazione, con un netto miglioramento tramite l'aggiunta di perossido di idrogeno. (Marinelli, 2020) (Barra, 2020) (Cuomo, 2019) (Bisogno, 2019). Sonolisi e ozonizzazione di soluzioni acquose generano radicali altamente reattivi ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{HO}_2$), i quali reagiscono con i composti organici disciolti

portando a reazioni di idrossilazione e ossidazione (Hartmann, et al., 2008) (Jones, Lester, & Voulvoulis, 2005).

Impiegando l'ozonizzazione si riscontra una riduzione del pH ed un incremento della conducibilità elettrica rispetto alla durata del trattamento. Inoltre, con la riduzione del flusso di ozono, la rimozione del DCF si riduce rispetto al tempo. Durante il processo l'ozono è stabile e reagisce direttamente con i substrati organici sotto mezzo acido. Tuttavia, i limiti del suo impiego sono dettati dall'elevato fabbisogno di energia per la generazione di ozono; inoltre, si registra un aumento della torbidità degli effluenti ed una sensibilità al pH. Con il fine di ridurre questi limiti, l'ozonizzazione viene combinata con l'irradiazione ultrasonica (Y.L.Pang, A.Z.Abdullah, & S.Bhatia, 2011). L'interesse verso gli ultrasuoni è sempre crescente dati i suoi notevoli vantaggi: pulizia, sicurezza, efficienza ad alta degradazione, elevata penetrabilità del mezzo acqua e risparmio energetico, mancanza di prodotti inquinanti secondari (Y.L.Pang, A.Z.Abdullah, & S.Bhatia, 2011). L'incremento di apporto di US porta all'aumento di energia e formazione di bolle di cavitazione. Incremento di temperatura, durata e intensità degli US contribuiscono alla buona riuscita del processo. (Naddeo, Ricco, Scannapieco, & Belgiorno, 2012).

I meccanismi di sonolisi e di ozonizzazione generano radicali altamente reattivi che comportano la rottura delle pareti delle cellule batteriche e la loro distruzione (L.Lan, Y.Xie, X.Kong, C.Li, & D.Liu, 2020), dimostrando che la sinergia dei due trattamenti potrebbe dimostrarsi particolarmente vantaggiosa. Ciò garantisce, infatti, la degradazione di una più ampia varietà di inquinanti, rispetto all'uso delle singole tecniche: la sinergia si innesca, però, solo quando l'attacco di radicali liberi ha il controllo sul processo di degradazione (Naddeo, Ricco, Scannapieco, & Belgiorno, 2012).

Si è dimostrato che dopo 40 minuti di processo emerge una riduzione del 39% di diclofenac con il processo combinato, contro il 22% ottenuto dall'ozonizzazione ed il 36% ottenuto con la sola sonolisi. Simultaneamente avvengono un incremento della temperatura e della conducibilità elettrica e una diminuzione del pH (Naddeo, Ricco, Scannapieco, & Belgiorno, 2012).

Ovviamente, nel passaggio dal setup sperimentale agli impianti su scala reale, è necessario effettuare un'analisi economica per la scelta del migliore metodo di trattamento da eseguire, nonché un'analisi di tossicità e di rimozione dei sottoprodotti che si genereranno durante il trattamento. Considerando costo capitale e di manutenzione viene fuori che l'US non è economicamente sostenibile per gli impianti su larga scala, per via della scarsa conversione di energia elettrica in energia di cavitazione (34%) (Y.L.Pang, A.Z.Abdullah, & S.Bhatia, 2011).

In conclusione, l'ozonizzazione garantisce una rimozione quasi completa dopo un trattamento di 40 minuti: la degradazione si riduce nel tempo al ridursi del flusso di ozono e aumenta per concentrazioni iniziali basse di diclofenac. Con la sonolisi, la rimozione aumenta con l'incremento della potenza specifica degli US: lo sviluppo di calore è benefico nei confronti della mineralizzazione dell'inquinante.

Il processo combinato resta l'opzione più efficace, previa valutazione di test di tossicità e di rimozione dei sottoprodotti: in tal caso la mineralizzazione del diclofenac avviene in tempi brevi (20 minuti circa) con una rimozione di circa il 39% (Scarpa).

Degradazione Photo-Fenton

Una ulteriore via di degradazione del diclofenac in soluzioni acquose è mediante la reazione Photo-Fenton. I risultati mostrano una rapida e completa ossidazione del diclofenac dopo 60 minuti e una mineralizzazione totale (scomparsa del carbonio organico disciolto, DOC) dopo 100 minuti di esposizione. Sebbene il diclofenac precipiti durante il processo a basso pH, la sua degradazione avviene nella fase governata dal processo di precipitazione-ridissoluzione. Le vie di degradazione principali sono due. La principale si basa sull'idrossilazione iniziale di una porzione di acido fenilacetico e sulla successiva formazione di un derivato dell'immina chinone che risulta essere il punto di partenza per un'ulteriore degradazione a più stadi che coinvolge reazioni di idrossilazione, decarbossilazione e ossidazione. Il percorso alternativo si basa sulla conversione transitoria della porzione amminica bifenilica che subisce un processo ossidativo simile alla scissione del legame C-N (Leonidas, et al., 2005).

La concentrazione di diclofenac diminuisce rapidamente durante la reazione Fenton, riducendo la quantità iniziale di oltre il 50%. Dopo la reazione di Photo-Fenton, sebbene il processo rallenti, avviene la mineralizzazione. Si scatenano due effetti: la degradazione parziale del diclofenac, con successiva comparsa di prodotti intermedi di reazione, e la rapida diminuzione del pH, innescando la precipitazione del diclofenac. Alla fine del trattamento, nonostante la precipitazione del diclofenac, il contenuto organico risulta completamente mineralizzato (Leonidas, et al., 2005).

3. Fanghi aerobici granulari

I fanghi aerobici granulari (AGS) sono stati sviluppati come migliore sostituto dei fanghi attivi (AS) per superare i problemi di separazione tra fanghi e acque nel trattamento biologico delle acque reflue urbane e industriali. L'AGS si presenta sotto forma di granuli microbici densi auto-immobilizzati con struttura microbica compatta, un elevato contenuto di biopolimeri e velocità di sedimentazione notevole (Yarlagadda V. Nancharaiah, 2019).

L'AGS può essere definito, pertanto, come un insieme di aggregati microbici altamente impacchettati, contenenti milioni di microrganismi per grammo di biomassa, in cui le diverse specie batteriche hanno funzioni specifiche nella degradazione degli inquinanti, e crescono in assenza di materiale di supporto incorporati in una rete tridimensionale di sostanze polimeriche extracellulari (Burzio, et al., 2022) (Liu Y. T., State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment, 2004). I granuli aerobici hanno una forte struttura microbica compatta, con la capacità di gestire elevati tassi di carico organico (Zheng, 2006). La crescita microbica granulare consente un'efficace separazione dell'acqua dalla

biomassa, concentrazioni più elevate di biomassa nel reattore, nitrificazione, denitrificazione e rimozione simultanea dei fosfati in un'unica vasca di trattamento. Ulteriori vantaggi del processo AGS sono la minore produzione di fanghi e la possibilità di riutilizzo dei fanghi in eccesso. I gruppi microbici prevalenti presentano un metabolismo unico che permette di ridurre la produzione dei fanghi nel processo AGS. Tuttavia, i lunghi periodi di avvio per la formazione dell'AGS sono ostacoli per l'implementazione diffusa della tecnologia. Le condizioni operative del bioreattore, come l'alimentazione anaerobica, il regime feast-famine e i brevi periodi di sedimentazione, impongono la selezione di batteri a crescita lenta con caratteristiche metaboliche uniche e che favoriscano la granulazione (Yarlagadda V. Nancharaiah, 2019).

Per la coltivazione di AGS da fiocchi di fanghi attivi, viene generalmente impiegato un reattore batch sequenziale (SBR) azionato principalmente con fasi anaerobiche, aerobiche e di decantazione breve nel ciclo. Queste condizioni operative consentono la selezione di microrganismi a crescita lenta come batteri nitrificanti, organismi accumulatori di fosfato (PAO) e organismi accumulatori di glicogeno (GAO) come aggregati densi. La velocità di sedimentazione dei bio-aggregati consente un'efficace ritenzione nell'SBR e la loro successiva crescita che porta alla formazione di granuli di dimensioni millimetriche. Grazie alle dimensioni elevate delle particelle, alla struttura microbica compatta e alla respirazione aerobica nella regione esterna del granulo, è possibile mantenere microambienti aerobici, anossici e anaerobici in un singolo granulo anche durante la fase di aerazione (Winkler MH, 2015).

Per la coltivazione di AGS, i reattori SBR vengono inoculati con fanghi attivi e corredati con aeratori a bolle prevedendo brevi tempi di decantazione. Nei reattori, la crescita dei fanghi viene promossa per formare aggregati compatti e densi, che vengono poi selezionati tramite brevi tempi di sedimentazione, in genere compresi tra 2 e 10 minuti. Il funzionamento degli SBR consente di selezionare aggregati microbici a rapida sedimentazione, mentre i fanghi con scarse sedimentabilità vengono lavati via. Pertanto, la separazione dell'AGS dall'acqua trattata si ottiene nello stesso serbatoio del reattore mediante sedimentazione (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018).

Le diverse condizioni redox nei granuli favoriscono la rimozione simultanea di carbonio organico, azoto e fosforo dalle acque reflue. La densità dell'AGS e l'efficace ritenzione della biomassa garantiscono la produzione di concentrazioni di biomassa elevate, pari a 8 g/l e superiori nei reattori su larga scala. Queste caratteristiche dei granuli sono fondamentali per una rimozione rapida ed efficace dei contaminanti dalle acque reflue (Yarlagadda V. Nancharaiah, 2019).

L'AGS semplifica il processo realizzando sia il trattamento biologico che la separazione della biomassa dalle acque trattate in un'unica vasca. Grazie alle eccellenti capacità di sedimentazione dei granuli, negli impianti non sono necessari chiarificatori secondari. Inoltre, non è richiesta la presenza di compartimenti separati ai fini di un'efficace rimozione biologica dell'azoto per via dei microambienti anaerobici, anossici ed aerobici all'interno dei granuli. Tutto ciò contribuisce ad una significativa riduzione delle superfici occupate (Yarlagadda V. Nancharaiah, 2019).

Oltre a ridurre l'ingombro, i sistemi AGS consentono di trattenere elevate concentrazioni di biomassa nel reattore. Le principali caratteristiche dell'AGS che favoriscono un trattamento efficiente con un ingombro ridotto sono la dimensione densa e macrometrica (millimetrica) delle particelle di fango, il mantenimento di diversi microambienti redox, cioè le regioni aerobiche, anossiche ed anaerobiche nei granuli, l'elevata ritenzione di biomassa, il controllo delle reazioni metaboliche tramite regolazione dell'ossigeno disciolto e la cooperazione metabolica tra microrganismi autotrofi ed eterotrofi. Pertanto, quasi tutte le conversioni biologiche, ovvero la degradazione della materia organica, la nitrificazione, la denitrificazione e la rimozione del fosforo, possono essere ottenute in un sistema a fanghi singoli utilizzando AGS (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018).

I meccanismi che permettono la rimozione dei contaminanti da parte dell'AGS sono di seguito elencati:

- L'AGS fornisce un'efficace ritenzione della biomassa, che consente ai microrganismi funzionali responsabili della biodegradazione delle sostanze organiche di essere efficacemente trattenuti nel reattore e di mantenere le loro attività microbiche;
- La struttura stratificata permette ai microrganismi funzionali aerobici e anaerobici di coesistere e cooperare, il che porta ad un'elevata diversità microbica;
- La struttura stratificata e la presenza di EPS conferiscono all'AGS una forte resistenza alla tossicità dei composti, impedendo ai microrganismi funzionali di essere sovraesposti ad essi ed evitando l'inibizione da essi causata;
- Con l'EPS che fornisce la forza elettrostatica, si ottiene un bio-assorbimento di composti organici sulla superficie dell'AGS, che consente di degradare efficacemente gli inquinanti bersaglio. In particolare, per i contaminanti a bassa solubilità, l'EPS può promuovere la biodisponibilità migliorando il contatto tra i contaminanti bersaglio e i microrganismi funzionali.

(Fangrui Cai, 2021)

Tuttavia, quando si tratta di acque reflue industriali contenenti numerose sostanze organiche refrattarie, l'applicazione diretta dei fanghi aerobici granulari per il loro trattamento non è stata ampiamente studiata. La composizione degli effluenti industriali è solitamente complicata in quanto non solo è contenuta una varietà di composti organici recalcitranti, ma sono inclusi altri inquinanti come metalli, solidi sospesi e sostanze nutritive, che hanno aumentato significativamente l'incertezza e la difficoltà del trattamento (Fangrui Cai, 2021).

3.1 La matrice EPS

Le sostanze polimeriche extracellulari svolgono un ruolo essenziale nello sviluppo dell'AGS e nel mantenimento della sua stabilità. Sono un componente chiave dei biofilm microbici e dei granuli e sono costituite principalmente da proteine, polisaccaridi, lipidi, acidi nucleici e glicoproteine (Sutherland, 2001). È stato confermato che gli EPS sono responsabili del comportamento gelificante che contribuisce

in modo significativo ad una forte stabilità strutturale. Inoltre, il cambiamento delle condizioni circostanti come il pH, la temperatura e la composizione influente può innescare modifiche di composizione della matrice EPS. Quando si nutre la biomassa con composti tossici, la matrice EPS protegge i microrganismi dalla tossicità acuta diretta (Maszenan & Ng, W.J., 2011).

Come materiale strutturale chiave degli aggregati microbici, le caratteristiche degli EPS determinano in larga parte la struttura, la carica superficiale, l'idrofobicità, la capacità di formare fiocchi, la capacità di sedimentazione, la capacità di disidratazione e la capacità di adsorbimento degli aggregati microbici nei sistemi biologici di trattamento delle acque reflue (Liu & Fang, H.H.P., Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge, 2003).

Poiché l'EPS contiene una varietà di gruppi funzionali organici tra cui carbossilico, ossidrilico e amminico, esso può migliorare l'affinità degli inquinanti bersaglio con la superficie dei granuli. In tali circostanze, viene fornita la forza elettrostatica richiesta per il bioassorbimento (Vashi, Iorhemen, & Tay, 2019).

Pertanto, le sostanze organiche refrattarie tendono ad essere adsorbite sulla superficie dei granuli e successivamente esposte ai loro degradatori. In particolare, per gli inquinanti a bassa solubilità, il bioassorbimento promuove la biodisponibilità creando un maggiore contatto tra loro e i microrganismi funzionali, i quali eventualmente rimuovono gli inquinanti stessi (Fangruì Cai, 2021).

Finora, due tipi di EPS strutturale sono stati recuperati da AGS sviluppati da acque reflue urbane utilizzando NaOH e Na₂CO₃, rispettivamente granulare ed esopolimerico simile all'alginato (ALE) (T, Z, MCM, & Y, 2012).

È stato messo in luce come le varie forme e componenti degli EPS, tra cui EPS disciolto, debolmente legato, strettamente legato, proteine e polisaccaridi, svolgano ruoli diversi nel processo di granulazione (Liu, et al., 2010). È stato confermato che l'EPS debolmente legato non favorisce l'aggregazione e la sedimentazione dei fanghi (Chen, Kong, Fu, Si, & Fatehi, 2019) mentre le proteine contribuiscono fortemente alla formazione dei granuli (Zhu, et al., 2008). Il nucleo non proteico nei fanghi permette la generazione di granuli in grado di operare stabilmente (Liu & Fang, H.H.P., 2002). I polisaccaridi, inoltre, migliorano l'adesione tra i microrganismi e quindi la stabilità del granulo (Tay, Liu, & Liu, 2001).

Recentemente, è stato recuperato EPS strutturale solubile in acido da AGS alimentati con acetato utilizzando l'estrazione con acido acetico. I granuli erano dominati da organismi *Deffluviococcus Cluster II* e l'EPS strutturale solubile era polisaccaride legato con monomeri di glucosio e galattosio (M, TR, MCM, & YM, 2017a).

Sempre più evidenze dimostrano che la matrice EPS dell'AGS dipende dal tipo di granuli, dai gruppi microbici dominanti, dalla composizione delle acque reflue e dalle condizioni operative del reattore. Inoltre, le interferenze sulla matrice EPS dell'AGS sono limitate dal tipo di metodi di estrazione e caratterizzazione applicati. È necessario applicare metodi avanzati di caratterizzazione per una determinazione accurata dell'EPS e per comprendere il ruolo che svolge nella granulazione e nella stabilità granulare (S, P, MCM, & YM, 2019). L'ALE è l'EPS strutturale dominante nell'AGS per il

trattamento delle acque reflue urbane. Il contenuto dell'ALE è significativo al 15% e 25% dell'AGS (S, S, OA, MCM, & YM, 2016); pertanto, la sua estrazione può ridurre il contenuto di solidi (del 25%) e contribuire alla gestione dei fanghi (A, MCM, M, S, & A, 2016). Inoltre, l'ALE in eccesso, recuperato dall'AGS e rimosso dagli impianti su larga scala, trova applicazione come materia prima nell'industria chimica, cartaria e tessile, nonché in agricoltura per aumentare la capacità di ritenzione idrica dei suoli semi-aridi (M, A, A, S, & M, 2017b). Il metodo di estrazione ALE riduce il volume dei biosolidi, elimina gli agenti patogeni e aiuta nella gestione dei fanghi in eccesso (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018). Sia la microscopia in situ che l'analisi chimica ex situ hanno rivelato che le concentrazioni e la distribuzione dei costituenti l'EPS come proteine e polisaccaridi sono diverse tra fanghi attivi e fanghi aerobici granulari. È stato dimostrato che il contenuto proteico è superiore del 50% nell'EPS dell'AGS rispetto ai fanghi attivi estraendolo utilizzando la resina a scambio cationico. La visualizzazione in situ dei componenti dell'EPS e dei microrganismi utilizzando fluoruri specifici ed un microscopio a scansione confocale hanno rivelato che le cellule microbiche e i polisaccaridi si distribuiscono principalmente nel bordo esterno dei granuli, mentre il centro è privo di cellule e composto principalmente da proteine. Sulla base di questo modello di distribuzione differenziale, è previsto che il nucleo proteico al centro possa svolgere un ruolo nella formazione e nella stabilità dei granuli (McSwain, Irvine, Hausner, & Wilderer, 2005).

Le condizioni operative di un reattore non solo promuovono la produzione di EPS, ma inducono anche cambiamenti di composizione nella loro struttura che a loro volta facilitano l'aggregazione microbica e la formazione di AGS (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018).

In conclusione, gli EPS influenzano in modo cruciale le proprietà dei fanghi nei reattori biologici di trattamento delle acque reflue, come il trasferimento di massa, le caratteristiche superficiali, la capacità di adsorbimento, la stabilità al taglio e la formazione di fiocchi di fango (Wingender, Neu, & Flemming, 1999). Tuttavia, i ruoli dell'EPS in queste caratteristiche dei fanghi non sono oggi ben definiti.

3.2 Meccanismi di granulazione

Sono varie le ipotesi proposte per la formazione di biomassa aerobica granulare negli SBR, ma raramente queste sono supportate da prove sperimentali. Sebbene il processo sia dominato dai batteri, le prime ricerche hanno proposto che i filamenti fungini svolgano un ruolo cruciale nelle fasi iniziali della granulazione per lo sviluppo di un nucleo per la colonizzazione batterica (Beun JJ, 1999).

È stato proposto un modello concettuale per la formazione e la rottura dell'AGS comprendente l'aggregazione di microbi di fanghi attivi, il collegamento con l'aiuto di cationi, la modellazione dei granuli, la densificazione e la disintegrazione.

Studi successivi hanno suggerito il coinvolgimento di quattro fasi:

- Interazioni cellula-cellula;
- Attaccamento di microbi e formazione di aggregati;

- Maggiore adesione grazie alla produzione di EPS;
- Formazione dei granuli mediante forza di taglio idrodinamica.

(Lv Y, 2014).

I primi due passaggi sono necessari quando si tenta la granulazione da singole colture batteriche definite (Adav S. , 2008). Gli altri due processi si verificano costantemente nei reattori AGS perché i processi di attacco e distacco fanno parte di un sistema di crescita dinamico (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018).

Ulteriori ricerche hanno dimostrato che molti agenti nucleanti (granuli frantumati, polvere magnetica e carbone attivo granulare) e ioni metallici cationici facilitano e promuovono la granulazione aerobica. Le condizioni SBR potrebbero essere delineate in forze scatenanti e forze di selezione per comprendere la granulazione (Nancharaiah YV, 2018). Le forze scatenanti inducono il fenotipo di aggregazione e la produzione di EPS, mentre le forze di selezione facilitano la ritenzione degli aggregati nel reattore. L'aerazione tramite bolle, le condizioni periodiche di carestia e la fame aerobica contribuiscono a migliorare la produzione di EPS e l'aggregazione di microrganismi (Yarlagadda V. Nancharaiah, 2019). Il processo di granulazione aerobica è influenzato da diversi parametri operativi, come la composizione del substrato, il carico organico (OLR), la forza di taglio idrodinamica, il regime di feast-famine, la strategia di alimentazione, la concentrazione di ossigeno disciolto, la configurazione del reattore, il tempo di ritenzione dei solidi, il tempo di ciclo del reattore batch sequenziale, il tempo di assestamento ed il rapporto di scambio di volume. Sebbene tutti questi fattori influenzino le proprietà dei granuli, solo i fattori associati alla pressione selettiva sulle particelle di fango sembrano contribuire al meccanismo di formazione dei granuli (Liu Y. W., 2005).

I vantaggi del funzionamento SBR sono duplici: la selezione di organismi a crescita lenta essenziali per la coltivazione di AGS stabili e la rimozione simultanea di carbonio, azoto e fosforo dalle acque reflue. La fase di reazione è costituita da due fasi discrete, che sono quella di utilizzo del substrato (banchetto) e quella di esaurimento dello stesso (carestia). Nella fase di banchetto, il substrato è disponibile nel mezzo extracellulare e utilizzato dai microbi. Nella fase di carestia, il substrato si esaurisce e le cellule muoiono di fame in presenza di apporto d'aria. Questi regimi ciclici feast-famine inducono alterazioni fenotipiche tra cui l'idrofobicità della superficie cellulare, la formazione e l'aggregazione del biofilm (Liu Y, 2004).

La formazione e la stabilità di AGS è correlata al quorum sensing basato su N-acilomoserina lattoni (AHL) ATP dipendenti (Jiang B, 2012). I livelli di AHL aumentano durante la granulazione e concentrazioni più elevate degli stessi sono riscontrate nei fanghi aerobici granulari rispetto ai fanghi attivi (Sarma SJ, 2018). Studi recenti hanno dimostrato che gli AHL sono legati alla stabilità granulare. Una diminuzione dei livelli di AHL è stata correlata ad un minore contenuto di ATP, un minore contenuto di EPS, un minore rapporto tra proteine extracellulari ed esopolisaccaridi, causando infine la disintegrazione dell'AGS (Chen H, 2019).

3.3 Microbiologia dell'AGS

Le condizioni operative di un reattore SBR per fanghi attivi granulari impongono la selezione di microbi a crescita lenta con funzioni fisiologiche uniche dei granuli (Xia J, 2018). L'operazione di riempimento e prelievo crea condizioni alternate di banchetto, carestia e fame aerobica che migliora l'aggregazione batterica. La fase anaerobica durante la fase di riempimento facilita l'idrolisi della materia organica biodegradabile, la fermentazione della materia organica in acidi grassi volatili e l'arricchimento di PAO che accumulano gli stessi acidi grassi. L'alimentazione lenta delle acque reflue affluenti mediante trasporto verso l'alto attraverso la biomassa consente ai PAO ed ai GAO di rimuovere la domanda chimica di ossigeno (COD) in condizioni anaerobiche (He Q, 2019). Pertanto, la fase anaerobica contribuisce ad una riduzione sostanziale del carbonio organico e riduce al minimo il passaggio del COD alla successiva fase aerobica. Questo metabolismo microbico unico è essenziale per la stabilità granulare e per prevenire la proliferazione di organismi filamentosi indesiderati durante la fase aerobica (Zhang B).

Gli AGS ospitano gruppi microbici filogeneticamente diversi nella matrice del biopolimero. Mentre lo strato periferico dei granuli è composto principalmente da aerobi, lo strato interno ed il nucleo sono costituiti da microrganismi anossici/anaerobi e cellule microbiche morte. Poiché nei granuli sono presenti sia i microrganismi aerobici che quelli anaerobici, anche le vie di biodegradazione possono essere condivise. Il prodotto di degradazione di un microrganismo può fungere da substrato per un altro, consentendo di completare la degradazione degli inquinanti bersaglio (Sarma, 2017). La selezione di microbi a crescita lenta come batteri nitrificanti, batteri *anammox*, PAO e GAO è utile per lo sviluppo di AGS stabili (de Sousa Rollemberg SL). L'instabilità della struttura granulare o la rottura dell'AGS durante il funzionamento a lungo termine è considerata un ostacolo importante per l'applicazione diffusa del processo. La rottura dei granuli può portare alla perdita di AGS, ad alti livelli di solidi sospesi nelle acque, al deterioramento della rimozione dei nutrienti e persino al fallimento del trattamento biologico complessivo (Wilén BM). La stabilità strutturale dell'AGS è compromessa a causa di vari parametri, tra cui la crescita di microrganismi filamentosi/eterotrofi, la lisi cellulare, l'idrolisi della matrice strutturale di EPS e l'esposizione a inquinanti tossici/ioni metallici (Franca RD, 2018).

3.3.1 PAO/DPAO e GAO/DGAO

La selezione della comunità microbica a crescita lenta è un criterio chiave per mantenere stabile l'AGS durante il funzionamento a lungo termine. L'alimentazione aerobica è un'altra strategia operativa per l'arricchimento di batteri a crescita lenta (PAO, GAO) per ridurre al minimo il tasso di crescita e mantenere stabili gli AGS (Zhang B).

A causa della varietà delle popolazioni microbiche, è necessario manipolare le condizioni operative per selezionare la specie desiderata per un determinato processo. È stato dimostrato che gli organismi a crescita lenta influenzano positivamente la densità e la stabilità del biofilm (de Kreuk M. v., 2004). Secondo Bernet e Spérandio (2009), rispetto alla crescita di microrganismi eterotrofi, la crescita di

batteri nitrificanti è più lenta anche in condizioni di coltivazione ottimali (Bernet, 2009). Il tasso di crescita specifico massimo per i microrganismi eterotrofi è compreso tra 4 e 13,2 giorni⁻¹, mentre, per quelli nitrificanti, l'intervallo è compreso tra 0,62 e 0,92 giorni⁻¹. I batteri *Anammox* hanno il più basso tasso di crescita tra i batteri che possono essere presenti nel granulo, con valori vicini a 0,065 giorni⁻¹ (Isaka, 2006).

Per quanto riguarda la rimozione del fosforo, i principali PAO sono: *Accumulibacter*, *Rhodocyclus* ed *Enterobacter*. Si crea competizione tra il suddetto gruppo e il genere *Competibacter* (GAO), poiché entrambi consumano lo stesso substrato ed hanno un metabolismo simile. Tuttavia, i GAO non sono in grado di accumulare fosforo, diminuendo così l'efficienza del sistema per la rimozione dei nutrienti (Bassin J. W., 2012). È stato dimostrato che anche gli organismi che accumulano polifosfato denitrificanti (DPAO) e gli organismi che accumulano glicogeno denitrificanti (DGAO) sono considerati organismi a crescita lenta e portano alla granulazione completa. Questi organismi consumano polimeri di stoccaggio interno, come i poliidrossialcanoati (PHA), al fine di ridurre i nitriti o i nitrati e, nel caso dei DPAO, contribuiscono anche all'assorbimento dei fosfati (Carta, 2001).

I DPAO e i DGAO appartengono generalmente alle famiglie *Comamonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Rhodobacteriaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Rhodocyclaceae*, in particolare dei generi *Thauera*, *Zoogloea*, *Meganema*, *Devosia* e *Stenotrophomonas* (Weissbrodt, 2013). Inoltre, le famiglie di *Sphingomonadaceae*, *Xanthomonadaceae* e *Rhodocyclaceae* sono state correlate alla produzione di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) (Szabó, 2017).

La principale strategia di selezione di questi microrganismi consiste in un lungo periodo di alimentazione anaerobica seguito da un periodo di reazione aerobica (PAO e GAO) o da un periodo di reazione anossica (DPAO e DGAO). Inoltre, gli organismi eterotrofi ordinari (OHO) presentano tassi di crescita inferiori per i polimeri di stoccaggio lentamente biodegradabili (PHA, glicogeno) rispetto ai substrati facilmente biodegradabili (Carta, 2001).

L'applicazione di un regime di banchetto/cresta ad un sistema SBR riduce il tasso massimo di crescita dei microrganismi a crescita rapida (OHO), in particolare durante la fase di cresta. L'assorbimento anaerobico di substrato facilmente biodegradabile, prima della fase di reazione aerobica/anossica, e/o la conversione del substrato da parte di batteri a crescita relativamente lenta durante il periodo aerobico o anossico sono condizioni essenziali per ottenere una granulazione stabile (Pronk, 2015).

L'accumulo di GAO, inoltre, viene favorito, rispetto ai PAO, da un basso rapporto tra domanda chimica di ossigeno e azoto (COD/N) e un'elevata concentrazione di ossigeno disciolto (DO) (He Q. C., 2018). In effetti, la riduzione del rapporto COD/N ha favorito l'accumulo di GAO e DPAO, inibendo la crescita di PAO (Wang H. S., 2018). L'aerazione influisce, inoltre, sulla selezione di PAO e GAO. È interessante notare che la riduzione dell'intensità (He Q. Z., 2017) e del tempo di aerazione potrebbe inibire la crescita dei GAO stimolando l'arricchimento di PAO (He Q. C., 2018).

3.3.2 AOB, NOB e Anammox

Come già detto più volte, la stabilità dei granuli aerobici è ottenibile mediante la selezione di batteri nitrificanti a crescita lenta (Liu Y. Y., 2004). Il rapporto COD/N genera un forte impatto sull'abbondanza di batteri ossidanti l'ammoniaca (AOB) (*Nitrosomonas*) e batteri ossidanti dei nitriti (NOB) (*Nitrospira*, *Nitrobacter*). Gli NOB diminuiscono con un basso rapporto COD/N, mentre i *Nitrosomonas* abbondano. Per quanto riguarda la competizione tra NOB, i *Nitrospira* prevalgono rispetto ai *Nitrobacter* a basse concentrazioni di nitrati (Luo J. H., 2014). Inoltre, l'abbassamento della velocità superficiale del gas di aerazione ha favorito l'arricchimento di AOB e ha soppresso l'accumulo di NOB (He Q. Z., 2017).

Un'importante famiglia è quella delle *Brocadiaceae*, responsabile dell'ossidazione anaerobica dell'ammonio (*Anammox*). Data la bassa resa ed il basso tasso di crescita dei batteri *Anammox*, la crescita eterotrofica dovrebbe essere ridotta al minimo, per mantenere un'elevata frazione di batteri *Anammox* nei fanghi (Silvio Luiz de Sousa Rollemberg, 2018).

Nei sistemi di fanghi aerobici granulari, la competizione tra *Anammox* e NOB per i nitriti e tra AOB e NOB per l'ossigeno è il problema principale nella selezione della popolazione desiderata. Basse concentrazioni di ossigeno sono state proposte per favorire l'AOB rispetto al NOB. Quando l'ossigeno è limitato nei sistemi AGS, nessuno dei tre i gruppi di batteri (*Anammox*, AOB e NOB) cresce in sospensione ma sono raccolti in un granulo compatto. In questo caso, l'SRT minimo richiesto è quindi definito dal microrganismo a crescita lenta (*Anammox*) (Winkler M. K., 2011).

In Tabella 3-1 sono riportati i gruppi microbici funzionali presenti nei granuli aerobici:

GRUPPI	REAZIONE	ABBREVIAZIONE
Organismi eterotrofi ordinari	Rimozione COD	OHO
Organismi nitrificanti	Nitrificazione	AOB
	Nitrificazione	NOB
	Nitrificazione completa	COMAMMOX
Organismi polifosfato accumulatori	Rimozione fosforo	PAO
Organismi eterotrofi glicogeno accumulatori	Rimozione COD	GAO
Organismi denitrificanti	Denitrificazione	DOHO
	Denitrificazione e rimozione fosforo	DPAO
	Denitrificazione e accumulo glicogeno	DGAO
Organismi autotrofi aerobici	Organismi anaerobici dell'ammonio	Anammox

Tabella 3-1: Gruppi microbici e principali reazioni coinvolte nei sistemi AGS (Eddy, 2016).

In Tabella 3-2 sono invece riportati i gruppi batterici osservati in diversi lavori sull'AGS e le loro rispettive funzioni:

BATTERIO	FUNZIONE
----------	----------

Nitrospira defluvii	NOB
Nitrobacter	NOB
Competibacter	PAO
Accumulibacter	GAO
Nitro somonas europaea	AOB
Azotobacter	Alginate production
Pseudomonas	DOHO
Tetrasphaera	PAO
Xanthomonadaceae	OHO and EPS production
Acidovorax	DOHO
Rhizobiales	DOHO
Beggiatoa spp.	OHO
Chryseobacterium spp.	OHO
Chloroflexi	OHO
Thiothrixnivea	OHO
Defluviococcus	GAO
Zoogloea sp.	DOHO
Flavobacterium sp.	OHO
Acinetobacter sp.	DOHO
Rhodocyclaceae	EPS productions
Xanthomonadaceae	EPS productions
Methylobacteriaceae	DOHO
Nitrospiraceae	NOB
Bradyrhizobiaceae	NOB
Brocadiaceae	Anammox
Comamonas	DOHO
Dechloromonas	DPAO
Azospira	DOHO
Aquicola tertiaricarbonis	DGAO
Paracoccus aminovorans	AOB
Rhodoplanes elegans	PAO
Paracoccus	Pvridine degradation

Tabella 3-2: Gruppi batterici e loro funzioni nel sistema AGS (Winkler M. K., 2012) (Lin Y. S., 2013) (Weissbrodt, 2013) (Figueroa, 2015) (Franca, 327-336) (Wan, 2015)

3.4 Parametri di coltivazione

La “pressione selettiva” è uno stress che induce un cambiamento nel comportamento di una popolazione microbica, essendo una forza trainante fondamentale per il successo della coltivazione dell’AGS (de Sousa Rollemberg SL). Fattori di pressione selettiva di cui si tiene conto sono i distinti periodi di feast-famine durante il funzionamento, ridotti tempi di sedimentazione e un’elevata intensità di aerazione (Qin, 2004).

3.4.1 Sforzi di taglio

La forza di taglio idrodinamica, i brevi periodi di sedimentazione e i regimi di alimentazione feast-famine sono le forze scatenanti fondamentali negli SBR (Nancharaiah Y. R., 2018). L’intensità di

aerazione, la velocità dell'aria verso l'alto ed il rapporto tra altezza e diametro (H/D) sono legati alle sollecitazioni di taglio imposte al sistema (Adav S. L., 2008).

Lo sforzo di taglio è strettamente correlato al metabolismo dell'AGS, alla produzione di EPS, alle prestazioni, alla stabilità dei granuli ed alla loro velocità di formazione. È stato osservato che un rapporto H/D maggiore fornisce una traiettoria circolare più lunga, la quale provoca attrito idraulico per l'aggregazione microbica (Liu Y. T., The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge, 2002).

Varie sperimentazioni hanno messo in luce che, sebbene valori elevati di H/D garantiscano la formazione dei granuli aerobici, non è applicabile in impianti su larga scala. Diminuendo tale rapporto, è necessario aumentare il livello di aerazione per incrementare lo sforzo di taglio con conseguente aumento dei costi di implementazione e di esercizio (de Sousa Rollemberg SL).

L'aerazione è il mezzo principale per il controllo della forza di taglio; un'elevata velocità di aerazione comporta una granulazione aerobica più rapida per via di una maggiore forza di taglio. Inoltre, un'elevata intensità di aerazione è benefica per la stabilità dei granuli aerobici non solo fornendo una forza di taglio sufficiente, ma anche inibendo la crescita di batteri filamentosi e granuli di dimensioni eccessive (He Q. Z., 2017) (Adav S. L., 2008) (Li, 2011).

In alcuni è stata applicata un'elevata intensità di aerazione sia per migliorare la granulazione aerobica che per mantenere la stabilità dei granuli durante il funzionamento a lungo termine, mentre uno sforzo di taglio idrodinamico relativamente basso favorisce l'aumento delle dimensioni dei granuli. Tuttavia, un'elevata sollecitazione di taglio idrodinamica richiede notevoli quantità di energia (Zhou, 2016).

Nei reattori AGS, la forza di taglio è quantificata dividendo il tasso di aerazione sull'area trasversale del reattore ed è rappresentata come velocità dell'aria per unità di superficie. È stato valutato l'effetto di diversi valori di velocità di aerazione sulla granulazione in un reattore SBR con una velocità costante dell'aria verso l'alto (v_{air}). Gli autori hanno osservato che una velocità di 0,41 cm/s è sufficiente per la formazione dei granuli, raggiungendo prestazioni ottimali con un COD di 300 mg/l. La stessa velocità si è rivelata inadatta per un COD di 600 mg/l, mostrando che l'ottimizzazione del valore di velocità di aerazione dipende anche dal carico influente. Valori di velocità maggiori di 2,5 cm/s hanno casato la formazione di granuli densi, compatti e maturi (Devlin, 2017).

Generalmente, il taglio idrodinamico causato dall'aerazione delle bolle induce la produzione di sostanze polimeriche extracellulari (EPS), l'idrofobicità della superficie cellulare e innesca interazioni tra le cellule che contribuiscono all'inizio della formazione dei granuli. Il taglio agisce anche come forza di compattazione sulla superficie degli aggregati microbici e aiuta a modellare i granuli staccando i microbi debolmente legati alla superficie esterna. Una adeguata comprensione dell'auto-immobilizzazione dei microrganismi, in particolare il ruolo dello sforzo di taglio sulla fisiologia delle cellule microbiche, è essenziale per ridurre al minimo il tasso di aerazione richiesto (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018).

Altro fattore rilevante è il DO (ossigeno disciolto); la limitazione della diffusione dell'ossigeno disciolto nei granuli aerobici è indispensabile per la creazione delle diverse zone necessarie per il processo simultaneo di nitrificazione/denitrificazione (SND). È stato dimostrato che è possibile formare AGS a basse concentrazioni di DO se vengono applicate condizioni che selezionano microrganismi a crescita lenta. Tuttavia, a basse concentrazioni di DO i granuli risultano molto instabili e si disintegrerebbero nel funzionamento a lungo termine. È stata valutata, inoltre, la rimozione dell'azoto in un sistema AGS a breve termine riducendo la concentrazione di ossigeno disciolto in saturazione dal 100% al 50%, 40%, 20% e 10%. La riduzione non risulta influire sul tasso di assorbimento dell'acetato nel periodo aerobico e la rimozione dell'azoto viene favorita. Nello stesso studio sono stati analizzati gli effetti sul funzionamento a lungo termine a due concentrazioni di ossigeno disciolto di saturazione (100% e 40%) ed è stato evidenziato che la rimozione dell'azoto può aumentare dall'8% al 45% quando la saturazione di ossigeno è ridotta al 40%. Nonostante il buon funzionamento, i granuli tendono a disintegrarsi portando al dilavamento della biomassa (Mosquera-Corral, 2005).

Stabilire la concentrazione ottimale di ossigeno disciolto è notevolmente complicato in quanto quest'ultima dipende da fattori specifici, quali la concentrazione di biomassa, la dimensione dei granuli, il tipo di substrato e la velocità di carico organico applicata. Granuli stabili sembra possano essere ottenuti per concentrazioni di ossigeno disciolto superiori al 50% della loro concentrazione di saturazione (de Sousa Rollemberg SL).

In conclusione, i vantaggi di una elevata velocità di aerazione sono la rapida formazione dei granuli, la loro stabilità, l'aumento dell'idrofobicità, l'inibizione della crescita di batteri filamentosi e granuli di dimensioni eccessive e la produzione di EPS (de Sousa Rollemberg SL).

3.4.2 Cicli SBR e tempo di assestamento

La maggior parte degli SBR applicati alla coltivazione di AGS opera con un tempo di ciclo totale compreso tra 4 e 12 ore. Cicli brevi, inferiori a 4 ore, ad esempio, possono provocare il dilavamento della biomassa con il surnatante del sistema (Liu Y. T., State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment, 2004). Tuttavia, è stata osservata granulazione nitrificante in cicli SBR superiori a 24 ore, probabilmente a causa del basso carico di azoto (Tay, Yang, & Liu, Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors, 2002). Per cicli SBR medi, in particolare tra le 4 e le 12 ore, sono stati coltivati granuli nitrificanti. L'alternanza di condizioni aerobiche e anaerobiche favorisce la crescita di microrganismi benefici alla granulazione (PAO, GAO, batteri nitrificanti), poiché la proliferazione di microrganismi eterotrofi è soppressa dalla mancanza di fonte di carbonio solubile in condizioni aerobiche. Pertanto, i cicli SBR hanno generalmente un periodo anaerobico seguito da un periodo aerobico (de Sousa Rollemberg SL).

Il tempo di sedimentazione è un fattore chiave per la formazione di granuli aerobici, essendo considerato la principale strategia di selezione microbica (Beun JJ, 1999). Brevi tempi di decantazione (<10 minuti)

consentono una rapida selezione degli aggregati microbici, causando il dilavamento dei fiocchi microbici leggeri (de Sousa Rollemberg SL).

Esiste una relazione tra la formazione dei granuli ed i tempi di assestamento. Con un tempo di decantazione di 5 minuti, la formazione di granuli risulta eccellente con assenza di fanghi flocculanti (Qin, 2004).

Gli studi indicano che brevi tempi di decantazione sono essenziali per la formazione di AGS. La riduzione graduale del tempo di sedimentazione è la strategia più utilizzata per la formazione dei granuli, ma le strategie variano molto in letteratura (Jiang, Tay, & Tay, 2002).

3.4.3 Periodo di feast-famine

La mancanza di nutrimento, durante il periodo di carestia, stimola l'idrofobicità dei batteri, permettendo la connessione tra loro (Tay, Liu, & Liu, 2001).

Gli studi hanno dimostrato che, sebbene un breve periodo di carestia possa accelerare la formazione di granuli, questa condizione ha un impatto negativo sulla stabilità dell'AGS (Liu & Tay, J.H., 2008). D'altra parte, lunghi periodi di carestia possono portare all'induzione di un consumo eccessivo di EPS e a maggiori spese energetiche (Wang, Liu, & Tay, 2005).

Con periodi di feast pari al 40% del tempo di aerazione, il processo di granulazione aerobica si accelera. Tuttavia, la stabilità a lungo termine dei granuli viene compromessa (Liu & Tay, J.H., 2008). La maggior parte degli studi ha evidenziato che, quando il periodo di feast è pari al 20% del tempo di aerazione, i granuli formati sono stabili e resistenti (Wang, Oehmen, Freitas, Carvalho, & Reis, 2017).

In uno studio mirato ad ottimizzare i periodi di feast-famine è stato dimostrato che, quando il periodo di feast è pari al 33% del tempo di aerazione, si formano granuli stabili, densi e resistenti. In sintesi, è stato osservato che un periodo di feast inferiore al 40% del tempo di aerazione comporta la formazione di granuli con una buona velocità di sedimentazione ed una buona stabilità nei lunghi periodi di funzionamento (López-Palau, Pinto, Basset, Dosta, & Mata- Álvarez, 2012).

Le sostanze polimeriche extracellulari (EPS) sono prodotte principalmente durante la fase di feast, successivo al periodo di alimentazione in cui il COD prontamente biodegradabile viene consumato.

3.5 Parametri di mantenimento

I parametri considerati chiave per il mantenimento dell'AGS sono la composizione delle acque reflue influenti, il tasso di carico organico (F/M) e i fattori correlati, il tempo di ritenzione (SRT) (Liu Y. W., 2005), pH e temperatura (de Kreuk, Pronk, & van Loosdrecht, 2005).

3.5.1 Composizione delle acque reflue influenti

Diversi studi indicano la possibilità di formazione di AGS utilizzando acque reflue reali. Pertanto, la coltivazione AGS è stata analizzata sia per le acque reflue domestiche che per l'acetato. In presenza di

acetato, i granuli formati sono più stabili e hanno una struttura più compatta e densa rispetto ai granuli formati con le acque reflue domestiche (Nor-Anuar, Ujang, Loosdrecht, M.C.M., & de Kreuk, 2012).

La maggior parte delle indagini sono state condotte con effluenti sintetici, essendo le principali fonti di carbonio il glucosio, l'acetato, l'etanolo ed il fenolo. Nella valutazione del tipo di granulo formato da diversi substrati, si osserva che il glucosio produce granuli filamentosi mentre l'acetato forma granuli densi e resistenti. L'uso del fenolo come substrato porta alla produzione di granuli forti ma con lunghi tempi di coltivazione (Adav, Lee, & Ren, Degradation of phenol by Acinetobacter strain isolated from aerobic granules, 2007).

In lavori è stato adottato il propionato come fonte di carbonio per la granulazione aerobica ed è stato osservato che, sebbene la granulazione sia ritardata, i granuli hanno una struttura forte e compatta e possono essere utilizzati per lunghi periodi senza che si disintegrino (Moy, Tay, Toh, & Tay, S.T., 2002). L'uso di propionato e acetato aumenta l'accumulo di poliidrossialcanoati (PHA), favorendo i PAO e ottenendo un granulo stabile (de Sousa Rollemberg SL).

Per quanto riguarda il rapporto COD/N influente, valori elevati possono causare la disintegrazione dei granuli e la crescita di microrganismi filamentosi. D'altra parte, la riduzione del rapporto a valori prossimi a 1, causa cambiamenti nella comunità microbica e riduce il contenuto di EPS, impattando sulla nitrificazione, sulla resistenza, sulle dimensioni e sulla capacità di sedimentazione del granulo aerobico, con conseguente perdita di biomassa granulare (Carrera, Vicent, & Lafuente, 2004).

Valori elevati di rapporto COD/N, compresi tra 10 e 30, favoriscono la crescita di granuli di grandi dimensioni con predominanza di microrganismi filamentosi (Kocaturk & Erguder, T.H., 2016). Tuttavia, valori bassi dello stesso rapporto, compresi tra 2 e 5, portano alla formazione di granuli stabili ma piccoli. Il rapporto ottimale in termini di efficienza di rimozione e stabilità dei granuli è di 7,5 (de Sousa Rollemberg SL).

3.5.2 Rapporto F/M e fattori correlati

Il rapporto F/M è un fattore rilevante nel processo di granulazione aerobica; è direttamente correlato alla composizione di EPS generato, alla stabilità dei granuli, al tempo di formazione, alla diversità microbica e all'efficienza di rimozione degli inquinanti (Wu, Zhang, Yu, & Zhu, 2018).

Un valore basso di F/M (0,33 g COD/gVSSd) è rilevante per lo sviluppo di granuli aerobici stabili (Tay, Liu, & Liu, Effect of organic loading rate on aerobic granulation. I: reactor performance, 2004). Si possono adottare valori maggiori o uguali a 1,1 gCOD/gVSSd per la formazione dei granuli e valori pari a 0,3 gCOD/gVSSd nella fase di maturazione (Li, 2011).

Valori compresi tra 0,4 e 0,5 mostrano una maggiore diversità microbica e una migliore efficienza di rimozione degli inquinanti (Wu, Zhang, Yu, & Zhu, 2018).

Quando i valori del rapporto F/M sono relativamente bassi, la stabilità dei granuli è favorita a causa delle dimensioni relativamente ridotte. Tuttavia, valori molto bassi causano una diminuzione della produzione di EPS, compromettendo il processo di granulazione (de Sousa Rollemberg SL).

La gestione del rapporto F/M avviene attraverso due parametri: i tassi di carico organico (OLR) e la concentrazione dei solidi sospesi volatili. I granuli risultano stabili quando OLR è inferiore o uguale a 15 kg COD/m³d, con granuli di circa 1,8 mm. Quando l'OLR aumenta i granuli vengono disintegrati e si verifica il dilavamento della biomassa. Per quanto riguarda l'effetto dell'OLR sulla rimozione della materia organica e dei nutrienti, è stato osservato che elevate rimozioni di COD e nutrienti vengono ottenute con valori di OLR minori di 12,6 kg di COD/m³d. Valori bassi di OLR causano la disintegrazione della biomassa granulare aerobica (Long, et al., 2015).

A bassi valori di OLR, i batteri filamentosi sono abbondanti, causando la disintegrazione dei granuli. Ad alti OLR, invece, l'instabilità dei granuli è attribuita a vari aspetti principali: l'aumento delle dimensioni dei granuli e la conseguente disintegrazione dovuta all'incapacità di penetrazione del carbonio, all'idrolisi e alla degradazione proteica del nucleo del granulo (Zheng, 2006) e la perdita della capacità di autoaggregazione microbica dovuta alla riduzione della concentrazione proteica nell'EPS (Adav, Lee, & La, Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates, 2010).

I valori di OLR che possono essere considerati di riferimento per la formazione ed il mantenimento dei granuli maturi sono compresi tra 0,5 e 10 (de Sousa Rollemberg SL).

3.5.3 Tempo di ritenzione SRT

Il tempo di ritenzione è un parametro importante per la stabilizzazione dei granuli, considerando che i batteri coinvolti sono a crescita lenta (de Sousa Rollemberg SL).

Un lungo tempo di ritenzione per fanghi granulari porta facilmente al deterioramento del granulo aerobico (Zhu, Yu, Dai, Xu, & Qi, 2013). Con un tempo di ritenzione di circa 10 giorni i granuli risultano abbastanza stabili anche se di piccole dimensioni (Lin Y. , 2003). È importante chiarire che nella maggior parte degli SBR di fanghi granulari aerobici, l'SRT non è strettamente controllato, ma varia naturalmente con le variazioni della sedimentabilità dei fanghi sotto determinate pressioni di selezione (Liu & Liu, Q.S., 2006).

3.5.4 pH e temperatura

La maggior parte della ricerca sui fanghi aerobici granulari è stata condotta a temperatura ambiente (20-25 °C). de Kreuk et al. hanno osservato che l'avvio di un reattore su scala di laboratorio a 8 °C provoca la crescita di organismi filamentosi e strutture irregolari, portando al dilavamento della biomassa (de Kreuk, Pronk, & van Loosdrecht, 2005). Per questo motivo, nelle regioni fredde è preferibile che l'avvio di un nuovo sistema avvenga in estate, quando la temperatura è elevata ed il processo di formazione dei fanghi è più veloce (de Sousa Rollemberg SL).

Un pH del valore di 3 causa una rapida formazione di granuli dominati da funghi dopo una settimana di funzionamento. Tuttavia, la degranulazione si verifica in breve tempo a causa dell'instabilità dei granuli stessi (Yang, Li, & Yu, 2008).

In presenza di pH basso i tassi cinetici biologici diminuiscono proporzionalmente all'OLR applicato. Pertanto, è utile la neutralizzazione del pH, soprattutto se è necessario trattare acque reflue ad alta resistenza (de Sousa Rollemberg SL).

3.6 Meccanismi di rimozione

A causa dell'elevata diversità batterica nei granuli, sono stati individuati diversi processi metabolici per ottenere l'energia ed il carbonio necessari per la rimozione efficace degli inquinanti in diverse condizioni operative. La rimozione dei composti organici ed inorganici nei reattori AGS avviene attraverso bioassorbimento, bioaccumulo e biodegradazione (Liu Y. W., 2005).

Negli intervalli anaerobici/anossici del ciclo, si verifica la denitrificazione del nitrito e del nitrato residuo, oltre al processo di idrolisi degli EPS. Gli organismi appartenenti ai *phylum Chloroflexi* sono batteri filamentosi importanti nell'idrolisi di proteine e polisaccaridi (Weissbrodt, 2013). In condizioni aerobiche, una maggiore diversità di microrganismi agisce nella biomassa granulare per i processi di denitrificazione e rimozione simultanea del fosforo, come AOB (batteri ossidanti l'ammoniaca), NOB (batteri ossidanti i nitriti), organismi eterotrofi ordinari denitrificanti (DOHO), PAO (batteri accumulatori di fosfato), DPAO (accumulatori di fosfato denitrificanti) e DGAO (accumulatori di glicogeno denitrificanti (de Sousa Rollemberg SL).

È stato osservato che la rimozione dei metalli e di alcuni composti recalcitranti è avvenuta per bioassorbimento ed è stata correlata al contenuto di EPS (Kong, et al., 2014). L'uso dell'EPS nel processo di bioassorbimento è un approccio economico e utile, e può essere un'alternativa ai metodi convenzionali, come la precipitazione, la coagulazione, lo scambio ionico, i processi elettrochimici e a membrana, utilizzati per la rimozione dei metalli (Gutnick & Bach, H., 2000).

Sono stati studiati i meccanismi di rimozione del colorante. La letteratura riporta che, in condizioni anaerobiche e con la presenza di un co-substrato (donatore di elettroni), si verifica una riduzione del colorante azoico, che richiede quattro elettroni per rompere ciascun legame azoico. I sottoprodotti di riduzione del colorante azoico, le ammine aromatiche, vengono solitamente rimossi in condizioni aerobiche, poiché vengono utilizzati come fonte di carbonio e azoto. I sottoprodotti finali possono essere composti azotati, acqua e anidride carbonica (Sarvajith, Reddy, & Nancharaiah, 2018).

I principali processi di rimozione riportati nell'esempio sono il bioassorbimento e la biodegradazione. Valutando la rimozione del blu di metilene nei reattori AGS è stato scoperto che il 9,4% del colorante è stato adsorbito dagli EPS e l'80,7% è stato degradato dai fanghi, dimostrando l'importanza di entrambi i processi simultanei (Wei, et al., 2015).

L'AGS ha mostrato un meccanismo di biodegradazione di alcuni composti legati alla rimozione dell'azoto. Ad esempio, è stato scoperto che la rimozione del p-nitrofenolo si verifica contemporaneamente all'ossidazione dell'ammoniaca in un processo co-metabolico (Jemmat, Suárez-Ojeda, Pérez, & Carrera, 2013).

In un recente studio è stato osservato un meccanismo simile durante la valutazione della rimozione della piridina, la cui degradazione è avvenuta tramite denitrificazione dei nitriti utilizzando gli intermedi di biodegradazione (Liu, et al., 2018).

Pertanto, la degradazione della piridina, mediato principalmente dal microrganismo *Paracoccus*, avviene contemporaneamente alla denitrificazione. La piridina potrebbe essere assorbita dai granuli aerobici a causa della porosità e dell'elevata area superficiale, seguita dalla diffusione interparticellare. La piridina adsorbita potrebbe essere ulteriormente degradata e immagazzinata come polimero intercellulare o extracellulare (Lopez-Vazquez, Brdjanovic, Gijzen, Loosdrech, & Hooijmans, 2009).

Il nitrito prodotto nel ciclo SBR potrebbe essere denitrificato nello strato anossico utilizzando gli intermedi di biodegradazione della piridina, dei polimeri intracellulari o extracellulari prodotti o della piridina stessa come donatori di elettroni (Liu, et al., 2018).

Utilizzando un sistema AGS per la rimozione del colorante giallo (YD), è stato osservato che il colore e l'azoto vengono rimossi contemporaneamente. Inizialmente, il composto donatore di elettroni è stato ossidato e gli elettroni generati sono stati utilizzati sia per ridurre il colorante azoico in condizioni anaerobiche che per supportare la denitrificazione eterotrofica del nitrito generato durante la fase aerobica (Sarvajith, Reddy, & Nancharaiah, 2018).

È stata studiata anche la rimozione di microinquinanti emergenti, come estrogeni, composti fenolici, estradiolo e altri composti, utilizzando AGS e alcuni autori hanno osservato cambiamenti significativi nella composizione batterica del granulo quando il sistema ha iniziato a trattare alcuni prodotti farmaceutici e per la cura della persona (Amorim, Alves, Castro, & Henriques, 2018). Tuttavia, è noto che l'EPS può agire come uno strato protettivo sulla superficie del granulo, evitando la penetrazione di composti tossici e proteggendo la comunità batterica (Liu, Sheng, & Yu, 2009).

3.6.1 Nitrificazione e denitrificazione

La rimozione convenzionale dell'azoto richiede condizioni sia aerobiche che anaerobiche/anossiche rispettivamente per la nitrificazione e la denitrificazione di nitrato o nitrito di ammonio. Pertanto, è necessaria l'integrazione di periodi con DO alto e basso per ottenere la completa rimozione dell'azoto. Nei granuli di dimensioni millimetriche, i microambienti aerobici e anossici/anaerobici vengono mantenuti a causa della respirazione microbica nella regione esterna del granulo. La presenza di diverse condizioni redox in un singolo granulo consente il verificarsi di processi simultanei di nitrificazione e denitrificazione (SND) anche quando l'aerazione è attiva (Nancharaiah, Venkata Mohan, & Lens, 2016). I parametri che possono influire sul processo includono l'ossigeno disciolto, la dimensione dei granuli, la disponibilità di donatori di elettroni e l'attività microbica (Coma, Verawaty, Pijuan, Yuan, & Bond, 2012).

Tuttavia, il processo SND non è sufficiente quando la dimensione dei granuli è piccola. L'elevato DO favorisce la nitrificazione ma limita la denitrificazione e viceversa. Al fine di migliorare la rimozione dell'azoto, è stata introdotta una fase anossica immediatamente dopo la fase aerobica che porta allo sviluppo di una strategia di nitrificazione e denitrificazione alternata (AND) (Adav, Lai, & Lai, 2009).

La rimozione dell'ammonio risulta più efficiente nella strategia AND rispetto alla SND nei sistemi AGS (Lochmatter & Holliger, C., 2014). Tuttavia, l'implementazione della strategia AND è impegnativa a causa della non disponibilità di COD per la denitrificazione e anche del rilascio di fosforo nella fase anossica (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018).

3.6.2 Rimozione del fosforo

L'efficienza di rimozione del fosforo dalle acque reflue nei reattori AGS è stata dimostrata in molti studi (Barr, Cook, & Bond, 2010). È stato dimostrato che l'effetto della temperatura, del pH, del carico organico, del tipo di substrato delle acque reflue e della strategia di aerazione influenza la rimozione del fosforo. Un aumento della concentrazione salina è direttamente collegato alla graduale scomparsa di organismi accumulatori di fosfato (PAO) come l'*Accumulibacter* dell'AGS. L'elevata salinità ha un forte impatto sulle capacità di rimozione del fosforo, favorendo gli organismi accumulatori di glicogeno (GAO) rispetto ai PAO (Bassin, et al., 2011).

Il COD è un fattore limitante nelle acque reflue e sia i processi di rimozione di azoto che del fosforo ne richiedono la presenza. Questa limitazione può essere superata se i microrganismi in grado di denitrificare e rimuovere il fosforo vengono arricchiti e mantenuti. I microrganismi che utilizzano nitrati e/o nitriti come accettori di elettroni e rimuovono il fosforo sono chiamati PAO denitrificanti (DPAO). Inoltre, questi microrganismi hanno la capacità di immagazzinare carbonio organico sotto forma di poliidrossialcanoati (PHA) e di utilizzarli come fonte di elettroni per la denitrificazione. Per queste ragioni, un sistema di trattamento contenente DPAO è efficiente dal punto di vista energetico grazie al corretto utilizzo del COD e alla minore necessità di aerazione. Nei granuli aerobici è presente un *Accumulibacter* denitrificante non classificato, in grado di accoppiare l'assorbimento di fosforo con la riduzione dei nitrati (Gonzalez-Gil & Holliger, C., 2011).

3.7 Recupero delle risorse e gestione dei fanghi in eccesso

Le diverse opzioni disponibili per la gestione dei fanghi in eccesso includono:

- Disidratazione ed uso comune come letame;
- Digestione anaerobica negli impianti di biometanazione;
- Uso di granuli di fanghi in eccesso come adsorbenti economici;
- Produzione e recupero di prodotti a base biologica come il poliidrossibutirrato (PHB) e l'esopolimero simile all'alginato (ALE).

I primi due metodi sono quelli per la gestione dei fanghi in eccesso nel caso del trattamento delle acque reflue a base di fanghi attivi. Mentre, le ultime due opzioni sono promettenti per la gestione dei fanghi negli impianti di trattamento delle acque reflue basati su AGS (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018).

A causa della presenza di EPS e di elevate capacità di adsorbimento, l'AGS è stato esplorato per rimuovere vari contaminanti, tra cui il blu di metilene, lo stronzio e l'ammonio tramite processi di adsorbimento (Wang, et al., 2015).

Gli studi hanno dimostrato che l'AGS non solo è in grado di rimuovere contaminanti con elevate capacità di adsorbimento, ma anche che il fenomeno dell'adsorbimento si verifica in un ampio intervallo di pH e temperatura. L'altro vantaggio nell'utilizzo dell'AGS per l'adsorbimento è che se caricato con metalli o coloranti può essere facilmente separato dall'acqua grazie alle eccellenti capacità di sedimentazione. La ricerca in questa direzione esplora le opportunità per l'uso dei fanghi in eccesso prodotti durante il trattamento delle acque reflue come assorbenti economici per la rimozione di contaminanti (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018).

Il PHB è una plastica biodegradabile che può essere prodotta come granuli intracellulari nei microrganismi. Al fine di ridurre i costi di produzione, le acque reflue vengono utilizzate per sviluppare colture miste ricche di PHB. È stato dimostrato che il contenuto di PHB può essere aumentato fino al 40% in AGS senza compromettere le proprietà di sedimentabilità (Wang, Li, Yue, & Yu, 2014a).

Sono state eseguite ricerche sul recupero di biomateriali a base di polisaccaridi da AGS per l'applicazione come materiale di rivestimento superficiale. Il biomateriale recuperato conteneva sia polisaccaridi che lipidi. Si è scoperto che il biopolimero forma una pellicola resistente all'acqua su superfici idrofile come la carta (Lin, de Kreuk, Loosdrecht, M.C.M., & Adin, 2010).

L'ALE è un importante polimero strutturale e rappresenta circa il 15-25% della frazione organica nell'AGS (S, S, OA, MCM, & YM, 2016). In questo range, è considerato un prezioso prodotto a base biologica che può essere estratto dai rifiuti AGS e può essere una materia prima per applicazioni in settori come l'industria chimica, cartaria e tessile. Il polimero può essere anche utilizzato come potenziatore del suolo per migliorare la ritenzione idrica in ambienti semi-aridi. L'altro vantaggio associato all'estrazione del polimero è che riduce significativamente il volume dei biosolidi. Pertanto, il recupero di un polimero simile all'alginato dall'AGS in eccesso offre strade alternative per la gestione dei fanghi in eccesso (Nancharaiaha & G. Kiran Kumar Reddy, 2018).

3.8 AGS e fanghi attivi

Nelle vasche di trattamento a fanghi attivi, la comunità microbica cresce tipicamente sotto forma di "fiocchi" sospesi nelle acque reflue da trattare; tali sistemi sono costituiti da due serbatoi fisicamente separati: una vasca di aerazione in cui avvengono reazioni biologiche (rimozione del carbonio organico e nitrificazione) e una vasca di decantazione in cui i fanghi vengono separati dall'acqua trattata mediante flocculazione. La rimozione dei nutrienti si ottiene mediante sistemi biologici avanzati. Le vasche di decantazione sono indispensabili dato che la biomassa si presenta sotto forma di fanghi flocculanti. Di conseguenza, i sistemi convenzionali presentano alcuni inconvenienti come le basse concentrazioni di biomassa nel serbatoio di aerazione, la necessità di serbatoi di aerazione e decantazione separati, l'elevato fabbisogno di superficie e l'elevata energia per i flussi di aerazione e ricircolo. La scarsa

capacità di sedimentazione dei fanghi attivi può portare a deterioramento della qualità dell'effluente a causa dell'eccessiva perdita di fanghi nell'effluente e ad età incontrollata dei fanghi con perdita dell'efficienza di trattamento. La nuova tecnologia, che si basa sulla crescita di biomassa compatta e densa sotto forma di granuli, supera questi limiti e offre opzioni di trattamento più sostenibili (Yarlagadda V. Nancharaiah, 2019).

Il processo a fanghi attivi è utilizzato in tutto il mondo per il trattamento biologico delle acque reflue urbane e industriali. Tuttavia, non è più considerato sostenibile in termini di impronta del suolo, flussi di ricircolo e complessi progetti di processo che richiedono più unità per rimuovere carbonio, azoto e fosforo dalle acque reflue (AR, EEL, & P, 2014).

Per affrontare i problemi di rimozione dei nutrienti e di separazione solido-liquido del processo a fanghi attivi convenzionale, sono stati sviluppati i fanghi aerobici granulari (E, T, MCM, JJ, & PA, 1997). La tecnologia AGS, infatti, sta affrontando le principali carenze del processo a fanghi attivi, in particolare l'elevata impronta sul suolo, l'elevato dispendio di energia per il ricircolo della biomassa e delle acque reflue e i problemi di separazione biomassa-acqua.

Inoltre, l'AGS presenta ulteriori vantaggi come una maggiore ritenzione della biomassa, una migliore sedimentabilità dei fanghi e un'efficace rimozione simultanea di carbonio organico e nutrienti (Fangrui Cai, 2021).

Si prevede che l'AGS supererà il processo a fanghi attivi convenzionale e fornirà un trattamento delle acque reflue più sostenibile nell'arco di circa un secolo (MCM & Brdjanovic D, 2014).

Le considerazioni chiave che guidano l'implementazione della tecnologia AGS sono la significativa riduzione dei requisiti di spazio (fino al 75%) e dei costi di capitale e operativi (fino al 50%) rispetto al processo a fanghi attivi e ad altre biotecnologie. Con questi vantaggi economici insieme a migliori prestazioni di trattamento, il processo AGS potrebbe presto diventare lo standard per il trattamento biologico sostenibile delle acque reflue (S, M, BM, & D, 2018).

Le stime iniziali hanno mostrato che gli impianti AGS richiedono solo un quarto dell'impronta terrestre (una riduzione del 75%) richiesta dagli impianti a fanghi attivi convenzionali (M., et al., 2015). Tale riduzione è dovuta principalmente all'assenza di necessità di chiarificatori secondari ed alla riduzione delle unità di processo. È stato riportato che l'impronta di un impianto AGS è paragonabile a quella di un'unità di bioreattore a membrana (MBR) (S, M, BM, & D, 2018). Tuttavia, l'MBR non è ampiamente applicato a causa dei maggiori costi di capitale, della domanda di energia e dell'incrostazione/deterioramento della membrana (W., et al., 2014).

L'assenza di chiarificatori secondari, l'assenza di attrezzature meccaniche minime e di impianti di ricircolo contribuiscono a ridurre le spese in conto capitale e le spese operative degli impianti di depurazione basati su AGS (Yarlagadda V. Nancharaiah, 2019).

Oltre alle differenze di progetto l'AGS si discosta dai convenzionali trattamenti biologici per le caratteristiche microbiche. La struttura microbica compatta dei fanghi aerobici granulari consente di stabilire nuovi percorsi di nitrificazione-denitrificazione; nell'AGS si riduce l'apporto di O₂ ed il

carbonio organico, rispettivamente, del 25 e del 40% rispetto alla classica nitrificazione-denitrificazione. Inoltre, si ottiene una denitrificazione più rapida (da 1,5 a 2 volte) e una minore produzione di fanghi (Winkler M. K., 2012).

L'alternanza di condizioni anaerobiche/anossiche e ossiche, basso ossigeno disciolto (DO), temperatura mesofila (>25 °C) e aerazione intermittente favoriscono l'arricchimento di AOB per stabilire una via di nitrificazione-denitrificazione a taglio corto (M-KH & Straka L, 2019). La via di ossidazione anerobica dell'ammonio (processo anammox) riduce ulteriormente l'apporto di ossigeno e rende il processo indipendente dal fabbisogno di donatori di elettroni. Nel processo anammox, l'ammoniaca viene direttamente ossidata a diazoto utilizzando il nitrito come accettore di elettroni. La fornitura di nitriti nei batteri anammox è soddisfatta dall'AOB attraverso la nitrificazione. Circa la metà dell'ammoniaca viene ossidata a nitrito dall'AOB e la restante metà viene ossidata dai batteri anammox utilizzando il nitrito. I principali vantaggi di questa via di nitrificazione sono:

- Circa il 60% in meno di aerazione;
- Nessun fabbisogno di carbonio organico;
- Circa il 75% in meno di produzione di fanghi;
- Minori emissioni di CO₂ e di N₂O.

(Yuan Q, et al., 2019)

Nei reattori AGS, la rimozione biologica del fosforo è ottenuta mediante PAO o PAO denitrificanti (dPAO). Analogamente al metabolismo dei PAO, i dPAO accumulano una fonte di carbonio sotto forma di polioidossialcanoati immagazzinati in condizioni anaerobiche. Tuttavia, i dPAO utilizzano il nitrito come accettore di elettroni per l'assorbimento di fosforo in condizioni aerobiche. In questo modo, i dPAO possono ridurre significativamente l'apporto di ossigeno e la produzione di fanghi rispetto alla rimozione biologica del fosforo potenziato dai PAO (X, et al., 2015).

La Tabella 3-3 mette a confronto AGS, granuli aerobici e fanghi attivi convenzionali:

PARAMETRI	AGS	GRANULI AEROBICI	FANGHI ATTIVI
Velocità di sedimentazione	10-90 m/h	<20 m/h	2-10 m/h
Dimensioni	0,2-5 mm	0,2-2,0 mm	<0,2 mm
Compattezza e densità	Alta	Alta	Bassa
Forma	Regolare	Regolare	Irregolare
	Sferica	Sferica	Filamentosa
Layers	Aerobico	Facoltativo	Aerobico
	Anossico	Anaerobico	
	Anaerobico		
Tollerabilità	Alta	Bassa	Bassa
Produzione di EPS	Alta	Media	Bassa

Tabella 3-3: Confronto tra AGS, granuli anaerobici e fanghi attivi (Bengtsson S, 2018)

4. Materiali e metodi

4.1 Preparazione e funzionamento del reattore

L'apparato sperimentale si presenta come un reattore batch sequenziale aerobico-anaerobico (SBR) del volume di lavoro pari a 2 L. Il sistema è corredato di un agitatore ad elica, per l'agitazione meccanica durante le fasi non aerata ed aerata, e di un diffusore a bolle fini connesso ad un compressore d'aria per l'aerazione durante la fase aerata. Parametri quali, il pH, il potenziale redox e la concentrazione di ossigeno disciolto sono monitorati in continuo durante tutte le fasi del ciclo.

Nel reattore sono messe in atto 6 ore di ciclo con un tempo di ritenzione idraulica (HRT) di 12 ore ed in assenza di un tempo di ritenzione dei solidi imposto (SRT). Il rapporto di scambio volumetrico è del 50% (in ogni ciclo, 1 litro di acque reflue trattate viene sostituito con acqua reflua fresca). Le pompe, l'agitatore ad elica ed il compressore a corredo lavorano in maniera automatica e sono gestiti con l'impiego di timer elettronici.

L'alimentazione delle acque reflue sintetiche avviene dall'alto del reattore e permette di ottenere un rapporto C:N:P di 100:7:1 $\mu\text{g}/\text{L}$. L'alimentazione consiste in una soluzione di diclofenac ed una fonte di carbonio (acetato) (Feed C) ed in una soluzione di fonte di azoto e fosforo (Feed N/P). La concentrazione di diclofenac nelle acque reflue sintetiche era di 40 $\mu\text{g}/\text{L}$ tra i giorni 110 e 165, 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ tra i giorni 166 e 221 e 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ tra i giorni 222 e 236 (ultimo giorno di monitoraggio).

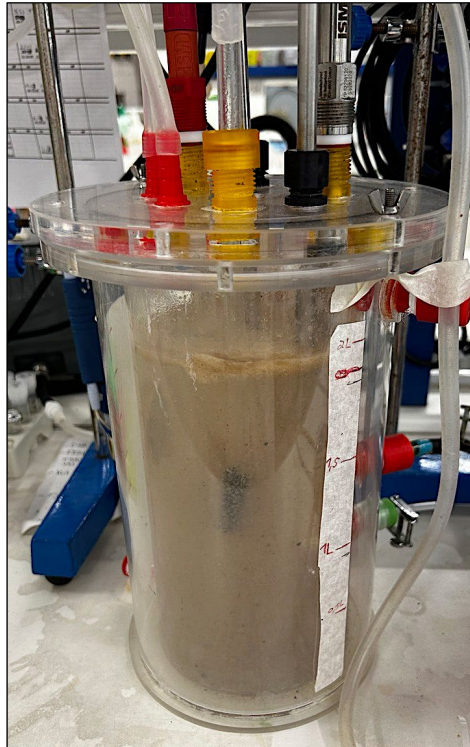


Figura 1: Reattore AGS



Figura 2: Sistema di alimentazione del reattore (a destra Feed C, a sinistra Feed N/P)

Il ciclo è articolato come di seguito:

- 4 minuti di alimentazione (0,5 L di Feed C, 0,5 L di Feed N/P);
- 2 ore di fase non aerata e agitazione meccanica;
- 3 ore di fase aerata;
- 3 minuti di sedimentazione dal giorno 110 al giorno 201, 5 minuti dal giorno 202 al giorno 236;
- 10 minuti di scarico;
- 36 minuti di IDLE (inattività).

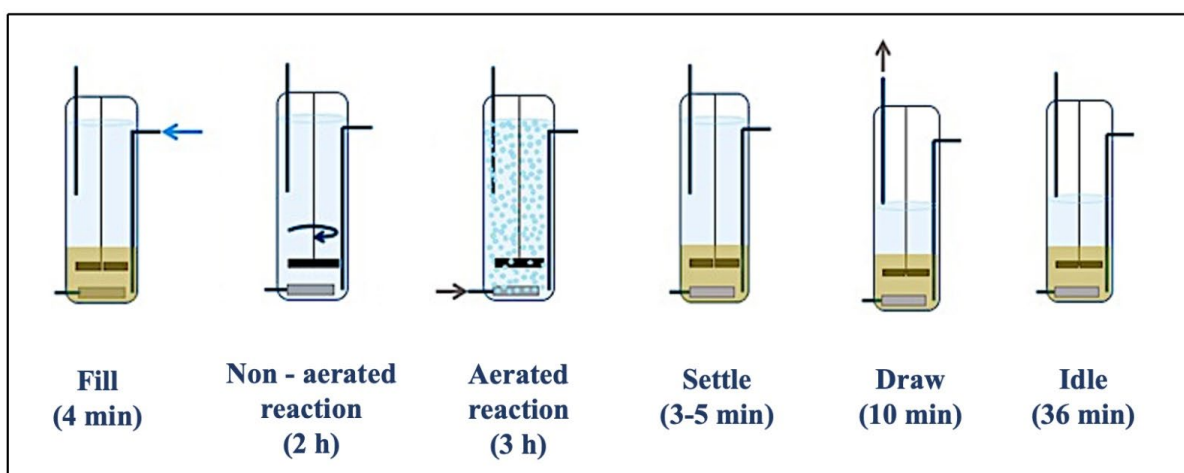


Figura 3: Fasi del ciclo di trattamento

La composizione della soluzione di acque reflue sintetiche è la seguente ().

	GIORNI 110-172 [g]	GIORNI 172-236 [g]
CH₃COONa	0,51282	1,02564
NH₄Cl	0,03978	0,07956
KH₂PO₄	0,006586	0,013172
MgSO₄·7H₂O	0,045	0,225
CaCl₂·H₂O	0,0729	0,3645

Tabella 4-1: Sostanze alimentate nel reattore

CH₃COONa, NH₄Cl e KH₂PO₄ sono fondamentali in quanto fonti di carbonio, ammonio e fosfato.

Nel feed sono inclusi anche i microelementi o elementi traccia (trace elements):

SOLUZIONE ELEMENTI TRACCIA
FeCl₃ ·6H₂O
H₃BO₄
CuSO₄ ·5H₂O
KI
MnCl₂ ·4H₂O
Na₂MoO₄ 2H₂O
ZnSO₄ · 7H₂O
CoCl₂ ·6H₂O

Tabella 4-2: Soluzione elementi traccia in alimentazione

4.2 Monitoraggio delle prestazioni dell'SBR

Il reattore (SBR) è stato avviato mediante l'introduzione di fanghi aerobici granulari provenienti da un impianto di trattamento delle acque reflue municipali situato a Lisbona. Il reattore ha iniziato a funzionare 109 giorni prima dell'inizio delle mie attività di monitoraggio.

Con l'obiettivo di analizzare i progressi nel trattamento delle acque reflue sintetiche alimentate al reattore, per tutta la durata del ciclo, sono prelevati, settimanalmente, 40 mL circa di campione in differenti istanti di tempo durante il funzionamento. Il primo campione viene prelevato al termine della fase di riempimento del reattore, il secondo al termine della fase non aerata e l'ultimo al termine della fase aerata; contestualmente, vengono prelevati campioni ogni 30 minuti per tutta la durata del ciclo.

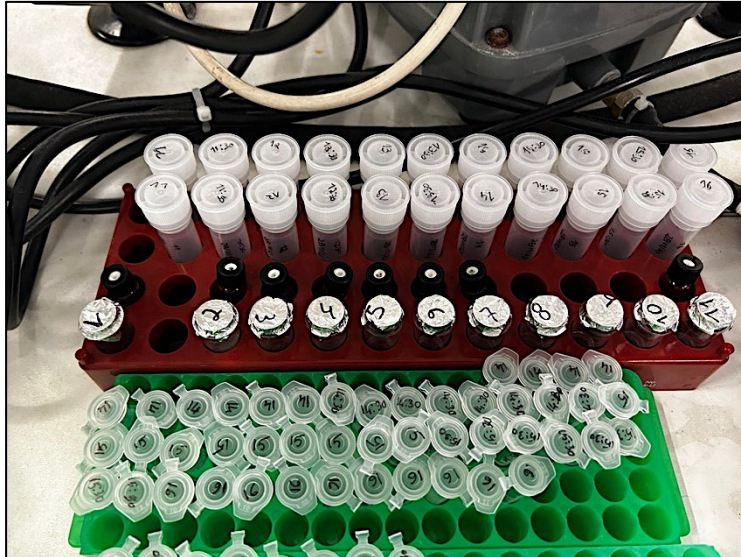


Figura 4: Campionamento

Per separare il surnatante dalla biomassa, le provette vengono centrifugate a 11000 rpm per 3 minuti per poi prelevare la fase liquida mediante ago e siringa. Il surnatante viene filtrato attraverso l'uso di filtri a membrana di nylon (con diametro dei pori di 0,2 μm), rimuovendo qualsiasi residuo di biomassa, e stoccato a basse temperature.



Figura 5: Filtri a membrana di nylon

I solidi sospesi totali (TSS) ed i solidi sospesi volatili (VSS) sono quantificati usando i metodi standard definiti dall'*American Public Health Association* (APHA), *American Water Works Association* (AWWA) e *Water Environment Federation* (WEF) in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

I TSS sono determinati filtrando 2 mL per ogni campione, usando filtri in microfibra di vetro preventivamente pesati (*Whatman, GF/C, ø 47 mm*) inseriti in un sistema di filtrazione a vuoto. I filtri, comprensivi di campione, vengono asciugati in una bilancia termica a 105 °C e successivamente pesati su una bilancia analitica.



Figura 6: Bilancia termica

Il valore dei TSS viene determinato usando la seguente relazione:

$$TSS = \frac{\text{Filter with sample (g)} - \text{Empty filter (g)}}{\text{Sample Volume (L)}}$$

Il valore dei TSS viene determinato sottoponendo i filtri usati per la determinazione dei TSS a 2 ore in muffola a 550 °C ed in seguito misurandone il peso con una bilancia analitica. Il valore dei VSS viene determinato usando la seguente relazione:

$$VSS = \frac{\text{Filter with sample (g)} - \text{Filter with ashes (g)}}{\text{Sample Volume (L)}}$$

La concentrazione di acetato (fonte di carbonio) è determinata tramite l'analisi di cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) in un cromatografo *VWR Hitachi Chromaster*.

Fosfato e ammoniaca sono determinati usando un analizzatore a flusso continuo segmentato (*Skalar SNA++*).

La concentrazione di diclofenac nel reattore viene ottenuta tramite analisi *LC-MS/MS*.

L'indice di volume dei solidi (SVI) è generalmente calcolato come il volume in millilitri occupato da 1 grammo di fanghi attivi in seguito a 30 minuti di sedimentazione (SVI_{30}). Nella fattispecie, l'SVI è calcolato, in aggiunta, anche dopo 5 minuti di sedimentazione (SVI_5).

L'SVI è determinato prelevando 1 L del contenuto del reattore (fase liquida e granuli) durante la fase aerata con lo scopo di ottenere una miscela quanto più omogenea e rappresentativa possibile. Il campione con queste caratteristiche viene versato in un cilindro graduato (mostrato in Figura 7) e lasciato in quiete per 30 minuti. Tramite la gradazione sul cilindro si registra il volume occupato dai solidi sedimentati dopo 5 e 30 minuti. Considerando il valore di volume occupato, ottenuto come descritto, ed il valore dei TSS, l'SVI viene determinato usando la seguente relazione:

$$SVI (ml/g) = \frac{\text{Settled Sludge Volume (mL)}/\text{Sample Volume (L)}}{TSS (g/L)}$$

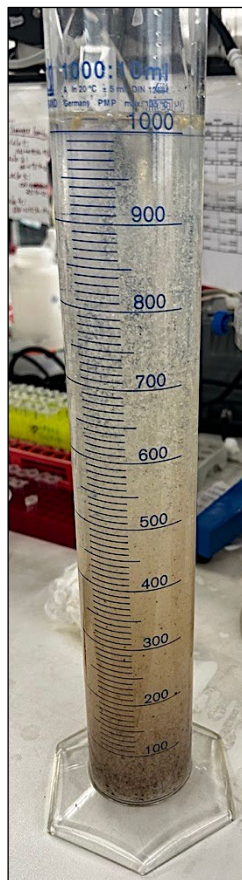


Figura 7: Cilindro graduato da 1 L

4.3 Caratterizzazione degli EPS

Si descrive di seguito la procedura che guida la caratterizzazione degli EPS.

Raccolta dei campioni:

1. Prelievo di fase liquida e biomassa dal reattore;
2. Centrifugazione dei campioni raccolti a 4000 rpm a 4°C per 20 minuti;
3. Separazione delle fasi liquida e solida;
4. Misura dei solidi totali e volatili della biomassa ottenuta.

Estrazione degli EPS strutturali dai fanghi aerobici granulari:

1. 1 g di biomassa viene lavato e centrifugato con 17 mL di acqua distillata;
2. Viene aggiunto carbonato di sodio (Na_2CO_3) alla miscela di granuli e acqua distillata per ottenere una concentrazione finale dello 0,5% in peso;
3. Si mescola la miscela per 35 minuti ad 80 °C in un water bath;
4. La miscela viene centrifugata a 4000 rpm a 4 °C per 20 minuti;
5. Si conserva il surnatante e si scarta il pellet;
6. Il pH del surnatante viene regolato a circa 2,2 con 1 M di acido cloridrico (HCl);
7. Si centrifuga la miscela acidificata a 4000 rpm a 4 °C per 20 minuti;
8. Si raccoglie il pellet risultante e contenente gli EPS strutturali;
9. Si misurano TS e VS.

Le frazioni organica e non organica degli EPS strutturali vengono determinate essiccando il campione a 105 °C e bruciandolo a 550 °C. Il valore ottenuto viene usato per il calcolo della percentuale in peso dei composti misurati con analisi colorimetriche.

Analisi colorimetrica

Si sciolgono gli EPS in soluzioni 0,02 M di idrossido di sodio (NaOH) e si analizzano a concentrazioni di x mg/L.

- **Proteine**

I reagenti impiegati sono:

1. NaOH ed Na_2CO_3 ;
2. CuSO_4 ;
3. Tartrato di sodio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6$);
4. Reagente ottenuto usando il primo ed il terzo reagente in rapporto 100:1:1;
5. Fenolo diluito in rapporto 5:6 con acqua distillata.

0,5 mL di campione vengono miscelati con 0,7 mL del reagente 4. Si aggiunge il reagente 5 e si miscela la soluzione. Dopo 45 minuti a temperatura ambiente sarà letta un'assorbanza di 750 nm.

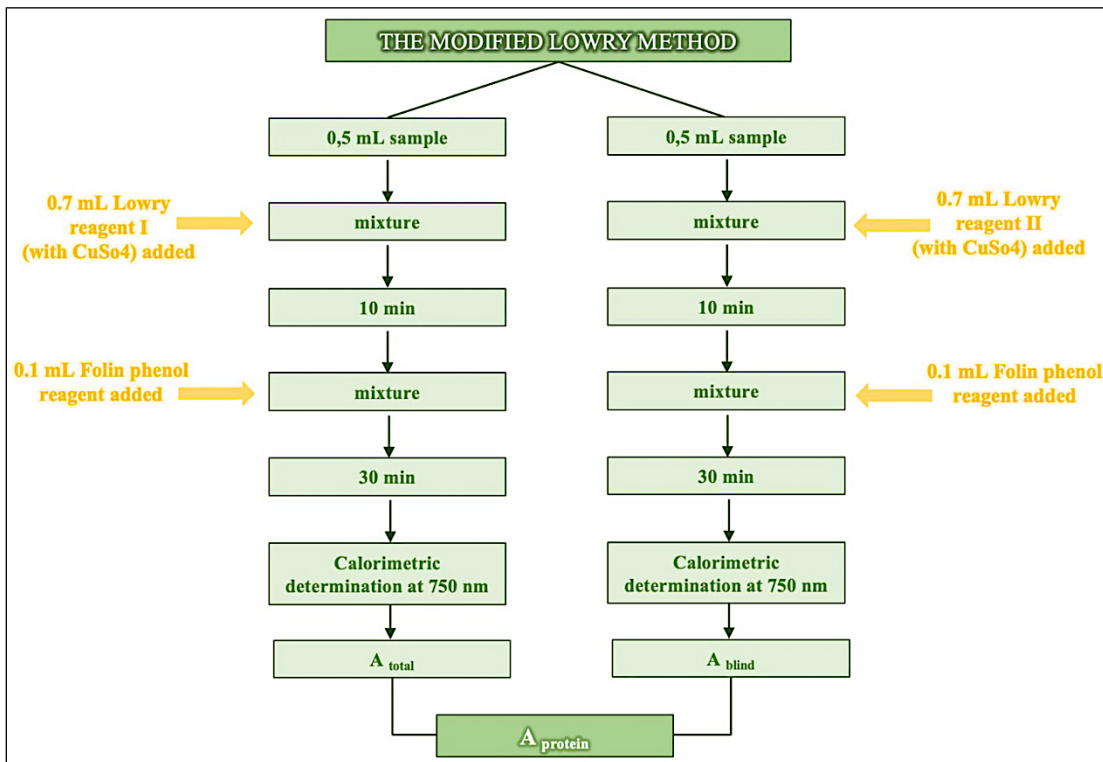


Figura 8: Caratterizzazione delle proteine

Il metodo si basa su due misure spettrofotometriche. Il primo valore di assorbanza misurato è individuato su una soluzione trattata con CuSO₄.

• Saccaridi

I saccaridi sono determinati usando il metodo dell'acido fenolo solforico (Dubois, 1956).

La lunghezza d'onda corrispondente è 487 nm (glucosio). Nella pubblicazione originale il glucosio era misurato a 490 nm. Negli esperimenti il glucosio risultava avere un'assorbanza leggermente inferiore a 487 nm piuttosto che a 490 nm.

Vengono preparate delle soluzioni standard in un range da 5 a 100 mg/L.

I reagenti utilizzati sono:

- Soluzioni standard di glucosio;
- Fenolo, 80% in H₂O (80% fenolo, 20 % miscela, preparato aggiungendo 20 grammi di acqua distillata a 80 grammi di fenolo);
- Acido solforico (H₂SO₄).

2 mL di una soluzione contenente glucosio vengono raccolti in un tubo colorimetrico, vengono aggiunti 0,05 mL di soluzione contenente 80% fenolo e 5 mL di acido solforico. Il campione così realizzato viene lasciato riposare per 10 minuti, miscelato e posto per un intervallo di 10-20 minuti in un water bath a 25-30 °C. Tramite uno spettrofotometro si legge l'assorbanza dei campioni.

4.4 Caratterizzazione microscopica della biomassa

I granuli intracellulari di PHA sono stati identificati utilizzando la colorazione con Nile Blue e osservati con un microscopio ad epifluorescenza (Axio Imager D2, Carl Zeiss) a 100x. La colorazione con Nile Blue è stata eseguita sulla biomassa umida secondo Bengtsson et al. (2008). È stato utilizzato un filtro fluorescente Cy3 per una migliore visualizzazione dei granuli intracellulari di PHA e del contenuto lipidico.

La colorazione con blu di metilene è stata utilizzata per i granuli di polifosfato. (Bengtsson, Werker, & Welander, T, 2008)

4.5 FISH analysis - Dinamiche della comunità microbica

I campioni vengono raccolti settimanalmente, fissati con paraformaldeide e conservati a -20°C per l'analisi FISH utilizzando sonde oligonucleotidiche previste per coprire la comunità principale di solito rilevata nei granuli di fango attivo.

5 Risultati

L'obiettivo della sperimentazione è quello di valutare l'efficacia della tecnologia AGS nel trattamento delle acque reflue contaminate da diclofenac. Nel corso della gestione del reattore, è stato raccolto e analizzato un insieme completo di dati, quali la caratterizzazione del reattore, la rimozione di diclofenac, dell'acetato e dei nutrienti chiave, nonché la valutazione degli Extracellular Polymeric Substances (EPS) e dei loro componenti fondamentali (proteine e polisaccaridi). Sarà fornita una analisi dettagliata dei risultati, evidenziando le tendenze significative e le relazioni tra le variabili.

5.1 Proprietà della biomassa

La presenza del farmaco all'interno del reattore ha avuto degli effetti sui parametri fondamentali della biomassa. I parametri considerati, ovvero SVI, TSS, VSS e granulometria, rivestono un ruolo cruciale nella valutazione della salute e della stabilità dei granuli. Il diclofenac, infatti, esercita potenzialmente effetti significativi sulla composizione e sul comportamento dei fanghi. I risultati raccolti sono riportati in figura 9:

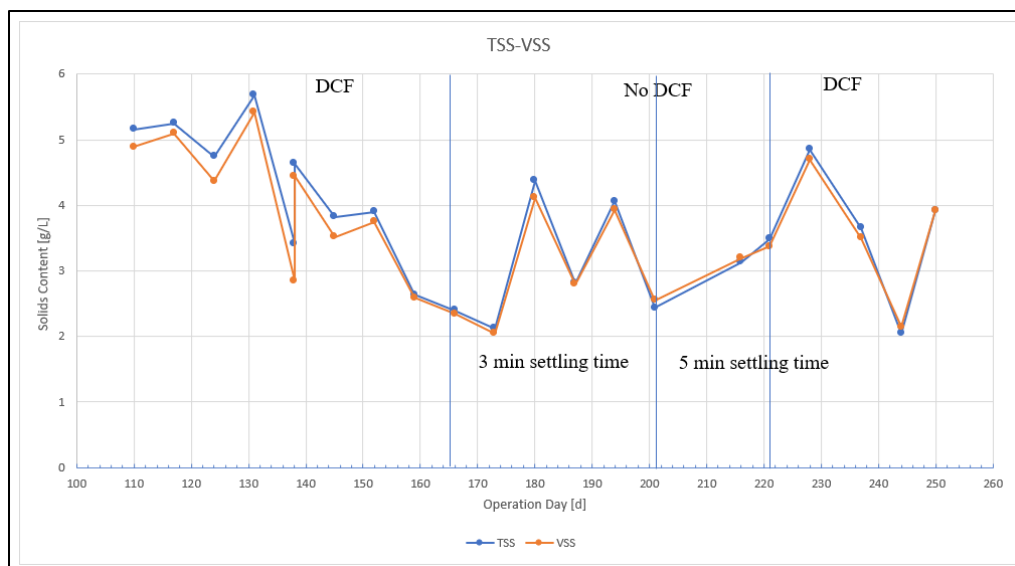


Figura 9 – Andamento dei TSS e VSS in funzione dei giorni di operazione

Durante il periodo di somministrazione regolare del diclofenac nel reattore, si è osservata una diminuzione dei solidi sospesi totali e volatili. Tuttavia, con l'interruzione dell'alimentazione di diclofenac, si è verificato un leggero aumento della concentrazione di solidi sospesi, con una tendenza a ritornare ai livelli precedenti. Inoltre, la reintroduzione del diclofenac ha causato un significativo calo sia dei TSS che dei VSS.

Di seguito è rappresentato l'andamento di SVI5 ed SVI30, registrati rispettivamente dopo 5 e 30 minuti di sedimentazione. Il grafico in figura 10 fornisce un'istantanea dell'evoluzione dei due parametri nel tempo:

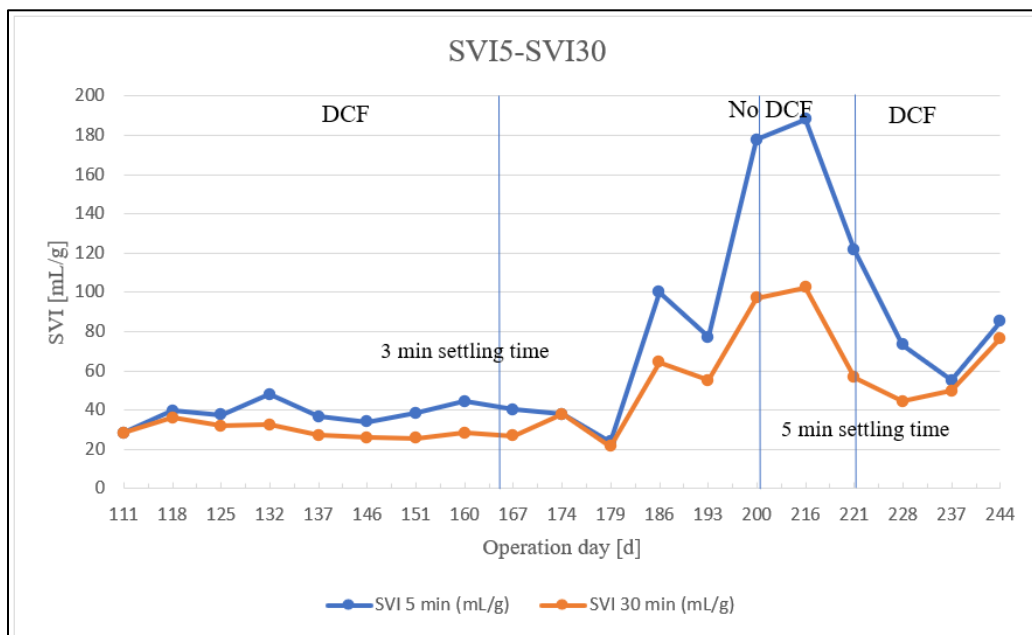


Figura 10 – Andamento dei valori di SVI5 ed SVI30 in funzione dei giorni di operazione

In presenza di diclofenac, si è notata una significativa coerenza tra i valori di SVI a 5 e 30 minuti. Tuttavia, si è osservato un improvviso aumento di tali valori quando l'alimentazione di diclofenac è stata interrotta ed un rapido cambiamento quando il tempo di sedimentazione nel ciclo è stato esteso da

3 a 5 minuti. Nel periodo successivo a quello in assenza di diclofenac, i valori di SVI hanno mostrato una tendenza a ritornare alle condizioni operative precedenti.

Successivamente, la figura 11 presenta l'andamento della granulometria; fornisce una panoramica della distribuzione dimensionale delle particelle presenti nel reattore. Il grafico offre una visualizzazione delle dimensioni delle particelle e la loro tendenza nel tempo:

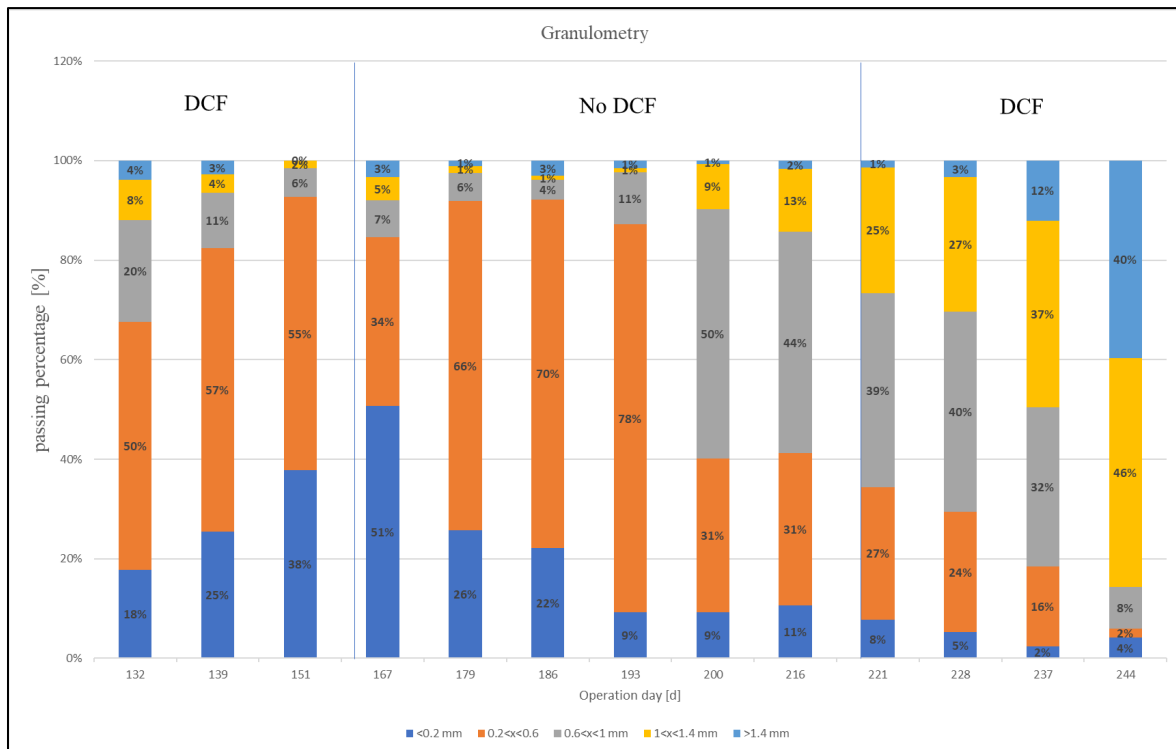


Figura 11 – Andamento della composizione granulometrica in funzione dei giorni di operazione

La granulometria, nella fase iniziale del monitoraggio, mostra una percentuale maggiore di granuli corrispondenti al setaccio di diametro compreso tra 0,2 e 0,6 mm. La granulometria subisce un cambiamento in seguito all'esaurirsi del diclofenac nel reattore. Si vede, infatti, che in assenza di diclofenac si è verificato un decremento della percentuale relativa al diametro compreso tra 0,2 e 0,6 mm a favore di quello relativo al diametro compreso tra 0,66 e 1 mm.

In figura 12, la presentazione dei grafici relativi al contenuto percentuale di EPS sulla biomassa, con le concentrazioni di proteine e di polisaccaridi al loro interno e l'andamento del rapporto proteine/polisaccaridi (PN/PS) nel corso del monitoraggio:

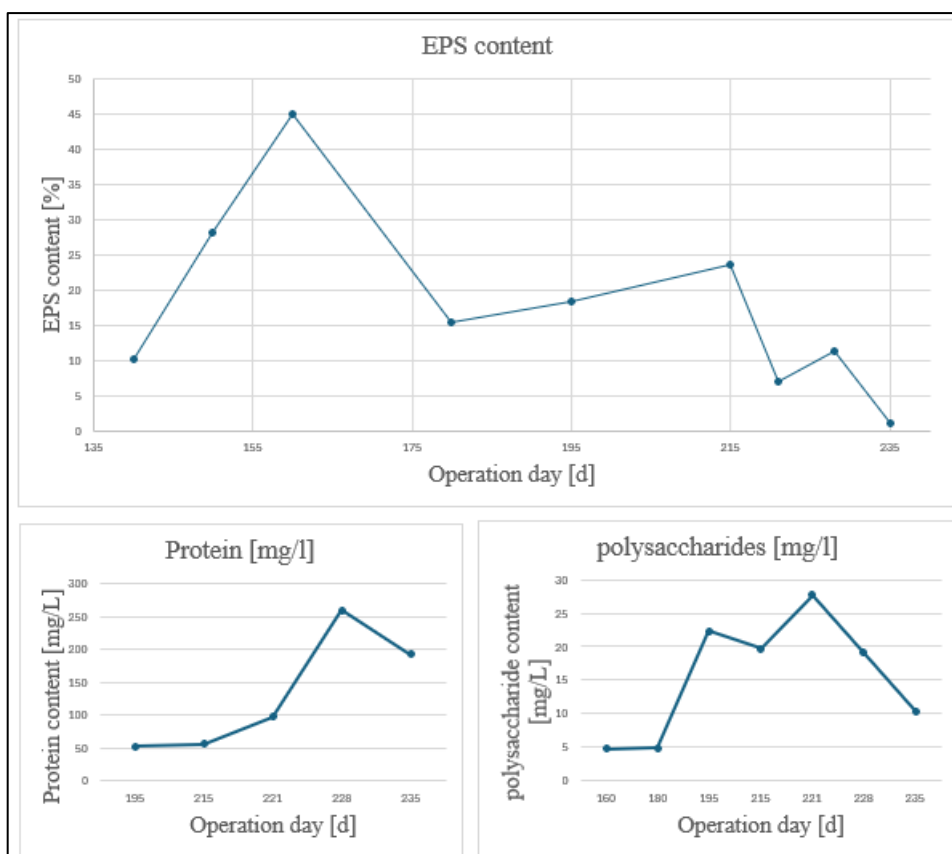


Figura 12 – Contenuto percentuale di EPS su biomassa e concentrazioni di Proteine e Polisaccaridi in funzione dei giorni di operazione

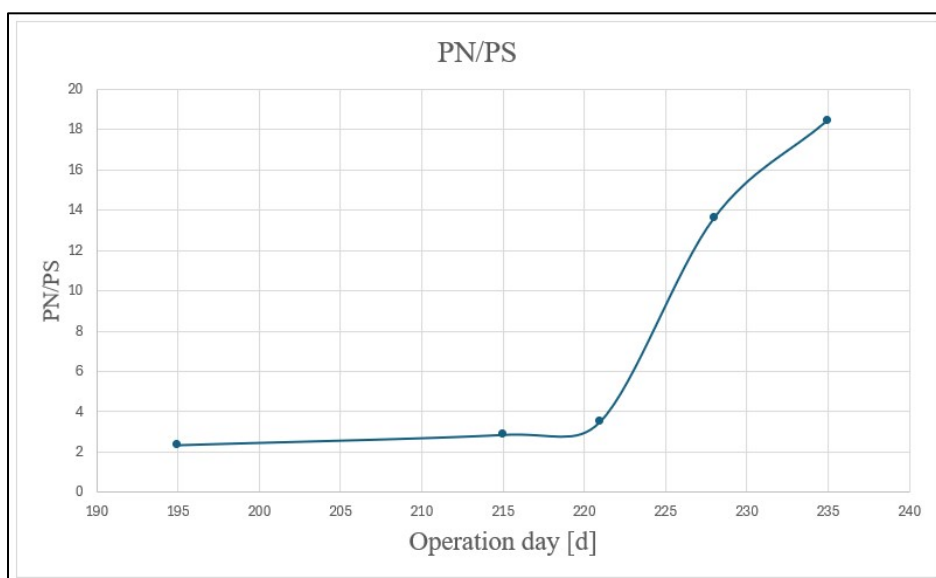


Figura 13 – Andamento nel tempo del rapporto proteine/polisaccaridi

Come si evince dai grafici mostrati, si è avuta una graduale riduzione della percentuale di EPS sulla biomassa contestualmente ad un aumento del contenuto di proteine e polisaccaridi al loro interno e del rapporto PN/PS.

L'analisi al microscopio è stata condotta in tre modalità, in base allo scopo dell'analisi:

- Attraverso la colorazione con Nile Blue per la rivelazione di polioidrossialcanoati (PHA);

- Attraverso il blu metilene per la valutazione dei granuli di polifosfati;
- In assenza di colorazione per verificare la presenza di batteri filamentosi.

L'analisi FISH, inoltre, ha permesso di osservare batteri quali PAO e GAO.

Le figure 14, 15, 16, 17 e 18 riportano quanto ottenuto:

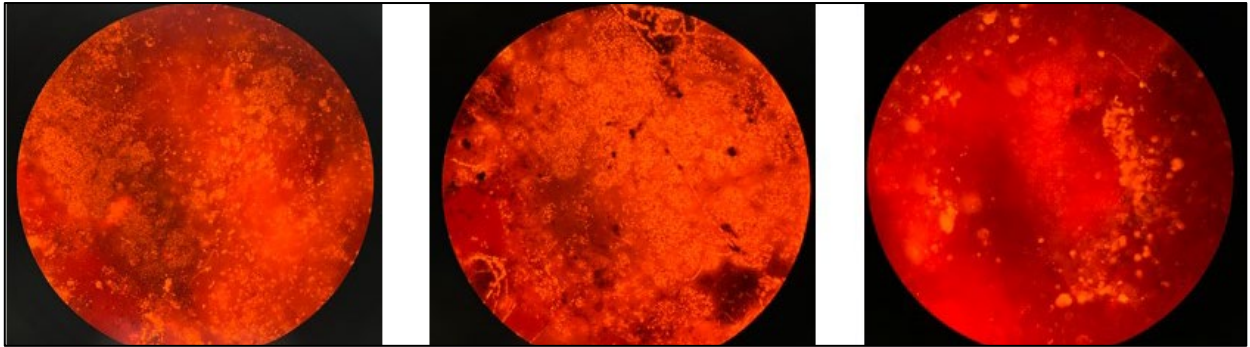


Figura 14 - Analisi al microscopio con colorazione Nile Blue (PHA al termine delle tre fasi del ciclo)

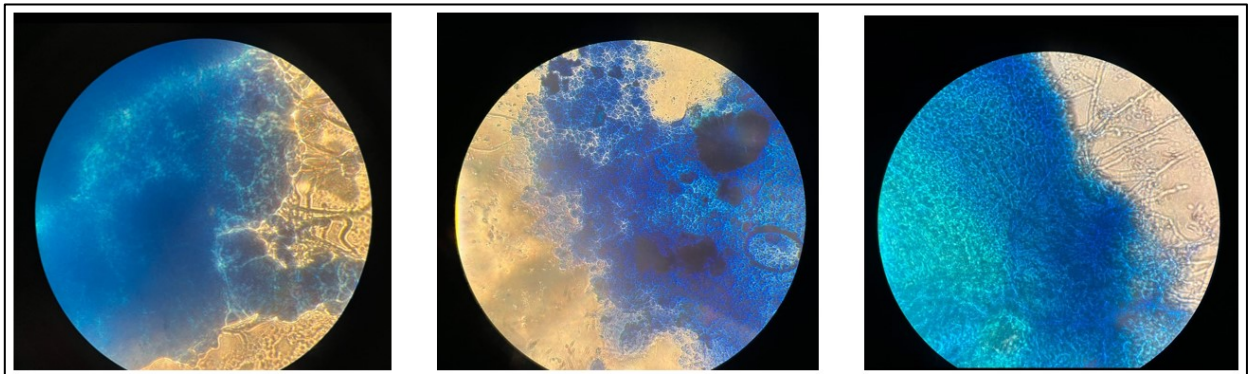


Figura 15 – Analisi al microscopio con colorazione blu metilene (polifosfati al termine delle tre fasi del ciclo)

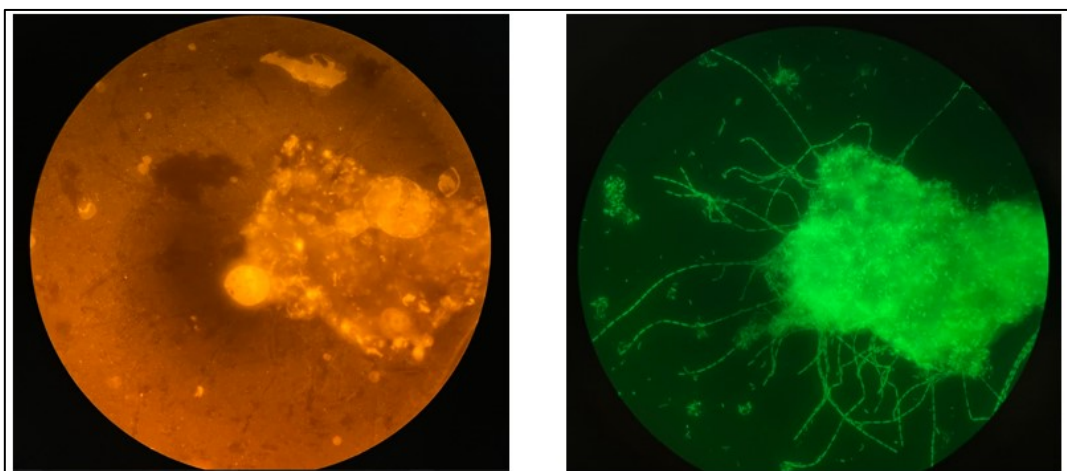


Figura 16 – Analisi FISH (PAO)

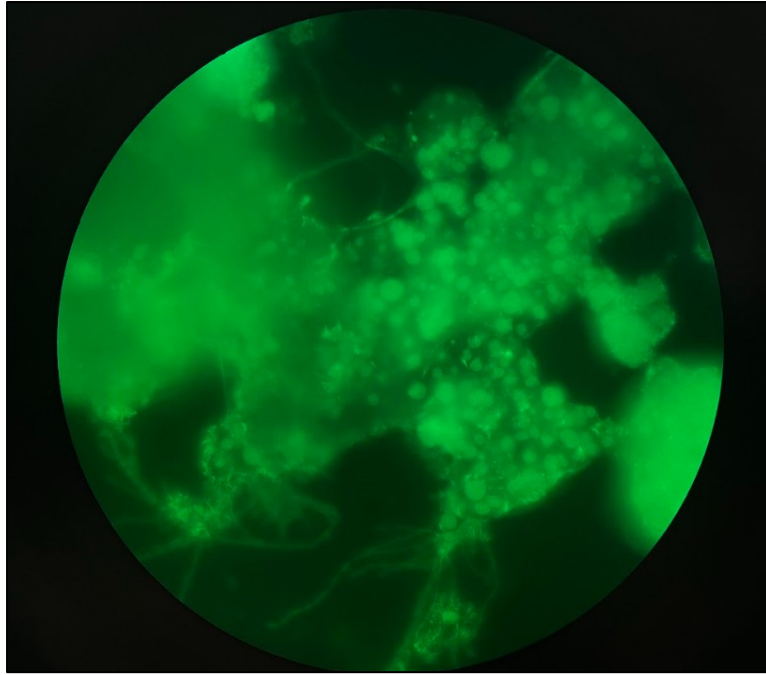


Figura 17 – Analisi FISH (GAO)

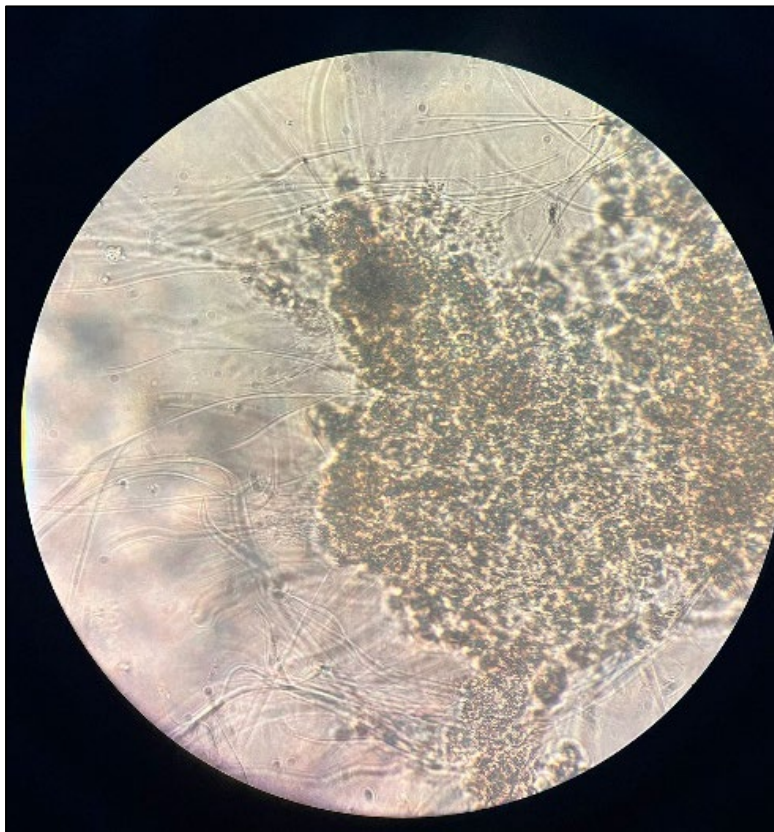


Figura 18 – Analisi in assenza di colorazione (batteri filamentosi)

5.2 Performance di trattamento acque

L'obiettivo della sperimentazione è quello di valutare l'efficacia della tecnologia AGS nel trattamento delle acque reflue contaminate da diclofenac. Nel corso della gestione del reattore, è stato raccolto e

analizzato un insieme completo di dati, quali la rimozione di diclofenac, dell'acetato e dei nutrienti chiave (azoto e fosforo). I risultati, elaborati e graficati, sono riportati nelle figure 19:

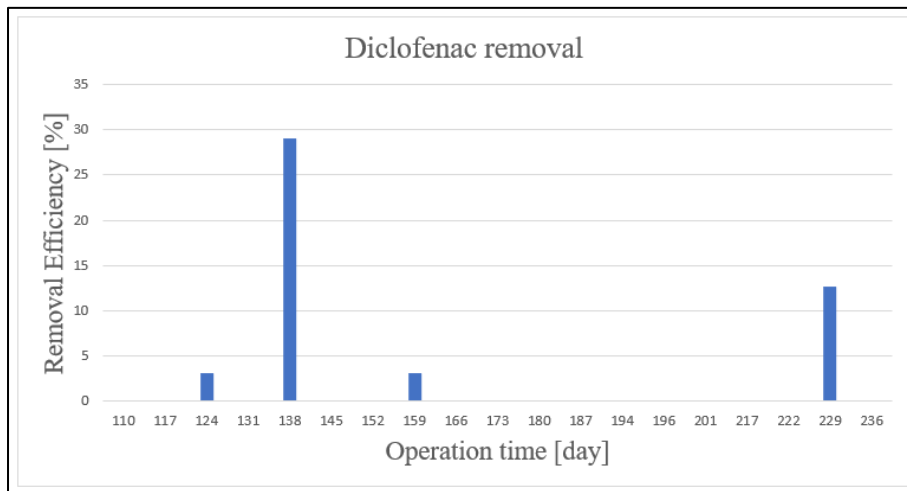


Figura 19 – Efficienza di rimozione del diclofenac nei giorni di operazione

Il reattore AGS non è stato in grado di ridurre significativamente la concentrazione di diclofenac; l'efficienza di rimozione non ha mai superato il 30%.

Di seguito i grafici che riportano le concentrazioni di acetato, azoto e fosforo nel reattore, in particolare il loro valore nei momenti più caratteristici del ciclo: inizio della reazione, fine della fase non aerata e fine della fase aerata:

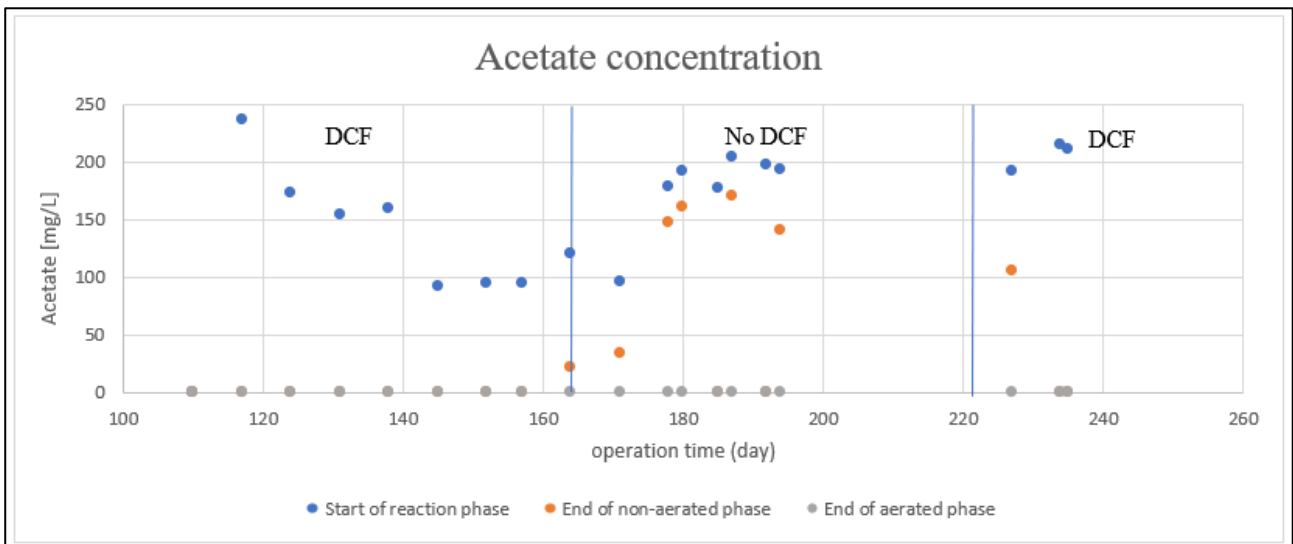


Figura 20 – Andamento della concentrazione di acetato in funzione dei giorni di operazione al termine di ogni fase del ciclo

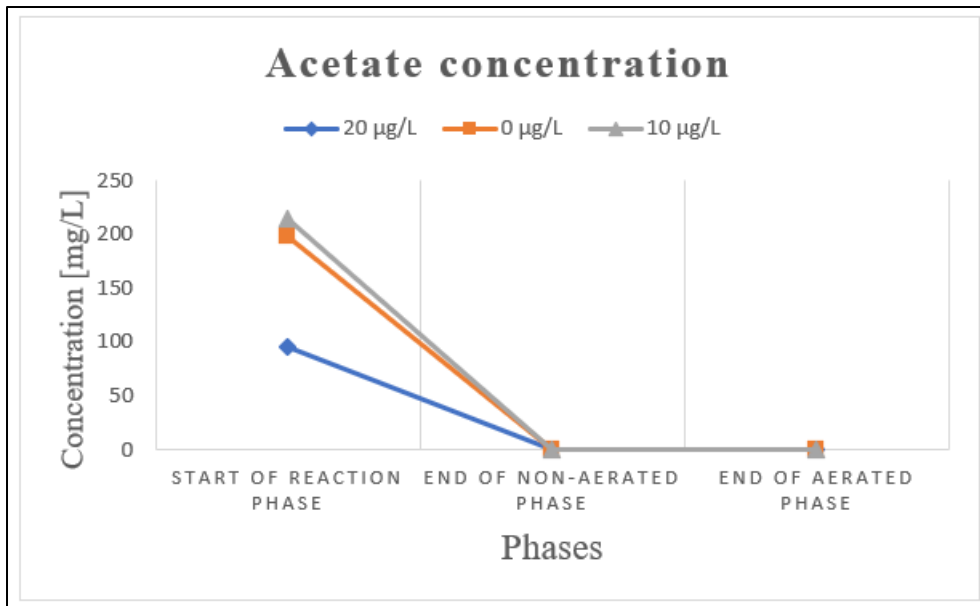


Figura 21 – Andamento della concentrazione di acetato in un ciclo rappresentativo in funzione delle tre fasi, in presenza di diclofenac, in assenza di diclofenac e in presenza ridotta di diclofenac

La figura 20 mostra che al termine di ogni ciclo la rimozione dell'acetato è totale; nei giorni di monitoraggio in cui in diclofenac non è stato immesso, si nota che al termine della fase non aerata l'acetato non è completamente rimosso.

La figura 21, invece, mostra l'andamento delle concentrazioni nelle tre fasi riferite, però, a tre periodi differenti: periodo di immissione di rispettivamente 20, 0 e 10 µg/L di diclofenac.

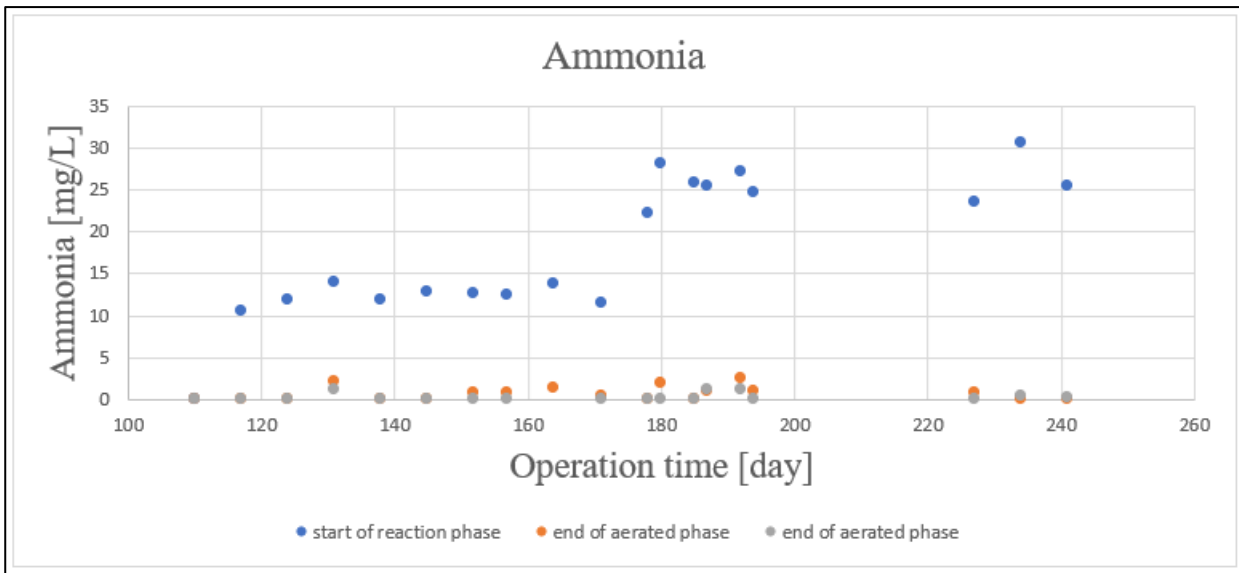


Figura 22 - Andamento della concentrazione di ammoniaca in funzione dei giorni di operazione al termine di ogni fase del ciclo

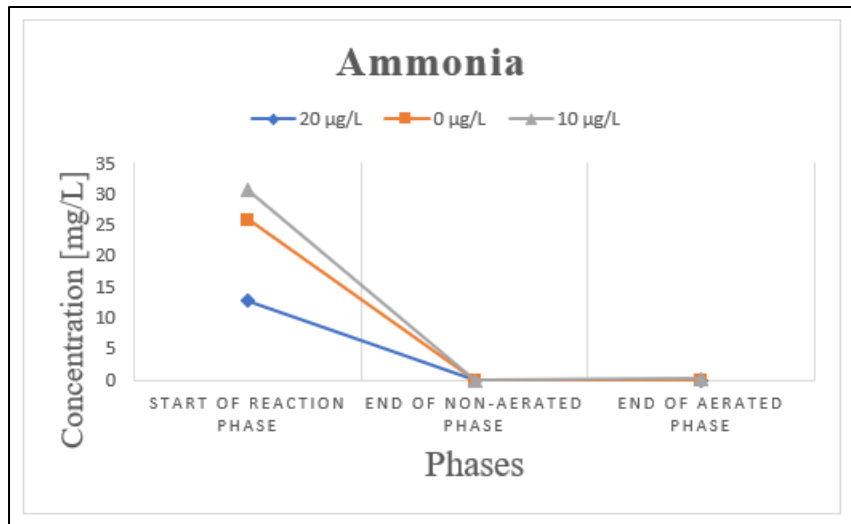


Figura 23 - Andamento della concentrazione di ammoniaca in un ciclo rappresentativo in funzione delle tre fasi, in presenza di diclofenac, in assenza di diclofenac e in presenza ridotta di diclofenac

Anche nel caso dell'ammoniaca la rimozione è totale in ogni ciclo, anche al termine della fase non aerata.

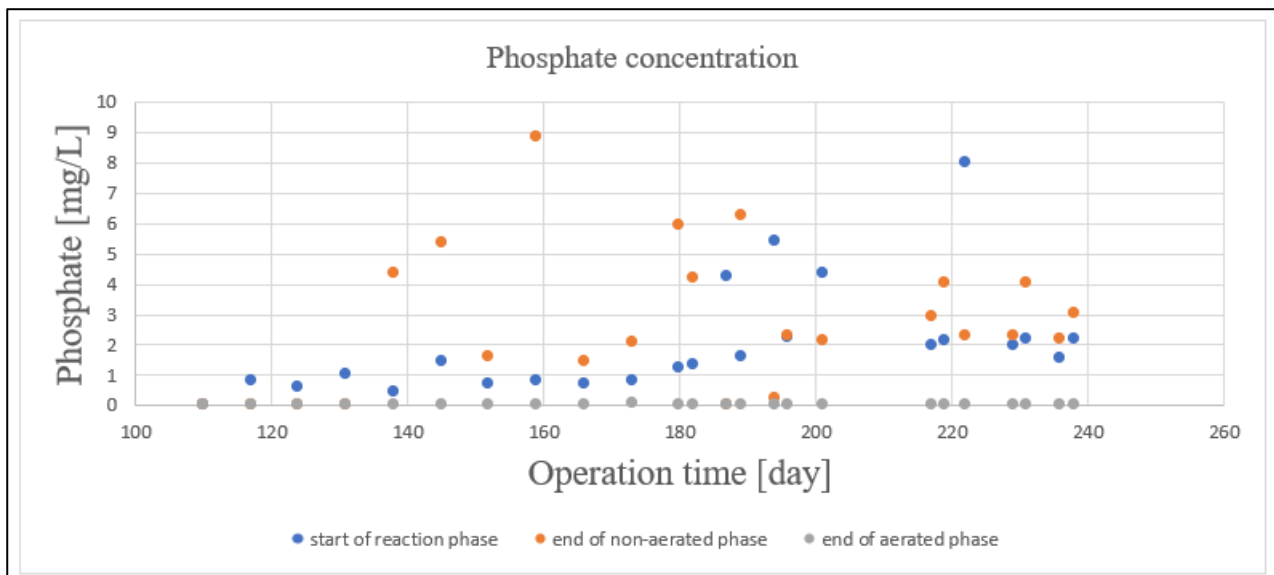


Figura 24 - Andamento della concentrazione di fosfato in funzione dei giorni di operazione al termine di ogni fase del ciclo

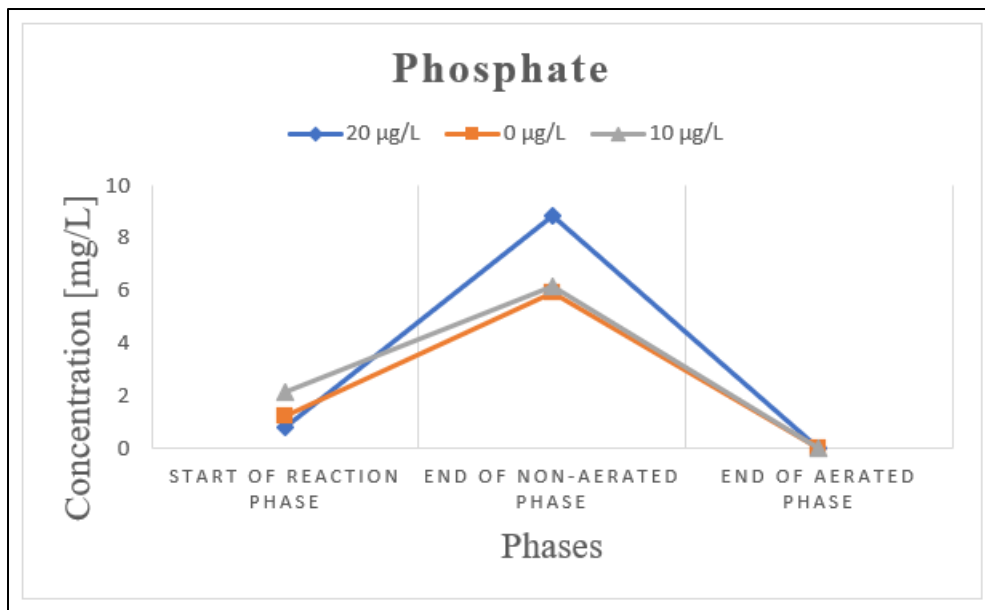


Figura 25 - Andamento della concentrazione di fosfato in un ciclo rappresentativo in funzione delle tre fasi, in presenza di diclofenac, in assenza di diclofenac e in presenza ridotta di diclofenac

Il fosfato viene completamente rimosso alla fine di tutti i cicli. In questo caso, (si può notare soprattutto dalla figura 25 che riporta l'andamento di tre cicli di riferimento), il metabolismo dei microrganismi porta ad un rilascio di fosfato durante la fase non aerata.

6. Discussioni

6.1 Impatto del diclofenac sulle proprietà della biomassa

Uno studio ha rilevato che valori tipici di SVI sono inferiori a 80 mL/g (Zaghloul, Halbas, Hamza, & Elbeshbishy, 2023); ciò è in accordo con i risultati raccolti nella prima fase di gestione del reattore oggetto del presente studio. Gli stessi risultati sono stati riscontrati in una ulteriore sperimentazione della tecnologia AGS in un reattore SBR che ha funzionato con tre ore di ciclo di sequenziamento, anche in questo caso i risultati si sono rivelati corrispondenti a quelli raccolti. Il valore di SVI nel suddetto studio resta compreso tra i 30 ed i 60 mL/g (Sharani, Anuar, & Khor, 2023).

Il profilo della biomassa nel sistema mostra che l'SVI è aumentato mostrando un declino della capacità di decantazione. Durante il periodo di aumento, i granuli hanno probabilmente peggiorato le proprietà di sedimentazione allungandone i tempi. L'incremento di tali valori potrebbe essere attribuito al fatto che, come riportato in uno studio recente (Sharani, Anuar, & Khor, 2023), i granuli potrebbero essere stati avvolti da batteri filamentosi. Questa osservazione trova riscontro nei risultati precedentemente presentati ed è ulteriormente supportata dalle analisi al microscopio che mostrano chiaramente la presenza di batteri filamentosi.

Oltre all'allontanamento delle due curve bisogna considerare che il valore SVI è eccessivo; valori alti di SVI sono, generalmente, associati a sistemi biologici a fanghi attivi e non a tecnologie legate ai fanghi aerobici granulari. Infatti, i tempi di sedimentazione nei fanghi attivi sono ben più lunghi rispetto alla tecnologia AGS, per la quale la velocità di sedimentazione è una caratteristica fondamentale.

Nel periodo in cui il diclofenac era regolarmente immesso all'interno del reattore è stata registrata una riduzione dei solidi sospesi totali e volatili. Ciò mette in luce l'influenza negativa del diclofenac sulla concentrazione di solidi sospesi all'interno del sistema di trattamento.

La stabilità e la resistenza dei granuli è legata anche alla durata dei periodi di feast e famine; la maggior parte degli studi ha evidenziato che, quando il periodo di feast è pari al 20% del tempo di aerazione, i granuli formati sono stabili e resistenti (Wang, Oehmen, Freitas, Carvalho, & Reis, 2017). Nello studio in esame, la fonte di carbonio viene consumata durante la fase non aerata, ciò potrebbe essere dovuto ad una lunga fase di famine seguita da una breve fase di feast non aerata.

Come per gli altri parametri, la presenza di diclofenac ha condizionato la granulometria della biomassa. Nelle sperimentazioni effettuate da Noor et Al., studio precedentemente citato, la dimensione media dei granuli risulta maggiore di 0,2 mm (Sharani, Anuar, & Khor, 2023). La granulometria, nella fase iniziale del monitoraggio, mostra una percentuale maggiore di granuli corrispondenti al setaccio compreso tra gli 0,2 mm e gli 0,6 mm, in disaccordo con lo studio sopra citato. Il diametro medio dei granuli è minore rispetto ai valori generici a causa della presenza del diclofenac. La dimensione media dei granuli prova, ancora una volta, che il farmaceutico ha un'influenza negativa sulla biomassa.

L'analisi dei risultati riguardanti la valutazione degli EPS e del loro contenuto di proteine (PN) e polisaccaridi (PS), insieme al rapporto PN/PS, fornisce informazioni cruciali sulla struttura e sul comportamento dei batteri anaerobici granulari nel reattore. Gli EPS sono componenti fondamentali della matrice extracellulare, essenziali per l'integrità strutturale dei granuli batterici e per il mantenimento delle funzioni metaboliche. L'analisi della composizione degli EPS, in particolare il contenuto di proteine e polisaccaridi, fornisce indicazioni sulla capacità dei batteri di produrre e utilizzare tali sostanze per sostenere il loro metabolismo e la loro crescita.

Gli EPS influenzano fortemente l'idrofobicità e svolgono un ruolo cruciale nel modellare la struttura del granulo e nel sostenerne la stabilità (Sutherland I. , 2001).

Molti studi hanno suggerito che le proteine svolgono un ruolo essenziale nell'aggregazione iniziale e a lunga scadenza dei granuli (Zhang, Feng, Zhu, & Chen, 2007).

Come si evince dai grafici mostrati, si è avuta una graduale riduzione della percentuale di EPS sulla biomassa contestualmente ad un aumento del contenuto di proteine e polisaccaridi al loro interno.

La diminuzione del contenuto di EPS può essere dovuta al metabolismo dei microrganismi, l'EPS infatti può essere utilizzato come fonte di carbonio ed energia durante il metabolismo microbico (Manavi, Kazemi, & Bonakdarpour, 2017).

Generalmente, il ruolo degli EPS viene valutato in termini di rapporto tra proteine e polisaccaridi. Osservando l'andamento del rapporto PN/PS, considerando che nel tempo si è verificato un miglioramento nelle proprietà di sedimentazione dei solidi e della stabilità dei granuli, i risultati trovano conferma in altri studi: l'andamento crescente del rapporto PN/PS è correlato positivamente con le prestazioni di aggregazione e sedimentazione dei granuli (Zhao, et al., 2018) portando ad una maggiore idrofobicità degli aggregati, vantaggiosa per la stabilità dei fanghi (Sheng, Yu, & Li, 2010).

Sebbene sia chiaro che l'EPS strutturale è fondamentale nello sviluppo dei granuli aerobici, mancano ancora metodi adeguati a isolare, quantificare e caratterizzare l'EPS. Ciò ostacola la comprensione approfondita dei meccanismi di formazione e stabilità dei granuli. Inoltre, non è ancora chiaro quale gruppo microbico sia effettivamente responsabile della generazione di EPS (Campo, Carretti, Lubello, & Lotti, Recovery of structural extracellular polymeric substances (sEPS) from aerobic granular sludge: Insights on biopolymers characterization and hydrogel properties for potential applications, 2022).

Il rapporto F/M è un fattore rilevante nel processo di granulazione aerobica; è direttamente correlato alla composizione di EPS generato, alla stabilità dei granuli, al tempo di formazione, alla diversità microbica e all'efficienza di rimozione degli inquinanti (Wu, Zhang, Yu, & Zhu, 2018).

Un valore basso di F/M (0,33 g COD/gVSSd) è rilevante per lo sviluppo di granuli aerobici stabili (Tay, Liu, & Liu, Effect of organic loading rate on aerobic granulation. I: reactor performance, 2004). Tali valori sono in accordo con quelli riscontrati nel reattore; infatti, il rapporto F/M è compreso mediamente tra 0,1 e 0,5 gCOD/gVSS.

In generale, si è visto che il farmaceutico ha causato impatti negativi sui parametri che caratterizzano la biomassa nel reattore. Di conseguenza, è stata interrotta l'immissione di diclofenac nel sistema (162° giorno di operazione) fino alla sua totale scomparsa (222° giorno di operazione). Al fine di compensare l'effetto negativo e migliorare le condizioni del sistema, si è optato per l'aumento della concentrazione di acetato nell'alimentazione, mantenendo sempre il rapporto C:N:P di 100:7:1, e per l'aumento del tempo di sedimentazione da 3 a 5 minuti. Come riportato in un altro studio (Qin, 2004), esiste una relazione tra la formazione dei granuli ed i tempi di sedimentazione; con un tempo di sedimentazione di 5 minuti, la formazione dei granuli risulta eccellente.

Inoltre, nella valutazione del tipo di granulo formato da diversi substrati, si osserva che l'acetato forma granuli densi e resistenti (Adav, Lee, & Ren, Degradation of phenol by Acinetobacter strain isolated from aerobic granules, 2007).

Tali scelte operative, erano mirate, oltre che a riportare i parametri nei range ottimali, per promuovere la formazione di nuovi granuli aerobi. Scelta guidata anche dall'osservazione di una graduale degranulazione in presenza di diclofenac, messa in luce dalle operazioni di monitoraggio.

L'aumento del valore di SVI, registrato in seguito ai cambiamenti operativi apportati, può essere imputabile all'incremento della concentrazione di acetato nell'alimentazione e dei tempi di sedimentazione.

Con l'interruzione dell'alimentazione di diclofenac la concentrazione di solidi sospesi ha subito un leggero aumento e una tendenza al ritorno alle condizioni precedenti. L'aumento dei solidi sospesi nella fase in assenza di diclofenac mostra una certa dinamicità del sistema e la capacità di rispondere ai cambiamenti delle condizioni operative. Tali risultati suggeriscono di tenere in considerazione l'influenza del contaminante sul comportamento e la gestione della biomassa.

Il graduale esaurimento di diclofenac nel reattore ha portato cambiamenti anche nella granulometria. Infatti, in assenza di diclofenac si è verificato un decremento della percentuale rappresentante il setaccio

compreso tra 0,2 e 0,6 mm a favore di quello corrispondente ad un diametro compreso tra 0,6 mm ed 1 mm. L'aumento del diametro può essere attribuito anche all'aumento dei tempi di sedimentazione da 3 a 5 minuti. Da notare che l'aumento del diametro medio è avvenuto contemporaneamente al riavvicinamento delle curve dei valori di SVI a 5 e 30 minuti, mostrando che un diametro medio dei granuli maggiore potrebbe comportare il miglioramento dell'efficienza e della velocità dei processi di sedimentazione e separazione tra acqua trattata e granuli. Bisogna, comunque, tenere conto che, in presenza di granuli di dimensioni elevate, i nutrienti potrebbero non riuscire a raggiungere la parte più interna portando alla morte del nucleo ed alla disintegrazione del granulo.

Quando il monitoraggio ha rivelato un ritorno dei parametri a condizioni accettabili l'immissione di diclofenac è stata ripresa. Con la reimmissione del diclofenac si può notare un forte calo sia dei TSS che dei VSS dovuto al riadattamento dei microrganismi alle nuove condizioni di processo, seguito da un aumento corrispondente ad un ritorno a regime del sistema.

In seguito alla fase in assenza di diclofenac, si è visto che i valori SVI hanno avuto una tendenza al ritorno alle condizioni operative precedenti.

Per quanto riguarda il calo degli EPS, potrebbe essere legato ai cambiamenti strategici effettuati in corso d'opera nella gestione del reattore come l'interruzione dell'immissione di diclofenac e la reimmissione, l'aumento del tempo di sedimentazione e l'aumento della concentrazione dei nutrienti alimentati nel reattore. Tuttavia, essendo il diclofenac una sostanza che intacca la stabilità del granulo, la sua presenza dovrebbe stimolare la produzione di EPS da parte dei microrganismi come meccanismo auto difensivo. La strategia adottata si è rivelata efficace nel migliorare i parametri discussi; ha contribuito a riportare i valori di TSS, VSS, SVI e granulometria a livelli accettabili, indicando un recupero delle condizioni ottimali di funzionamento del reattore. L'adozione di queste misure correttive ha rafforzato la robustezza e l'efficienza complessiva del sistema di trattamento.

6.2 Impatto del diclofenac sulle performance di trattamento acque

Come visto nei risultati precedentemente esposti, la rimozione di diclofenac non ha mai ecceduto il 30%, nonostante ciò, è degno di nota sottolineare che la rimozione del diclofenac ha comunque ottenuto risultati significativi, dimostrando una maggiore efficacia del processo; contestualmente, si è osservato un deterioramento della struttura e della qualità dei granuli messo in luce dall'andamento dei valori di TSS e VSS.

L'acetato, come substrato organico, gioca un ruolo cruciale nel supportare l'attività batterica all'interno del sistema. La sua rimozione è di primaria importanza per garantire un ambiente di trattamento sostenibile. Allo stesso modo, la gestione dell'azoto, presente sotto forma di ammoniacale, è fondamentale per prevenire il rilascio di composti inquinanti. Infine, la rimozione dei fosfati, spesso responsabili dell'eutrofizzazione, è di vitale importanza per il mantenimento degli ecosistemi.

L'alternanza di fasi aerobiche e anaerobiche ha contribuito ad una maggiore efficienza di rimozione delle sostanze organiche azoto e fosforo.

È chiaro che l'acetato e l'ammoniaca diminuiscono drasticamente durante la fase anaerobica, mentre i fosfati subiscono un leggero aumento nella stessa fase. Ciò è dovuto al fatto che gli organismi accumulatori di fosfato (PAO) nei granuli rilasciano i fosfati nelle acque reflue durante le condizioni anaerobiche; quindi, assorbono i fosfati dalle acque durante la fase di aerazione, immagazzinandoli come polifosfati intracellulari all'interno delle loro cellule e utilizzandoli per la generazione di energia (T.I., U., D., & L., 2022).

Durante la fase di aerazione avvengono contemporaneamente varie reazioni biologiche. Ciò è dovuto ad un gradiente di ossigeno all'interno del granulo, che si traduce in un guscio esterno aerobico e un nucleo anossico/anaerobico. I batteri nitrificanti convertono i composti azotati in nitrato, il nitrato viene trasformato nella parte interna del granulo dai batteri denitrificanti in azoto gassoso. Grazie alla profonda penetrazione del substrato nel granulo nella fase di alimentazione, durante l'aerazione è disponibile una quantità sufficiente di acetato (quindi di carbonio) per la denitrificazione. Inoltre, l'adsorbimento del fosfato avviene durante la fase aerobica (Gademan, Gaydon, & Bruin, 2022).

In accordo con quanto detto, i grafici mostrano che effettivamente sussiste nel reattore in questione una buona correlazione tra la rimozione di acetato e di fosfato. Infatti, i granuli hanno la caratteristica di potenziale accumulo di fosforo con concomitante assorbimento di carbonio organico e rilascio di fosforo nella fase anaerobica, seguita da una rapida rimozione del fosforo stesso nella fase aerobica.

È interessante notare che, nonostante abbia intaccato la salute dei granuli, il diclofenac non ha condizionato in maniera negativa la rimozione di acetato, ammoniaca e fosfato che, in effetti, hanno sempre dimostrato una rimozione del 100% o comunque molto prossima. Ciò è in accordo con uno studio sui processi di rimozione biologica in fanghi granulari aerobici esposti a diclofenac (Bessa V. S., Moreira, Loosdrecht, & Castro, 2021).

Un altro studio con AGS ha riportato che, sebbene l'efficienza di rimozione dell'acetato sia stata temporaneamente influenzata dalla presenza di farmaci, il reattore è stato in grado di riprendere l'attività rapidamente dopo averne cessato la fornitura, indicando una rapida ripresa del sistema (Amorim, et al., 2016).

L'andamento dei livelli di fosfato è coerente con il metabolismo degli organismi accumulatori di fosfato, ma comunque è evidente che la presenza di diclofenac abbia influenzato tale processo. In effetti, al termine della fase non aerata, nonostante ci sia rilascio di fosfato, questo non riguarda quantità importanti come ci si aspetterebbe. Tale comportamento è stato riscontrato in altri studi (Kent & J.H. Tay, 2019), dove la presenza di composti farmaceutici ha inibito il rilascio di fosfato durante la fase anaerobica, ma non ha interferito con il suo assorbimento durante la fase aerobica.

Generalmente i PAO ed i GAO accumulano PHA, ma in questo caso la quantità di questi ultimi è irrilevante per poter essere quantificata mediante cromatografia gassosa. La ragione principale è la bassa concentrazione di acetato nell'alimentazione, ma tale concentrazione è ridotta per simulare acque reflue. L'uso di acetato dovrebbe, come descritto in un altro studio, incrementare l'accumulo di PHA, promuovendo la presenza ed il metabolismo dei PAO (de Sousa Rollemberg SL).

Una ulteriore possibile causa della mancanza di PHA è legata proprio alla presenza di PAO e GAO ed in particolare alla loro competizione nel sistema. Infatti, si nota che al termine della fase aerata, nonostante si verifichi, il rilascio di fosfati coinvolge valori bassi ed in alcuni cicli addirittura nulli. Ciò potrebbe rivelare che la fonte di carbonio non è abbastanza da garantire il metabolismo del fosforo; il carbonio potrebbe essere consumato e non convertito in PHA.

In generale, i PAO assorbono la fonte di carbonio presente (acetato in questo caso) e la immagazzinano sotto forma di PHA, utilizzando l'energia derivante dall'accumulo intracellulare di polifosfati (poly-P). Tale processo rilascia ortofosfato ($PO_4\text{-P}$) nella fase liquida. Tuttavia, la presenza di GAO può portare ad un deterioramento delle prestazioni in termini di rimozione del fosforo, poiché questi batteri possono competere con i PAO per il carbonio presente nelle acque reflue (Luiza Girard, Encina, & Elisa R. Rodriguez, 2012).

Nel caso in esame, l'acetato non viene completamente consumato al termine della fase non aerata in tutti i cicli e gli ortofosfati non vengono rilasciati in quantità rilevanti. Ciò può essere ricondotto ad una maggiore competitività da parte dei GAO rispetto ai PAO.

La nitrificazione è risultata, anch'essa, altamente efficiente. Ciò indica che i batteri ossidanti l'azoto non sono stati influenzati dalla presenza di diclofenac durante il funzionamento del reattore.

Sebbene alcuni studi riportino la sensibilità dei batteri nitrificanti nei confronti di composti tossici, come farmaci chirali, la fluoxetina e la tetraciclina (Moreira, et al., 2015), nel presente studio la rimozione di ammoniaca ha dato risultati soddisfacenti.

Un'importante famiglia di batteri è quella delle *Brocadiaceae*, responsabile dell'ossidazione anaerobica dell'ammonio (*Anammox*). Data la bassa resa ed il basso tasso di crescita dei batteri *Anammox*, la crescita eterotrofica dovrebbe essere ridotta al minimo, per mantenere un'elevata frazione di batteri *Anammox* nei fanghi (Silvio Luiz de Sousa Rollemberg, 2018).

Nel caso in esame, è molto probabile la presenza di *Anammox*. Tipicamente, l'ammoniaca viene consumata completamente in assenza di ossigeno durante la fase non aerata, ciò suggerisce condizioni favorevoli per la crescita dei batteri *anammox*. L'ipotesi della presenza di questi ultimi è rinforzata dalla bassa velocità di crescita ed il prolungato tempo di ritenzione dei solidi (SRT) nel sistema SBR.

7. Conclusioni

I risultati della sperimentazione suggeriscono che nonostante il diclofenac non presenti una percentuale di rimozione superiore al 30 %, la sua presenza ha avuto un impatto significativo sulla biomassa nel reattore. Ciò è stato verificato attraverso evidenti segni di stress, come indicato da valori di SVI, TSS, VSS e granulometria.

Tuttavia, è interessante notare che l'efficienza di rimozione di acetato, fosfati e ammonio non è stata compromessa dalla presenza dell'inquinante. Questo suggerisce che, nonostante il diclofenac influenzi

negativamente la salute della biomassa, i meccanismi di rimozione dei contaminanti di interesse nel reattore rimangono efficienti.

Si evince l'importanza di valutare non solo l'effetto degli inquinanti sulle prestazioni del processo, ma anche sullo stato e sul comportamento della biomassa. Inoltre, è sottolineata la necessità di ulteriori indagini per comprendere i meccanismi di interazione tra inquinanti e biomassa e per sviluppare strategie di mitigazione per minimizzare gli effetti negativi sul trattamento dei reflui.

In conclusione, i risultati suggeriscono che il processo di trattamento è resiliente ed in grado di mantenere elevate efficienze di rimozione per i principali contaminanti, offrendo prospettive future promettenti per il miglioramento e l'ottimizzazione dei sistemi di trattamento dei reflui in presenza di farmaci e contaminanti emergenti.

Bibliografia

- A. Aleboye, Y. M. (2005). Kinetics of oxidative decolourisation of Acid Orange 7 in water by ultraviolet radiation in the presence of hydrogen peroxide. *Separ. Purif. Technol.* 43, 143-148.
- A.M. Redding, F. C. (2009). A QSAR-like analysis of the adsorption of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals, and personal care products on modified activated carbons. *Water Res.* 43, 3849-3861.
- Adav, S. C. (2007). Degradation of phenol by Acinetobacter strain isolated from aerobic granules. *Chemosphere* 67, 1566-1572.
- Adav, S. L. (2008). Aerobic granular sludge: recent advances. *Biotechnol. Adv.* 26, 411-423.
- Adav, S. L. (2009). Biological nitrification denitrification with alternating oxic and anoxic operations using aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 1181-1189.
- Adav, S. L. (2010). Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1601-1610.
- Adav, S. L.-J. (2008). Aerobic granulation of pure bacterial strain Bacillus thuringiensis. *Front. Environ. Sci. Eng. China* 2, 461-467.
- Aissaoui, S. O.-H. (2017). Metabolic and co-metabolic transformation of diclofenac by Enterobacter hormaechei D15 isolated from activated sludge. *Curr. Microbiol.*, 381-388.
- Amorim, C. A. (2018). Bacterial community dynamics within an aerobic granular sludge reactor treating wastewater loaded with pharmaceuticals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 905-912.
- Baazeem, A. A.-H. (2021). In Vitro antibacterial, antifungal, nematocidal and growth promoting activities of Trichoderma hamatum. *J. Funghi*, 331.
- Barr, J. C. (2010). Granule formation mechanisms within an aerobic wastewater system for phosphorus removal. *Appl. Environ. Microb.* 76, 7588-7597.
- Barra, P. (2020). Trattamenti avanzati delle acque reflue per la rimozione di contaminanti emergenti. *Authorea Inc.*
- Bartrons, M. P. (2017). Pharmaceuticals and personal-care products in plants. *Trends Plant Sci.* 22.
- Bassin, J. P. (2011). Effect of elevated salt concentrations on the aerobic granular sludge process: linking microbial activity with microbial community structure. *Appl. Environ. Microb.* 77, 7942-7953.
- Bassin, J. W. (2012). Improved phosphate removal by selective sludge discharge in aerobic granular sludge reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1919-1928.
- Belgiorno, V., V. Naddeo, M. F. N. Secondes, L. Borea, & F. c. Ballesteros. (2016). Controllo di contaminanti emergenti nelle acque reflue mediante ultrafiltrazione migliorata con ultrasuoni. *Ingegneria dell'Ambiente.*
- BELTRÁN, F. J. (2009). Diclofenac removal from water with ozone and activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*, 768-776.
- Bengtsson S, d. B. (2018). A comparison of aerobic granular sludge with conventional and compact biological treatment technologies. *Environ Technol* 13, 1479-1487.

- Bengtsson, S. W. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by glycogen accumulating organisms treating a paper mill wastewater. *Water Science and Technology*.
- Bernet, N. S. (2009). Principles of nitrifying processes. *Cervantes, F.J. (Ed.), Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution: Principles and Engineering. IWA Publishing, London*.
- Bessa, V. M. (2017). Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 135-142.
- Beun JJ, H. A. (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res* 33, 2283-2290.
- Bisogno, S. (2019). Rimozione dei prodotti farmaceutici dalle acque reflue urbane. *Authorea Inc*.
- Buscher, B., Van de Lagemaat, D., Gries, W., Beyer, D., Markham, D. A., Budinsky, R. A., & Hentges, S. G. (2015). Quantitative analysis of unconjugated and total bisphenol A in human urine using solid-phase extraction and UPLC-MS/MS: Method implementation, method qualification and troubleshooting. *Journal of Chromatography B*, 30-38.
- C.L. Amorim, A. M. (2014). Performance of aerobic granular sludge in a sequencing batch bioreactor exposed to ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin. *Water Res.* 50.
- C.L. Amorim, I. M.-M. (2016). Treatment of a simulated wastewater amended with a chiral pharmaceuticals mixture by an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 115.
- Camejo, P. O. (2019). Integrated omic analyses provide evidence that a “Candidatus Accumulibacter phosphatis” strain performs denitrification under microaerobic conditions. *mSystems* 4, 1-23.
- Caracciolo, A. T. (2015). Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. *A review. J. Pharm. Biomed. Anal.*
- Cardoso, O. P. (2014). Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: review of evidence and need for knowledge. *Chemosphere* 115.
- Carrera, J. V. (2004). Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochem.* 39, 2035-2041.
- Carta, F. B. (2001). Simultaneous storage and degradation of PHB and glycogen in activated sludge cultures. *Water Res.* 35, 2693-2701.
- Cecilia Burzio, J. E.-M. (2022). Removal of organic micropollutants from municipal wastewater by aerobic granular sludge and conventional activated sludge. *Journal of Hazardous Materials* 438.
- Charraud, L. J. (2019a). veterinary pharmaceutical residues in water resources and tap water in an intensive husbandry area in France. *Sci. Total Environ.* 664.
- Chedeville, O. D. (2016). Oxidation of pharmaceutical compounds by ozonation and ozone/activated carbon coupling: a kinetic approach. *Desalination Water Treat*, 18956-18963.
- Chen H, L. A. (2019). AHL-mediated quorum sensing regulates the variations of microbial community and sludge properties of aerobic granular sludge under low organic loading. *Environ Int* 130.

- Chen, X. K. (2019). Improvements on activated sludge settling and flocculation using biomass-based fly ash as activator. *Sci. Rep.* 9.
- Coma, M. V. (2012). Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioresour. Technol.* 103, 101-108.
- Cuomo, R. (2019). Metodi innovativi per il trattamento dei contaminanti emergenti: adsorbimento su carboni attivi combinati ad ultrasuoni. *Authorea Inc.*
- D. I. Andersson, D. H. (2012). Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates*, 162-172.
- da Silva, T. F. (2020). Tandem anaerobic-aerobic degradation of ranitidine, diclofenac, and simvastatin in domestic sewage. *Sci. Total Environ.* 721.
- de Kreuk, M. P. (2005). Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. *Water Res.* 39, 4476-4484.
- de Kreuk, M. v. (2004). Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Sci. Technol.* 49, 9-17.
- de Sousa Rollemberg SL, B. A. (s.d.). Aerobic granular sludge: cultivation parameters and removal mechanisms. *Bioresour technol* , -.
- Devlin, T. D. (2017). Granulation of activated sludge under low hydrodynamic shear and different wastewater characteristics. *Bioresour. Technol.* 224, 229-235.
- Dubois. (1956).
- Eddy, M. a. (2016). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, fifth ed.* New York: MacGraw-Hill Companies.
- F. Han, X. Y. (2020). The oxidative degradation of diclofenac using the activation of peroxymonosulfate by BiFeO₃ microspheres Kinetics role of visible light and decay pathways. *Separation and Purification Technology.*
- Fangrui Cai, L. L. (2021). A review of aerobic granular sludge (AGS) treating recalcitrant wastewater: Refractory organics removal mechanism, application and prospect. *Science of the Total Environment* 782.
- Felz S, A.-Z. S. (2016). Extraction of structural extracellular polymeric substances from aerobic granular sludge. *Vis Exp* 115.
- Felz S, V. P. (2019). Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). *Water Res* 157, 201-208.
- Figuroa, M. V.-C. (2015). Filamentous bacteria existence in aerobic granular reactors. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 841-851.
- Franca RD, P. H. (2018). Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation. *Biotechnol Adv* 36, 228-246.
- Franca, R. V. (327-336). Effect of an azo dye on the performance of an aerobic granular sludge sequencing batch reactor treating a simulated textile wastewater. *Water Res* 85.

- G. Gademan, P. G. (2022). GRANULAR AEROBIC ACTIVATED SLUDGE. *SSI Engineers and Environmental Consultants and DHV*.
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 147-156.
- Gerbersdorf, S. C.-H. (2015). Anthropogenic trace compounds (ATCs) in aquatic habitats—research needs on sources, fate, detection and toxicity to ensure timely elimination strategies and risk management. *Environ. Int.*, 85-105.
- Giesen A, v. L. (2016). Aerobic Granular Biomass Technology: recent performance data, lessons learnt and retrofitting conventional treatment infrastructure. *Proc Water Environ Fed 11*, 1913-1923.
- Gil, A. T. (2018). Comparative removal of emerging contaminants from aqueous solution by adsorption on an activated carbon. *Environ. Technol.*, 3017-30330.
- Gonda, S. K.-S. (2016). Efficient biotransformation of non-steroid anti-inflammatory drugs by endophytic and epiphytic fungi from dried leaves of a medicinal plant, *Plantago lanceolata* L. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 108, 115-121.
- Gonzalez-Gil, G. H. (2011). Dynamics of microbial community structure of and enhanced biological phosphorus removal by aerobic granules cultivated on propionate or acetate. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8041-8051.
- Gurung, K. N. (2019). Removal and fate of emerging organic micropollutants (EOMs) in municipal wastewater by a pilot-scale membrane bioreactor (MBR) treatment under varying solid retention times. *Sci. Total Environ. Sci. Total Environ.*, 671-680.
- Gutnick, D. B. (2000). Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals, new products and novel formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 541-560.
- He Q, S. J. (2019). Enhanced simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal through mixed carbon sources by aerobic granular sludge. *J Hazard Mater* .
- He, Q. C. (2018). Simultaneous nitrification denitrification and phosphorus removal in aerobic granular sequencing batch reactors with high aeration intensity: impact of aeration time. *Bioresour. Technol.* 263, 214-222.
- He, Q. Z. (2017). Enhanced nitrogen removal in an aerobic granular sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, endogenous denitrification and phosphorus removal with low superficial gas velocity. *Chem. Eng. J.* 326, 1223-1231.
- Hernandez, F., Sancho, & J. V., & Pozo, O. J. (2005). critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Anal Bioanal Chem*, 934:946.
- I.S. Moreira, C. A. (2015). Removal of fluoxetine and its effects in the performance of an aerobic granular sludge sequential batch reactor. *J. Hazard. Mater.* 287.

- Isaka, K. D. (2006). Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic biological filtrated reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 47-52.
- J. Haginaka, H. S. (2000). Uniform-sized molecularly imprinted polymers for 2-arylpropionic acid derivatives selectively modified with hydrophilic external layer and their applications to direct serum injection analysis. *Anal. Chem.* 72, 5206-5210.
- J. Hartmann, P. B. (2008). Degradation of the drug diclofenac in water by sonolysis in presence of catalysts. *Chemosphere* 70, 453-461.
- J. Jean, Y. P.-G. (2012). Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*, 103.
- J. Kent, J. T. (2019). Treatment of 17 α - ethinylestradiol, 4- nonylphenol, and carbamazepine in wastewater using an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. *Sci. Total Environ.*
- J. Wang, H. C. (2020). Catalytic ozonation for water and wastewater treatment: Recent advances and perspective. *Science of The Total Environment*, 704.
- Jemmat, Z. S.-O. (2013). Simultaneous nitrification and p-nitrophenol removal using aerobic granular biomass in a continuous airlift reactor. *Bioresour. Technol.* 150, 307-313.
- Jewell, K. F. (2016). Transformation of diclofenac in hybrid biofilm-activated sludge processes. *Water Res.*, 559-567.
- Jiang B, L. Y. (2012). Roles of ATP-dependent N-acylhomoserine actones (AHLs) and extracellular polymeric substances (EPSs) in aerobic granulation. *Chemosphere* 88, 1058-1064.
- Jiang, H. T. (2002). Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 439-445.
- Jingnan Yang a, A. D. (2022). The fate of diclofenac in anaerobic fermentation of waste activated sludge. *Journal of Environmental Management*.
- Joss, A. Z. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water Res.* 40 (8), 1686-1696.
- Kamal, M. I. (2007). Enhanced skin permeation of diclofenac by ion-pair formation and further enhancement by microemulsion. *Chem. Pharm. Bull.*, 368.
- Khazri, H. G.-A.-A. (2017). Removal of ibuprofen, naproxen and carbamazepine in aqueous solution onto natural clay: equilibrium, kinetics, and thermodynamic study. *Appl. Water Sci.*, 3031-3040.
- Kocaturk, I. E. (2016). Influent COD/TAN ratio affects the carbon and nitrogen removal efficiency and stability of aerobic granules. *Ecol. Eng.* 90, 12-24.
- Kolakovic, S. F. (2021). *Accumulibacter diversity at the sub-clade level impacts enhanced biological phosphorus removal performance.* *Tratto da Water Res.:* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117210>.
- Kong, Q. N. (2014). Enhancement of aerobic granulation by zero-valent iron in sequencing batch airlift reactor. *J. Hazard. Mater.* 279, 511-517.

- L.Lan, Y. X. (2020). Investigation of reduction in risk from antibiotic resistance genes in laboratory wastewater by using O 3 ultrasound, and autoclaving. *Water Environment Research Wiley*.
- Leonidasa, P.-E. S. (2005). Photo-Fenton Degradation of Photo-Fenton Degradation of Intermediates and Degradation Pathway. *Environ. Sci. Technol.*
- Li, A. L. (2011). Effect of the food-to-microorganism (F/M) ratio on the formation and size of aerobic sludge granules. *Process Biochem.* 46, 2269-2276.
- Lin, Y. (2003). Development of P-accumulating microbial granules in SBR. *Interim PhD Report*.
- Lin, Y. d. (2010). Characterization of alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant. *Water Res.* 44, 3355-3364.
- Lin, Y. S. (2013). The chemical and mechanical differences between alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic flocculent sludge and aerobic granular sludge. *Water Res.* 47, 57-65.
- Liu Y, Y. S.-F.-H.-S. (2004). cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. *Enzym Microb Technol* 34, 371-379.
- Liu, H. F. (2002). Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnol. Bioeng.* 80.
- Liu, X. S. (2009). Physicochemical characteristics of microbial granules. *Biotechnol. Adv.* 27, 1061-1070.
- Liu, X. S. (2010). Contribution of extracellular polymeric substances (EPS) to the sludge aggregation. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4355-4360.
- Liu, X. W. (2018). Simultaneous pyridine biodegradation and nitrogen removal in an aerobic granular system. *Environ. Sci.* 67, 318-329.
- Liu, Y. F. (2003). Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 33, 237-273.
- Liu, Y. L. (2006). Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Biotechnol. Adv.* 24, 115-127.
- Liu, Y. T. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* 36, 1653-1665.
- Liu, Y. T. (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22, 533-563.
- Liu, Y. T. (2008). Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.* 99, 980-985.
- Liu, Y. W. (2005). Selection pressure-driven aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 26-32.
- Liu, Y. Y. (2004). Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. *J. Biotechnol.* 108, 161-169.
- Lochmatter, S. H. (2014). Optimization of operation conditions for the startup of aerobic granular sludge reactors biologically removing carbon, nitrogen, and phosphorus. *Water Res.* 59, 58-70.

- Lonappan, L. B. (2016). Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity - a review. *Environ. Int.* 96.
- Long, B. Y. (2015). Tolerance to organic loading rate by aerobic granular sludge in a cyclic aerobic granular reactor. *Bioresour. Technol.* 182, 314-322.
- Loos, R. T. (2017). Analysis of emerging organic contaminants in water, fish and suspended particulate matter (SPM) in the joint Danube survey using solid-phase extraction followed by UHPLC MS-MS and GC-MS analysis. *Sci. Total Environ.* 607-608.
- López-Palau, S. P.-Á. (2012). ORP slope and feast-famine strategy as the basis of the control of a granular sequencing batch reactor treating winery wastewater. *BioChem. Eng. J.*, 190-198.
- Lopez-Vazquez, C. H. (2009). Temperature effects on glycogen accumulating organisms . *Water Res.* 43, 2852-2864.
- Luo W, H. F. (2014). High retention membrane bioreactors: challenges and opportunities. *Bioresour Technol* 167, 539-546.
- Luo, J. H. (2014). Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge. *Water Res.* 62, 127–135.
- Luo, J. Z. (2020). Potential influences of exogenous pollutants occurred in waste activated sludge on anaerobic digestion: a review. *J. Hazard Mater.* 383.
- Luo, Y. G. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.*, 473-747.
- Luong N. Nguyen, L. D. (2019). Cometabolic biotransformation and impacts of the anti-inflammatory drug diclofenac on activated sludge microbial communities. *Science of the Total Environment* 657.
- Lv Y, W. C. (2014). Microbial communities of aerobic granules: granulation mechanisms. *Bioresour Technol* .
- Madikizela, L. T. (2017). Status of pharmaceuticals in African water bodies: occurrence, removal and analytical methods. *J. Environ. Manag.* 193.
- Manavi, N. K. (2017). The development of aerobic granules from conventional activated sludge under anaerobic-aerobic cycles and their adaptation for treatment of dyeing wastewater. *Chem. Eng. J.* 312.
- Manickam, N. P. (2012). Nitratireductor lucknowense sp. nov., a novel bacterium isolated from a pesticide contaminated soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101 (1), 125-131.
- Marchlewicz, A. D. (2016). *Bacillus thuringiensis* B1 (2015b) is a gram-positive bacteria able to degrade naproxen and ibuprofen. *Water Air Soil Pollut*, 1-8.
- Marinelli, A. (2020). Soluzione per il controllo dei composti farmaceutici nelle acque reflue. *Authorea Inc.*
- Maszenan, A. L. (2011). Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. *Biotechnol. Adv.* 29, 111-123.

- Matongo, S. B. (2015). Occurrence of selected pharmaceuticals in water and sediment of Umgeni River, KwaZulu-Natal, South Africa. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 10298-10308.
- McSwain, B. I. (2005). composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1051-1057.
- Metcalf & Eddy, I. (2003). Wastewater Engineering, Treatment and Reuse, Fourth Edition.
- Mezzelani, M. G. (2018a). Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, ibuprofen and Ketoprofen: insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes. *Chemosphere* 198.
- Mohamed S. Elshikh, D. S.-k.-N. (2022). Diclofenac removal from the wastewater using activated sludge and analysis of multidrug resistant bacteria from the sludge. *Environmental Research* 208.
- Mohamed S. Zaghloul, A. M. (2023). Digestibility of Aerobic Granular Sludge: A Mini Review. *Processes*, 11.
- Morgenroth E, S. T. (1997). Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Res* , 3191-3194.
- Mosquera-Corral, A. d. (2005). Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Res* 39, 2676-2686.
- Moy, B. T. (2002). High organic loading influences the physical characteristics of aerobic granules. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 407-412.
- Muz, M. A. (2014). Removal of endocrine disrupting compounds in a lab-scale anaerobic/aerobic sequencing batch reactor unit. *Environ. Technol. (U.K.)* 35, 1055-1063. Tratto da Environ. Technol. (U.K.) 35.
- N. Le-Minh, S. K. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Res.* 44, 4295-4323.
- Naddeo, V., V. Belgiorno, D. Ricco, & D. Kassinos. (2009). Degradation of diclofenac during sonolysis ozonation and their simultaneous application. *Ultrasonics Sonochemistry*, 790–794.
- Nancharaiah YV, K. K. (2018). Aerobic granular sludge technology: mechanisms and biotechnological applications. *Bioresour Technol* 247, 1128-1143.
- Nancharaiah, Y. R. (2018). Aerobic granular sludge technology: mechanisms of granulation and biotechnological applications. *Bioresour. Technol.* 247, 131-141.
- Nancharaiah, Y. V. (2016). Recent advances in nutrient removal and recovery in biological and bioelectrochemical systems. *Bioresour. Technol.* 215, 173-185.
- Nguyen, L. H. (2013). Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Bioresour. Technol.*, 234-241.
- Nikolaou, A. M. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem*, 1225-1234.

- Noor A. Sharani, A. N. (2023). Cultivation of Aerobic Granular Sludge in a Column Bioreactor with 3 h SBR Cycle Time for Low Strength Domestic wastewater. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS* 106.
- Nor-Anuar, A. U. (2012). Strength characteristics of aerobic granular sludge. *Water Sci. Technol.* 65, 309-316.
- O. A Jones, J. L. (2005). Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends Biotechnol* 23, 1363-167.
- Ogunlaja, O. P. (2018). Modeling the biotransformation of trimethoprim in biological nutrient removal system. *Water Sci. Technol*, 144-155.
- Oliver T.I., S. U. (2022). Phosphorus removal from aerobic granular sludge: Proliferation of polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) under different feeding strategies, processes.
- P. A. Fowler, M. B.-S. (2012). Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology* , 355.
- Paíga, P. S.-M. (2013). Pilot monitoring study of ibuprofen in surface waters of north of Portugal. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 2410-2420.
- Pronk M, d. K. (2015). Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment. *Water Res* 84, 207-217.
- Pronk M, G. A. (2017b). Aerobic granular biomass technology: advancements in design, applications and further developments. *Water Pract Technol* 12, 987-996.
- Pronk M, N. T. (2017a). The acid soluble extracellular polymeric substance of aerobic granular sludge dominated by *Deffluviococcus* sp. *Water Res* 122, 148-158.
- Pronk, M. A.-z. (2015). Effect and behaviour of diferente substrates in relation to th formation of aerobic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5257-5268.
- Qin, L. T. (2004). Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Process Biochem.* 39, 579-584.
- Quintelas, C. C. (2013). Bioremoval of diethylketone by the synergistic combination of microorganisms and clays: uptake, removal and kinetic studies. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 1374-1383.
- Riccardo Campo, E. C. (s.d.).
- Riccardo Campo, E. C. (2022). Recovery of structural extracellular polymeric substances (sEPS) from aerobic granular sludge: Insights on biopolymers characterization and hydrogel properties for potential applications. *Journal of Environmental Management*.
- Rubio-Rincón, F. W.-V. (2019). *Candidatus accumulibacter delftensis*?: a clade IC novel polyphosphate-accumulating organism without denitrifying activity on nitrate. *Water Res.* 161, 135-151.
- S. Esplugas, J. G. (2002). Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. *Water Res.* 36, 1034-1042.
- S. Irmak, E. K. (2004). Degradation of 4-chloro-2-methylphenol in aqueous solution by UV irradiation in the presence of titanium dioxide. *Appl. Catal. B Environ.* 54, 85-91.

- Sarma SJ, T. J. (2018). Carbon, nitrogen and phosphorus removal mechanisms of aerobic granules. *Crit Rev Biotechnol* 38, 1077-1088.
- Sarma, S. T. (2017). Finding knowledge gaps in aerobic granulation technology. *Trends Biotechnol* 35, 66-78.
- Sarvajith, M. R. (2018). Textile dye biodecolourization and ammonium removal over nitrite in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Hazard. Mater.* 342, 536-543.
- Sathishkumar, P. A. (2015). Modified phyto-waste Terminalia catappa fruit shells: a reusable adsorbent for the removal of micropollutant diclofenac. *RSC Adv.* 5, 20950-30962.
- Scarpa, A. (s.d.). Contaminanti emergenti nelle acque reflue: una bomba.
- Scheurell, M. F. (2009). Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan. *Chemosphere* 77 (6), 870-876.
- Schmidt, S. H. (2018). Liquid chromatography tandem mass spectrometry detection of diclofenac and related compounds in water samples. *J. Chromatogr. A* 1538.
- Seviour T, Y. Z. (2012). Aerobic sludge granulation: a tale of two polysaccharides? *Water REs* 46, 4803-4813.
- Sheik AR, M. E. (2014). A hundred years of activated sludge: time to rethink. *Front Microbiol* , 5-47.
- Sheng, G. Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnol. Adv.* 28.
- Silvio Luiz de Sousa Rollemberg, A. R. (2018). Aerobic granular sludge: Cultivation parameters and removal mechanisms. *Bioresource Technology* 270.
- Srdana Kolakovic, R. S. (2022). Diclofenac biotransformation in the enhanced biological phosphorus removal process. *Science of the Total Environment* 806.
- Sutherland. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 3-9.
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147.
- SVESTKOVA, T. e. (2019). Use of Advanced Oxidation Processes for Water Treatment. *FEB-FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN*, 831.
- Szabó, E. L. (2017). Microbial population dynamics and ecosystem functions of anoxic/aerobic granular sludge in sequencing batch reactors operated at different organic loading rates. *Front. Microbiol.* 8, 201-207.
- Tay, J. L. (2001). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 227-233.
- Tay, J. L. (2004). Effect of organic loading rate on aerobic granulation. I: reactor performance. *J. Environ. Eng.* 130, 1094-1101.
- Tay, J. Y. (2002). Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 332-337.
- Tobajas, M. M. (2012). Enhancement of cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol induced with phenol and glucose as carbon sources by *Comamonas testosteroni*. *J. Environ. Manag.* 95, 116-121.

- Tran, N. R.-H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Res*, 182-207.
- Tran, N. U. (2009). The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *J. Hazard. Mater.* 171 (1), 1051-1057.
- V. Acuña, A. G. (2015). Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment Internationa*.
- V. Naddeo, D. R. (2012). Degradation of Antibiotics in Wastewater during Sonolysis Ozonation, and Their Simultaneous Application: Operating Conditions Effects and Processes Evaluation. *International Journal of Photoenergy*, 1-7.
- V. Naddeo, M. N. (2020). Removal of contaminants of emerging concern from real wastewater by an innovative hybrid membrane process UltraSound Adsorption and Membrane ultrafiltration (USAMe). *Ultrasonics Sonochemistry* 68.
- V.K. Gupta, A. R. (2008). Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: Kinetics and equilibrium studies. *J. Hazard. Mater.* 152, 407-414.
- V.K. Gupta, R. J. (2007). Photochemical degradation of the hazardous dye Safranin-T using TiO₂ catalyst. *J. Colloid Interface Sci.* 309, 464-469.
- V.R.A. Ferreira, C. A. (2016). Fluoroquinolones biosorption onto microbial biomass: Activated sludge and aerobic granular. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 110, 53–60.
- van Loosdrecht MCM, B. D. (2014). Water treatment. Anticipating the next century of wastewater treatment. *Science*, 1452-1453.
- Van Tung Tra a, V. T.-D. (2023). Enhance diclofenac removal in wastewater by photocatalyst process combination with hydrogen peroxide. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*.
- Van Tung Tra, V. T.-D.-V.-H.-Y.-N.-G.-S. (2023). Enhance diclofenac removal in wastewater by photocatalyst process combination with hydrogen peroxide. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*.
- Vânia S. Bessa, I. S. (2021). Biological removal processes in aerobic granular sludge exposed to diclofenac. *Environmental Technology*.
- Vashi, H. I. (2019). Extensive studies on the treatment of pulp mill wastewater using aerobic granular sludge (AGS) technology. *Chem. Eng. J.*, 1175-1194.
- Wan, C. C. (2015). Formation of bacterial aerobic granules: role of propionate. *Bioresour. Technol.* 197, 489-494.
- Wang X, W. S. (2015). Treating low carbon/nitrogen (C/N) wastewater in simultaneous nitrification-endogenous denitrification and phosphorous removal (SNDPR) systems by strengthening anaerobic intracellular carbon storage. *Water Res* 77, 191-200.
- Wang, G. Z. (259-265). Co-metabolic biodegradation of acetamiprid by *Pseudoxanthomonas* sp. AAP-7 isolated from a long-term acetamiprid-polluted soil. *Bioresour. Technol.* 150.

- Wang, H. S. (2018). Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor with high dissolved oxygen: effects of carbon to nitrogen ratios. *Sci. Total Environ.* 15 .
- Wang, J. L. (2014a). Cultivation of aerobic granules for polyhydroxybutyrate production from wastewater. *Bioresour. Technol.* 159, 442-445.
- Wang, L. L. (2015). Biosorption of Sr(II) from aqueous solutions using aerobic granules: equilibrium and mechanisms. *J. Radioanaly. Nuc. Chem.* 306, 193-202.
- Wang, X. O. (2017). The link of feast phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production. *Water Res.* 112, 269-278.
- Wang, Z. L. (2005). Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 469-473.
- Wei, D. W. (2015). Role of extracellular polymeric substances in biosorption of dye wastewater using aerobic granular sludge. *Bioresour. Technol.* 185, 14-20.
- Weissbrodt, D. N. (2013). Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. *Front. Microbiol.* 4, 1-18.
- Wilén BM, L. R. (s.d.). The mechanisms of granulation of activated sludge in wastewater treatment, its optimization, and impact on effluent quality. *Appl Microbiol Biotechnol* , -.
- Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H. C. (1999). Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structures and Function. *Springer-verlag.: Berlin Heidelberg.*
- Winkler MH, L. Q. (2015). Influence of partial denitrification and mixotrophic growth of NOB on microbial distribution in aerobic granular sludge. *Environ Sci Technol* , 11003-11010.
- Winkler M-KH, S. L. (2019). New directions in biological nitrogen removal and recovery from wastewater. *Curr Opin Biotechnol* 57, 50-55.
- Winkler, M. K. (2011). Segregation of biomass in cyclic anaerobic/aerobic granular sludge allows the enrichment of anaerobic ammonium oxidizing bacteria at low temperatures. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7330-7337.
- Winkler, M. K. (2012). Integration of anammox into the aerobic granular sludge process for main stream wastewater treatment at ambient temperatures. *Water Res.* 46, 136-144.
- Wu, D. Z. (2018). Optimization of F/M for stability of aerobic granular process via quantitative sludge discharge. *Bioresour. Technol.* 252, 150-156.
- WWF, T. C. (s.d.). http://wwf.panda.org/about_our_earth/teacher_resources/webfieldtrips/toxics/.
- Xia J, Y. L. (2018). Microbial community structure and function in aerobic granular sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 3967-3979.
- Y.L.Pang, A. S. (2011). Review on sonochemical methods in the presence of catalysts and chemical additives for treatment of organic pollutants in wastewater. *Desalination* 277, 1-14.
- Y.V. Nancharaiaha, G. K. (2018). Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications. *Bioresource Technology.*

- Yang, S. H. (2016). Occurrence of trace organic contaminants in wastewater sludge and their removals by anaerobic digestion. *Bioresour. Rep. Technol.*, 153-159.
- Yang, S. L. (2008). Formation and characterization of fungal and bacterial granules under different feeding alkalinity and pH conditions. *Process Biochem.* 43, 8-14.
- Yarlagadda V. Nancharaiah, M. S. (2019). Aerobic granular sludge process: a fast growing biological treatment for sustainable wastewater treatment. *ScienceDirect*.
- Yu, T. L. (2011). Biodegradation and bio-sorption of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs using immobilized cell process. *Chemosphere* 84, 1216-1222.
- Yuan Q, G. H. (2019). Strategies to improve aerobic granular sludge stability and nitrogen removal based on feeding mode and substrate. *Int J Environ SCI* 84, 144-154.
- Zhang B, J. M. (s.d.). Microbial population dynamics during sludge granulation in an anaerobic-aerobic biological phosphorus removal system. *Bioresour Technol* , -.
- Zhang, Chang, C. H., Lou, J. L., Zhao, M. R., & Lu, C. (2018). Potential human exposures to neonicotinoid insecticides. *Environmental Pollution*, 71-88.
- Zhang, L. F. (2007). Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzym. Microb. Technol.* 41.
- Zhao, J. X. (2020). Diclofenac inhibited the biological phosphorus removal: performance and mechanism. *Chemosphere* 243.
- Zhao, Y. F. (2018). Insight into the aggregation capacity of anammox consortia during reactor start-up. *Environ. Sci. Technol.* 52 .
- Zheng, Y. Y. (2006). Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere* 63, 1791-1800.
- Zhou, J. Z. (2016). Optimizing granules size distribution for aerobic granular sludge stability: Effect of a novel funnel-shaped internals on hydraulic shear stress. *Bioresour. Technol.* 216, 562-570.
- Zhu, L. X. (2008). A comparative study on the formation and characterization of aerobic 4-chloroaniline-degrading granules in SBR and SABR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 867-874.
- Zhu, L. Y. (2013). Optimization of selective sludge discharge mode for enhancing the stability of aerobic granular sludge process. *Chem. Eng. J.* 213, 442-446.

“In this terrifying world,
all we have are the connections that we make”

-Bojack Horseman