



Agenzia nazionale per le nuove tecnologie,
l'energia e lo sviluppo economico sostenibile



MINISTERO DELLA TRANSIZIONE ECOLOGICA



Ricerca di Sistema elettrico

Ottimizzazione di bioreattori microaerobici e anaerobici per il trattamento di acque reflue urbane e fanghi della depurazione

G. Esposito, S. Papirio, A. Cesaro, F. Di Capua, M. Fabbricino, F.
Pirozzi



Report RdS/PTR2020/098

OTTIMIZZAZIONE DI BIOREATTORI MICROAEROBICI E ANAEROBICI PER IL TRATTAMENTO DI ACQUE REFLUE URBANE E FANGHI DELLA DEPURAZIONE

G. Esposito, S. Papirio, A. Cesaro, F. Di Capua, M. Fabbricino, F. Pirozzi
Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile e Ambientale, Università degli Studi di Napoli Federico II

Aprile 2021

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico (oggi Ministero della Transizione Ecologica) - ENEA

Piano Triennale di Realizzazione 2019-2021 - II annualità

Obiettivo: N. 1 - Tecnologie

Progetto: 1.6 - Efficienza energetica dei prodotti e dei processi industriali

Work package: 5 - Efficientamento energetico degli impianti di depurazione municipale e del trattamento delle acque reflue in ambito industriale

Linea di attività: LA5.6 Valutazione delle prestazioni di bioreattori MBBR microaerobici per la rimozione simultanea di carbonio, azoto e fosforo dalle acque reflue urbane

Responsabile del Progetto: Miriam Benedetti, ENEA

Responsabile del Work package: Davide Mattioli, ENEA

Il presente documento descrive le attività di ricerca svolte all'interno dell'Accordo di collaborazione tra ENEA e Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile ed Ambientale (DICEA) dell'Università degli Studi di Napoli Federico II per una attività di ricerca dal titolo: *"Ottimizzazione di bioreattori microaerobici e anaerobici per il trattamento di acque reflue urbane e fanghi della depurazione"*

Responsabile scientifico ENEA: Davide Mattioli

Responsabile scientifico DICEA: Prof. Giovanni Esposito

Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE.....	5
2 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI.....	9
2.1 PREMESA	9
2.2 PROCESSO COMBINATO DI SND E RIMOZIONE DI P IN UN REATTORE IAMBRR	9
2.2.1 <i>Coltivazione della biomassa denitrificante e nitrificante</i>	9
2.2.2 <i>Set-up sperimentale</i>	10
2.2.3 <i>Sviluppo di un sistema di controllo automatizzato dell'ossigeno tramite piattaforma Raspberry Pi</i>	10
2.2.4 <i>Avvio del bioreattore e composizione influente</i>	10
2.2.5 <i>Esercizio del reattore IAMBRR</i>	11
2.2.6 <i>Test di attività microbica in condizioni batch</i>	11
2.2.7 <i>Analisi della comunità microbica</i>	11
2.2.8 <i>Raccolta e analisi dei campioni</i>	12
2.2.9 <i>Analisi statistica</i>	12
2.2.10 <i>Risultati</i> 12	
2.3 PROCESSO COMBINATO DI SPND E RIMOZIONE DI P IN REATTORI MBBR ALIMENTATI CON ACETATO ED ETANOLO	30
2.3.1 <i>Set-up sperimentale</i>	30
2.3.2 <i>Coltivazione della biomassa</i>	30
2.3.3 <i>Start-up dei bioreattori e composizione dell'influente</i>	30
2.3.4 <i>Esercizio dei reattori MBBR</i>	31
2.3.5 <i>Calcolo delle efficienze</i>	31
2.3.6 <i>Analisi microbiologiche</i>	32
2.3.7 <i>Metodi analitici</i>	33
2.3.8 <i>Analisi statistica dei dati</i>	33
2.3.9 <i>Risultati</i> 33	
2.4 SVILUPPO DI UN MODELLO PREVISIONALE MEDIANTE ALGORITMI DI MACHINE LEARNING.....	52
2.4.1 <i>Premessa</i> 52	
2.4.2 <i>Metodologia e modelli previsionali utilizzati</i>	52
2.4.3 <i>Risultati</i> 53	
3 CONCLUSIONI	57
4 DISSEMINAZIONE.....	57
5 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	58
CURRICULUM SCIENTIFICO DEL GRUPPO DI LAVORO	65

Sommario

Nei tradizionali impianti a fanghi attivi, la rimozione biologica dell'azoto (BNR) è ottenuta generalmente attraverso due processi separati, e cioè tramite la nitrificazione e la denitrificazione. Durante il processo di nitrificazione, i batteri ammonio ossidanti (AOB) ossidano l'ammoniaca (NH_4^+) in nitriti (NO_2^-), mentre i batteri nitrito ossidanti (NOB) ossidano i NO_2^- in nitrati (NO_3^-). Durante il processo di denitrificazione, i batteri denitrificanti (DNB) riducono i NO_3^- a NO_2^- e infine producono N_2 . Poiché i NO_2^- sono prodotti durante la nitrificazione e poi consumati durante la denitrificazione, l'ossidazione dei NO_2^- da parte degli NOB può essere considerato uno step non indispensabile. Da qui nasce il concetto di nitrificazione parziale come interessante alternativa alla nitrificazione completa. La nitrificazione parziale prevede infatti alcuni vantaggi, tra cui un risparmio energetico, dato che si ha una richiesta minore di ossigeno, e un ridotto consumo di COD per l'attività dei denitrificanti. Il processo di nitrificazione e denitrificazione simultanee, nota come *simultaneous nitrification and denitrification* (SND), inoltre, è in grado di rimuovere l'azoto all'interno dello stesso bioreattore in specifiche condizioni operative.

Nell'ambito della linea di attività oggetto del presente report, sono stati utilizzati reattori a biofilm a letto mobile (MBBR) a flusso continuo eserciti alternando condizioni microaerobiche e aerobiche al fine rimuovere carbonio, azoto e fosforo mediante un processo di nitrificazione e denitrificazione simultanee accoppiate alla rimozione del fosforo. In un primo studio, un reattore MBBR è stato esercito con diversi intervalli di ossigeno disciolto (DO) (0.2-2, 0.2-3 e 0.2-4 mg L^{-1}) e rapporti C/N nell'influenza (2.8, 3.6 e 4.2) ad un HRT di 1 giorno. Con un intervallo di DO di 0.2-3 mg L^{-1} e un rapporto C/N nell'influenza di 3.6, il reattore MBBR ha ottenuto una rimozione simultanea di carbonio organico disciolto (DOC), azoto inorganico totale (TIN) e P-PO_4^{3-} con efficienze medie di rimozione rispettivamente di 100%, 62% e 75%. L'analisi delle comunità microbiche all'interno del reattore ha rivelato la coesistenza di batteri nitrificanti e denitrificanti con capacità di accumulo del fosforo (*Hydrogenophaga* e *Dokdonella*) nel biofilm del reattore IAMBRR. I test di attività in batch hanno mostrato che l'accumulo del fosforo non si è verificato in condizioni anaerobiche o anossiche stabili, né in condizioni aerobiche in assenza di nitrato.

In un secondo studio è stata esaminata la fattibilità di un processo combinato di nitrificazione e denitrificazione parziale simultanee (SPND) e rimozione biologica del fosforo in reattori MBBR alimentati con diverse fonti di carbonio, cioè etanolo e acetato. La coltivazione della biomassa nitrificante a pH 8.2 (± 0.2), 26-28°C e età del fango (SRT) di 4 giorni ed il funzionamento del reattore MBBR in condizioni microaerobiche/aerobiche hanno permesso di ottenere efficienze di rimozione di DOC, TIN e P-PO_4^{3-} del 100%, 81-88% e 83-86% ad un HRT di 1 giorno, DO di 0.2-3 mg L^{-1} e rapporti C/N e C/P di alimentazione rispettivamente di 3.6 e 11. L'utilizzo di acetato come fonte di sostanza organica ha favorito lo sviluppo di una comunità microbica più diversificata rispetto al reattore alimentato con etanolo, in cui invece è stata osservata una maggiore crescita di batteri eterotrofi all'aumentare del rapporto C/N nell'influenza. Il sequenziamento tramite Illumina ha mostrato la presenza di microorganismi accumulanti fosforo (PAO) putativi come *Hydrogenophaga* e *Pseudomonas* sia nel biofilm MBBR che nella biomassa sospesa, mentre non è stato identificato alcun NOB tipico, dimostrando l'effettiva realizzazione di un processo SPND.

1 Introduzione

L'azoto (N) e il fosforo (P) sono nutrienti essenziali per tutte le forme viventi [1]. Tuttavia, un eccessivo scarico di azoto e fosforo nelle acque superficiali può determinare una crescita anomala delle alghe e, di conseguenza, un impoverimento dell'ossigeno disciolto all'interno del corpo idrico, con conseguente morte per asfissia delle specie acquatiche [2]. Questo fenomeno è noto come eutrofizzazione e rappresenta un grave problema che può interessare fiumi, laghi ed estuari di tutto il mondo [3]. La crescita esponenziale dell'urbanizzazione negli ultimi anni ha comportato un aumento della produzione di acque reflue ricche di nutrienti [4]. La Direttiva del Consiglio Europeo 271/91 CEE ha focalizzato l'attenzione sulla protezione delle aree sensibili a rischio eutrofizzazione, fissando limiti per le concentrazioni di fosforo totale (TP) e di azoto totale (TN) negli effluenti degli impianti di depurazione delle acque reflue urbane a servizio di comunità con oltre 10000 abitanti equivalenti (AE). Per le piccole comunità (< 2000 AE), l'attuale legislazione nazionale ed europea non obbliga il rispetto dei limiti di scarico richiesti per le comunità più grandi. Tuttavia, a livello locale possono essere fissati limiti di emissione a seconda del corpo idrico ricevente. L'Italia è caratterizzata da un'elevata percentuale di località poco popolate, in quanto quasi il 44% dei comuni conta meno di 2000 abitanti [5]. Come riportato da Lijó et al. (2016), in Italia sono presenti oltre 9000 impianti di trattamento delle acque reflue (WWTP) progettati per massimo 2000 AE. Il trattamento di tipo centralizzato delle acque reflue dei piccoli comuni non è sempre fattibile o l'opzione più economica da adottare [6].

Negli impianti a fanghi attivi, la rimozione biologica dell'azoto (BNR) è ottenuta generalmente attraverso due processi separati, la nitrificazione e la denitrificazione. Durante il processo di nitrificazione, i batteri AOB ossidano l' NH_4^+ in NO_2^- , mentre i batteri NOB ossidano i NO_2^- in NO_3^- . Durante il processo di denitrificazione, i batteri denitrificanti (DNB) riducono i NO_3^- a NO_2^- e infine producono azoto gassoso (N_2). Poiché i NO_2^- sono prodotti durante la nitrificazione e poi consumati durante la denitrificazione, l'ossidazione dei NO_2^- da parte degli NOB può essere considerato uno step non indispensabile. Da qui nasce il concetto di nitrificazione parziale come alternativa interessante alla nitrificazione completa. La nitrificazione parziale prevede alcuni vantaggi, tra cui un risparmio energetico, dato che si ha una richiesta minore di ossigeno, e un ridotto consumo di COD per l'attività dei denitrificanti. Il processo di nitrificazione e denitrificazione simultanee, noto come SND, invece, è in grado di rimuovere l'azoto all'interno dello stesso bioreattore in specifiche condizioni operative.

I sistemi tradizionali per l'implementazione dei trattamenti biologici nella maggior parte degli impianti di depurazione sono costituiti dagli impianti a fanghi attivi. Tuttavia, nei casi in cui tali sistemi non siano opportunamente gestiti o il carico influente di progetto non sia stato correttamente determinato, le efficienze depurative dell'intero impianto possono drasticamente diminuire soprattutto in termini di abbattimento dell'azoto. I sistemi tradizionali a fanghi attivi possono essere efficacemente sostituiti dai sistemi innovativi MBBR che sono in grado di garantire efficienze depurative maggiori e costi di esercizio minori.

Gli MBBR rientrano tra i processi di depurazione biologica a colture adese, basati su colonie di microrganismi che crescono adesi a supporti inerti, formando la cosiddetta pellicola biologica, o "biofilm", deputata allo svolgimento dei processi di degradazione dei substrati contenuti nelle acque reflue influenti. A differenza degli altri sistemi a colture adese, gli MBBR utilizzano l'intero volume del reattore biologico con gli elementi plastici di supporto mantenuti in continuo movimento in una configurazione simile a quella degli impianti a fanghi attivi. Tuttavia, diversamente dai sistemi a fanghi attivi, non è necessario alcun ricircolo dei fanghi, poiché gli aggregati microbici non sono sospesi nella massa liquida ma adesi ad elementi di supporto, che sono mantenuti all'interno del reattore da griglie o stacci appositamente predisposti. Tra i vantaggi significativi dell'applicazione dei reattori MBBR si annoverano:

- Una maggiore efficienza depurativa, sia nella rimozione della sostanza organica che dei composti dell'azoto. A beneficiarne risulta soprattutto il processo di nitrificazione in quanto la biomassa nitrificante autotrofa responsabile del processo di nitrificazione aderisce ai supporti plastici e risulta "più protetta" all'interno del reattore, trovando le migliori condizioni per mantenere elevate le efficienze depurative ed evitare di essere dilavata dal sistema.
- Ridotti ingombri volumetrici e superficiali. Il miglioramento delle cinetiche di degradazione biologica, sia per l'abbattimento della sostanza organica che dei composti azotati, comporta l'utilizzo di fattori di carico superiori e, di conseguenza, volumetrie e superfici delle vasche inferiori rispetto al caso degli impianti a fanghi attivi convenzionali.
- Una maggiore resistenza contro eventuali sostanze xenobiotiche e contaminanti emergenti presenti nei reflui. La configurazione MBBR permette soprattutto ai microrganismi che si trovano nella parte più interna della pellicola biologica di lavorare in condizioni ottimali e di non essere influenzati dalla presenza di sostanze potenzialmente inibenti (quali antibiotici e sostanze stupefacenti) che sempre più spesso si ritrovano all'interno dei reflui civili.

Alla luce di quanto affermato poc'anzi, relativamente alla co-esistenza nel biofilm di più famiglie microbiche, un'applicazione molto interessante della tecnologia MBBR può essere quella rivolta all'abbattimento dell'azoto totale (sia ammoniacale che nitrico). L'utilizzo di un sistema MBBR può comportare la semplificazione del ciclo di trattamento, passando quindi da una classica configurazione di pre-denitrificazione con due fasi biologiche distinte, una anossica e l'altra aerobica, ad una configurazione "mono-stadio" caratterizzata da una sola fase biologica nella quale far sviluppare sia le cinetiche di nitrificazione che denitrificazione. Da un punto di vista economico, questo comporta un risparmio sui costi di investimento iniziali dovendo affrontare la spesa per la realizzazione di una sola fase di trattamento. Ciò va sommato all'assenza di ricircolo del fango biologico, tipico invece degli impianti tradizionali a fanghi attivi, che consente una riduzione anche dei costi di esercizio di un impianto MBBR. Infine, la maggiore economicità di un impianto MBBR dipende anche dalle:

- Migliori caratteristiche di sedimentabilità del fango, ovvero della pellicola biologica, che comportano l'utilizzo di valori maggiori di carico idraulico applicato e valori minori di tempo di detenzione idraulica per il dimensionamento della fase di sedimentazione secondaria, riducendo significativamente le volumetrie e le superfici di ingombro delle vasche di sedimentazione.
- Elevate età del fango, cioè elevati tempi di residenza del fango all'interno delle vasche biologiche in linea acque, che consentono di ridurre la produzione di fango e quindi i costi di esercizio della linea fanghi.

I reattori di tipo MBBR sono stati ampiamente applicati per la rimozione dei nutrienti dalle acque reflue [7]. La presenza di supporti mobili in libero movimento nel reattore permette la formazione di un biofilm stratificato caratterizzato da una comunità batterica variegata dipendente soprattutto dalla composizione delle acque reflue e dalle condizioni operative [8]. I substrati sono trasportati dalla fase liquida nel biofilm attraverso meccanismi di diffusione, e questo determina la formazione di strati aerobici, anossici e anaerobici nel biofilm stesso. Rispetto ai sistemi a biofilm a letto fisso, il reattore MBBR non presenta problemi di intasamento e non è necessario un contro-lavaggio periodico.

La rimozione del fosforo dalle acque negli impianti di depurazione avviene generalmente per via chimica o biologica. Il metodo chimico prevede l'utilizzo di sali metallici (ad esempio cloruro ferrico) volti a far precipitare il fosforo all'interno dei bacini di sedimentazione. L'utilizzo di tale metodo comporta costi notevoli per l'acquisto dei reagenti chimici, nonché un incremento dei volumi di fango prodotto. La rimozione biologica del fosforo viene comunemente definita con l'acronimo EBPR (enhanced biological phosphorus removal) e viene svolta da organismi capaci di accumulare fosforo sotto forma di polifosfati. Tali microorganismi, noti come PAO (phosphorus accumulating organisms), hanno la capacità di accumulare fosfato dalle acque reflue in eccesso rispetto al fabbisogno di crescita (meccanismo noto come *luxury uptake*). Tale metabolismo è generalmente attivato dall'alternanza di condizioni anaerobiche e aerobiche/anossiche [9]. In condizioni anaerobiche, gli acidi grassi volatili (VFA) vengono assorbiti e conservati come poliidrossialcanoati (PHA) all'interno della cellula microbica. I PAO ottengono l'energia dall'idrolisi dei polifosfati intracellulari immagazzinati durante la fase aerobica e rilasciano fosfati nel bulk liquido del reattore. Nella successiva fase aerobica e in assenza di carbonio organico in fase liquida, i PAO utilizzano i PHA immagazzinati come fonte di carbonio ed energia per la crescita, mentre il fosfato viene prelevato dal bulk liquido e immagazzinato sotto forma di polifosfato all'interno della cellula [10,11]. Poiché la quantità di PO_4^{3-} rilasciata durante la fase anaerobica è inferiore alla quantità accumulata durante la fase aerobica o anossica, si ottiene globalmente una rimozione del fosforo, che può essere rimosso prontamente dalle acque reflue attraverso la rimozione del fango.

Studi precedenti hanno dimostrato che la rimozione combinata di COD, azoto e fosforo può essere ottenuta in assenza di una fase anaerobica. Nel ciclo aerobico-anossico, l'accumulo di fosforo viene effettuato dai PAO denitrificanti (DNPAO) durante la fase anossica accoppiando l'assorbimento di polifosfato alla completa riduzione dei nitrati tramite ossidazione diretta dell'acetato. Al contrario, l'assenza di un accettore di elettroni adatto per il metabolismo dei DNPAO durante la fase aerobica (nitrito o nitrito) induce uno stress metabolico che promuove il rilascio di fosforo. Tuttavia, la fase aerobica fornisce una condizione di "digiuno" o *famine* essenziale per sostenere il predominio dei DNPAO sui DNB, essendo i DNPAO in grado di utilizzare l'accumulo interno di fosforo per ottenere l'energia necessaria per il mantenimento delle cellule [12]. In uno studio precedente, Satoh et al. (1998) hanno dimostrato che l'applicazione di un ciclo microaerobico/aerobico in un reattore SBR (sequencing batch reactor) è stato efficace per l'arricchimento dei microrganismi che accumulano PHA. Il ciclo microaerobico/aerobico è una modifica del processo di EBPR convenzionale basato su un ciclo anaerobico-aerobico/anossico, in cui le condizioni anaerobiche sono sostituite da una fase microaerobica.

Gli SBR sono stati ampiamente utilizzati per la rimozione simultanea di azoto e fosforo in quanto consentono facilmente di stabilire e alternare condizioni anaerobiche e aerobiche/anossiche [14–17]. Sebbene sia possibile ottenere una rimozione soddisfacente del fosforo con gli SBR, i sistemi batch vengono utilizzati principalmente per trattare le acque reflue industriali prodotte in modo discontinuo durante la produzione. Inoltre, l'applicazione dei reattori SBR negli impianti di depurazione richiede un gran numero di unità di trattamento, temporizzazione e controllo, nonché un livello di manutenzione più elevato rispetto ai sistemi convenzionali [18,19]. Ciò può comportare eccessivi costi di investimento e gestione per il trattamento delle acque reflue in impianti di piccole dimensioni, a servizio di piccole comunità e aree rurali.

Il processo SND ha acquisito un interesse crescente negli ultimi anni in quanto efficiente ed economico per il trattamento delle acque reflue con bassi rapporti C/N (< 5.0) [20] tipici delle acque reflue urbane [21]. L'SND viene generalmente eseguito in un unico bioreattore, riducendo così il numero di vasche, la superficie occupata e i costi di investimento del sistema di pre-denitrificazione convenzionale [22]. Se la nitratazione (conversione del nitrito in nitrato) è inibita, la rimozione dell'azoto avviene tramite un processo di parziale nitrificazione e denitrificazione simultanee (SPND), anche noto come *shortcut* SND. Il processo SPND offre diversi vantaggi rispetto a quello SND, incluso (1) un consumo inferiore del 25% di ossigeno in fase aerobica

[23], (2) un consumo inferiore del 40% di donatori di elettroni in fase anossica [24], (3) tassi di riduzione di NO_x^- fino a 2 volte più veloci e (4) inferiori emissioni di CO_2 [25]. L'inibizione selettiva dei batteri NOB può essere ottenuta imponendo diverse condizioni, e cioè $\text{pH} > 7.5$ [26], temperatura $> 25^\circ\text{C}$ [20], $\text{SRT} < 5$ giorni, concentrazioni di DO tra 1 e 2 mg L^{-1} [27], rapporto C/N < 6 , ammoniaca libera (FA) nell'intervallo 0.1-5 mg N L^{-1} , concentrazione di acido nitroso libero (FNA) di 0.011-0.026 mg N L^{-1} e condizioni anossiche e aerobiche alternate [28,29]. Ad oggi, il processo SPND è stato principalmente studiato in reattori SBR [24,28,30], mentre esistono solo poche applicazioni in modalità continua. Tra queste, Yang e Yang (2011) sono stati in grado di ottenere un'efficienza di rimozione dell'azoto dell'88% attuando un processo SPND in un MBR a flusso continuo con aerazione intermittente, HRT di 16 h e rapporto COD/N tra 3.7 e 5.6, dimostrando che l'aerazione intermittente è efficace per il mantenimento del processo SPND.

La combinazione della rimozione biologica dell'azoto tramite SPND e della rimozione di fosforo in un bioreattore a flusso continuo rappresenta un'opportunità promettente per ottenere una rimozione dei nutrienti economica dalle acque reflue urbane. Tuttavia, l'accoppiamento del processo SPND alla rimozione di P rappresenta una sfida complicata a causa del potenziale effetto inibitorio dei nitriti sui PAO [20]. Recentemente, Roots et al. [16] hanno accoppiato SPND e rimozione biologica di P alternando condizioni anaerobiche, anossiche e aerobiche in un reattore SBR alimentato con acque reflue aventi concentrazioni di N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} influenti rispettivamente di 13.5–15.8 e 1.8–1.4 mg L^{-1} . Il reattore ha ottenuto efficienze di rimozione medie di COD, N e P RE rispettivamente del 70%, 83% e 81%. Ad oggi, nessuno studio ha ancora coniugato un processo SPND monostadio e la rimozione di P in sistemi a flusso continuo.

L'applicazione di algoritmi di *machine learning* (ML) può essere una soluzione efficace per modellazione di processi non lineari. In generale, i processi biologici mostrano caratteristiche spiccatamente non lineari poiché influenzati da diversi parametri [31]. Khanongnuch et al. [8] ha applicato un modello di rete neurale artificiale (ANN) al fine di prevedere l'efficienza di rimozione di tiosolfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) e NO_3^- e la produzione di SO_4^{2-} in un reattore a letto fluido (FBR) per l'ossidazione anossica di $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ mediante denitrificazione autotrofa. Il modello ANN è stato in grado di prevedere con successo i parametri di output, ottenendo un coefficiente di determinazione (R^2) di 0.90. Altre applicazioni del modello ANN hanno riguardato la valutazione delle prestazioni dei sistemi biologici di trattamento dei gas di scarico [32,33]. Recentemente, l'applicazione di algoritmi Multilayer Perceptron (MLP) e Random Forest (RF) hanno mostrato ottimi risultati in merito alla modellazione di processi complessi e altamente non lineari (es. evapotraspirazione fenomeno nelle zone umide) [34].

2 Descrizione delle attività svolte e risultati

2.1 Premessa

Le attività svolte sono state suddivise in due differenti campagne sperimentali.

Nella prima campagna sperimentale, il processo SND e la rimozione di fosforo sono stati studiati in un reattore in continuo di tipo MBBR esercito in condizioni di aerazione alternata (IAMBBR). In particolare, nel reattore sono state alternate condizioni micro-aerobiche e condizioni aerobiche ($0.2-2 \text{ mg L}^{-1}$, $0.2-3 \text{ mg L}^{-1}$ e $0.2-4 \text{ mg L}^{-1}$) e sono stati sperimentati diversi valori del rapporto C/N (2.8, 3.6 e 4.2), mantenendo un HRT di 1 giorno. Al termine della campagna sperimentale sono state effettuate analisi microbiologiche volte ad illustrare la composizione del biofilm microbico all'interno del reattore nelle differenti condizioni operative testate.

La seconda campagna sperimentale ha riguardato lo studio di un processo di parziale nitrificazione e denitrificazione simultanee (SPND) all'interno di un reattore di tipo MBBR. In tale campagna, il processo SPND è stato condotto in due reattori MBBR a flusso continuo in parallelo alternando condizioni micro-aerobiche a condizioni aerobiche. Inoltre, i due MBBR sono stati alimentati con due differenti composti organici, al fine di studiare l'effetto della fonte di sostanza organica sulla rimozione combinata di carbonio, azoto e fosforo. Un MBBR è stato infatti alimentato con acetato, mentre l'altro MBBR è stato alimentato con etanolo. Anche in questa campagna sperimentale sono state testate differenti condizioni micro-aerobiche (concentrazione di DO tra 0.2 e 3 mg L^{-1} e tra 0.2 e 2 mg L^{-1}) e rapporti C/N E C/P al fine di evidenziare il loro effetto sul processo SPND. Al termine della campagna sperimentale sono state effettuate analisi microbiologiche volte ad illustrare la composizione del biofilm microbico e della biomassa in sospensione all'interno dei due reattori nelle differenti condizioni operative testate.

2.2 Processo combinato di SND e rimozione di P in un reattore IAMBBR

2.2.1 Coltivazione della biomassa denitrificante e nitrificante

Del fango attivo (3.3 g TS L^{-1} , 2.5 g VS L^{-1}) è stato raccolto dal sistema di pre-denitrificazione di un impianto di depurazione locale e utilizzato come fonte microbica per la coltivazione di batteri denitrificanti e nitrificanti. La biomassa denitrificante è stata coltivata in modalità semi-batch in un recipiente di vetro sigillato con un tappo di plastica (D1). Il bioreattore è stato riempito fino a 1.8 L con terreno di coltura, inoculo (200 mL) e supporti mobili di tipo Kaldness K1 (Veolia, Francia) usando un rapporto di riempimento del 50%. Il terreno di coltura è stato preparato con acqua distillata, 0.469 g L^{-1} di nitrato di potassio (KNO_3), 0.798 g L^{-1} di acetato di sodio triidrato ($\text{CH}_3\text{COONa } 3\text{H}_2\text{O}$) e nutrienti come descritti di seguito (mg L^{-1}): $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (150), KH_2PO_4 (50), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20), $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.75), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1), CoCl_2 (0.05). Durante la coltivazione, è stato scelto un rapporto COD/N nell'influente > 5.0 al fine di sostenere il processo di denitrificazione [35]. La miscelazione è stata garantita mediante un agitatore magnetico alla velocità di 120 rpm . Le concentrazioni di NO_3^- , NO_2^- e COD nel reattore sono state monitorate giornalmente e metà della soluzione del reattore è stata sostituita con nuovo terreno di coltura non appena il COD o N-NO_3^- alimentato è stato completamente consumato. È stato insufflato N_2 per 15 minuti dopo la fase di inoculo e ogni *refresh* per garantire condizioni anossiche. La coltivazione della biomassa denitrificante è stata effettuata per un periodo di 100 giorni, fino a quando sono state verificate l'attività denitrificante e la crescita del biofilm nel bioreattore.

La biomassa nitrificante è stata coltivata in un bioreattore di vetro (N1) riempito con 400 mL di terreno di coltura e 100 mL di inoculo. Il terreno di coltura è stato preparato con acqua distillata, 0.246 g L^{-1} di NH_4Cl , 1 g L^{-1} di NaHCO_3 e sostanze nutritive come descritto nella Sezione 2.1. Metà della soluzione del bioreattore è

stata sostituita con nuovo terreno di coltura non appena l'azoto ammoniacale alimentato al reattore è stato consumato. La concentrazione di DO nel reattore è stata mantenuta al di sopra di 5 mg L^{-1} mediante insufflazione di aria tramite una pompa di aerazione e una pietra porosa. La miscelazione è stata fornita da un agitatore magnetico alla velocità di 70 rpm. Il bioreattore per la coltivazione della biomassa nitrificante è stato esercito per quasi 100 giorni e le concentrazioni di NO_3^- , NO_2^- e NH_4^+ sono state misurate giornalmente per valutare l'attività nitrificante.

2.2.2 Set-up sperimentale

Il reattore IAMBRR in scala di laboratorio utilizzato in questo studio è stato un recipiente di vetro del volume di 2 L sigillato da un coperchio in plexiglass con sei aperture per i tubi dell'influente e dell'effluente, sonda DO, insufflazione d'aria, campionamento di liquidi e uscita dei gas. Una pompa peristaltica (Watson-Marlow, Regno Unito) è stata utilizzata per l'alimentazione ed il prelievo dell'effluente dal reattore. Le condizioni di miscelazione sono state garantite utilizzando un agitatore magnetico alla velocità di 110 rpm. L'aria è stata erogata all'interno del reattore IAMBRR con una portata di 0.9 L min^{-1} utilizzando una pompa d'aria per acquario e solubilizzata nel mezzo del reattore attraverso una pietra porosa. La concentrazione di DO è stata monitorata continuamente utilizzando una sonda ottica FDO 925 (WTW, Germania) collegata a un misuratore portatile OXI 3410 (WTW, Germania). Un computer a scheda singola Raspberry Pi 3 Modello B+ (Raspberry Pi Foundation, Regno Unito) accoppiato con il software Python 3.0 (Python Software Foundation, USA) è stato utilizzato per controllare e automatizzare l'aerazione nel reattore. La sonda di DO portatile è stata collegata tramite porta USB al Raspberry Pi, che è stato programmato per accendere e spegnere un relè 5V collegato alla pompa dell'aria a valori di DO selezionati.

2.2.3 Sviluppo di un sistema di controllo automatizzato dell'ossigeno tramite piattaforma Raspberry Pi

L'ossigeno disciolto è stato monitorato e gestito tramite un sistema di controllo automatico costituito da un Raspberry Pi 3b plus (Raspberry Pi Foundation, UK), un intero ecosistema hardware raccolto in un'unica board, e un'apposita sonda ottica FDO 925 (WTW, Germania) connessa ad un lettore portatile di tipo OXI 3410 (WTW, Germania) ed immersa all'interno del reattore h24. Il lettore portatile OXI 3410 invia tramite porta USB il valore del DO al Raspberry Pi 3b plus con un time steps di 5 minuti (**Figura 1**). Successivamente, uno script Python riceve e converte il segnale in valori numerici rendendo quindi possibile la regolazione del DO nel range desiderato ($0.2-2$, $0.2-3$, $0.2-4 \text{ mg/L}$ per esempio) grazie al segnale trasferito alla pompa dell'aria. In particolare, il Raspberry Pi è dotato di una lunga base nera costituita da dentini, denominati GPIO, che offrono la possibilità di collegarsi a molteplici dispositivi elettrici e di svolgere differenti azioni, tra cui accendere e spegnere un relè da 5V (Elegoo, China) che a sua volta accende e spegne la pompa di aerazione. L'aerazione intermittente così ottenuta permette l'alternanza di condizioni anossiche ed aerobiche all'interno dello stesso reattore.

2.2.4 Avvio del bioreattore e composizione influente

L'avviamento del reattore IAMBRR è stato effettuato trasferendo tutti i supporti mobili pieni di biomassa denitrificante dal reattore D1, 250 mL di biomassa nitrificante dal reattore N1 ed influente sintetico nel reattore MBBR fino a raggiungere un volume di 1.5 L. È stato utilizzato un influente sintetico ($\text{pH } 8.0 \pm 0.1$) al fine di poter testare diversi rapporti C/N durante lo studio. L'influente è stato preparato utilizzando con $0.552-1.064 \text{ g L}^{-1}$ di $\text{CH}_3\text{COONa } 3\text{H}_2\text{O}$, 0.246 g L^{-1} di NH_4Cl , 1 g L^{-1} di NaHCO_3 e nutrienti come descritto per la fase di coltivazione della biomassa. Il nitrato di potassio (KNO_3 , 1 g L^{-1}) è stato aggiunto solo durante il periodo di start-up del reattore (**Tabella 1**) per sostenere il processo di denitrificazione. Durante lo studio, l'influente è stato mantenuto in frigorifero alla temperatura di 4°C .

Il reattore IAMBBR è stato esercito per 1 settimana in modalità batch. Metà della soluzione è stata sostituita con nuovo influente non appena tutto il DOC o NH_4^+ è stato consumato. La concentrazione di DO non è stata controllata in questa fase e si è mantenuta tra 0.5 e 3 mg L^{-1} . Successivamente, il reattore IAMBBR è stato utilizzato in modalità continua con un HRT di 2 giorni per un periodo di 35 giorni al fine di consentire la creazione di un biofilm microbico multistrato sui carrier (Start-up, **Tabella 1**). La concentrazione di DO è stata controllata tramite piattaforma Raspberry Pi e mantenuta tra 0.2 e 2 mg L^{-1} .

2.2.5 Esercizio del reattore IAMBBR

Il reattore IAMBBR è stato esercito con un HRT di 1 giorno in 6 diversi periodi sperimentali (**Tabella 1**). Durante il periodo P1 (giorni 36-49), l'intervallo di DO è stato mantenuto nel range 0.2-2 mg L^{-1} ed è stato scelto un rapporto C/N nell'influente di 4.2 in quanto valore ottimale osservato in uno studio precedente per sostenere il processo di simultanei SND e rimozione di fosforo in condizioni microaerobiche. All'inizio del periodo P2 (giorni 50-66), il rapporto C/N nell'influente è stato ridotto da 4.2 a 2.8 riducendo la concentrazione di DOC da 131(± 17) a 94(± 4) mg L^{-1} , in quanto la crescita eccessiva della biomassa sospesa disturbava il monitoraggio della concentrazione di DO. Durante i periodi P3-P5 (giorni 67-122), l'intervallo di DO è stato mantenuto a 0.2-3 mg L^{-1} (P3 e P5) e 0.2-4 mg L^{-1} (P4), mentre le concentrazioni influenti non sono state modificate. All'inizio del periodo P6 (giorno 123), la concentrazione di DOC influente è stata aumentata da 94 (± 12) mg L^{-1} (P2-P5) a 116(± 10) mg L^{-1} (rapporto C/N influente di 3.6) per studiare l'effetto della concentrazione di DOC sulla rimozione del fosforo. La durata media di ogni ciclo durante i periodi P3-P6 è variata tra 65 e 90 min, quasi equamente suddivisa tra condizioni aerobiche e microaerobiche. Durante i periodi P1-P6, il pH e la concentrazione di alcalinità nell'influente sono rimasti stabili rispettivamente a 7.9(± 0.1) e 1052(± 40) $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$.

2.2.6 Test di attività microbica in condizioni batch

Alla fine del periodo P6 sono stati condotti dei test di attività microbica in condizioni batch per valutare le attività nitrificanti, denitrificanti e di rimozione del fosforo del biofilm del reattore IAMBBR in condizioni aerobiche (test ATN), anossiche (test ATD) e anaerobiche (test ATDC). Tutti i test in batch sono stati eseguiti in duplicato per 24 ore alla temperatura di 22(± 2)°C. Il terreno di coltura usato per tutti i test è stato preparato con 244 mg DOC L^{-1} usando $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 32.5 $\text{mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ usando NH_4Cl , 1 $\text{g NaHCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e nutrienti come per la preparazione dell'influente per il reattore IAMBBR. Il NO_3^- (100 mg L^{-1}) è stato aggiunto solo per i test ATD. La concentrazione di DOC è stata raddoppiata rispetto a quella dell'influente usato per il reattore IAMBBR nel periodo P6 al fine di garantire la disponibilità di DOC ai batteri denitrificanti durante l'intero test.

I test ATD e ATDC sono stati condotti in bottiglie di vetro da 100 mL con un volume di lavoro di 50 mL. N_2 è stato insufflato nelle bottiglie per 5 minuti e sono stati usati tappi di gomma e ghiera in alluminio per garantire condizioni anossiche. I test ATN sono stati condotti utilizzando beute a collo largo da 70 mL con un volume di lavoro di 50 mL. Tutti i matracci sono stati inoculati con 10 supporti K1 rivestiti con biofilm raccolti dall'IAMBBR e risciacquati con acqua ultrapura prima dell'inoculo. Successivamente, le bottiglie sono state poste su un agitatore orizzontale ad una velocità di 150 rpm. Questa velocità ha permesso di mantenere una concentrazione di DO di 2.5 (± 0.5) mg L^{-1} nei flaconi ATN durante l'esperimento. I campioni sono stati raccolti 12 volte per misurare le concentrazioni di NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} e DOC nelle bottiglie.

2.2.7 Analisi della comunità microbica

L'analisi della comunità microbica è stata eseguita sulla biomassa adesa ai carrier e raccolta dal reattore alla fine di ogni periodo sperimentale eccetto per il periodo P1. L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando un kit Quick-DNA (Zymo Research, USA). La resa finale e la qualità del DNA estratto sono state determinate utilizzando un fluorometro Qubit 1.0 con dsDNA HS (High-Sensitivity) Assay Kit (Invitrogen, USA).

L'amplificazione PCR, la quantificazione delle librerie, il sequenziamento Illumina, il filtraggio delle sequenze e la classificazione tassonomica sono stati eseguiti come descritto da Ucar et al. (2020).

2.2.8 Raccolta e analisi dei campioni

I campioni liquidi sono stati raccolti quotidianamente (fine settimana e festivi esclusi) dall'IAMBBR alla fine di entrambe le fasi (aerobica e microaerobica) di un singolo ciclo e dalla tanica di influente. I campioni di gas sono stati raccolti periodicamente dall'IAMBBR collegando una busta di raccolta da 1 L all'uscita del gas fino al riempimento. Alla fine di ogni periodo sperimentale, i carriers K1 e la biomassa sospesa sono stati raccolti per le analisi dei solidi sospesi volatili (VSS). COD, pH, alcalinità e le concentrazioni di NO_3^- , NO_2^- e PO_4^{3-} in campioni liquidi sono stati analizzati come descritto da Iannacone et al. (2019). La concentrazione di DOC è stata misurata utilizzando un analizzatore TOC L CSH/CSN (Shimadzu, Giappone). I campioni sono stati filtrati attraverso filtri a siringa da $0.45 \mu\text{m}$ (VWR, USA) prima delle analisi cromatografiche e di DOC. L' N_2O nel gas prelevato è stato misurato utilizzando un gascromatografo Varian Star 3400 dotato di una colonna ShinCarbon ST 80/100 e di un detector ECD. La concentrazione di VSS nel biofilm è stata analizzata secondo la procedura di Classen et al. (2013). Prima dell'analisi VSS, i supporti mobili K1 sono stati aggiunti ad una provetta Falcon contenente 10 mL di acqua ultrapura ed il biofilm è stato distaccato mediante sonicazione (10 min, 45 Hz) seguita da agitazione manuale. La soluzione contenente il biofilm distaccato è stata utilizzata per la determinazione dei VSS.

2.2.9 Analisi statistica

È stata eseguita un'analisi della varianza (ANOVA) dei dati utilizzando lo strumento Data Analysis Tool di Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA). L'ANOVA è stata condotta al fine di determinare le differenze statistiche nei parametri di efficienza, cioè l'efficienza di rimozione di DOC, TIN e TP. La differenza significativa è stata fissata al 95% ($p < 0.05$).

2.2.10 Risultati

Le concentrazioni effluenti sono espresse come medie tra i valori misurati alla fine della fase aerobica e microaerobica di un singolo ciclo, poiché non è stata osservata alcuna differenza significativa tra i profili in fase microaerobica e aerobica di ciascun parametro ($p > 0.05$).

2.2.10.1 Rimozione dell'azoto nel reattore IAMBBR

L'abbassamento dell'HRT da 2 giorni a 1 giorno e l'aumento del rapporto C/N nell'influente da 2.0 a 4.2 all'inizio del periodo P1 hanno determinato un accumulo transitorio di N-NH_4^+ fino a 15 mg L^{-1} (giorno 39), seguito da un aumento della concentrazione di N-NO_2^- dell'effluente (fino a 15 mg L^{-1}) fino alla fine del periodo (**Figura 2**). Nonostante l'efficienza di rimozione del TIN alla fine del periodo P1 abbia raggiunto il 61%, essendo il più alto osservato fino al periodo P6, il rapporto C/N dell'influente è stato ridotto da 4.2 (P1) a 2.8 (P2) poiché l'eccessiva crescita di biomassa sospesa ha portato al malfunzionamento della sonda DO ed ha ostacolato il controllo dell'ossigeno nel bioreattore. Studi precedenti hanno riportato che la crescita eccessiva di batteri aerobi eterotrofi (HAB) può verificarsi con rapporti C/N elevati e sopprimere la nitrificazione nei sistemi SND [39]. L'aumento del rapporto C/N nell'influente e la successiva eccessiva crescita di HAB hanno probabilmente influenzato l'attività di nitrificazione durante il periodo P1, contribuendo all'accumulo di NH_4^+ e NO_2^- .

Durante i periodi P2-P5 (giorni 50-122), il reattore IAMBBR è stato esercito con un rapporto C/N nell'influente di 2.8 e ha mostrato un valore di TIN RE stabile intorno al 40% (**Figura 3**). Tuttavia, i diversi range di DO testati hanno influenzato in modo significativo l'attività nitrificante e denitrificante del biofilm nel reattore, determinando tendenze dinamiche delle concentrazioni di N-NH_4^+ , N-NO_3^- e N-NO_2^- nell'effluente (**Figura 2**).

La concentrazione di N-NH_4^+ dell'effluente durante il periodo P2 è aumentata fino a 9 mg L^{-1} (giorno 56) a seguito della diminuzione del rapporto C/N nell'effluente da 4.2 (P1) a 2.8 (P2). Le basse abbondanze relative (<2%) di batteri nitrificanti osservate alla fine del periodo P2 (Tabella 2) sono state probabilmente responsabili degli alti livelli di N-NH_4^+ che si sono verificate nell'effluente del reattore IAMBRR (**Figura 2**), risultando in un TIN RE inferiore del 12% rispetto a quello osservato alla fine del periodo P1 (giorni 42-49, **Figura 3**). La diminuzione del rapporto C/N nell'influenza ha ridotto l'assorbimento assimilativo di N-NH_4^+ da parte di HAB e ha contribuito ad aumentare i livelli di N-NH_4^+ nell'effluente dell'IAMBRR. La concentrazione di N-NO_2^- nell'effluente durante il periodo P2 è rimasta stabile a $11 (\pm 2) \text{ mg L}^{-1}$, mentre sono state osservate fluttuazioni della concentrazione di N-NO_3^- fino alla fine del periodo (**Figura 2**).

La modifica del range di DO ($0.2\text{-}3 \text{ mg L}^{-1}$) applicato all'inizio del P3 ha determinato un aumento dell'abbondanza di *Nitrosomonas* dall'1.0% al 4.8% (**Tabella 2**) seguito da un immediato recupero dell'efficienza di nitrificazione. La concentrazione di N-NH_4^+ nell'effluente è diminuita rapidamente a 2 mg L^{-1} (giorno 74) ed è rimasta al di sotto di questo valore fino alla fine del periodo P5, tranne il giorno 88 (7 mg L^{-1}). Allo stesso modo, le concentrazioni di N-NO_2^- nell'effluente sono diminuite progressivamente, mentre la concentrazione di N-NO_3^- è aumentata rapidamente per poi rimanere stabile a $16 (\pm 3) \text{ mg L}^{-1}$ fino alla fine del periodo P4 (**Figura 2**). È interessante notare che l'aumento delle concentrazioni di DO all'inizio del P4 ha avuto un effetto negativo sull'abbondanza di *Nitrosomonas*, che è diminuita da 4.8% (P3) a 2.5% (P4) (**Tabella 2**). Tale risultato può essere correlato a una maggiore concorrenza con i batteri HAB per l'azoto ammoniacale, quasi completamente esaurito durante il periodo P4 (**Figura 2**). Durante i periodi P1-P5, il processo combinato di nitrificazione e denitrificazione ha permesso di mantenere il pH dell'effluente ad un valore di $8.0 (\pm 0.1)$, ottimale sia per i batteri nitrificanti che per quelli denitrificanti [40]. Allo stesso modo, la concentrazione di alcalinità nell'effluente è rimasta stabile a $939 (\pm 37) \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Anche le concentrazioni di biomassa adesa ai carrier durante i periodi P1-P5 sono rimaste stabili e pari a $1.1 (\pm 0.2) \text{ mg VSS carrier}^{-1}$, mentre la concentrazione di biomassa sospesa è variata tra 57 mg VSS L^{-1} (P3) e $104 \text{ mg VSS L}^{-1}$ (P5).

L'aumento del rapporto C/N nell'influenza da 2.8 (P3-P5) a 3.6 (P6) è stato vantaggioso per l'aumento del TIN RE ($p < 0.05$). La diminuzione della concentrazione di N-NO_3^- dell'effluente da 19 mg L^{-1} (giorno 122) al di sotto del limite di rilevabilità durante il periodo P6 ha incrementato il TIN RE fino all'82% (62% in media) (**Figura 3**), dimostrando che l'efficienza di denitrificazione era limitata dalla scarsa disponibilità di DOC nei periodi precedenti. Il miglioramento dell'efficienza di denitrificazione durante il periodo P6 è stato anche indicato dalla maggiore abbondanza di DNB nel biofilm del reattore IAMBRR (**Tabella 2**) e dall'aumento del pH (8.3 ± 0.1) e della concentrazione di alcalinità ($1076 \pm 37 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) nell'effluente IAMBRR. La concentrazione di biomassa adesa ai carrier durante il periodo P6 è aumentata di 2.4 volte rispetto al valore medio dei periodi precedenti, mentre la concentrazione di biomassa sospesa è rimasta simile a quella osservata nel periodo P5. La maggiore abbondanza di NOB (*Devosia* e *Nitrospira*) nel biofilm del reattore IAMBRR ha permesso di mantenere le concentrazioni di N-NO_2^- dell'effluente al di sotto di 8 mg L^{-1} . Una possibile spiegazione dell'aumentata abbondanza relativa di NOB durante il periodo P6 è che il concomitante aumento dell'attività denitrificante (**Figura 2**) e l'abbondanza relativa di DNB (**Tabella 2**) abbiano fornito NO_2^- aggiuntivo per la crescita degli NOB (un meccanismo noto anche come *nitrite-loop*), aumentando il rapporto tra le abbondanze relative di NOB e AOB. Inoltre, il funzionamento a basso DO a lungo termine può aumentare significativamente l'affinità dei batteri NOB con l'ossigeno, il che rende gli NOB più competitivi per l'utilizzo del DO disponibile rispetto ai batteri AOB [41]. La minore abbondanza relativa di batteri AOB durante il periodo P6 (**Tabella 2**) può essere attribuita alla competizione con i batteri HAB e NOB per il DO disponibile, la quale ha probabilmente causato una minore efficienza di rimozione di N-NH_4^+ rispetto ai periodi P3-P5 (**Figura 2**).

La concentrazione di N_2O nella fase gassosa è rimasta al di sotto del limite di rilevabilità (1%) durante l'intero studio. Secondo Sabba et al. (2018), l' N_2O nei sistemi SND è prodotto sia dai batteri nitrificanti che dai denitrificanti ed è successivamente ridotto dai denitrificanti. Gli autori spiegano che nei bioreattori aerati con biofilm multistrato co-diffusionali (come nel caso dell'IAMBRR) c'è un maggiore trasferimento di massa di

N_2O verso il bulk liquido aerato piuttosto che verso la zona anossica dove può l' N_2O essere ridotto. In questo studio, il regime di aerazione intermittente e l'elevata concentrazione di biomassa denitrificante nel biofilm del reattore sono stati efficaci nel limitare l'emissione di N_2O in tutte le condizioni testate.

2.2.10.2 Rimozione del fosforo nel reattore IAMBRR

Le concentrazioni di $P-PO_4^{3-}$ dell'effluente nell'IAMBRR durante i periodi P1 e P2 sono state di $10(\pm 1)$ e $8(\pm 1)$ $mg L^{-1}$, portando a valori di $P-PO_4^{3-}$ RE rispettivamente pari a $16(\pm 3)\%$ e $25(\pm 4)\%$ (**Figura 4**). I bassi valori di $P-PO_4^{3-}$ RE osservati in questi periodi possono essere attribuiti agli alti livelli di $N-NO_2^-$ nell'effluente (**Figura 2**), i quali sono aumentati fino a $15 mg L^{-1}$ (giorno 47). Studi precedenti hanno riportato una notevole inibizione della rimozione aerobica di fosforo a causa della presenza di NO_2^- . Jabari et al. (2016) hanno osservato una inibizione crescente della rimozione aerobica di fosfato da parte della biomassa adesa e sospesa proveniente da un sistema IFAS (integrated fixed-film activated sludge) a concentrazioni di $N-NO_2^-$ superiori a $10 mg L^{-1}$. Secondo Saito et al. (2004), effetti inibitori sull'accumulo aerobico del fosforo possono essere osservati già ad una concentrazione di $2 mg N-NO_2^- L^{-1}$, mentre $6 mg N-NO_2^- L^{-1}$ possono portare alla completa inibizione. Gli autori hanno concluso che la rimozione aerobica del fosforo è più sensibile all'inibizione da NO_2^- rispetto alla rimozione del fosforo in condizioni anossiche.

La variazione dell'intervallo di DO a $0.2-3 mg L^{-1}$ all'inizio del periodo P3 ha determinato un aumento immediato di $P-PO_4^{3-}$ RE, che è rimasta a $55(\pm 4)\%$ durante l'intero periodo (**Figura 3**). Al contrario, la variazione dell'intervallo di DO a $0.2-4 mg L^{-1}$ nel periodo P4 ha determinato un netto aumento delle concentrazioni di $P-PO_4^{3-}$ dell'effluente al di sopra dei valori influenti (**Figura 3**), che indica un rilascio di $P-PO_4^{3-}$ dal biofilm del reattore IAMBRR alla fase liquida. Il rilascio di fosforo da parte dei microrganismi è stato probabilmente indotto dalla carenza e dalla competizione con gli HAB per il DOC disponibile, essendo i livelli di DOC degli effluenti al di sotto del limite di rilevabilità durante l'intero periodo P4 (eccetto nei giorni 101-102) (**Figura 4**). In uno studio condotto da Barak e Van Rijn (2000), gli autori hanno osservato il rilascio di fosfato da parte di DNB in condizioni aerobiche dopo che tutto l'acetato è stato esaurito, mentre il fosfato è stato nuovamente assimilato dopo l'aggiunta di acetato. Di conseguenza, la disponibilità di DOC sembra cruciale per supportare la rimozione di $P-PO_4^{3-}$ da parte dei batteri DNB in condizioni aerobiche. I valori di DO più elevati (fino a $4 mg L^{-1}$) sperimentati dal biofilm del reattore IAMBRR durante il periodo P4 hanno innescato la proliferazione di HAB come i *Chryseolinea* (**Tabella 2**) e la competizione con i DNB per il carbonio organico, che ha portato all'inibizione della rimozione di fosforo.

La modifica dell'intervallo di DO a $0.2-3 mg L^{-1}$ all'inizio del periodo P5 ha immediatamente aumentato la $P-PO_4^{3-}$ RE fino ad un valore stabile di $66(\pm 4)\%$ (giorni 117-122), superiore dell'11% rispetto a quello osservato durante il periodo P3 in condizioni operative simili ($p < 0.05$). Il più alto $P-PO_4^{3-}$ RE osservato durante il periodo P5 può essere collegato alla maggiore concentrazione di biomassa sospesa e ai livelli più bassi di NO_2^- nell'effluente del reattore IAMBRR rispetto al periodo P3. Mentre la concentrazione di biomassa adesa nei due periodi è rimasta stabile, la concentrazione di biomassa sospesa è quasi raddoppiata. Le concentrazioni di $N-NO_2^-$ dell'effluente durante il periodo P5 non hanno superato i $5 mg L^{-1}$, mentre sono state osservate concentrazioni fino a $10 mg L^{-1}$ durante il periodo P3 (**Figura 2**).

L'aumento del rapporto C/N nell'influente ad un valore di 3.6 all'inizio del P6 ha notevolmente migliorato il $P-PO_4^{3-}$ RE, che è aumentato di quasi il 10% rispetto alla fine del P5 (giorni 117-122) e del 20% rispetto al periodo P3 ($p < 0.05$), risultando in un valore di $P-PO_4^{3-}$ RE medio del 75% (**Figura 3**). Nonostante l'aumento del rapporto C/N nell'influente, la concentrazione di DOC nell'effluente è rimasta al di sotto del limite di rilevabilità (**Figura 4**), il che significa che il surplus di DOC è stato completamente consumato dalla biomassa del reattore. Le concentrazioni di $N-NO_3^-$ dell'effluente nel periodo P6 sono state significativamente inferiori rispetto a quelle del periodo P5 (**Figura 2**) nonostante il notevole aumento dell'abbondanza di NOB (**Tabella 2**), il che indica che l'aggiunta di acetato ha stimolato la crescita dei batteri DNB. Il concomitante aumento di

P-PO₄³⁻ RE indica che i batteri DNB potrebbero aver giocato un ruolo importante nella rimozione del fosforo in condizioni microaerobiche/aerobiche.

2.2.10.3 Meccanismi per la rimozione del fosforo all'interno del ciclo microaerobico / aerobico

Durante i periodi P3, P5 (giorni 117-122) e P6, sono stati rimossi dall'influenza tra 4.1 e 8.8 mg di P-PO₄³⁻ L⁻¹, ottenendo valori di P-PO₄³⁻ RE tra 42% e 81%. L'assimilazione di fosforo per crescita cellulare, valutato sulla base di un rapporto C:N:P di 100:5:1 [46], è stato compreso tra 12% e il 19%, indicando che la rimozione di P-PO₄³⁻ può essere considerata principalmente come rimozione biologica avanzata del fosforo (*luxury uptake*). I test di attività in batch eseguiti alla fine dello studio hanno mostrato che l'assorbimento di P-PO₄³⁻ non si è verificato in condizioni anossiche e anaerobiche stabili, né in condizioni aerobiche in assenza di NO₃⁻. Sulla base di questi risultati, sia le condizioni microaerobiche/aerobiche che la presenza di NO₃⁻ sono necessarie per innescare la rimozione biologica avanzata del fosforo e ottenere un P-PO₄³⁻ RE soddisfacente nell'IAMBBR.

L'alternanza di condizioni microaerobiche e aerobiche è stata inizialmente sperimentata da Satoh et al. (1998) con l'obiettivo di promuovere l'accumulo di PHA nei fanghi attivi. Gli autori hanno dimostrato che il ciclo microaerobico-aerobico può raddoppiare il potenziale di accumulo di PHA del sistema rispetto a quello ottenuto con l'alternanza di condizioni anaerobiche e aerobiche. In condizioni microaerobiche i microrganismi possono assorbire e accumulare carbonio organico come PHA, mentre l'ossidazione del carbonio organico in condizioni aerobiche fornisce energia per l'attività di assimilazione. Il ciclo microaerobico-aerobico supera il limite energetico per la sintesi PHA del ciclo anaerobico-aerobico, che è rappresentato dalla quantità di poli-P e glicogeno immagazzinati. Fornendo un apporto di ossigeno limitato durante le condizioni microaerobiche, i microrganismi possono utilizzare l'energia ossidativa ottenuta dall'ossidazione dell'acetato esclusivamente per l'accumulo di PHA. In questa condizione, la rottura delle molecole di polifosfato per lo stoccaggio di PHA non è necessaria, mentre l'energia acquisita in condizioni aerobiche tramite l'ossidazione di PHA potrebbe comunque servire a generare granuli di polifosfato, con conseguente accumulo netto di fosforo.

Sebbene il ciclo microaerobico-aerobico non selezioni specificamente i batteri che accumulano P, è noto che la sintesi di polifosfato è un tratto distintivo di molti batteri accumulatori di PHA e dei DNB [45]. Jørgensen e Pauli (1995) hanno dimostrato che i generi *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* e *Comamonas*, tutti rilevati alla fine della P2 (**Figura 5d**), possono accumulare P-PO₄³⁻ in condizioni aerobiche. In particolare, *Hydrogenophaga* è stato incluso tra i DNB effettivi (batteri in grado di convertire più dell'80% di NO₃⁻ in N₂O) coltivati con acetato in grado di sintetizzare granuli di polifosfato in condizioni aerobiche ed ha mostrato una velocità di accumulo del fosforo in condizioni aerobiche di circa 6 mg P g VSS⁻¹ h⁻¹ (considerando un rapporto VSS/TS di 0.5), essendo paragonabile alle velocità osservate per la biomassa di sistemi EBPR su vasta scala [48]. *Hydrogenophaga* è stato il genere dominante nel reattore IAMBBR durante l'intero studio (**Tabella 2**) e sembra aver svolto un ruolo importante nella rimozione del fosforo.

2.2.10.4 Struttura ed evoluzione della comunità microbica nell'IAMBBR

La **Figura 5** mostra la struttura della comunità batterica (con abbondanza relativa > 2%) nel biofilm del reattore IAMBBR durante lo studio a livello di phylum, classe, ordine e genere. I *Proteobacteria* (45.7-65.9%) sono stati il phylum dominante durante l'intero studio, seguiti da *Bacteroidetes* (15.4-22.9%), *Planctomycetes* (4.0-12.3%), *Patescibacteria* (3.3-11.1%) e *Chloroflexi* (1.1-6.5%) (**Figura 5a**). I *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* sono riportati come batteri comunemente coinvolti nella rimozione di azoto e fosforo [49]. Il phylum *Chloroflexi* include batteri capaci di accoppiare la degradazione di un'ampia gamma di composti organici alla rimozione dell'azoto [50]. Le classi dominanti sono rappresentate da *Gammaproteobacteria* (20.5-34.1%),

Alphaproteobacteria (21.9-29.8%) e *Bacteroidia* (15.2-22.0%), seguite da *Planctomycetacia* (4.0-10.2%), *Parcubacteria* (3.3-11.0%) e *Anaerolineae* (0.9-6.0%) (**Figura 5b**). A livello di ordine, i *Rhizobiales*, *Betaproteobacteriales*, *Xanthomonadales* e *Cytophagales* sono stati i più abbondanti nel biofilm del reattore IAMBBR durante lo studio (**Figura 5c**).

La **Tabella 2** elenca i generi batterici più abbondanti (> 4%) nella comunità microbica del biofilm del reattore IAMBBR. *Hydrogenophaga* e *Hyphomonadaceae_SWB02* hanno mostrato abbondanze relative elevate (3.2-11.4%) in tutti i periodi operativi. I membri di questi due generi includono DNB eterotrofi e autotrofi [7,51]. Anche *Rhizobium* (7.3%), *Pseudomonas* (6.1%) e *Thauera* (5.7%) sono stati abbondanti nel biofilm del reattore IAMBBR alla fine del periodo P2 e sono batteri riportati in letteratura come potenziali denitrificanti [7,52,53]. Al contrario, sono state osservate basse abbondanze relative (<2%) per i batteri nitrificanti (**Figura 5d**), e cioè *Nitrosomonas*, *Nitrospira* e *Devosia* [7,54,55].

Alla fine del periodo P3, i generi *Pseudofulvimonas* (7.2%), *Chryseolinea* (6.4%), *Microscillaceae* OLB12 (5.8%) e *Nitrosomonas* (4.7%) hanno mostrato una maggiore abbondanza rispetto al periodo precedente. Al contrario, l'abbondanza relativa di *Pseudomonas* (0,2%), *Thauera* (1,0%) e *Rhizobium* (2,3%) è diminuita significativamente (**Tabella 2, Figura 5d**). I generi *Pseudofulvimonas* e *Chryseolinea* includono HAB [56,57]. Il genere *Nitrosomonas* ha rappresentato il gruppo funzionale chiave correlato all'ossidazione autotrofa dell'ammoniaca nell'IAMBBR.

L'abbondanza relativa di *Chryseolinea* è ulteriormente aumentata durante il periodo P4, raggiungendo il 9.0% alla fine del periodo, mentre è stata osservata una diminuzione dell'abbondanza di *Nitrosomonas* dal 4.8% a 2.5%. I batteri appartenenti al genere *Rhodobacter*, classificati come DNB da Qiu et al. (2020), sono stati rilevati con un'abbondanza del 4.3% a fine periodo. Alla fine del periodo P5, *Microscillaceae* OLB12 (11.9%), *Hydrogenophaga* (7.3%), *Hyphomonadaceae_SWB02* (9.6%), *Nitrosomonas* (6.3%) e *Chryseolinea* (5.9%) sono stati i generi dominanti nel biofilm del reattore IAMBBR (**Tabella 2**).

I risultati del sequenziamento alla fine del periodo P6 hanno mostrato abbondanze relative elevate di batteri precedentemente non rilevati, come *Stappiaceae* (8.9%), *Chryseobacterium* (7.0%) e *Dokdonella* (4.4%) (**Tabella 2**). Al contrario, l'abbondanza relativa di *Hyphomonadaceae_SWB02*, *Microscillaceae* OLB12 e *Nitrosomonas* è stata significativamente inferiore rispetto al periodo precedente. *Chryseobacterium* e *Stappiaceae* sono classificati come HAB, sebbene la respirazione dei nitrati sia un meccanismo diffuso tra i membri della famiglia delle *Stappiaceae* [59]. Allo stesso modo, i membri del genere *Dokdonella* sono stati riconosciuti come microrganismi coinvolti nella rimozione dell'azoto [58,60]. Pishgar et al. (2019) hanno riportato una rimozione di $P-PO_4^{3-}$ di circa il 50% nei sistemi aerobi dominati da *Dokdonella* accoppiata alla riduzione di NO_3^- e NO_2^- , il che suggerisce che i batteri appartenenti al genere *Dokdonella* possono anche svolgere un ruolo nell'accumulo di fosforo. Anche l'abbondanza relativa di *Acidovorax* (3.0%), *Arenimonas* (4.1%), *Luteimonas* (3.0%), *Bdellovibrio* (3.1%), *Nitrospira* (5.0%) e *Devosia* (3.3%) è aumentata in modo significativo durante il periodo P6 (**Tabella 2**). I generi *Arenimonas* e *Luteimonas* appartengono alla famiglia delle *Xanthomonadaceae* e sono riportati in letteratura come DNB [52,61]. Allo stesso modo, molti membri del genere *Acidovorax* possiedono capacità di denitrificazione [7,15]. È interessante notare che l'aumento dei rappresentanti degli NOB *Devosia* e *Nitrospira* da 1.7% (P5) a 8.4% durante il periodo P6 è stato accompagnato da una diminuzione di AOB (*Nitrosomonas*) da 6.3% (P5) a 2.4%.

2.2.10.5 Applicazioni e ricerche future

Sulla base dei risultati di questo studio, il reattore IAMBBR può essere considerato una tecnologia innovativa e promettente per la rimozione simultanea di carbonio organico, azoto e fosforo dalle acque reflue urbane. Efficienze di rimozione più elevate sono state ottenute mantenendo l'intervallo di DO a 0.2-3 mg L⁻¹, mentre i livelli di DO più alti si sono rivelati negativi in termini di $P-PO_4^{3-}$ RE. Per ottenere rimozioni soddisfacenti, il

dosaggio di ossigeno nel reattore IAMBBR deve dunque essere opportunamente limitato, risultando in un risparmio energetico e, dunque, costi di gestione ridotti. In Italia, più del 20% delle acque reflue urbane non trattate è generato da centri abitati e aree rurali con meno di 2000 AE per i quali il trattamento delle acque reflue non è economicamente conveniente. L'IAMBBR offre una soluzione compatta per la rimozione di carbonio e nutrienti ad un costo sostenibile a livello locale.

Le efficienze di rimozione più elevate sono state ottenute con un rapporto C/N nell'influente inferiore a 3.6, mentre l'applicazione di un rapporto C/N di 4.2 ha comportato una crescita eccessiva di HAB in sospensione e un malfunzionamento della sonda di DO. Pertanto, l'utilizzo del reattore IAMBBR per il processo combinato di SND e rimozione del fosforo è consigliato per acque reflue con rapporti C/N < 4 per evitare interruzioni del processo.

Sono necessari ulteriori studi su scala reale e pilota per valutare i costi operativi relativi al funzionamento in regime microaerobico e microaerobico/aerobico e gli effetti dello scale-up sulla rimozione di carbonio e nutrienti. Inoltre, ulteriori studi dovrebbero indagare l'effetto di diversi composti organici sulla rimozione di P-PO₄³⁻ dall'IAMBBR e nel caso di trattamento di acque reflue reali contenenti una concentrazione significativa di sostanza organica scarsamente biodegradabile.

Tabella 1 – Condizioni operative e composizione dell'influente durante l'esercizio del reattore IAMBRR.

Periodo sperimentale	Giorni	HRT (giorni)	DO range (mg L ⁻¹)	C/N ratio	DOC (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	TIN (mg L ⁻¹)	Alcalinità (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	TP (mg L ⁻¹)
Start-up	0 - 35	2	0.2 - 2	2.0 (±0.1)	134 (±17)	33 (±2)	66 (±5)	942 (±102)	11 (±1)
P1	36 - 49	1	0.2 - 2	4.2 (±0.3)	131 (±17)	33 (±1)	33 (±1)	985 (±133)	11 (±1)
P2	50 - 66	1	0.2 - 2	2.8 (±0.5)	94 (±4)	34 (±1)	34 (±1)	1064 (±32)	10 (±1)
P3	67 - 91	1	0.2 - 3	2.9 (±0.3)	96 (±8)	33 (±1)	33 (±1)	1035 (±37)	11 (±1)
P4	92 - 109	1	0.2 - 4	2.8 (±0.1)	94 (±1)	33 (±1)	33 (±1)	931 (±158)	10 (±1)
P5	110 - 122	1	0.2 - 3	2.8 (±0.1)	94 (±3)	33 (±1)	33 (±1)	1036 (±46)	10 (±1)
P6	123 - 173	1	0.2 - 3	3.6 (±0.4)	116(±10)	33 (±0)	33 (±0)	1050 (±36)	10 (±1)

Tabella 2 –Identificazione di gruppo funzionale, genere, abbondanza relativa e affiliazione filogenetica dei principali microorganismi componenti il biofilm e la biomassa sospesa del reattore IAMBBR. Sono riportati solo i generi con abbondanza relativa maggiore del 4%.

Key functional group	Genus	Phylum/family	Relative abundance [%]				
			P2	P3	P4	P5	P6
DNB	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Proteobacteria/Burkholderiaceae</i>	10.9	9.5	6.8	7.3	7.7
	<i>SWB02</i>	<i>Proteobacteria/Hyphomonadaceae</i>	8.1	11.4	8.2	9.6	3.2
	unidentified	<i>Proteobacteria/Rhizobiaceae</i>	4.0	0.9	4.1	1.6	3.7
	<i>Dokdonella</i>	<i>Proteobacteria/Rhodanobacteraceae</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	4.4
	<i>Arenimonas</i>	<i>Proteobacteria/Xanthomonadaceae</i>	0.2	0.1	n.r.	n.r.	4.1
	<i>Thauera</i>	<i>Proteobacteria/Rhodocyclaceae</i>	5.7	1.0	0.3	0.2	0.6
	<i>Planctopirus</i>	<i>Planctomycetes/Schlesneriaceae</i>	0.8	3.5	4.2	4.1	4.1
	<i>Rhizobium</i>	<i>Proteobacteria/Rhizobiaceae</i>	7.3	2.3	0.1	0	0.9
	<i>Rhodobacter</i>	<i>Proteobacteria/Rhodobacteraceae</i>	n.r.	0.8	4.3	0.9	n.r.
	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacteroidetes/Flavobacteriaceae</i>	5.2	1.3	n.r.	n.r.	n.r.
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteobacteria/ Pseudomonadaceae</i>	6.1	0.2	0.1	n.r.	0.2
	HAB	<i>OLB12</i>	<i>Bacteroidetes/Microscillaceae</i>	1.6	5.8	4.7	11.9
<i>Pseudofulvimonas</i>		<i>Proteobacteria/Rhodanobacteraceae</i>	4.8	7.2	4.1	3.0	0.2
<i>Chryseobacterium</i>		<i>Proteobacteria/Weeksellaceae</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	7.0
unidentified		<i>Proteobacteria/Stappiaceae</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	8.9
<i>Chryseolinea</i>		<i>Bacteroidetes/Microscillaceae</i>	1.4	6.4	9.0	5.9	0.9
AOB	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Proteobacteria/Nitrosomonadaceae</i>	1.0	4.8	2.5	6.3	2.4
NOB	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospirae/Nitrospiraceae</i>	n.r.	n.r.	n.r.	0.2	5.0

n.r. = non rilevato.

Tabella 3 – Test di attività in batch con biomassa adesa prelevata dal reattore IAMBRR ed effettuati in condizioni aerobiche (ATN), anossiche (ATD) e anaerobiche (ATDC).

n.r. = non rilevato.

Test	Concentrazione di biomassa (mg VSS carrier⁻¹)	Rimozione specifica del TIN (mg N g VSS⁻¹ h⁻¹)	Accumulo di NO₂⁻ (mg N L⁻¹)	Rimozione specifica di DOC (mg DOC g VSS⁻¹ h⁻¹)	Rimozione specifica di P (mg P g VSS⁻¹ h⁻¹)
ATN	2.6	2.5	n.r.	15.4 (±1.3)	0.3
ATD	2.6	1.9 (±0.1)	n.r.	13.0 (±1.7)	0.1
ATDC	2.6	0.3	n.r.	6.7 (±0.3)	0.1

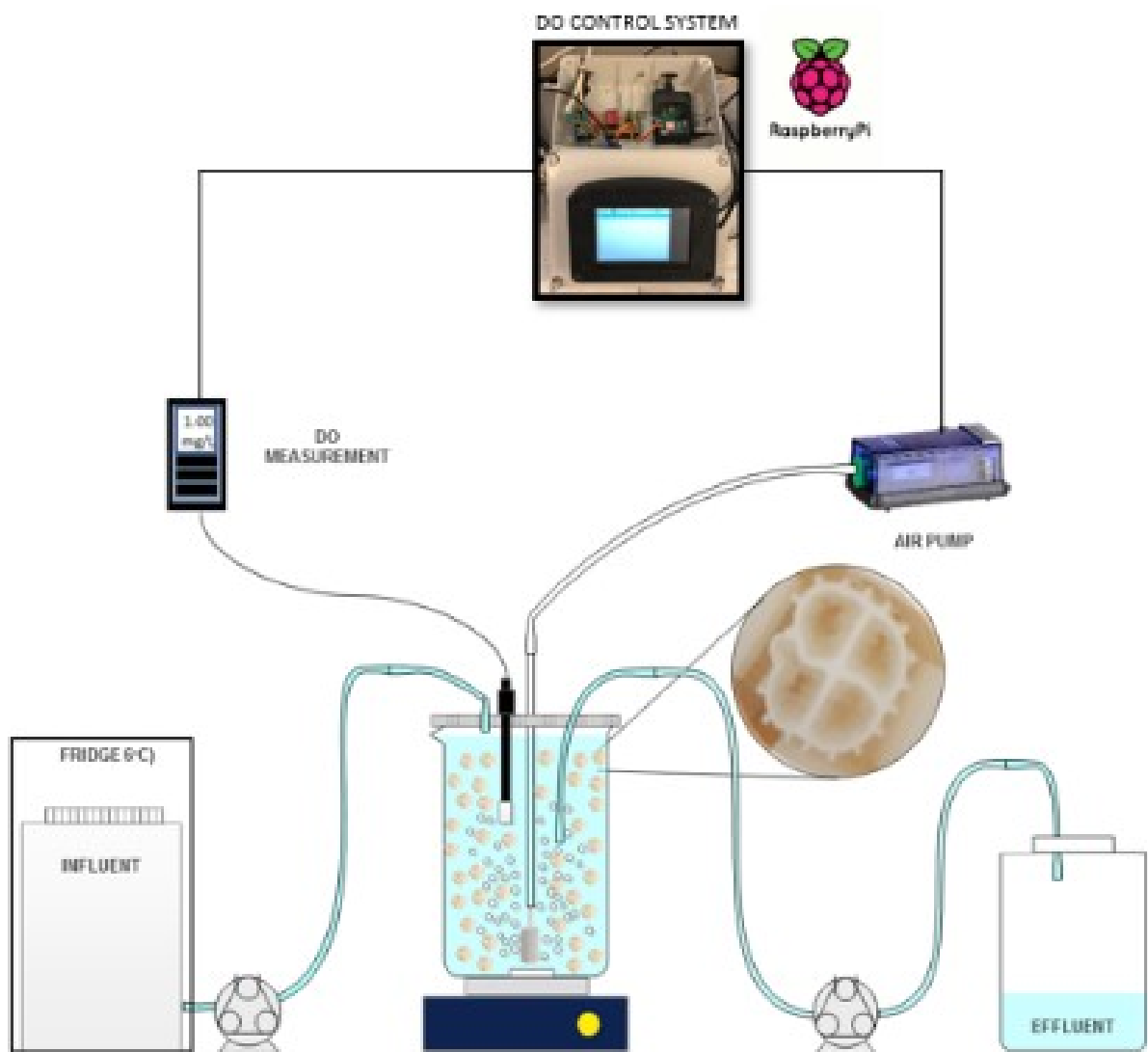


Figura 1 – Schema del reattore IAMBBR con controllo del DO tramite piattaforma Raspberry Pi.

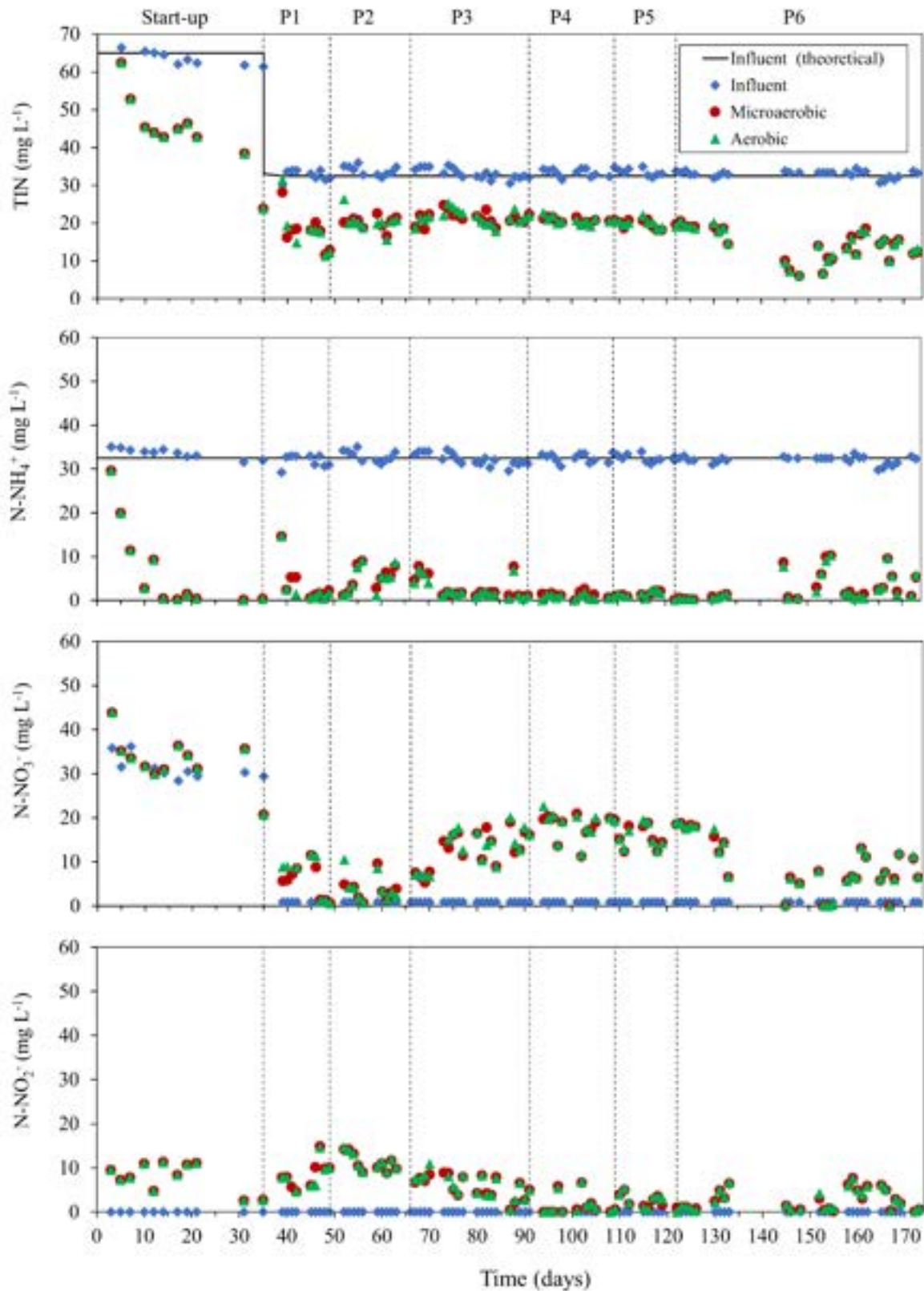


Figura 2 – Andamento delle concentrazioni influenti ed effluenti di TIN, N-NH_4^+ , N-NO_3^- e N-NO_2^- durante l'esercizio in continuo del reattore IAMBRR.

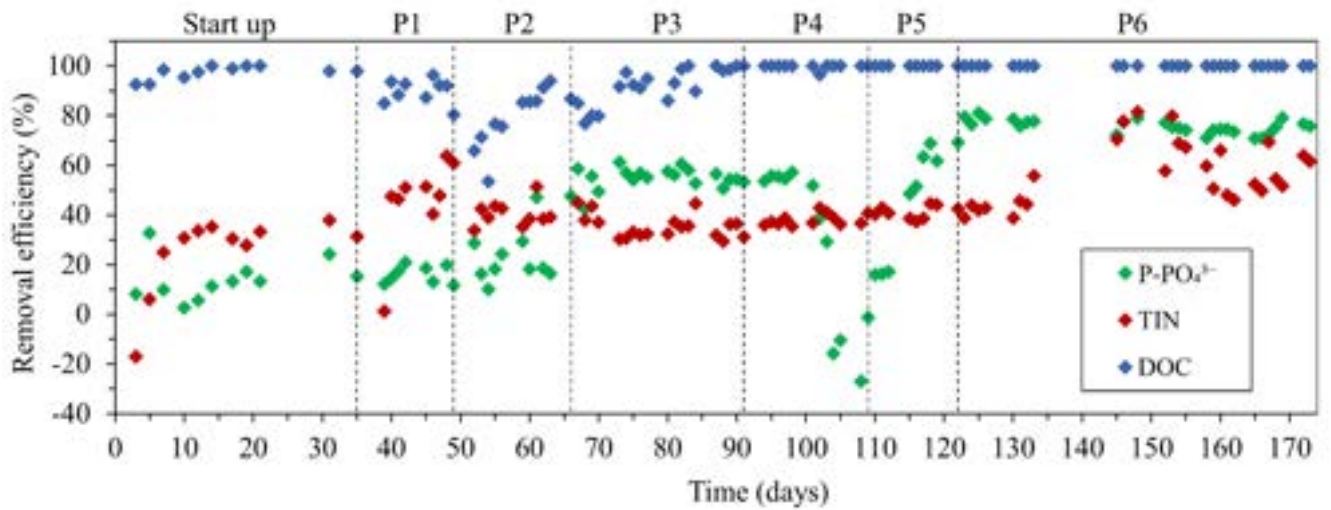


Figura 3 – Efficienze di rimozione di TIN, DOC e P-PO₄³⁻ durante l'esercizio in continuo del reattore IAMBRR.

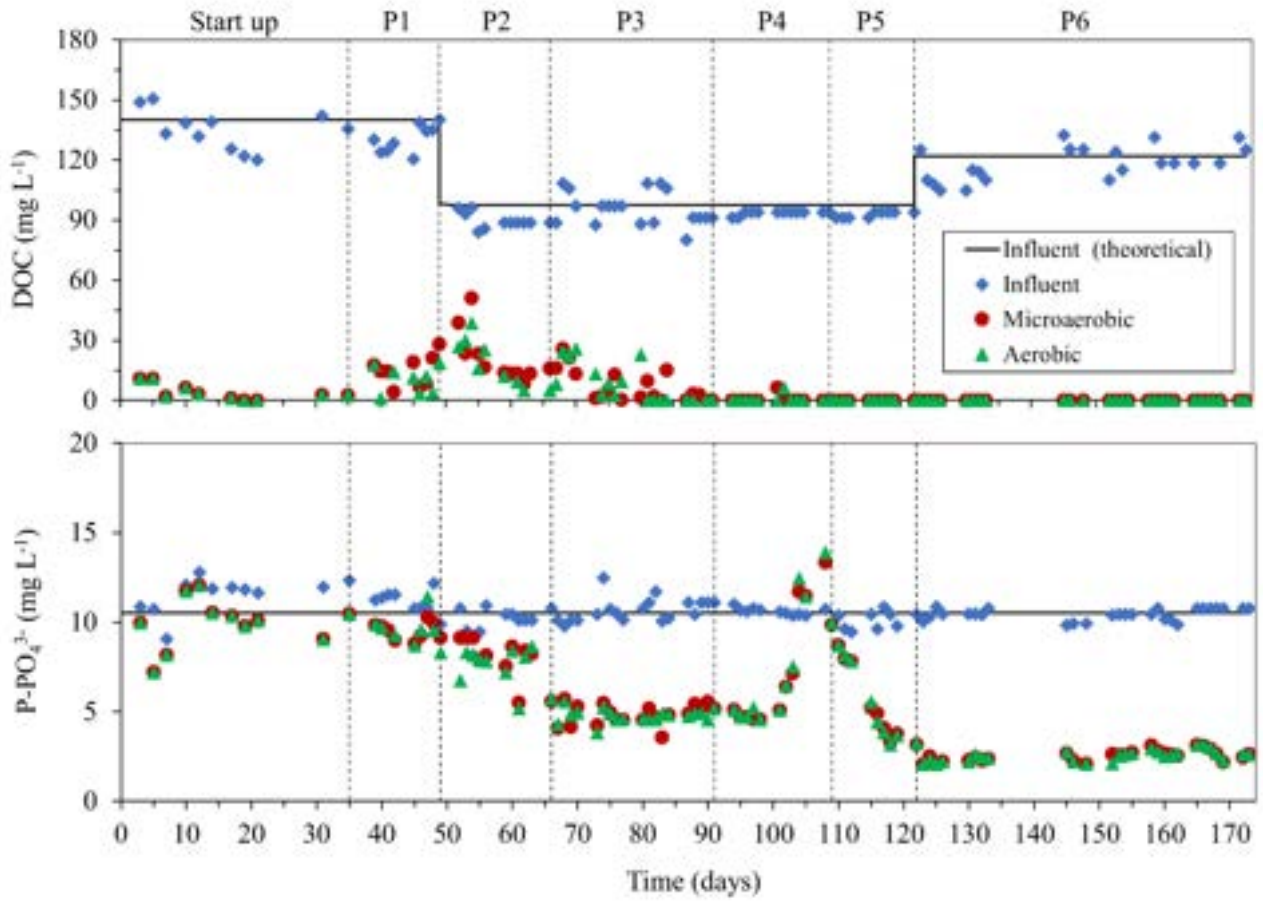


Figura 4 – Concentrazioni influenti ed effluenti di DOC e P-PO₄³⁻ nel reattore IAMBBR.

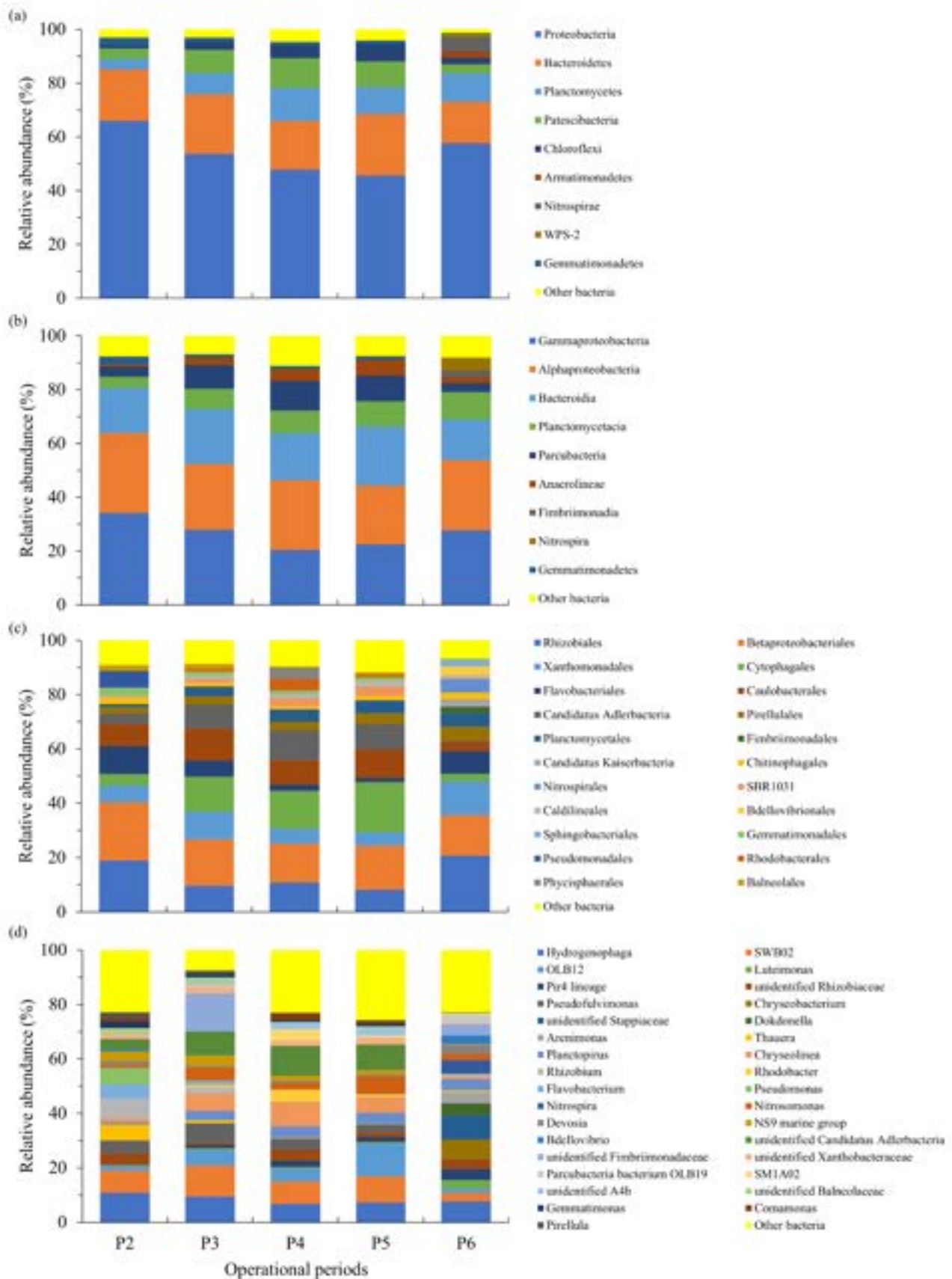


Figura 5 – Composizione della comunità microbica del biofilm del ratore IAMBRR a livello di (a) phylum, (b) classe, (c) ordine e (d) genere.

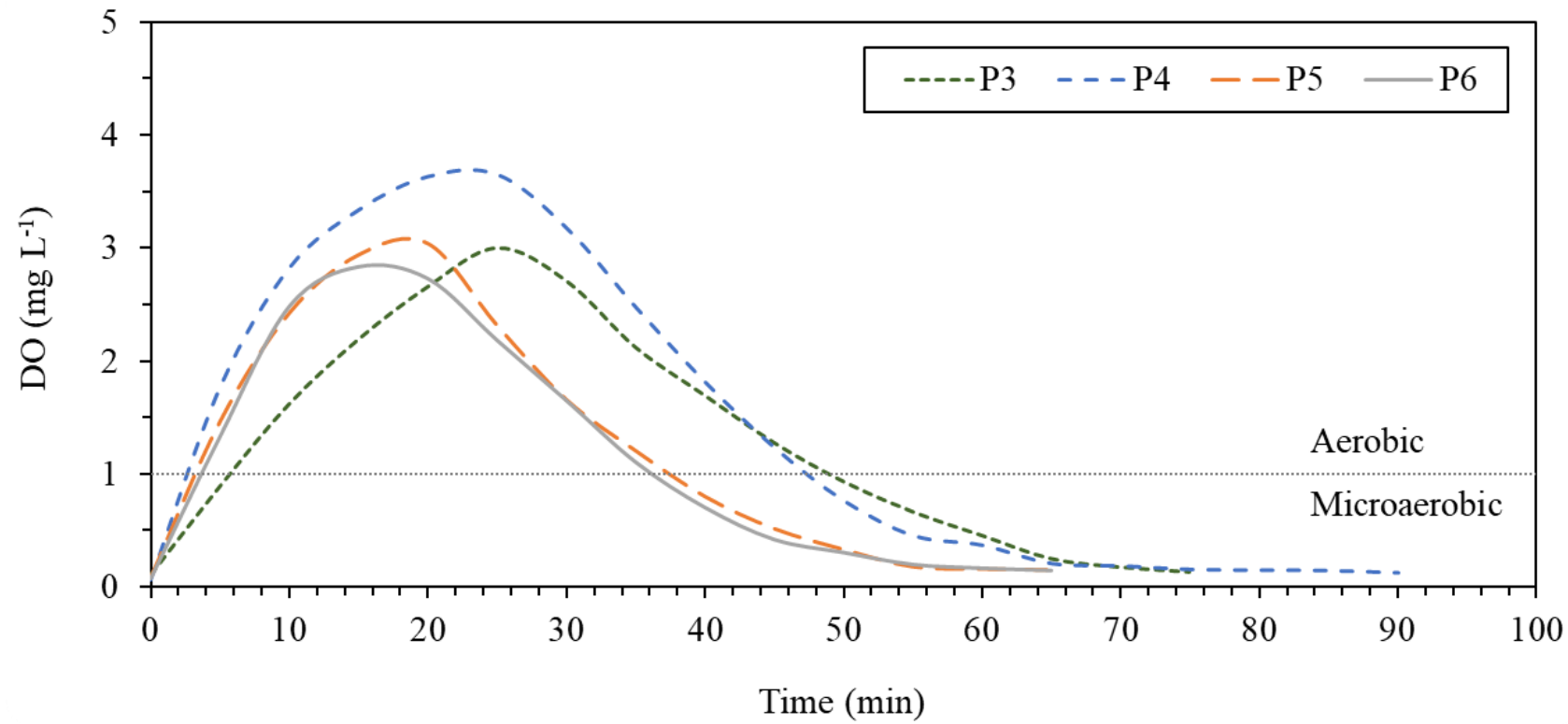


Figura 6 – Profili della concentrazione di DO tipici del ciclo microaerobico-aerobico applicati durante i periodi P3-P6 nel reattore IAMBBR. Ciascun profilo è stato costruito mediando 4-6 profili dello stesso periodo ottenuti misurando la concentrazione di DO ad intervalli di 5 minuti.

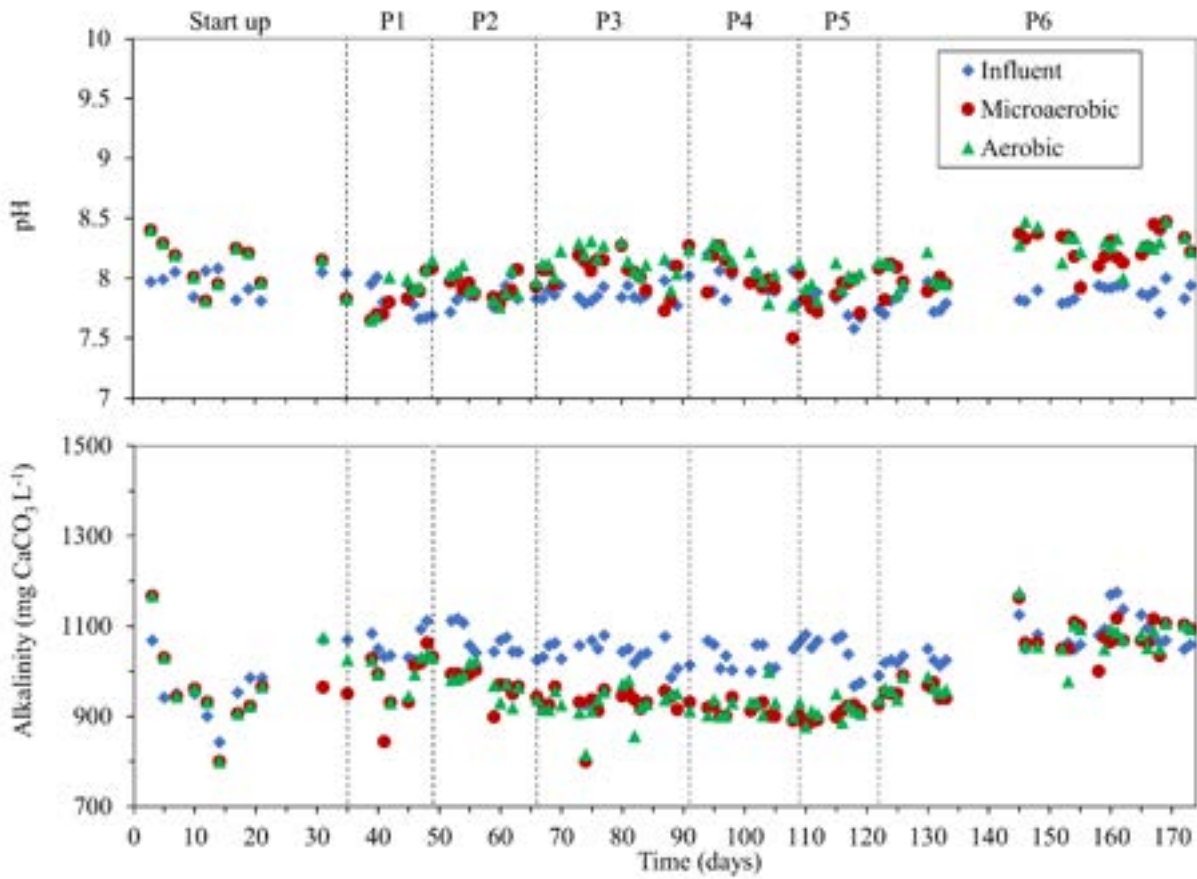


Figura 7 – Profili delle concentrazioni di pH ed alcalinità nell'effluente del reattore IAMBRR durante lo studio.

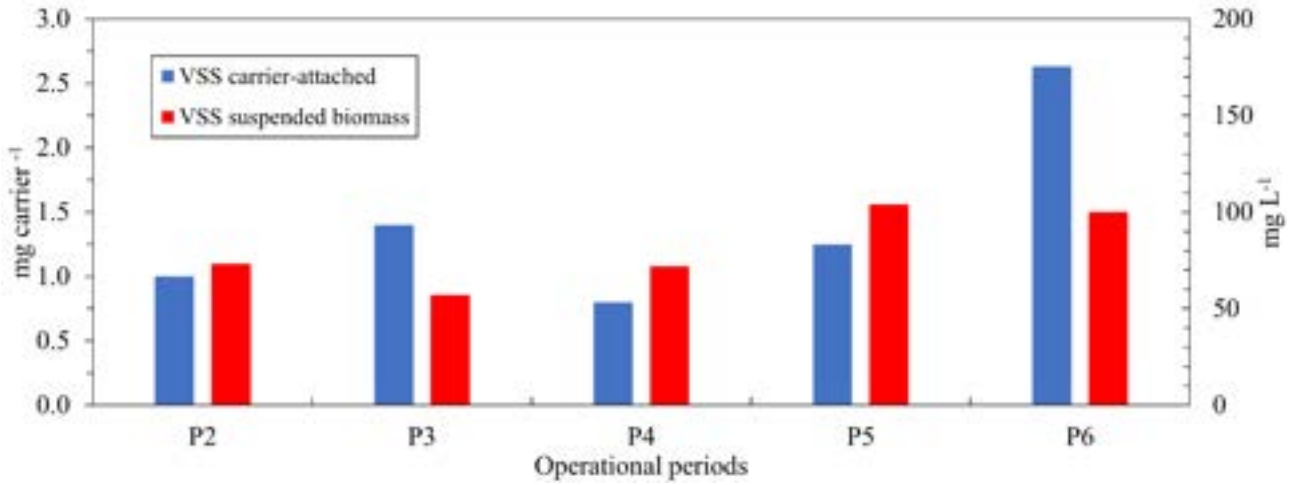


Figura 8 – Concentrazioni di biomassa adesa e sospesa nel reattore IAMBRR durante lo studio.

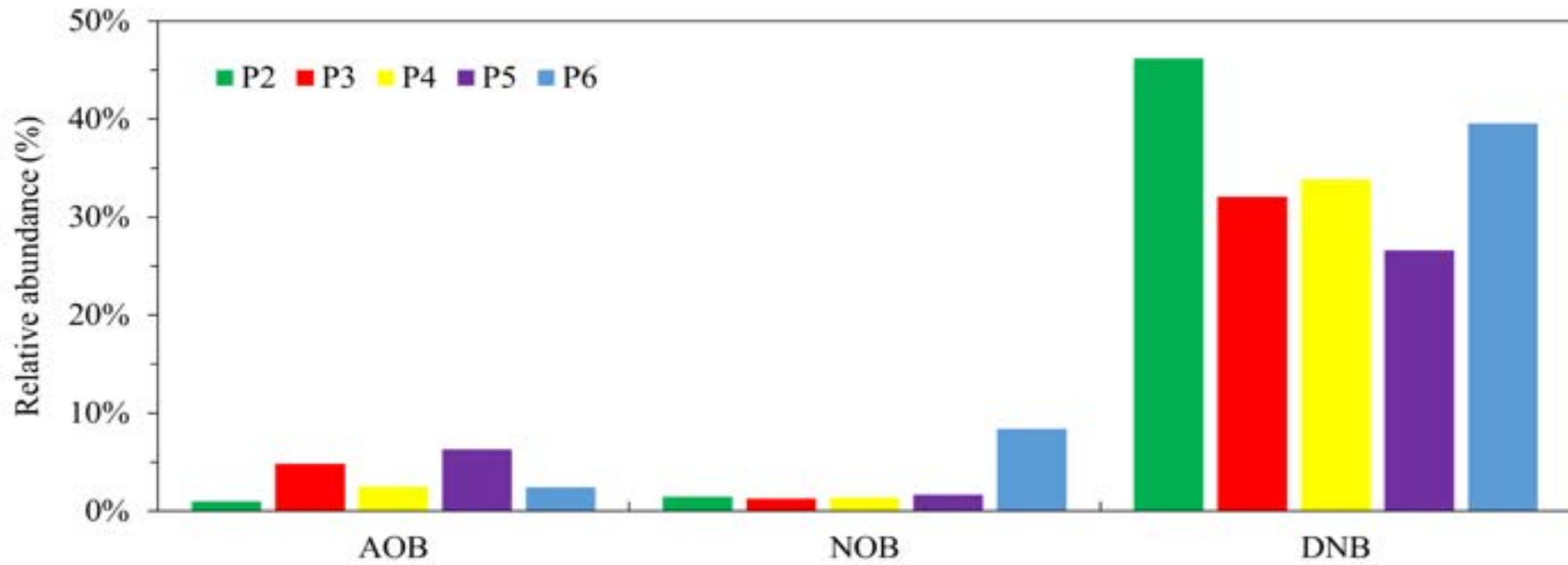


Figura 9 – Abbondanza relativa di batteri AOB, NOB e DNB nel reattore IAMBRR durante lo studio.

2.3 Processo combinato di SPND e rimozione di P in reattori MBBR alimentati con acetato ed etanolo

2.3.1 Set-up sperimentale

Il processo combinato di SPND e rimozione del fosforo è stato studiato in due reattori da laboratorio identici di tipo MBBR. Un reattore è stato alimentato con acetato (MBBR-Ac) e l'altro con etanolo (MBBR-Et) come fonte di sostanza organica. Ciascun reattore è stato costruito in scala di laboratorio usando un cilindro in vetro borosilicato con un volume di lavoro di 1.5 L. Il cilindro è stato sigillato con un tappo di plexiglass avente diverse aperture per l'introduzione delle sonde e dei tubi per influente ed effluente all'interno del reattore. Ciascun reattore è stato esercito in modalità continua ed una pompa peristaltica (Watson-Marlow, UK) è stata utilizzata per l'alimentazione dell'influente ed il prelievo dell'effluente dai reattori al fine di mantenere un livello idrico costante all'interno del reattore. I due reattori sono stati posizionati su un agitatore magnetico impostato ad una velocità di 120 rpm al fine di mantenere condizioni di completa miscelazione.

L'aerazione dei due reattori è stata garantita mediante l'utilizzo di pompe per acquario, tubi in silicone ed una pietra porosa posizionata sul fondo del reattore immediatamente sopra l'ancoretta magnetica in rotazione. Le portate d'aria utilizzate durante lo studio sono state di 110-130 mL min⁻¹ per il reattore MBBR-Ac e di 140-160 mL min⁻¹ per il reattore MBBR-Et (**Tabella 4**). Le differenze nei flussi di aria applicati per i due MBBR sono dovute al maggiore COD dell'etanolo (COD/DOC = 4.0) rispetto a quello dell'acetato (COD/DOC = 2.3). Il controllo automatizzato del DO all'interno dei reattori è stato effettuato utilizzando il sistema basato su Raspberry Pi come descritto in precedenza.

2.3.2 Coltivazione della biomassa

Per l'arricchimento della biomassa nitrificante e denitrificante è stato utilizzato fango di ricircolo con una concentrazione di solidi totali (TS) e di solidi volatili (VS) rispettivamente pari a 3.0 e 2.1 g L⁻¹. Tale fango è stato prelevato dal sistema di pre-denitrificazione di un impianto di depurazione municipale ed utilizzato come inoculo per la coltivazione della biomassa denitrificante e nitrificante. I batteri denitrificanti sono stati coltivati in modalità batch come descritto nello studio precedente. Il tempo di coltivazione è stato di 40 giorni, al termine dei quali l'attività di denitrificazione e la crescita del biofilm all'interno del reattore sono stati verificati. I microorganismi AOB sono stati coltivati in un bioreattore in vetro riempito con 400 mL di terreno di coltura e 100 mL di inoculo. Il terreno di coltura è stato preparato con acqua distillata, 0.246 g L⁻¹ di NH₄Cl, 1 g L⁻¹ di NaHCO₃ e nutrienti come descritto per lo studio precedente. Il pH è stato mantenuto ad un valore di 8.2 (±0.2) mediante aggiunta di NaHCO₃ quando è stato necessario. Metà del contenuto del bioreattore è stato sostituito con nuovo terreno di coltura ogni 2 giorni (weekend esclusi), mantenendo un SRT medio all'interno del reattore di 4 giorni. I microorganismi AOB sono stati coltivati per 5 generazioni prima di inoculare i due MBBR. I campioni prelevati dai reattori nitrificanti e denitrificanti sono stati collezionati prima e dopo ogni operazione di refresh al fine di monitorare il pH, l'alcalinità totale e le concentrazioni di NH₄⁺, NO₂⁻ e NO₃⁻. Durante la fase di coltivazione, la temperatura è stata mantenuta nel range 26-28°C.

2.3.3 Start-up dei bioreattori e composizione dell'influente

Lo start-up dei bioreattori è stato effettuato dividendo i supporti plastici ricoperti di biofilm denitrificante, la biomassa nitrificante sospesa e l'influente sintetico in due reattori in vetro fino ad un volume di 1.3 L. La percentuale di riempimento di ciascun reattore MBBR è stata di circa il 40%. L'influente sintetico (pH 8.0 ± 0.1) è stato utilizzato al fine di testare differenti rapporti C/N e C/P durante lo studio ed è stato preparato utilizzando acqua di rubinetto. Acetato di sodio ed etanolo (96% v/v) sono stati utilizzati come fonti di carbonio a concentrazioni di DOC teorico di 90-105 mg L⁻¹. Il cloruro di ammonio (NH₄Cl) è stato aggiunto al fine di ottenere una concentrazione teorica di N-NH₄⁺ di 25 mg L⁻¹ (48 mg L⁻¹ durante lo start-up) ed è stata

L'unica fonte di azoto utilizzata nel terreno di coltura eccetto durante il periodo di start-up, quando anche nitrato di potassio (KNO_3) (0.23 g L^{-1} in fase liquida) è stato aggiunto al fine di sostenere il processo di denitrificazione (**Tabella 4**). Il fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4) è stato utilizzato quale fonte di fosforo al fine di ottenere una concentrazione teorica di P-PO_4^{3-} di 4.5 e 9 mg L^{-1} a seconda del periodo (**Tabella 4**). Le concentrazioni di DOC, N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} nell'influente sono state scelte in base ad una verifica dei valori degli influenti ad impianti di depurazione locale a servizio di piccole comunità. Una soluzione di micronutrienti, la cui composizione è analoga a quella descritta per la seconda campagna sperimentale, è stata aggiunta all'influente sintetico. Durante lo studio, l'influente sintetico è stato mantenuto ad una temperatura di 5°C .

I due reattori MBBR sono stati eserciti per un periodo di 2 giorni in modalità batch. Metà del contenuto dei reattori è stato sostituito con nuovo influente sintetico non appena le concentrazioni di DOC o di N-NH_4^+ sono calate al di sotto del limite di rilevabilità. La concentrazione di DO in questa fase è stata fissata in modo da alternarsi tra concentrazioni di 0.2 e 3 mg L^{-1} . Successivamente, i reattori sono stati eserciti in modalità continua con un HRT di 1 giorno per 1 settimana (**Tabella 4**) al fine di permettere la formazione di un biofilm microbico multistrato sui supporti mobili.

2.3.4 Esercizio dei reattori MBBR

I reattori MBBR-Ac e MBBR-Et sono stati eserciti con un HRT di 1 giorno e durante 5 differenti periodi sperimentali (P1-P5, **Tabella 4**). Durante i periodi P1-P4 (giorni 10-105), le concentrazioni di DOC nell'influente sono stati di $89 (\pm 9.1) \text{ mg L}^{-1}$ per il reattore MBBR-Ac e di $91 (\pm 5.9) \text{ mg L}^{-1}$ per il reattore MBBR-Et. Durante il periodo P1 (giorni 10-51), il range di DO è stato mantenuto tra 0.2 e 3 mg L^{-1} per entrambi i reattori MBBR ed è stato selezionato un rapporto C/N nell'influente pari a 3.6 , il quale si è rivelato essere quello ottimale per il processo di SND e rimozione del fosforo combinati nell'MBBR esercito in condizioni microaerobiche/aerobiche durante la campagna sperimentale precedente. La concentrazione di P-PO_4^{3-} nell'influente dei due reattori MBBR è stata di $8 (\pm 1) \text{ mg L}^{-1}$, dando luogo a rapporti C/P pari a $11.1 (\pm 1.1)$ per MBBR-Ac e $12.3 (\pm 1.7)$ per MBBR-Et. All'inizio del periodo P2, il rapporto C/P influente è stato aumentato ad un valore di $19.9 (\pm 2.0)$ per MBBR-Ac e $21.9 (\pm 3.0)$ per MBBR-Et diminuendo la concentrazione di P-PO_4^{3-} a 4 mg L^{-1} , al fine di valutare l'effetto di una minore concentrazione di fosforo nell'influente, rappresentativa dei liquami municipali, sul processo. Alla fine del periodo P2 (giorno 68), il range di DO è stato fissato a $0.2-2 \text{ mg L}^{-1}$ in entrambi i bioreattori con l'obiettivo di recuperare l'efficienza del processo SPND dopo un malfunzionamento del sistema di controllo dell'ossigeno. Al fine di valutare il recupero del processo SPND, il rapporto C/P nell'influente è stato abbassato a circa 10 (P3) ed il range di DO è stato abbassato a $0.2-3 \text{ mg L}^{-1}$ (P4). All'inizio del periodo P5 (giorno 106), il rapporto C/N influente è stato aumentato a 4.0 per entrambi gli MBBR con l'obiettivo di supportare il processo di denitrificazione e migliorare l'efficienza di rimozione dell'azoto.

Il pH e l'alcalinità dell'influente durante lo studio sono rimasti stabili ad un valore pari rispettivamente a $8.1 (\pm 0.1)$ e $1011 (\pm 0.1) \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ per MBBR-Et e di $8.1 (\pm 0.2)$ e $1214 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ per MBBR-Ac. La temperatura non è stata controllata durante lo studio ed è rimasta in un range di $28-32^\circ\text{C}$ durante i periodi P1-P2 e $22-28^\circ\text{C}$ durante i periodi P3-P5. L'SRT non è stato controllato durante l'esercizio dei reattori in modalità continua in quanto non sono stati effettuati né sedimentazione né ricircolo della biomassa sospesa.

2.3.5 Calcolo delle efficienze

L'efficienza di rimozione (RE) di TIN, P-PO₄³⁻ e DOC così come l'efficienza di nitrificazione (N_{eff}) e l'efficienza di denitrificazione (D_{eff}) sono state valutate mediante le seguenti equazioni (Eqs. 1-5):

$$\text{TIN RE (\%)} = \frac{([\text{N-NH}_4^+]_i + [\text{N-NO}_3^-]_i - [\text{N-NH}_4^+]_e - [\text{N-NO}_3^-]_e - [\text{N-NO}_2^-]_e)}{([\text{N-NH}_4^+]_i + [\text{N-NO}_3^-]_i)} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{P-PO}_4^{3-} \text{ RE (\%)} = \frac{([\text{P-PO}_4^{3-}]_i - [\text{P-PO}_4^{3-}]_e)}{([\text{P-PO}_4^{3-}]_i)} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{DOC RE (\%)} = \frac{([\text{DOC}]_i - [\text{DOC}]_e)}{([\text{DOC}]_e)} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{N}_{\text{eff}} (\%) = \frac{([\text{N-NH}_4^+]_i - [\text{N-NH}_4^+]_e)}{([\text{N-NH}_4^+]_i)} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{D}_{\text{eff}} (\%) = \frac{([\text{N-NH}_4^+]_i - [\text{N-NH}_4^+]_e + [\text{N-NO}_3^-]_i - [\text{N-NO}_3^-]_e - [\text{N-NO}_2^-]_e)}{([\text{N-NH}_4^+]_i - [\text{N-NH}_4^+]_e + [\text{N-NO}_3^-]_i)} \times 100 \quad (5)$$

dove:

- [N-NH_{4,i}⁺] e [N-NH_{4,e}⁺] sono rispettivamente le concentrazioni di influente ed effluente dell'N-NH₄⁺;
- [N-NO_{x,i}⁻] e [N-NO_{x,e}⁻] sono rispettivamente le concentrazioni di influente ed effluente dell'N-NO_x⁻;
- [P-PO_{4,i}³⁻] e [P-PO_{4,e}³⁻] sono rispettivamente le concentrazioni di influente ed effluente di P-PO₄³⁻;
- [DOC_i] e [DOC_e] sono rispettivamente le concentrazioni di influente ed effluente di DOC.

2.3.6 Analisi microbiologiche

Le comunità microbiologiche del biofilm e della biomassa in sospensione dei due reattori MBBR sono state analizzate alla fine dei periodi P1 e P2. I campioni sono stati prelevati dai due MBBR e conservati ad una temperatura di -20°C prima di essere analizzati. Il biofilm è stato distaccato dai supporti mobili mediante sonicazione della durata di 5 minuti alla frequenza di 45 Hz seguita da agitazione manuale. L'estrazione e la quantificazione del DNA sono state effettuate come descritto per la seconda campagna sperimentale.

L'amplificazione PCR, il sequenziamento Illumina e la classificazione tassonomica sono stati effettuati come descritto da Ucar et al. (2020).

2.3.7 Metodi analitici

I campioni liquidi sono stati prelevati 3-4 volte a settimana da entrambi i bioreattori e dalle taniche di influente. Alla fine di ogni periodo sperimentale, il biofilm microbiologico e la biomassa sospesa sono stati campionati per le analisi dei VSS. Le concentrazioni di DOC, NO_3^- , NO_2^- e PO_4^{3-} nei campioni liquidi sono state misurate immediatamente dopo il campionamento come descritto nella seconda campagna sperimentale e in seguito a filtrazione attraverso filtri per siringa $0.45 \mu\text{m}$ (VWR, USA). pH ed alcalinità totale sono stati analizzati in campioni non filtrati come descritto da Di Capua et al. (2020). I VSS sono stati misurati in duplicato come descritto da Classen et al. (2013).

2.3.8 Analisi statistica dei dati

Le differenze statistiche tra i valori dei parametri DOC, TIN e P-PO_4^{3-} RE nei differenti periodi sperimentali sono state valutate mediante analisi della varianza (ANOVA) usando il tool Data Analysis di Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA). La differenza significativa è stata fissata ad un valore del 95% ($p < 0.05$).

2.3.9 Risultati

2.3.9.1 Inibizione della biomassa NOB durante la fase di coltivazione

Durante la fase di coltivazione, la crescita dei batteri NOB è stata inibita in maniera soddisfacente mediante l'adozione di condizioni di SRT, pH e temperatura come descritto nel paragrafo 2.3.2. La concentrazione di N-NO_3^- nel terreno di coltura si è mantenuta stabile ad un valore di $11 (\pm 1) \text{ mg L}^{-1}$, mentre un accumulo di N-NO_2^- fino a 91 mg L^{-1} è stato osservato in ciascun ciclo a causa dell'ossidazione dell'ammonio. In letteratura, valori di pH tra 7.5 e 8.5 sono riportati come inibenti l'attività degli NOB a causa di un effetto diretto sui meccanismi enzimatici [20,26], mentre temperature maggiori di 25°C aumentano le differenze in termini di tasso specifico di crescita tra AOB e NOB. A causa di un minore valore del massimo tasso specifico di crescita degli NOB, questi batteri possono proliferare soltanto in reattori eserciti con SRT molto lungo [63].

La soppressione dei batteri NOB durante la fase di coltivazione ha permesso di inoculare entrambi i reattori con un pool di biomassa privo (o con concentrazioni trascurabili) di NOB, favorendo in tal modo il processo SPND durante i primi 69 giorni di esercizio dei reattori in regime di aerazione alternata ($\text{DO} = 0.2\text{--}3 \text{ mg L}^{-1}$) e pH alcalino (≥ 8.2). Diversi studi hanno dimostrato che l'aerazione intermittente può indurre in maniera efficace inibizione ai microorganismi NOB [23,63]. Durante il passaggio da condizioni microaerobiche ad aerobiche, la fase di lag delle due specie microbiche (AOB e NOB) gioca un ruolo molto importante. Gli enzimi dei batteri NOB sono disattivati in condizioni anossiche/microaerobiche e vengono riattivati in condizioni aerobiche. Inoltre, gli AOB recuperano la propria attività metabolica prima più velocemente dei batteri NOB, generando un accumulo di nitrito. L'inibizione dei batteri durante la fase di coltivazione della biomassa è stata confermata dalle analisi microbiologiche della biomassa sia adesa sia sospesa effettuate al termine dei periodi P1 e P2, che hanno mostrato un'abbondanza relativa dei batteri NOB al di sotto del limite di rilevabilità (**Tabella 5, Figura 14**).

2.3.9.2 Il processo SPND nei reattori MBBR-Ac e MBBR-Et

L'evoluzione della concentrazione di N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- nei reattori MBBR-Ac e MBBR-Et è descritta in **Figura 11**, mentre l'efficienza di rimozione del TIN (TIN RE) è mostrata in **Figura 12**. Durante il periodo P1 (giorni 10-51), i reattori MBBR-Ac e MBBR-Et hanno mostrato TIN RE stabili rispettivamente pari a 81 (± 6) % e 86 (± 6) %, con concentrazioni medie di N-NH_4^+ e N-NO_2^- nell'effluente al di sotto di 5 mg L⁻¹. La concentrazione media di N-NO_3^- nell'effluente si è mantenuta al di sotto di 1 mg L⁻¹, indicando che il processo SPND è stato soddisfacente. In genere, il DO è il principale fattore limitante per l'ossidazione di NH_4^+ e NO_2^- durante il processo SND [24], anche a causa della competizione tra gli AOB e i batteri eterotrofi aerobi (HAB). In questo studio, l'aerazione intermittente a livelli di DO tra 0.2 e 3 mg L⁻¹ è stata efficace nell'inibire la crescita dei batteri NOB nei reattori durante l'esercizio in continuo dei reattori MBBR.

N_{eff} e D_{eff} del reattore MBBR-Ac hanno raggiunto valori rispettivamente pari a 87 (± 7) % e 93 (± 6) %, con un picco di D_{eff} del 100% al giorno 16. Il reattore MBBR-Et ha raggiunto un valore di N_{eff} del 100% (giorni 29-31), mentre D_{eff} è rimasto ad un valore pari a 88 (± 8) %. Durante l'intero periodo sperimentale, il DOC nell'effluente dei due reattori MBBR è rimasto al di sotto del limite di rilevabilità, poiché viene utilizzato sia dagli HAB sia dai DNB per le loro attività metaboliche, che indica il DOC come fattore limitante per la denitrificazione.

Le acque reflue civili presentano generalmente bassi valori di C/N, per cui l'aggiunta di ulteriore sostanza organica può essere richiesta per ottenere una soddisfacente efficienza di denitrificazione [64]. Il processo SPND richiede meno sostanza organica per la denitrificazione, il che è vantaggioso per il trattamento di acque reflue con un basso rapporto C/N e comporta efficienze di rimozione maggiori rispetto al processo SND. I risultati dello studio precedente hanno mostrato che un valore di TIN RE medio pari al 62% è stato ottenuto mediante il processo SND. Da un confronto con i risultati ottenuti nella seconda campagna sperimentale si può notare un incremento del valore medio di TIN RE maggiore del 20%.

Il valore di N_{eff} del reattore MBBR-Et è stato maggiore di quello del reattore MBBR-Ac, nonostante la minore abbondanza di *Nitrosomonas* osservata alla fine del periodo P1 nel biofilm del reattore MBBR-Et rispetto a quello del reattore MBBR-Ac (**Tabella 5**). È possibile che i generi riportati come potenziali nitrificanti eterotrofi (i.e. *Thauera* e *Pseudomonas*) o anammox (i.e. OM190), i quali sono stati rilevati in maggior abbondanza nel reattore MBBR-Et rispetto al reattore MBBR-Ac (**Tabella 2**), abbiano avuto un ruolo nella rimozione di N-NH_4^+ . È importante sottolineare che il genere *Nitrosomonas* è stato rilevato solo all'interno del biofilm dei due reattori, indicando che la biomassa sospesa non era responsabile del processo di nitrificazione.

Durante i giorni 52-69 del periodo P2, valori di TIN RE di circa l'86% sono stati osservati per entrambi i reattori MBBR con concentrazioni medie di N-NH_4^+ , N-NO_2^- e N-NO_3^- non superiori a 2 mg L⁻¹ (**Figura 11**). Il valore di N_{eff} ha raggiunto il 100% con un valore medio di 96 (± 5) % per il reattore MBBR-Ac e di 98 (± 5) % per il reattore MBBR-Et. In particolare, il valore di N_{eff} per il reattore MBBR-Et è stato di circa il 10% maggiore rispetto a quello osservato durante il periodo P1. Questo risultato è in accordo con la duplicazione dell'abbondanza relativa di *Nitrosomonas* nel biofilm del reattore MBBR-Ac, che è aumentata da 0.7% (P1) a 1.4% (P2) (**Tabella 5**). Il valore medio di D_{eff} nel reattore MBBR-Et è stato maggiore di più del 4% rispetto a quello osservato nel periodo P1 (che potrebbe essere attribuito ad una maggiore disponibilità di DOC seguente all'incremento del rapporto C/P nell'influenza durante il periodo P2), mentre un valore stabile di D_{eff} è stato osservato nel reattore MBBR-Ac. È riportato in letteratura che la fonte di sostanza organica può influenzare l'attività degli enzimi coinvolti nell'ossidazione dell'azoto e nei processi di riduzione così come la diversità microbica [63]. In particolare, l'acetato dovrebbe favorire la diversità batterica, mentre l'etanolo è riportato come una delle sostanze organiche preferite dai batteri eterotrofi e ne stimola la crescita [65]. Tali risultati sono congruenti con i risultati delle analisi microbiologiche effettuate in questo studio, che ha mostrato un considerevole aumento dell'abbondanza relativa di HAB come *Neochlamydia* e *Bdellovibrio* nella comunità microbica del

reattore MBBR-Et durante il periodo P2 e una minore abbondanza di *Nitrosomonas* nel biofilm del reattore MBBR-Et rispetto a quella del reattore MBBR-Ac (**Tabella 5**).

Nel giorno 69, un malfunzionamento del sistema di controllo dell'ossigeno ha portato ad un aumento della concentrazione di DO ad un valore di circa 5 mg L⁻¹ durante il weekend. Come risultato, durante i giorni 70-79, concentrazioni di NO₃⁻ tra 1 e 5 mg L⁻¹ sono state misurate nell'effluente dei due bioreattori. La presenza di nitrati nell'effluente indica attività dei batteri NOB, sebbene i risultati delle analisi microbiologiche sul biofilm e sulla biomassa sospesa non abbiano mostrato la presenza di NOB tipici (**Figura 14**). L'aumento della concentrazione di NO₃⁻ alla fine del periodo P2 potrebbe essere dovuta all'attività dei nitrificanti eterotrofi come alcuni batteri del genere *Flavobacterium* [22], che ha mostrato un netto incremento di abbondanza relativa nelle comunità microbica della biomassa adesa e sospesa di entrambi i reattori rispetto a quella osservata nei periodi precedenti (**Tabella 5**).

La crescita di batteri NOB potrebbe essere più limitata a basse concentrazioni di ossigeno disciolto rispetto a quella degli AOB, i quali hanno una maggiore affinità per l'ossigeno. In letteratura, i valori riportati per la costante di saturazione dell'ossigeno K_{DO} sono di 0.3 mg L⁻¹ per gli AOB e di 1.1 mg L⁻¹ per gli NOB [29]. Durante il periodo P3 (giorni 80-93), l'obiettivo è stato quello di recuperare il processo di SPND limitando ulteriormente il DO all'interno del sistema. Quindi, il livello di DO è stato fissato a 0.2-2 mg L⁻¹ al fine di ridurre l'attività dei batteri NOB. In questo modo, si è riusciti ad abbattere la concentrazione di NO₃⁻ nell'effluente del reattore MBBR-Ac (**Figura 11**). Tuttavia, la concentrazione di N-NH₄⁺ è aumentata in entrambi i reattori MBBR fino ad un valore di 10 mg L⁻¹ come conseguenza della competizione tra i batteri AOB e i batteri HAB per il substrato DO disponibile (**Figura 14**). L'aumento della concentrazione influente di N-NH₄⁺ ha ridotto TIN RE nei due MBBR da 84-86% (P2) a 71-72% (P3) (**Figura 12**).

All'inizio del periodo P4 (giorno 94), il range di DO è stato fissato ad un valore tra 0.2 e 3 mg L⁻¹ per entrambi i reattori con l'obiettivo di recuperare l'efficienza di rimozione dell'azoto. Ciò nonostante, il TIN RE si è ulteriormente ridotto ad un valore di 69 (±8) % per il reattore MBBR-Ac e di 60 (±5) % per il reattore MBBR-Et. La diminuzione del TIN RE è stata principalmente dovuta ad una diminuzione di D_{eff}, che è diminuita in entrambi i reattori MBBR del 6-10% ed in particolare nel reattore MBBR-Ac, sebbene il recupero dell'efficienza di nitrificazione N_{eff} nel reattore MBBR-Ac abbia consentito di ottenere TIN RE più elevati rispetto a quelli del reattore MBBR-Et. Come mostrato dal profilo di NO₃⁻ nell'effluente (**Figura 11**), il processo SPND non è stato recuperato completamente. In aggiunta agli alti valori di DO osservati nei due MBBR per 2 giorni, è possibile che sia avvenuto un adattamento dei batteri NOB alle basse concentrazioni di DO ottenute con l'aerazione intermittente. Studi precedenti hanno riportato un incremento dell'affinità dell'ossigeno per i batteri NOB dopo lunga coltivazione a bassi livelli di ossigeno [41,66]. La soppressione dei batteri NOB è difficile da ottenere e necessita spesso di temperature di esercizio superiori a 30°C. La diminuzione della temperatura di esercizio durante lo studio non ha favorito il recupero del processo SPND.

Al fine di migliorare l'efficienza di denitrificazione D_{eff} e migliorare i valori di TIN RE, all'inizio del periodo P5 il rapporto C/N nell'influente è stato aumentato ad un valore di 4.2 (**Tabella 4**). Come risultato, il valore di D_{eff} nei due reattori MBBR è aumentato del 7-18% rispetto a quello osservato nel periodo P3. Tuttavia, mentre il reattore MBBR-Ac ha mostrato un valore stabile di N_{eff} pari al 94 (±5) % e del TIN RE del 77 (±2) % durante il periodo P5, il reattore MBBR-Et ha mostrato una diminuzione del valore di N_{eff} da 78 (±6) % a 68 (±7) % (P5). La concentrazione di N-NH₄⁺ nell'effluente del reattore MBBR-Et durante il periodo P5 è stata del 29% più elevata che durante il periodo P4. Di conseguenza, la rimozione del TIN nel reattore MBBR-Et è stata di circa il 10% più bassa che nel reattore MBBR-Ac. (**Figura 12**). La diminuzione di N_{eff} nel reattore MBBR-Et è stata probabilmente data da una crescita eccessiva di HAB in competizione con i batteri nitrificanti per il DO. Gli HAB posseggono tassi di crescita e affinità per l'ossigeno più elevati rispetto ai batteri nitrificanti e possono sopprimerli così come il processo di nitrificazione all'interno del biofilm [37,67].

La concentrazione della biomassa adesa ai carrier durante lo studio è rimasta stabile ad un valore di $2.0(\pm 0.4)$ e $2.1(\pm 0.4)$ mg VSS carrier⁻¹ rispettivamente per il biofilm del reattore MBBR-Ac e del reattore MBBR-Et. Tuttavia, mentre il biofilm del reattore MBBR-Ac si è presentato compatto e sottile, quello del reattore MBBR-Et durante il periodo P5 è apparso sempre spesso e poroso, aspetto che potrebbe essere attribuito ad una maggiore abbondanza di batteri eterotrofi e filamentosi [68]. Ciò ha probabilmente limitato la diffusione del DO all'interno del biofilm e ha ostacolato la nitrificazione.

In questo lavoro, le concentrazioni di TIN degli effluenti durante il funzionamento continuo dei reattori MBBR sono state quasi sempre al di sotto di 10 mg L⁻¹ e non hanno mai superato 12 mg L⁻¹ in tutte le condizioni testate. Queste concentrazioni sono conformi alla normativa italiana ed europea (Direttiva sul trattamento delle acque reflue urbane 98/15/CE), che ha fissato una soglia per l'azoto totale nelle acque reflue urbane di 10-15 mg L⁻¹ a seconda delle dimensioni del centro urbano, e cioè di 10 mg L⁻¹ per popolazione equivalente (PE) > 100000 e 15 mg L⁻¹ per PE < 100000. Nonostante la soddisfacente rimozione del TIN, i livelli di NO₂⁻ osservati nell'effluente potrebbero essere motivo di preoccupazione per la vita acquatica essendo spesso superiori a 0.6 mg N-NO₂⁻ L⁻¹ [69] e potrebbero aumentare la richiesta di cloro durante la disinfezione. Pertanto, una regolazione del ciclo di DO nel reattore sarebbe necessaria per l'up-scaling del processo, ad esempio applicando periodi microaerobici più lunghi che potrebbero migliorare l'efficienza di denitrificazione e ridurre i livelli di NO₂⁻ dell'effluente.

2.3.9.3 Rimozione del fosforo

Durante lo studio, tra il 62% e il 95% della concentrazione di P-PO₄³⁻ alimentata è stato rimosso dai due MBBR (**Figura 13**). Le concentrazioni medie di N-NO₂⁻ nell'effluente sono rimaste inferiori a 3 mg L⁻¹, valore inferiore ai livelli riportati come inibitori per la rimozione aerobica del fosforo (> 10 mg N-NO₂⁻ L⁻¹) [43].

Durante il periodo P1, la concentrazione di P-PO₄³⁻ negli effluenti dei reattori MBBR è stata stabile a circa 1 mg L⁻¹, risultando in efficienze di rimozione medie ≥ 80% (**Figura 13**). La diminuzione della concentrazione di N-NO₃⁻ nell'influenza da 18 mg L⁻¹ (fase di start-up) a circa 1 mg L⁻¹ ha determinato un aumento di P-PO₄³⁻ RE da 35 (± 1)% a 83 (± 3)% per il reattore MBBR-Ac e da 39 (± 1)% a 86 (± 6)% per il reattore MBBR-Et, che può essere attribuito alla minore competizione tra i batteri DNB e PAO per il carbonio organico disponibile. Alla fine del periodo P1, i batteri appartenenti ai generi *Hydrogenophaga*, *Acidovorax* e *Pseudomonas* sono stati rilevati con abbondanze relative elevate nel biofilm e nella biomassa sospesa di entrambi gli MBBR (**Tabella 5**). I membri di questi generi sono spesso classificati come PAO putativi a causa della capacità di formare e immagazzinare polifosfato [11,70] e potrebbero aver svolto un ruolo chiave nella rimozione di fosforo nei due MBBR. I risultati dello studio precedente hanno evidenziato che il genere *Hydrogenophaga* era il genere dominante nel biofilm di un MBBR a flusso continuo che combinava la rimozione di N e P in condizioni di aerazione intermittente. Secondo Ge et al. (2015) vi sono prove evidenti che il genere *Hydrogenophaga* include batteri con capacità di accumulare P.

La rimozione del fosforo nei due MBBR è stata ottenuta in condizioni di alimentazione continua e senza la presenza dello stadio anaerobico, che è comunemente previsto per la rimozione biologica del fosforo in SBR in quanto consente la conversione di materia organica complessa in VFA e stabilisce una fase di *feast* che innesca il metabolismo dei PAO. In entrambi gli MBBR eserciti in questo studio, le concentrazioni di NO₃⁻ durante i primi 69 giorni di esercizio sono state trascurabili. Pertanto, il funzionamento in regime microaerobico/aerobico nei due reattori MBBR può aver indotto l'alternanza di condizioni anaerobiche e (micro)aerobiche negli strati interni del biofilm e promosso il metabolismo dei PAO. Tuttavia, va sottolineato che la fase anaerobica non è obbligatoria per la rimozione biologica del fosforo. Diversi studi hanno evidenziato la possibilità di eseguire la rimozione di P quando il donatore di elettroni (VFA o alcol) e l'accettore di elettroni (ossigeno) sono presenti contemporaneamente [9,10]. Pijuan et al. [71] hanno

mostrato che l'alternanza di fasi di *feast/famine* può avvenire anche in condizioni strettamente aerobiche in concomitanza con la disponibilità (*feast*) e l'assenza (*famine*) di VFA nel reattore esercito come SBR.

All'inizio del periodo P2, il rapporto C/P nell'influenza dei due MBBR è stato quasi raddoppiato diminuendo la concentrazione di $P-PO_4^{3-}$ da 8 a 4 mg L⁻¹ (**Tabella 4**). L'aumento del rapporto C/P nell'influenza ha determinato una diminuzione di $P-PO_4^{3-}$ RE ad un valore di 77 (± 4) % per il reattore MBBR-Ac e di 84 (± 2)% per il reattore MBBR-Et (**Figura 13**). Bassi valori del rapporto COD/ $P-PO_4^{3-}$ sono raccomandati nei sistemi EBPR per ottenere un'elevata rimozione del fosforo, poiché valori elevati favoriscono la proliferazione di batteri eterotrofi diversi dai PAO [72]. L'analisi di sequenziamento ha rivelato che durante il periodo P2 le popolazioni di *Hydrogenophaga* e *Acidovorax* sono diminuite significativamente sia nel biofilm che nella biomassa sospesa degli MBBR ed è stato osservato un aumento complessivo di HAB (come *Leadbetterella* e *Bdellovibrio*) (**Tabella 5**).

Dal periodo P3 al periodo P5, la concentrazione di $P-PO_4^{3-}$ nell'effluente dei due MBBR è rimasta stabile a circa 3 mg L⁻¹, circa 2 volte superiore a quella osservata durante il periodo P2. Di conseguenza, il valore di $P-PO_4^{3-}$ RE è diminuito a circa 70% in entrambi gli MBBR (**Figura 13**). La diminuzione dei livelli di DO durante il periodo P3 potrebbe aver favorito i denitrificanti rispetto ai PAO per il DOC disponibile, riducendo $P-PO_4^{3-}$ RE. Il ripristino del regime DO ad un range di 0.2-3 mg L⁻¹ (P4) e l'aumento del rapporto C/P nell'influenza ad un valore di 13 (P5) non ha migliorato la rimozione di $P-PO_4^{3-}$, probabilmente a causa della competizione con i batteri HAB per il DOC disponibile.

Il trattamento di acque reflue reali con il sistema studiato potrebbe presumibilmente comportare una diminuzione di $P-PO_4^{3-}$ RE a causa della presenza di materia organica complessa scarsamente biodegradabile. Una possibile strategia per migliorare la rimozione del fosforo potrebbe essere quella di assicurare fasi microaerobiche più lunghe, in modo da indurre zone anaerobiche negli strati più profondi del biofilm, consentendo la conversione parziale di sostanze organiche complesse in VFA e supportando la rimozione di $P-PO_4^{3-}$.

2.3.9.4 Struttura delle comunità microbiologiche dei due MBBR

La struttura delle comunità microbiche dei due MBBR durante i primi due periodi operativi (P1 e P2) sono state simili. I *Proteobacteria* sono stati il phylum dominante sia nel biofilm che nella biomassa sospesa, essendo presenti in abbondanza relativa tra il 39% e il 60% nel biofilm e tra il 36% e il 74% nella biomassa sospesa. I *Proteobacteria* includono specie tipiche dei sistemi di trattamento delle acque reflue e spesso correlate alla rimozione dell'azoto [29,73]. Anche i phyla *Bacteroidetes*, *Bdellovibrionota* e *Planctomycetes* sono stati presenti in tutti i periodi operativi sia nel biofilm che nella biomassa sospesa con abbondanze relative comprese rispettivamente nei range 7–31%, 3–35% e 2–11%. Le abbondanze relative di *Bdellovibrionota* nel reattore MBBR-Et alla fine del periodo P2 (15-35%) sono state significativamente superiori rispetto a quelle osservate nello stesso bioreattore alla fine del periodo P1 (3-6%) e nel reattore MBBR-Ac in entrambi i periodi (4-7%). I *Bdellovibrionota* sono batteri aerobi eterotrofi obbligati che possono predare batteri gram-negativi. L'aumento di HAB durante il periodo P2 è stato una conseguenza del più elevato rapporto C/P nell'influenza rispetto a quello del periodo P1 (**Tabella 4**). Al contrario, la popolazione di *Chloroflexi* nella biomassa sospesa del reattore MBBR-Et alla fine della P2 è diminuita al di sotto del limite di rilevamento, mentre nel biofilm è stata osservata un'abbondanza relativa maggiore (8%) rispetto al periodo precedente (5%). È stato segnalato che i *Bacteroidota* e i *Chloroflexi* dominano i sistemi EBPR e includono DNPAO [74]. I *Planctomycetes*, che sono stati rilevati durante i periodi P1 e P2 nel biofilm e nella biomassa sospesa di entrambi gli MBBR, sono tipici dei sistemi anammox e la loro presenza potrebbe essere attribuita alla concomitanza di ammoniaca, nitriti e alte temperature operative [75]. L'abbondanza relativa di questi batteri nel biofilm è stata molto più alta che nella biomassa sospesa (**Tabella 5**), suggerendo che condizioni anaerobiche si sono verificate negli strati interni del biofilm.

A livello di classe, le comunità microbiche dei due MBBR durante i periodi P1-P2 sono state dominate da *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria*, che sono stati osservati nel biofilm e nella biomassa sospesa con abbondanze relative rispettivamente di 20–42% e 15–32%. L'unica eccezione è rappresentata dalla biomassa sospesa di MBBR-Et durante il periodo P2, dominata da *Bdellovibrionia* (35%) e *Gammaproteobacteria* (20%).

La **Figura 14** mostra la composizione tassonomica a livello di genere delle comunità microbiche nel biofilm MBBR e nella biomassa sospesa, mentre una classificazione filogenetica dei gruppi funzionali inclusi AOB, DNB, HAB e PAO/DNPAO putativi è mostrata in **Tabella 5**. Alla fine del periodo P1, i generi batterici più abbondanti nel biofilm MBBR-Ac erano *Rhizobium* (15.6%), *Acidovorax* (13.5%) e *Thauera* (7.2%). È stato riportato che i membri di questi generi possiedono capacità denitrificanti [7,15,29]. Altri DNB includono *Luitemonas* (4.0%), *Aquamicrobium* (2.5%) e *Hydrogenophaga* (2.2%) [49,52,76] (**Tabella 5, Figura 14**). I generi *Hydrogenophaga* e *Acidovorax*, appartenenti alla famiglia delle *Comamonadaceae*, sono stati indicati come PAO putativi per la capacità di formare e immagazzinare polifosfato [70]. In particolare, è stato dimostrato che *Hydrogenophaga* accumula P in condizioni aerobiche [47] ed era il genere dominante in un MBBR in continuo che rimuoveva simultaneamente azoto tramite SND e P in condizioni microaerobiche/aerobiche, come mostrato nello studio precedente. Organismi di accumulo di glicogeno (GAO) non sono stati rilevati nel biofilm MBBR o nella biomassa sospesa, probabilmente a causa dell'assenza di una fase anaerobica vera e propria all'interno del ciclo di aerazione. I batteri *Nitrosomonas* (0.7%) sono gli unici AOB individuati all'interno dei biofilm degli MBBR. Tuttavia, non si può escludere che *Thauera* e *Pseudomonas* abbiano svolto un ruolo nella nitrificazione, poiché membri di questi generi sono stati segnalati come potenziali nitrificanti eterotrofi-denitrificanti aerobici [77]. NOB tipici come *Nitrobacter*, *Nitrospira* e *Nitrosospira* non sono mai stati rilevati nel biofilm MBBR e nella biomassa sospesa durante lo studio, indicando che l'alternanza di condizioni microaerobiche e aerobiche dopo la coltivazione a pH e temperatura elevati e SRT basso è stata efficace per la soppressione degli NOB. Per quanto riguarda il reattore MBBR-Et, i generi dominanti nel biofilm sono stati *Thauera* (14.2%), *Hyphomicrobium* (10.4%), OM190 (11.3%) e *Pseudomonas* (8.8%) (**Tabella 5**). *Hyphomicrobium* e *Pseudomonas* includono PAO/DNPAO putativi [73,78]. Il genere *Hydrogenophaga* è stato rilevato anche nel biofilm dei reattori MBBR-Et con un'abbondanza relativa del 4.2%.

La composizione microbica della biomassa sospesa nei due MBBR durante il periodo P1 è stata abbastanza simile e dominata da DNB come *Rhizobium* (19.2%), *Acidovorax* (13.0–13,8%) e *Luitemonas* (5.6–5.9%). Sono state osservate elevate abbondanze relative di batteri coinvolti nella degradazione della materia organica come *Bdellovibrio* (6.1-7.2%), *Parapusillimonas* (6.0-6.3%) e *Dojnbacteria* (6.1-9.6%) [79] (**Tabella 5**). Interessante è l'assenza di AOB, che indica che la biomassa sospesa era principalmente composta da un pool di batteri eterotrofi, mentre il biofilm MBBR includeva tutti i gruppi funzionali tipici di un processo SPND.

La composizione del biofilm è cambiata in modo significativo durante il periodo P2 in seguito alla diminuzione del rapporto C/P nell'influyente. Le abbondanze relative di uncultured *Anaerolineaceae*, SM1A02, *Arenimonas* e *Flavobacterium* sono aumentate dell'1.0–6.4% (**Tabella 5**). Al contrario, le abbondanze relative di *Hydrogenophaga*, *Luitemonas*, *Aquamicrobium* e *Rhizobium* hanno mostrato una diminuzione tra lo 0.3% e l'8.3%. *Flavobacterium* e *Arenimonas* sono riportati tra i DNB [49,61]. SM1A02, un genere appartenente ai *Planctomycetes*, è stato indicato come un potenziale batterio anammox, essendo presente in abbondanza nei sistemi anammox [80,81]. L'abbondanza relativa di *Nitrosomonas* nella comunità microbica del biofilm è raddoppiata in entrambi gli MBBR, il che spiega il valore di N_{eff} più elevato osservato in P2 (97%) rispetto a P1 (87%). La popolazione di *Hydrogenophaga* è diminuita significativamente nel biofilm di entrambi gli MBBR e soprattutto in MBBR-Et (da 4.4% a 0.8%), in accordo con la diminuzione di $P-PO_4^{3-}$ RE in P2 (**Tabella 4**).

L'aumento del rapporto C/P ha stimolato la crescita dei batteri HAB in forma sospesa durante il periodo P2. L'aumento complessivo dell'abbondanza relativa di HAB è stato stimato essere di 9.3% e di 42.3%

rispettivamente per MBBR-Ac e MBBR-Et. In particolare, la popolazione di *Bdellovibrio* e *Neochlamydia* nella biomassa sospesa del reattore MBBR-Et è aumentata notevolmente, raggiungendo rispettivamente abbondanze relative di 34.7% e 12.4%. Al contrario, le abbondanze relative di *Acidovorax*, *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Luteimonas* e *Parapusillimonas* sono diminuite di 1.3-18.3% (**Tabella 5**), contribuendo alla diminuzione di P-PO₄³⁻ RE durante il periodo P2 (**Figura 13**).

Tabella 4 – Condizioni sperimentali e composizione dell’effluente durante l’esercizio in continuo dei reattori MBBR-Ac e MBBR-Et.

Periodo	Reattore	Giorni	DO range (mg L ⁻¹)	Portata d’aria (mL min ⁻¹)	C/N ratio	C/P ratio	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	TIN (mg L ⁻¹)	P-PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)
Start-up	MBBR-Ac	3-9	0.2-3.0	120	1.5 (±0.1)	10.1 (±1.5)	48 (±1)	65 (±1)	10 (±1)
	MBBR-Et		0.2-3.0	140	1.4 (±0.1)	10.0 (±0.4)	48 (±0)	66 (±1)	9 (±1)
P1	MBBR-Ac	10-51	0.2-3.0	120	3.5 (±0.3)	11.1 (±1.1)	26 (±1)	27 (±1)	8 (±1)
	MBBR-Et		0.2-3.0	140	3.6 (±0.3)	12.3 (±1.7)	26 (±1)	26 (±1)	8 (±1)
P2	MBBR-Ac	52-79	0.2-3.0	120	3.0 (±0.3)	19.9 (±2.0)	25 (±1)	26 (±1)	4 (±0)
	MBBR-Et		0.2-3.0	140	3.5 (±0.2)	21.9 (±3.0)	24 (±1)	25 (±1)	4 (±0)
P3	MBBR-Ac	80-93	0.2-2.0	120	3.4 (±0.1)	9.3 (±0.1)	26 (±0)	27 (±0)	9 (±1)
	MBBR-Et		0.2-2.0	140	3.4 (±0.3)	9.9 (±1.2)	25(±1)	26 (±1)	9 (±1)
P4	MBBR-Ac	94-105	0.2-3.0	120	3.3 (±0.1)	9.7 (±0.1)	25 (±0)	26 (±0)	8 (±0)
	MBBR-Et		0.2-3.0	140	3.5 (±0.2)	10.5 (±0.4)	24 (±0)	25 (±0)	8 (±0)
P5	MBBR-Ac	106-135	0.2-3.0	130	4.0 (±0.2)	13.1 (±0.8)	25 (±1)	26 (±1)	8 (±0)
	MBBR-Et		0.2-3.0	160	4.0 (±0.4)	13 (±0.9)	26 (±1)	27 (±1)	8 (±0)

Tabella 5 – Identificazione a livello di genere, abbondanza relativa e affiliazione filogenetica dei batteri del biofilm e della biomassa sospesa all'interno dei reattori MBBR-Ac e MBBR-Et. Solo i generi con abbondanza relativa superiore al 4% sono mostrati in tabella (eccetto per AOB e NOB).

Gruppo funzionale	Genere	Phylum	MBBR-Ac				MBBR-Et			
			P1		P2		P1		P2	
			Biofilm	Biomassa sospesa	Biofilm	Biomassa sospesa	Biofilm	Biomassa sospesa	Biofilm	Biomassa sospesa
DNB	<i>Thauera</i>	<i>Proteobacteria</i>	7.2	4.5	7.3	5.5	14.2	6.0	6.4	6.5
	<i>Luteimonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	4.0	5.9	1.9	2.3	1.8	5.6	1.2	0.5
	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i>	0.4	0.6	5.2	13.5	0.8	0.8	3.4	4.6
	<i>Arenimonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	0.2	0.3	6.6	0.3	0.1	0.4	0.3	0.7
	<i>Rhizobium</i>	<i>Proteobacteria</i>	15.6	19.2	7.3	12.0	4.8	19.2	3.1	0.9
	<i>Aquamicrobium</i>	<i>Proteobacteria</i>	2.5	3.4	1.5	1.6	1.2	3.9	0.9	n.r.
DNB/ putative DNPAOs	<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	0.3	2.1	1.1	0.8	8.8	2.8	10.6	1.0
DNB/ putative PAOs	<i>Acidovorax</i>	<i>Proteobacteria</i>	13.5	13.8	1.5	7.0	n.r.	13.0	0.7	n.r.
	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Proteobacteria</i>	2.2	4.2	1.4	1.7	4.4	4.5	0.8	1.3
putative PAOs	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Proteobacteria</i>	n.r.	1.3	0.9	n.r.	10.4	3.8	2.7	9.1
Anammox	<i>SM1A02</i>	<i>Planctomycetes</i>	5.0	0.9	8.6	2.2	1.9	0.7	4.1	0.6
	<i>OM190</i>	<i>Planctomycetes</i>	0.2	0.7	1.6	0.2	11.3	0.8	2.9	0.1
HAB	<i>Neochlamydia</i>	<i>Verrucomicrobiota</i>	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	0.7	12.4
	<i>Parapusillimonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	2.2	6.0	0.3	2.2	n.r.	6.3	0.2	0.1
	<i>Leadbetterella</i>	<i>Bacteroidetes</i>	3.0	1.8	8.0	12.2	2.7	2.0	1.6	3.4
	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Bdellovibrionota</i>	4.4	7.2	3.1	5.3	2.9	6.1	15.1	34.7
	<i>Uncultured</i> <i>_Anaerolineaceae</i>	<i>Chloroflexi</i>	5.6	1.7	9.8	2.7	0.9	1.5	4.3	n.r.
	<i>Dojkabacteria</i>	<i>Patescibacteria</i>	5.8	9.6	4.9	1.0	4.7	6.1	4.1	n.r.
AOB	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Proteobacteria</i>	0.7	n.r.	1.4	n.r.	0.3	n.r.	0.6	n.r.
NOB			n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.

n.r. = non rilevato



Figura 10. Reattori MBBR alimentati con diversa fonte di carbonio organico (etanolo ed acetato)

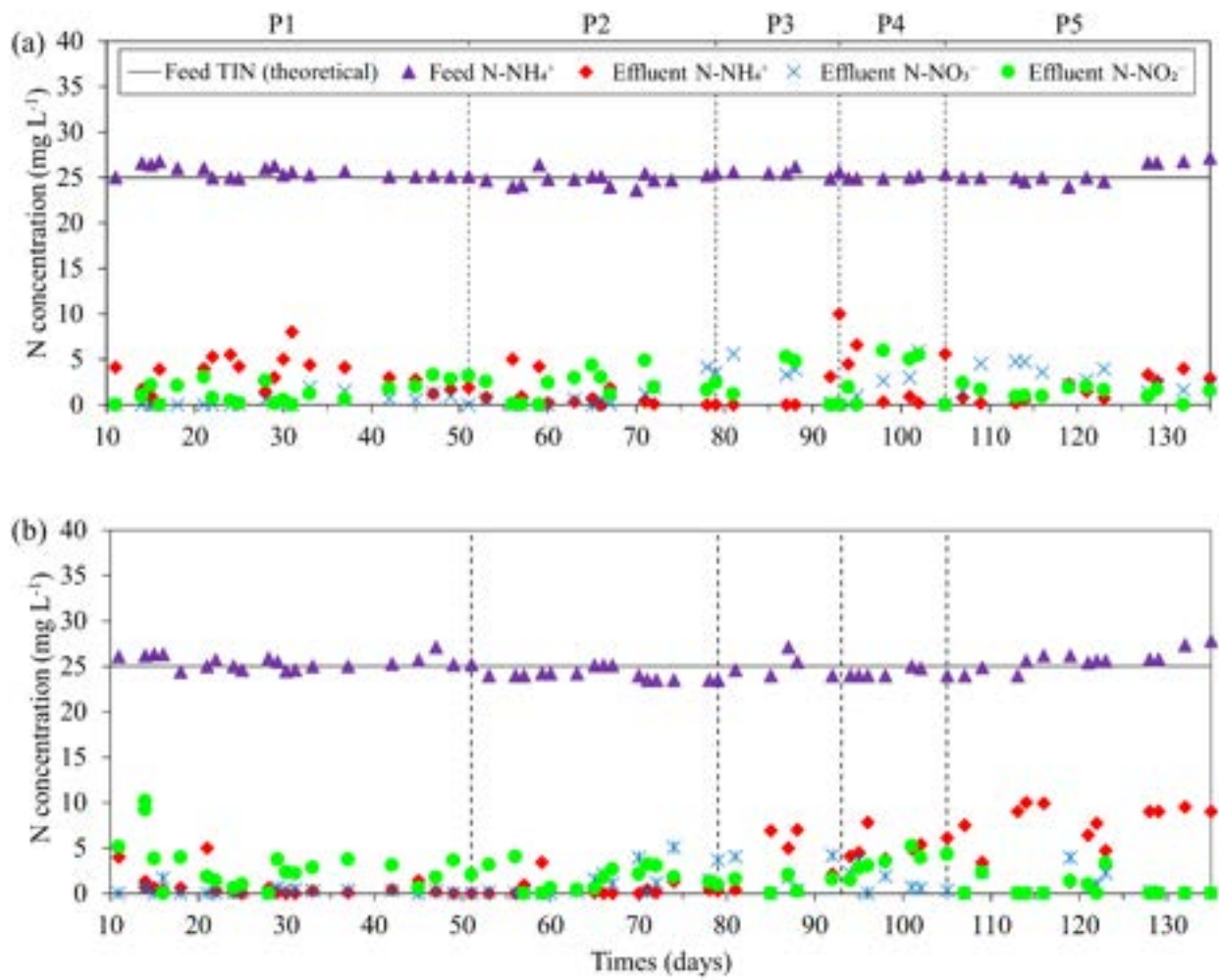


Figura 11 – Profili delle concentrazioni di N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ e N-NO₂⁻ durante l'esercizio in continuo dei reattori MBBR-Ac (a) e MBBR-Et (b).

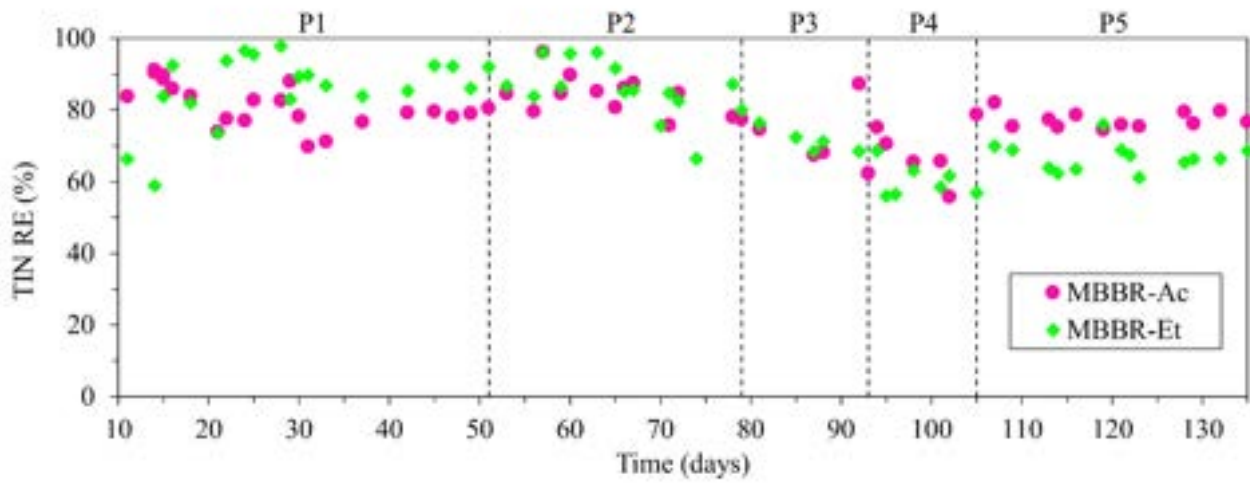


Figura 12 – Andamento del TIN RE nei reattori MBBR-Et e MBBR-Ac durante l'esercizio in continuo.

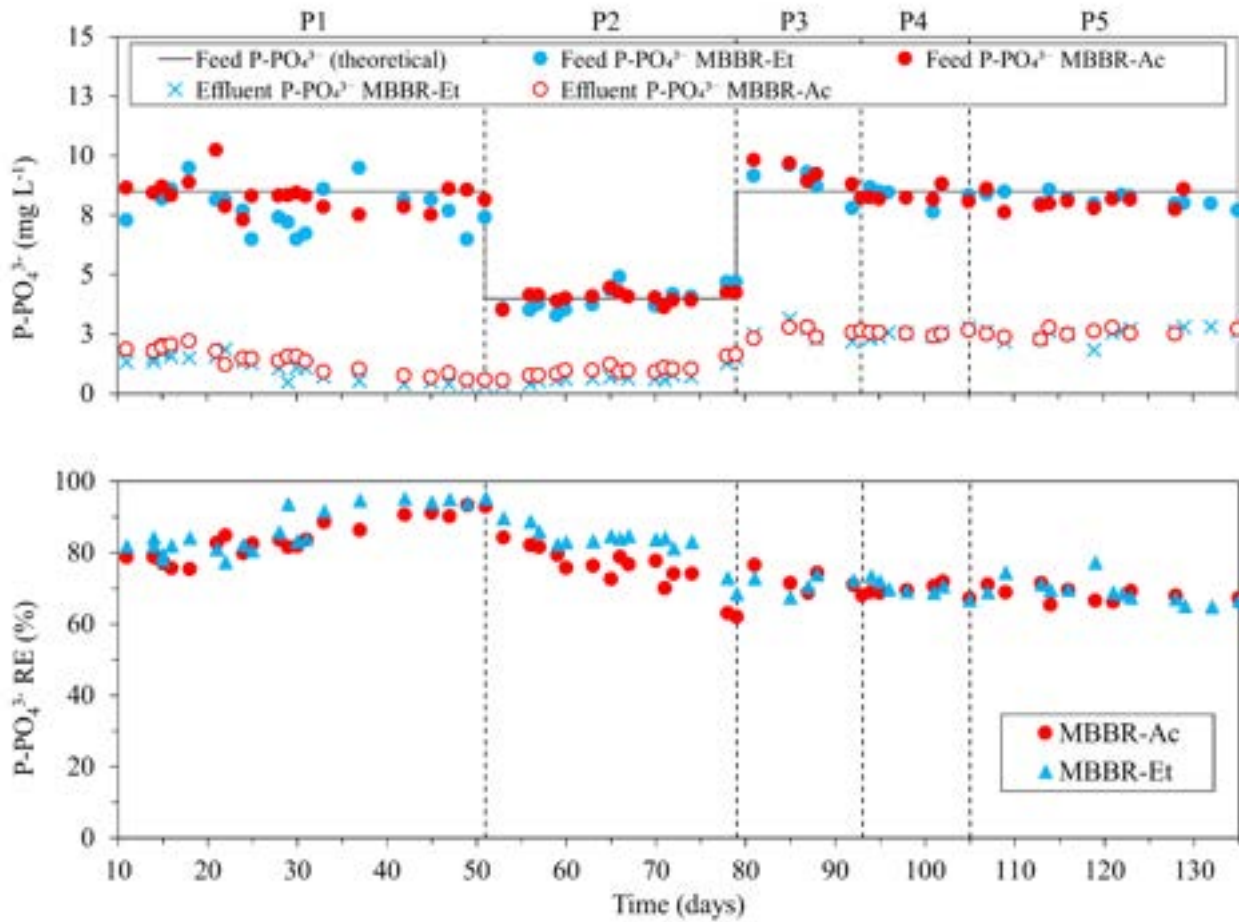


Figure 13 – Andamento delle concentrazioni di P-PO₄³⁻ nell'influenza ed effluente dei reattori MBBR.

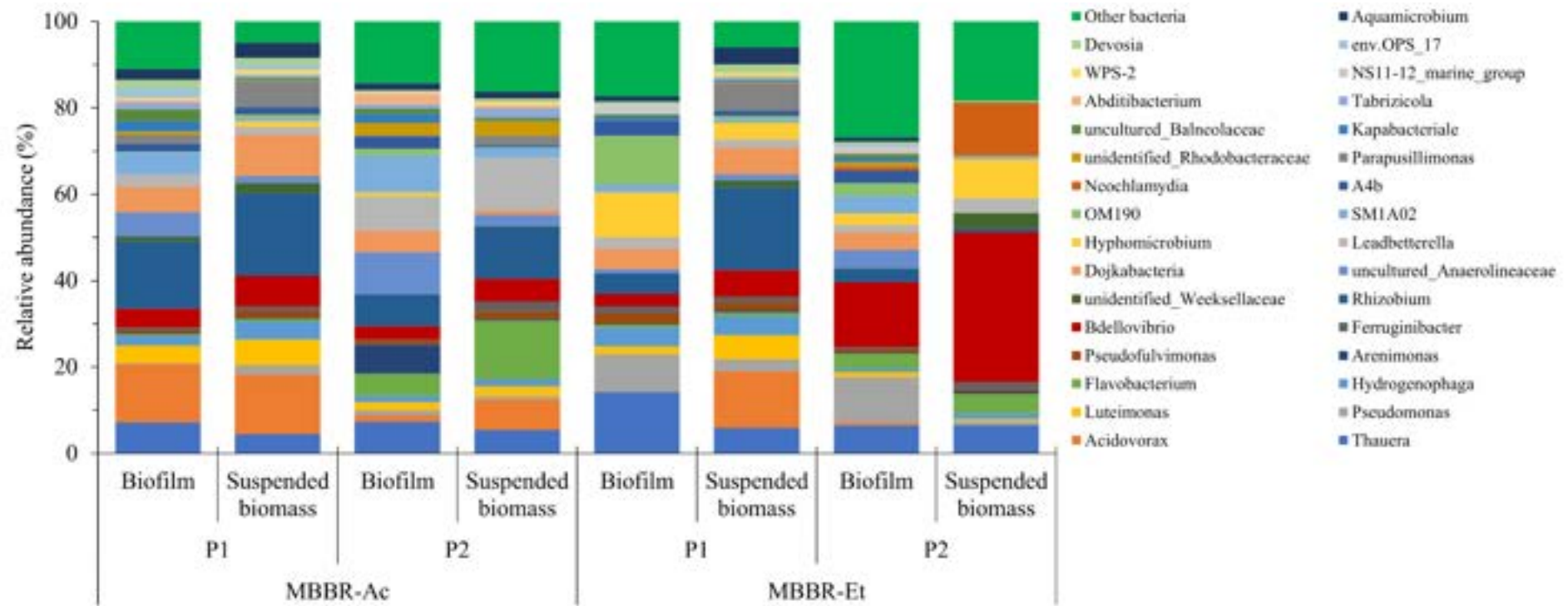


Figure 14 – Composizione della comunità microbica nei reattori MBBR-Ac e MBBR-Et a livello di genere con abbondanza relativa sopra il 2%.

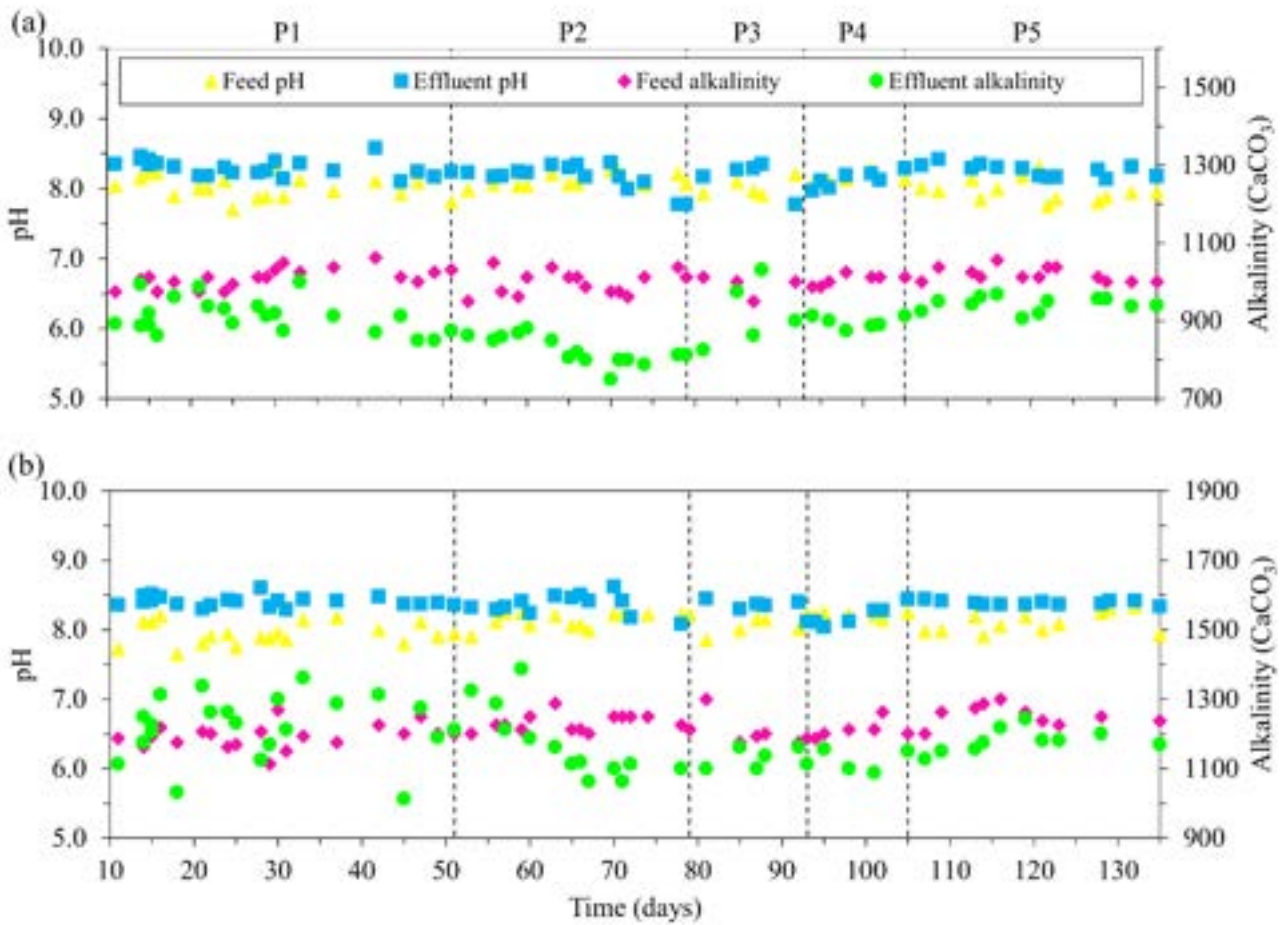


Figura 15 – Profilo del pH effluente e della concentrazione di alcalinità durante l'esercizio in continuo dei reattori MBBR-Ac (a) ed MBBR-Et (b).

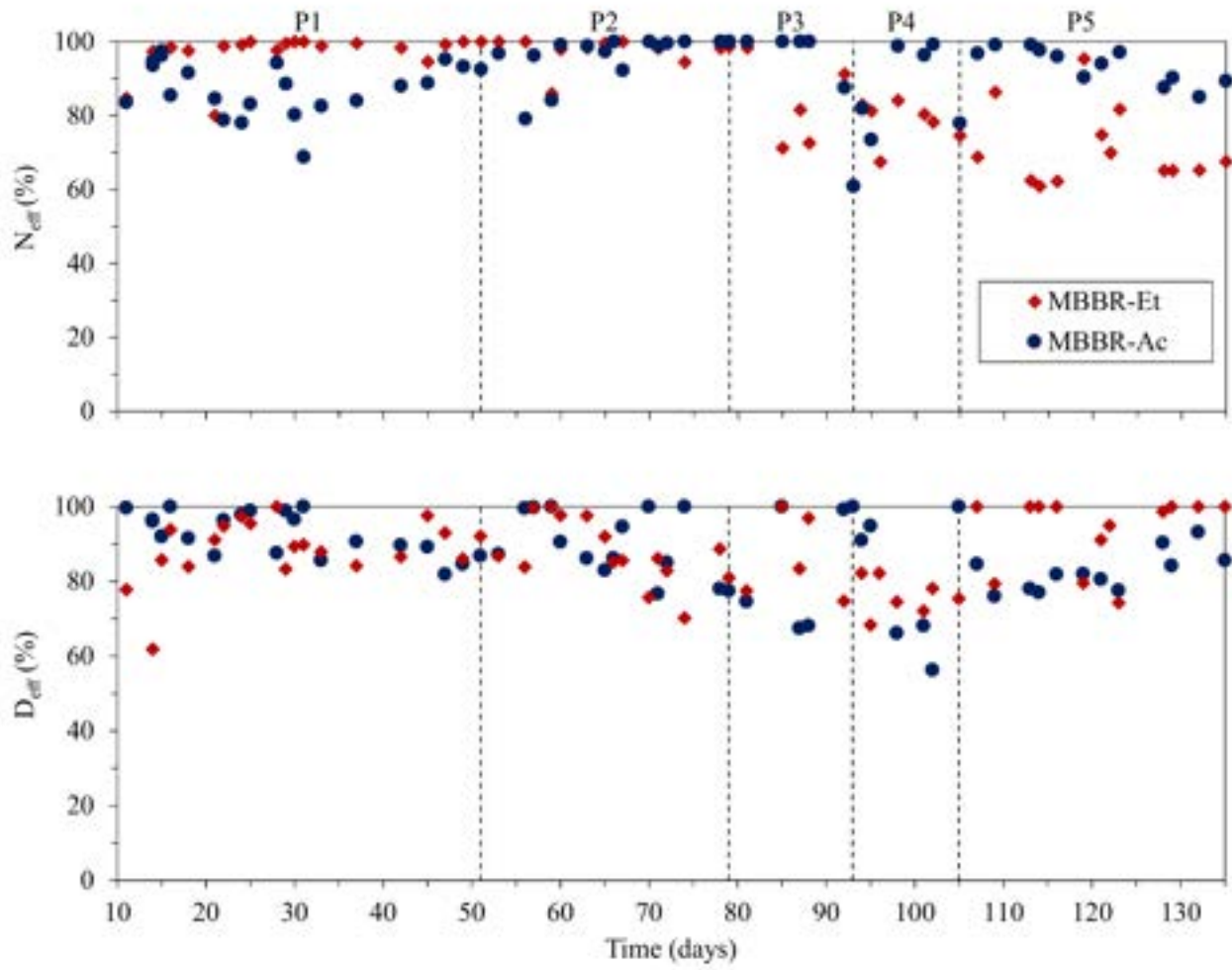


Figura 16 – Efficienze di nitrificazione (N_{eff}) e denitrificazione (D_{eff}) durante l'operazione in continuo dei reattori MBBR-Ac e MBBR-Et.

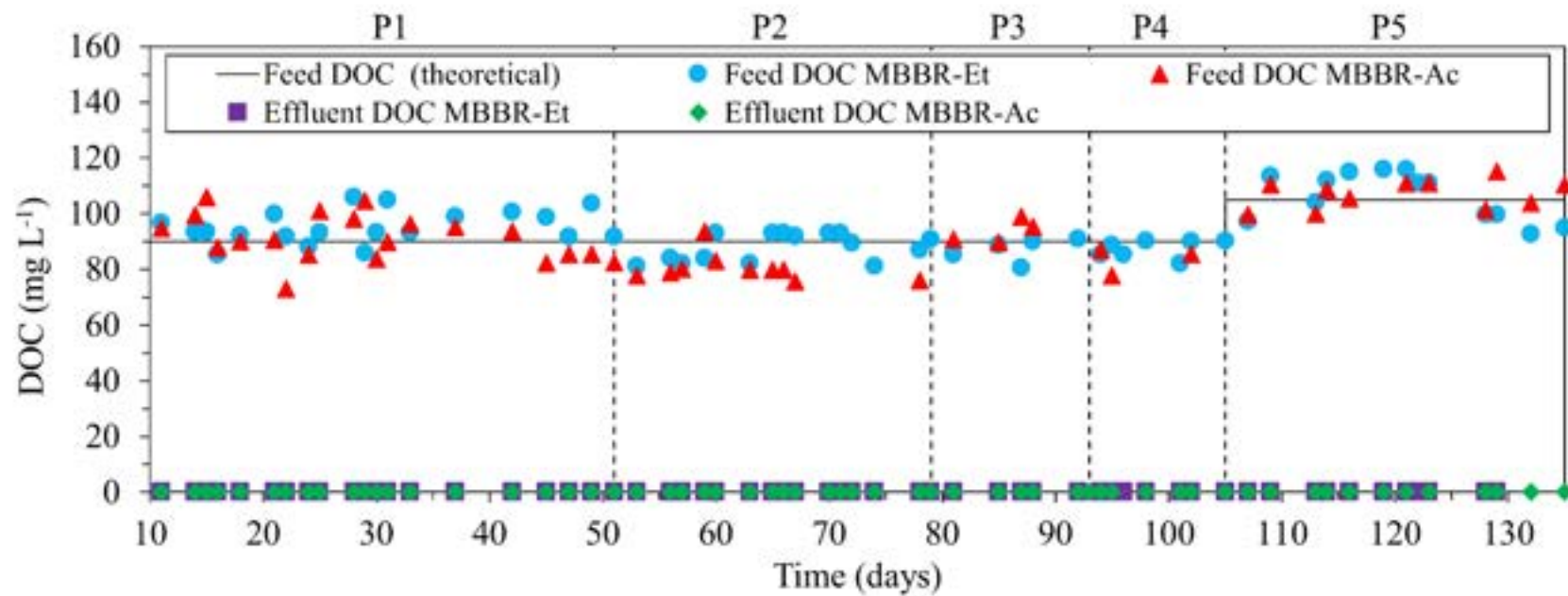


Figura 17 – Andamento delle concentrazioni influenti ed effluenti di DOC durante durante l'operazione in continuo dei reattori MBBR-Ac e MBBR-Et.

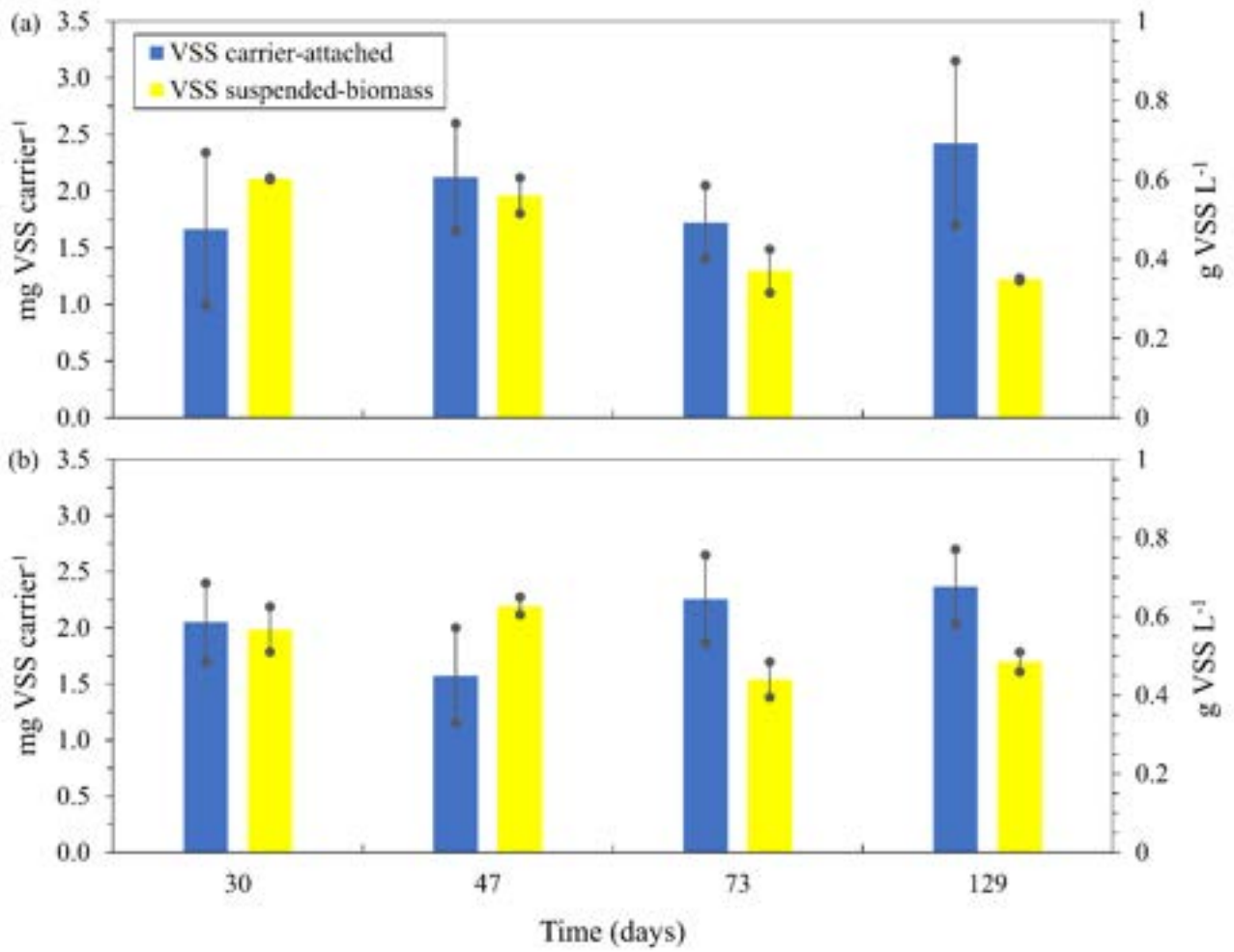


Figura 18 – Concentrazione della biomassa adesa e sospesa durante l’esercizio in continuo dei reattori MBBR-Ac (a) e MBBR-Et (b).

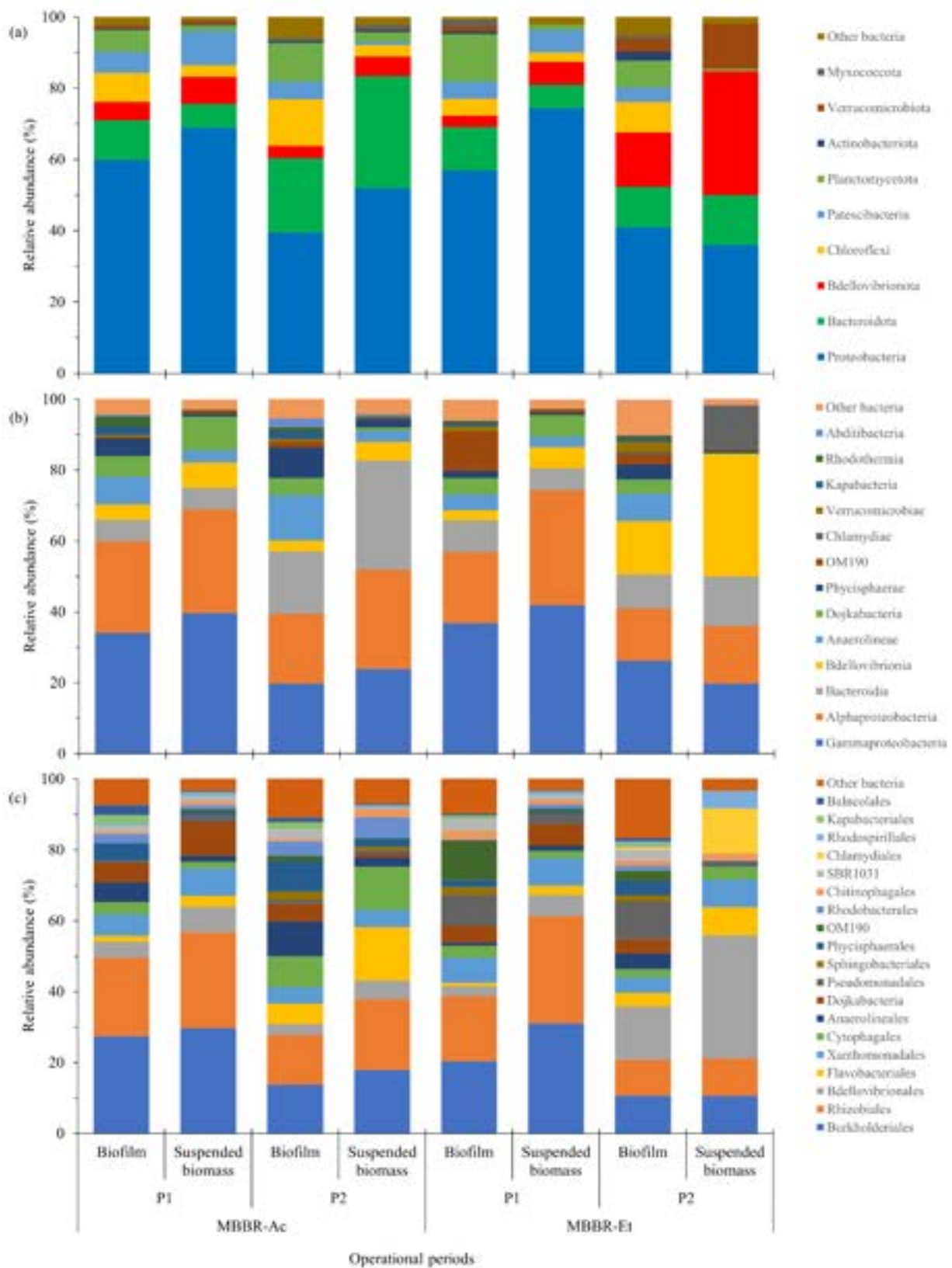


Figura 19 – Composizione della comunità microbica del biofilm e della biomassa sospesa nei reattori MBBR-Ac e MBBR-Et a livello di (a) phylum, (b) classe e (c) ordine.

2.4 Sviluppo di un modello previsionale mediante algoritmi di Machine Learning

2.4.1 Premessa

Nell'ambito trattamento biologico delle acque reflue, la variabilità delle caratteristiche dell'influente ha un'enorme influenza sulle condizioni di funzionamento del sistema. Inoltre, modellare un sistema biologico è molto complesso, soprattutto quando all'interno di un singolo reattore sono presenti più famiglie microbiche. Il ML può essere uno strumento per poter effettuare la modellazione e la previsione di un processo biologico. In questo studio, l'obiettivo è stato quello di esplorare le potenzialità degli algoritmi esistenti (Random Forest, Support Vector Machine, ecc.) per la previsione delle performance di un reattore biologico al fine di fornire un valido supporto previsionale ai gestori di un impianto di trattamento delle acque reflue. La disponibilità di informazioni sull'evoluzione del processo consentirebbe agli operatori degli impianti di calibrare gli interventi sui vari processi, portando ad un'efficienza più stabile nel lungo periodo. In situazioni pratiche, il modello ANN può essere utilizzato in abbinamento ad un software programmato per monitorare in tempo reale le prestazioni dell'MBBR e generare segnali relativi alle variazioni di prestazione che si stanno verificando e consigliare opportune variazioni delle condizioni operative (ad esempio di HRT e DO). Le prime analisi sono state effettuate mediante l'utilizzo di tre algoritmi implementati nel software WEKA: Random Forest (RF), Multilayer Perceptron (MLP) e Support Vector Machine for Regression (SMOreg). Il dataset considerato è quello relativo ad un reattore MBBR gestito in modo modalità puramente microaerobica mantenendo una concentrazione di ossigeno disciolto di $1.0(\pm 0.2)$ mg L⁻¹ durante l'intero studio. Il set-up del reattore, le condizioni operative, i metodi analitici e le performance depurative in termini di SND e rimozione del fosforo da parte del reattore microaerobico MBBR (mMBBR) sono descritte da Iannacone et al. (2019).

2.4.2 Metodologia e modelli previsionali utilizzati

Prima di modellare il processo biologico di rimozione del TIN, il set di dati deve essere suddiviso in sezioni di addestramento e test. Il metodo più utilizzato è quello di suddividere casualmente il set di dati in sottoinsiemi di addestramento e test con un tipico test di addestramento dei dati che varia tra il 70% e l'80% [32]. In questo studio, è stato utilizzato un metodo di cross-validation K-fold per selezionare i dati per l'addestramento e il test del modello. Il metodo di cross-validation prevede di dividere casualmente il set di dati in K pieghe (K = 10), quindi K-1 pieghe vengono utilizzate per l'addestramento del modello, mentre 1 piega per il test del modello. Il metodo di cross-validation viene ripetuto K volte per utilizzare ogni K volte come set di dati di convalida. La prestazione complessiva del modello è stimata come media delle prestazioni ottenute per ogni sottoinsieme.

Per valutare le prestazioni del modello sono stati valutati R², l'errore medio assoluto (MAE), l'errore quadratico medio (RMSE) e l'errore assoluto relativo (RAE). R² indica quanto bene il modello prevede i dati (Eq. 6); MAE è la media della differenza assoluta tra il valore previsto e il valore sperimentale, cioè è una misura dell'errore medio tra questi valori (Eq. 7); RMSE è valutato come la radice quadrata delle differenze quadrate medie tra il valore previsto e il valore effettivo e rappresenta la deviazione standard delle differenze predette (Eq. 8); RAE è l'errore assoluto totale normalizzato (Eq. 9).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^m (f_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^m (y_a - y_i)^2} \quad (6)$$

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^m |f_i - y_i|}{m} \quad (7)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (f_i - y_i)^2}{m}} \quad (8)$$

$$RAE = \frac{\sum_{i=1}^m |f_i - y_i|}{\sum_{i=1}^m |y_a - y_i|} \quad (9)$$

Dove m è il numero totale di dati, y_i è il dato sperimentale, y_a il valore medio dei dati sperimentali e f_i è il valore previsto.

Gli algoritmi utilizzati sono RF e MLP implementati in WEKA (University of Waikato, NZ). Gli algoritmi sono esaurientemente descritti da Granata et al. [34,82]. In breve, RF è un modello di insieme costituito da alberi di regressione non correlati. L'albero di regressione è caratterizzato da un processo di costruzione che consiste nella suddivisione dei dati in "rami". Le variabili di input sono raggruppate in una singola partizione e successivamente vengono allocate nei primi due rami. Il modello procede considerando tutti i possibili frazionamenti. Nel caso di una foresta casuale, gli iper-parametri includono il numero di alberi decisionali nella foresta e il numero di caratteristiche considerate da ogni albero quando si divide un nodo. La foresta casuale utilizzata contava 100 alberi.

MLP è un sistema di nodi interconnessi che appartiene alla classe delle reti di feed forward supervisionate. MLP è il tipo più comune di modello ANN utilizzato per problemi ambientali [32,33]. La struttura di MLP è composta da uno strato di input, uno o più strati nascosti e uno strato di output [83]. Il numero ottimale di strati nascosti può essere ottenuto con un processo di tentativi ed errori, tuttavia un numero insufficiente di strati nascosti può determinare un problema di underfitting mentre un numero elevato di strati nascosti può determinare un problema di overfitting. In questo studio è stata utilizzata la tecnica di back propagation. La correlazione tra l'input x_i , elaborato attraverso gli strati nascosti, e l'output y_j può essere espressa come segue (Eq. 10):

$$y_j = f\left(\sum_{i=1}^n w_{ij}x_i + b\right) \quad (10)$$

Dove $f(x)$ è la funzione di trasferimento, n il numero di variabili di input, w_{ij} è il peso della connessione moltiplicato per l'input del livello precedente x_i . L'input ponderato viene quindi riassunto nel valore bias b . Ciascun nodo o neurone utilizza una funzione di attivazione non lineare, ad eccezione dei nodi di input. Le reti neurali erano composte da 1 strato nascosto, con 2 neuroni. È stata utilizzata una funzione di attivazione sigmoide, mentre il tasso di apprendimento e il tasso di quantità di moto sono stati rispettivamente di 0.3 e 0.2.

2.4.3 Risultati

Le variabili di input per la previsione dell'andamento di TIN RE nel reattore mMBBR sono state valutate mediante un processo di trial-and-error. Secondo l'evoluzione della rimozione del TIN attraverso il processo SND, la modifica di questi parametri di input potrebbe avere un impatto significativo sulle prestazioni del bioreattore. Le concentrazioni di TIN misurate e previste nell'effluente sono riportate in **Figura 19**. Un confronto tra le previsioni delle prestazioni ottenute tramite i modelli MLP e RF è rappresentato dagli errori relativi. Gli errori relativi sono stati valutati come rapporto tra la differenza dei valori misurati e previsti e il valore misurato [84]. La **Figura 19** mostra che il 70% dei valori previsti dal modello RF sono stati affetti da un errore inferiore al 20% in valore assoluto (**Figura 19**), mentre meno del 60% dei valori previsti dal modello MLP sono stati affetti da un errore inferiore a 20% (**Figura 19**).

L'errore relativo positivo determina una sovrastima delle concentrazioni di TIN effluente, mentre l'errore negativo corrisponde a una sottostima dei valori previsti [84]. La combinazione delle variabili di input con le migliori prestazioni di previsione (R^2 , MAE, RMSE e RAE) sono mostrate in **Tabella 6**.

È stato utilizzato un metodo trial-and-error per identificare i parametri di input più influenti, ovvero HRT, DO, COD e TIN (**Tabella 6**). Secondo l'evoluzione della rimozione del TIN attraverso il processo SND, la modifica di questi parametri di input potrebbe avere un impatto significativo sulle prestazioni del bioreattore [7,85,86]. L'algoritmo RF ha mostrato la migliore accuratezza ($R^2=0.90$, MAE=3.02, RMSE=4.0, RAE=25.7%) (**Figura 19**), mentre il valore di R^2 più alto ottenuto con l'algoritmo RF rispetto a MLP (cioè 0.84) ha confermato un'accuratezza nella previsione dei dati sperimentali (**Tabella 6**). È interessante notare che l'algoritmo MLP ha mostrato una tendenza a sottostimare le concentrazioni effettive di TIN nell'effluente, determinando la previsione di TIN RE più elevati (**Figura 19**).

Tabella 6 – Paragone tra i diversi modelli previsionali utilizzati.

Variabile di input	Unità di misura	Algoritmo	R ²	MAE	RMSE	RAE
HRT	[d]	RF	0.90	3.0	4.0	25.7%
DO	[mg L ⁻¹]					
COD	[mg L ⁻¹]	MLP	0.84	4.1	5.4	35.3%
TIN	[mg L ⁻¹]					

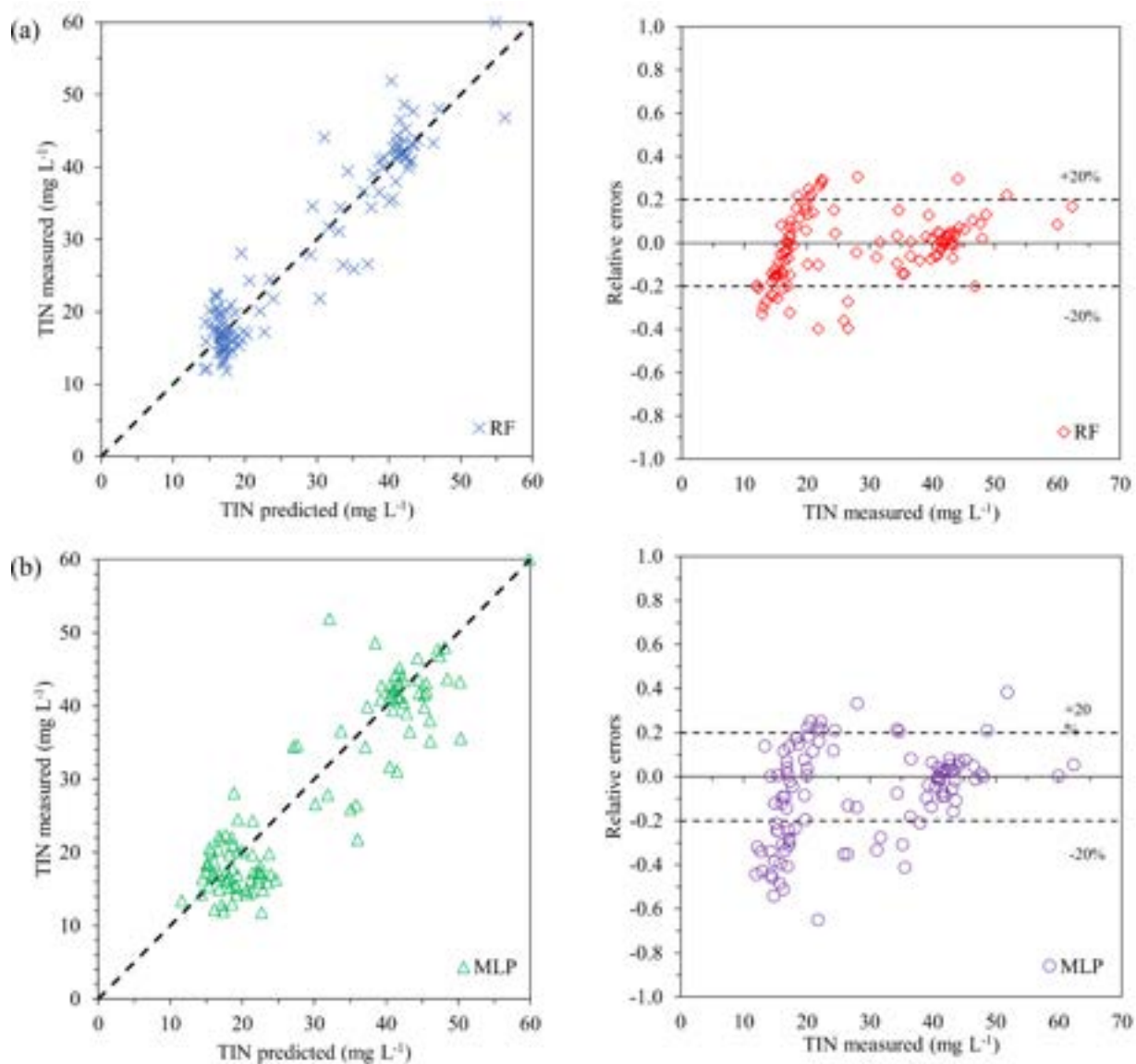


Figura 20 – Previsione della concentrazione di azoto. A sinistra è riportato il confronto tra valori previsti e valori predetti, mentre a destra sono riportati gli errori relativi dei valori di TIN misurati.

3 Conclusioni

Il reattore IAMBRR ha raggiunto efficienze di rimozione di DOC, TIN e P-PO₄³⁻ fino a valori rispettivamente di 100%, 82% e 81%, funzionando ad un intervallo di DO di 0.2-3 mg L⁻¹, rapporto C/N nell'influente di 3.6 e HRT di 1 giorno. Il ciclo microaerobico-aerobico ha consentito la coesistenza di specie chiave coinvolte nei processi di nitrificazione, denitrificazione e accumulo di fosforo nel biofilm del reattore IAMBRR. I batteri denitrificanti aerobici, ovvero *Hydrogenophaga* e *Dokdonella*, sono stati identificati come potenzialmente responsabili della rimozione avanzata del fosforo.

Un processo SPND con valori medi di TIN, N_{eff} e D_{eff} REs > 80% è stato eseguito in reattori MBBR a flusso continuo con aerazione intermittente a livelli di DO compresi tra 0.2 e 3 mg L⁻¹. La coltivazione della biomassa a pH 8.2, SRT 4 giorni e 26–28° C e il funzionamento ad aerazione intermittente hanno inibito efficacemente la crescita di NOB e permesso lo sviluppo di un processo SPND negli MBBR. L'acetato si è rivelato una fonte di sostanza organica preferibile rispetto all'etanolo in quanto il suo utilizzo ha portato ad una comunità microbica più diversificata. Valori di P-PO₄³⁻ RE > 80% sono stati raggiunti senza uno stadio anaerobico. Il reattore MBBR microaerobico/aerobico si è dimostrato una tecnologia promettente per la rimozione combinata di C, N e P, sebbene l'impatto di sostanze organiche complesse e la riduzione dei livelli di NO₂⁻ degli effluenti necessitino di ulteriori indagini.

Nell'applicazione su scala reale degli MBBR microaerobici, i WWTP potrebbero essere controllati tramite monitoraggio online, utilizzando sensori programmabili integrati con intelligenza artificiale capaci di suggerire cambiamenti appropriati delle condizioni operative in corrispondenza di una scarsa rimozione dell'azoto. Va notato che i dati misurati sono stati raccolti in un periodo molto breve (10 mesi). Al fine di una migliore calibrazione e validazione dei modelli previsionali proposti, si consiglia l'utilizzo di dataset di grandi dimensioni.

4 Disseminazione

Articoli su rivista

- Iannacone, F., Di Capua, F., Granata, F., Gargano, R., Esposito, G., 2020. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in a continuous-flow moving bed biofilm reactor alternating microaerobic and aerobic conditions. *Bioresour. Technol.* 310, 123453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123453>
- Iannacone, F., Di Capua, F., Granata, F., Gargano, R., Esposito, G., 2021. Shortcut nitrification-denitrification and biological phosphorus removal in acetate- and ethanol-fed moving bed biofilm reactors under microaerobic/aerobic conditions. *Bioresour. Technol.* 330, 124958. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124958>

Conferenze

- IWA Nutrient removal and recovery 2020 conference, contributo dal titolo "Simultaneous Removal Of Carbon, Nitrogen And Phosphorus In Continuous Single-stage Moving Bed Biofilm Reactors (MBBRs) Under Microaerobic And Intermittent Aeration Conditions". Website: www.iwa-nrr.org.

5 Riferimenti bibliografici

- [1] M.C. Chrispim, M. Scholz, M. Antunes, Phosphorus recovery from municipal wastewater treatment: critical review of challenges and opportunities for developing countries, *J. Environ. Manage.* 248, (2019), 109268. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109268>.
- [2] Y. Chen, C. Peng, J. Wang, L. Ye, L. Zhang, Y. Peng, Effect of nitrate recycling ratio on simultaneous biological nutrient removal in a novel anaerobic/anoxic/oxic (A2/O) -biological aerated filter (BAF) system, *Bioresour. Technol.* 102 (2011), 5722–5727. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.114>.
- [3] P.J.T.M. van Puijenbroek, A.H.W. Beusen, A.F. Bouwman, Global nitrogen and phosphorus in urban waste water based on the Shared Socio-economic pathways, *J. Environ. Manage.* 231 (2019), 446–456. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.048>.
- [4] EEA, EEA Signals 2018 - Water Is Life. Copenhagen, Denmark., 2018. <https://doi.org/10.2800/52469>.
- [5] ISTAT, Annuario statistico italiano 2019, 2019. <https://www.istat.it/it/archivio/236772> (accessed April 17, 2021).
- [6] L. Lijó, S. Malamis, S. González-García, F. Fatone, M. T. Moreira, E. Katsou, Technical and environmental evaluation of an integrated scheme for the co-treatment of wastewater and domestic organic waste in small communities, *Water Res.* 109 (2016), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.057>.
- [7] Y.Q. Gu, T.T. Li, H.Q. Li, Biofilm formation monitored by confocal laser scanning microscopy during startup of MBBR operated under different intermittent aeration modes, *Process Biochem.* 74 (2018), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.032>.
- [8] R. Khanongnuch, F. Di Capua, A.-M. Lakaniemi, E.R. Rene, P.N.L. Lens, Effect of N/S ratio on anoxic thiosulfate oxidation in a fluidized bed reactor: experimental and artificial neural network model analysis, *Process Biochem.* 68 (2018), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.02.018>.
- [9] S.Y. Gebremariam, M.W. Beutel, D. Christian, T.F. Hess, Research Advances and Challenges in the Microbiology of Enhanced Biological Phosphorus Removal — A Critical Review, *Water Environ. Res.* 83 (2011), 195–219. <https://doi.org/10.2175/106143010X12780288628534>.
- [10] M. Pijuan, A. Guisasola, J.A. Baeza, J. Carrera, C. Casas, J. Lafuente, Net P-removal deterioration in enriched PAO sludge subjected to permanent aerobic conditions, *J. Biotechnol.* 123 (2006), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.10.018>.
- [11] M. Stokholm-Bjerregaard, S.J. Mcilroy, M. Nierychlo, S.M. Karst, M. Albertsen, P.H. Nielsen, A critical assessment of the microorganisms proposed to be important to enhanced biological phosphorus removal in full-scale wastewater treatment systems, *Front. Microbiol.* 8 (2017), 718. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00718>.
- [12] J. Jena, R. Kumar, A. Dixit, T. Das, Anoxic – aerobic SBR system for nitrate, phosphate and COD removal from high-strength wastewater and diversity study of microbial communities, *Biochem. Eng. J.* 105 (2016), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.007>.
- [13] H. Satoh, Y. Iwamoto, T. Mino, T. Matsuo, Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic, *Water Sci. Technol.* (1998), 103–109. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00435-1](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00435-1).

- [14] R. Ferrentino, A. Ferraro, M.R. Mattei, G. Esposito, G. Andreottola, Process performance optimization and mathematical modelling of a SBR-MBBR treatment at low oxygen concentration, *Process Biochem.* 75 (2018), 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.023>.
- [15] S. Salehi, K.Y. Cheng, A. Heitz, M.P. Ginige, Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus recovery (SNDPr) - an opportunity to facilitate full-scale recovery of phosphorus from municipal wastewater, *J. Environ. Manage.* 238 (2019), 41–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.063>.
- [16] P. Roots, F. Sabba, A.F. Rosenthal, Y. Wang, Q. Yuan, L. Rieger, F. Yang, J.A. Kozak, H. Zhang, G.F. Wells, Integrated shortcut nitrogen and biological phosphorus removal from mainstream wastewater: Process operation and modeling, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 6 (2020), 566–580. <https://doi.org/10.1039/c9ew00550a>.
- [17] H. Wang, Q. Song, J. Wang, H. Zhang, Q. He, W. Zhang, J. Song, J. Zhou, H. Li, 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.* 642 (2018), 1145–1152. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.081>.
- [18] I.S. Arvanitoyannis, *Waste management for the food industries*, Elsevier Inc., 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373654-3.X5001-9>.
- [19] S. Jafarinejad, Cost estimation and economical evaluation of three configurations of activated sludge process for a wastewater treatment plant (WWTP) using simulation, *Appl. Water Sci.* 7 (2017), 2513–2521. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0446-8>.
- [20] S. Rahimi, O. Modin, I. Mijakovic, Technologies for biological removal and recovery of nitrogen from wastewater, *Biotechnol. Adv.* 43 (2020), 107570. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107570>.
- [21] L. Chu, J. Wang, Comparison of polyurethane foam and biodegradable polymer as carriers in moving bed biofilm reactor for treating wastewater with a low C/N ratio, *Chemosphere.* 83 (2011), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.077>.
- [22] Y. Jia, M. Zhou, Y. Chen, Y. Hu, J. Luo, Insight into short-cut of simultaneous nitrification and denitrification process in moving bed biofilm reactor: effects of carbon to nitrogen ratio, *Chem. Eng. J.* 400 (2020), 125905. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125905>.
- [23] S. Yang, F. Yang, Nitrogen removal via short-cut simultaneous nitrification and denitrification in an intermittently aerated moving bed membrane bioreactor, *J. Hazard. Mater.* 195 (2011), 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.045>.
- [24] W. Huang, Z. She, M. Gao, Q. Wang, C. Jin, Y. Zhao, L. Guo, Effect of anaerobic/aerobic duration on nitrogen removal and microbial community in a simultaneous partial nitrification and denitrification system under low salinity, *Sci. Total Environ.* 651 (2019), 859–870. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.218>.
- [25] Y. Peng, G. Zhu, Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2006), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0534-z>.
- [26] X. Liu, M. Kim, G. Nakhla, M. Andalib, Y. Fang, Partial nitrification-reactor configurations, and operational conditions: Performance analysis, *J. Environ. Chem. Eng.* 8 (2020), 103984. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103984>.

- [27] A. di Biase, M.S. Kowalski, T.R. Devlin, J.A. Oleszkiewicz, Moving bed biofilm reactor technology in municipal wastewater treatment: a review, *J. Environ. Manage.* 247 (2019), 849–866. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.053>.
- [28] R. Campo, S. Sguanci, S. Caffaz, L. Mazzoli, C. Lubello, T. Lotti, Efficient carbon, nitrogen and phosphorus removal from low C/N real domestic wastewater with aerobic granular sludge, *Bioresour. Technol.* 305 (2020), 122961. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122961>.
- [29] L. Yan, S. Liu, Q. Liu, M. Zhang, Y. Liu, Y. Wen, Z. Chen, Improved performance of simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an oxygen-limited SBR by alternating the DO, *Bioresour. Technol.* 275 (2019), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.054>.
- [30] C. Tan, F. Ma, S. Qiu, Impact of carbon to nitrogen ratio on nitrogen removal at a low oxygen concentration in a sequencing batch biofilm reactor, *Water Sci. Technol.* 67 (2013), 612–618. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.554>.
- [31] H. Guo, K. Jeong, J. Lim, J. Jo, Y.M. Kim, J. pyo Park, J.H. Kim, K.H. Cho, Prediction of effluent concentration in a wastewater treatment plant using machine learning models, *J. Environ. Sci. (China)*. 32 (2015), 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2015.01.007>.
- [32] M. Asadi, H. Guo, K. McPhedran, Biogas production estimation using data-driven approaches for cold region municipal wastewater anaerobic digestion, *J. Environ. Manage.* 253 (2020), 109708. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109708>.
- [33] E.R. Rene, M. Estefanía López, M.C. Veiga, C. Kennes, Neural network models for biological waste-gas treatment systems, *N. Biotechnol.* 29 (2011), 56–73. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.07.001>.
- [34] F. Granata, R. Gargano, G. de Marinis, Artificial intelligence based approaches to evaluate actual evapotranspiration in wetlands, *Sci. Total Environ.* 703 (2020), 135653. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135653>.
- [35] Y. Peng, Y. MA, S. Wang, Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process, *J. Environ. Sci.* 19 (2007), 284–289.
- [36] D. Ucar, T. Yilmaz, F. Di Capua, G. Esposito, E. Sahinkaya, Comparison of biogenic and chemical sulfur as electron donors for autotrophic denitrification in sulfur-fed membrane bioreactor (SMBR), *Bioresour. Technol.* 299 (2020), 122574. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122574>.
- [37] F. Iannacone, F. Di Capua, F. Granata, R. Gargano, F. Pirozzi, G. Esposito, Effect of carbon-to-nitrogen ratio on simultaneous nitrification denitrification and phosphorus removal in a microaerobic moving bed biofilm reactor, *J. Environ. Manage.* 250 (2019), 109518. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2019.109518>.
- [38] J.J. Classen, W.J. Chandler, R.S. Huie, J.A. Osborne, A centrifuge-based procedure for suspended solids measurements in Lagoon sludge, *Am. Soc. Agric. Biol. Eng.* 56 (2013), 747–752.
- [39] G. Zajzon, D. Sándor, E. Fleit, A. Szabó, Investigation of simultaneous nitrification and denitrification process using biofilm formed on intelligent hydrogel micro-carriers, in: *Proc. 6th IWA Int. Young Water Prof. Conf.*, 2012: pp. 10–13.
- [40] B.E. Rittmann, P.L. McCarty, *Environmental biotechnology: principles and applications*, McGraw Hill Education, 2012.

- [41] G. Liu, J. Wang, Long-Term Low DO Enriches and Shifts Nitrifier Community in Activated Sludge, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013), 5109–5117.
- [42] F. Sabba, A. Terada, G. Wells, B.F. Smets, R. Nerenberg, Nitrous oxide emissions from biofilm processes for wastewater treatment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018), 9815–9829. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9332-7>.
- [43] P. Jabari, G. Munz, Q. Yuan, J.A. Oleszkiewicz, Free nitrous acid inhibition of biological phosphorus removal in integrated fixed-film activated sludge (IFAS) system, *Chem. Eng. J.* 287 (2016), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.117>.
- [44] T. Saito, D. Brdjanovic, M.C.M. Van Loosdrecht, Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms, *Water Res.* 38 (2004), 3760–3768. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.05.023>.
- [45] Y. Barak, J. Van Rijn, Atypical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000), 1209–1212. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1209-1212.2000>.
- [46] L.J. Thompson, V. Gray, D. Lindsay, A. Von Holy, Carbon:nitrogen:phosphorus ratios influence biofilm formation by *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*, *J. Appl. Microbiol.* 101 (2006), 1105–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03003.x>.
- [47] S.K. Jørgensen, A.S.L. Pauli, Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge, *Anaerobe.* 1 (1995), 161–168.
- [48] C.M. López-Vázquez, C.M. Hooijmans, D. Brdjanovic, H.J. Gijzen, M.C.M. van Loosdrecht, Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands, *Water Res.* 42 (2008), 2349–2360. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.001>.
- [49] J. Fu, Z. Lin, P. Zhao, Y. Wang, L. He, J. Zhou, Establishment and efficiency analysis of a single-stage denitrifying phosphorus removal system treating secondary effluent, *Bioresour. Technol.* 288 (2019), 121520. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121520>.
- [50] X. Zhang, Y. Liang, Y. Ma, J. Du, L. Pang, Ammonia removal and microbial characteristics of partial nitrification in biofilm and activated sludge treating low strength sewage at low temperature, *Ecol. Eng.* 93 (2016), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.05.016>.
- [51] A.R.M. Barros, S.L. de Sousa Rollemberg, C.D.A. de Carvalho, I.H.H. Moura, P.I.M. Firmino, A.B. dos Santos, Effect of calcium addition on the formation and maintenance of aerobic granular sludge (AGS) in simultaneous fill/draw mode sequencing batch reactors (SBRs), *J. Environ. Manage.* 255 (2020), 109850. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109850>.
- [52] L. Li, G. Qian, L. Ye, X. Hu, X. Yu, W. Lyu, Research on the enhancement of biological nitrogen removal at low temperatures from ammonium-rich wastewater by the bio-electrocoagulation technology in lab-scale systems, pilot-scale systems and a full-scale industrial wastewater treatment plant, *Water Res.* 140 (2018), 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.036>.
- [53] R. Pishgar, J.A. Dominic, Z. Sheng, J.H. Tay, Denitrification performance and microbial versatility in response to different selection pressures, *Bioresour. Technol.* 281 (2019), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.061>.

- [54] S. Zhang, Z. Huang, S. Lu, J. Zheng, X. Zhang, Nutrients removal and bacterial community structure for low C/N municipal wastewater using a modified Anaerobic/Anoxic/Oxic (mA2/O) process at north areas of China, *Bioresour. Technol.* 243 (2017), 975–985. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.048>.
- [55] Z. Song, X. Zhang, H. Hao, W. Guo, P. Song, Y. Zhang, Zeolite powder based polyurethane sponges as biocarriers in moving bed biofilm reactor for improving nitrogen removal of municipal wastewater, *Sci. Total Environ.* 651 (2019), 1078–1086. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.173>.
- [56] P. Kämpfer, E. Martin, N. Lodders, S. Langer, P. Schumann, U. Ja, *Pseudofulvimonas gallinarii* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Xanthomonadaceae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 (2010), 1427–1431. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014548-0>.
- [57] Z. Zhong, X. Wu, L. Gao, X. Lu, B. Zhang, Efficient and microbial communities for pollutant removal distributed-inflow biological reactor (DBR) for treating piggery wastewater, *RSC Adv.* 6 (2016), 95987–95998. <https://doi.org/10.1039/C6RA20777D>.
- [58] Y.Y. Qiu, L. Zhang, X. Mu, G. Li, X. Guan, J. Hong, F. Jiang, Overlooked pathways of denitrification in a sulfur-based denitrification system with organic supplementation, *Water Res.* 169 (2020), 115084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115084>.
- [59] C.F. Weber, G.M. King, Physiological, ecological, and phylogenetic characterization of *Stappia*, a marine CO-oxidizing bacterial genus, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007), 1266–1276. <https://doi.org/10.1128/AEM.01724-06>.
- [60] Y. Luo, J. Yao, X. Wang, M. Zheng, D. Guo, Y. Chen, Efficient municipal wastewater treatment by oxidation ditch process at low temperature: bacterial community structure in activated sludge, *Sci. Total Environ.* 703 (2020), 135031. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135031>.
- [61] W. Xing, Y. Wang, T. Hao, Z. He, F. Jia, H. Yao, pH control and microbial community analysis with HCl or CO₂ addition in H₂-based autotrophic denitrification, *Water Res.* 168 (2020), 115200. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115200>.
- [62] F. Di Capua, M.C. Mascolo, F. Pirozzi, G. Esposito, Simultaneous denitrification, phosphorus recovery and low sulfate production in a recirculated pyrite-packed biofilter (RPPB), *Chemosphere.* 255 (2020), 126977. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126977>.
- [63] S. Ge, S. Wang, X. Yang, S. Qiu, B. Li, Y. Peng, Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review, *Chemosphere.* 140 (2015), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.004>.
- [64] H. Chai, Y. Xiang, R. Chen, Z. Shao, L. Gu, L. Li, Q. He, Enhanced simultaneous nitrification and denitrification in treating low carbon-to-nitrogen ratio wastewater: treatment performance and nitrogen removal pathway, *Bioresour. Technol.* 280 (2019), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.022>.
- [65] L.S. de S. Rollemberg, Q.L. De Oliveira, A.R.M. Barros, V.M.M. Melo, P.I.M. Firmino, A.B. do Santos, Effects of carbon source on the formation, stability, bioactivity and biodiversity of the aerobic granule sludge, *Bioresour. Technol.* 278 (2019), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.071>.
- [66] F. Iannacone, F. Di Capua, F. Granata, R. Gargano, G. Esposito, Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in a continuous-flow moving bed biofilm reactor alternating

- microaerobic and aerobic conditions, *Bioresour. Technol.* (2020), 123453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123453>.
- [67] S. Zhu, S. Chen, Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters, *Aquac. Eng.* 25 (2001), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00071-1).
- [68] S. Okabe, H. Satoh, Y. Watanabe, In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999), 3182–3191.
- [69] C. Dale, M. Laliberte, D. Oliphant, M. Ekenberg, Wastewater treatment using MBBR in cold climates, in: *Proc. Mine Water Solut. Extrem. Environ.*, Vancouver, Canada, 2015.
- [70] H. Ge, D.J. Batstone, J. Keller, Biological phosphorus removal from abattoir wastewater at very short sludge ages mediated by novel PAO clade *Comamonadaceae*, *Water Res.* 69 (2015), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.026>.
- [71] M. Pijuan, A. Guisasola, J.A. Baeza, J. Carrera, C. Casas, J. Lafuente, Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake: Influence of PAO intracellular storage compounds, *Biochem. Eng. J.* 26 (2005), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.014>.
- [72] J. Zhao, X. Wang, X. Li, S. Jia, Q. Wang, Y. Peng, Improvement of partial nitrification endogenous denitrification and phosphorus removal system: Balancing competition between phosphorus and glycogen accumulating organisms to enhance nitrogen removal without initiating phosphorus removal deterioration, *Bioresour. Technol.* 281 (2019), 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.109>.
- [73] S. Du, D. Yu, J. Zhao, X. Wang, C. Bi, J. Zhen, Achieving deep-level nutrient removal via combined denitrifying phosphorus removal and simultaneous partial nitrification-endogenous denitrification process in a single-sludge sequencing batch reactor, *Bioresour. Technol.* 289 (2019), 121690. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121690>.
- [74] Q. He, J. Zhou, Q. Song, W. Zhang, H. Wang, L. Liu, Elucidation of microbial characterization of aerobic granules in a sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal at varying carbon to phosphorus ratios, *Bioresour. Technol.* 241 (2017), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.093>.
- [75] T. Ya, S. Du, Z. Li, S. Liu, M. Zhu, X. Liu, Z. Jing, R. Hai, X. Wang, Successional Dynamics of Molecular Ecological Network of Anammox Microbial Communities under Elevated Salinity, *Water Res.* (2020), 116540. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116540>.
- [76] S. Wang, L. Wang, L. Deng, D. Zheng, Y. Zhang, Y. Jiang, H. Yang, Performance of autotrophic nitrogen removal from digested piggery wastewater, *Bioresour. Technol.* 241 (2017), 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.153>.
- [77] L. Zhang, G. Fu, Z. Zhang, Long-term stable and energy-neutral mixed biofilm electrode for complete nitrogen removal from high-salinity wastewater: mechanism and microbial community, *Bioresour. Technol.* 313 (2020), 123660. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123660>.
- [78] Q. Wang, D. Yu, X. Wang, G. Chu, T. He, J. Zhao, Development of novel denitrifying nitrite accumulation and phosphorus removal (DNAPR) process for offering an alternative pretreatment to achieve mainstream Anammox, *Bioresour. Technol.* 319 (2021), 124164. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124164>.

- [79] X. Huang, P. Lee, Shortcut nitrification/denitrification through limited-oxygen supply with two extreme COD/N-and-ammonia active landfill leachates, *Chem. Eng. J.* 404 (2021), 126511. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126511>.
- [80] J. Zhang, L. Zhang, Y. Miao, Y. Sun, Q. Zhang, L. Wu, Y. Peng, Enhancing sewage nitrogen removal via anammox and endogenous denitrification : Significance of anaerobic/oxic/anoxic operation mode, *Bioresour. Technol.* 289 (2019), 121665. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121665>.
- [81] Z. rui Chu, K. Wang, X. kun Li, M. ting Zhu, L. Yang, J. Zhang, Microbial characterization of aggregates within a one-stage nitritation-anammox system using high-throughput amplicon sequencing, *Chem. Eng. J.* 262 (2015), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.09.067>.
- [82] F. Granata, S. Papirio, G. Esposito, R. Gargano, G. De Marinis, Machine Learning Algorithms for the Forecasting of Wastewater Quality Indicators, (2017), 1–12. <https://doi.org/10.3390/w9020105>.
- [83] H.R. Maier, G.C. Dandl, Neural Network Based Modelling of Environmental Variables : A Systematic Approach, *Math. Comput. Model.* 33 (2001), 669–682.
- [84] F. Di Nunno, F. Granata, Groundwater level prediction in Apulia region (Southern Italy) using NARX neural network, *Environ. Res.* 190 (2020), 110062. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110062>.
- [85] C.Z. Correa, K.V.M.C. Prates, E.F. de Oliveira, D.D. Lopes, A.C. Barana, Nitrification/denitrification of real municipal wastewater in an intermittently aerated structured bed reactor, *J. Water Process Eng.* 23 (2018), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.03.013>.
- [86] A.A.L. Zinatizadeh, E. Ghaytooli, Simultaneous nitrogen and carbon removal from wastewater at different operating conditions in a moving bed biofilm reactor (MBBR): Process modeling and optimization, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 53 (2015), 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.02.034>.

Curriculum scientifico del gruppo di lavoro

Giovanni Esposito è Professore di Ingegneria Sanitaria-Ambientale all'Università di Napoli Federico II. Nel 2004 presso la stessa Università ha conseguito il dottorato di ricerca in *Hydraulic and Environmental Engineering*, svolgendo per un anno le proprie attività dottorali presso l'Università di Wageningen in Olanda. Dal 2004 al 2018 ha lavorato, prima come Ricercatore e poi come Professore Associato, presso l'Università di Cassino e del Lazio Meridionale, dove ha realizzato il proprio laboratorio e ha guidato un gruppo di ricerca composto da numerosi dottorandi di ricerca e post-doc. Dal 2014 al 2019 ha coordinato il Dottorato Europeo Marie Curie in *Advanced Biological Waste to Energy Technologies (ABWET)* e dal 2009 al 2018 il Dottorato Internazionale Erasmus Mundus in *Environmental Technologies for Contaminated Solids, Soils and Sediments*, entrambi finanziati dalla Commissione Europea. Attualmente si interessa di sviluppo, modellazione matematica e ingegnerizzazione di biotecnologie innovative per il recupero di energia e risorse dai rifiuti solidi e dalle acque reflue. Giovanni Esposito è stato tutor di più di 30 dottorandi e 70 tesisti e ha pubblicato più di 200 lavori nel campo dell'ingegneria ambientale con più di 7000 citazioni e h-index 44 (fonte Scopus).

L'ing. Stefano Papirio è dal 28 novembre 2019 ricercatore a tempo determinato L. 240/10 art. 24 c. 3 lett. b) di Ingegneria Sanitaria-Ambientale presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile e Ambientale (DICEA) dell'Università degli Studi di Napoli Federico II (UniNA). Si è laureato con lode in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio nel 2009 presso UniNA e ha ottenuto il titolo di Dottore di Ricerca in Ingegneria Civile nel 2013 presso l'Università degli Studi di Cassino e del Lazio Meridionale (UniCLaM). È affidatario dell'insegnamento di "Mitigazione dei Cambiamenti Climatici" presso il DICEA ed ha avuto incarichi di insegnamento di "Ingegneria Sanitaria-Ambientale" e "Bonifica dei Siti Contaminati" presso UniNA e di "Rifiuti Solidi e Bonifica dei Siti Contaminati" presso UniCLaM. L'ing. Papirio è al momento responsabile scientifico del progetto di ricerca "*Employing circular economy approach for OFMSW management within the Mediterranean countries (CEOMED)*" finanziato nell'ambito del Programma ENI CBC MED 2014-2020. Tra gli altri progetti di ricerca, è stato, membro della Management Assembly di due progetti di dottorato internazionale: "*Environmental Technologies for Contaminated Solids, Soils and Sediments (ETeCoS³)*" finanziato nel programma quadro Erasmus Mundus FP 7 2007-2013, e "*Advanced Biological Waste-to-Energy Technologies (ABWET)*" finanziato nel programma quadro FP 8 Horizon 2020, nell'ambito dei quali è stato supervisore scientifico di circa 10 dottorandi e organizzatore di 3 summer school internazionali. Stefano Papirio ha un'esperienza pluriennale di didattica e ricerca presso Istituti di ricerca e Università straniere, quali l'UNESCO-IHE Institute for Water Education (Delft, Paesi Bassi), la Tampere University (Finlandia) e la National University of Ireland Galway. I suoi principali interessi di ricerca riguardano i processi biologici per il trattamento delle acque di rifiuto, la valorizzazione energetica dei rifiuti organici e tecniche di biorisanamento di sedimenti marini. È coautore di circa 100 pubblicazioni scientifiche in riviste internazionali e atti di congresso nazionali ed internazionali. In data 27 luglio 2017, ha conseguito l'Abilitazione Scientifica Nazionale per lo svolgimento delle funzioni di professore universitario di II fascia nel settore concorsuale (SC) 08-A2.

Alessandra Cesaro è Ricercatrice a tempo determinato ai sensi dell'art. 24, c.3, lett. b) della Legge 240/2010 e ss.mm.ii. (RTD-B) presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile e Ambientale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, dove è docente del corso di Valutazioni e Autorizzazioni Ambientali. Laureata con lode in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio presso l'Università degli Studi di Salerno, nel 2013 ha conseguito il titolo di Dottore di Ricerca in Ingegneria Civile per l'Ambiente e il Territorio. Dal 2017 è abilitata allo svolgimento delle funzioni di professore universitario di II fascia nel settore concorsuale 08/A2 - Ingegneria Sanitaria Ambientale, Ingegneria degli idrocarburi e fluidi nel sottosuolo, della sicurezza e protezione in ambito civile. La sua attività di ricerca è incentrata sulla valorizzazione dei rifiuti solidi, con particolare riferimento all'integrazione di processi di ossidazione avanzata e digestione anaerobica per il trattamento della frazione organica dei rifiuti. In tempi più recenti l'ing. Cesaro ha svolto, tra l'altro, attività di ricerca sull'identificazione di strategie innovative per il recupero di materia dai rifiuti da apparecchiature elettriche ed elettroniche. È co-autrice di numerose pubblicazioni e svolge attività di referee per diverse riviste scientifiche (tra cui Waste Management, Journal of Environmental Management, Journal of Cleaner Production, Resources, Conservation and Recycling e Chemical Engineering Journal). È stata, inoltre, Guest

Editor per Global Nest Journal e Waste and Biomass Valorization. È stata ricercatrice ospite presso l'Università di Stoccarda già nel 2009 e presso l'Università Tecnica di Amburgo nel 2012, dove ha lavorato in collaborazione con la Ultrawaves GmbH (Amburgo, Germania). Dal 2015 al 2019 è stata Membro Sostituto del Comitato di gestione e Coordinatrice del gruppo dei Giovani Ricercatori nell'ambito dell'Azione COST ES1407 - ReCrew (European network for innovative **R**ecovery strategies of rare earth and other **C**ritical metals from electrical and electronic **w**aste) e dal 2016 è Membro del Comitato scientifico dell'International Conference on Environmental Science and Technology (CEST). È, inoltre, Membro dell'International Advisory Board dell'International Conference on Environmental Research and Technology (ICERT) e Componente dell'International Solid Waste Association (ISWA) e dell'International Waste Working Group (IWWG).

Francesco Di Capua è ricercatore al Politecnico di Bari da dicembre 2020 ed è coordinatore del progetto "Minimizzazione dei fanghi di DEpurazione Pugliesi mediante Upgrading, Riconfigurazione ed Ottimizzazione degli impianti (MIDEPURO)" nell'ambito del programma Research for Innovation (REFIN) cofinanziato dall'Unione Europea a valere sul POR Puglia 2014-2020. La sua attività di ricerca riguarda principalmente il trattamento biologico, chimico e fisico degli effluenti liquidi, solidi e gassosi degli impianti di depurazione, con particolare attenzione alle tematiche della rimozione e del recupero di nutrienti, alla digestione anaerobica dei fanghi di depurazione, al trattamento e upgrading del biogas ed alla bioraffineria dei materiali di scarto. È in possesso del dottorato europeo Erasmus Mundus Joint Doctorate ETeCoS³ in Tecnologie Ambientali conferito congiuntamente dalle Università di Cassino e del Lazio Meridionale, Université Paris-Est Marne-la-Vallée e IHE-Delft nel 2016. Dal 1 luglio 2019 al 30 giugno 2020 è stato titolare di un assegno di ricerca presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile ed Ambientale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

Massimiliano Fabbicino è professore Ordinario di Rifiuti Solidi e di Bonifiche dei Siti Contaminati presso il Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile ed Ambientale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, e Presidente dei Corsi di Laurea e di Laurea Magistrale in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio. Ha tenuto lezioni nel campo del risanamento ambientale presso numerosi Atenei Europei ed extra-Europei. È responsabile scientifico, presso l'Ateneo Federiciano, di una cinquantina di accordi di collaborazione con Atenei di tutto il mondo. Ha ricevuto il Premio Endowed Professorship della Washington University nel 2013, La Borsa Fulbright per la ricerca nel 2002, il Premio Fondazione Cortese nel 1997. È autore di oltre 100 pubblicazioni nel campo del trattamento dei rifiuti solidi e liquidi, della bonifica dei siti contaminati, e della potabilizzazione delle acque, oltre che di un libro di testo sul trattamento dei rifiuti solidi urbani (ed Rogiosi), e di un volume a carattere scientifico sull'alterazione della qualità delle acque destinate al consumo umano per effetto della corrosione delle tubazioni (ed. IWA).

Francesco Pirozzi è Professore Ordinario di Ingegneria Sanitaria-Ambientale e Direttore del Dipartimento di Ingegneria Civile, Edile e Ambientale dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, ove è docente dei corsi di "Ingegneria Sanitaria-Ambientale". A partire dal mese di Agosto 2019, è Componente della Commissione *Valutazione di Impatto Ambientale e Valutazione Ambientale Strategica* (VIA e VAS) istituita presso il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. È membro e revisore dell'International Water Association (IWA) e dell'American Society of Civil Engineer (ASCE) e revisore di numerose riviste internazionali, tra le quali si citano Waste Management, Desalination and Water Treatment, Chemical Papers, Reviews in Environmental Science and Biotechnology, Separation and Purification Technology, Journal of Environmental Engineering, Water Research, Bioresource Technology. È stato responsabile scientifico di Programmi di Ricerca di Interesse Nazionale e di Convenzioni finanziate da Enti e Società pubblici (Regione Campania, ENEA, ENAC, AcquaCampania, BagnoliFutura, etc.) ed Aziende Private (CementirItalia, Acqua e Sole s.r.l., EcoTrend s.r.l., Ansaldo STS, Alenia Aermacchi, GORI S.p.A., etc.). È autore di oltre duecentosettanta pubblicazioni nel campo dell'Ingegneria Sanitaria-Ambientale.