

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato finanziato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (Prin-Cofin 2001). Gli autori desiderano ringraziare per la loro disponibilità e preziosa collaborazione il Consorzio Nord Milano, Pero (MI), Wedeco Technologie Acque e Air Liquide Italia Service.

La letteratura scientifica ha spesso evidenziato come i batteri di norma utilizzati come microrganismi indicatori non siano sempre adeguati per stimare il destino ambientale di altri microrganismi. Inoltre, la sensibilità all'azione dei disinfettanti varia al variare del disinfettante [1]. I batteri di origine fecale possono essere degli indicatori abbastanza affidabili, anche se non esiste evidenza del loro ruolo di microrganismo indice per altri potenziali patogeni, come virus e protozoi.

Bisogna anche considerare che le metodiche analitiche disponibili e comunemente utilizzate non sempre sono in grado di fornire i risultati quantitativi desiderati, a causa della complessità della matrice da analizzare. Il problema è ben evidente per i virus, usualmente determinati mediante Pcr (Polymerase Chain Reaction) che non consente di valutare l'integrità dell'unità virale rilevata [2]. Solitamente l'indica-

zione del microrganismo indicatore di riferimento viene direttamente dalla normativa: in Italia, il DLgs. 152/99 ha stabilito il limite di qualità microbiologica allo scarico con riferimento a *E. coli* (Ufc/100 mL), mentre in passato, tale limite faceva riferimento ai coliformi totali e fecali. Nell'ambito del riuso irriguo delle acque reflue depurate il limite di 10 *E. coli*/100 mL è di introduzione abbastanza recente. Infatti, fino al luglio 2003 - data della pubblicazione del DM 185/03 - il limite era riferito ai coliformi totali ed era fissato pari a 2 Mpn/mL, per l'irrigazione di colture consumabili crude, e a 20 Mpn/100 mL, per la sola irrigazione di colture non edibili crude. Per quanto riguarda invece la balneabilità valgono i limiti del Dpr 470/82 espressi in termini di coliformi totali (2.000 Ufc/100 mL), di coliformi fecali (100 Ufc/100 mL) e streptococchi fecali (100 Ufc/100 mL);

è inoltre richiesta l'assenza di *Salmonella* ed enterovirus. L'uso di ipoclorito di sodio può comportare rischi legati alla formazione di sottoprodotti e, in Italia, tale rischio è la causa primaria della sua progressiva sostituzione con altri agenti disinfettanti chimici o fisici. La già citata normativa sul riuso (DM 185/03) ha stabilito un limite per i trialometani (THMs) pari a 0,03 mg/L. Tale limite è facilmente superabile se si utilizza il cloro nei dosaggi richiesti per il rispetto dello standard microbiologico per il riutilizzo, anche nel caso di acque di ottima qualità (nitrificante e filtrate). Viene, quindi, di fatto precluso, seppur in maniera indiretta, il ricorso alla clorazione. Nel seguito sono esposti i risultati di una ricerca in cui sono state messe a confronto le possibili alternative all'ipoclorito per la disinfezione delle acque reflue (acido peracetico, ozono, radiazione ultravioletta). L'articolo ri-

DISINFEZIONE DELLE ACQUE REFLUE

L'efficacia di diversi disinfettanti è stata valutata con circa 450 prove su impianto pilota (1÷4,5 m³/h). Sono stati monitorati i coliformi (TC, FC ed EC) e la carica batterica eterotrofa totale (CBT), mediante conta in piastra (PCA) e citometria.

L'ozono ha mostrato pari efficacia per TC, FC ed EC. Il cloro è risultato più efficace per i TC, l'acido peracetico per EC, i raggi UV per TC e FC. Non è stata evidenziata alcuna correlazione fra inattivazione della CBT, dose e tempo di contatto. La CBT enumerata mediante citometria è 1÷2 log maggiore di quella determinata con PCA.

About 450 disinfection tests were carried out on pilot plant (1÷4.5 m³/h), monitoring coliforms bacteria (TC, FC and EC) and total heterotrophic bacteria (THB), enumerated by plate count (PCA) and flow cytometry. Ozonation inactivated comparably TC, FC and EC. Chlorine was more efficient for TC, under similar dose and contact time. Peracetic acid was more efficient for EC. Inactivation with UV light was stronger for TC and FC. No correlation was found among THB inactivation (PCA), dose and contact time. THB counts by cytometry were 1÷2 logs over PCA ones.



porta dati sull'inattivazione/rimozione di coliformi totali, fecali ed *E. coli* e anche della carica batterica eterotrofa totale, determinata sia mediante metodiche tradizionali di conta in piastra sia mediante citometria (che consente di distinguere i microrganismi vivi, morti e danneggiati) [3].

La citometria consente di effettuare le analisi microbiologiche in tempi molto più brevi rispetto alle metodiche tradizionali di conta in piastra e, inoltre, consente di contare tutti i microrganismi presenti e non solo quelli coltivabili, cioè in grado di crescere in piastra nelle condizioni di incubazione. La citometria potrebbe quindi costituire una valida risposta a molti dei problemi relativi alle conte dei microrganismi presenti nell'ambiente e un'alternativa per la valutazione dell'efficacia dei trattamenti di disinfezione, qualora venissero messe a punto tecni-

Parametro	UM	Intervallo di confidenza al 95% della media	Minimo	Massimo
pH	-	7,0÷7,2	5,8	7,6
Toc ⁽¹⁾	mg/L	4,7÷5,4	2,4	12,0
sst	mg/L	1,6÷3,0	0,3	13,2
Torbidità	Ntu	1,5÷2,0	0,4	9,9
Assorbanza 254 nm	cm ⁻¹	0,27÷0,30	0,17	0,67
Trasmittanza a 254 nm	%	74÷76	51	84
Coliformi totali	ufc/100 mL	1÷3·10 ⁵	500	2·10 ⁶
Coliformi fecali	ufc/100 mL	4÷7·10 ⁴	300	6·10 ⁵
<i>Escherichia coli</i>	ufc/100 mL	5÷8·10 ³	50	6·10 ⁴
cbt (carica batterica totale) con pca (plate count agar)	ufc/1 mL	8÷14·10 ⁴	500	9·10 ⁵
Celle integre mediante citometria	batteri/mL	2,3÷3,5·10 ⁶	1,4·10 ⁶	1,8·10 ⁷

(1) Cod ≥ 20 mg/L nel 12,5% dei campioni con valori massimi paria 36 mg/L.

che affidabili applicabili agli organismi indicatori previsti dalle normative.

Materiali e metodi

La sperimentazione è stata svolta a scala pilota presso l'impianto

di depurazione del sud Olona (Pero - MI), che tratta reflui misti civili e industriali. L'impianto pilota (schematizzato in Figura 1) è stato alimentato in continuo con l'effluente biologico dell'impianto di depurazione con una portata

Tabella 1 – Caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche dell'effluente biologico filtrato.

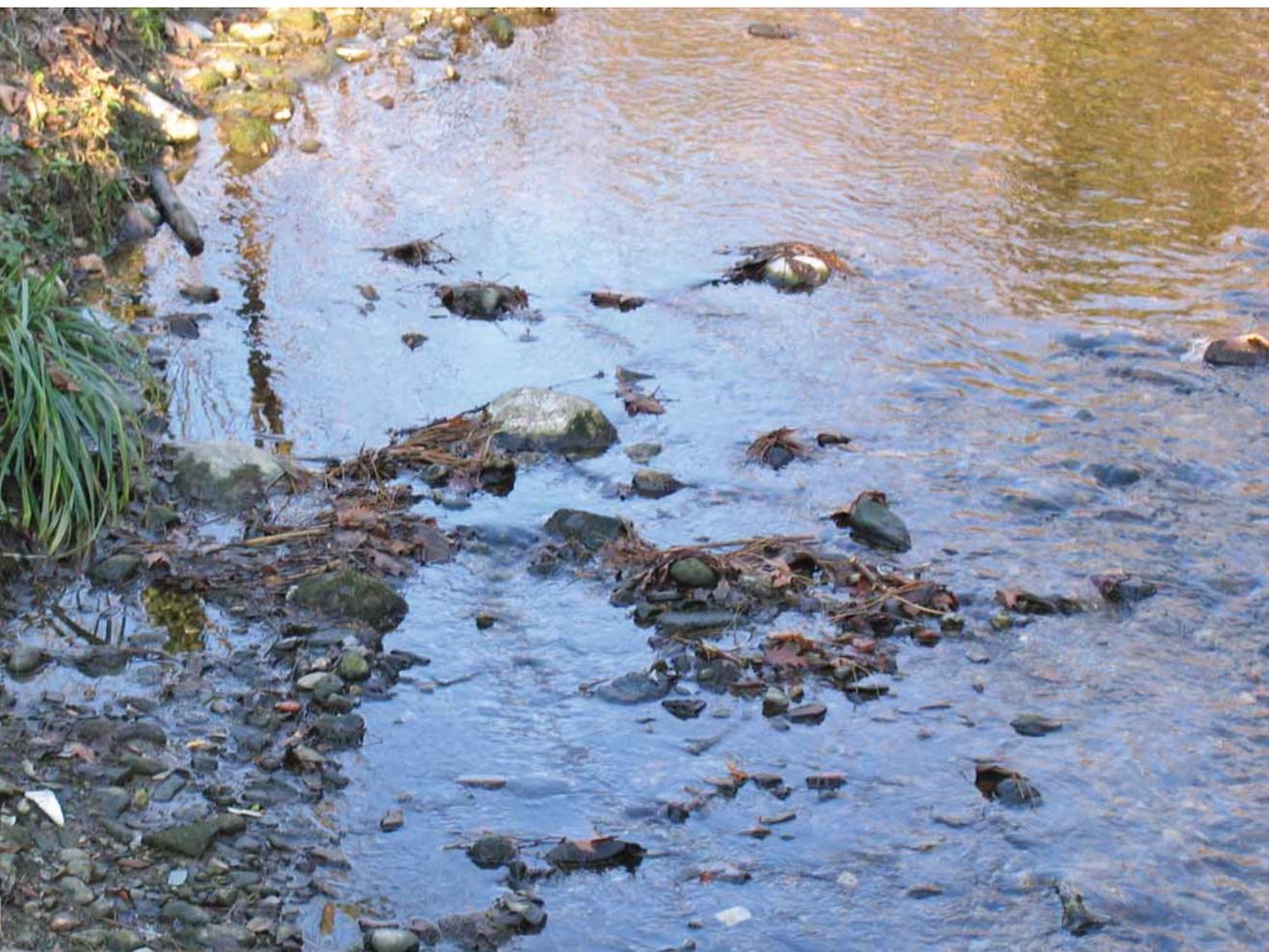


Figure 1
Schema
dell'impianto
pilota.

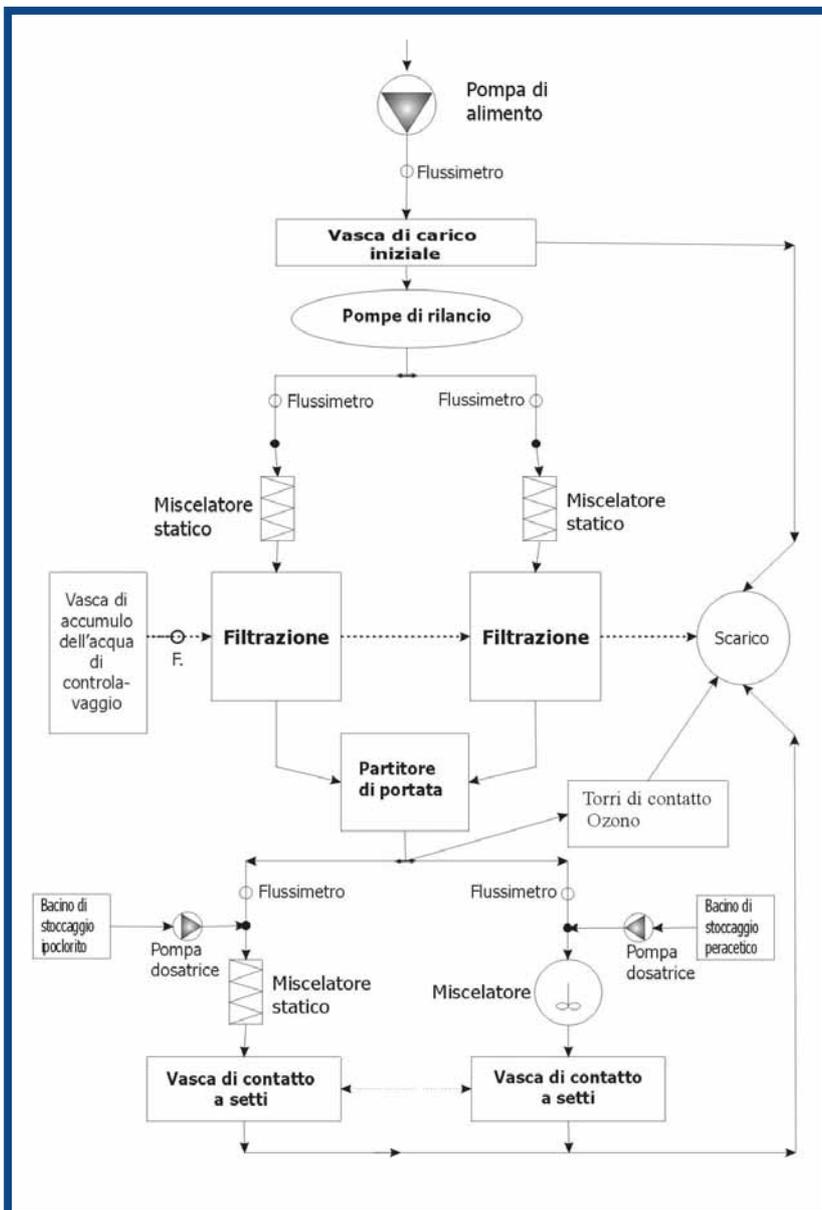


Tabella 2
Condizioni
di prova
per i differenti
agenti disinfettanti
testati.

Disinfettante	Concentrazione	Tempo di contatto
Acido peracetico (paa)	1, 2, 3, 5, 7,5 mg/L	6, 12, 18, 36, 42, 54 minuti
	2, 5, 15, 25 mg/L	6, 12, 18,
	2,0, 2,5, 3,0, 3,8, 6,0, 7,1 mg/L	6, 12 minuti
Raggi UV	3÷90 mJ/cm ² (0,2÷7 s)	

variabile nell'intervallo 1÷4,5 m³/h ed è costituito da una sezione di filtrazione rapida su sabbia (D₁₀=0,8÷1,2 mm), usata come pretrattamento (C_v<10,6 m/h), seguita da una sezione di disinfezione. Quest'ultima è stata strutturata in modo da poter utilizzare differenti disinfettanti e prevede:
- due vasche di contatto a setti, utilizzate in serie, per l'ipoclorito

di sodio (15% in peso di cloro attivo) e l'acido peracetico (15% in peso di principio attivo);
- due colonne di contatto in serie per l'ozono (prodotto a partire da ossigeno puro);
- un reattore UV, equipaggiato con 6 lampade a bassa pressione ad amalgama di mercurio. Il comportamento idrodinamico delle vasche a setti è stato caratterizzato, al variare della portata

influyente e dell'altezza d'acqua in vasca, mediante prove di traccianti [4]. Attraverso tali prove è stato possibile definire le condizioni operative, fra quelle testate, meglio in grado di approssimare un flusso a pistone ideale. Prima di ogni prova di disinfezione, sul refluo utilizzato sono stati determinati i principali parametri in grado di influenzare l'azione del disinfettante (temperatura,

pH, torbidità, Sst, assorbanza e trasmittanza a 254 nm, Toc), secondo le metodiche ufficiali [5]. È stata inoltre valutata la carica microbica in termini di coliformi totali (TC), coliformi fecali (FC), *E. coli* (EC) e carica batterica totale (Cbt). Il refluo è risultato molto diluito e caratterizzato da bassi valori di carica batterica, come riportato in Tabella 1, a causa della significativa presenza di acque industriali e di raffreddamento nell'influente dell'impianto di depurazione. In Tabella 2 sono riassunte le condizioni di prova testate per i differenti agenti disinfettanti (per i disinfettanti chimici le concentrazioni si riferiscono al prodotto puro). Nel complesso sono state condotte 230 prove di disinfezione. Dopo la disinfezione sono stati misurati pH, Toc e carica microbica residua. Per i disinfettanti chimici, per ciascuna combinazione dose-tempo di contatto si è, inoltre, determinata la concentrazione residua di disinfettante secondo le metodiche ufficiali [5]. Nelle prove di disinfezione con radiazione ultravioletta i campioni disinfettati sono stati raccolti e conservati in bottiglie di vetro scuro per prevenire possibili fenomeni di fotoriattivazione. I coliformi totali, fecali e gli *E. coli* sono stati analizzati mediante metodiche tradizionali di filtrazione su membrana e conta in piastra (metodiche Irsa: 7010C, 7020B e 7030C, [5]). La carica batterica eterotrofa totale è stata determinata sia mediante conta in piastra (Pca), dopo incubazione a 28°C per 5 giorni, sia mediante citometria, utilizzando la doppia colorazione Sybr green I (SG) - Ioduro di propidio (PI) [6]. Entrambi i pigmenti si legano al Dna dei microrganismi, ma hanno differente capacità di penetrazione all'interno della membrana cellulare: SG è in grado di penetrare sia in cellule integre sia morte, mentre PI può penetrare solo in cellule la cui membrana è danneggiata. Nella presente sperimentazione la citometria è stata utilizzata solamente per la determinazione della Cbt, ma sono in corso ricerche per l'identificazione di sonde molecolari specifiche e selettive che consentano il rico-

noscimento di specifici microrganismi indicatori [7].

Risultati

Coliformi

Per valutare l'efficacia dei differenti agenti disinfettanti nei confronti dei microrganismi monitorati si è verificata l'esistenza di una correlazione di tipo lineare fra i loro abbattimenti logaritmici, a parità di dose e tempo di contatto, attraverso un'espressione del tipo:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right)_x = m \cdot \text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right)_y + q$$

In cui N_0 e N sono i valori di carica batterica al tempo $t=0$ e al termine del tempo di contatto fissato; x e y sono i due microrganismi indicatori confrontati (TC, FC, EC). I diversi agenti disinfettanti testati hanno evidenziato comportamenti differenti. Nel caso di disinfezione con ozono le rimozioni logaritmiche dei tre microrganismi monitorati sono state confrontabili per tutte le dosi testate: quindi, i tre microrganismi rispondono allo stesso modo all'azione del disinfettante. Infatti, l'intercetta (q) della retta di regressione non è mai risultata significativamente diversa da zero, mentre la pendenza della retta (m) è stata stimata pari a $0,91 \pm 0,104$, $0,95 \pm 0,121$ e $1,04 \pm 0,377$ rispettivamente per TC vs. FC, TC vs. EC e FC vs. EC ($R^2=0,765$; $0,747$; $0,973$). Al contrario, la clorazione ha evidenziato efficienze di inattivazione batterica maggiori nei confronti dei coliformi totali rispetto ai coliformi fecali ed *E. coli*, come mostrato in Figura 2. Le differenze sono risultate significative, fino a un'unità logaritmica nel caso di dosaggi elevati, anche a causa di limitazioni degli abbattimenti conseguibili per FC ed EC dovute alle basse cariche batteriche iniziali. L'andamento nel tempo delle rimozioni logaritmiche dei tre microrganismi indicatori è confrontabile: la disinfezione ha luogo soprattutto nei minuti iniziali ($Hrt=6$ minuti). L'acido peracetico ha mostrato pari efficacia nei confronti di coliformi totali e fecali, mentre gli *E. coli* sono stati rimossi con maggior efficacia, a parità di dose e

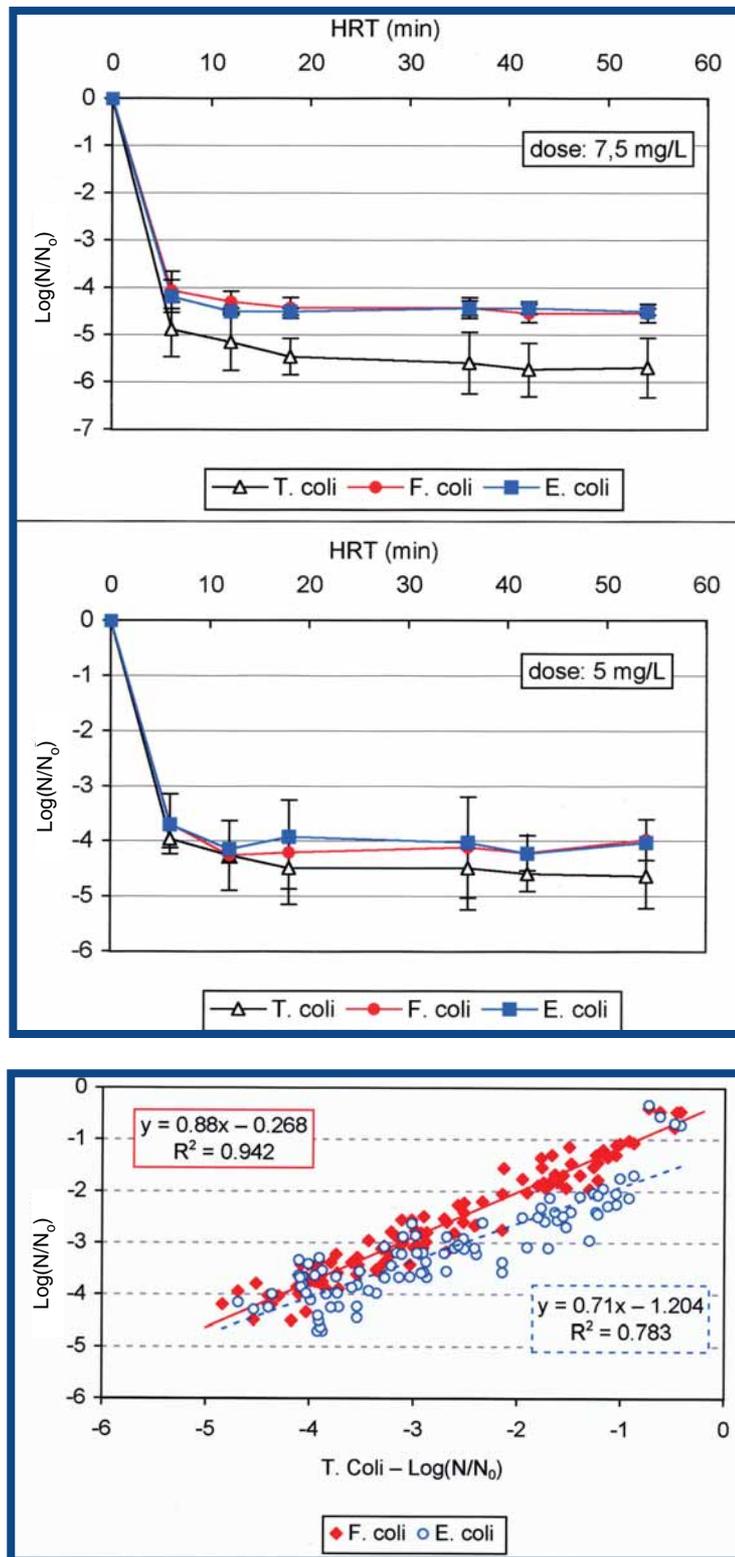


Figura 2 - Confronto delle rimozioni logaritmiche dei microrganismi indicatori nel trattamento con ipoclorito (a) 7,5 mg/L e b) 5,0 mg/L.

Figura 3 - Acido peracetico: confronto fra le rimozioni logaritmiche di coliformi totali e coliformi fecali o *E. coli*.

tempo di contatto (Figura 3). In apparente contrasto con quanto comunemente riportato in letteratura [8], la radiazione UV sembra avere un'efficacia inferiore nei confronti di *E. coli* rispetto agli altri microrganismi (Figura 4). Bisogna, però, osservare che i valori di carica iniziale di *E. coli*

nel refluo utilizzato nella presente sperimentazione erano piuttosto bassi. Ciò ha fatto sì che, già alle dosi radianti più basse ($20 \div 30 \text{ mJ/cm}^2$), si raggiungessero condizioni di disinfezione totale ($N=0$) per tali microrganismi, limitando così il valore numerico dell'efficienza espressa come

Figura 4 - Radiazione UV: confronto fra le rimozioni logaritmiche, in funzione della dose radiante, per i tre microrganismi indicatori monitorati.

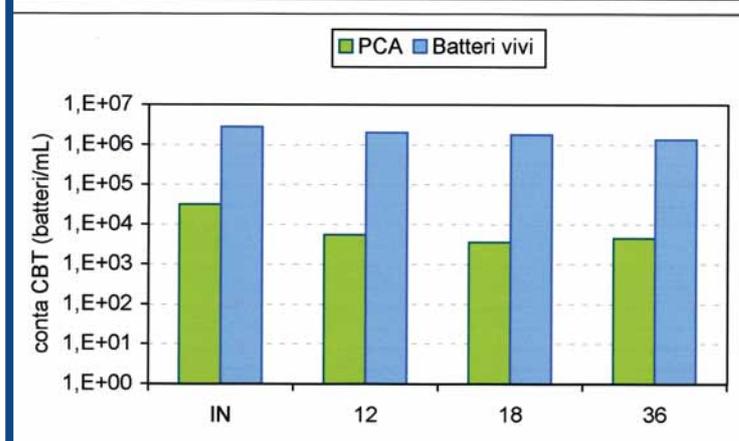
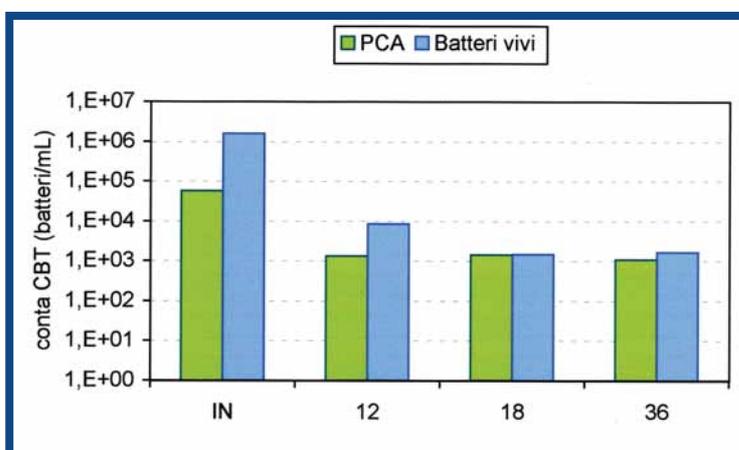
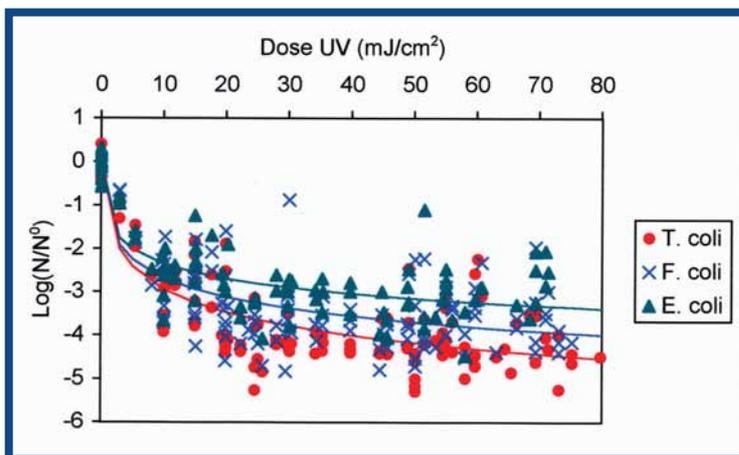


Figure 5 - Confronto fra la Cbt determinata mediante conta in piastra e mediante citometria (celle integre) a monte e a valle di: a) clorazione (5 mg/L); b) Paa (15 mg/L).

logaritmi di rimozione conseguibili ed eliminandone artificialmente la dipendenza dalla dose radiante.

Questa situazione, comunque, è abbastanza caratteristica di effluenti nitrificanti e filtrati, quali sono tipicamente quelli idonei a un trattamento di disinfezione con radiazione ultravioletta [9-10], caratterizzati da concentrazioni di solidi sospesi e torbidità molto basse e anche, in molti casi, da bassi valori di carica batterica. In tali circostanze, i

modelli di disinfezione basati sulla valutazione degli abbattimenti logaritmici non appaiono essere adeguati. I massimi livelli di rimozione batterica ottenuti con i differenti disinfettanti sono stati:

- 4÷4,5 log per 15 mg/L e tempi di contatto superiori a 18 minuti per tutti i microrganismi monitorati;
- ipoclorito di sodio: 4,5-5,5 log per 7,5 mg/L e tempi di contatto pari a 18 minuti per tutti i microrganismi monitorati;

- ozono (le rimozioni sono state in funzione del microrganismo: pari a 4,2 log per i FC, con 3,6 mg/L e Hrt=12,8 minuti; pari a 5,6 log per i TC con 4,6 mg/L e Hrt=12,8 minuti; pari a 4,3 log per EC con 5,3 mg/L e Hrt=6,4 minuti);

- radiazione ultravioletta: 4÷4,5 log per dosi radianti maggiori di 20 mJ/cm² per tutti i microrganismi monitorati.

Tutti i disinfettanti, quindi, hanno confermato la loro efficacia nell'abbattimento dei coliformi. Tra i disinfettanti chimici l'ipoclorito sembra essere il più efficace: bisogna però anche considerare i rischi ambientali e sanitari conseguenti al suo utilizzo. Infatti, nonostante il basso valore del potenziale di formazione di DBPs (assorbance a 254 nm) misurato nel refluo da disinfettare, la concentrazione di trialometani (THMs) misurata nel refluo disinfettato è stata compresa fra 40,6 e 56,3 µg/L per la dose 5 mg/L e fra 44,4 e 62,0 µg/L per la dose 7,5 mg/L. Non si sono avute, invece, evidenze di formazione di DBPs (analisi dei cromatogrammi GC/MS dopo estrazione in fase solida Spme (Solid phase micro-extraction) e in fase liquida) nel caso di utilizzo del paa. In generale, anche grazie ai valori di carica batterica iniziale, è stato possibile garantire il rispetto dei limiti italiani per lo scarico in corpo idrico superficiale (5.000 *E. coli*/100 mL) con tutti gli agenti disinfettanti testati a bassi dosaggi, mentre - evidentemente - maggiori difficoltà si sono riscontrate per raggiungere gli obiettivi fissati per il riuso irriguo (10 *E. coli*/100 mL). Le dosi e i tempi necessari al rispetto di tale limite sono: pari ad almeno 5 mg/L e 20÷30 minuti per il paa, a 5 mg/L e 10 minuti per l'ipoclorito (l'utilizzo alle dosi necessarie, però, non consente il rispetto dei limiti relativi ai THMs) e a 3 mg/L e almeno 6 minuti per l'ozono.

I risultati migliori sono stati ottenuti con la radiazione ultravioletta: già in pochi secondi di contatto, e quindi in reattori molto compatti, corrispondenti a bassi dosaggi (15÷20 mJ/cm²) si ottiene la rimozione totale di *E. coli*.

Carica Batterica Totale

La Cbt comprende una grande varietà di specie microbiche e ciò giustifica la forte variabilità sia della loro conta in piastra sia della loro resistenza ai fattori ambientali. Questo gruppo di microrganismi così eterogeneo è stato comunque considerato per valutare l'efficienza generale di disinfezione, cioè non specifica per un prefissato indicatore microbico, tenendo in considerazione il fatto che tale gruppo può anche comprendere microrganismi potenzialmente patogeni (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp.* ecc.), che non sono di norma determinati nelle acque reflue, anche quando il destino di queste è il riuso. Il numero di microrganismi individuati con la citometria, che consente di enumerare tutti i microrganismi presenti, è stato sempre di 1÷2 ordini di grandezza superiore rispetto a quello risultante dalle conte in piastra, potendosi in tal modo contare solo i microrganismi coltivabili nelle specifiche condizioni di incubazione. La clorazione si è mostrata più efficace del trattamento con paa, già a bassi dosaggi e tempi di contatto (5 mg/L, 12 minuti), come riportato in Figura 5. I risultati della citometria suggeriscono che l'ipoclorito provochi la distruzione di numerose cellule (le cellule dopo lisi cellulare non sono più contabili, neanche fra quelle morte): la conta totale decresce al crescere della dose applicata e del tempo di contatto, mentre la percentuale di cellule danneggiate rimane sempre pressoché costante (0÷5% sia nel refluo influente sia nel campione disinfettato).

Non è stato possibile identificare alcuna correlazione fra la rimozione della Cbt (Pca), la dose di disinfettante applicata e il tempo di contatto. Un esempio, riferito al trattamento UV, è riportato in Figura 6, in cui è evidente l'elevata dispersione dei dati sperimentali ($R^2 < 0,1$), così come l'inadeguatezza di questo parametro come indicatore.

La metodica selezionata per le analisi citometriche non è adeguata, come mostrato in Figura 7, per la verifica dell'efficienza di disinfezione della radiazione UV

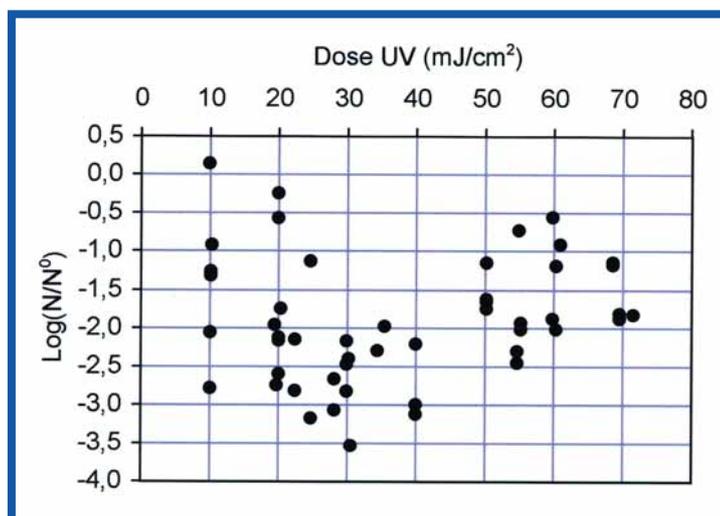


Figura 6 - Rimozione logaritmica della Cbt (enumerata mediante conta in piastra) in un trattamento UV in funzione della dose radiante.

che non danneggia la parete cellulare ma il materiale genetico: infatti i fluorocromi utilizzati (SG e PI) consentono di distinguere le cellule in vive, danneggiate e morte sulla base dell'integrità della loro parete cellulare.

Conclusioni

I risultati ottenuti nel corso della sperimentazione hanno permesso di formulare alcune considerazioni sui differenti agenti disinfettanti, sui microrganismi indicatori considerati e sui metodi di valutazione dei trattamenti di disinfezione. L'ozono ha mostrato pari efficacia nei confronti dei microrganismi indicatori monitorati, mentre l'ipoclorito inattiva con maggior efficacia i coliformi totali. Gli *E. coli* si sono mostrati maggiormente sensibili all'azione del paa rispetto a *T. coli* e *F. coli*. La radiazione ultravioletta sembra essere meno efficace nei confronti di *E. coli* che dei restanti coliformi, ma ciò è dovuto alla bassa carica iniziale di tali microrganismi: già a basse dosi radianti si raggiungevano condizioni di disinfezione totale. Il ricorso al paa risulta favorito dall'adozione di limiti microbiologici espressi con riferimento a *E. coli*. Nel caso di effluenti depurati di elevata qualità i logaritmi di abbattimento non appaiono essere un parametro idoneo alla valutazione di un processo di disinfezione. La carica batterica totale determinata mediante conta in piastra non è un indicatore idoneo per i trattamenti di disinfezione, mentre può fornire alcune informazioni interessanti quando

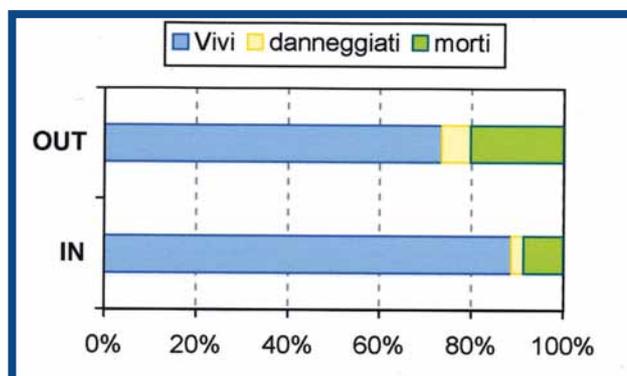


Figura 7 - Percentuale di microrganismi (Cbt) vivi, danneggiati e morti, determinati mediante citometria, a monte e a valle di un trattamento UV (70 mJ/cm²).

determinata mediante citometria. La metodica scelta per le analisi citometriche, che evidenzia solamente i danni alla membrana cellulare, non è idonea per valutare la disinfezione con radiazione ultravioletta. ■

BIBLIOGRAFIA

- [1] V. Mezzanotte, M. Antonelli, S. Citterio, C. Nurizzo, In proceedings of 4th IWA World Water Congress and Exhibition, Marrakech, Settembre 2004.
- [2] A. Carducci. In proceedings of 4th IWA World Water Congress and Exhibition, Marrakech, September, 2004, 276.
- [3] V. Mezzanotte, N. Prato, S. Sgorbati, S. Citterio, *Wat. Environ. Res.*, 2004, **76**(5), 463.
- [4] M. Antonelli, V. Mezzanotte, S. Rossi, C. Nurizzo, *Ecomondo 2004*, Maggioli Editore, Rimini Fiera, vol. II, 39.
- [5] Apat-Irsa/Cnr: Metodologie analitiche per il controllo della qualità delle acque, 2003.
- [6] S. Barbesti, S. Citterio *et al.*, *Cytometry*, 2000, **40**, 214.
- [7] V. Mezzanotte, M. Bernasconi, S. Citterio, M. Labra. Dati non pubblicati, 2006.
- [8] H. Dizer, W. Bartocha *et al.*, *Wat. Res.* 1993, **27**(3), 397.
- [9] J.L. Darby, K.E. Snider, G. Tchobanoglous, *Wat. Environ. Res.*, 1993, **65**(2), 169.
- [10] J.A. Parker, J.L. Darby, *Wat. Environ. Res.*, 1995, **67**(7), 1.065.