

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria Civile, Ambientale e Territoriale

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio

Dipartimento di Ingegneria Idraulica, Ambientale, Infrastrutture Viarie e
Rilevamento



PROCESSO BIOLOGICO ANAMMOX PER LA RIMOZIONE DELL'AZOTO DA DIGESTATI ZOOTECNICI

Relatrice: Ing. Elena FICARA
Correlatore: Ing. Davide SCAGLIONE

Tesi di: Diego Rizzardini
Matr. 750269

Anno Accademico 2011 - 2012

Indice

1	Introduzione	5
2	Stato dell'arte	6
2.1	Il ciclo dell'azoto	6
2.1.1	Problematiche legate all'azoto	7
2.1.2	La presenza dell'azoto in agricoltura	9
2.2	I processi convenzionali per la rimozione dell'azoto	10
2.2.1	La rimozione biologica dell'azoto: nitrificazione-denitrificazione	11
2.3	Tecnologie dedicate al trattamento del digestato agricolo	13
2.3.1	Separazione solido-liquido	14
2.3.2	Trattamenti fisici e chimici	14
2.3.3	Trattamenti biologici	15
2.3.4	Aspetti economici	17
2.4	Processo di nitrificazione-denitrificazione (DENO₂)	17
2.4.1	Principio del processo DENO ₂	17
2.4.2	Parametri fondamentali per la stabilità del processo	18
2.5	Processo anammox	19
2.5.1	Stechiometria e cinetica anammox	20
2.5.2	Arricchimento anammox	21
2.5.3	Implementazione del processo anammox	22
2.5.3.1	Configurazione in reattore unico	22
2.5.3.2	Configurazione in due reattori in serie	23
2.6	Inibizione dell'attività anammox	24
2.7	Reflui trattabili con processo anammox	25
2.8	Processo anammox applicato al trattamento di reflui di origine zootecnica	26
3	Materiali e metodi	29
3.1	Impianto sperimentale SBR	29
3.2	Determinazioni analitiche	32
3.2.1	Analisi delle specie azotate di interesse	32

3.2.2	Analisi del COD	33
3.2.3	Analisi del contenuto di solidi sospesi	33
3.2.4	Modalità di campionamento	33
3.2.4.1	Analisi di forme azotate e COD	34
3.2.4.2	Analisi solidi nello scarico di uscita dall'SBR	34
3.2.4.3	Analisi solidi presenti nell'SBR	34
3.2.5	Analisi microbiologiche FISH su popolazione batterica anammox	34
3.3	Soluzioni e reattivi utilizzati nel corso della sperimentazione.....	35
3.3.1	Preparazione alimento in ingresso al reattore SBR.....	35
3.3.2	Preparazione soluzioni concentrate.....	35
3.3.2.1	Mezzo sintetico minerale (soluzione madre)	35
3.3.2.2	Soluzioni concentrate di forme azotate di interesse	36
3.3.2.3	Soluzioni concentrate di acidi	36
3.4	Prove di attività ed inibizione.....	37
3.4.1	Conduzione delle prove manometriche per la stima dell'attività anammox.....	37
3.4.1.1	Principio del metodo.....	37
3.4.1.2	Strumentazione	39
3.4.1.3	Conduzione della prova di attività.....	40
3.4.1.4	Elaborazione dei dati di pressione ottenuti.....	40
3.4.2	Prove di inibizione su popolazione batterica anammox	43
3.4.2.1	Struttura della prova di inibizione	43
3.4.2.2	Elaborazione dei dati	44
3.5	Arricchimento anammox in reattore SBR.....	45
3.5.1	Inoculo e start-up del reattore SBR	45
3.5.2	Parametri operativi	46
3.5.3	Monitoraggio del processo e calcoli	50
3.5.3.1	Monitoraggio dell'attività nel reattore SBR	50
3.5.3.2	Calcolo dei parametri di caratterizzazione dell'attività.....	51
3.5.3.3	Verifica dell'apporto anammox al processo di rimozione	53
3.6	Processo biologico anammox in reattore SBR per il trattamento della frazione liquida di digestato agricolo.....	55
3.6.1	Inoculo e start-up del reattore SBR	55
3.6.2	Caratteristiche del refluo influente	56
3.6.3	Parametri operativi	58
3.6.4	Monitoraggio del processo e calcoli	61
3.6.4.1	Monitoraggio dell'attività nel reattore SBR	61
3.6.4.1.1	Valutazione del massimo carico di azoto trattabile (NRR_{max}).....	62
3.6.4.2	Calcolo dei parametri di caratterizzazione dell'attività.....	63
3.6.4.3	Verifica dell'apporto anammox al processo di rimozione	64
4	Risultati.....	65
4.1	Arricchimento anammox in reattore SBR.....	65
4.1.1	Qualità dell'effluente ed efficienza del processo	65
4.1.2	Attività specifica anammox.....	70

4.1.3	Riscontri da analisi microbiologiche FISH.....	72
4.2	Trattamento della frazione liquida di digestato agricolo in reattore SBR attraverso processo biologico anammox	73
4.2.1	Test manometrici in batch	74
4.2.2	Prova in continuo	84
4.2.2.1	Qualità dell'effluente ed efficienza del processo.....	84
4.2.2.2	Monitoraggio dell'attività	92
4.2.2.3	Attività specifica anammox e contenuto in sostanza organica (COD).....	94
4.2.2.4	Risultati di letteratura	97
4.2.2.5	Riscontri da analisi microbiologiche FISH	98
5	Conclusioni.....	100
6	Riferimenti	105
7	Appendice	111
7.1	Tabelle e grafici relativi alle prove di attività ed inibizione manometrici in batch.....	111

1 Introduzione

La digestione anaerobica è un processo attualmente sempre più applicato nel trattamento efficace delle acque reflue di origine zootecnica e nella produzione di energia da fonti rinnovabili come il biogas.

La frazione liquida del digestato agricolo è molto ricca in azoto ammoniacale e solitamente viene restituita al suolo agricolo. Tuttavia, lo spandimento sui terreni come fertirrigazione può rivelarsi un grave problema, nel caso di allevamenti intensivi per le aziende che non dispongono di sufficienti superfici di terreni coltivabili per conformarsi alla Direttiva Europea sui nitrati, la quale impone severi limiti per lo scarico di azoto al fine di proteggere le acque sotterranee da inquinamento da nitrati.

Questo problema ha comportato una crescente attenzione volta a nuovi processi di rimozione dell'azoto, i quali dovrebbero risultare molto più convenienti rispetto ai processi biologici convenzionali, al fine di rendere economicamente sostenibile la rimozione dell'azoto a livello delle aziende agricole.

Le principali sfide nell'applicazione di processi biologici su questa tipologia di acque reflue, riguardano l'ampia variabilità delle caratteristiche del digestato agricolo associata alla stagionalità delle matrici digestate e la presenza occasionale o permanente di inibitori quali organici recalcitranti (antibiotici, acidi umici e fulvici) o metalli pesanti.

La presente tesi è parte di un progetto di studio più ampio, chiamato BRAIN (biotecnologie per la riduzione dell'azoto da digestati agricoli mediante l'applicazione di processi innovativi, e per promuovere la sostenibilità economica ed ambientale della produzione di biogas) ed istituito dal Ministero Italiano per l'Agricoltura. Lo scopo di questo progetto è quello di esplorare la fattibilità della rimozione dell'azoto dal digestato agricolo, mediante l'applicazione di processi biologici avanzati efficaci e sostenibili.

In questo senso la presente tesi è stata orientata verso l'applicazione di un processo innovativo di rimozione autotrofa dell'azoto, definito "anammox" (dall'acronimo "ANoxic AMMonium OXidation), attraverso la sperimentazione in reattore SBR a scala di laboratorio per il trattamento di refluo zootecnico da digestato agricolo, quale effluente dell'impianto pilota SBR di nitrificazione-denitrificazione (DENO₂), situato presso l'azienda agricola Corte Grande SRL sita a Casaletto di Sopra (CR), e alimentato con il surnatante di digestione prodotto dall'azienda.

Gli obiettivi specifici di studio della presente tesi hanno riguardato:

- la valutazione della possibilità di arricchire la biomassa anammox, proveniente da diverse tipologie di fanghi convenzionali, entro un ragionevole lasso di tempo utilizzando un sistema SBR;
- l'analisi della stabilità del processo anammox nel trattamento di refluo proveniente da digestato agricolo a differenti livelli di diluizione e crescenti nel tempo, come primo passo verso la valutazione della sua applicabilità tecnica.

2 Stato dell'arte

Nel seguito verranno presentati inizialmente gli aspetti teorici generali legati alle tecniche di rimozione dell'azoto per reflui generici, per poi passare all'analisi specifica dei processi di trattamento dei reflui zootecnici, con particolare attenzione al processo anammox quale fulcro della presente tesi.

2.1 Il ciclo dell'azoto

Il ciclo dell'azoto è uno dei principali cicli biogeochimici che si verificano in natura, il quale consente di mantenere un equilibrio dinamico fra le diverse forme dell'azoto e la composizione della biosfera. Si caratterizza per essere un processo ciclico attraverso il quale l'azoto viene incorporato nel suolo e diventa parte di organismi viventi, prima di tornare nell'atmosfera. Il ciclo dell'azoto è costituito da differenti processi naturali, all'interno dei quali si verifica l'azione di vari microorganismi che mettono a disposizione questo elemento per gli esseri viventi.

L'azoto, parte essenziale delle proteine e degli amminoacidi, si trova principalmente in atmosfera, in percentuale nell'aria circa pari al 79%. Tuttavia questo elemento in fase gas deve essere chimicamente trasformato per poter essere utilizzato dagli esseri viventi, attraverso la fissazione e l'assimilazione; in seguito ad una serie di reazioni dell'azoto assorbito, esso è convertito in composti assimilabili da organismi viventi. Queste reazioni vengono sviluppate attraverso il ciclo dell'azoto (Figura 2.1).

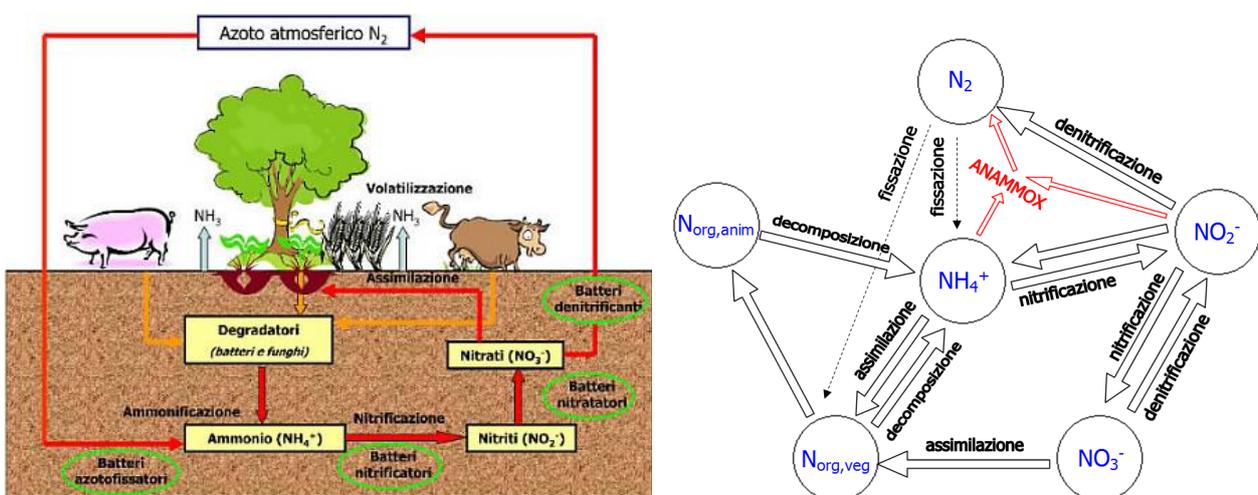


Figura 2.1 - Ciclo dell'azoto, con dettaglio sulle specie batteriche presenti (a sinistra) e sulle reazioni che vi intercorrono (a destra); viene indicato in rosso il processo anammox, adottato nella presente sperimentazione quale soluzione per la rimozione dell'azoto

La fissazione dell'azoto consente di incorporare diversi composti molecolari solubili dell'elemento stesso (N_{org} , NH_4^+ , NO_3^-), suscettibili di essere utilizzati dagli esseri viventi per la crescita, che gli organismi autotrofi convertono in azoto organico per assimilazione. Una volta che i composti dell'azoto organico (N_{org} , di origine animale e vegetale) sono assimilati, i batteri lo trasformano in ammonio (NH_4^+) attraverso la decomposizione di organismi viventi, di escrementi e di urina. Gli organismi nitrificanti (ad esempio: Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrobacter), in presenza di ossigeno, convertono l'ammonio in nitrito (NO_2^-) e successivamente in nitrato (NO_3^-) attraverso il processo di nitrificazione. Infine il nitrato viene convertito in azoto molecolare (azoto gas, N_2) da batteri denitrificanti (ad esempio: Pseudomonas, Alcaligenes, Thiobacillus) attraverso il processo di denitrificazione, in condizioni ambientali anossiche e con consumo di sostanza organica.

Tuttavia recentemente sono stati scoperti nuovi microrganismi, i quali intervengono anch'essi nel ciclo globale dell'azoto; in particolare i batteri anammox (anaerobic ammonium oxidation: ossidazione dell'ammonio in condizioni anaerobiche), che consentono di ossidare ammoniaca ad azoto gas utilizzando il nitrito quale accettori di elettroni, in condizioni anaerobiche e senza la necessità di sostanza organica (Strous et al., 1998; Jetten et al., 1999).

2.1.1 Problematiche legate all'azoto

L'azoto è un nutriente fondamentale per l'esistenza degli esseri viventi, ma se presente in quantità eccessive in acqua può causare gravi problemi. In questo senso, è uno dei più importanti macroinquinanti in acqua e, insieme al carbonio ed al fosforo, si incontra in vari tipi di acque reflue, sia urbane che industriali o agricole. I composti dell'azoto presentano uno stato di ossidazione che spazia dalla valenza -3 (NH_3 , NH_4^+) a +5 (HNO_3/NO_3^-) (vedi Tabella 2.1). I composti più stabili sono l'anione nitrato ed il catione ammonio, i quali possono comportare problemi di tossicità e indurre cambiamenti ambientali negli ecosistemi acquatici.

Tabella 2.1 - Stato di ossidazione delle specie azotate di interesse

specie azotata	nome specie	stato di ossidazione
NH_3/NH_4^+	ammoniaca/ione ammonio	-3
N_2H_4	idrazina	-2
NH_2OH	idrossilammina	-1
N_2	azoto gas	0
N_2O	ossido nitroso	+1
NO	ossido nitrico	+2
HNO_2/NO_2^-	acido nitroso/ione nitrito	+3
NO_2	diossido di azoto	+4
HNO_3/NO_3^-	acido nitrico/ione nitrato	+5

Uno dei problemi associati al rilascio di composti azotati nel mezzo acquoso, insieme con fosforo e micronutrienti, è il rapido sviluppo di alghe ed altre piante acquatiche, le quali successivamente muoiono e si decompongono, causando il fenomeno dell'eutrofizzazione.

Nelle zone ad intensa attività agricola, i corpi idrici superficiali e sotterranei risultano sensibili a fenomeni di eutrofizzazione, ovvero l'incremento delle concentrazioni delle forme azotate presenti oltre il limite naturale, a causa di apporti di azoto che, in forma organica (proteine), ureica o ammoniacale, possono causare:

- riduzione del tenore di ossigeno disciolto nelle acque, utilizzato per l'ossidazione batterica dell'azoto ammoniacale ad azoto nitroso e nitrico;
- tossicità acuta dell'azoto ammoniacale sulla fauna ittica (sensibile già a concentrazioni di 0.01 mg L^{-1} di N-NH_3);
- limitazione nell'impiego delle acque ad uso idropotabile per la presenza di nitrati (Limite OMS di 11 mg L^{-1} di N-NO_3^-);
- forte accumulo di sedimenti a seguito dell'intensa proliferazione algale.

A seguito di queste evidenze ambientali è stata introdotta il 12 dicembre 1991 la "Direttiva Nitrati" (91/676/CEE), con lo scopo di ridurre l'inquinamento delle acque causato direttamente o indirettamente dai nitrati di origine agricola. La direttiva, avanzata a livello europeo, ha richiesto agli Stati Membri la designazione di zone di vulnerabilità (Zone di Vulnerabilità ai Nitrati, ZVN), dove la gestione dell'azoto, in particolare quello di origine zootecnica, sia regolamentata attraverso specifici programmi di azione regionali con la definizione di quantitativi, modalità e periodi per la distribuzione di effluenti di allevamento e fertilizzanti. Il limite più significativo imposto riguarda la quantità massima di azoto da effluenti di allevamento spandibile sui terreni, che viene fissata in 170 kg ha^{-1} per anno per le zone vulnerabili, ed in 340 kg ha^{-1} per anno per il resto del territorio.

La Regione Lombardia si è adeguata a quanto richiesto dalla Direttiva Nitrati già a partire dal 1993 con la L.R. 37 del 15 dicembre, ed il relativo Regolamento Attuativo (L.R. 37/93 n.17149/1996), disciplinando la gestione dei reflui zootecnici e coinvolgendo le aziende zootecniche nel rispetto delle disposizioni, in particolare per quanto riguarda la realizzazione di idonee strutture di stoccaggio degli effluenti, e la dichiarazione di PUAs (Piano di Utilizzazione Agronomica in forma Semplificata) e di PUA (Piano di utilizzazione agronomica), al fine di garantire il rispetto del tetto massimo di apporti di azoto di origine organica. Successivamente, la Regione Lombardia ha proceduto alla revisione delle ZVN (D.G.R. 8/3297/2006) e quindi all'approvazione del Programma d'Azione (D.G.R. 8/5868/2007), e successive modifiche. Allo stato attuale la D.G.R. 8/3297/2006 definisce le ZVN, aggiornando la precedente designazione realizzata nell'ambito del Piano di Tutela delle Acque (D.G.R. 8/19359/2004).

Il recepimento della direttiva, ha avuto come conseguenza la classificazione del 56.4% della pianura padana come ZVN, soprattutto nelle provincie di Mantova, Lodi, Brescia e Cremona, portando gli allevamenti intensivi a trovarsi in deficit di superficie agricola rispetto alle esigenze di spandimento del carico azotato. La disponibilità di terreno diventa inoltre un notevole fattore limitante nelle prospettive di sviluppo della produzione di biogas nelle aziende zootecniche. Infatti l'approvvigionamento di biomasse per la produzione energetica non fa che aumentare il carico di azoto, il quale, in uscita dal digestore, dovrà essere smaltito sul terreno a carico dell'azienda.

Attualmente, per rimuovere l'azoto presente nelle acque reflue si applicano metodi fisico-chimici e biologici. La prima soluzione, nella maggior parte dei casi, non risolve il problema in quanto il contaminante viene trasferito tra due comparti ambientali. I principali processi fisico-chimici utilizzati per rimuovere l'azoto riguardano lo strippaggio dell'ammoniaca e lo scambio ionico (Metcalf e Eddy, 2003).

I metodi biologici, in condizioni ideali, consentono di convertire le specie azotate in ingresso all'impianto di trattamento in azoto gas (N_2), chiudendo così il ciclo dell'azoto.. I processi biologici convenzionali non assimilativi, come la nitrificazione e la denitrificazione, hanno costituito la soluzione più efficace, sostenibile ed economicamente vantaggiosa per la rimozione dell'azoto dalle acque reflue (Cervantes-Carrillo et al., 2000).

2.1.2 La presenza dell'azoto in agricoltura

L'azoto è fondamentale per la vita sulla terra, e il ciclo dell'azoto è uno dei più importanti cicli di sostanze nutritive per gli ecosistemi naturali. Le piante assorbono l'azoto dal terreno, e gli animali si cibano attraverso le piante stesse. Quando essi muoiono e si decompongono l'azoto ritorna al suolo, dove i batteri lo convertono e viene chiuso il ciclo, che ciclicamente ricomincia.

L'eccessivo utilizzo di fertilizzanti sul suolo (ad esempio per aumentare la produzione di alimento per il bestiame) è uno dei motivi principali dell'inquinamento delle acque e del fenomeno di eutrofizzazione. L'allevamento di bestiame produce inoltre emissioni gassose (cioè N_2O , NH_3 , CH_4), causando problematiche di acidificazione e di effetto serra, ed acque di rifiuto altamente concentrate in azoto. In Figura 2.2 viene mostrato schematicamente il ruolo che l'allevamento gioca nel ciclo dell'azoto.

Il letame da deiezioni zootecniche rappresenta uno dei più significativi contributi alle fonti di azoto in Europa e, pertanto, il recupero di N è strategico per ragioni economiche ed ambientali. Tuttavia, il recupero di azoto agronomico in seguito a spandimento di letame sui terreni deve essere regolato secondo le buone pratiche agricole ed in funzione della vulnerabilità dei corpi idrici. In diverse regioni dell'Unione Europea, i nutrienti da letame zootecnico utilizzato eccedono la quantità che può essere utilizzata sui terreni ($170 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$ in Zone Vulnerabili ai Nitrati - NVZ), secondo i criteri indicati di buona pratica agricola e fissati dalla Direttiva sui Nitrati (Commissione delle Comunità Europee, 1991). Una vasta area in Europa (40.9%) è stata designata come NVZ (Commissione delle Comunità Europee, 2007). Nella regione Lombardia (Italia), le NVZ riguardano il 56% della superficie ($5,823 \text{ km}^2$) disponibile complessiva coltivabile (SAU).

Per ridurre l'impatto degli allevamenti sull'ambiente, il letame (e le acque reflue provenienti da trattamento dello stesso) deve essere gestito e trattato attraverso adeguate modalità.

Lo scambio ionico consente la rimozione di ammonio e metalli pesanti, nonostante non venga comunemente utilizzato per le acque reflue a causa degli elevati costi operativi. Questo processo, oltre al costo elevato di investimento, non rimuove solamente ammonio ma anche cationi presenti in acqua, riducendo la capacità di rimozione. In questo senso, il presente processo viene utilizzato per rimuovere l'azoto ammoniacali da reflui a bassa concentrazione.

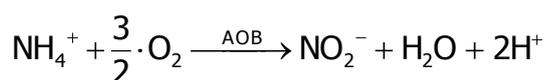
2.2.1 La rimozione biologica dell'azoto: nitrificazione-denitrificazione

Il metodo biologico più comune per la rimozione di composti azotati dalle acque di rifiuto è la combinazione dei processi di nitrificazione e denitrificazione (Munch et al, 1996; Grady et al., 1999) che consente di ossidare l'ammonio a nitrito e successivamente a nitrato, che viene quindi convertito in azoto gas.

La nitrificazione è un processo aerobico attuato da microorganismi chemiolitotrofi appartenenti al Phylum Proteobacteria. Questo processo viene condotto in due fasi normalmente concomitanti: l'ossidazione dell'ammonio a nitrito e l'ossidazione di nitrito a nitrato, che richiede l'apporto di ossigeno quale accettore di elettroni.

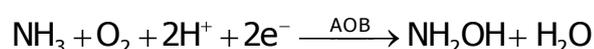
Gli organismi nitrificanti sono suddivisi in due categorie: i batteri ammonio-ossidanti (AOB) e batteri nitrito-ossidanti (NOB). Questi microrganismi ottengono l'energia dei composti ridotti dell'azoto (ammonio e nitrito, rispettivamente), utilizzando la fonte di carbonio inorganica (CO₂) disciolta in acqua e fissata attraverso il ciclo di Calvin-Benson (Madigan et al., 1997). Una caratteristica importante di questi microorganismi è che essi realizzano un processo aerobico strutturato in modo che il prodotto finale degli AOB risulta essere il substrato degli NOB.

I batteri AOB ossidano l'ammonio a nitrito, attraverso il processo di nitrosazione:



Il substrato di questi batteri è l'ammoniaca (NH₃), che è in equilibrio con lo ione ammonio (NH₄⁺) in funzione del pH (Anthonisen et al., 1976; Ganigué et al., 2007; Van Hulle et al., 2007). A pH pressoché neutro la specie azotata è presente in acqua come ione ammonio, mentre per valori basici prevale l'ammoniaca.

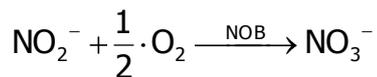
Nel processo di nitrosazione, i batteri ammonio-ossidanti convertono l'ammonio in idrossilammina (NH₂OH) ed acqua mediante l'enzima ammonio mono-ossigenasi. Successivamente l'idrossilammina ossido-reduttasi ossida NH₂OH a NO₂⁻, con rimozione di quattro elettroni. L'ammonio mono-ossigenasi è una proteina di membrana, mentre l'idrossilammina ossido-reduttasi è una proteina periplasmatica. Nella reazione catalizzata dall'ammonio mono-ossigenasi:



sono necessari due elettroni per ridurre un atomo di ossigeno ad acqua. Questi elettroni derivano dall'ossidazione dell'idrossilammina e vengono forniti all'ammonio mono-ossigenasi dall'idrossilammina ossido-reduttasi. Quindi dall'ossidazione dell' NH_3 a NO_2^- vengono generati quattro elettroni, ma soltanto due arrivano all'ossidasi terminale. Durante questa fase si produce il maggior consumo di ossigeno disciolto del processo globale di nitrificazione (3.43 g O_2 per 1 g di N-NH_4^+ ossidato a N-NO_2^-).

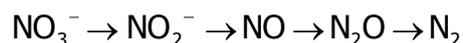
Nella seconda fase del processo di nitrificazione si verifica l'ossidazione dei nitriti a nitrati (nitratazione) da parte dei batteri nitrito-ossidanti, attraverso un complesso enzimatico denominato nitrito ossido-riduttasi.

In questa fase si consumano 1.14 g O_2 per 1 g di N-NO_2^- ossidato a N-NO_3^- .



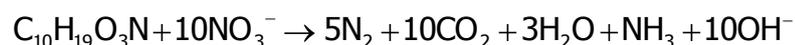
Nel corso del processo di nitrificazione avviene quindi un consumo di ossigeno di 4.57 g per 1 g di N-NH_4^+ ossidato a N-NO_3^- . Inoltre si producono due moli di protoni per mole di ammonio ossidato con consumo di alcalinità quantificabile in 7.14 g CaCO_3 per 1 g di N-NH_4^+ ossidato a N-NO_3^- (Metcalf e Eddy, 2003). Inoltre il processo di nitrificazione può essere influenzato da vari fattori ambientali, come il pH, la presenza di sostanze tossiche (Metcalf e Eddy, 2003), l'ammoniaca libera (NH_3) e acido nitroso (HNO_2) (Anthonisen et al., 1976; Ganigué et al., 2007).

Una volta ossidato l'ammonio a nitrato, quest'ultimo viene ridotto ad azoto gas (N_2) attraverso il processo di denitrificazione. La denitrificazione è un processo eterotrofo ed anossico in cui viene promossa la riduzione di nitrato a N_2 tramite enzimi differenti. I prodotti intermedi di reazione sono il nitrito (NO_2^-), l'ossido nitrico (NO) e protossido di azoto (N_2O).

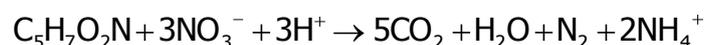


I generi dei batteri denitrificanti più comuni sono: *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiosphaera* e *Thiobacillus*. La denitrificazione avviene in presenza di una fonte di materiale organico (donatore di elettroni), utilizzando ossidi di azoto come accettori di elettroni in luogo dell'ossigeno disciolto (Cervantes-Carrillo et al., 2000). A seconda della sostanza organica adottata, le espressioni che descrivono il processo di denitrificazione sono (Metcalf e Eddy, 2003):

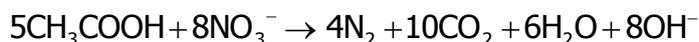
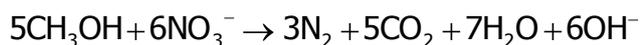
per sostanza organica presente nelle acque reflue



per sostanza organica prodotta durante la lisi dei microrganismi (endogena)



per sostanza organica da fonte di carbonio esogena (rispettivamente metanolo ed acetato)



Il processo di denitrificazione provoca un aumento del pH dovuto ad un aumento dell'alcalinità, dato che fornisce 3.57 g di alcalinità espressa come CaCO_3 da 1 g di N-NO_3^- ridotto a N_2 . Quindi l'applicazione del processo congiunto di nitrificazione-denitrificazione riduce l'impatto sull'alcalinità e sul pH, difatti il processo di nitrificazione provoca una diminuzione del pH, che tende invece ad incrementare durante il processo di denitrificazione.

La resa del processo di denitrificazione è correlata alla concentrazione di sostanza organica biodegradabile presente nell'influenza. Come indicato da Helmer-Madhok et al. (2002), per acque reflue con basso rapporto C:N è necessario aggiungere una fonte esterna di sostanza organica al fine di completare il processo di denitrificazione. Mentre con rapporti di C:N inferiori a 2.5 non si è in grado di raggiungere una denitrificazione ottimale, adottando un rapporto C:N superiore a 4 il tasso di denitrificazione aumenta di un fattore da 1.5 a 1.7. A questo proposito, il rapporto C:N deve essere regolato per consentire un efficiente processo di denitrificazione (Cervantes-Carrillo et al, 2000).

2.3 Tecnologie dedicate al trattamento del digestato agricolo

La digestione anaerobica è sempre più applicata con il duplice scopo di un efficace trattamento delle acque reflue da reflujo zootecnico e di un mezzo per la produzione di biogas come energia rinnovabile. Il digestato è il fango che rimane a valle del processo di digestione anaerobica. Il contenuto complessivo di azoto nei substrati alimentati al digestore non cambia durante la digestione, perché è solo parzialmente trasferito alla fase gas come ammoniaca gassosa ed una piccola frazione viene consumata per la crescita batterica. La differenza principale è che la maggior parte dell'azoto organico viene mineralizzata, in modo tale che la frazione di azoto come ammoniaca risulta maggiore nel digestato.

Il recupero dell'azoto è un'opzione desiderabile, ma la sua sostenibilità e la possibilità di applicazioni su larga scala è ancora da dimostrare, sia dal punto di vista tecnico (ad esempio la necessità di trattamenti supplementari per purificare i flussi concentrati), ambientale (ad esempio confrontando prodotti alternativi e tecnologie attraverso un LCA, Life Cycle Assessment), amministrativo-normativo, ed economico. La fattibilità economica è strettamente legata al mercato dei materiali recuperati ed alla capacità di competere con i fertilizzanti chimici tradizionali. Inoltre, Maurer et al. (2003) hanno confrontato il consumo di energia di diverse tecnologie per il recupero di azoto ed hanno calcolato che:

- il recupero di azoto per strippaggio con aria, seguito da condensazione acida e produzione di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, necessita di 90 MJ kg N^{-1} ;
- la rimozione biologica attraverso nitrificazione-denitrificazione con consumo di metanolo come substrato organico, necessita di 109 MJ kg N^{-1} ;

- la rimozione biologica con processo strettamente autotrofo (nitritazione parziale e ossidazione anaerobica dell'ammoniaca), necessita solamente di 19 MJ kg N⁻¹;
- il processo Haber-Bosch per la produzione di ammoniaca da N₂, necessita di 45 MJ kg N⁻¹.

Ne consegue che la combinazione del tradizionale processo di rimozione biologica con il processo Haber-Bosch (154 MJ kg N⁻¹) risulta meno conveniente rispetto al recupero di azoto attraverso lo stripping d'aria (90 MJ kg N⁻¹), ma processi strettamente autotrofi abbinati al processo Haber-Bosch potrebbero risultare quale soluzione più energeticamente conveniente (64 MJ kg N⁻¹).

Di seguito vengono presentate alcune tecnologie adottate per il trattamento del digestato zootecnico.

2.3.1 Separazione solido-liquido

Le tecnologie di separazione solido/liquido (S/L) consentono una migliore gestione del digestato, ma non permettono di modificare il quantitativo complessivo di azoto nel digestato. La separazione, tuttavia, può modificare il rapporto N/P delle due frazioni prodotte: la maggior parte del fosforo rimane nella frazione solida, mentre la frazione liquida risulta ricca in azoto solubile come ammoniaca.

Ci sono diversi tipi di tecnologie per ottenere la separazione solido/liquido con differenti costi, scopi ed efficienze (Møller et al., 2000). La massima efficienza nella separazione S/L viene raggiunta dalla centrifuga decantatrice (Møller et al., 2002).

Burton (2007) riassume con efficacia ciò che i processi di separazione possono ottenere:

- rendere il letame liquido più facile da gestire, riducendo i rischi di intasamento delle condotte;
- produrre sottoprodotti solidi contenenti la maggior parte del materiale solido originale;
- produrre liquidi chiarificati con livelli molto ridotti di sostanza organica insolubile, fosforo e metalli pesanti;
- facilitare l'applicazione di effluenti di allevamento ai terreni agricoli e trasportare i concentrati solidi all'esterno della fattoria;
- migliorare le prestazioni della digestione anaerobica con produzione di un alimento concentrato da un effluente diluito;
- produrre una frazione solida compostabile solida da concimi liquidi/digestato.

Un'efficace separazione S/L è un passo necessario prima di applicare successive tecnologie atte alla rimozione dell'azoto od al recupero da digestato.

2.3.2 Trattamenti fisici e chimici

Lo stripping con aria, in combinazione con tecniche di assorbimento, può essere usato per rimuovere e recuperare l'ammoniaca da acque di rifiuto da allevamenti e da digestato agricolo. L'ammoniaca viene trasferita dal refluo al flusso d'aria, e quindi assorbita in una

soluzione di acido forte (acido solforico in genere), generando così sali di ammonio, che possono essere cristallizzati. Per risultare efficace, il processo deve essere condotto a pH elevato (Liao et al. 1995) od ad alta temperatura. Il principale fattore limitante per lo stripping dell'ammoniaca in aria a temperatura elevata, è la disponibilità di una fonte economica di energia termica. Quando si combinano la digestione anaerobica con un processo di stripping/assorbimento, il biogas prodotto durante la digestione anaerobica può parzialmente o totalmente fornire il calore necessario per lo stripping ad alta temperatura. Bonmati e Flotats (2003) hanno confermato risultati migliori, in termini di efficienza e di qualità del sale, per lo stripping dell'ammoniaca condotto ad alte temperature nel caso di liquame suino digerito, rispetto al liquame fresco.

Un'altra tecnologia, che potrebbe essere adottata in combinazione con lo stripping dell'ammoniaca, e che può essere utilizzata per concentrare i nutrienti, è l'evaporazione e la successiva condensazione in un'unità di ricompressione meccanica del vapore (MVR, Melse e Verdoes, 2005). L'essiccazione è una tecnologia alternativa da applicare al digestato, ed è spesso associata a condensazione od assorbimento acido, producendo così un flusso concentrato in ammonio ed una frazione solida.

La filtrazione su membrana rappresenta una tecnologia adatta per la produzione concentrata di nutrienti (Masse et al., 2007). Membrane selettive di osmosi inversa (RO) possono anche produrre acque di qualità relativamente elevata, che potrebbero essere riutilizzate in azienda. Il riutilizzo delle acque sarebbe particolarmente vantaggioso per i grandi allevamenti suini situati in zone con problemi di carenza d'acqua. La RO richiede pre-trattamenti spinti delle deiezioni zootecniche, per prevenire la formazione di incrostazioni oltre che per massimizzare la vita delle membrane ed incrementare i flussi. L'utilizzo dell'osmosi inversa, per il trattamento di concentrati di nutrienti e di letame, è tecnicamente fattibile con un opportuno pretrattamento, ma gli elevati costi rimangono il principale ostacolo per l'applicazione del sistema.

La combinazione di tecnologie come le membrane e lo stripping, sono proposti da alcune aziende per il trattamento del digestato agricolo. Fino ad ora, non sono disponibili dati a lungo termine in merito ai costi operativi ed alle esigenze di manutenzione. Preez et al. (2005) hanno proposto uno schema (BIOREK) che include i processi, testati a scala pilota, come la digestione anaerobica, lo stripping dell'ammoniaca e tecnologie avanzate a membrana basate su ultrafiltrazione e osmosi inversa. Il principale inconveniente di tale sistema è il costo elevato di funzionamento, oltre che alcuni problemi operativi come l'intasamento della membrana.

2.3.3 Trattamenti biologici

Nella maggior parte dei moderni impianti di trattamento delle acque reflue l'azoto, che entra nell'impianto sotto forma di ammonio o di azoto organico, viene rimosso attraverso un processo di nitrificazione-denitrificazione biologica. L'ammonio in ingresso viene inizialmente convertito in nitrato (processo di nitrificazione), il quale viene poi ridotto ad azoto gas nella seconda fase (processo di denitrificazione), attraverso le reazioni chimiche già descritte in precedenza. I vantaggi del processo sono l'elevata efficienza di rimozione, l'elevata stabilità di processo e l'affidabilità del sistema.

Tra le alternative per migliorare la gestione dei reflui zootecnici, i processi biologici sono spesso visti come la soluzione al problema (oppure una parte della soluzione) a causa

della loro presenza naturale nei cicli di azoto, carbonio e fosforo. Gli studi sul trattamento biologico di effluenti da allevamento hanno trattato inizialmente aspetti riguardanti la degradazione della sostanza organica e la riduzione degli odori, anche se ultimamente la rimozione dell'azoto (Evans et al., 1986; Oleszkiewicz, 1986) ed il recupero di energia dalla digestione anaerobica hanno guadagnato sempre più attenzione. Diverse tecnologie sono state proposte per il trattamento biologico di effluenti da allevamento:

- lagunaggi aerati (Oleszkiewicz, 1986);
- reattori a letto fisso (Westerman et al., 2000);
- sistemi a fanghi attivi con vasca anossica (Willers et al., 1993);
- sistemi a fanghi attivi con aerazione intermittente (Bicudo e Svoboda, 1995);
- reattori SBR (Sequencing Batch Reactors, Bortone et al., 1992; Mace e Mata-Alvarez, 2002).

I sistemi a fanghi attivi con vasca anossica forniscono buoni risultati, e possono essere applicati al trattamento di deiezioni suine (Vanotti et al., 2007). Tuttavia, i processi che comprendono alimentazione intermittente ed aerazione sono generalmente considerati tecnicamente ed economicamente più efficienti. Di conseguenza, la maggior parte dei processi su larga scala sono tecnologie a singolo serbatoio (Bicudo e Svoboda, 1995), compresi i sistemi SBR (Mace e Mata-Alvarez, 2002), che si basano su aerazione intermittente per ottenere una buona rimozione di azoto attraverso il processo concomitante di nitrificazione-denitrificazione. Tale processo è adatto a carichi influenti variabili.

Il problema principale quando viene applicato un processo convenzionale di nitrificazione-denitrificazione per il trattamento di digestato, è il basso rapporto C/N nell'influente, che comporta la necessità del dosaggio di carbonio esterno per sostenere la denitrificazione. Obaja et al. (2005) e Deng et al. (2007) hanno dimostrato che il dosaggio di liquame suino fresco come fonte di carbonio esterno può risultare un'alternativa economica.

Alcuni processi biologici avanzati, quali il processo di nitritazione-denitrificazione ed il processo strettamente autotrofo (nitritazione parziale e processo anammox), risultano adatti per il trattamento del digestato e consentono un risparmio economico grazie alla più bassa richiesta di aerazione ed alla limitata necessità di fonte di carbonio esterna (Tabella 2.2).

Tabella 2.2 - Ossigeno e COD richiesti per differenti processi biologici

tipologia processo	richiesta di ossigeno (g O₂ g N⁻¹)	richiesta di COD dissimilativo (g COD g N⁻¹)	richiesta di COD assimilativo (g COD g N⁻¹)
nitritazione-denitrificazione	4.57	2.86	4.0
nitritazione-denitrificazione	3.43	1.72	2.4
nitritazione parziale-anammox	1.72	-	-

Il processo di nitrificazione-denitrificazione può consentire di risparmiare la metà del costo energetico per un impianto di depurazione, mentre la combinazione in serie di nitrificazione parziale e processo anammox restituisce un risparmio dell'80%.

I processi nitrificazione-denitrificazione ed anammox vengono nel seguito descritti in dettaglio.

2.3.4 Aspetti economici

Il costo del processo autotrofo di rimozione dell'azoto (applicato a surnatanti di digestori urbani) è stato stimato pari ad 1 euro al kg di N rimosso, mentre altre tecniche convenzionali di rimozione dell'azoto costano da 2 a 4 € al kg di N rimosso (Van Hulle et al., 2010). In pratica, la selezione del metodo di rimozione dell'azoto, sia che esso sia una soluzione di tipo biologico che di tipo chimico-fisico, è anche determinata dalla concentrazione di azoto nel refluo. In accordo con Mulder (2003), il trattamento biologico di rimozione autotrofa dell'azoto è preferibile per flussi di reflui concentrati, con concentrazioni di ammonio compresi tra $100 \div 5000 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$. Considerando i ricavi derivanti dalla vendita di sali di ammonio recuperato e l'energia termica recuperata dalla produzione di biogas, la concentrazione massima di ammonio per il trattamento biologico di digestato può essere regolata a $3000 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$; al di sopra di questo valore di soglia lo stripping dell'ammoniaca può diventare più conveniente.

2.4 Processo di nitrificazione-denitrificazione (DENO2)

2.4.1 Principio del processo DENO2

Il processo DENO2 si basa sul fatto che il nitrito è un composto intermedio sia in nitrificazione che in denitrificazione, e quindi sia la produzione di nitrato che i processi di riduzione possono essere bypassati. In questo processo, viene condotta una nitrificazione parziale a nitrito, seguita dalla denitrificazione del nitrito come mostrato in Figura 2.3.

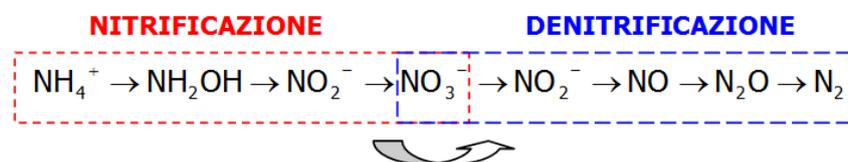


Figura 2.3 - Nitrificazione-denitrificazione biologica via nitrito

La rimozione dell'azoto via nitrito è stata riconosciuta come economicamente vantaggiosa in impianti biologici di depurazione (Turk e Mavinic, 1986). Il processo DENO2 risparmia l'ossigeno richiesto per l'ossidazione dei nitriti (25% della richiesta complessiva di ossigeno) ed il 40% della domanda di carbonio (Figura 2.4).

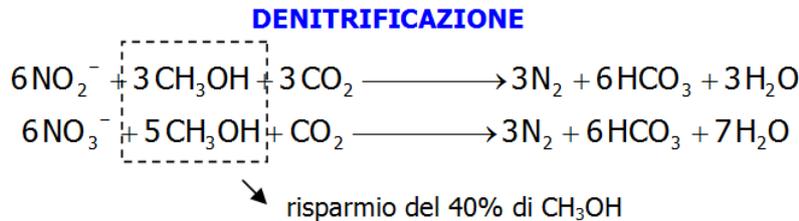


Figura 2.4 - Comparazione tra nitrificazione-denitrificazione e nitrificazione-denitrificazione

Tuttavia, la difficoltà nell'applicare la rimozione dell'azoto via nitrito risiede nel mantenere i batteri ammonio-ossidanti, rimuovendo contemporaneamente i batteri nitrito-ossidanti.

2.4.2 Parametri fondamentali per la stabilità del processo

Ad oggi i ricercatori hanno sviluppato numerosi metodi di controllo e strategie per ottenere la nitrificazione parziale (Sinha et al., 2007). L'obiettivo principale di questi metodi è stato quello di accumulare batteri AOB e dilavare gli NOB attraverso diverse strategie. Le soluzioni principali sono elencate di seguito.

Alta temperatura e basso SRT: il dilavamento selettivo degli NOB da reattori a flusso continuo (ad esempio un chemostato) è stato raggiunto a temperature elevate (30÷40 °C), accoppiate ad un tasso di diluizione inferiore al tasso di crescita degli NOB, e superiore al tasso di crescita degli AOB (circa 0.5÷1 d⁻¹). L'applicazione più nota di questa strategia è il processo in singolo reattore ad elevata attività di rimozione dell'ammonio a nitriti (SHARON, Hellinga et al., 1998; Mosquera-Corral, 2005). Hellinga et al. (1998) indica che è sufficiente mantenere la temperatura a 25 ° C quando la temperatura del reattore e l'età del fango sono i soli parametri di controllo. In ogni caso, molte esperienze segnalano una nitrificazione parziale soddisfacente, con età del fango più elevate (ad esempio: Pollice et al., 2002; Fux e Siegrist, 2004).

Concentrazione di ossigeno disciolto: i coefficienti di semisaturazione di ossigeno disciolto degli AOB e degli NOB sono pari rispettivamente a 0.2÷0.4 mg L⁻¹ e 1.2÷1.5 mg L⁻¹ (Picioreanu et al., 1997). Pertanto, una bassa concentrazione di ossigeno disciolto limita la crescita degli NOB più che quella degli AOB. La nitrificazione in condizioni stabili, con l'utilizzo di basse concentrazioni di ossigeno disciolto (DO), è stata osservata in una ampia varietà di configurazioni di reattori (Sliemers et al., 2005; Wyffels et al., 2004; Canziani et al., 2006).

Concentrazioni di FA e di FNA: fenomeni di inibizione sono stati confermati da molti autori come parametri fondamentali per realizzare un processo di nitrificazione stabile. Le concentrazioni di ammoniaca libera (FA) e di acido nitroso libero (FNA) possono essere calcolate in funzione di pH, temperatura, e l'azoto ammoniacale totale (TAN) per FA, o nitrito totale (TNO₂) per FNA, secondo Anthonisen et al. (1976). FA e FNA inibiscono a differenti concentrazioni sia AOB che NOB, ma FA ha un effetto inibente più significativo sugli NOB (Jubany, 2009). Abeling e Seyfried (1992) hanno constatato che concentrazioni di FA comprese tra 1 e 5 mg N-NH₃ L⁻¹ inibiscono la nitrificazione ma non la nitrificazione. Jubany (2007) ha riscontrato valori di concentrazione, con inibizione al 50% dell'attività (IC₅₀), per NOB pari a 0.45 mg N-HNO₂ L⁻¹ e 9.5 mg N-NH₃ L⁻¹. Tuttavia le concentrazioni di soglia di inibizione di ammoniaca libera in letteratura variano entro ampi intervalli, in funzione anche dell'acclimatazione della biomassa (Jubany, 2007).

Altri autori (Peng e Zhou, 2006) riportano che la nitrificazione può essere inibita da idrossilammina libera, metalli pesanti, composti organici, acidi fulvici, forti ossidanti, acidi grassi volatili (VFAs) ed alogenuri. I metalli pesanti, quali cromo, nichel, rame, zinco, piombo e cadmio, potrebbero inibire entrambe le fasi di reazione della nitrificazione, ma le soglie di inibizione sono differenti.

Wett e Rauch (2003) hanno evidenziato che la limitazione relativa al carbonio inorganico può anche ridurre l'attività degli NOB. Tukotomi et al. (2010) hanno riportato che i batteri nitrito-ossidanti (NOB) sono stati rimossi dal reattore quando NaHCO₃ è stato utilizzato come fonte di alcalinità.

Park et al. (2010) hanno proposto un modello che fornisce un metodo per identificare le combinazioni ottimali di pH, DO, ammonio ed azoto totale (TAN) per supportare una rapida nitrificazione. Essi dimostrano che l'effetto legato esclusivamente all'ossigeno disciolto, e l'effetto del DO combinato all'inibizione diretta da pH, non può dare una selezione abbastanza forte contro i batteri nitrito-ossidanti. Tuttavia, aggiungendo l'effetto di FA e di FNA, si ottiene un effetto di selezione più forte il quale risulta più efficace a valori di pH intorno a 8. Perciò una conclusione generalizzata è che mantenere il pH intorno a 8 è favorevole in molte situazioni.

Mentre ricercare le cause di una nitrificazione stabile, in un processo di nitrificazione-denitrificazione che ha luogo in un reattore SBR, facendo uso di un modello calibrato di ossidazione dell'ammonio e del nitrito, la durata della fase aerobica è risultata essere un fattore chiave per ottenere la nitrificazione (Blackburne et al., 2008).

Il reattore SBR è stato dimostrato essere una configurazione appropriata per ottenere un processo stabile di nitrificazione-denitrificazione (Fux et al., 2004; Fux e Siegrist, 2004; Dosta et al., 2007). Dosta et al. (2008) ha applicato questo sistema per il trattamento di digestato suino.

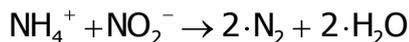
2.5 Processo anammox

All'inizio del ventesimo secolo il ciclo dell'azoto è assunto essere pienamente compreso. Tuttavia, non vi era ancora alcuna reazione in questo ciclo che tenesse in conto della possibilità di ossidazione anaerobica dell'ammonio con il nitrito quale accettore di elettroni, anche se questa reazione è associata ad un rilascio notevole di energia libera di Gibbs ($\Delta G_0 = -358 \text{ kJ mol}^{-1}$), (Broda, 1977).

La prima prova dell'esistenza dell'ossidazione anaerobica dell'ammonio (anammox) deriva da un progetto su un reattore di denitrificazione a scala pilota, presso lo stabilimento di

lievito Gist-Brocades in Delft, Paesi Bassi (Mulder et al., 1995). Anche in Germania (Hippen et al., 1997) e Svizzera (Siegrist et al., 1998) è stata riscontrata la produzione di azoto gas (invece di nitrato, "le perdite di azoto") in un impianto su scala reale a dischi rotanti, trattando acque reflue (ricche di ammonio) provenienti da percolati di discarica. Quasi dieci anni dopo la prima prova dell'esistenza dell'ossidazione anaerobica dell'ammonio, alcuni scienziati sono riusciti nell'identificazione molecolare dei batteri responsabili della reazione chimica, per mezzo di un nuovo approccio sperimentale basato sull'introduzione di strumenti molecolari e della moderna ingegneria dei bioreattori per l'ecologia microbica (Strous et al., 2002). Mediante centrifugazione in gradiente di densità, le cellule fisicamente separate (purificate fino al 99,6%) relative alla cultura di arricchimento rappresentativa del phylum Planctomycetes, Candidatus "Brocadia anammoxidans" hanno dimostrato di ossidare l'ammonio ad azoto gas, con il nitrito come accettore di elettroni in condizioni rigorosamente anossiche (Strous et al., 1999).

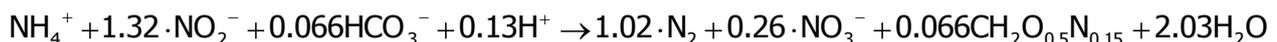
Questo nuovo processo è stato chiamato deammonificazione anossica o "anammox" (dall'acronimo inglese ANoxic AMMonium OXidation, ossia ossidazione anossica dell'ammonio), ed è stato applicato in combinazione con la conversione parziale dell'ammonio a nitrito (in una proporzione di circa 1:1) condotta da batteri aerobici ammonio-ossidanti (AOB). Una prima approssimazione del processo globale (Van Dongen, 2001) è quindi:



Rispetto al processo convenzionale di nitrificazione-denitrificazione, la combinazione di nitrificazione parziale e deammonificazione anossica (anammox) consente di dimezzare la richiesta di ossigeno, di ridurre la produzione di fanghi a un decimo e di evitare la necessità di una fonte di carbonio esterno. I costi operativi dei reagenti e di trattamento e smaltimento dei fanghi sono pertanto ridotti a un decimo di quelli previsti per un processo convenzionale. Se si tiene conto anche del personale, della manutenzione e dei costi di capitale, i costi complessivi sono 1.5 volte inferiori rispetto ai processi convenzionali (Fux, 2003).

2.5.1 Stechiometria e cinetica anammox

Conducendo il bilancio di massa su diverse culture di arricchimento anammox, la stechiometria globale della reazione anammox è stata determinata come specificato nella seguente equazione (Strous et al., 1998):



La produzione di nitrato nel processo anammox deriva dall'ossidazione dei nitriti, che funziona come donatore di elettroni per la fissazione di CO₂ (Van de Graaf et al., 1996). La produzione di nitrato è una parte inevitabile della reazione anammox globale, e può essere usato per misurare la crescita dei batteri anammox. I rapporti di conversione stechiometrici di nitrito/ammonio e di nitrato/ammonio sono circa pari a 1.1÷1.3 e 0.1÷0.25 rispettivamente. Un rapporto più elevato tra nitrito e ammonio e/o una produzione più ridotta di nitrato è generalmente un'indicazione della (co)occorrenza di batteri eterotrofi denitrificanti.

Oltre alla conversione di ammonio e nitrito, i batteri anammox sono anche in grado di ridurre nitrato a nitrito e nitrito ad ammonio, utilizzando acidi grassi come donatori di elettroni. La produzione di nitrito e/o ammonio serve ancora come substrato per il normale catabolismo anammox (Kartal et al., 2007), ma cambia completamente la stechiometria sopra descritta.

Anche se i batteri anammox sono autotrofi con un guadagno di energia per la loro reazione catabolica simile a quella degli AOB, il loro tasso massimo di crescita specifico è notevolmente inferiore: il tasso di crescita dei batteri anammox è compreso tra $0.05 \div 0.2 \text{ d}^{-1}$ (Strous et al., 1999; Tsushima et al., 2007; Van der Star et al., 2008; Lotti, 2011), rispetto a $1 \div 1.2 \text{ d}^{-1}$ (tipico per AOB, Anthonisen et al., 1976). Il tasso di decadimento dei batteri anammox in organismi a lento accrescimento non è facile da valutare poichè, come la crescita, anche il decadimento risulta lento. Recentemente esso è stato stimato pari a 0.0048 d^{-1} a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (Scaglione et al., 2009) in condizioni anaerobiche, il che equivale a un tempo di dimezzamento della biomassa anammox di circa 145 giorni. Il decadimento è quindi circa 10 volte inferiore al tasso massimo di crescita specifica, che è in linea con le osservazioni per organismi a rapida crescita.

I batteri anammox sono strettamente anaerobici e sono inibiti da ossigeno disciolto. Tuttavia, l'inibizione causata da basse concentrazioni di ossigeno è stata dimostrata essere reversibile. Strous et al. (1997) ha concluso da esperimenti con fornitura ossigeno intermittente, che il processo anammox risulta reversibilmente inibito da ossigeno, rendendo possibile la nitrificazione parziale ed il processo anammox in un unico reattore. Egli et al. (2001) hanno affermato che l'ossigeno inibisce il metabolismo anammox reversibilmente a bassi livelli di ossigeno (saturazione dell'aria del $0.25 \div 2\%$), ma probabilmente in modo irreversibile a concentrazioni più elevate ($>18\%$).

2.5.2 Arricchimento anammox

Dato che i batteri anammox crescono molto lentamente (Strous et al., 1999), la disponibilità di un inoculo di biomassa adatto è molto importante.

Lo start-up di una nuova installazione è di solito eseguito con un inoculo prelevato dai pochi impianti esistenti che applicano processi brevettati come SHARON-anammox, CANON e OLAND (Li et al., 2008). In alternativa, si può provare ad accrescere colture anammox sul substrato specifico attraverso l'arricchimento progressivo di una coltura mista ottenuta da digestori di fanghi o reattori a fanghi attivi e lo sviluppo di soluzioni sito-specifiche. Ci sono numerose testimonianze della diffusione abbastanza ampia dei microrganismi anammox, sia in ambienti naturali che in quelli artificiali, come ad esempio in impianti di trattamento delle acque reflue (Kuenen, 2008). Le tecniche di arricchimento si propongono di accrescere la biomassa anammox a partire da campioni di fanghi ambientali in un lasso di tempo ragionevole (da 3 a 6 mesi, ad esempio Pynaert et al., 2004; Noophan et al., 2009), da utilizzare come inoculo per lo start-up dei reattori.

Diverse tipologie di reattori sono state suggerite come soluzione adatta per l'arricchimento anammox (Egli et al., 2001; Tang et al., 2010), sebbene l'impiego di un reattore SBR sia stato raccomandato (Strous et al., 1998) ed applicato in molti casi (Dapena-Mora et al., 2004; Lopez et al., 2008). Tuttavia strategie in sistemi chiusi alimentati (fed-batch), semplici ed a basso costo, possono essere adatte quando si testa una serie notevole di inoculi di fanghi diversi (Sánchez-Melsió et al., 2009).

Questa possibilità è particolarmente attraente in quanto, da un lato, consente di arricchire una biomassa specificamente adattata sul substrato da trattare e, dall'altro, supera la necessità di acquisto di campioni di biomassa dall'estero.

2.5.3 Implementazione del processo anammox

La rimozione dell'ammonio attraverso il processo anammox è sempre preceduta da nitrificazione parziale da parte degli AOB di circa la metà dell'ammonio da trattare a nitrito; quest'ultimo viene quindi utilizzato nel processo anammox per convertire l'ammonio residuo in azoto gas. Entrambi i processi possono aver luogo sia in un unico reattore che in due reattori in serie. Un esame approfondito sugli aspetti tecnici e sulle applicazioni pratiche della tecnologia anammox è stato pubblicato di recente (Van Hulle et al., 2010).

2.5.3.1 Configurazione in reattore unico

Quando la nitrificazione ed il processo anammox avvengono nello stesso reattore, l'ossigeno agisce sia come substrato (per gli AOB) che come inibitore (per i batteri anammox). Poiché livelli molto bassi di ossigeno causano già inibizione (reversibile) dei batteri anammox, si richiedono condizioni strettamente anossiche nel reattore; al contrario per consentire la crescita degli AOB sono necessarie condizioni aerobiche. Inoltre il valore di SRT applicato dovrebbe essere sufficientemente elevato (diverse settimane) per promuovere la crescita dei batteri anammox. Al fine di soddisfare contemporaneamente entrambe le condizioni aerobica ed anossica nel reattore, si possono distinguere tre differenti approcci:

- funzionamento continuo, nel quale i livelli di ossigeno sono gestiti da gradienti nei sistemi a biofilm (Hippen et al., 1997; Kuai e Verstraete, 1998; Sliemers et al., 2002; Szatkowska et al., 2007). In tali sistemi, l'ossigeno viene consumato nello strato esterno del biofilm e quindi non penetra completamente. Il processo anammox può quindi essere effettuato negli strati interni anossici facendo uso del nitrito prodotto che diffonde ulteriormente nel biofilm. Lo stesso approccio è stato eseguito in sistemi di crescita sospesi (Joss et al. 2009);
- aerazione intermittente, in cui i livelli di ossigeno variano nel tempo (Third et al., 2005; Wett, 2006). In tali sistemi, la nitrificazione avviene durante i periodi di aerazione, mentre il processo anammox durante i periodi non aerati. Tuttavia, quando si tiene conto della bassa profondità di penetrazione dell'ossigeno nei sistemi a biofilm, secondo l'approccio descritto in precedenza, il processo anammox può giocare un ruolo attivo anche durante i periodi di aerazione;
- trasporto fisico della biomassa tra la zona aerobica e la zona anossica, alternando fasi sommerse ed emerse come in rotori biologici con contatto del biofilm con la massa liquida (Kuai e Verstraete, 1998) oppure spostando la biomassa tra le zone aerate e non aerate di un reattore.

Oltre a condizioni che favoriscono la crescita di batteri AOB ed anammox, il funzionamento efficace del processo monostadio di nitrificazione-anammox richiede anche che gli NOB siano non competitivi. Dal momento che questi tre gruppi condividono substrati comuni, la

concorrenza può verificarsi su ossigeno (AOB-NOB), ammonio (anammox-AOB) e nitrito (anammox-NOB). Diverse tipologie di reattore possono essere utilizzate per condurre il processo contestuale di nitrificazione-anammox. Queste soluzioni impiantistiche includono sistemi a fango granulare (reattori SBR, air lift), nonché sistemi con crescita di biomassa su supporti (reattori a letto mobile o fisso). La principale caratteristica in comune è la capacità di raggiungere elevati valori di SRT ed alte efficienze di miscelazione.

Joss et al. (2009) hanno dimostrato l'applicabilità del processo stabile di nitrificazione-anammox in diversi reattori SBR monostadio a scala reale in Svizzera. Capacità di ossidazione dell'ammonio fino a $500 \text{ g N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, con conversione ad N_2 di oltre il 90% dell'azoto influente, si sono raggiunte mantenendo la concentrazione di ossigeno disciolto nel reattore su valori inferiori a 1 mg L^{-1} con aerazione continua, e controllando il processo attraverso un elettrodo ione-selettivo per l'ammonio o alternativamente tramite segnali di conducibilità.

2.5.3.2 Configurazione in due reattori in serie

In configurazioni a due reattori, la nitrificazione ed il processo anammox avvengono separatamente, in un reattore aerato il primo processo ed in un reattore non aerato il secondo. Le caratteristiche ed i requisiti per il set-up dei due reattori in serie differiscono completamente dalla soluzione con un unico reattore.

Reattore di nitrificazione

Nel reattore di nitrificazione, circa la metà (55% quale frazione ottimale) dell'ammonio deve essere convertita in nitrito per produrre la miscela di reazione desiderata per il processo anammox. La sfida in questo tipo di reattore è impedire la crescita dei batteri NOB, che porterebbe alla produzione di nitrato piuttosto che di nitrito, e di assicurare che solo la metà di ammonio viene convertita in nitrito. Molte strade sono percorribili al fine di assicurare la produzione di nitriti e non di nitrati, come descritto in precedenza. Il controllo dell'ammonio nelle acque reflue è il fattore principale che assicura la conversione della sola metà di ammonio. Se il suddetto contro-ione è rappresentato da bicarbonato (come risulta nella maggior parte dei flussi reflui), la nitrificazione è limitata dal pH, anziché dall'ammonio, in quanto solo il 50% dei protoni prodotti può essere bilanciato con la capacità tampone del bicarbonato.

A seconda del rapporto tra bicarbonato e ammonio contenuto nelle acque (di solito vale $1 \div 1.2$ per digestati da depurazione fanghi), viene raggiunto un pH di equilibrio ($6.3 \div 6.6$) a cui avviene la conversione del $50 \div 60\%$ dell'ammoniaca (Van Dongen et al., 2001).

Reattore anammox

I fattori chiave per il funzionamento stabile di reattori anammox riguardano sostanzialmente tempi di ritenzione della biomassa sufficientemente lunghi ed adeguata miscelazione. Quest'ultimo aspetto è importante in particolare all'ingresso del reattore, dove le concentrazioni di nitriti nell'affluente sono generalmente abbastanza elevate per essere tossiche. La ritenzione della biomassa è importante per quanto riguarda la lenta crescita dei batteri anammox. Va notato che l'età del fango richiesta in casi tipici non è

molto lunga, a causa delle elevate temperature alle quali viene solitamente gestita la maggior parte dei reattori. In linea di principio, un SRT di 30 giorni risulta sufficiente. Soprattutto in sistemi a gestione discontinua con basse densità di biomassa, la flottazione è un possibile preoccupazione (Dapena-Mora et al., 2004), così come i cambiamenti improvvisi delle condizioni di miscelazione od un'esposizione troppo alta a sforzo di taglio (Arrojo et al., 2006) che possono portare a stress meccanico o disgregazione della struttura del granulo di anammox.

I requisiti per reattori anammox (buona miscelazione e alta ritenzione di biomassa) vengono soddisfatti in applicazioni su scala reale di reattori a fango granulare, dove si utilizza una pressione selettiva (capacità di sedimentazione) per la formazione di granuli. Questo tipo di reattore è costituito da zone distinte di miscelazione e sedimentazione. In quest'ultima zona, una velocità ascendente stabile ($>1 \text{ m h}^{-1}$) seleziona con forza i granuli densi. Il vantaggio di questo tipo di reattore riguarda il notevole carico volumetrico ottenibile nel caso in cui vengano utilizzate moderne soluzioni progettistiche dei reattori (ad esempio reattori gas-lift a sospensione di biofilm, reattori con circolazione interna), con l'utilizzo del gas prodotto come agente di miscelazione economico (Van der Star et al., 2007).

I principali vantaggi di lavorare con una configurazione a due reattori in confronto con un unico reattore sono:

- la possibilità di trattare acque reflue con concentrazioni più elevate di BOD, con un più alto contenuto di solidi o con maggiore variabilità: il carbonio organico in eccesso viene consumato nel reattore di nitrificazione parziale, evitando eccessi di crescita eterotrofa nel reattore anammox;
- ratei fino a 10 volte più elevati per la fase anaerobica (Van der Star et al., 2007).

Tuttavia la soluzione combinata nitrificazione-anammox presenta altri notevoli vantaggi (Joss et al., 2009):

- operare in reattore unico risulta una notevole semplificazione per il funzionamento ed il controllo del reattore (ad esempio: nessun controllo pH);
- sotto funzionamento a regime, il nitrito viene continuamente esaurito, riducendo i rischi di accumulo.

2.6 Inibizione dell'attività anammox

Gli aspetti più critici nell'accrescimento del processo sono collegati, da un lato, al lento tasso di crescita dei batteri anammox (tempo di duplicazione fino a 14 giorni) e, dall'altro, alla loro sensibilità a concentrazioni moderate del proprio substrato (nitrito, Strous et al., 1999). Questi aspetti rendono il processo potenzialmente instabile e difficile da inizializzare. Pertanto sono necessarie semplici tecniche di monitoraggio, per la valutazione dell'attività specifica anammox, per regolare il modello di carico evitando così condizioni di sovraccarico potenzialmente pericolose.

I processi legati ad una lenta crescita dei microorganismi soffrono di prolungati periodi di recupero, quando i microorganismi vengono inibiti e perdono attività. In questo senso, il processo anammox può essere particolarmente soggetto a questo problema a causa della propria sensibilità a diversi composti esogeni, come metanolo, cloruro di sodio, flocculanti,

antibiotici (Van de Graaf et al., 1996; Dapena-Mora et al., 2007; Isaka et al., 2008). In ogni caso il problema interessante, dal punto di vista ingegneristico, è l'importante inibizione causata da nitrito, l'accettore terminale di elettroni. Pertanto, il punto chiave per un funzionamento corretto e sicuro della rimozione autotrofa dell'azoto, è il modo con cui evitare l'accumulo di nitrito al di sopra del livello di soglia, che comporta una seria inibizione.

A differenza dell'inibizione di AOB e NOB, vi sono indicazioni che lo ione stesso (NO_2^-) è più tossico per gli organismi (Strous, 2000) dell'acido nitroso (HNO_2), la forma indissociata, che viene più facilmente trasportata attraverso la parete cellulare tramite trasporto passivo.

Il livello al quale si verifica tossicità, e la sua reversibilità, rimangono non chiari e sembra essere fortemente dipendente dal tempo di esposizione. L'inibizione da nitrito è stata rilevata in un sistema SBR a concentrazioni superiori a $100 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ (Strous et al., 1999), ed è stata osservata una perdita completa di attività a $185 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ (Egli et al., 2001). Alcuni altri studi hanno fornito dati circa l'effetto inibitorio di ammoniaca e nitriti sia in reattori batch che in reattori alimentati in continuo: Fux et al. (2004) hanno indicato elevata inibizione ad una concentrazione di $30 \div 50 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ durante sei giorni; Jung et al. (2007) hanno riportato un calo di attività a concentrazione superiore a $70 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. L'inibizione da nitrito è stata considerata irreversibile (Strous et al. 1999). In un test in batch a breve termine, Bettazzi et al. (2009) hanno evidenziato una diminuzione dell'attività specifica del 25% con $60 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, mentre la concentrazione di inibizione del 50% (IC_{50}) è risultata essere $350 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ come riportato da Dapena-Mora (2007). Fernandez et al. (2010), dopo aver valutato la perdita di attività in due SBR con alimentazione continua a lungo termine continua a differenti concentrazioni di ammonio e nitrito, ha riportato un successivo ripristino dell'attività in circa un mese. Kimura et al. (2010) hanno testato, a breve e lungo termine, l'inibizione da ammonio e nitrito di anammox intrappolati in supporti in gel, utilizzando prove sia in batch che ad alimentazione continua. Nell'esperimento in batch, l'attività anammox ha iniziato a decrescere per concentrazioni superiori a $274 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, mentre nel test di alimentazione continua l'attività anammox è diminuita del 10% quando la concentrazione di nitrito è aumentata fino a $750 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. L'attività è stata completamente recuperata entro 3 giorni riducendo la concentrazione di nitrito influente. Quest'ultimo risultato è in contrasto con Strous et al. (1999).

Al momento, non è ancora chiaro se il nitrito esercita un effetto tossico (irreversibile) o inibitorio (reversibile), e se il livello di inibizione (o di tossicità) dipende dal tipo di refluo al quale sono esposti i batteri anammox.

2.7 Reflui trattabili con processo anammox

L'applicazione del processo anammox è principalmente associata ad acque reflue caratterizzate da un elevato contenuto di azoto ($>200 \text{ mg N L}^{-1}$) ed un basso rapporto C/N. Dal momento che nel processo congiunto di nitrificazione-anammox non è richiesta la disponibilità di sostanza organica, le acque con un più alto rapporto C/N possono essere trattate vantaggiosamente combinando il processo di nitrificazione-anammox con un pretrattamento anaerobico.

Il processo anammox è stato testato con successo ed utilizzato principalmente nel trattamento di surnatanti di digestione (liquidi di digestione dei fanghi). Queste acque provengono dalla digestione anaerobica dei fanghi di rifiuto e di solito contengono da 500 a 1,500 mg N L⁻¹ di ammonio (come bicarbonato di ammonio). Sebbene i flussi di surnatante di digestione sono quantitativamente bassi (tipicamente dal 0.5% al 2% del flusso principale affluente), contengono dal 5% al 20% del carico complessivo di azoto. Entrambe le configurazioni ad un reattore (Hippen et al., 1997) e a due reattori in serie (Van Dongen et al., 2001) sono state testate e sono ora applicate in impianti su scala reale (Van der Star et al., 2007; Wett, 2006; Joss et al., 2009; Ling, 2009), con biomasse granulari, sospese o adese (Gut el al., 2006).

Reflui da industrie alimentari sono generalmente molto carichi e ricchi di proteine (e quindi di azoto), e possono essere efficacemente digeriti; il digestato può essere utilizzato nel processo di nitrificazione-anammox. Il digestato prodotto a partire dal refluo della lavorazione alimentare di patate è attualmente trattato su scala reale in un unico reattore con processo di nitrificazione-anammox (Abma et al., 2009), come del resto succede per un refluo di digestato di una conceria, in configurazione a due reattori in serie. Altri effluenti trattati con questa soluzione sono gli effluenti da digestati da lavorazione e conservazione di pesce e molluschi (Dapena-Mora et al., 2006).

Si è testato anche il trattamento di urea separata all'origine con processo di nitrificazione-anammox (Sliemers et al., 2004); le acque nere (acque da servizi igienici) sono un'altra fonte di azoto separata all'origine da flusso di refluo. Dopo la digestione anaerobica delle acque nere, rimane un flusso di scarto residuo ricco in ammonio (1÷1.5 g N L⁻¹), che può essere trattato attraverso un processo di nitrificazione-anammox ad un reattore (Vlaeminck et al., 2009) o a due reattori in serie (De Graaff et al., 2009).

In percolati di discarica, la concentrazione di ammonio può risultare pari fino a 5 g N L⁻¹ e la relativa variabilità è specifica del sito e legata all'età della discarica; poche esperienze sono disponibili in relazione al trattamento di percolato maturo con le procedure anammox (Liang et al., 2008; Rusalleda et al., 2008; Wang et al., 2010).

Complessivamente, più di 20 impianti su larga scala sono ora in funzione in Olanda, Svizzera, Germania, Belgio, Austria, Svezia, Giappone e Cina (Van der Star et al., 2011). Il tempo di avvio è stato ridotto in successivi start-up, grazie alla disponibilità di biomassa per l'inoculazione e al migliore livello di comprensione del processo.

2.8 Processo anammox applicato al trattamento di reflui di origine zootecnica

Recentemente, ha guadagnato interesse l'applicabilità del processo anammox alle acque reflue di tipo zootecnico. In primo luogo, sono stati eseguiti test di laboratorio negli Stati Uniti (Vanotti et al., 2006; Szogi et al., 2007), in Corea (Dong e Tollner, 2003; Ahn et al., 2004; Choi et al., 2004), in Giappone (Yamamoto et al., 2008), e nel Nord Europa (Molinuevo et al., 2009). La fattibilità del trattamento delle acque reflue da allevamenti è stata confermata solo applicando un rapporto di diluizione o pre-trattamenti intensivi.

Hwang et al. (2005) hanno testato a scala di laboratorio un processo combinato SHARON-ANAMMOX. Nel reattore anammox, il tasso di conversione dell'azoto ed il rateo specifico di

rimozione dell'azoto sono risultati rispettivamente $0.72 \text{ kg N m}^{-3}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$ e $0.44 \text{ kg N kg}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$, con un carico di azoto applicato di $1.36 \text{ kg N m}^{-3}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$.

Karakashev et al. (2008) hanno proposto il concetto PIGMAN ("schema innovativo di processo per la rimozione di sostanza organica, fosforo ed azoto da letame suino, "PIG MANure") per il trattamento di rifiuti organici come il letame da porcilaia. Lo schema include una digestione anaerobica su scala reale, una decantazione centrifuga, una post-digestione UASB, un'ossidazione parziale al fine di diminuire il COD residuo e convertire parte dell'ammonio in nitrito e, infine, il processo OLAND (Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification) per la rimozione autotrofa dell'azoto in un unico reattore. La linea di trattamento proposta ha portato ad una efficienza di rimozione per sostanza organica, azoto e fosforo del 96%, 88% e 81% rispettivamente, per trattamento di letame suino. Tuttavia, ulteriori indagini sono necessarie per chiarire la sostenibilità economica ed ambientale di un tale schema di processo su scala pilota e su scala reale.

Oltre all'enorme variabilità nella qualità e quantità, un problema rilevante quando si applica il processo anammox a letame suino potrebbe essere l'eccesso di carbonio organico biodegradabile, come riportato da Molinuevo et al. (2009); i suddetti ricercatori hanno trattato l'effluente di letame suino dopo post-digestione UASB ed ossidazione parziale in un reattore anammox granulare. Dopo aver aumentato la frazione di digestato diluito con reflu sintetica minerale fino al 12% v/v nell'affluente (corrispondente a $242 \text{ mg COD L}^{-1}$), la sperimentazione è stata interrotta in quanto il processo di denitrificazione risultava dominante. Nessun dettaglio è fornito circa la frazione biodegradabile del COD influente.

Yamamoto et al. (2008) hanno testato una nitrificazione parziale ed un successivo trattamento con processo anammox (colonna a letto fisso con flusso ascendente) per trattare digestato suino. La frazione liquida del digestato è stata pre-trattata in chiariflocculazione e diluita. I ratei di rimozione anammox dell'azoto sono diminuiti fino a $0.22 \text{ kg N m}^{-3}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$, corrispondente al 10-20% del NRR ottenuto con un influente sintetico. In una successiva ricerca Yamamoto et al. (2011), durante il trattamento di digestato suino, hanno ottenuto un tasso di rimozione anammox dell'azoto relativamente alto di $2.0 \text{ kg N m}^{-3}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$ sotto un NLR di $2.2 \text{ kg N m}^{-3}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$. Tuttavia, l'effluente della nitrificazione parziale è stato filtrato e diluito 7÷10 volte prima di venire alimentato al reattore anammox.

Qiao et al. (2010) ha riferito di un sistema combinato dato da un reattore di nitrificazione parziale e da un reattore anammox granulare a scala di laboratorio, atto al trattamento della frazione liquida di reflui suini digeriti. Diluendo per un minimo di 1.5 volte l'effluente parzialmente nitrificato, il NRR del reattore anammox ha raggiunto $3.1 \text{ kg N m}^{-3}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$, con un NLR di $4.1 \text{ kg N m}^{-3}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$.

Problemi rilevanti nel trattamento di reflui zootecnici potrebbero sorgere dalla presenza di antibiotici o di metalli pesanti. Fernandez et al. (2009) hanno riportato una riduzione del 75% dell'attività specifica anammox, nel caso di alimentazione continuativa di 20 mg L^{-1} di cloramfenicolo in un SBR anammox. Questi autori hanno anche osservato effetti simili nel caso di alimentazione continua di 50 mg L^{-1} di cloridrato di tetraciclina.

Lotti et al. (2011) hanno condotto alcune prove di inibizione in batch su rame, zinco ed antibiotici. La presenza di concentrazioni crescenti e di esposizione prolungata a rame e zinco, porta ad un calo dell'attività specifica anammox. Analogamente, l'effetto inibente di ossitettraciclina e solfatiazolo sull'attività specifica anammox è aumentato con concentrazioni crescenti ed elevati tempi di esposizione. Tuttavia, i risultati da esposizione a breve termine mostrano una perdita trascurabile di attività, dopo 24 ore di esposizione a concentrazioni di ossitettraciclina ($\text{IC}_{50} = 1100 \text{ mg L}^{-1}$) e solfatiazolo ($\text{IC}_{50} = 650 \text{ mg L}^{-1}$)

fino a 100 mg L⁻¹. Dopo 14 giorni di esposizione a 100 mg L⁻¹ di ossitetraciclina e solfatiazolo, l'attività anammox è rispettivamente diminuita fino al 75% ed al 50%, in confronto alla coltura non esposta. Gli autori hanno concluso che gli inibitori studiati non rappresentano un rischio reale per l'applicazione del processo anammox, poiché una più bassa attività specifica può essere compensata da una maggiore concentrazione di biomassa nel reattore.

La maggior parte dei riferimenti presenti in letteratura, citati in precedenza, suggeriscono la possibilità di applicare il processo anammox a reflui di origine zootecnica ma, a nostra conoscenza, non esiste ad oggi disponibilità di pubblicazioni di dati sul trattamento delle acque reflue, senza alcuna diluizione con refluo sintetico, e tutte le ricerche sono ancora alla scala di laboratorio. Inoltre, i dati sperimentali sono limitati ad acque reflue da deiezioni suine, e non sono disponibili risultati sul trattamento di digestati con composizione mista (letame suino, pollina, colture energetiche).

In questo senso l'attività di sperimentazione si è basata sulla valutazione dell'applicabilità del processo anammox, al fine di testare inizialmente la possibilità di riduzione dei tempi di accrescimento ed acclimatazione della popolazione batterica anammox, e quindi di verificare successivamente l'adattabilità della biomassa anammox a reflui di tipo zootecnico (caratterizzati non solo da deiezioni suine ma anche da pollina e colture energetiche) ed i relativi effetti di inibizione sull'attività di rimozione autotrofa dell'azoto.

3 Materiali e metodi

Nel presente capitolo verranno illustrati i materiali utilizzati e le metodologie adottate nel corso della sperimentazione. Lo studio è stato strutturato in due fasi successive, di cui la prima fase inerente il trattamento biologico di refluo sintetico (Paragrafo 3.5), mentre la seconda fase riguardante il trattamento biologico della frazione liquida di digestato agricolo (Paragrafo 3.6).

Il capitolo viene quindi strutturato presentando nella parte iniziale gli aspetti comuni ad entrambe le fasi di sperimentazione, nei paragrafi 3.1-3.2-3.3-3.4; successivamente vengono trattate nello specifico le metodiche relative alle singole fasi di sperimentazione, nei paragrafi 3.5-3.6.

3.1 Impianto sperimentale SBR

Il processo anammox di deammonificazione di reflui concentrati in azoto è stato effettuato in un reattore SBR ("Sequencing Batch Reactors") alla scala di laboratorio.

Il reattore SBR opera su cicli, composti da specifiche fasi che si susseguono in successione temporale. In particolare, le fasi necessarie per far avvenire il processo anammox sono:

- il carico dell'influente da trattare nel reattore ("FILL");
- la reazione biologica delle specie azotate da rimuovere ("REACT");
- la sedimentazione della biomassa sul fondo del reattore ("SETTLE");
- lo scarico dell'effluente trattato ("DRAW").

Il reattore SBR a scala di laboratorio, prodotto dalla azienda svizzera Diachrom (Mendrisio, CH) e commercializzato da Microline (Como), è costituito da un fermentatore e da un'unità di controllo (vedi Figura 3.1).



Figura 3.1 - Fotografica del reattore SBR

I comandi possono essere forniti alla macchina in automatico da PC, tramite software dedicato, oppure inseriti mediante un pannello di controllo posto sull'unità di controllo; in alternativa è possibile azionare manualmente alcuni elementi del sistema, attivando i relativi pulsanti ON/OFF dall'unità di controllo.

Attraverso l'unità di controllo è possibile:

- temporizzare l'attivazione e lo spegnimento delle pompe peristaltiche, della miscelazione meccanica e del riscaldamento tramite piastra;
- definire il valore che dovranno assumere i parametri controllati (pH, grado di miscelazione, temperatura desiderata) durante le diverse fasi;
- registrare i valori relativi ai parametri operativi di interesse su PC;
- impostare la programmazione dei cicli di lavoro ed archivarli in cartelle dedicate.

L'unità di fermentazione è costituita da un reattore (fermentatore) in vetro del volume pari a 8 litri, chiuso alla sommità da una piastra in acciaio inox flangiata al fermentatore (vedi Figura 3.2); quest'ultima è dotata di:

- appositi fori filettati per l'inserimento, a tenuta, delle sonde di monitoraggio (pH, tenore di ossigeno, temperatura, anti-foam);
- un pescante per l'estrazione di campione, posizionabile ad altezza variabile;
- una calata forata per l'insufflazione di gas;
- una apertura per l'inserimento della biomassa;
- un punto di sfiato dotato di sistema di condensazione del vapore (condensatore);

- connessioni in metallo per i tubi di dosaggio (collegati alle pompe peristaltiche situate sull'unità di controllo).

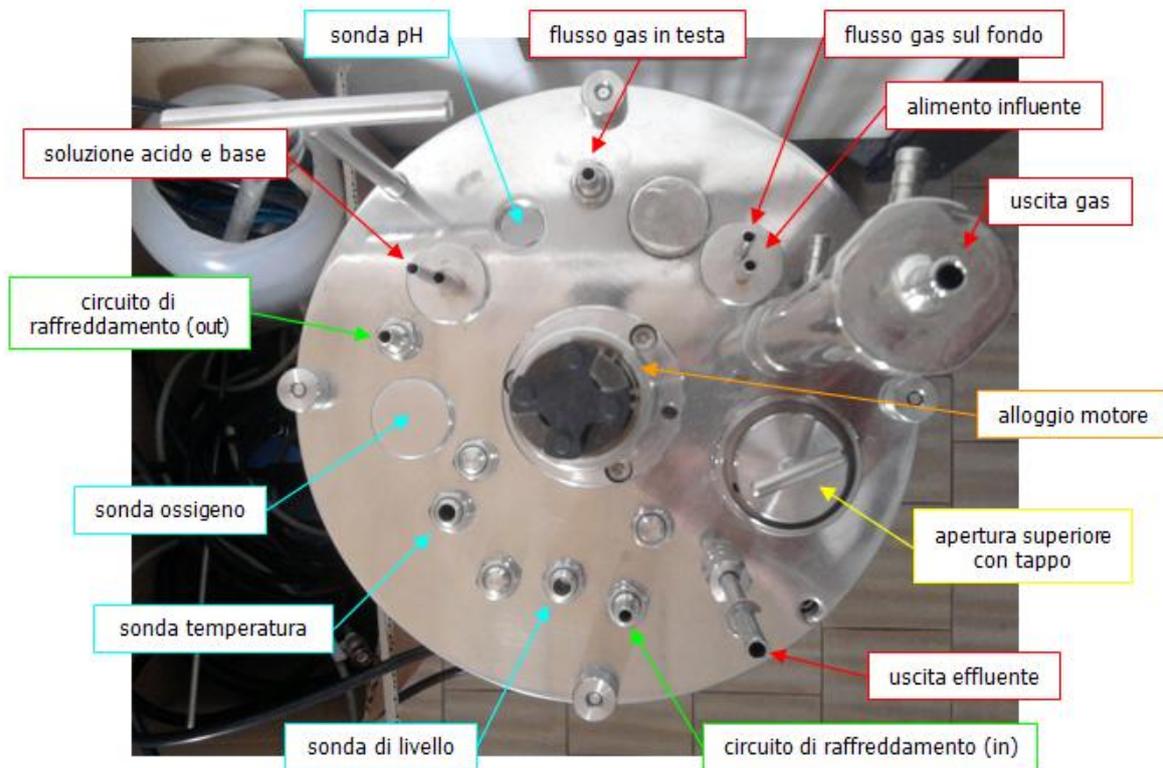


Figura 3.2 - Dettaglio della piastra del reattore SBR, con i relativi collegamenti

L'unità di fermentazione comprende inoltre:

- un sistema di miscelazione meccanica ad asse verticale a velocità variabile (compresa tra 100 e 1000 rpm), costituito da 3 ordini di palettature rettangolari montate a differenti altezze sull'asse, collegato all'esterno del reattore ad un motore elettrico;
- un sistema di riscaldamento a piastra riscaldante sul fondo del fermentatore, e un sistema di raffreddamento a circolazione d'acqua costituito da un tubo metallico ad "U", collegato all'esterno alla rete idrica il cui azionamento è controllato dall'unità di controllo, in funzione del segnale di temperatura inviato dalla sonda;
- pompe peristaltiche a portata regolabile ($1 \div 80 \text{ mL minuto}^{-1}$) per il dosaggio di reattivi (acidi o basi, antischiuma) e per alimentare o scaricare il reattore.

Lo spazio di testa del reattore SBR è collegato ad una bombola di azoto gas (o di un mix costituito da 95% N_2 e 5% CO_2), ed è dotato di una valvola di backpressure per mantenere la pressione nel reattore intorno ad 1 bar. La pressione nel corso della sperimentazione viene monitorata da un trasduttore di pressione installato sulla testa del reattore (Leo Record Pressure Data Logger, SensorONE Ltd, UK).

In Figura 3.3 viene riportata la struttura del sistema di lavoro dell'SBR, evidenziando le connessioni presenti tra i vari elementi principali quali il fermentatore, l'unità di controllo e

il PC per l'inserimento della programmazione dei cicli di lavoro, e la registrazione dei parametri di interesse.

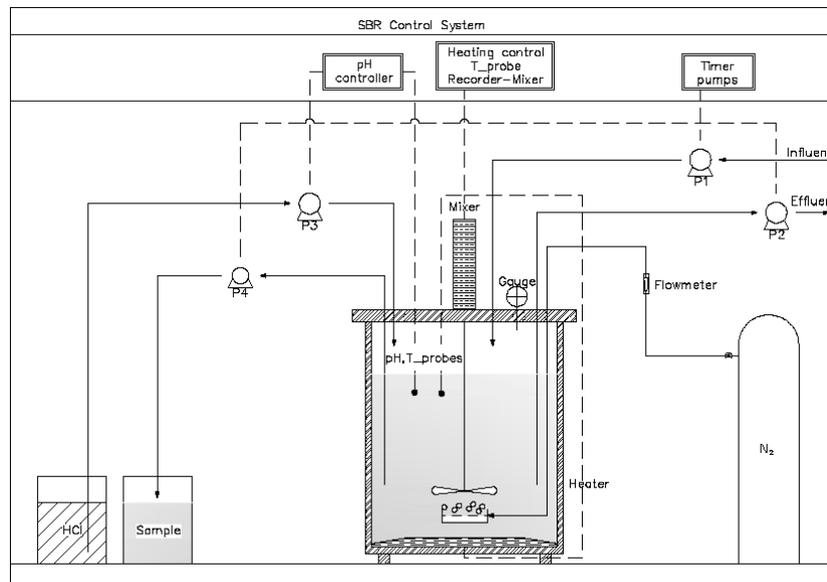


Figura 3.3 - Schema funzionale del reattore SBR

3.2 Determinazioni analitiche

3.2.1 Analisi delle specie azotate di interesse

La misurazione delle concentrazioni delle forme azotate di interesse (ammonio N-NH_4^+ , nitrito N-NO_2^- , nitrato N-NO_3^-) è stata effettuata per via spettrofotometrica ed utilizzando appositi kit "H-Lange", mostrati in Figura 3.4. I campioni devono essere preventivamente filtrati su filtri in cellulosa a $0,45 \mu\text{m}$, e può rendersi necessaria una preventiva diluizione, con acqua ultrapura, in funzione dell'intervallo di misura del kit pari a:

- N-NO_2^- : range basso $0.015 \div 0.6 \text{ mg L}^{-1}$ (kit "Lange LCK-341")
range alto $0.6 \div 6 \text{ mg L}^{-1}$ (kit "Lange LCK-342")
- N-NO_3^- : range basso $0.23 \div 13.5 \text{ mg L}^{-1}$ (kit "Lange LCK-339")
range alto $5 \div 35 \text{ mg L}^{-1}$ (kit "Lange LCK-340")
- N-NH_4^+ : range basso $2 \div 47 \text{ mg L}^{-1}$ (kit "Lange LCK-303")
range alto $47 \div 130 \text{ mg L}^{-1}$ (kit "Lange LCK-302")

3.2.2 Analisi del COD

La misurazione delle concentrazioni di COD è stata effettuata per via spettrofotometrica utilizzando kit "H-Lange" (kit "Lange LCK-314", range 15÷150 mg L⁻¹ O₂). I campioni vengono preventivamente riscaldati in termostato a 148 °C per 2 ore.

Il COD viene effettuato, a seconda delle necessità, sul campione tal quale (quindi si otterrà il COD totale) e/o sul campione filtrato (quindi si otterrà il COD solubile).

Nel corso della sperimentazione, è stata verificata un'interferenza nei confronti della misura di COD da parte di nitrito eventualmente presente nei campioni analizzati; per questo motivo sono state effettuate prove di misura di COD su campioni a concentrazione nota di nitrito, per ottenere una stima dell'influenza nell'analisi. Si è verificato un contributo di 1.14 mg L⁻¹ di COD per ogni mg L⁻¹ di N-NO₂⁻ presente, da sottrarre alla misura analitica.

Oltre a ciò si deve considerare anche una potenziale interferenza di cloruri se presenti in concentrazione ≥1500 mg L⁻¹ nel campione (diluito o tal quale).

3.2.3 Analisi del contenuto di solidi sospesi

Le analisi dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) sono state eseguite seguendo le procedure "APAT-IRSA 2090"; queste analisi sono state effettuate sia sull'effluente dell'SBR, sia sulla miscela di fango (definita "mixed liquor") nel reattore SBR.

L'analisi si differenzia sostanzialmente nella modalità di campionamento e nei quantitativi di volume prelevati, scelti in base alla concentrazione di solidi attesa. In particolare sono stati utilizzati 100÷300 mL di effluente ed 20÷50 mL di mixed liquor.

Le procedure preliminari che devono essere adottate sono le seguenti:

- il prelievo del campione (modalità di campionamento);
- la filtrazione del campione a 0.45 µm con filtri in carta GF/C.

3.2.4 Modalità di campionamento

Le modalità di campionamento adottate si differenziano a seconda della tipologia di analisi che si vuole effettuare: analisi di forme azotate e COD; analisi solidi nell'effluente dall'SBR; analisi solidi presenti nell'SBR. Si è cercato di seguire costantemente una metodologia specifica in modo tale da ottenere campioni omogenei e rappresentativi, al fine di avvicinarsi il più possibile ai valori reali che caratterizzano il processo.

3.2.4.1 Analisi di forme azotate e COD

A seconda delle esigenze il prelievo è stato effettuato sia durante la programmazione automatica del reattore sia in fase manuale, a ciclo di lavoro non attivo. A ciclo di lavoro attivo è necessario attendere alcuni minuti dopo l'inizio della fase di scarico (per permettere la pulizia del tubo di scarico), quindi è possibile prelevare un volume sufficiente per effettuare l'analisi delle forme azotate (circa 50 mL).

Se la macchina è in modalità manuale, per prima cosa è necessario lasciar sedimentare per alcuni minuti i solidi sul fondo, disattivando l'agitazione meccanica; quindi è possibile campionare, alternativamente:

- dal tubo di scarico del reattore, collegato alla pescante nell'SBR, utilizzando una siringa;
- attivando la pompa peristaltica di scarico in manuale; è importante svuotare e pulire il tubo prima di raccogliere il campione per l'analisi;
- dall'apertura in testa al reattore utilizzando un tubo di gomma di sufficiente lunghezza e una siringa ad esso collegata (il primo prelievo viene scartato, perché è necessario in prima istanza avvinare la siringa e il tubo, rimuovendo eventuali residui presenti).

3.2.4.2 Analisi solidi nello scarico di uscita dall'SBR

Il campione viene prelevato dalla tanica contenente lo scarico del reattore, agitando adeguatamente la stessa al fine di ottenere un campione il più omogeneo possibile.

3.2.4.3 Analisi solidi presenti nell'SBR

In modalità manuale è necessario impostare i giri dell'agitatore meccanico su 200 rpm, al fine di rendere il più omogeneo possibile il contenuto del reattore; quindi si preleva il mixed liquor dall'apertura in testa al reattore utilizzando un tubo di gomma di sufficiente lunghezza e una siringa ad esso collegata. Il primo prelievo non viene utilizzato per la misura, perché è necessario in prima istanza avvinare la siringa e il tubo, rimuovendo eventuali residui presenti. Si prelevano ed analizzano almeno 2 campioni, per aumentare la rappresentatività della misura.

3.2.5 Analisi microbiologiche FISH su popolazione batterica anammox

La metodica FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) è una tecnica citogenetica di analisi caratterizzata da ibridazione in situ fluorescente, che permette di rilevare e localizzare la presenza o l'assenza di specifiche sequenze di DNA nei cromosomi; quindi può consentire di identificare la presenza/assenza di un determinato batterio all'interno della biomassa.

Il risultato di questa analisi è costituito da immagini caratterizzate da punti fluorescenti sui filamenti del cromosoma dove si è ibridizzato.

Al fine di condurre le suddette analisi microbiologiche, sono stati prelevati dal reattore SBR campioni di circa 12 mL di biomassa, quindi fissati con paraformaldeide; l'ibridazione con sonde fluorescenti è stata eseguita come descritto da Daims et al. (2005). Le analisi sono state condotte presso il Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Naturali dell'Università di Milano Bicocca.

Le immagini FISH sono state ottenute con un microscopio ottico Axioskop 40 (Zeiss, DE).

3.3 Soluzioni e reattivi utilizzati nel corso della sperimentazione

3.3.1 Preparazione alimento in ingresso al reattore SBR

Le modalità di preparazione dell'alimento vengono stabilite in funzione di:

- tipologia e caratteristiche del refluo reale scelto;
- percentuale (da 0 a 100%) di refluo reale sul totale nell'alimento;
- carico di azoto totale da alimentare al reattore e rapporto tra nitrito e ammonio.

In base a queste indicazioni si calcola il quantitativo di N-NO_2^- e N-NH_4^+ , rispettivamente come massa di NaNO_2 e NH_4Cl , da dosare per l'alimento.

Se si utilizza medium sintetico, allora il substrato è fornito interamente per dosaggio di NaNO_2 e NH_4Cl disciolti nel mezzo minerale sintetico (paragrafo 3.3.2.1).

Se si alimenta refluo reale, la concentrazione di sali azotati è scelta in base alla concentrazione di ammonio e nitrito già presenti nel refluo reale e in base al carico di azoto totale che si vuole alimentare. Il refluo reale viene fatto decantare per rimuovere eventuali solidi sul fondo.

Inoltre è necessario dosare una certa quantità di bicarbonato di sodio (in eccesso), circa 1 g L^{-1} , tenendo conto dell'alcalinità già presente nel refluo reale.

L'alimento è trasferito in contenitori collassabili (bag) di volume pari a 10-20 L, per evitare l'ingresso di ossigeno durante l'aspirazione del liquido; i contenitori sono deossigenati flussandoli con azoto gas sotto cappa per circa 5-10 minuti.

3.3.2 Preparazione soluzioni concentrate

3.3.2.1 Mezzo sintetico minerale (soluzione madre)

Il mezzo sintetico, utilizzato durante la sperimentazione, è costituito da una miscela di sali contenenti i macro e micro nutrienti necessari alla crescita dei batteri anammox, ed è stato preparato, come specificato di seguito, secondo le ricette proposte in letteratura (Van de Graaf et al., 1996 e Lopez et al., 2008). Per 1 litro di mezzo sintetico minerale, vengono forniti:

- 1.05 g di NaHCO_3
- 0.0272 g di KH_2PO_4
- 0.18 g di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.30 g di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 3 mL di HCl 1N (per abbassare il pH totale del refluo sintetico)
- 1 mL di ogni soluzione di elementi in tracce (soluzione I e II)

La prima soluzione di elementi in tracce, definita soluzione I, in un litro totale di volume di acqua ultrapura ("milli") è costituita da:

- 5 g di FeSO_4
- 5 g di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico)

La seconda soluzione di elementi in tracce, definita soluzione II, è costituita da (sempre in un litro totale di acqua ultrapura):

- 0.43 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.496 $\text{mmol}_{\text{Zn}}/\text{L}$)
- 0.24 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.009 $\text{mmol}_{\text{Co}}/\text{L}$)
- 0.99 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (5.004 $\text{mmol}_{\text{Mn}}/\text{L}$)
- 0.25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.001 $\text{mmol}_{\text{Cu}}/\text{L}$)
- 0.22 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.005 $\text{mmol}_{\text{Mo}}/\text{L}$)
- 0.19 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.799 $\text{mmol}_{\text{Ni}}/\text{L}$)
- 0.21 g $\text{NaSeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0.607 $\text{mmol}_{\text{Se}}/\text{L}$)
- 0.014 g H_3BO_4 (0.180 $\text{mmol}_{\text{B}}/\text{L}$)
- 15 g EDTA (51.33 $\text{mmol}_{\text{EDTA}}/\text{L}$)

Se la soluzione viene utilizzata in miscela con il refluo reale, non si dosa il bicarbonato di sodio. Esso verrà difatti aggiunto direttamente nell'alimento (circa 1 g L^{-1}), tenendo conto dell'alcalinità già messa a disposizione dal refluo.

3.3.2.2 Soluzioni concentrate di forme azotate di interesse

Le soluzioni concentrate di specie azotate, come N-NH_4^+ , N-NO_2^- , N-NO_3^- , sono state generalmente preparate alla concentrazione di 10 g N L^{-1} a partire da cloruro di ammonio, nitrito di sodio e nitrato di sodio disciolti in acqua ultrapura.

3.3.2.3 Soluzioni concentrate di acidi

La preparazione di soluzioni concentrate di acidi di interesse nella sperimentazione, in particolare acido cloridrico (HCl), è anch'essa di fondamentale importanza per i loro numerosi impieghi nelle attività di progetto.

Le soluzioni più comunemente adoperate sono:

- soluzione di acido cloridrico 1N (3.6%), ottenuta diluendo 83.25 mL di acido concentrato 12N (37%) in 1 litro di acqua ultrapura;

- soluzione di acido cloridrico 0.1N (100 mL di acido 1N portando a volume a 1 L, oppure 50 mL di acido 1N portando a volume a 500 mL);
- soluzione di acido cloridrico 0.2N (200 mL di acido 1N portando a volume a 1 L, oppure 100 mL di acido 1N portando a volume a 500 mL).

3.4 Prove di attività ed inibizione

3.4.1 Conduzione delle prove manometriche per la stima dell'attività anammox

3.4.1.1 Principio del metodo

L'analisi dell'attività batterica anammox mediante metodo manometrico consiste nella misura di variazione di pressione interna al reattore di sperimentazione, riconducibile alla produzione batterica di azoto molecolare. L'attività viene condotta in reattori in batch a scala ridotta, dotati di una testa di misura di tipo manometrico che consente di valutare e registrare la pressione nel tempo.

Il metodo manometrico si fonda sulla legge dei gas perfetti:

$$PV = n_{N_2} RT$$

dove:

P = pressione interna alla bottiglia (hPa)

V = volume dello spazio di testa della bottiglia (L)

n_{N_2} = moli di azoto in fase gassosa (mol)

R = costante universale dei gas ($0.0821 \text{ L atm K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T = temperatura della bottiglia (K)

Partendo dalle ipotesi che la biomassa contenuta nelle bottiglie OxiTop® sia satura di N_2 , e che il trasferimento dello stesso in fase gassosa non sia cinematicamente limitante, le moli di azoto gassoso prodotte vengono determinate a partire dai valori di pressione registrati nelle OxiTop® come:

$$n_{N_2} = \frac{PV}{RT}$$

Nota il quantitativo di moli di N_2 gassoso prodotte, si può risalire alla produzione di azoto gassoso come volume (espresso in mL di N_2), attraverso il volume molare ($22.4 \text{ L mol}_{N_2}^{-1}$ in condizioni normali = 0 °C e 1 atm).

$$V_{\text{sperimentale}} [\text{L}] = n_{N_2} [\text{mol}_{N_2}] \cdot 22.4 [\text{L mol}_{N_2}^{-1}]$$

Il volume stechiometrico (teorico) di azoto gassoso atteso dal processo di degradazione batterica, operante in condizioni di limitata disponibilità di nitrito, si determina attraverso

la stechiometria anammox a partire dalla massa di nitrito dosato nelle bottiglie all'inizio della prova:

$$V_{\text{stechiometrico}} [\text{L}] = \frac{\text{dosaggio}_{\text{N-NO}_2^-} [\text{g}_{\text{N-NO}_2^-}]}{14 [\text{g}_{\text{N-NO}_2^-} \text{ mol}_{\text{N-NO}_2^-}^{-1}]} \cdot \frac{1.02 [\text{mol}_{\text{N}_2}]}{1.32 [\text{mol}_{\text{N-NO}_2^-}]} \cdot 22.4 [\text{L mol}_{\text{N}_2}^{-1}]$$

Nella stima dell'azoto gassoso prodotto, ottenuta dai dati di pressione, è necessario considerare anche la quota di gas che solubilizza nel liquido. Il quantitativo di azoto gassoso non contabilizzato nel dato di pressione si determina attraverso la legge di Henry:

$$P = \frac{C_{\text{N}_2}}{K_{\text{N}_2}}$$

che invertita restituisce i mL di gas solubilizzato alla temperatura operativa (T=36 °C):

$$C_{\text{N}_2} = K_{\text{N}_2} \cdot P$$

dove

C_{N_2} = concentrazione di N_2 in fase liquida (mL di N_2 per L di soluzione, $\text{mL}_{\text{N}_2} \text{ L}_{\text{sol}}^{-1}$)

K_{N_2} = coefficiente di solubilità di N_2 in acqua ($K_{\text{N}_2} = 12.5 \text{ mL}_{\text{N}_2} \text{ L}_{\text{sol}}^{-1} \text{ atm}^{-1}$, per T=36 °C)

P = pressione parziale del gas (bar)

In realtà nella sperimentazione non risulta rilevante contare anche l'azoto gassoso presente in fase liquida, dato che tale quantità rappresenta una frazione trascurabile rispetto all'azoto trasferito alla fase gas.

A partire dai dati di pressione, vengono elaborate curve di pressione (Figura 3.4), le quali evidenziano l'andamento nel tempo dell'attività della popolazione batterica anammox; queste vengono trasformate in curve di produzione cumulata di azoto gassoso (come mL di N_2). Le curve sono caratterizzate da 2 o 3 fasi distinte: una prima fase di acclimatazione (non sempre presente), a cui segue una fase di sviluppo dell'attività batterica. Quando la curva dell'andamento della pressione nel tempo cambia pendenza, evidenziando un 'ginocchio', significa che l'attività anammox è terminata a causa dell'esaurimento del substrato limitante (generalmente il nitrito).

I dati di pressione contenuti nell'intervallo temporale compreso tra l'acclimatazione e l'esaurimento dell'attività permettono di determinare la velocità di degradazione batterica.

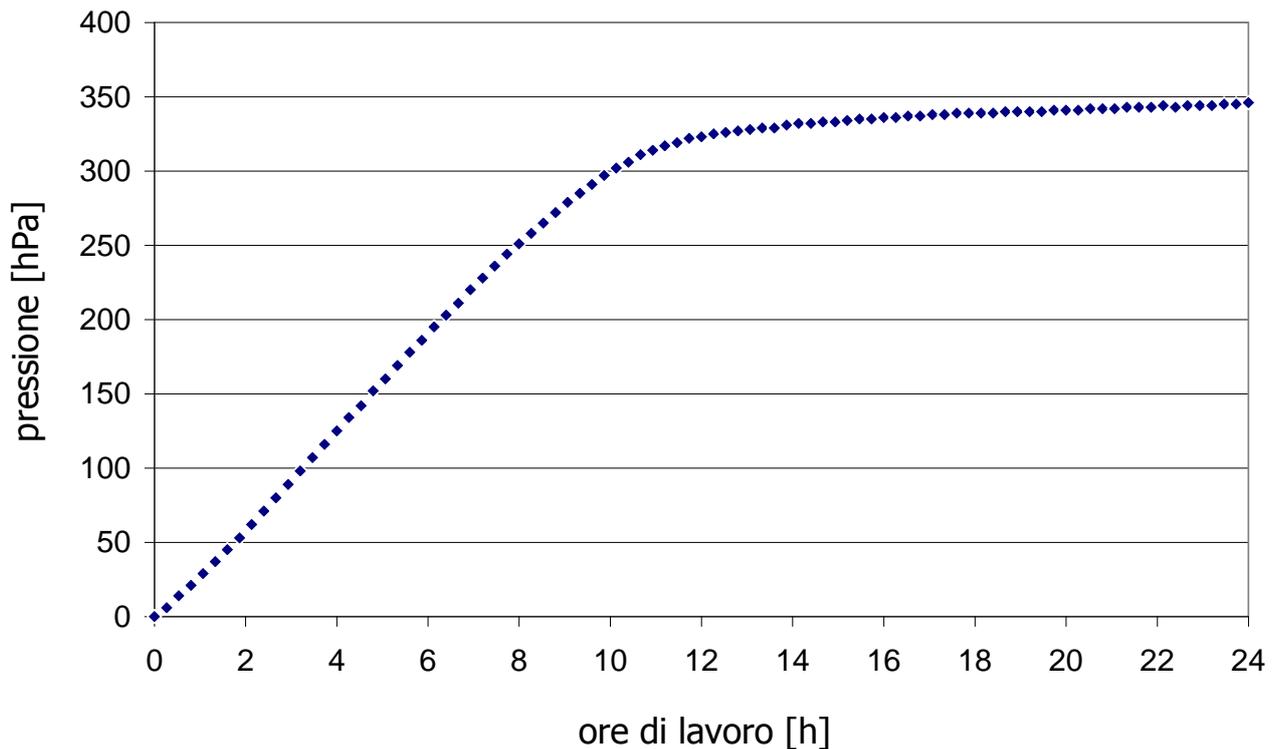


Figura 3.4 - Curva di pressione relativa ad una tipica prova manometrica su biomassa ammox

3.4.1.2 Strumentazione

Per condurre le prove manometriche sono state utilizzate bottiglie OxiTop® di volume pari a 1.140 L, le quali sono in grado di simulare l'attività di un reattore in batch a scala ridotta, e sono fornite di una testa dotata di un trasduttore di pressione per la misura della pressione interna alla bottiglia (Figura 3.5).

La bottiglia OxiTop® è dotata di un'apertura principale centrale, con collo verticale ampio, di 3 cm di diametro, dotato di tappo filettato di chiusura a tenuta su cui avvitare la testa di misura OxiTop®-C; lateralmente sono presenti due aperture più piccole, di 1.7 cm di diametro, volte una ad operazioni di iniezione di substrati (attraverso un supporto forato in plastica, in cui inserire la siringa, sotto cui è presente un setto poroso in gomma a tenuta) e l'altra a manovre di sfiato del gas interno (tramite rubinetto a tenuta con guarnizione in gomma).

I dati possono essere scaricati su pc utilizzando un software dedicato.

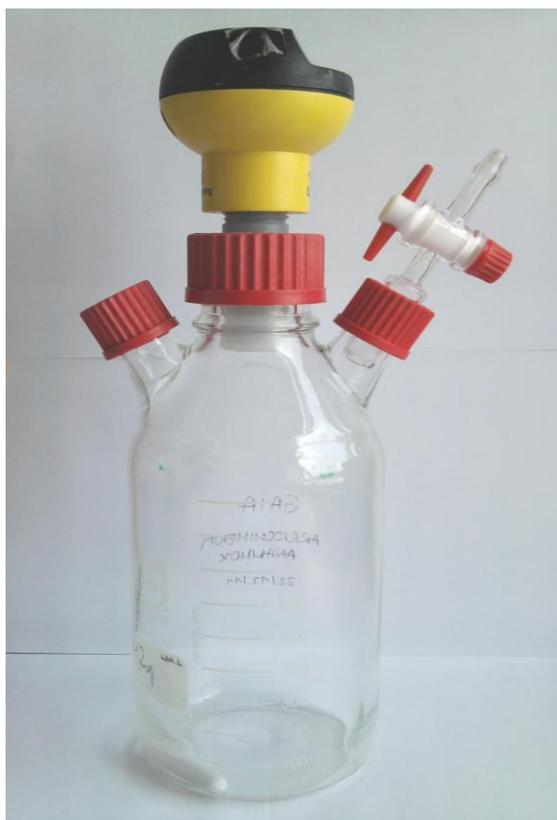


Figura 3.5 - Immagine bottiglia Oxitop®

3.4.1.3 Conduzione della prova di attività

Si immette nella bottiglia un campione di biomassa anammox pari a circa 100 mL e si porta al volume desiderato con la soluzione madre. Il volume totale di liquido presente nelle bottiglie è scelto in base al volume dello spazio di testa che si desidera lasciare disponibile al gas, da cui dipende l'incremento di pressione associato al rilascio di gas. Nelle prove condotte, si è utilizzato un volume liquido variabile tra 700 e 900 mL. Quindi le bottiglie vengono flussate con N₂ (95%) e CO₂ (5%) per circa 5 minuti utilizzando una pietra porosa immersa nel liquido, e chiuse a tenuta mantenendo all'interno una leggera sovrappressione. Questa operazione serve a rimuovere l'ossigeno presente e garantire le necessarie condizioni anossiche.

Si dosano ammonio e nitrito attraverso i setti porosi. Quindi si colloca la bottiglia in termostato alla temperatura di circa 36 °C, ed in miscelazione costante, mediante agitatore magnetico. Si lascia il contenuto in stufa, quindi si sfiata il gas in eccesso sottobattente. Si avvia quindi l'acquisizione dei dati di pressione. Si lascia evolvere la prova fino a quando la curva del volume di azoto prodotto non mostra il ginocchio precedentemente descritto.

3.4.1.4 Elaborazione dei dati di pressione ottenuti

I dati di pressione ricavati dalla prova vengono trattati per ottenere informazioni quali:

- il rateo massimo di produzione di azoto (N_2), in termini sia di massa ($mg N_2 h^{-1}$) che di volume ($mL N_2 h^{-1}$);
- la velocità media di produzione di N_2 ($g N_2 L^{-1} d^{-1}$);
- il rateo di produzione di N_2 , in termini sia di massa ($mg N_2 h^{-1}$) che di volume ($mL N_2 h^{-1}$);
- l'attività specifica anammox, SAA ($g N_2 g VSS^{-1} d^{-1}$).

In primo luogo è necessario trattare i dati al fine di rimuovere il contributo di pressione non dovuto all'attività anammox, evidenziato dalla sovrappendenza residua nel secondo tratto sub-orizzontale della curva sperimentale (vedi Figura 3.4).

Il secondo tratto della curva presenta infatti una pendenza residua rispetto all'orizzontale, questo perché la produzione di azoto gas non è dovuta esclusivamente alla popolazione batterica anammox; per valutare la sola attività anammox è necessario sottrarre la pendenza residua all'intera curva sperimentale di pressione.

Quindi i dati vengono convertiti in volume (o massa) di azoto prodotto, da cui possono essere stimati i parametri elencati in precedenza.

Il rateo massimo di produzione di azoto viene determinato interpolando i dati di produzione relativi alla fase di attività biologica anammox (vedi Figura 3.6), ricavando la pendenza della retta interpolante; vengono scartati i valori iniziali a causa dell'acclimatazione della biomassa nel sistema.

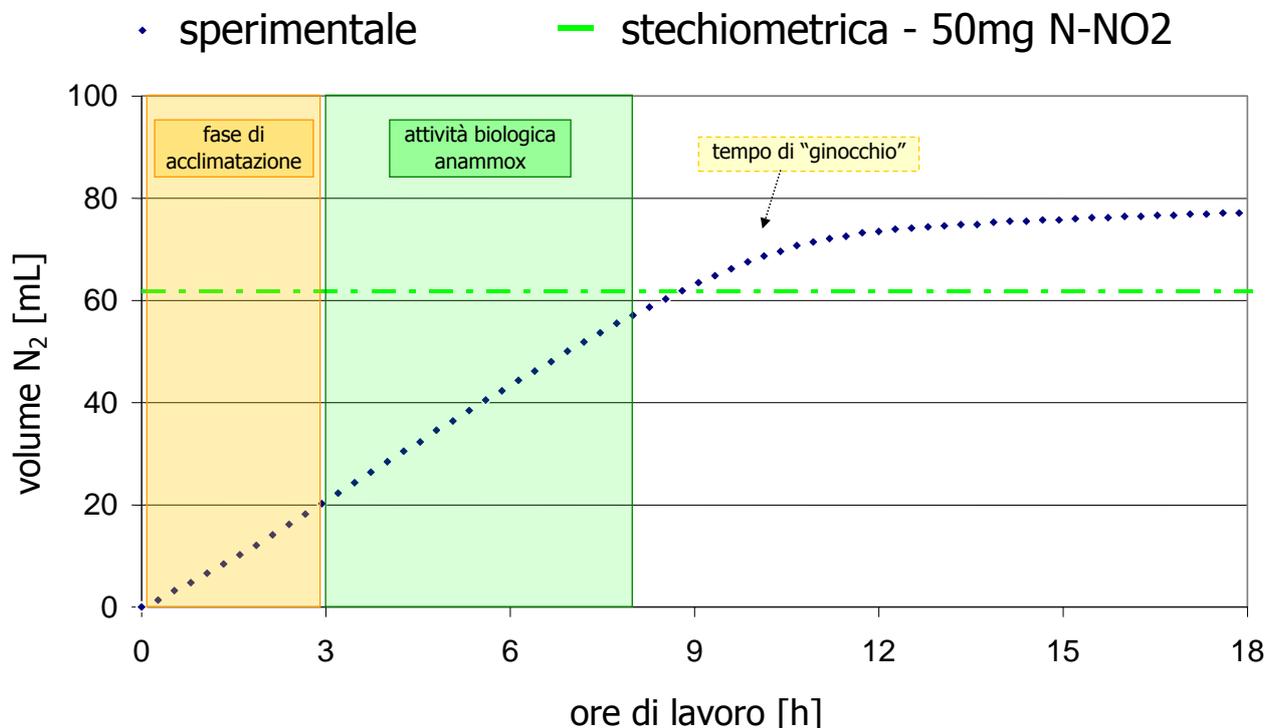


Figura 3.6 - Andamento della produzione di N_2 nell'unità di tempo durante una prova di attività. Si notano una prima fase di acclimatazione della popolazione batterica anammox, a cui segue l'attività biologica.

La velocità media di produzione di N_2 è ricavata per interpolazione lineare della prima decina di dati utili di produzione di azoto (circa 30, quale campione rappresentativo di dati), durante la fase di attività biologica anammox (vedi Figura 3.7); si determina quindi un rateo medio di produzione di N_2 , in massa, il quale viene diviso per il volume di liquido presente nella bottiglia.

Il rateo di produzione sperimentale di azoto viene invece determinato interpolando sia i dati di produzione nel primo tratto della curva (fase di attività biologica anammox), che i dati del secondo tratto di curva (a seguito del "tempo di ginocchio"), dopo il consumo totale di nitrito dosato (vedi Figura 3.6); si determina l'ascissa e l'intercetta del punto di intersezione delle due rette interpolanti, corrispondenti rispettivamente al tempo di lavoro (h) per il consumo del substrato ed al valore di N_2 complessivamente prodotto (mL). Quindi il rateo è noto dividendo la produzione di azoto per il tempo di lavoro.

In Figura 3.8 viene mostrata la differenza tra la produzione di azoto in una prova di attività, prima e dopo la rimozione della sovrappendenza residua.

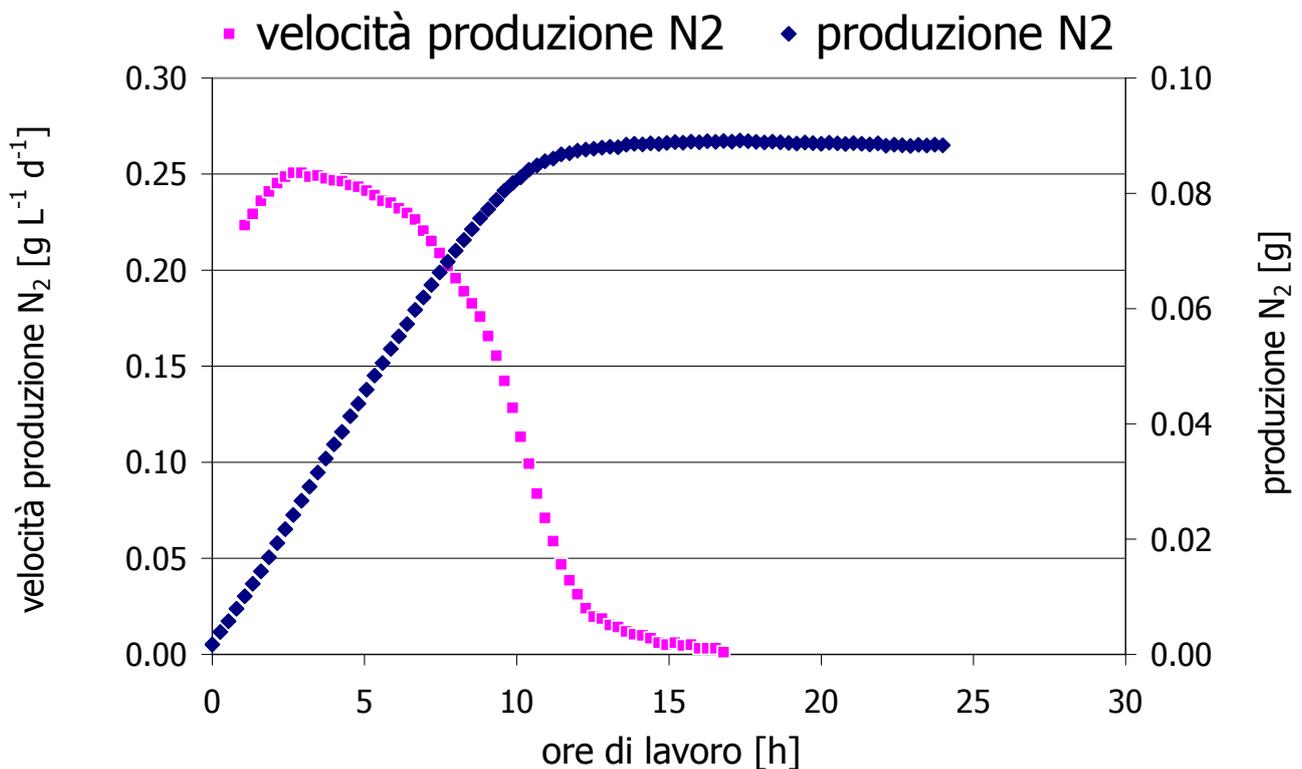


Figura 3.7 - Curva di velocità media di produzione di N_2 , a confronto con la produzione di N_2

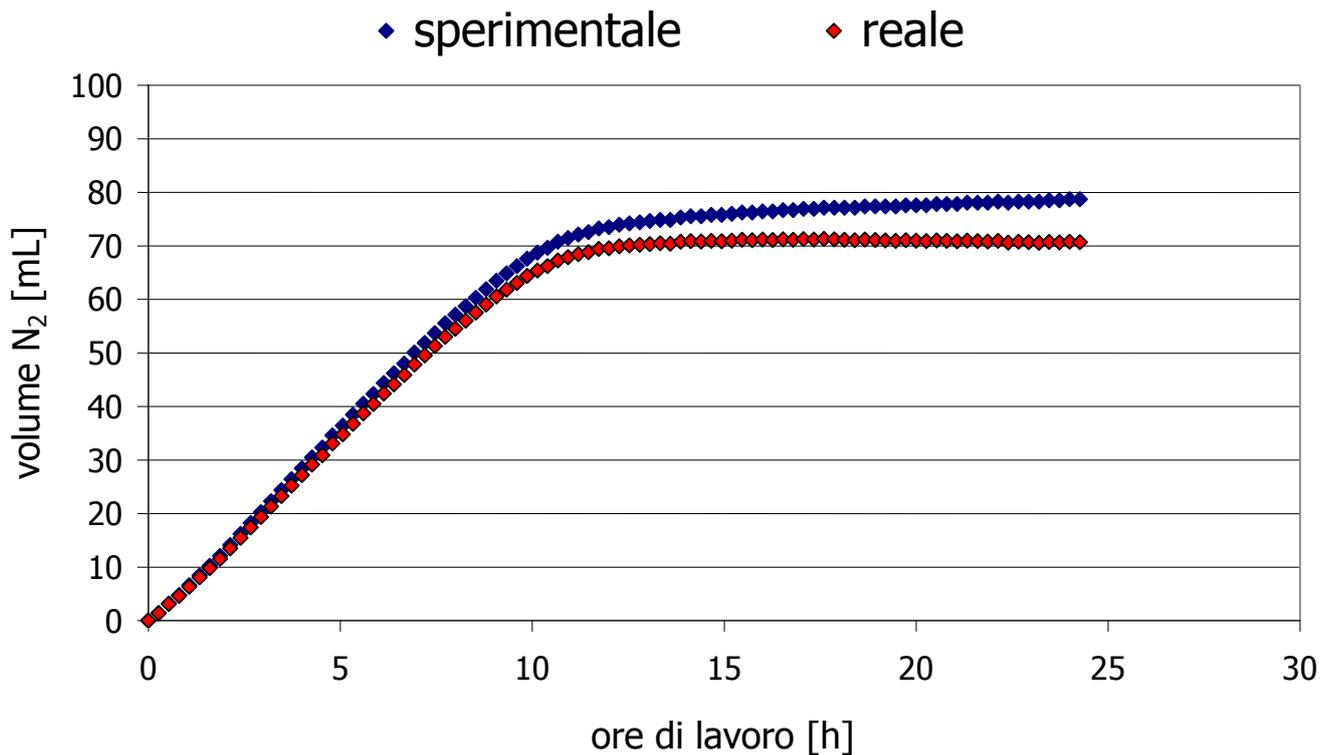


Figura 3.8 - Curva di produzione di N₂ "sperimentale" e "reale" corretta a confronto

Infine l'attività specifica anammox (SAA) si ricava dal rateo di produzione sperimentale, in termini di massa, dividendolo per la massa di VSS contenuti nella miscela di fango.

3.4.2 Prove di inibizione su popolazione batterica anammox

Le prove di inibizione consistono nel confrontare l'attività di un campione di biomassa batterica anammox in presenza di un refluo reale con quella che lo stesso tipo di biomassa esprime in presenza della sola soluzione madre. Questo confronto consente di valutare l'effetto inibente esercitato dal refluo reale sull'attività anammox.

3.4.2.1 Struttura della prova di inibizione

Per condurre le prove, vengono prelevati due o più campioni omogenei di biomassa anammox, in modo da permettere un confronto tra le singole attività; è importante che i campioni siano il più possibile omogenei tra loro, in modo che la loro attività sia confrontabile.

Si preparano due o più bottiglie "bianche", in cui la biomassa è sospesa in soluzione madre; si dosano ammonio e nitrito, tra i 20 e i 30 mg di N-NO₂⁻, per valutare l'attività in ciascuna bottiglia. Il rateo di produzione di azoto deve essere pressoché lo stesso per tutti i campioni, o per lo meno con uno scarto minimo, per consentire successive valutazioni comparative tra le bottiglie. Se è possibile è preferibile effettuare un paio di cicli in bianco,

per testare come già detto l'attività dei campioni senza inibizione, ed avere un numero maggiore di dati per le valutazioni successive.

La seconda fase consiste nell'effettuare una prova di attività in presenza del refluo da testare. A questo scopo, una parte della fase liquida presente nelle bottiglie viene sostituita dal refluo potenzialmente inibente. Se sono disponibili diverse bottiglie, potranno essere testate in parallelo diverse percentuali di refluo. Una bottiglia deve sempre rimanere in "bianco" per permettere confronti tra le attività con e senza il refluo. Si dosa 1 g L⁻¹ di bicarbonato di sodio (NaHCO₃); come in precedenza, è necessario deossigenare le bottiglie, come già descritto. Durante il flussaggio del gas, si controlla che il pH sia adeguato (compreso tra 7 e 7.8). A seconda delle concentrazioni di N-NH₄⁺ e di N-NO₂⁻ e dei volumi del refluo immesso, si regolano in ogni bottiglia le concentrazioni di N-NH₄⁺ e di N-NO₂⁻, portando tutte le bottiglie ai medesimi valori. Quindi si sfiata, si collocano le bottiglie in termostato e si riavvia la registrazione dei dati di pressione.

Quando la curva dell'andamento della pressione nel tempo si approssima sull'orizzontale, significa che l'attività anammox è terminata a causa dell'esaurimento del substrato limitante (generalmente il nitrito); quindi il ciclo di lavoro è concluso e si può scegliere alternativamente di:

- proseguire con lo stesso tipo e percentuale di refluo, effettuare un nuovo dosaggio di N-NH₄⁺ e di N-NO₂⁻ ed iniziare un nuovo ciclo di lavoro;
- cambiare il mezzo nelle bottiglie e procedere come visto in precedenza con un nuovo ciclo di lavoro (o anche aumentare la percentuale del refluo già presente, per incrementare l'inibizione).

3.4.2.2 Elaborazione dei dati

Il primo aspetto fondamentale di una prova di inibizione, come già accennato in precedenza, è la necessità di mantenere condizioni omogenee di lavoro, al fine di consentire coerenti analisi comparative tra i risultati ottenuti. Si rende perciò necessario analizzare in primo luogo la variabilità sia della produzione netta di azoto gas che del rateo sperimentale di produzione di N₂, confrontando in parallelo i diversi campioni all'interno del medesimo ciclo "in bianco" (vedi par. 3.4.2.1).

Questa analisi incrociata può aiutare a comprendere meglio, nel caso di condizioni di lavoro non ottimali, la causa della differente attività; si può infatti valutare se il problema è da ricondurre alla non omogeneità tra i campioni, piuttosto che ad un lento raggiungimento della temperatura ideale nel sistema oppure alla presenza di ossigeno nella miscela di fango (variabilità sul rateo), rispetto a problematiche di perdita di gas dalla bottiglia (variabilità sulla produzione netta).

Per le prove che risultano rappresentative è possibile effettuare valutazioni comparative tra il campione che rimane in bianco ed i restanti con sostituzione del refluo; le prove con condizioni iniziali non omogenee tra tutti i campioni (in bianco), possono dare informazioni importanti se si confrontano solo le SAA tra i campioni con rateo simile in partenza.

Quindi a partire dai valori di produzione di azoto (rateo di produzione) e di SAA ottenuti dal trattamento dei dati di pressione, vengono estrapolate elaborazioni al fine di confrontare l'attività anammox

- tra campioni in bianco e campioni con refluo reale
- tra i medesimi campioni, inizialmente in bianco e successivamente con refluo reale
- tra campioni con differenti percentuali di refluo reale

in funzione dell'omogeneità iniziale delle prove come sopra indicato, da cui vengono stimate le percentuali di inibizione sul processo anammox.

Questo tipo di prova consente inoltre di valutare l'influenza del refluo reale sia per brevi tempi di contatto (24÷72 ore) che a lungo termine (dopo diversi giorni).

3.5 Arricchimento anammox in reattore SBR

Lo scopo della prima fase di sperimentazione è stato quello di arricchire della biomassa anammox, selezionata da campioni di fango prelevati da impianti di depurazione grazie ad una preventiva fase di arricchimento in modalità semi-batch. A questo scopo si è lavorato in continuo in reattore SBR alimentato con soluzione madre, aumentando progressivamente il carico di azoto influente.

3.5.1 Inoculo e start-up del reattore SBR

Per la prima fase di sperimentazione a scala di laboratorio, il reattore SBR è stato inoculato con un mix di campioni di fango derivanti da un precedente arricchimento anammox in modalità semi-batch. Questi campioni sono stati selezionati tra 6 campioni disponibili, ottenuti da una campagna sperimentale su altrettanti campioni di fango prelevati da impianti italiani di trattamento di acque reflue (Motta, 2009; Tornotti, 2011).

L'origine dei suddetti campioni di fango, utilizzati come inoculo per la coltura in semi-batch, è la seguente:

- campione S1: fango anaerobico sospeso proveniente dal digestore dei fanghi di un grande impianto di depurazione di acque reflue (750,000 AE), con sede a Monza (Lombardia);
- campione S2: fango anaerobico granulare proveniente da un reattore UASB (Up Flow Anaerobic Sludge Blanket), dedicato al trattamento dell'effluente di uno stabilimento lombardo di produzione di lieviti;
- campione S3: fango attivo proveniente dal bacino di denitrificazione di un impianto di depurazione di acque reflue, dedicato al trattamento del surnatante da digestione anaerobica di letame di una fattoria di maiali in Lombardia;
- campione S4: fango anaerobico sospeso proveniente dal digestore dei fanghi di un grande impianto di depurazione di acque reflue (600,000 AE), con sede a S. Colombano (Toscana);
- campione S5: fango attivo proveniente dal bacino di denitrificazione del suddetto impianto di depurazione di acque reflue di S. Colombano;

- campione S6: fango attivo proveniente dal bacino di denitrificazione di un impianto di depurazione di acque reflue, di medie dimensioni (70,000 AE), con sede a Pistoia (Toscana).

Tra questi, i campioni S1, S2 e S3 costituiscono il mix utilizzato per inoculare il reattore SBR, descritto nel par. 3.1. Il mix del fango di inoculo è stato diluito con mezzo sintetico minerale (descritto nel par. 3.3.2.1) nel reattore SBR fino ad un volume complessivo pari a 5 L, ottenendo una concentrazione iniziale di solidi sospesi totali di $0.56 \text{ g TSS L}^{-1}$ e sospesi volatili di $0.30 \text{ g VSS L}^{-1}$ (53% circa di volatili sul totale).

L'attività anammox iniziale attesa è stata stimata in funzione delle attività specifiche misurate sui singoli campioni prima dell'inoculazione, e ricavata in funzione della massa di VSS dosati per ogni singolo fango. Complessivamente l'attività iniziale attesa risultava essere pari a $0.093 \text{ g N g VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

In Figura 3.9 viene mostrato un dettaglio di un campione dell'inoculo, in agitazione ed in sedimentazione.

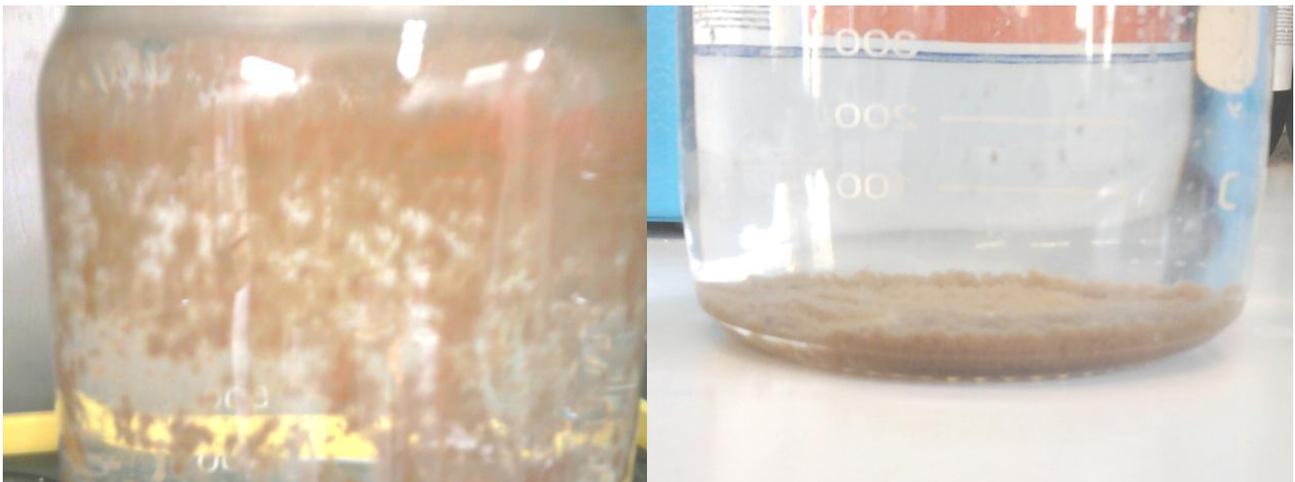


Figura 3.9 - Dettaglio di un campione dell'inoculo diluito con mezzo sintetico minerale, in agitazione (a sinistra) ed in sedimentazione (a destra)

3.5.2 Parametri operativi

Il primo periodo di sperimentazione (giorni di lavoro 0÷103) si è svolto operando con un ciclo di lavoro dell'SBR di 24 ore, che comprende:

- 18 ore di lenta alimentazione del refluo sintetico e contemporanea reazione;
- 4.5 ore di reazione;
- 30 minuti di sedimentazione;
- 1 ora di scarico.

Il ciclo di lavoro nello specifico prevede due sottofasi separate sia di carico (9+9 ore) che di reazione (2.5+2 ore), con sedimentazione e scarico al termine (vedi Figura 3.10).



Figura 3.10 - Struttura del ciclo di lavoro dell'SBR, 1° periodo

Durante la sperimentazione si è deciso di decrementare progressivamente la durata della sedimentazione (e di conseguenza di aumentare in egual misura il tempo dedicato alla reazione), passando da 30 a 25 minuti (dal giorno 41) fino a 20 minuti (dal giorno 56).

Per impedire l'ingresso di ossigeno il reattore è stato mantenuto costantemente in pressione tramite una valvola di backpressure e mantenendo un flusso costante di azoto gas in ingresso allo spazio di testa del reattore. Questo accorgimento è fondamentale durante la fase di scarico, caratterizzata da un calo di pressione per il richiamo del surnatante verso l'esterno.

Il pH è stato mantenuto tra 7.00 ed 8.00, attraverso un controllo automatico collegato all'alimentazione di HCl 1N nel reattore, essendo il pH ottimale per l'attività batterica anammox compreso tra 6.70 e 8.30, con valore ideale pari a 8.00 (Strous et al., 1999).

La temperatura è stata mantenuta intorno a 36 °C, essendo il valore ideale per il metabolismo e l'attività di rimozione della popolazione anammox compreso nel range 30÷40 °C (Strous et al., 1999; Egli et al., 2001); in particolare il range ottimale che consente di ottenere l'attività massima della biomassa anammox non adattata è pari a 35÷40 °C (Dosta et al., 2008).

L'agitazione meccanica del mixed liquor presente nell'SBR è stata mantenuta costante a 100 rpm, al fine di mantenere miscelato il fango ed evitare la sedimentazione preventiva dei solidi.

Il tempo di ritenzione idraulica (HRT, Hydraulic Retention Time) nel reattore è stato mantenuto intorno ai 6 giorni, con un volume interno nel corso del ciclo variabile tra 5 e 6 L ed una portata di alimento in ingresso pari a 0.059 L h⁻¹ (circa 1 L d⁻¹ di reflujo sintetico alimentato).

Il tempo di ritenzione del fango (SRT, Sludge Retention Time) è stato mantenuto piuttosto elevato nell'intervallo tra 90 e 238 d, in media 137±50 d.

Nel secondo periodo di sperimentazione (giorni di lavoro 104÷127) viene modificato il ciclo di lavoro, passando da 24 a 12 ore complessive; si è operato dunque con due cicli al giorno, ciascuno costituito da (vedi Figura 3.11):

- 9 ore di lenta alimentazione del reflujo sintetico e contemporanea reazione;

- 1 ora 40 minuti di reazione;
- 20 minuti di sedimentazione;
- 1 ora di scarico.

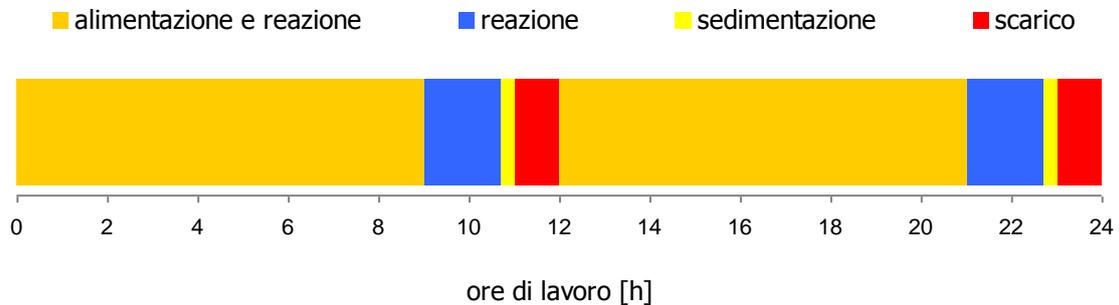


Figura 3.11 - Struttura della giornata di lavoro dell'SBR, costituita da due cicli consecutivi

Alcuni parametri operativi del reattore (pressione interna, pH, temperatura, intensità di miscelazione) sono stati mantenuti pressoché invariati rispetto al primo periodo.

Rispetto al 1° periodo sono stati modificati i seguenti parametri.

Il flusso di azoto gas in ingresso allo spazio di testa dell'SBR, viene sostituito con una miscela gassosa al 95% N₂ e 5% CO₂, al fine di equilibrare il pH interno e dosare una quantità minore di acido.

Il tempo di ritenzione idraulica (HRT) nel reattore è stato dimezzato, passando mediamente da 6 a 3 giorni. Questo è stato reso possibile dalla presenza di due estrazioni di surnatante giornaliera, bilanciate da un'alimentazione doppia (0.122 L h⁻¹) di refluo sintetico per ogni singolo ciclo.

Il tempo di ritenzione del fango (SRT) è stato mantenuto più basso che nel primo periodo, in funzione della maggiore estrazione di solidi attraverso l'effluente di scarico del reattore SBR, con valori compresi nell'intervallo 75÷108 d, in media pari a 87±18 d.

Il carico di azoto nell'influyente (NLR, Nitrogen Loading Rate, espresso come g N_{alimentato} L⁻¹ d⁻¹) nei primi 38 giorni di lavoro è stato mantenuto basso, su valori pari a 0.01÷0.02 g N L⁻¹ d⁻¹. Dal giorno 39 al giorno 103 il NLR è stato incrementato da 0.02 a 0.17 g N L⁻¹ d⁻¹, aumentando la concentrazione complessiva di ammonio e nitrito in ingresso (in termini di azoto totale) da 110 a 1060 mg N L⁻¹. Nel secondo periodo di lavoro (dal giorno 104 al giorno 127), il NLR è salito gradualmente passando da 0.10 a 0.26 g N L⁻¹ d⁻¹.

In Figura 3.12 è rappresentato il rapporto molare N-NO₂⁻/N-NH₄⁺ nell'influyente confrontato con la concentrazione di azoto totale nell'influyente (intesa come somma di azoto ammoniacale e nitroso), mentre in Figura 3.13 sono riportati i valori di NLR e HRT applicati nel corso della sperimentazione.

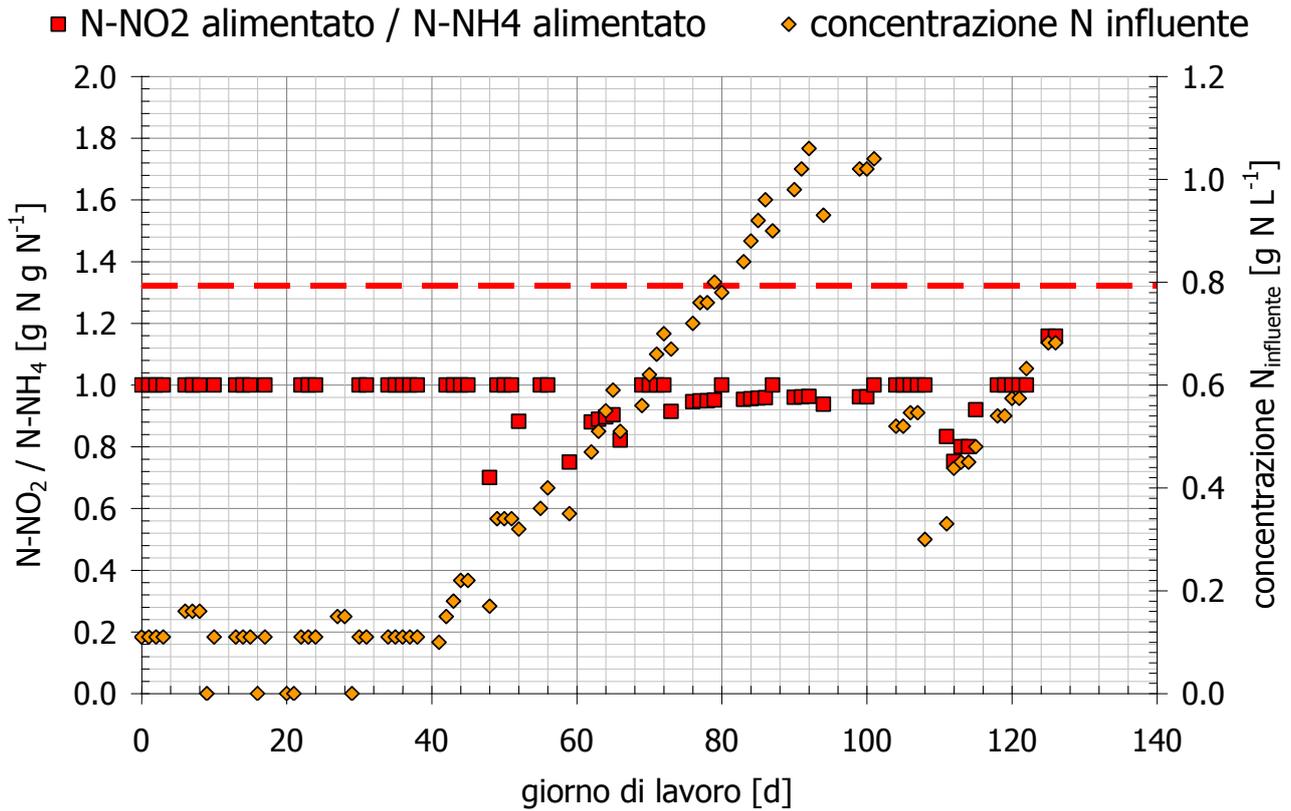


Figura 3.12 - Rapporto molare NO₂/NH₄ nell'influyente, confrontato con la concentrazione di azoto totale nell'influyente

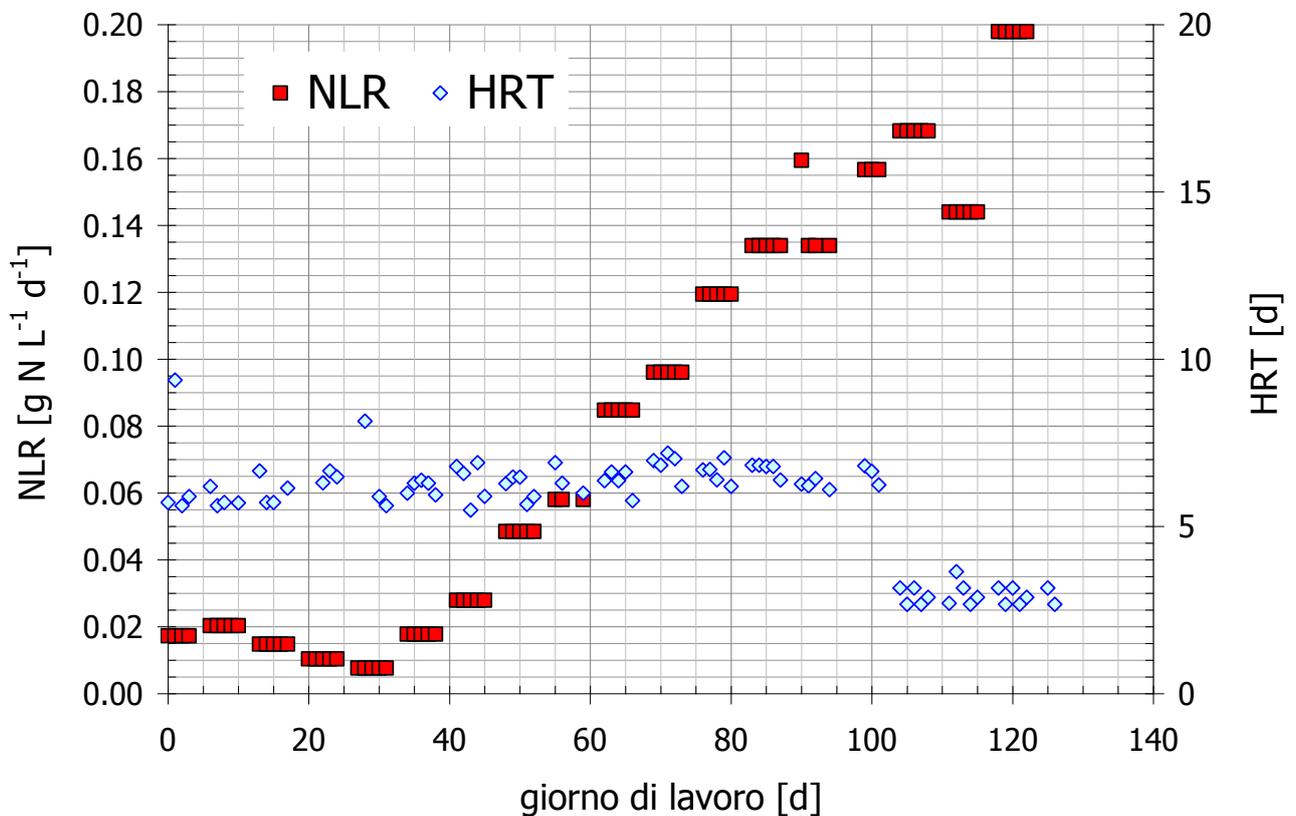


Figura 3.13: Valori di NLR e HRT applicati nel corso della sperimentazione

I parametri operativi principali del reattore SBR vengono complessivamente riassunti nella seguente Tabella 3.1.

Tabella 3.1: Parametri principali del reattore SBR durante la prima fase di sperimentazione con refluo sintetico

parametri operativi	Periodo 1 (giorni 0-103)	Periodo 2 (giorno 104-127)
temperatura (°C)	36	36
miscelazione (rpm)	100	100
range pH	7÷8	7÷8
durata complessiva ciclo (h)	24	12
durata fase di alimentazione/reazione (h)	18	9
durata fase di reazione (min)	270	100
durata fase di sedimentazione (min)	20÷30	20
durata fase di scarico (h)	1	1
HRT (d)	5.5÷7.2	2.7÷3.6
SRT (d)	90÷238	75÷108
volume minimo-massimo ciclo (L)	5-6	5-6
NLR (g N L ⁻¹ d ⁻¹)	0.02÷0.17	0.10÷0.26
concentrazione influente (mg N L ⁻¹)	110÷1060	300÷682
rapporto molare N-NO ₂ ⁻ /N-NH ₄ ⁺ influente	0,70÷1,00	0.75÷1.16

3.5.3 Monitoraggio del processo e calcoli

3.5.3.1 Monitoraggio dell'attività nel reattore SBR

Il monitoraggio dell'attività del reattore SBR è stato effettuato attraverso:

- l'analisi delle concentrazioni delle specie azotate di interesse (N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻) nell'effluente dalle 3 alle 5 volte la settimana;
- la misura della concentrazione di solidi sospesi (TSS, VSS) nell'effluente una volta la settimana;
- la misura della concentrazione di solidi sospesi presente nel mixed liquor (MLTSS, MLVSS) ogni 2 settimane;
- analisi microbiologiche FISH, 4 volte nell'arco della sperimentazione.

3.5.3.2 Calcolo dei parametri di caratterizzazione dell'attività

I parametri fondamentali che si è reso necessario calcolare per il monitoraggio attivo dell'attività biologica anammox nel reattore SBR sono i seguenti:

- SRT (Sludge Retention Time);
- NRR (Nitrogen Removal Rate);
- rateo di rimozione di ammonio e nitrito;
- rateo di produzione di nitrato;
- rapporto molare $N\text{-NO}_2^-_{\text{rimosso}}/N\text{-NH}_4^+_{\text{rimosso}}$, confrontato con la stechiometria dell'attività anammox;
- rapporto molare $N\text{-NO}_3^-_{\text{prodotto}}/N\text{-NH}_4^+_{\text{rimosso}}$, confrontato con la stechiometria dell'attività anammox;
- rapporto NRR/NLR di efficienza dell'attività anammox;
- attività specifica anammox.

Di seguito vengono riportate le modalità di calcolo adottate nella sperimentazione.

SRT

Il tempo di residenza del fango SRT viene determinato come il rapporto tra la massa di solidi volatili, VSS, mantenuti nel reattore e la massa di VSS estratta con l'effluente nell'unità di tempo:

$$\text{SRT}[\text{d}] = \frac{\text{VSS}_{\text{SBR}} [\text{g VSS L}^{-1}] \cdot V_{\text{min}} [\text{L}]}{\text{VSS}_{\text{effluente}} [\text{g VSS d}^{-1}]}$$

dove con VSS_{SBR} e con $\text{VSS}_{\text{effluente}}$ vengono indicati rispettivamente la concentrazione di solidi sospesi volatili nella miscela di fango e il carico di solidi sospesi volatili nell'effluente. Il termine V_{min} rappresenta il volume di surnatante minimo presente all'interno del reattore nel corso di un ciclo di lavoro; nella formula viene considerato il volume minimo (e non quello massimo) perché il parametro è definito come rapporto tra i solidi mantenuti nel sistema e quelli rimossi nell'unità di tempo, quindi si fa riferimento alla conclusione del ciclo, dopo lo scarico dell'effluente ed il raggiungimento del V_{min} .

NRR

Il rateo di rimozione dell'azoto, NRR (Nitrogen Removal Rate, espresso come $\text{g N}_{\text{rimosso}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$), è stato calcolato in accordo con il bilancio di massa dinamico dell'azoto nel reattore SBR, tenendo conto dell'accumulo e del rilascio di azoto solubile nello stesso in un determinato intervallo di tempo Δt di lavoro:

$$\text{NRR}_t = \frac{N_{\text{influyente}} - N_{\text{effluente}} + \left(N_{\text{inizio intervallo}} - N_{\text{fine intervallo}} \right)}{\Delta t \cdot V_{\text{max}}}$$

con:

$N_{\text{influente}}$: massa di azoto alimentata in ingresso al reattore, nell'intervallo di tempo Δt considerato;

$N_{\text{effluente}}$: massa di azoto scaricata con l'effluente in uscita dal reattore, nell'intervallo di tempo Δt considerato, considerando la concentrazione media dell'effluente nell'intervallo di tempo;

$N_{\text{inizio intervallo}}$: massa di azoto presente nel reattore all'inizio dell'intervallo di tempo, corrispondente alla massa di azoto residua nel reattore dall'intervallo di tempo precedente;

$N_{\text{fine intervallo}}$: massa di azoto residua nel reattore alla fine dell'intervallo di tempo;

Δt : durata dell'intervallo di tempo;

V_{max} : volume massimo del reattore.

Rateo di rimozione di ammonio e nitrito - rateo di produzione di nitrato

In modo analogo, la rimozione di ammonio e nitrito e la produzione di nitrato (g N d^{-1}) sono state calcolate con le seguenti formule:

- rimozione di ammonio ($\Delta N\text{-NH}_4^+$)

$$\Delta N\text{-NH}_4^+ = \frac{N\text{-NH}_4^+ \text{ influente} - N\text{-NH}_4^+ \text{ effluente} + \left(N\text{-NH}_4^+ \text{ iniziointervallo} - N\text{-NH}_4^+ \text{ fineintervallo} \right)}{\Delta t \cdot V_{\text{max}}}$$

- rimozione di nitrito ($\Delta N\text{-NO}_2^-$)

$$\Delta N\text{-NO}_2^- = \frac{N\text{-NO}_2^- \text{ influente} - N\text{-NO}_2^- \text{ effluente} + \left(N\text{-NO}_2^- \text{ iniziointervallo} - N\text{-NO}_2^- \text{ fineintervallo} \right)}{\Delta t \cdot V_{\text{max}}}$$

- produzione di nitrato ($\Delta N\text{-NO}_3^-$)

$$\Delta N\text{-NO}_3^- = \frac{N\text{-NO}_3^- \text{ influente} - N\text{-NO}_3^- \text{ effluente} + \left(N\text{-NO}_3^- \text{ iniziointervallo} - N\text{-NO}_3^- \text{ fineintervallo} \right)}{\Delta t \cdot V_{\text{max}}}$$

Rapporti molari $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+ - \text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$

Dai suddetti ratei è possibile determinare il rapporto molare $\text{N-NO}_2^-_{\text{rimosso}}/\text{N-NH}_4^+_{\text{rimosso}}$ e il rapporto molare $\text{N-NO}_3^-_{\text{prodotto}}/\text{N-NH}_4^+_{\text{rimosso}}$, e confrontarli con la stechiometria della reazione anammox:

$$\left(\frac{\text{N-NO}_2^-_{\text{rimosso}}}{\text{N-NH}_4^+_{\text{rimosso}}} \right)_{\text{stechiometrico}} = 1.32 \qquad \left(\frac{\text{N-NO}_3^-_{\text{prodotto}}}{\text{N-NH}_4^+_{\text{rimosso}}} \right)_{\text{stechiometrico}} = 0.26$$

NRR/NLR

Il rapporto NRR/NLR di efficienza dell'attività anammox è stato calcolato in due modalità:

- considerando, sia per il NLR che per il NRR, la sommatoria di ammonio e nitrito;
- considerando, sia per il NLR che per il NRR, la sommatoria di ammonio, nitrito e nitrato.

Attività specifica anammox (SAA)

L'attività specifica anammox (SAA, Specific Anammox Activity) viene determinata come il rapporto tra l'azoto rimosso nell'unità di tempo e la concentrazione di solidi sospesi volatili nella miscela di fango:

$$\text{SAA}[\text{gN}_{\text{rimosso}} \text{ g VSS}_{\text{SBR}}^{-1} \text{ d}^{-1}] = \frac{\text{N}_{\text{rimosso}} [\text{g N d}^{-1}]}{\text{VSS}_{\text{SBR}} [\text{g VSS L}^{-1}] \cdot V_{\text{max}}} = \frac{\text{NRR}}{\text{VSS}_{\text{SBR}}}$$

dove con VSS_{SBR} e con $\text{N}_{\text{rimosso}}$ vengono indicati rispettivamente la concentrazione di solidi sospesi volatili nella miscela di fango e la massa di azoto totale rimossa nel processo, nell'unità di tempo; il termine V_{max} rappresenta il volume di surnatante massimo che viene raggiunto all'interno del reattore nel corso di un ciclo di lavoro, a conclusione della fase di alimentazione dell'influente. Nella formula viene utilizzato il volume massimo (e non quello minimo), dato che l'attività specifica viene valutata considerando il processo di rimozione dell'azoto sulla totalità del refluente influente in un giorno di lavoro, che comporta il raggiungimento del V_{max} nel reattore.

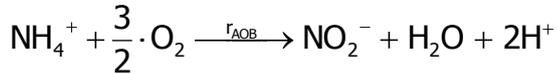
In analogia con il precedente parametro, si hanno due differenti modalità di calcolo in funzione delle specie azotate che si considerano.

3.5.3.3 Verifica dell'apporto anammox al processo di rimozione

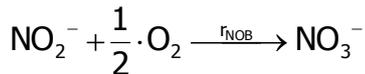
Nel corso del monitoraggio dell'attività nel reattore SBR, si è voluto verificare l'apporto anammox al processo di rimozione delle specie azotate di interesse (quali ammonio e

nitrito), valutando la percentuale di conversione dell'ammonio dovuta all'attività anammox rispetto alla rimozione totale dello stesso; ciò è stato effettuato considerando le reazioni concomitanti che occorrono nel reattore SBR, quali:

1) ossidazione dell'ammonio da parte dei batteri ammonio ossidanti AOB:



2) ossidazione del nitrito da parte dei batteri nitrito ossidanti NOB:



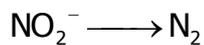
3) rimozione dell'ammonio e del nitrito da parte dei batteri anammox:



4) riduzione del nitrato da parte dei batteri denitrificanti:



5) riduzione del nitrito da parte dei batteri denitrificanti:



dove con r_{AOB} , r_{NOB} , r_{ANAMMOX} si indicano rispettivamente i ratei di reazione relativi ai batteri ammonio-ossidanti, nitrito-ossidanti ed anammox.

In prima ipotesi viene considerato trascurabile il contributo degli NOB e dei denitrificanti (eq. 2-4-5), prendendo in considerazione solo gli AOB e gli anammox. Dalle suddette equazioni si ricava il sistema di 3 equazioni per descrivere la variazione delle specie azotate:

$$\frac{\Delta \text{NH}_4^+}{\Delta t} = -r_{\text{AOB}} - r_{\text{ANAMMOX}}$$

$$\frac{\Delta \text{NO}_2^-}{\Delta t} = +r_{\text{AOB}} - 1.32 \cdot r_{\text{ANAMMOX}}$$

$$\frac{\Delta \text{NO}_3^-}{\Delta t} = +0.26 \cdot r_{\text{ANAMMOX}}$$

dove i termini a primo membro sono noti a partire dai dati sperimentali (rimozione delle specie azotate), mentre a secondo membro i ratei " r_i " sono le incognite del sistema. Le prime due equazioni sono sufficienti per l'analisi del processo, mentre la terza equazione è utile per controllare la correttezza della stima della produzione di nitrato, da confrontare con i dati sperimentali.

Risolvendo il sistema si ricavano le rimozioni di ammonio dovute all'attività anammox, che rapportate alle rimozioni complessive di ammonio forniscono le percentuali sul totale dell'attività anammox.

Dal confronto tra la stima di produzione di $N-NO_3$ ricavata dal sistema ed i valori sperimentali, si ottiene una variabilità complessiva sulla produzione di nitrato che deve essere confrontata con la produzione sperimentale stessa. Difatti se la variabilità ottenuta è minima rispetto ai valori sperimentali, significa che in prima approssimazione si può considerare consistente il sistema utilizzato e rappresentativo per descrivere il processo nel reattore SBR; quindi si possono ipotizzare corrette le stime sulla rimozione di ammonio da attività anammox.

3.6 Processo biologico anammox in reattore SBR per il trattamento della frazione liquida di digestato agricolo

Lo scopo della seconda fase di sperimentazione è stato quello di verificare l'applicabilità del processo anammox al trattamento della frazione liquida di un digestato agricolo, previa nitrificazione parziale, con differenti livelli di diluizione del refluo.

3.6.1 Inoculo e start-up del reattore SBR

Per la seconda fase della sperimentazione, il reattore SBR è stato inoculato con fango granulare proveniente dal reattore anammox a scala reale dell'impianto di depurazione di Rotterdam, Dokhaven-Sluisjesdijk (Olanda).

L'inoculo granulare (vedi Figura 3.14), in forma concentrata, è stato stoccato in cella frigorifera a 4 °C per 2 mesi, prima di iniziare la sperimentazione; quindi è stato diluito con mezzo sintetico minerale (descritto nel par. 3.3.2.1) nel reattore SBR fino ad un volume complessivo pari a 5 L, per raggiungere una concentrazione di solidi iniziale pari a 4.8 g TSS L⁻¹ e 2.7 g VSS L⁻¹ (58% circa di volatili sul totale).



Figura 3.14 – Inoculo granulare anammox presente all'interno del reattore SBR

3.6.2 Caratteristiche del refluo influente

Nel corso della sperimentazione è stato utilizzato come refluo reale l'effluente dell'impianto pilota SBR di nitrificazione-denitrificazione (DENO2), situato presso l'azienda agricola Corte Grande SRL sita a Casaletto di Sopra (CR) e alimentato con il surnatante di digestione prodotto dall'azienda.

Periodicamente sono stati prelevati dei campioni di refluo reale dal reattore DENO2, trasferiti nel laboratorio sperimentale in taniche da 10 L e stoccate in cella frigorifera a 4 °C. Il refluo non è stato pretrattato prima dell'alimentazione nell'SBR a scala di laboratorio.

Durante il periodo di sperimentazione, durato 175 giorni, sono stati utilizzati 3 diverse campioni di refluo, prelevati in momenti diversi dall'impianto pilota e con differenti composizioni in termini di contenuto di specie azotate, alcalinità, sostanza organica, solidi e metalli, come indicato in Tabella 3.2.

In generale il pH dei reflui è risultato essere abbastanza elevato, con valori superiori a 8 (8÷8.4), mentre la concentrazione di metalli è risultata relativamente bassa; il contenuto in COD solubile ed in solidi totali è risultato essere crescente dal campione 1 (sCOD=1038 mg L⁻¹, TSS=160 mg L⁻¹) al campione 3 (sCOD=2629 mg L⁻¹, TSS=1100 mg L⁻¹), con una biodegradabilità dei reflui (sBOD₅/sCOD (%)) piuttosto costante nel tempo. La presenza delle specie azotate di interesse è stata trascurabile per N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻, mentre il N-NO₂⁻ presenta una concentrazione elevata, in particolare nei campioni 1 e 2 (circa 400 mg N-NO₂⁻ L⁻¹).

Tabella 3.2 - Caratteristiche principali dei reflui utilizzati nella sperimentazione

campione		campione 1	campione 2	campione 3
periodo di alimentazione (d)		44÷153	154÷167	168÷175
pH (unità di pH)		8.0÷8.4		
alcalinità (mg CaCO ₃ L ⁻¹)		2200	2228	2700
conducibilità (mS cm ⁻¹)		n.d.	7.8	9.4
specie azotate	N-NH ₄ ⁺ /N _{org} (%)	83±3		
	NH ₄ (mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹)	22.2	28	0
	NO ₂ (mg N-NO ₂ ⁻ L ⁻¹)	404	403	182
	NO ₃ (mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹)	79	0	5
COD totale, COD (mg L ⁻¹)		1380	2210	3850
COD solubile, sCOD (mg L ⁻¹)		1038	1598	2629
sBOD ₅ /sCOD (%)		n.d.	12	8
sBOD ₂₀ /sCOD (%)		n.d.	19	27
TSS (mg L ⁻¹)		160	258	1100
Metalli	Al (mg L ⁻¹)	< 0.2	0.2	0.2
	As (mg L ⁻¹)	< 0.02	< 0.02	< 0.02
	B (mg L ⁻¹)	0.4	1.13	1.22
	Ba (mg L ⁻¹)	< 0.02	< 0.02	< 0.02
	Cd (mg L ⁻¹)	< 0.003	< 0.003	< 0.003
	Cr _{tot} (mg L ⁻¹)	< 0.02	< 0.02	< 0.02
	Cu (mg L ⁻¹)	0.02	< 0.02	0.02
	Fe (mg L ⁻¹)	0.19	0.27	0.25
	Hg (mg L ⁻¹)	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	Mb (mg L ⁻¹)	< 0.02	< 0.02	< 0.02
	Mn (mg L ⁻¹)	0.04	0.14	0.07
	Ni (mg L ⁻¹)	< 0.02	0.05	0.05
	Pb (mg L ⁻¹)	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	Sb (mg L ⁻¹)	< 0.02	< 0.02	< 0.02
	Se (mg L ⁻¹)	< 0.005	0.006	0.005
Sn (mg L ⁻¹)	< 0.02	< 0.02	< 0.02	
Zn (mg L ⁻¹)	0.1	0.13	0.15	

Nella maggior parte della sperimentazione (dal giorno 44 al giorno 153) è stato utilizzato il refluo indicato come campione 1; il campione 2 è stato alimentato dal giorno 154 al giorno 167, mentre il campione 3 dal giorno 168 al giorno 170.

3.6.3 Parametri operativi

L'SBR è stato gestito lavorando con 2 cicli al giorno. Ogni ciclo di lavoro, della durata di 12 ore, comprende (Figura 3.15):

- 9 ore di lenta alimentazione del refluo sintetico e contemporanea reazione;
- 1 ora 55 minuti di reazione;
- 5 minuti di sedimentazione;
- 1 ora di scarico.

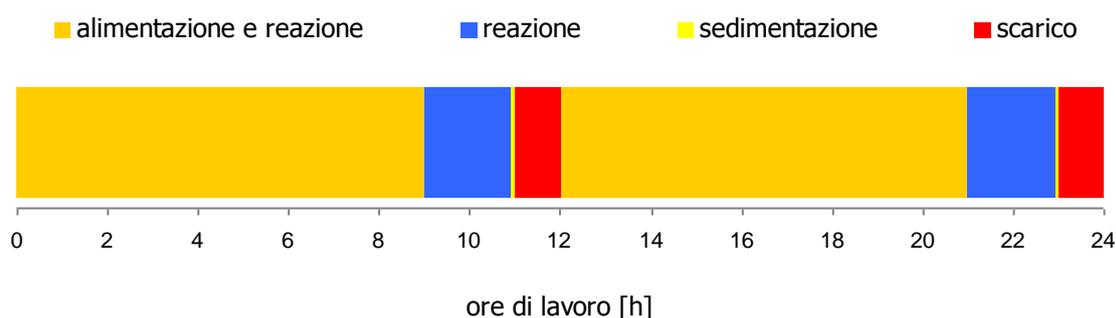


Figura 3.15 - Struttura della giornata di lavoro dell'SBR, costituita da due cicli consecutivi

Per impedire l'ingresso di ossigeno, il reattore è stato mantenuto costantemente in pressione tramite una valvola di backpressure e mantenendo un flusso costante di una miscela gassosa al 95% N₂ e 5% CO₂ in ingresso allo spazio di testa del reattore, come nella prima fase di sperimentazione con refluo sintetico. La presenza di CO₂ nella miscela ha inoltre contribuito ad equilibrare il pH.

Il pH è stato mantenuto in un intervallo compreso tra 7.00 e 8.00, quale range ottimale per l'attività batterica anammox, attraverso un controllo automatico collegato all'alimentazione nel reattore di HCl 0.1N, in un primo momento, e successivamente di HCl 0.2N.

La temperatura è stata mantenuta intorno a 36 °C, valore ottimale per il metabolismo e l'attività di rimozione della popolazione anammox, nelle fasi di alimentazione e reazione. Nelle fasi di sedimentazione e scarico la temperatura impostata risultava più bassa, vista la vicinanza della biomassa (sedimentata rapidamente sul fondo) con la piastra riscaldante; data la lenta variazione di temperatura tra l'inizio della sedimentazione e la conclusione dello scarico, prima dell'inizio di un nuovo ciclo di lavoro, si è riusciti a mantenere le condizioni ideali per l'attività.

L'agitazione meccanica del mixed liquor presente nell'SBR è stata mantenuta pressoché costante, come nella prima fase, a 100 rpm, al fine di mantenere miscelato il fango ed evitare la sedimentazione preventiva dei solidi.

Il tempo di ritenzione idraulica (HRT) nel reattore è stato mantenuto intorno ai 2-3 giorni, con un volume interno nel corso del ciclo variabile tra circa 5 e 7 L ed una portata di alimento in ingresso pari a 0.180 L h⁻¹ (circa 3 L d⁻¹ di refluo reale alimentato).

L'SRT non è stato controllato attivamente, ma è stato determinato dai solidi estratti con l'effluente e delle estrazioni periodiche di miscela di fango per le analisi. I valori di SRT così stimati sono pari in media a 85 giorni, e variabili nel range compreso tra 40 e 140 giorni, benché questi valori siano da ritenersi solo indicativi dato che le modalità di

campionamento non hanno consentito una buona ripetibilità della misura della concentrazione di biomassa nel reattore.

I parametri operativi principali del reattore SBR vengono complessivamente riassunti nella seguente Tabella 3.3.

Tabella 3.3 - Parametri principali del reattore SBR durante la seconda fase di sperimentazione con refluo reale

parametri operativi	unità di misura	valore
temperatura	°C	36
miscelazione	rpm	100
pH	unità di pH	7÷8
durata complessiva ciclo	h	12
durata fase di alimentazione/reazione	h	9
durata fase di reazione	min	115
durata fase di sedimentazione	min	5
durata fase di scarico	h	1
HRT (d)	d	2.1÷3.1
SRT (d)	d	41÷140
volume minimo-massimo ciclo (L)	L	4.9÷7.0
NLR	g N L ⁻¹ d ⁻¹	0.20÷0.80
concentrazione influente	mg N L ⁻¹	650÷1400
rapporto molare N-NO ₂ ⁻ /N-NH ₄ ⁺ influente	mg N-NO ₂ ⁻ / mg N-NH ₄ ⁺	1.10÷1.25

Nei primi 43 giorni di lavoro la sperimentazione è stata condotta alimentando nell'SBR solamente mezzo sintetico minerale; le concentrazioni di ammonio e nitrito sono state variate aggiustando il NLR mediante dosaggi di sali delle relative specie azotate (NH₄Cl e NaNO₂).

Il carico di azoto totale influente è stato incrementato durante questo periodo da 0.2 a 0.8 g N L⁻¹ d⁻¹ (da giorno 0 a giorno 20), per poi decrescere fino a 0.4 g N L⁻¹ d⁻¹ (da giorno 21 a giorno 43).

In media si è mantenuto un NLR pari a 0.51±0.15 g N L⁻¹ d⁻¹. L'HRT è stato mantenuto costante attorno a 2-3 giorni (HRT medio = 2.47±0.53 d).

Dal giorno 44, l'alimento è stato diluito progressivamente con percentuali crescenti di refluo reale descritto nel par. 5.2.

Dal giorno 44 al giorno 52 l'influente è stato caratterizzato dal 10% in volume di refluo reale. L'attività sperimentale, dopo la pausa estiva durante la quale la miscela di fango è stata mantenuta in cella frigorifera a 4 °C, è ripresa il giorno 70 con mezzo sintetico

minerale al fine di riattivare la popolazione batterica, per poi alimentare nuovamente refluo reale al 10% dal giorno 85 al giorno 90.

Quindi dal giorno 91 la frazione di refluo reale è stata gradualmente incrementata al 25%, 40%, 70% e in conclusione della sperimentazione al 100% (vedi Tabella 3.4).

Il NLR è stato determinato dalla concentrazione delle forme azotate nel refluo reale e dal dosaggio esterno di sali di ammonio e di nitrito, in quantità tali da raggiungere un determinato carico totale di azoto influente compreso tra 0.29 e 0.77 g N L⁻¹ d⁻¹, in media pari a 0.53±0.13 g N L⁻¹ d⁻¹, con una concentrazione totale di azoto influente pari a 1.31±0.26 g N L⁻¹ (nei giorni 77÷169 pari a 1.40 g N L⁻¹). Inoltre, il dosaggio esterno dei sali di azoto ha consentito di regolare il rapporto molare NO₂/NH₄ nell'influento mantenendolo vicino a quello stechiometrico di consumo che caratterizza l'attività anammox (NO₂/NH₄ = 1.10÷1.25, dove lo stechiometrico è pari a 1.32). In Figura 3.16 sono riportati i valori di NLR e le frazioni di refluo reale applicati nel corso della sperimentazione.

Al termine della sperimentazione, il volume complessivo di refluo reale trattato è stato pari a 125L.

Tabella 3.4 - Frazioni di refluo reale alimentato nel corso della sperimentazione

periodo di sperimentazione (d)	frazione di refluo reale alimentata (% v/v)
0 - 43	0
44 - 52	10
53 - 69	sospensione attività
70 - 84	0
85 - 90	10
91 - 106	25
107 - 118	40
119 - 162	70
163 - 169	100
170 - 172	0

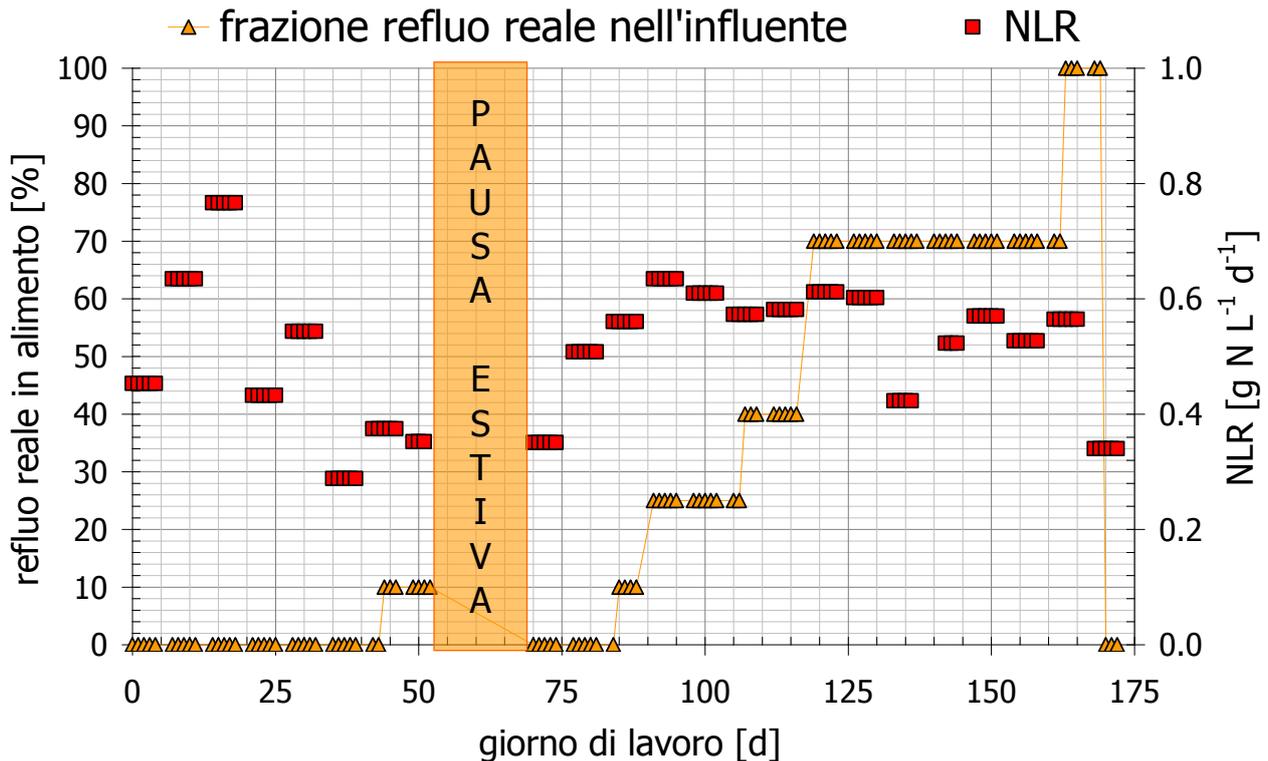


Figura 3.16 - Valori di NLR e della frazione di refluo reale applicati nella sperimentazione

3.6.4 Monitoraggio del processo e calcoli

3.6.4.1 Monitoraggio dell'attività nel reattore SBR

Il reattore SBR è stato monitorato attraverso le seguenti misure analitiche:

- concentrazione delle componenti azotate solubili nell'effluente, con una frequenza di 3-5 volte la settimana (ammonio, nitrito e nitrato in termini di azoto);
- concentrazione di solidi sospesi, totali e volatili, presenti nel reattore (miscela di fango), con una frequenza di 1-2 volte al mese; è importante sottolineare che non è possibile ottenere una stima corretta ed affidabile della concentrazione di solidi contenuti nel reattore, poiché la miscela di fango presenta caratteristiche eterogenee in termini di dimensioni dei granuli, e quindi risulta difficile ottenere campioni rappresentativi della biomassa anammox;
- concentrazione di solidi sospesi, totali e volatili, nell'effluente (scarico del reattore a conclusione di ogni ciclo di lavoro), ogni 2-3 settimane.

Sono inoltre determinati:

- il NRR_{max} (massimo carico di azoto trattabile), attraverso prove di attività in batch ogni 1-2 settimane;
- la natura della biomassa presente nel reattore, attraverso analisi microbiologiche condotte dopo ogni cambio di composizione dell'influente.

Di seguito viene illustrata la modalità adottata per la valutazione del massimo carico di azoto trattabile.

3.6.4.1.1 Valutazione del massimo carico di azoto trattabile (NRR_{max})

Il test di attività su popolazione batterica anammox consiste nella misura dell'attività della popolazione anammox presente all'interno del reattore SBR, utile per valutare il rapporto tra carico alimentato e la potenzialità massima degli anammox, oltre che per effettuare valutazioni sui carichi di lavoro da apportare per i successivi cicli.

Il test di attività viene effettuato direttamente all'interno del reattore SBR e non su un sottocampione di biomassa da questo estratta visto che la disomogeneità del fango granulare impedisce un campionamento omogeneo e rappresentativo. Il test viene effettuato impostando il reattore in modalità manuale, la temperatura a 36 °C e l'agitazione a 100 rpm.

La prova si avvia con un dosaggio impulsivo di un certa quantità di $N-NO_2^-$ e $N-NH_4^+$ per portare la concentrazione iniziale di ammonio e nitrito a $50\div 70$ mg N L^{-1} di $N-NH_4^+$ e $N-NO_2^-$. Dopo di ché vengono prelevati, ogni 10-30 min, 3-4 campioni di mixed liquor, di cui si analizzano le concentrazioni delle forme azotate.

I risultati del test di attività consistono nei dati di concentrazione delle forme azotate $N-NO_2^-$ e $N-NH_4^+$ nel tempo; questi possono essere interpolati con una retta, la cui pendenza rappresenta il consumo nel tempo di azoto, come ammonio, nitrito od azoto totale (vedi Figura 3.17). Questa pendenza, espressa in mg N $L^{-1} min^{-1}$ rappresenta il carico di azoto massimo trattabile, indicato come NRR_{max} (Maximum Nitrogen Removal Rate). Da questo risultato si passa al consumo in massa di azoto totale nel tempo moltiplicando per il volume di reazione, che rappresenta il carico massimo di azoto trattabile dalla popolazione batterica, generalmente espresso in g N giorno⁻¹.

Rapportando poi il carico di azoto effettivo, con il carico massimo trattabile, si ottiene la percentuale a cui si sta spingendo l'attività rispetto alle potenzialità massime attuali degli anammox.

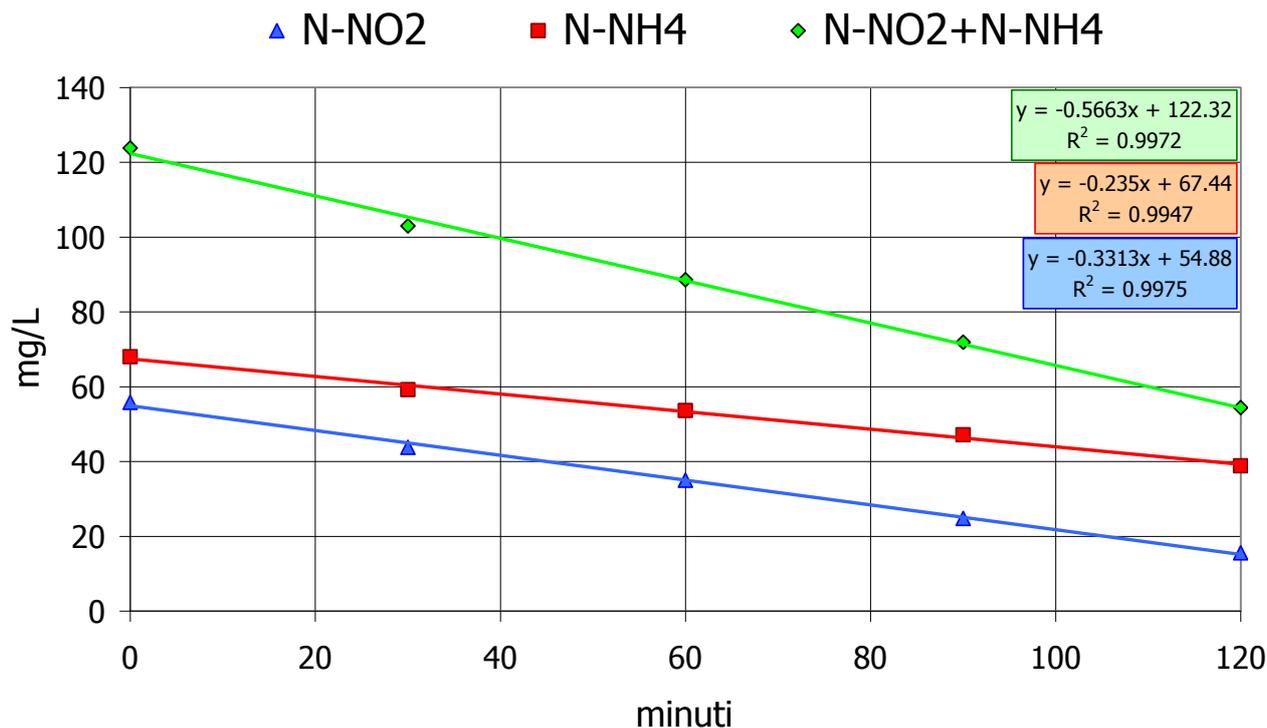


Figura 3.17 - Concentrazione delle specie azotate presenti nel reattore SBR nell'unità di tempo durante una prova di attività; i dati analitici (punti singoli) sono stati interpolati per fornire il rateo di rimozione delle singole specie e di quello complessivo

Oltre a questa valutazione è possibile analizzare il consumo singolo di N-NO₂⁻ nel tempo e il consumo singolo di N-NH₄⁺ nel tempo; il loro rapporto può essere utilmente confrontato con il rapporto stechiometrico di rimozione, pari a N-NO₂⁻/N-NH₄⁺ = 1.32. Questo parametro può consentire di dedurre eventuali reazioni concorrenti al processo biologico anammox.

Nel caso infatti di valori del rapporto superiori a 1.32, la possibile reazione concorrente di denitrificazione può portare alla sovrastima dell'attività anammox (per consumo di nitrito da parte della popolazione eterotrofa denitrificante), e ciò contribuirebbe al rateo complessivo di rimozione dell'azoto. In questo è necessario calcolare il NRR_{max} a partire dalla rimozione massima dell'ammonio (NH_4RR_{max} , non modificata dall'attività denitrificante):

$$NRR_{max} = NH_4RR_{max} + 1.32 \cdot NH_4RR_{max}$$

con NH_4RR_{max} , ricavato per interpolazione dei dati di concentrazione di N-NH₄⁺.

3.6.4.2 Calcolo dei parametri di caratterizzazione dell'attività

I parametri fondamentali che si è reso necessario calcolare per il monitoraggio attivo dell'attività biologica anammox nel reattore SBR sono i seguenti:

- NRR (Nitrogen Removal Rate);
- rateo di rimozione di ammonio e nitrito;

- rateo di produzione di nitrato;
- rapporto molare $\text{N-NO}_2^-_{\text{rimosso}}/\text{N-NH}_4^+_{\text{rimosso}}$, confrontato con la stechiometria dell'attività anammox;
- rapporto molare $\text{N-NO}_3^-_{\text{prodotto}}/\text{N-NH}_4^+_{\text{rimosso}}$, confrontato con la stechiometria dell'attività anammox;
- rapporto NRR/NLR di efficienza dell'attività anammox;
- attività specifica anammox.

La descrizione delle modalità di calcolo dei parametri elencati viene illustrata in dettaglio nel precedente par. 3.5.3.2.

3.6.4.3 Verifica dell'apporto anammox al processo di rimozione

Per quanto riguarda la descrizione teorica del contributo della popolazione anammox al processo di rimozione dell'azoto, si rimanda al precedente par. 3.5.3.3 essendo la trattazione del tutto simile.

4 Risultati

La sperimentazione del processo biologico anammox per la rimozione di specie azotate in reattore SBR è stata suddivisa e condotta in due fasi successive. La prima fase ha comportato il trattamento biologico di refluo sintetico, costituito da mezzo sintetico minerale addizionato con sali di ammonio e nitrito (rispettivamente NH_4Cl e NaNO_2); la seconda fase ha riguardato il trattamento biologico della frazione liquida di digestato agricolo, dopo parziale nitrificazione, in percentuale progressivamente crescente sul totale del refluo alimentato nel ciclo di lavoro dell'SBR.

L'obiettivo della prima fase di sperimentazione è stato la verifica dei tempi di accrescimento ed acclimatazione degli anammox, mentre nella seconda fase si è cercato di valutare l'adattabilità degli anammox al refluo reale.

Nel presente capitolo vengono illustrati i risultati ottenuti dalle singole fasi di sperimentazione.

4.1 Arricchimento anammox in reattore SBR

4.1.1 Qualità dell'effluente ed efficienza del processo

La valutazione dei risultati relativi alla sperimentazione si basa sull'analisi dei valori di rimozione delle specie azotate ottenuti, confrontando le concentrazioni ed i carichi di azoto in ingresso ed in uscita al reattore, e determinando quindi l'efficienza di rimozione e l'attività specifica della popolazione anammox (in funzione dei solidi sospesi volatili presenti nella miscela di fango, vedi par. 4.1.2).

In Figura 4.1 vengono riportate le concentrazioni delle specie azotate di interesse (ammonio, nitrito e nitrato) relative all'effluente dell'SBR, e confrontate con le concentrazioni delle stesse nell'alimento in ingresso al reattore.

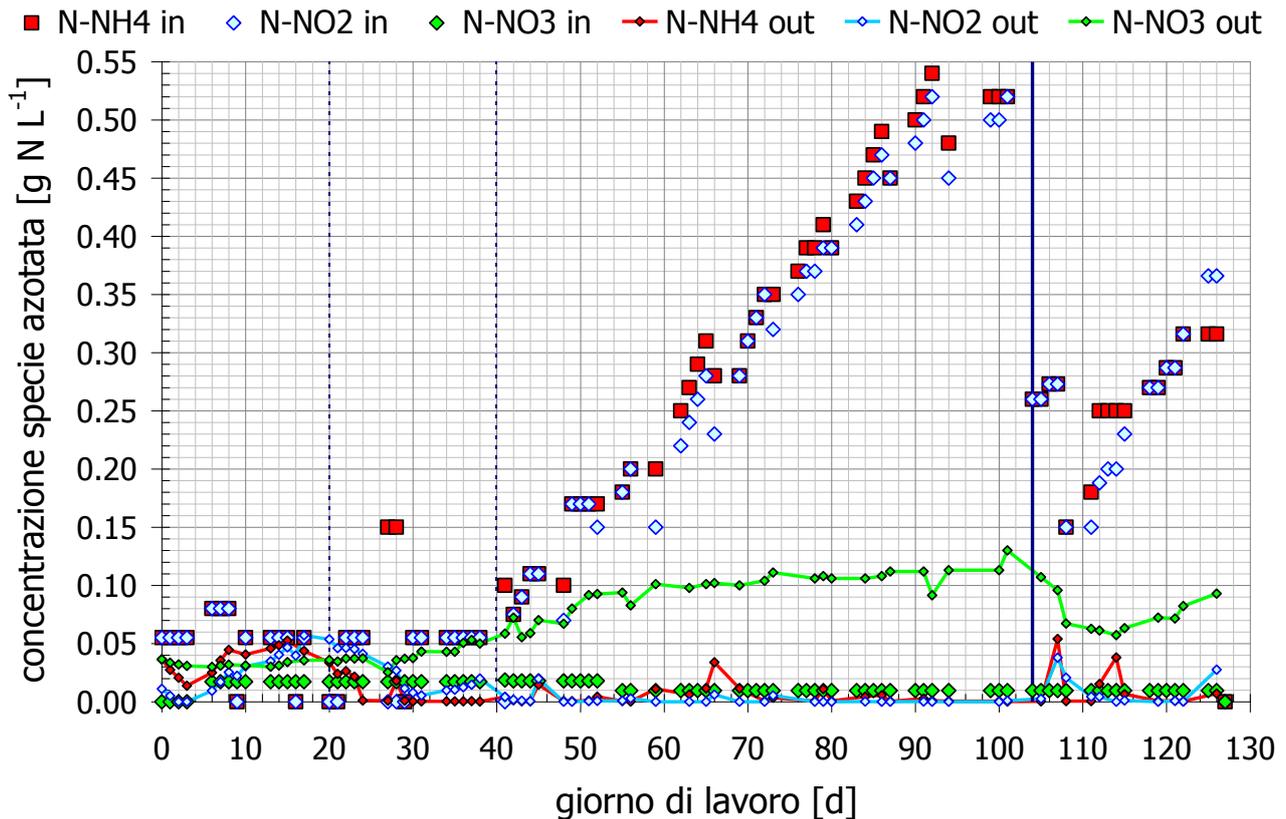


Figura 4.1 - Concentrazioni delle specie azotate nell'effluente, confrontate con l'influenza

Le concentrazioni delle forme azotate nell'influenza, tra il giorno 0 e 20, sono state pari a 55 mg N L^{-1} sia in termini di N-NH_4^+ che di N-NO_2^- , mentre i valori di ammonio e nitrito nell'effluente in uscita dal reattore sono stati in media rispettivamente $36 \pm 12 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ e $26 \pm 19 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. L'accumulo nel reattore di più della metà dell'ammonio e del nitrito alimentati suggerisce che l'attività anammox è stata molto bassa. Questa fase di lag iniziale potrebbe essere dovuta all'adattamento della biomassa anammox alle condizioni di lavoro.

Il comportamento iniziale appena descritto è usuale nelle sperimentazioni di arricchimento di biomassa anammox, come citato da Chamchoi et al. (2007), ed è causato sia dalla necessaria acclimatazione della popolazione batterica che dall'eventuale presenza di ossigeno nel reattore che comporta la produzione di nitrito da parte dei batteri AOB. Questo aspetto è stato analizzato valutando la percentuale di conversione dell'ammonio dovuta all'attività anammox, rispetto alla rimozione totale dello stesso, verificando quindi l'apporto anammox al processo di rimozione complessivo, con modalità specificate nel par. 3.5.3.3.

La stima della produzione di N-NO_3^- , ricavata dal sistema proposto nel par. 3.5.3.3 (con il nitrato quale parametro di verifica della correttezza dell'analisi), presenta uno scostamento pari a $24 \pm 42 \text{ mg d}^{-1}$ rispetto alla misura sperimentale, su valori di produzione mediamente di un ordine di grandezza superiori (produzione sperimentale media pari a $109 \pm 40 \text{ mg d}^{-1}$); si può quindi considerare in prima approssimazione corretto il sistema utilizzato e le stime sulla rimozione di ammonio da attività anammox; si nota inoltre una maggiore tendenza a sottostimare la produzione. I risultati relativi al contributo dei batteri

anammox alla rimozione complessiva dell'ammonio, ottenuti risolvendo il sistema semplificato che considera solo AOB e anammox, vengono illustrati in Figura 4.2.

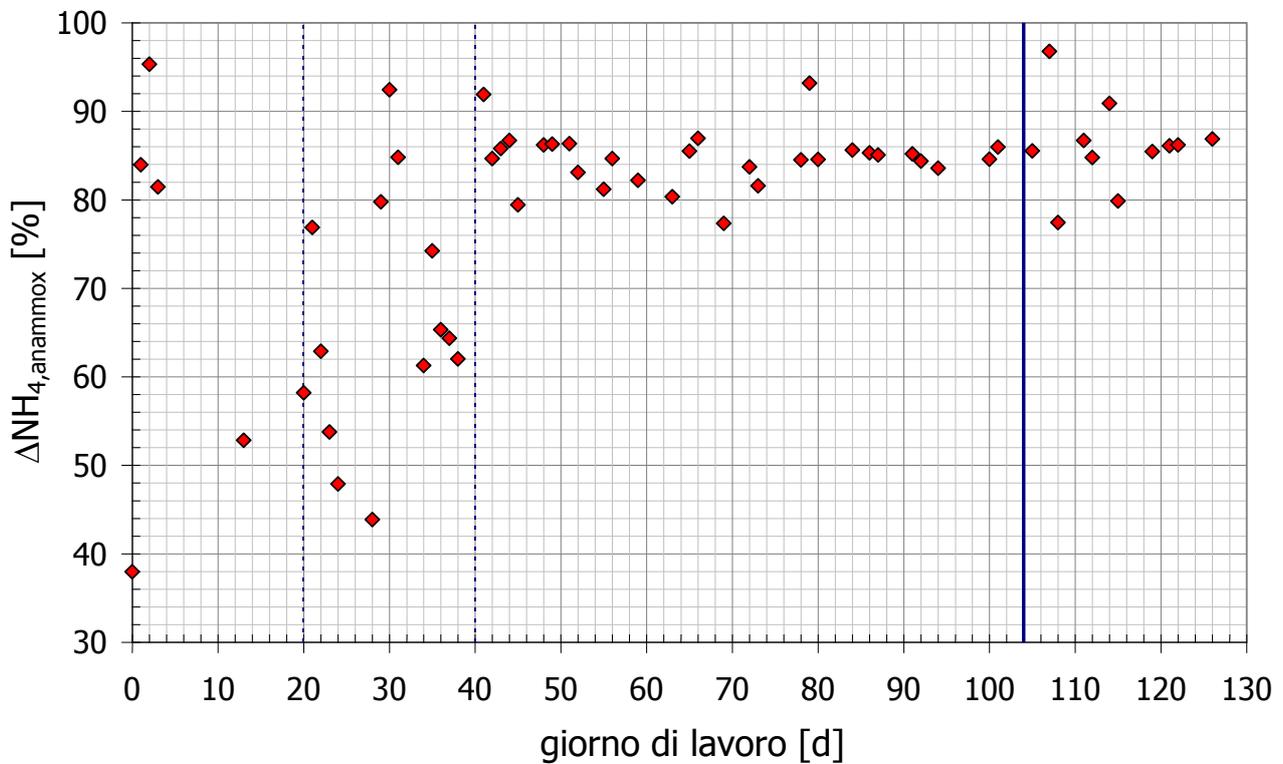


Figura 4.2 - Percentuale di conversione dell'ammonio dovuta ad attività anammox

Si è ottenuta una percentuale di conversione pari a $50 \pm 10\%$ sui primi 20 giorni, cioè durante la fase di lag, e pari a $64 \pm 15\%$ sui primi 40 giorni (fase a basso e costante NLR, in media $0.015 \pm 0.009 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

In seguito le concentrazioni di ammonio e nitrito nell'effluente sono rapidamente diminuite (tra il giorno 21 ed il giorno 28) e sono rimaste stabili (dal giorno 29) rispettivamente intorno a valori di $5 \pm 8 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ e $4 \pm 8 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, mentre il contenuto di ammonio e nitrito nell'inflente è stato progressivamente aumentato fino a 520 mg N L^{-1} (dal giorno 41 al giorno 103). In questo periodo la percentuale di conversione dell'ammonio dovuta ad attività anammox è del $85 \pm 3\%$.

La concentrazione di nitrati nell'effluente, tra il giorno 29 ed il giorno 61, è incrementata rapidamente da $37 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ a $101 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, confermando l'intensificazione dell'attività anammox nel reattore; la concentrazione è aumentata ulteriormente fino a $130 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, anche se più lentamente, dal giorno 62 al giorno 103.

In Figura 4.3 sono riportati i valori applicati di NLR ed i risultati ottenuti di NRR nel corso della sperimentazione. Nei primi 40 giorni di lavoro il NRR si è mantenuto su valori limitati, con un massimo registrato il giorno 29 pari a $0.029 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; l'efficienza di rimozione dell'azoto solubile è stata in media pari al $40.1 \pm 25.3\%$ sull'azoto totale ed al $64.9 \pm 31.1\%$ su ammonio e nitrito. Dopo i primi 40 giorni di bassa attività, il NRR è cresciuto di circa 17 volte in 80 giorni, partendo da $0.013 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e raggiungendo i $0.22 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

L'efficienza di rimozione dell'azoto solubile dopo 40 giorni, considerando tutte le forme azotate nel complesso (ammonio, nitrito, nitrato), è risultata essere in media pari a $82.1 \pm 11.6\%$, mentre la rimozione di soli ammonio e nitrito è stata del $95.9 \pm 5.7\%$. In questo periodo la percentuale di conversione dell'ammonio dovuta ad attività anammox è del $86 \pm 5\%$. Da notare che valori di rapporto percentuale NRR/NLR superiori al 100%, presenti nel grafico, sono da considerare coerenti con la definizione dei due parametri NRR e NLR, in quanto si tiene conto anche dell'accumulo e del decumulo delle specie azotate nel reattore SBR; per questo motivo risultati superiori al 100% non sono da intendersi come un'efficienza più elevata rispetto a tale percentuale (non coerente, essendo il valore massimo riscontrabile di attività), bensì come una rimozione completa del carico alimentato ($\text{NRR/NLR}=100\%$) oltre che dell'azoto accumulatosi in precedenza.

I valori di NLR e NRR raggiunti sono confrontabili con quelli riportati in altre sperimentazioni. Ad esempio, come riportato da Lopez et al. (2008), durante una sperimentazione di arricchimento anammox eseguita in reattore SBR, si è verificata la possibilità di incrementare il NLR da 0.02 a $0.25 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in 147 giorni.

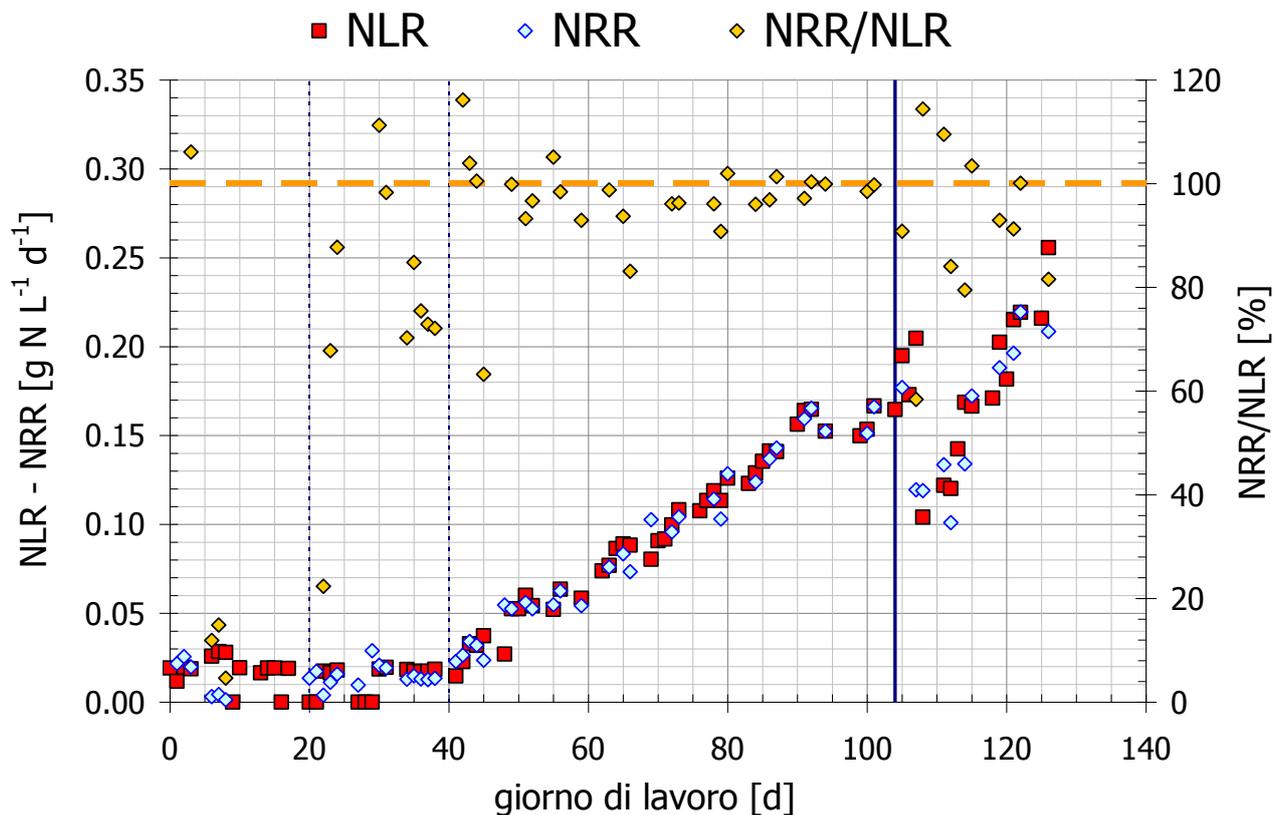


Figura 4.3 - NRR e NLR a confronto; viene specificato il rapporto percentuale tra i parametri

In Figura 4.4 sono riportati i rapporti molari sperimentali rimossi, relativi al N-NO_2^- rimosso sul N-NH_4^+ rimosso ed al N-NO_3^- prodotto sul N-NH_4^+ rimosso, confrontati con i valori stechiometrici indicati da Strous et al. (1998); in Figura 4.5 viene confrontato il rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_2^-/\Delta\text{N-NH}_4^+$ tra l'influente al reattore ed il rapporto di rimozione delle specie. Nella fase iniziale della sperimentazione, tra il giorno di lavoro 0 e 40, il rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_2^-/\Delta\text{N-NH}_4^+$ rimosso è risultato essere distante dal valore stechiometrico indicato da

Strous et al. ($0.66 \pm 0.33 \text{ g N g N}^{-1}$), a causa della bassa attività anammox. Considerando infatti il rapporto nell'influente costante ($\Delta\text{N-NO}_2^-/\Delta\text{N-NH}_4^+=1$), se si analizza la differenza con il rapporto delle specie rimosse (Figura 4.5), si nota una notevole variabilità dei valori sperimentali ottenuti, dovuta nei primi 20 giorni agli accumuli di ammonio e nitrito occorsi (alcuni rapporti sono più alti dello stechiometrico), e dal giorno 21 al giorno 40 a causa della lenta attivazione del processo di rimozione.

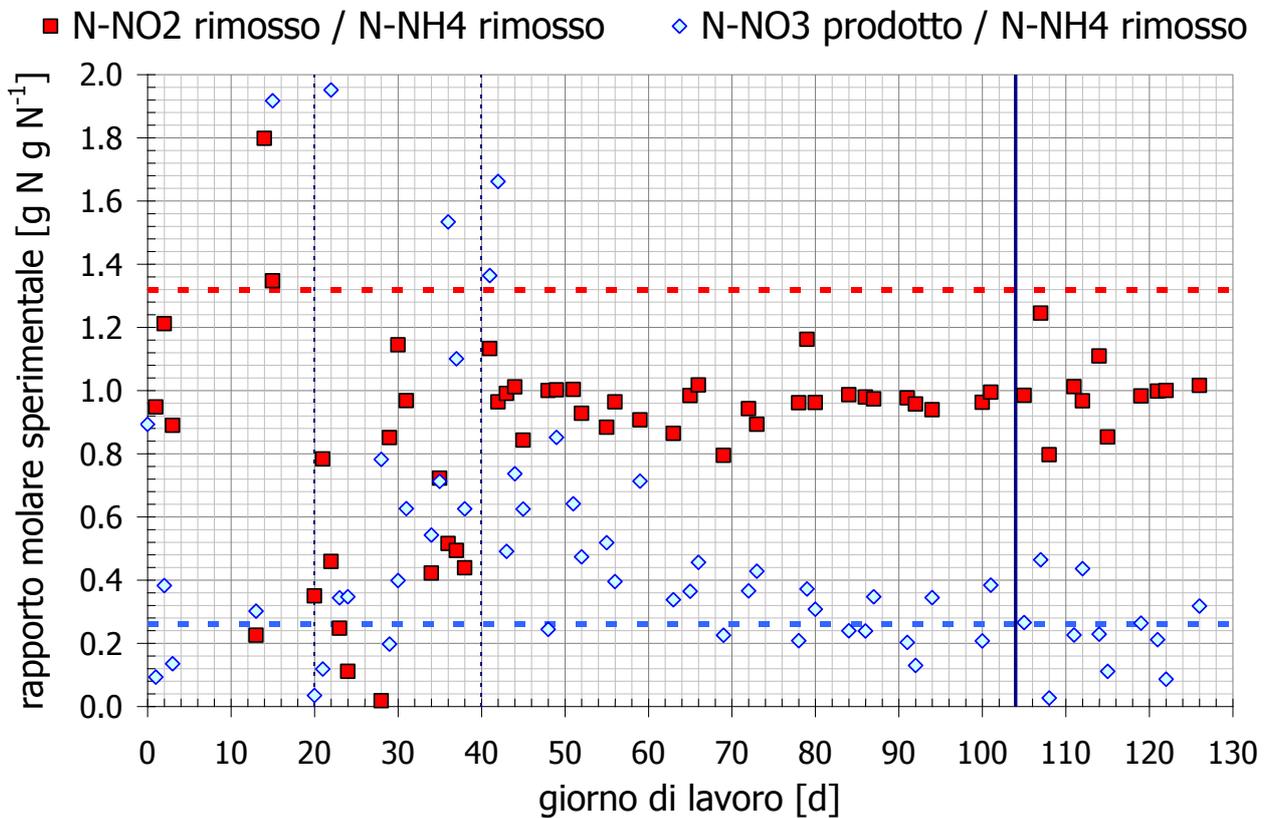


Figura 4.4 - Rapporti molarali sperimentali N-NO₂/N-NH₄ e N-NO₃/N-NH₄ rimossi

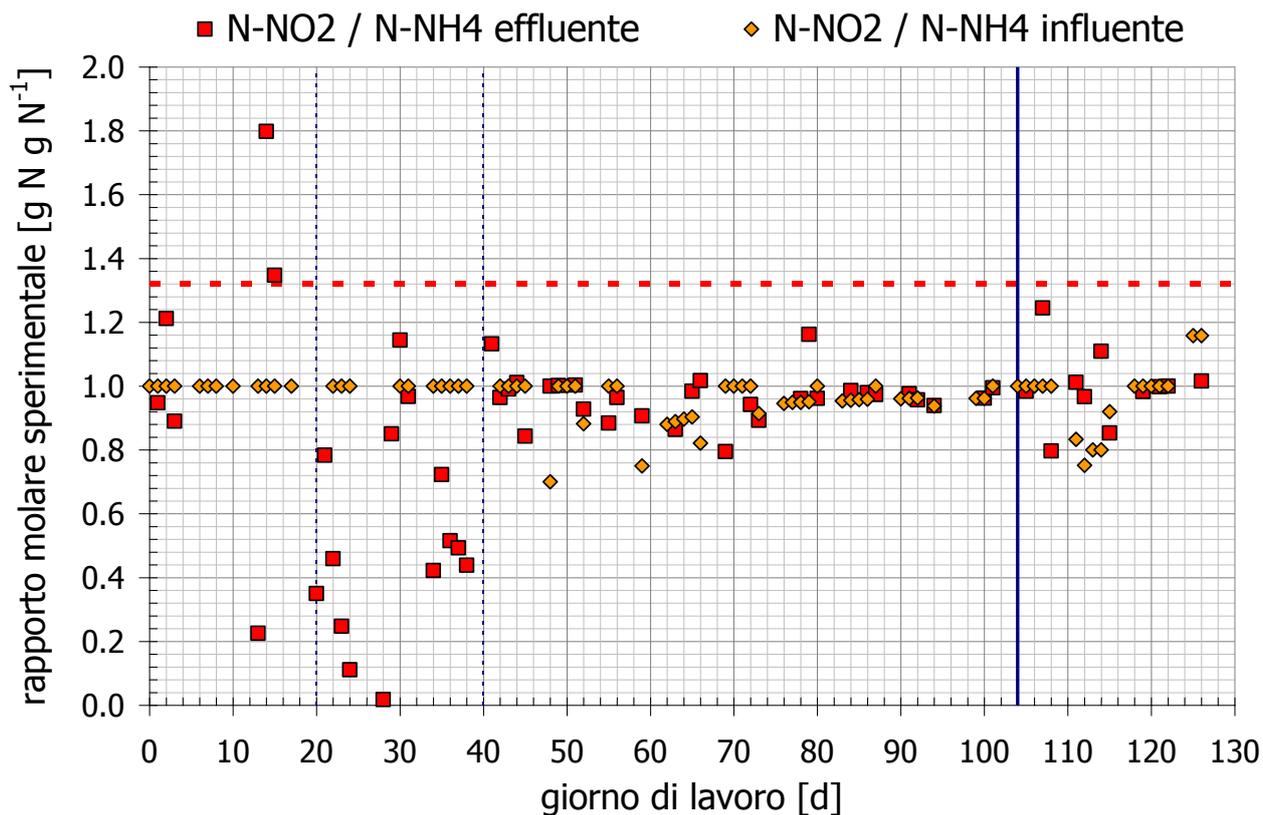


Figura 4.5 - Rapporto molare sperimentale N-NO₂/N-NH₄ rimosso e nell'influente

Dal giorno 41 fino a conclusione del primo periodo della sperimentazione (giorni di lavoro 41-103) il rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_2/\Delta\text{N-NH}_4^+$ nell'effluente è rimasto stabile intorno a 1 ($0.96 \pm 0.07 \text{ g N g N}^{-1}$), vicino al rapporto molare dell'alimento in ingresso al reattore. Questo valore è inferiore al valore stechiometrico anammox di 1.32, e potrebbe essere connesso ad una presenza di batteri che AOB, come accennato in precedenza, i quali comportano la conversione di parte dell'ammonio presente in nitrito (possibile presenza di ossigeno).

Nel secondo periodo di sperimentazione, dal giorno 104 al giorno 127, il rapporto molare analizzato in uscita dall'SBR si è mantenuto in linea con i valori precedenti, in media pari a $1.00 \pm 0.12 \text{ g N g N}^{-1}$.

Per quanto riguarda il rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_3^-/\Delta\text{N-NH}_4^+$ nell'effluente (Figura 4.6), esso ha presentato un'elevata variabilità fino al giorno 40 ($0.58 \pm 0.52 \text{ g N g N}^{-1}$), con valori nettamente superiori allo stechiometrico ($0.26 \text{ g N g N}^{-1}$), per diminuire progressivamente tendendo verso il giorno 70 al valore stechiometrico indicato da Strous et al. (1998); dal giorno 70 il rapporto ha assunto valori in media pari a $0.28 \pm 0.11 \text{ g N g N}^{-1}$.

4.1.2 Attività specifica anammox

A partire dai valori di NRR raggiunti nel corso della sperimentazione e dalla concentrazione di solidi sospesi volatili presenti nel reattore, l'attività specifica anammox (SAA) è stata stimata utilizzando la formula riportata nel par. 3.5.3.2.

La concentrazione dei solidi sospesi totali, relativi alla miscela di fango presente nell'SBR, è diminuita nel corso della sperimentazione da 0.56 a 0.45 g TSS L⁻¹ (0.46±0.08 g TSS L⁻¹), mentre la concentrazione dei solidi sospesi volatili è lievemente aumentata passando da 0.30 a 0.35 g VSS L⁻¹ (0.30±0.07 g VSS L⁻¹); la frazione di volatili rispetto ai totali presente nel reattore è aumentata notevolmente dal 53 al 78%, a sottolineare la crescita batterica. La concentrazione di solidi nell'effluente è rimasta piuttosto stabile nel corso della sperimentazione, intorno a valori pari a 15.0±5.0 mg TSS L⁻¹ e 10.9±4.3 mg VSS L⁻¹, anche se la fase di sedimentazione è stata ridotta progressivamente da 30 a 25 minuti (dal giorno 41) fino a 20 minuti (dal giorno 56); ciò conferma le buone caratteristiche di sedimentabilità del fango sospeso.

In Figura 4.6 vengono rappresentate le concentrazioni dei solidi misurate sia sull'effluente che nel mixed liquor del reattore SBR; viene inoltre mostrata la frazione di volatili raggiunta nella miscela di fango.

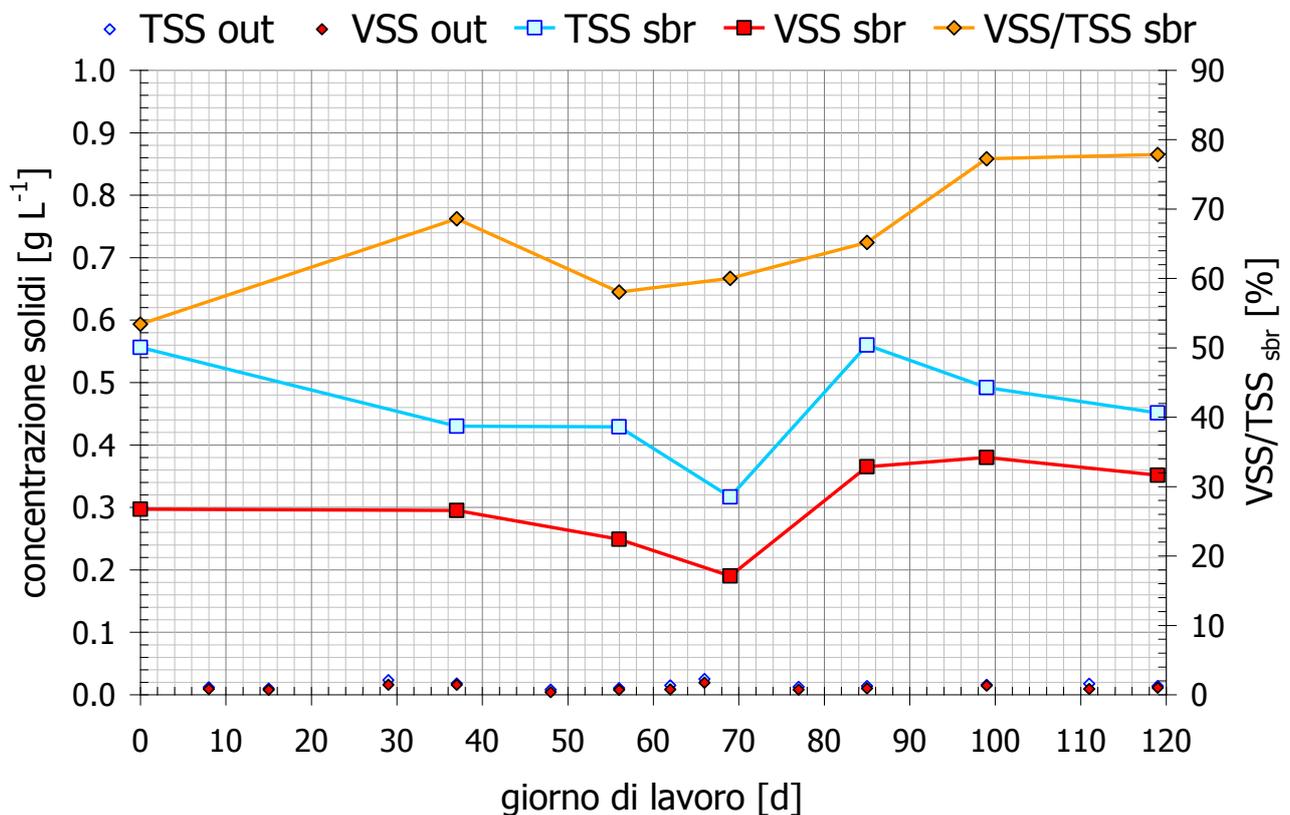


Figura 4.6 - Concentrazione dei solidi sospesi nell'effluente e nella miscela di fango; con il pedice "out" si indica l'effluente del reattore, con il pedice "sbr" si fa riferimento al mixed liquor

La SAA nel corso della sperimentazione è aumentata da 0.037 a 0.580 g N g VSS⁻¹ d⁻¹ (Figura 4.7), considerando come specie azotate rimosse l'ammonio ed il nitrito. La crescita di circa 16 volte rispetto all'inizio del lavoro conferma che la frazione di anammox nella miscela di fango è aumentata nel tempo, in accordo con i valori mostrati in Figura 4.2 relativi alla percentuale di rimozione dell'ammonio per attività anammox; in ogni

caso potrebbe aver avuto luogo un fenomeno concorrente di riattivazione di batteri, già esistenti in precedenza nella miscela di fango.

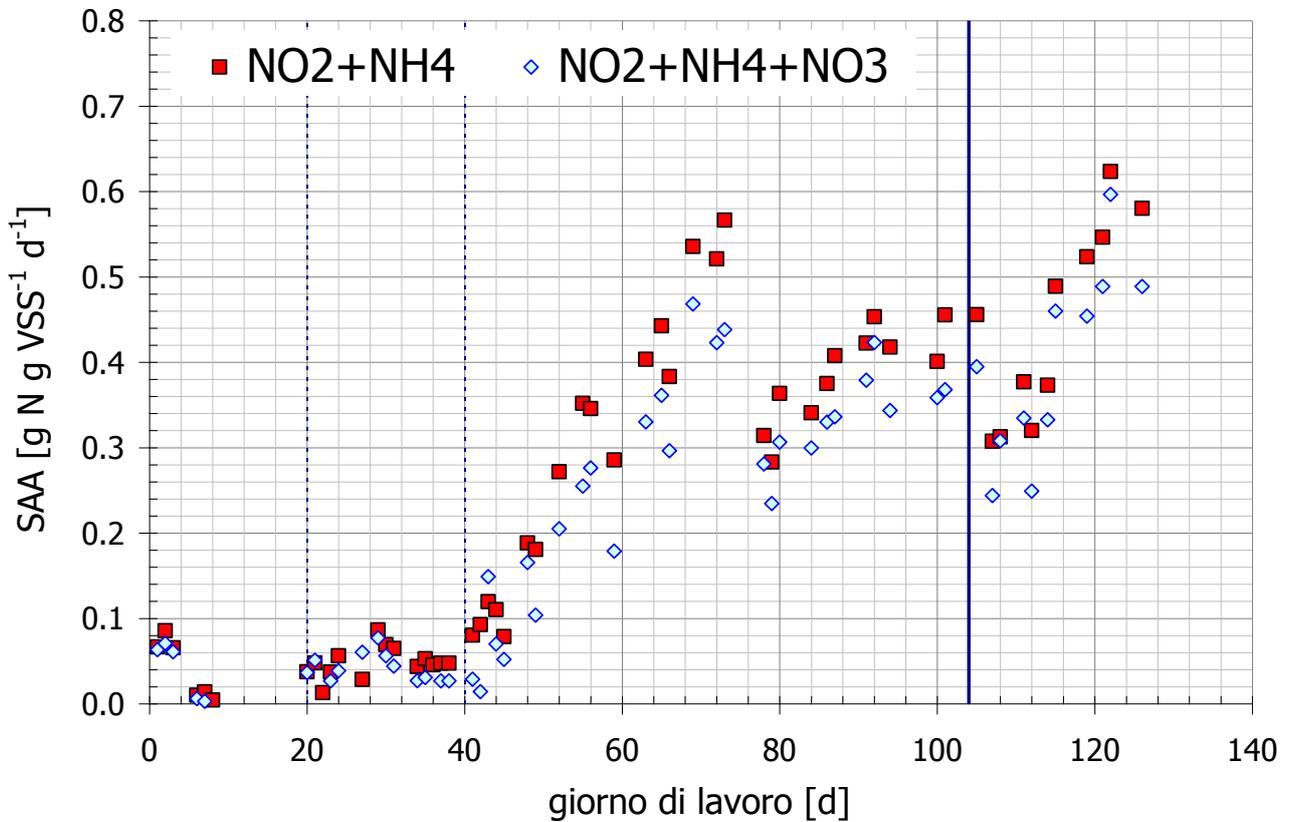


Figura 4.7 - Attività specifica anammox nel corso della sperimentazione, differenziata a seconda delle specie azotate considerate nel calcolo della stessa

4.1.3 Riscontri da analisi microbiologiche FISH

Per verificare la presenza di microrganismi anammox all'interno della miscela di fango in arricchimento (suggerita dal consumo osservato di nitrito ed ammonio e dalle prove di attività), sono state condotte delle prove FISH sulle colture arricchite. Per i campioni analizzati si osservano fiocchi di fango all'interno dei quali sono presenti dei raggruppamenti che vanno da poche (4-5) a diverse decine di cellule anammox.

Dal confronto tra i risultati ottenuti con le sonde utilizzate (sonda BAN162 - sonde EUB338I+EUB338II+EUB338III) si deduce che gli Anammox presenti siano in grandissima maggioranza *Candidatus Brocadia anammoxidans*.

In Figura 4.8 si riportano a titolo esemplificativo alcune fotografie relative alle analisi FISH condotte.

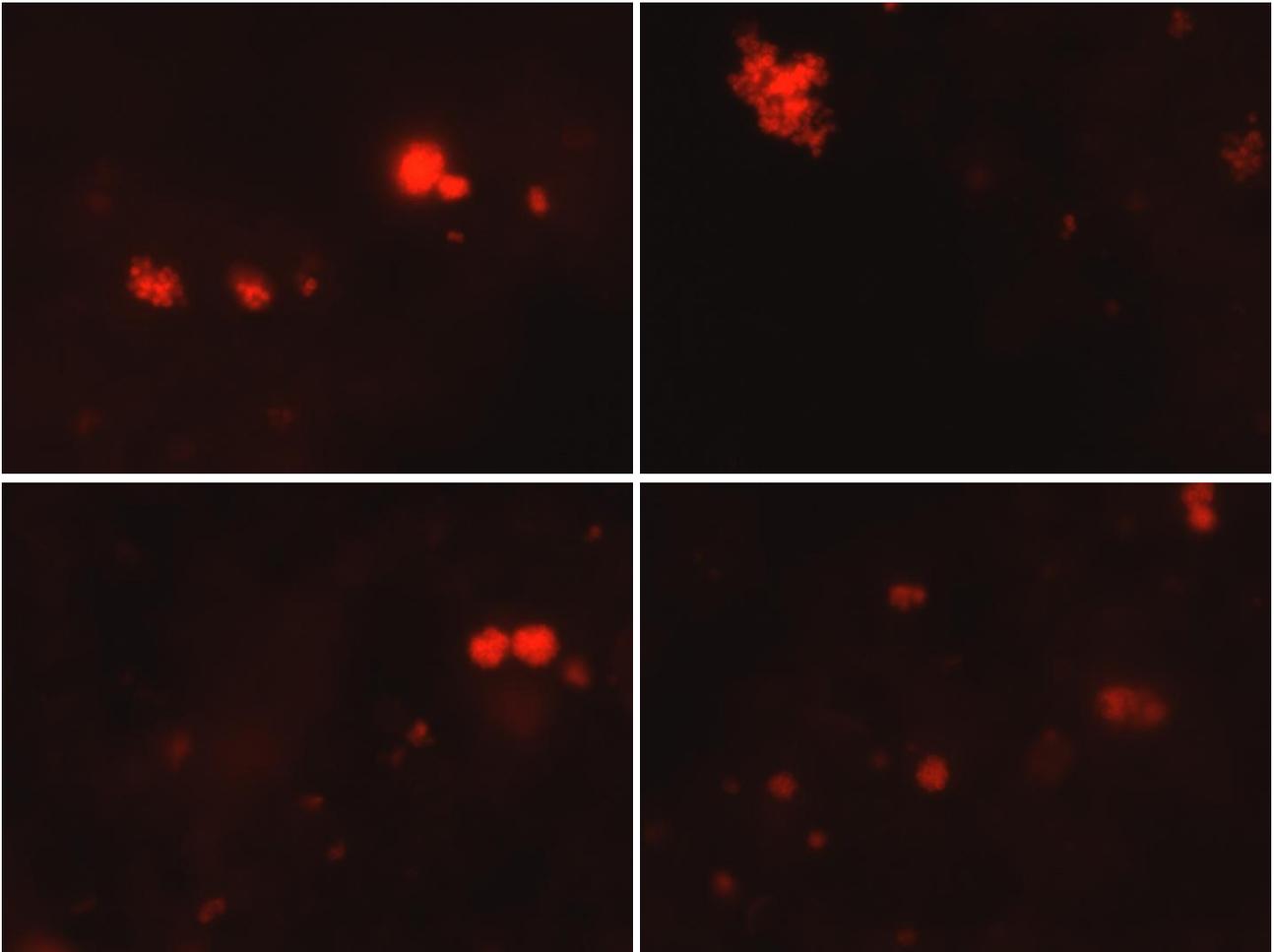


Figura 4.8 - Immagini esemplificative FISH relative al Candidatus "Brocadia anammoxidans"

4.2 Trattamento della frazione liquida di digestato agricolo in reattore SBR attraverso processo biologico anammox

La fase di sperimentazione sul digestato agricolo ha comportato un'attività principale, consistente nel trattamento del refluo reale nel reattore SBR, e attività complementari propedeutiche alla stessa, quali:

- test di attività della popolazione anammox direttamente sul reattore SBR (miscela di fango), per valutare il carico massimo di azoto attuale trattabile dalla biomassa ed impostare il NLR dei cicli successivi (vedi par. 3.6.4.1.1);
- test di inibizione in batch, a scala inferiore rispetto al reattore SBR, per verificare l'effetto di inibizione di un determinato refluo reale su un campione di biomassa anammox prelevato dall'SBR (vedi par. 3.4.2).

Nei paragrafi successivi vengono presentati i risultati ottenuti dalla sperimentazione.

4.2.1 Test manometrici in batch

Nel corso della sperimentazione sono state svolte complessivamente 5 prove di inibizione, in parallelo all'attività sul reattore SBR, di durata mediamente compresa tra 1 e 3 settimane. In Tabella 4.1 sono illustrate le caratteristiche delle prove di inibizione (refluo reale abbreviato con "r.r.").

Tabella 4.1 - Caratteristiche delle prove

prova di inibizione	giorno di lavoro SBR corrispondente	campione	tipologia contenuto				
			1° dosaggio	2° dosaggio	3° dosaggio	4° dosaggio	5° dosaggio
1	9÷30	1	sintetico	sintetico	sintetico	sintetico	sintetico
		2	sintetico	25% r.r.	25% r.r.	25% r.r.	25% r.r.
2	37÷44	1	sintetico	sintetico	sintetico	-	-
		2	sintetico	10% r.r.	10% r.r.	-	-
3	112÷115	1	25% r.r.	60% r.r.	60% r.r.	60% r.r.	-
		2	25% r.r.	25% r.r.	25% r.r.	25% r.r.	-
		3	25% r.r.	100% r.r.	100% r.r.	100% r.r.	-
4	120÷126	1	40% r.r.	40% r.r.	70% r.r.	-	-
		2	40% r.r.	70% r.r.	70% r.r.	-	-
		3	40% r.r.	70% r.r.	70% r.r.	-	-
5	127÷133	1	70% r.r.	70% r.r.	70% r.r.	-	-
		2	70% r.r.	85% r.r.	85% r.r.	-	-
		3	70% r.r.	70% r.r.	85% r.r.	-	-

Il primo aspetto fondamentale di una prova di inibizione, come già accennato in precedenza, è la necessità di avere condizioni omogenee di lavoro, ossia lo stesso quantitativo di biomassa di partenza per ogni campione utilizzato, al fine di consentire analisi comparative coerenti. Si è reso perciò necessario analizzare la variabilità del rateo sperimentale di produzione di azoto gas, tra i campioni avviati in parallelo nella medesima prova, prima della sostituzione del mezzo liquido di partenza con il refluo reale; (vedi par. 3.4.2).

Nella seguente Tabella 4.2 vengono elencate le caratteristiche iniziali delle prove condotte, prima del cambio del mezzo con il refluo reale.

Tabella 4.2 - Analisi del primo ciclo di lavoro delle prove

prova di inibizione	periodo primo dosaggio	campione	produzione N ₂ [mL]	variabilità produzione	rateo di produzione N ₂ [mL h ⁻¹]	variabilità rateo
1	22-24 giugno 2011	1	55.87	2.00%	3.568	0.74%
		2	57.47		3.531	
2	20-22 luglio 2011	1	19.49	10.39%	0.730	7.75%
		2	22.58		0.815	
3	3-4 ottobre 2011	1	28.40	8.82%	5.645	2.60%
		2	33.89		5.785	
		3	31.68		5.491	
4	11-12 ottobre 2011	1	16.38	21.64%	1.952	23.43%
		2	24.48		3.008	
		3	24.65		3.066	
5	18-19 ottobre 2011	1	45.36	0.83%	4.152	10.34%
		2	45.62		3.468	
		3	44.88		3.509	

Come si nota dai valori di variabilità sul rateo di produzione ottenuti, in alcuni casi si hanno condizioni di lavoro di partenza omogenee come nella prova 1 e 3; nella prova 2 si nota una maggiore variabilità tra i campioni di biomassa.

Al contrario nelle prove 4 e 5 la differenza è marcata, il che non consente un'efficace comparazione successiva tra le prove. In realtà la variabilità non riguarda in generale tutti i 3 campioni in esame, ma nello specifico il primo rispetto ai restanti; difatti se si valuta la variabilità di produzione di N₂ nelle suddette prove, escludendo il campione 1, si ha:

- nella prova 4, una variabilità pari al 1.35%
- nella prova 5, una variabilità pari al 0.84%

Questa analisi può indicare per la prova 5 la presenza di condizioni di lavoro non ottimali, come ad esempio un più lento raggiungimento della temperatura ideale nel sistema o la presenza di ossigeno nella miscela di fango, dato che la produzione complessiva di N₂ a fine prova è pressoché la stessa per tutti i campioni; sembra quindi difficile attribuire la causa ad una perdita nel setto delle bottiglie. Al contrario, nella prova 4, è probabile una perdita di gas verso l'esterno dato che la produzione complessiva del campione 1 è decisamente inferiore agli altri campioni, i quali presentano la medesima produzione di N₂; lo stesso si verifica in modo più lieve nella prova 2.

Quindi si può constatare che le prove 1 e 3 sono rappresentative e consentono analisi comparative successive, mentre le restanti possono dare informazioni importanti se si confrontano tra loro solo i valori dei campioni con rateo similare (es. confronti dell'effetto inibente in funzione del refluo alimentato).

Le prove sono state strutturate al fine di verificare preventivamente l'effetto inibente del refluo reale sull'attività, in vista dell'applicazione sul reattore SBR (vedi Tabella 4.1).

Da notare che in ogni prova è presente un campione "in bianco", e i restanti sono caratterizzati da % differenti di refluo reale; dalla terza prova in poi si sceglie di volta in volta, come condizione di riferimento del campione in bianco, la % di refluo reale utilizzato

nella prova precedente e già applicata all'SBR, che è la base da cui incrementare l'inibizione, e non più solo mezzo sintetico minerale.

Le prime due prove sono state strutturate per determinare la fattibilità del passaggio nel reattore SBR da mezzo sintetico minerale a refluo reale, decidendo con quale percentuale lavorare inizialmente e con quale carico complessivo di azoto, in funzione della SAA osservata. In quest'ottica nella prima prova è stata testata l'influenza a lungo termine (15 giorni di durata) di refluo reale in percentuale pari al 25%, a confronto con l'attività su un campione mantenuto in "bianco"; nella seconda prova si è monitorato l'effetto del 10% di refluo in volume (7 giorni di durata).

La prima prova si è svolta in 15 giorni, con 5 dosaggi successivi equamente suddivisi (50 mg di N-NO_2^- e N-NH_4^+ nei primi 4 dosaggi, 30 mg al 5° dosaggio, corrispondenti a concentrazioni rispettivamente pari a circa 56 mg L^{-1} e 33 mg L^{-1}).

L'andamento della produzione di N_2 per i singoli campioni è rappresentato in Figura 4.9.

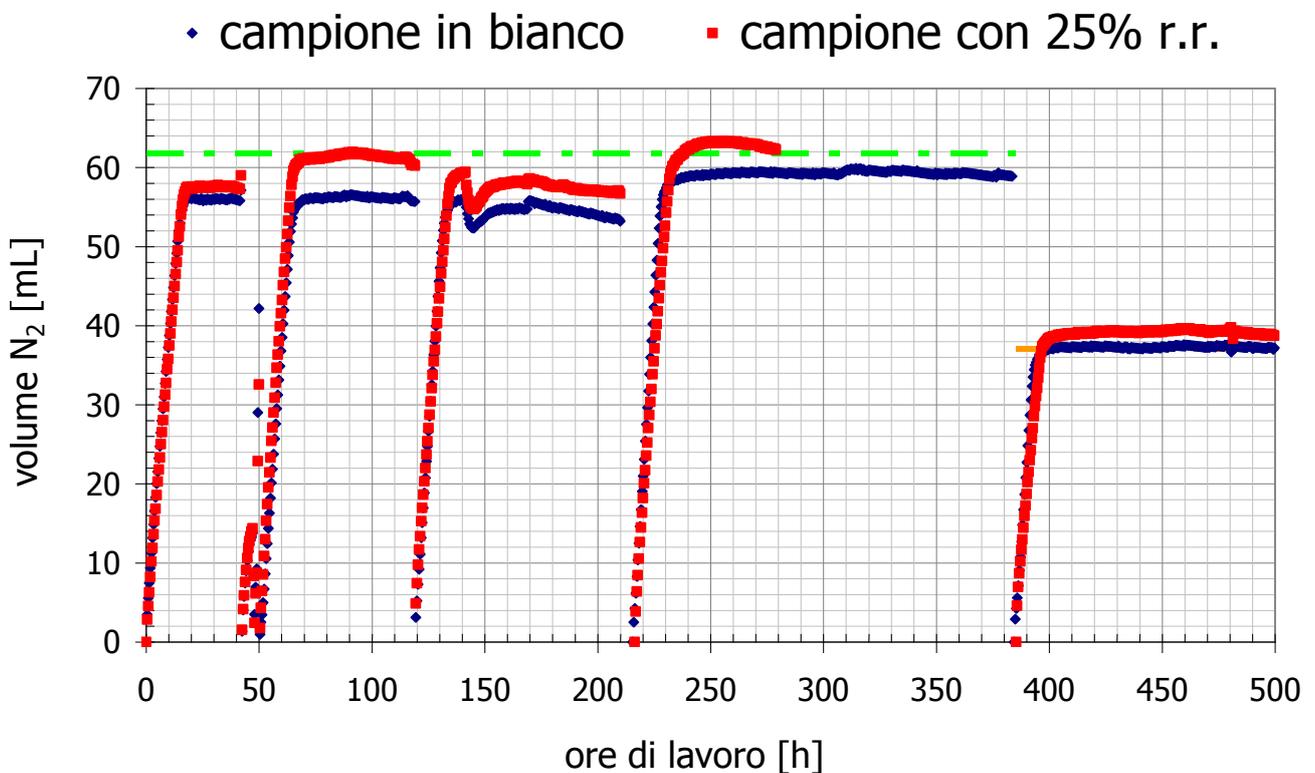


Figura 4.9 - Andamento della produzione di N_2 nella prima prova di inibizione; il tratteggio indica la produzione stechiometrica attesa, in funzione dei dosaggi di N-NO_2^-

I risultati hanno mostrato una bassa influenza del refluo reale sulla popolazione anammox, anche per prolungati tempi di contatto con la popolazione batterica, se diluito in rapporto 1:4 con mezzo sintetico, con una riduzione della SAA iniziale del 13.1% dopo 5 giorni, del 17.6% dopo 9 giorni e del 24.9% dopo 15 giorni dall'inizio. In Figura 4.10 viene illustrata l'attività specifica anammox determinata, a confronto tra i due campioni.

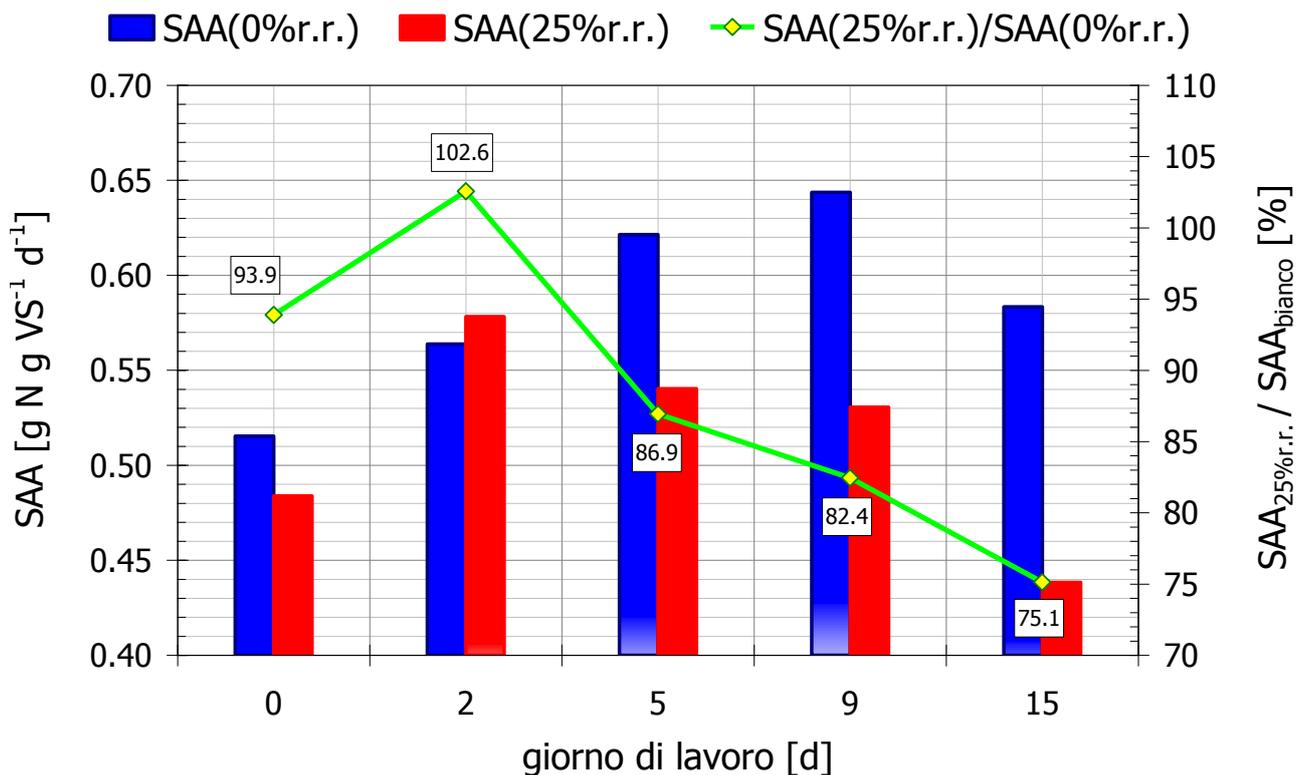


Figura 4.10 - SAA per diverse % di inibizione a differenti tempi di esposizione; viene indicata inoltre la variazione % della SAA con refluo reale in funzione del campione in bianco

Data la bassa influenza del refluo reale al 25% in volume, si è deciso di iniziare la sperimentazione anche in SBR con refluo reale, procedendo cautelativamente con una frazione di refluo più bassa (10%); in quest'ottica si è reso necessario determinare il comportamento della popolazione batterica con tale percentuale, attraverso la seconda prova in batch.

In Tabella 4.3 sono forniti i risultati ottenuti dalla prova; da notare che in questo caso vengono effettuate analisi solo per singolo campione e non per comparazione tra gli stessi, dato che è stato appurato in precedenza che la variabilità iniziale dei dati è tale da non consentire confronti affidabili.

Tabella 4.3 - Sintesi dei risultati della seconda prova; viene qui analizzata la variazione del rateo di produzione nel tempo, per ogni singolo campione

dosaggi	tempo [d]	bianco		10% r.r.	
		1		2	
		rateo produzione [mL h ⁻¹]	%	rateo produzione [mL h ⁻¹]	%
1	0	0.73	100.0	0.81	100.0
2	2	0.94	128.6	0.93	113.8
3	5	1.33	182.3	1.08	132.9

Nonostante una variabilità iniziale importante tra i ratei di produzione, si nota che il campione in bianco ha una crescita maggiore di attività rispetto a quella del campione

inibito; in ogni caso non si evidenziano particolari effetti di inibizione del campione 2, con una diluizione 1:10 del refluo reale con mezzo sintetico.

Dalla terza prova in poi si è testato progressivamente l'effetto dell'aumento della frazione di refluo reale, tale da consentire di portare l'alimentazione all'SBR fino al 100% di refluo reale; queste tre prove sono state eseguite a breve distanza tra loro.

La terza prova si è svolta in 3 giorni, per valutare l'effetto inibente con un breve tempo di contatto con la popolazione batterica; sono stati effettuati 4 dosaggi:

- al 1° dosaggio 20 mg di N-NO_2^- e N-NH_4^+ , al tempo "0" di inizio;
- al 2° dosaggio 50 mg di N-NO_2^- e N-NH_4^+ , dopo 22 h dall'inizio;
- al 3° dosaggio 50 mg di N-NO_2^- e N-NH_4^+ , dopo 46 h dall'inizio;
- al 4° dosaggio 15 mg di N-NO_2^- e N-NH_4^+ , dopo 67 h dall'inizio (non considerato nell'analisi perché il numero dei dati campionati non è sufficiente a fornire risultati affidabili).

La prova è stata condotta su tre campioni, mantenuti rispettivamente al 25-60-100% di diluizione con refluo reale (refluo con $200 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ in partenza, poi diluito ed aggiustato con NaNO_2), di cui quello al 25% è considerato il campione in "bianco"; la scelta di % di refluo reale così differenti è stata presa per valutare l'effetto inibente su un ampio spettro.

Come già analizzato in precedenza, la prova 3 è particolarmente significativa poiché presenta una bassa variabilità iniziale tra i ratei di produzione di N_2 dei differenti campioni, quindi consente un'analisi comparativa della SAA come nella prova 1; inoltre la prova è distribuita su % di inibizione notevolmente differenti, dando utili informazioni sulle scelte successive per l'SBR.

In Figura 4.11 viene illustrata l'attività specifica anammox a confronto tra i tre campioni, determinata a 0-24-48 h dall'inizio della prova.

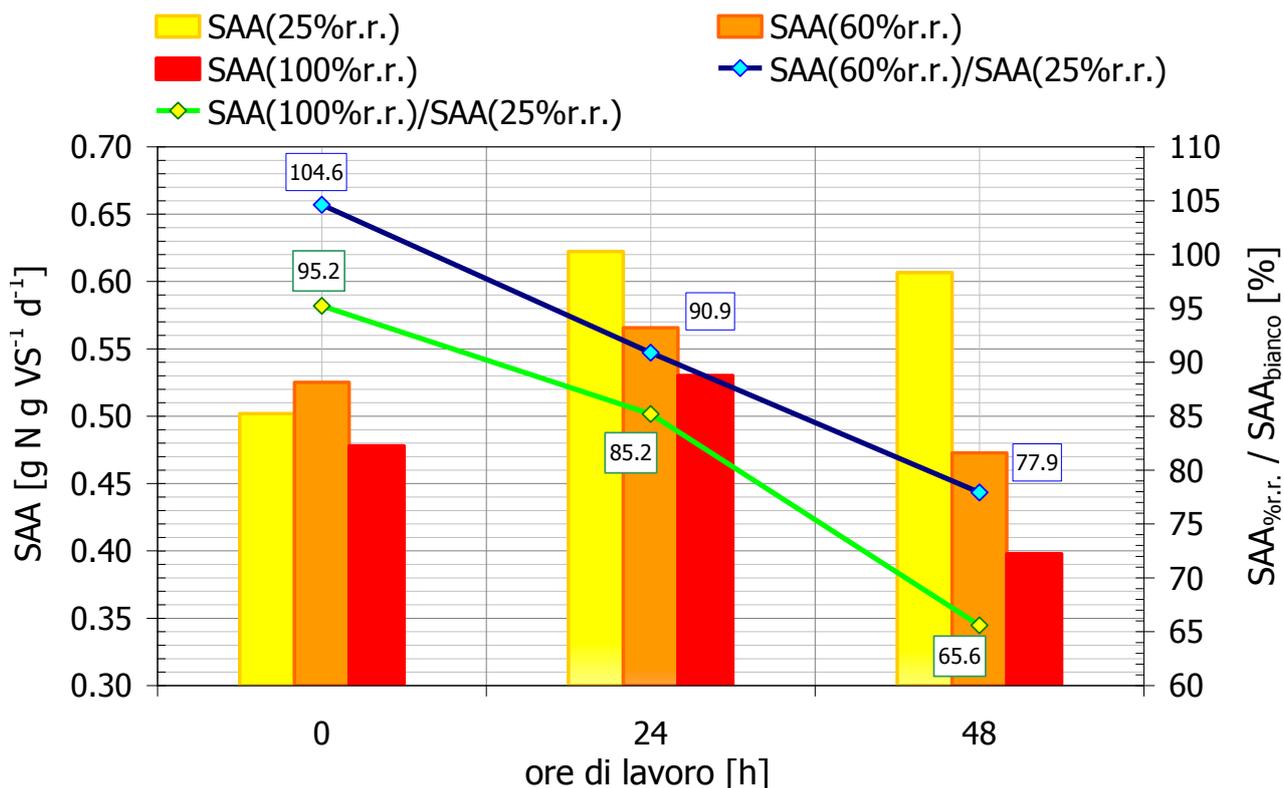


Figura 4.11 - SAA per diverse % di inibizione a differenti tempi di esposizione; viene indicata inoltre la variazione % della SAA con refluo reale in funzione del campione in bianco

I risultati di rateo di produzione e di SAA hanno mostrato una modesta inibizione dell'attività anammox, in particolare all'aumentare del tempo di contatto col refluo reale; nello specifico si nota un calo importante di SAA per la sostituzione con 100% di refluo reale a 48 ore dall'inizio della prova, maggiore che con il 60%. La riduzione della SAA iniziale per il campione con il 60% di inibente è del 9.1% dopo 24 ore e del 22.1% dopo 48 ore; per il campione con il 100% di inibente la riduzione della SAA iniziale è del 14.8% dopo 24 ore e del 34.4% dopo 48 ore.

Da notare che i risultati relativi al primo dosaggio, anche se coerenti tra loro per la bassa variabilità, sono più bassi dei successivi, probabilmente a causa dell'iniziale effetto di lento riscaldamento nelle bottiglie; per questo motivo non sono tanto interessanti nelle analisi comparative tra i campioni, quanto analizzando la risposta nel tempo del singolo campione. A questo proposito nella seguente Figura 4.12 viene analizzata la variazione percentuale della SAA per ogni singolo campione, a differenti tempi di esposizione; viene preso come riferimento non il tempo "0", come specificato in precedenza, ma il tempo t=24h.

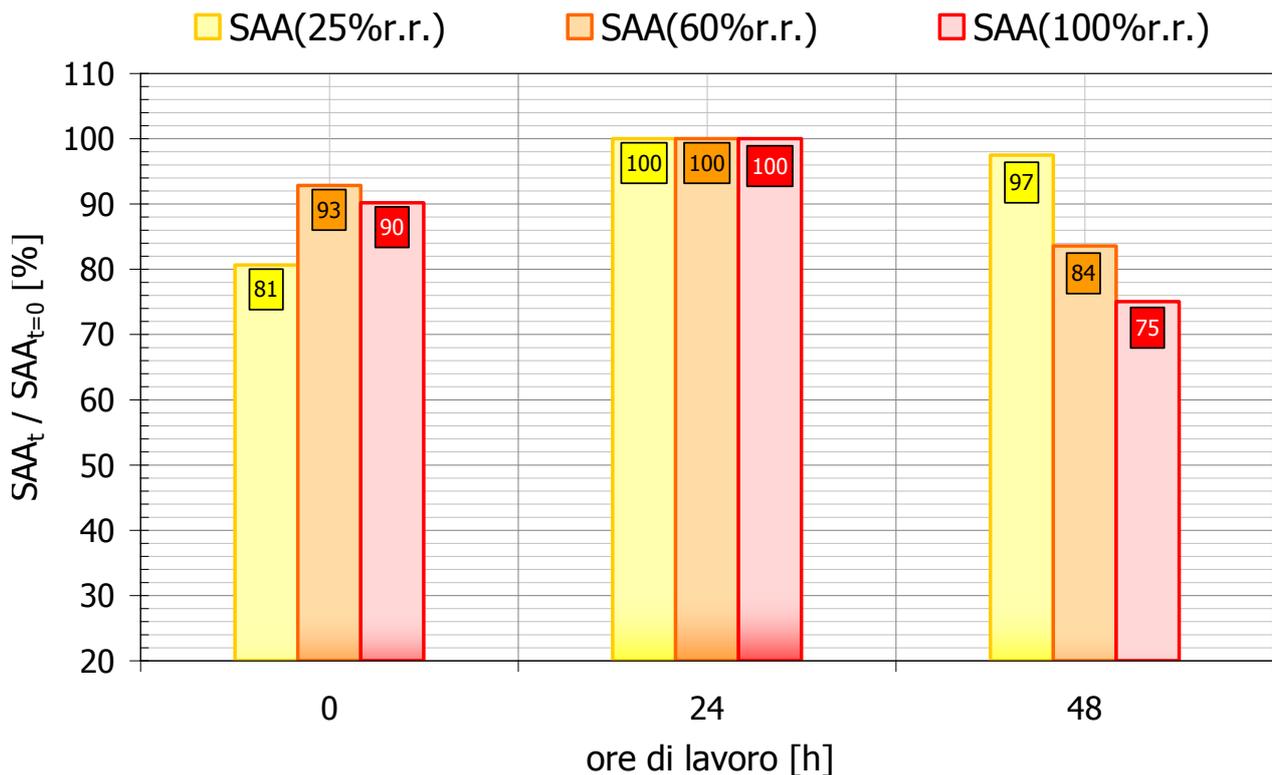


Figura 4.12 - SAA per diverse % di inibizione a differenti tempi di esposizione, in riferimento alla SAA al tempo t=24h

La quarta e la quinta prova sono strutturate per cercare di analizzare l'influenza del refluo reale su uno spettro più limitato rispetto alla prova precedente, al fine di aumentare la % di refluo reale nell'influente all'SBR.

La quarta prova è caratterizzata da tre campioni in esame:

- 1 - campione in bianco (prelevato dall'SBR alimentato al 40% di refluo reale);
- 2 - campione con 70% di refluo reale (refluo con $400 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ in partenza, poi diluito ed aggiustato con NH_4Cl);
- 3 - campione con 70% di refluo reale (refluo con $200 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ in partenza, poi diluito ed aggiustato con NaNO_2), contenente pollina.

La prova presenta un'elevata variabilità dei dati iniziali che non consente confronti affidabili tra il campione 1 e i restanti; in ogni caso è possibile constatare che nel campione in bianco il 40% di refluo reale non ha comportato inibizione, al contrario l'attività nel breve periodo (fino a 72 ore) è lentamente salita, anche dopo la sostituzione al 70% con lo stesso refluo utilizzato per il campione 2, al 3° dosaggio.

In Tabella 4.4 sono forniti i risultati ottenuti dalla prova con il campione in bianco.

Tabella 4.4 - Sintesi dei risultati della quarta prova relativi al campione in bianco

dosaggi	tempo [h]	bianco - 40% r.r.		
		1		
		rateo produzione [mL h ⁻¹]	%	SAA [g N gSV ⁻¹ d ⁻¹]
1	0	1.95	100.0	0.231
2	24	2.65	135.7	0.314
3	72	3.41	174.6	0.404

La quinta prova si è svolta in circa 3 giorni, per valutare l'effetto inibente del refluo reale con un breve tempo di contatto con la popolazione batterica; sono stati effettuati 3 dosaggi:

- al 1° dosaggio 50 mg di N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺, al tempo "0" di inizio;
- al 2° dosaggio 30 mg di N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺, dopo 24 h dall'inizio;
- al 3° dosaggio 140 mg di N-NO₂⁻ e N-NH₄⁺, dopo 48 h dall'inizio.

La seguente prova è caratterizzata da tre campioni in esame:

- 1 - campione in bianco (70% di refluo reale);
- 2 - campione con 85% di refluo reale (refluo con 400 mg N-NO₂⁻ L⁻¹ in partenza, poi diluito ed aggiustato con NH₄Cl), dal 2° dosaggio;
- 3 - campione con 85% di refluo reale (refluo con 200 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ in partenza, poi diluito ed aggiustato con NaNO₂) contenente pollina, dal 3° dosaggio.

Dato che nel primo dosaggio si è registrata un'elevata variabilità dei risultati in termini di rateo di produzione di N₂, ma la produzione complessiva è risultata equivalente tra i tre campioni, si può effettuare un'analisi comparativa tra i campioni scartando il primo dosaggio, oltre che analizzare l'influenza dell'inibente nel tempo sui singoli campioni.

In Figura 4.13 viene illustrata l'attività specifica anammox a confronto tra i tre campioni, determinata a 0-24-48 h dall'inizio della prova; il valore di variazione percentuale della SAA a tempo "0" viene riportato per completezza, ma non è rappresentativo, come già accennato.

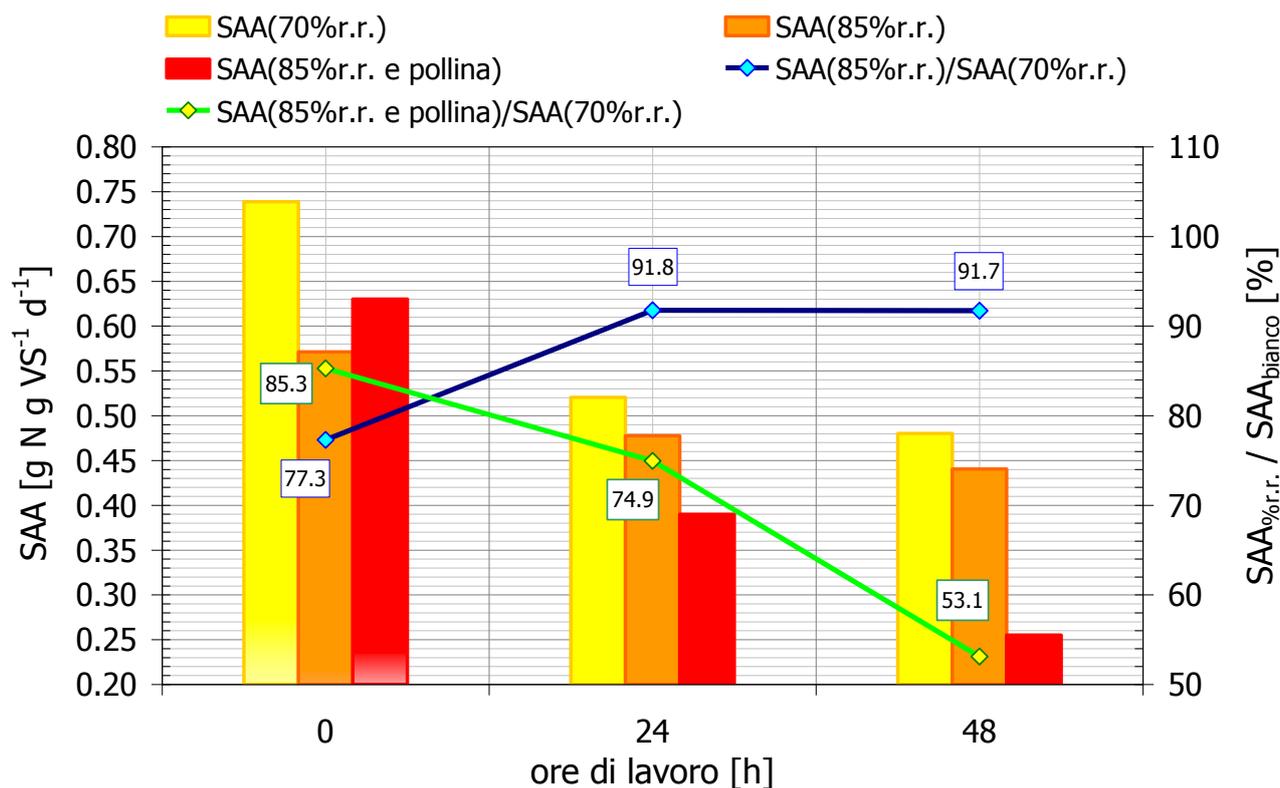


Figura 4.13 - SAA per diverse % di inibizione a differenti tempi di esposizione; viene indicata inoltre la variazione % della SAA con refluo reale in funzione del campione in bianco. Il valore di variazione a tempo "0" viene riportato per completezza, ma non è rappresentativo

I risultati di rateo di produzione e di SAA hanno mostrato un'importante inibizione dell'attività anammox, in particolare all'aumentare del tempo di contatto col refluo reale con pollina; nello specifico si nota un calo importante di SAA per la sostituzione con 85% di refluo reale con pollina a 48 ore dall'inizio della prova, notevolmente maggiore che con l'85% senza pollina. La riduzione della SAA iniziale per il campione con l'85% di inibente senza pollina è del 8.2% dopo 24 ore e del 8.3% dopo 48 ore; per il campione con l'85% di inibente con pollina la riduzione della SAA iniziale è del 25.1% dopo 24 ore e del 46.9% dopo 48 ore. Da questi dati si intuisce che l'inibizione è già elevata dopo 24 ore per il refluo con pollina, e quasi raddoppia a 48 ore. In Tabella 4.6 sono riassunti i risultati sopra citati ottenuti dalla prova, suddivisi per campione.

Nella seguente Figura 4.14 viene analizzata la variazione percentuale della SAA per ogni singolo campione, a differenti tempi di esposizione; viene preso come riferimento il tempo "0" iniziale.

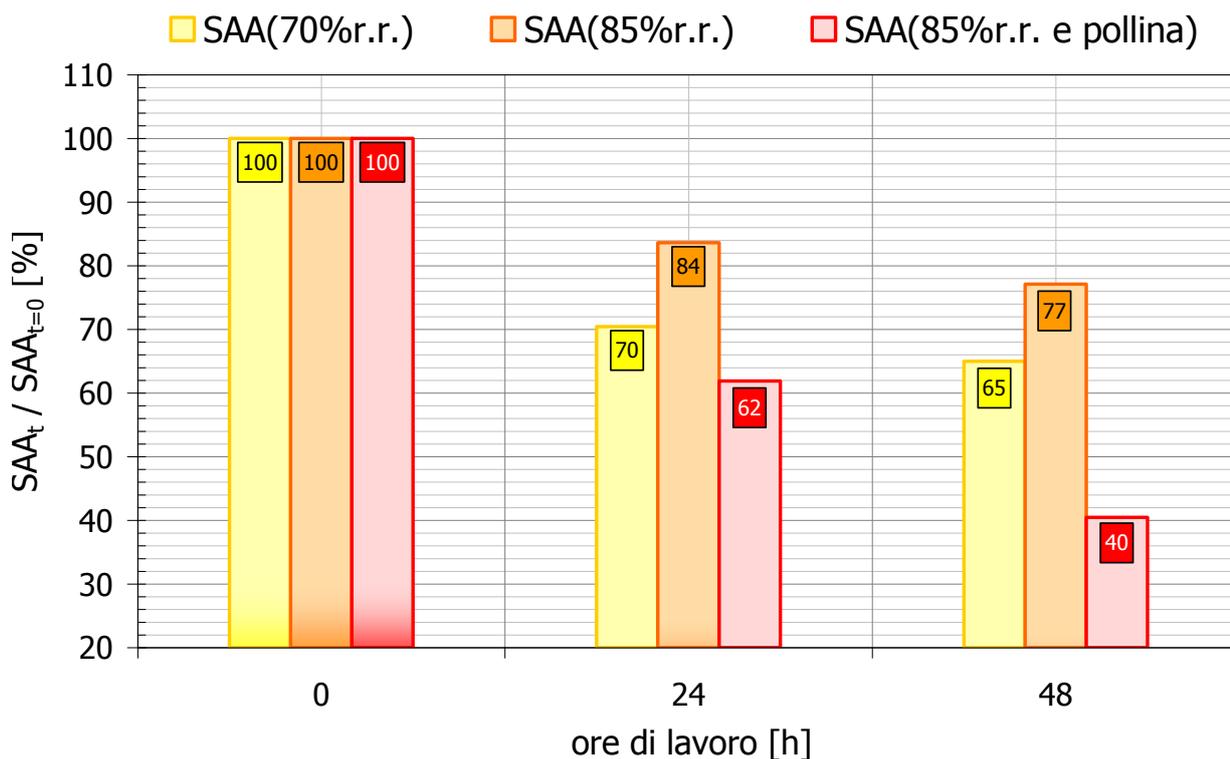


Figura 4.14 - SAA per diverse % di inibizione a differenti tempi di esposizione, in riferimento alla SAA iniziale al tempo "0"

I valori in Figura 4.14 sono riassunti nella seguente Tabella 4.5.

Tabella 4.5 - Sintesi dei risultati della quinta prova; viene qui analizzata la variazione del rateo di produzione nel tempo, per ogni singolo campione

dosaggi	tempo [h]	bianco - 70% r.r.		85% r.r.		85% - r.r. con pollina	
		1		2		3	
		rateo produzione [mL N h ⁻¹]	%	rateo produzione [mL N h ⁻¹]	%	rateo produzione [mL N h ⁻¹]	%
1	0	4.15	100.0	3.47	100.0	3.51	100.0
2	24	2.92	70.4	2.90	83.6	2.17	61.9
3	48	2.70	65.0	2.67	77.1	1.42	40.5

Tabella 4.6 - Sintesi dei risultati della quinta prova; viene qui analizzata la variazione della SAA nel tempo, per ogni singolo campione

campione	tempo [h]	dosaggi	rateo produzione [mL h⁻¹]	SAA [g N g SV⁻¹ d⁻¹]	SAA%	□ SAA [%]
1	0	1	4.15	0.739	100	-
	24	2	2.92	0.520	100	-
	48	3	2.70	0.480	100	-
2	0	1	3.47	0.571	77.3	-22.7
	24	2	2.90	0.477	91.8	-8.2
	48	3	2.67	0.440	91.7	-8.3
3	0	1	3.51	0.630	85.3	-14.7
	24	2	2.17	0.390	74.9	-25.1
	48	3	1.42	0.255	53.1	-46.9

4.2.2 Prova in continuo

4.2.2.1 Qualità dell'effluente ed efficienza del processo

La valutazione dei risultati relativi alla sperimentazione si basa sull'analisi dei valori di rimozione delle specie azotate ottenuti, confrontando le concentrazioni ed i carichi di azoto in ingresso ed in uscita al reattore, e determinando quindi l'efficienza di rimozione e l'attività specifica della popolazione anammox, distinguendo in funzione della frazione di refluo reale presente nell'influente.

In Figura 4.15 vengono illustrate le concentrazioni delle specie azotate solubili in ingresso ed in uscita dal reattore SBR; in Figura 4.16 è rappresentato l'andamento dell'efficienza di rimozione (espresso come rapporto percentuale tra NRR e NLR), valutata nel corso della sperimentazione.

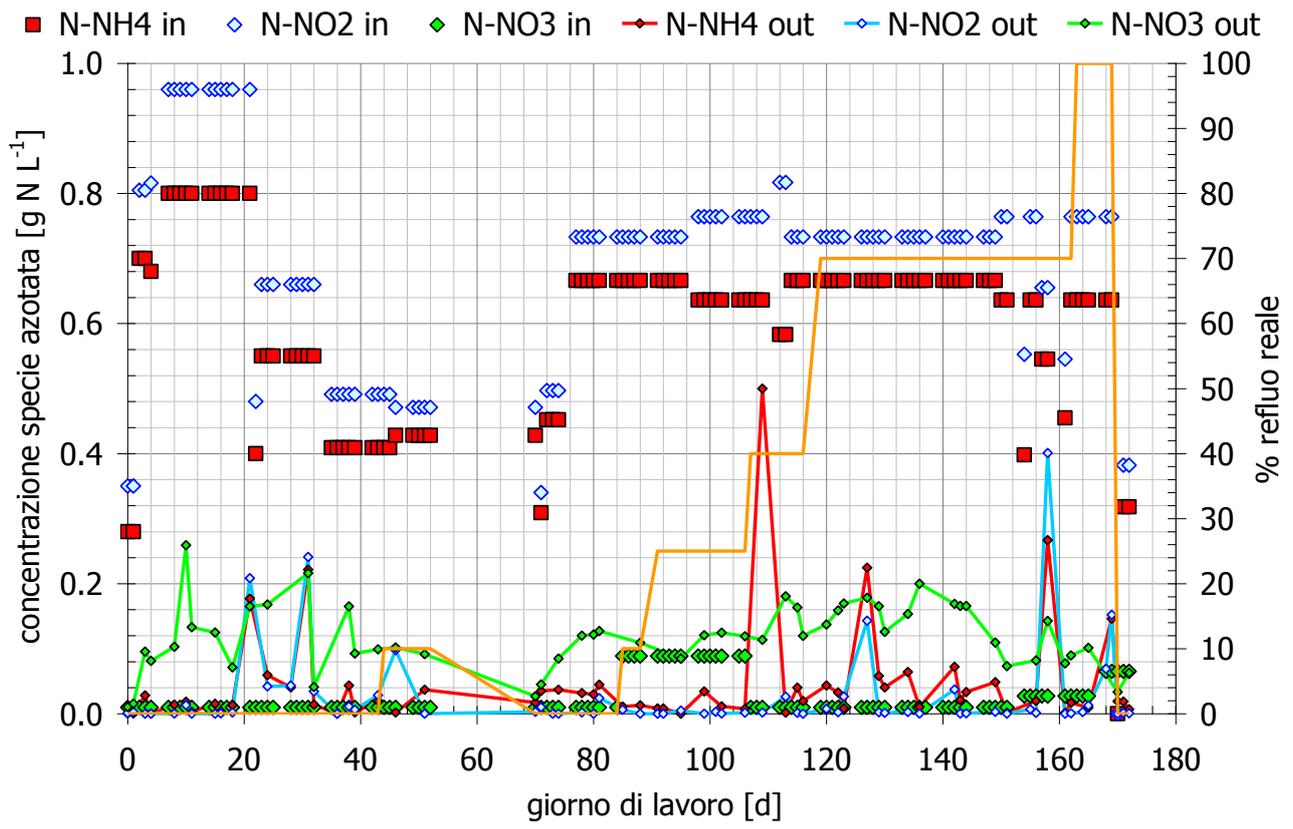


Figura 4.15 - Concentrazioni delle specie azotate nell'effluente, confrontate con l'influente; in arancione si evidenzia la frazione di refluo reale nell'alimento (scala di riferimento a destra)

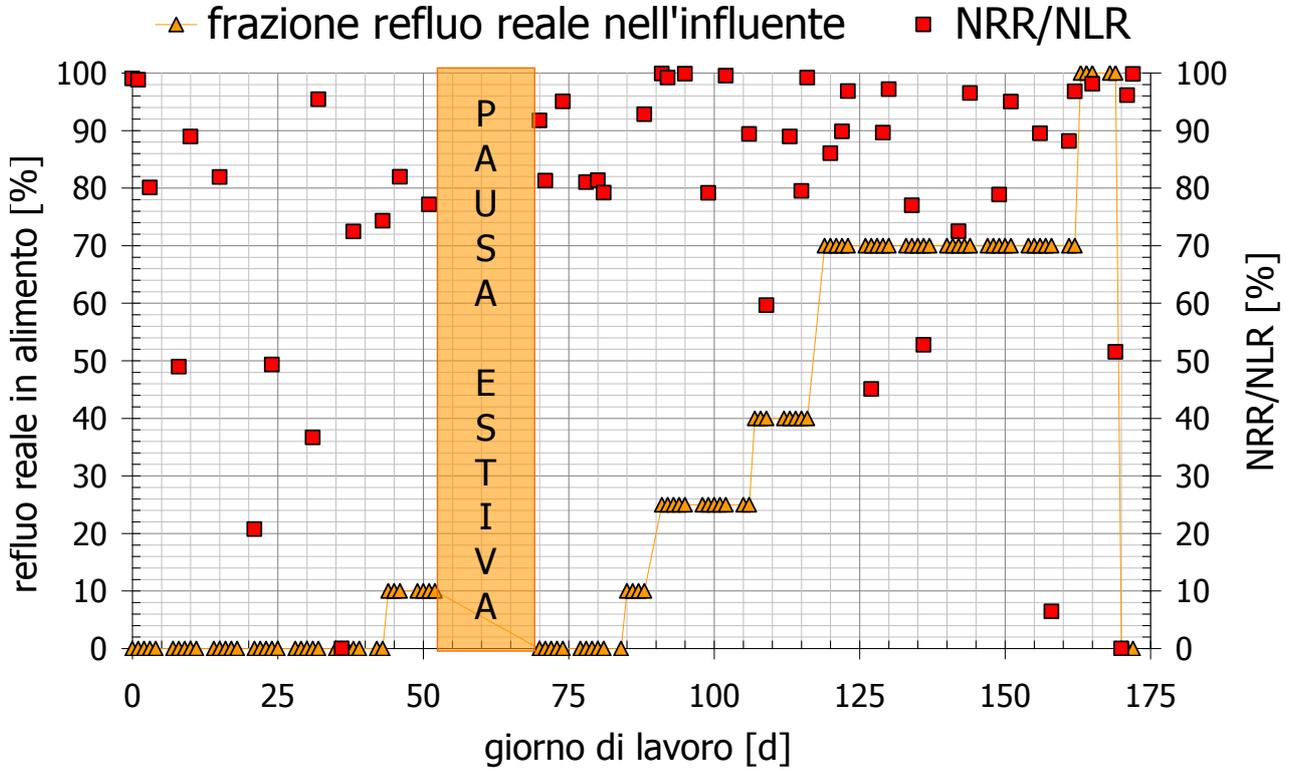


Figura 4.16 - rapporto percentuale NRR/NLR confrontato con la frazione di refluo reale nell'alimento in ingresso al reattore

Durante i primi 7 giorni la concentrazione totale di azoto nell'influente è stata progressivamente aumentata da 630 a 1760 mg N L⁻¹ e quindi mantenuta su questo valore fino al giorno 20, con un'efficienza di rimozione media del 90±16%.

Al giorno 21 l'efficienza nel reattore è diminuita fino al 20.7%, che ha comportato un aumento della concentrazione di nitrito nell'effluente a 209 mg N-NO₂⁻ L⁻¹.

La concentrazione nell'alimento influente all'SBR è stata quindi ridotta da 1760 a 1200 mg N L⁻¹, abbassando il NLR medio settimanale da 0.77 a 0.54 g N L⁻¹ d⁻¹.

Al giorno 31, a seguito di un nuovo aumento di concentrazione di nitrito (241 mg N-NO₂⁻ L⁻¹), la concentrazione complessiva di azoto nell'influente è stata ulteriormente ridotta a 900 mg N L⁻¹, per consentire la ripresa del processo e il raggiungimento dell'efficienza di rimozione ottimale dell'azoto (95% al giorno di lavoro 32).

Al giorno 44 si è iniziato a preparare l'alimento in ingresso al reattore SBR miscelando il mezzo sintetico con refluo reale (campione 1, vedi Tabella 3.2); si è qui partiti da una frazione bassa di refluo reale sul totale pari al 10% in volume, mantenendo mediamente il NLR a 0.36 g N L⁻¹ d⁻¹ fino al giorno 51. L'efficienza di rimozione riscontrata al 10% di inibizione da refluo reale è stata in media l'80±3%.

Durante la pausa estiva (giorni di lavoro da 52 a 69), il laboratorio è rimasto chiuso e la biomassa anammox è stata conservata in cella frigorifera a 4 ° C con eccesso di nitrato (150 mg N-NO₃⁻ L⁻¹) per mantenere condizioni anossiche ed evitare la produzione di solfuri, tossici per la popolazione batterica (Van de Graaf et al., 1996; Dapena-Mora et al., 2007; Abma et al., 2007).

Il reattore è stato riavviato il giorno 70 utilizzando solo mezzo sintetico minerale, con una concentrazione di azoto totale nell'alimento di 900 mg N L⁻¹ e un NLR pari a 0.31 g N L⁻¹ d⁻¹, per consentire la ripresa dell'attività prima di utilizzare nuovamente il refluo reale.

Poiché l'efficienza di rimozione dell'azoto si è dimostrata sin da subito soddisfacente (in media pari al 89±7% dal giorno 70 al giorno 76), il NLR è stato incrementato in una settimana (il giorno 77) mediamente fino a 0.51 g N L⁻¹ d⁻¹, aumentando quindi la concentrazione di azoto totale in ingresso a 1400 mg N L⁻¹.

Dopo una settimana di lavoro caratterizzata da condizioni stabili in termini di efficienza di rimozione dell'azoto, in media pari al 81±1% (dal giorno 77 al giorno 84), il giorno 85 si è ripreso l'utilizzo del refluo reale diluito nell'alimento, in frazione pari al 10% (v/v), senza mostrare alcun effetto negativo sulla qualità dell'effluente (concentrazioni in uscita inferiori a 13 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ e 6 mg N-NO₂⁻ L⁻¹; efficienza di rimozione in media pari al 96±5%) fino al giorno 90.

Al giorno operativo 91 la frazione di refluo reale nella miscela influente è stata aumentata al 25%, mantenendo una concentrazione costante di azoto di 1400 g N L⁻¹; l'efficienza di rimozione dell'azoto si è mantenuta su valori molto elevati (94±9%) sino al giorno 106.

A distanza di 16 giorni (giorno di lavoro 107) la percentuale di refluo reale è stata incrementata al 40% e mantenuta tale fino al giorno 118, senza ravvisare notevoli effetti sulla qualità dell'effluente e sull'efficienza di rimozione (concentrazioni in uscita inferiori a 40 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ e 26 mg N-NO₂⁻ L⁻¹; efficienza di rimozione in media pari al 88±10%), escludendo il caso isolato del giorno 111 caratterizzato da 500 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ e 2 mg N-NO₂⁻ L⁻¹ in uscita dal reattore, dovuto ad erroneo dosaggio in ingresso.

Dal giorno 119 al giorno 137 la frazione di refluo reale è stata portata al 70%, con un'efficienza di rimozione compresa tra il 77 e il 99% ($89\pm 8\%$). Quindi, a causa della chiusura del laboratorio, il reattore è stato nuovamente fermato e lasciato a temperatura ambiente senza alimentazione per 5 giorni (fino al giorno 141); anche in questo caso è stato previsto un dosaggio di nitrato in eccesso ($150 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$).

Al giorno 142 il reattore è stato riavviato utilizzando la stessa frazione di refluo reale (70% di refluo reale e 30% di mezzo sintetico minerale, v/v) e il medesimo NLR mantenuti in precedenza fino al termine della sperimentazione. Il giorno 154 il refluo reale denominato "campione 1" è stato sostituito da un nuovo refluo reale (campione 2) con caratteristiche indicate in precedenza in Tabella 5.1, e sempre diluito al 70% nell'alimento influente. L'efficienza di rimozione dell'azoto, dal giorno 142 al giorno 162, è rimasta superiore al 72%, in media pari al $90\pm 10\%$).

Al giorno di lavoro 163 si è caricato il reattore SBR con alimento caratterizzato al 100% da refluo reale. Il giorno 165 il refluo reale denominato "campione 2" è stato sostituito da un nuovo refluo reale (campione 3) con caratteristiche indicate in precedenza in Tabella 3.2, e utilizzato sempre al 100% nell'alimento influente. Al giorno 170, dopo 7 giorni di alimentazione di refluo reale al 100%, l'efficienza di rimozione è notevolmente diminuita (52%), con concentrazioni di ammonio e nitrito nel reattore rispettivamente pari a $146 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ e $152 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. Pertanto si è deciso di interrompere l'utilizzo di refluo reale, utilizzando nuovamente mezzo sintetico minerale come unico alimento, e di ridurre la concentrazione di azoto totale in ingresso a 700 mg N L^{-1} , portando di conseguenza il NLR medio a 0.30 g N L^{-1} . Il forte calo dell'efficienza di rimozione dell'azoto è stato confermato dal monitoraggio dell'attività del reattore durante i test di attività effettuati nell'SBR (vedi par. 3.6.4.1.1).

In Figura 4.17 viene riassunta la rimozione dell'azoto nel corso della sperimentazione, distinta in funzione delle specie azotate di interesse (ammonio e nitrito analizzati singolarmente, riportati come g N d^{-1} rimosso).

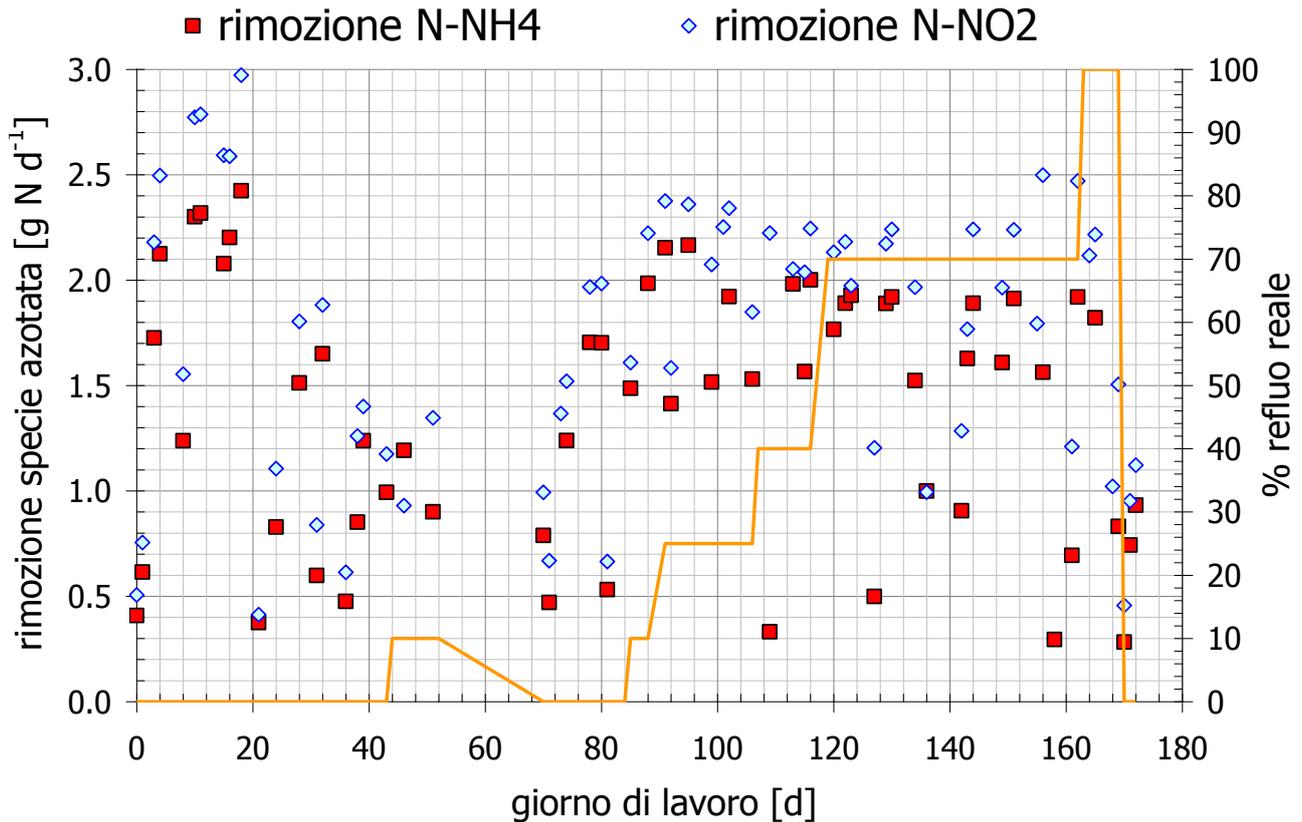


Figura 4.17 - Rimozione di N-NH₄ e N-NO₂ nel corso della sperimentazione; in arancione si evidenzia la frazione di reflujo reale nell'alimento (scala di riferimento a destra)

Nel corso della sperimentazione sono occorsi alcuni problemi tecnici che hanno provocato temporanee instabilità nell'attività, quali:

- il giorno 111, un calcolo errato nella preparazione dell'influente ha causato un carico di ammonio doppio rispetto a quello previsto, comportando un accumulo di ammonio nel reattore, corrispondente ad una concentrazione di $500 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$;
- il giorno 127, un problema tecnico della pompa peristaltica di dosaggio dell'acido (attivazione non corretta nel ciclo di lavoro) ha causato un aumento del pH fino a 8.5, comportando l'accumulo di ammonio e nitrito nel reattore, con concentrazioni rispettivamente di $225 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ e $143 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$;
- nei giorni dal 158 al 161 (durante il fine settimana), il sistema di riscaldamento non ha funzionato e la temperatura all'interno del reattore è scesa a circa $15 \div 18 \text{ }^\circ\text{C}$; questo problema ha provocato un accumulo di ammonio e nitrito, arrivando a concentrazioni rispettivamente pari a $267 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ e $401 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$.

L'elevata concentrazione di ammonio e nitrito rilevata nel reattore, in seguito ai problemi in precedenza elencati, è stata rapidamente ridotta per diluizione del surnatante in rapporto 1:3-1:4 con mezzo sintetico minerale; questo accorgimento ha consentito in ciascun caso di riproporre in alimentazione il carico di azoto stabilito prima dell'accumulo nell'SBR. L'efficienza di rimozione dell'azoto è stata sempre ristabilita rapidamente, indicando un rapido ripristino dell'attività.

In Tabella 4.7 sono riassunti i risultati ottenuti nella sperimentazione, in termini di qualità dell'effluente e di efficienza del processo, e suddivisi in funzione delle differenti frazioni di refluo reale presenti nell'alimento in ingresso al reattore; i dati relativi ai problemi occorsi nella sperimentazione, elencati in precedenza, sono stati considerati come outliers e quindi non sono stati tenuti in considerazione nell'analisi dei valori ottenuti.

La qualità dell'effluente e l'efficienza di rimozione sono risultate buone fino ad una percentuale di refluo reale del 70% (nei giorni da 0 a 162), mentre con il 100% di sostituzione si è verificato l'accumulo di ammonio e nitrito nel reattore, con conseguente calo dell'efficienza del processo.

Tabella 4.7 - Sintesi delle concentrazioni di ammonio e nitrito negli effluenti e dell'efficienza di rimozione nel corso della sperimentazione

giorno di lavoro	frazione di refluo reale	N-NH ₄ ⁺ _{out}	N-NO ₂ ⁻ _{out}	NRR/NLR (N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₂ ⁻)	NRR/NLR (N-NH ₄ ⁺ , N-NO ₂ ⁻ , N-NO ₃ ⁻)
[d]	[%]	[mg L ⁻¹]	[mg L ⁻¹]	[%]	[%]
0 - 43	0	35±60	33±69	80±25	72±25
44 - 52	10	19±25	49±69	80±3	68±0.5
53 - 69	sospensione	-	-	-	-
70 - 84	0	33±9	6±9	85±7	71±15
85 - 90	10	12±1	3±4	96±5	87
91 - 106	25	12±12	1±2	94±9	85±12
107 - 118	40	20±19	7±13	88±10	77±16
119 - 162	70	31±23	6±11	89±13	78±16
163 - 169	100	78±97	59±69	75±33	93
170 - 172	0	15±7	1±1	98±3	82

La rimozione delle specie azotate è stata inoltre analizzata valutando la percentuale di conversione dell'ammonio dovuta all'attività anammox, rispetto alla rimozione totale dello stesso, per verificare eventuali presenze di ossigeno nel reattore da cui deriverebbe una competizione con popolazioni concorrenti nell'attività di rimozione (ad esempio AOB e NOB). L'analisi e le ipotesi effettuate sono già state presentate in precedenza nel par. 3.5.3.3; i risultati ottenuti vengono illustrati in Figura 4.18. La stima della produzione di N-NO₃⁻ presenta uno scostamento pari a 11±69 mg d⁻¹ rispetto alla misura sperimentale, su valori di produzione mediamente di un ordine di grandezza superiori (produzione sperimentale pari a 354±275 mg d⁻¹); si può quindi considerare in prima approssimazione corretto il sistema utilizzato e le stime sulla rimozione di ammonio da attività anammox.

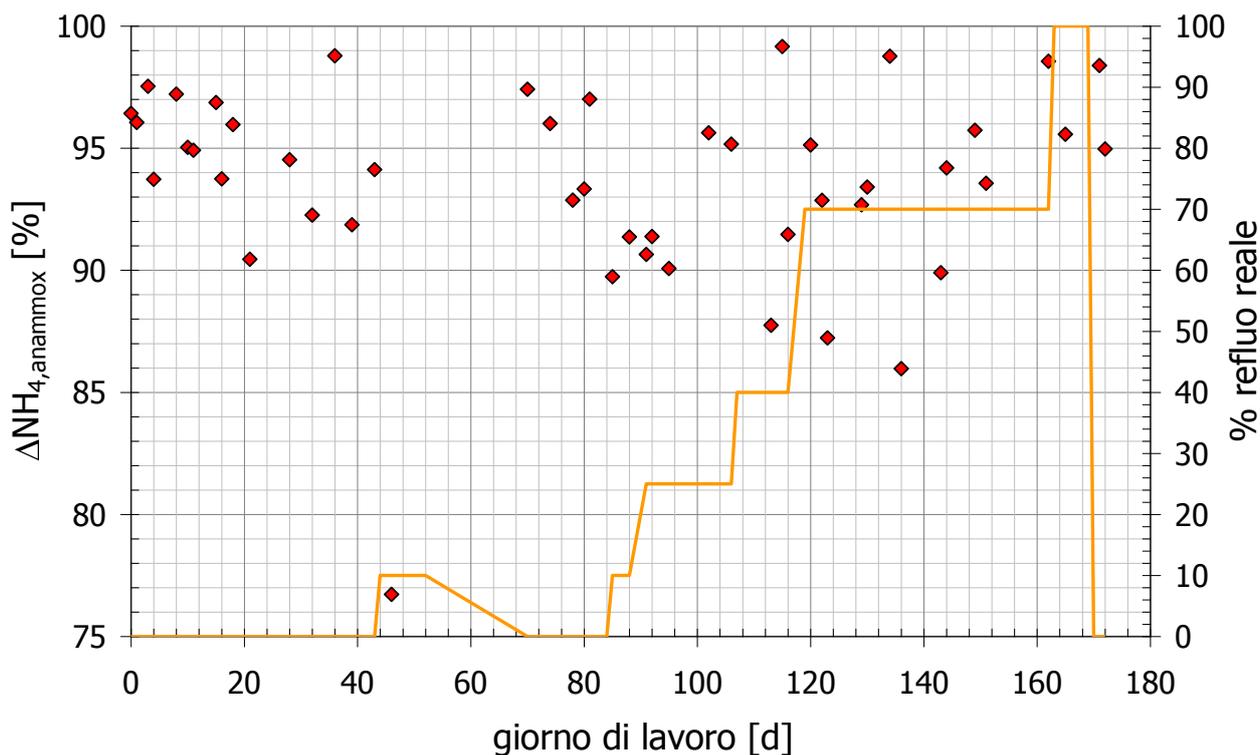


Figura 4.18 - Percentuale di conversione dell'ammonio dovuta ad attività anammox; in arancione si evidenzia la frazione di refluo reale nell'alimento (scala di riferimento a destra)

In Figura 4.19 sono riportati i rapporti molari sperimentali di rimozione delle specie, relativi al N-NO_2^- rimosso sul N-NH_4^+ rimosso ed al N-NO_3^- prodotto sul N-NH_4^+ rimosso, confrontati con i valori stechiometrici indicati da Strous et al. (1998); in Figura 4.20 viene confrontato il rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_2^-/\Delta\text{N-NH}_4^+$ tra l'influente al reattore ed il rapporto di rimozione delle specie.

Durante i giorni di lavoro da 0 a 153 il rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_2^-/\Delta\text{N-NH}_4^+$ rimosso è risultato essere molto vicino a quello stechiometrico, in media pari a $1.20 \pm 0.13 \text{ g N g N}^{-1}$; al contrario negli ultimi giorni di sperimentazione il valore è aumentato fino a $1.55 \pm 0.24 \text{ g N g N}^{-1}$, in corrispondenza del cambio di tipologia del refluo reale (campione 1 sostituito dal 2, e successivamente dal 3), ed in particolare nei giorni 163÷169 con il 100% di refluo reale non diluito. Analogamente il rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_3^-/\Delta\text{N-NH}_4^+$ è diminuito nel suddetto periodo da $0.27 \pm 0.19 \text{ g N g N}^{-1}$ a $0.21 \pm 0.19 \text{ g N g N}^{-1}$. Entrambi questi comportamenti indicano un probabile aumento dell'attività denitrificante nel sistema.

Poiché risultati recenti hanno dimostrato che i batteri anammox possono utilizzare direttamente i nitrati (Kartal et al., 2006), non può essere esclusa la riduzione dissimilativa dei nitrati ad ammonio via nitrito come intermedio di reazione (DNRA, dissimilatory nitrate reduction to ammonium).

Il rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_2^-/\Delta\text{N-NH}_4^+$ rimosso è risultato essere prossimo a quello nell'alimento in entrata, con una variabilità in media pari a $0.07 \pm 0.17 \text{ g N g N}^{-1}$ (per variabilità positiva si intende un rapporto in uscita maggiore di quello in ingresso).

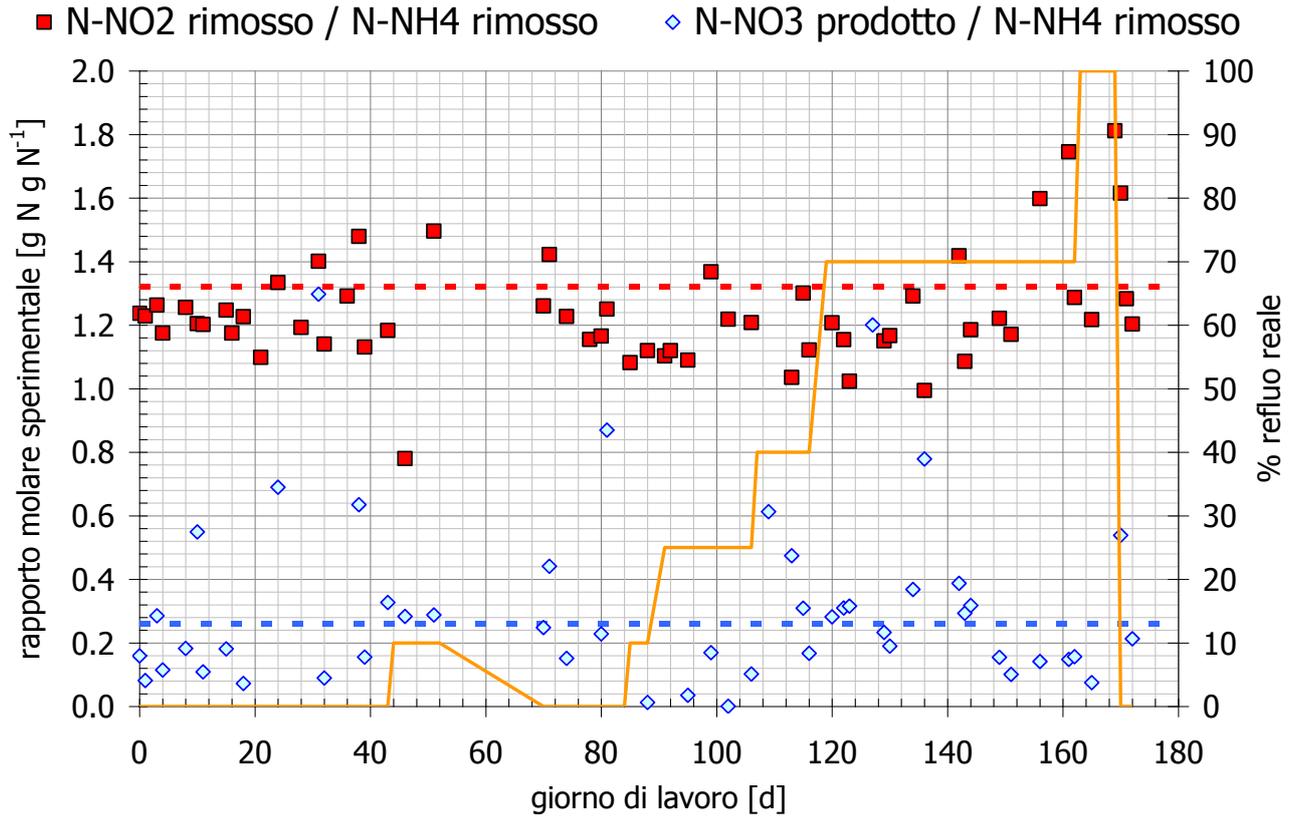


Figura 4.19 - Rapporti molari sperimentali N-NO₂/N-NH₄ e N-NO₃/N-NH₄ rimossi; in arancione si evidenzia la frazione di refluo reale nell'alimento (scala di riferimento a destra)

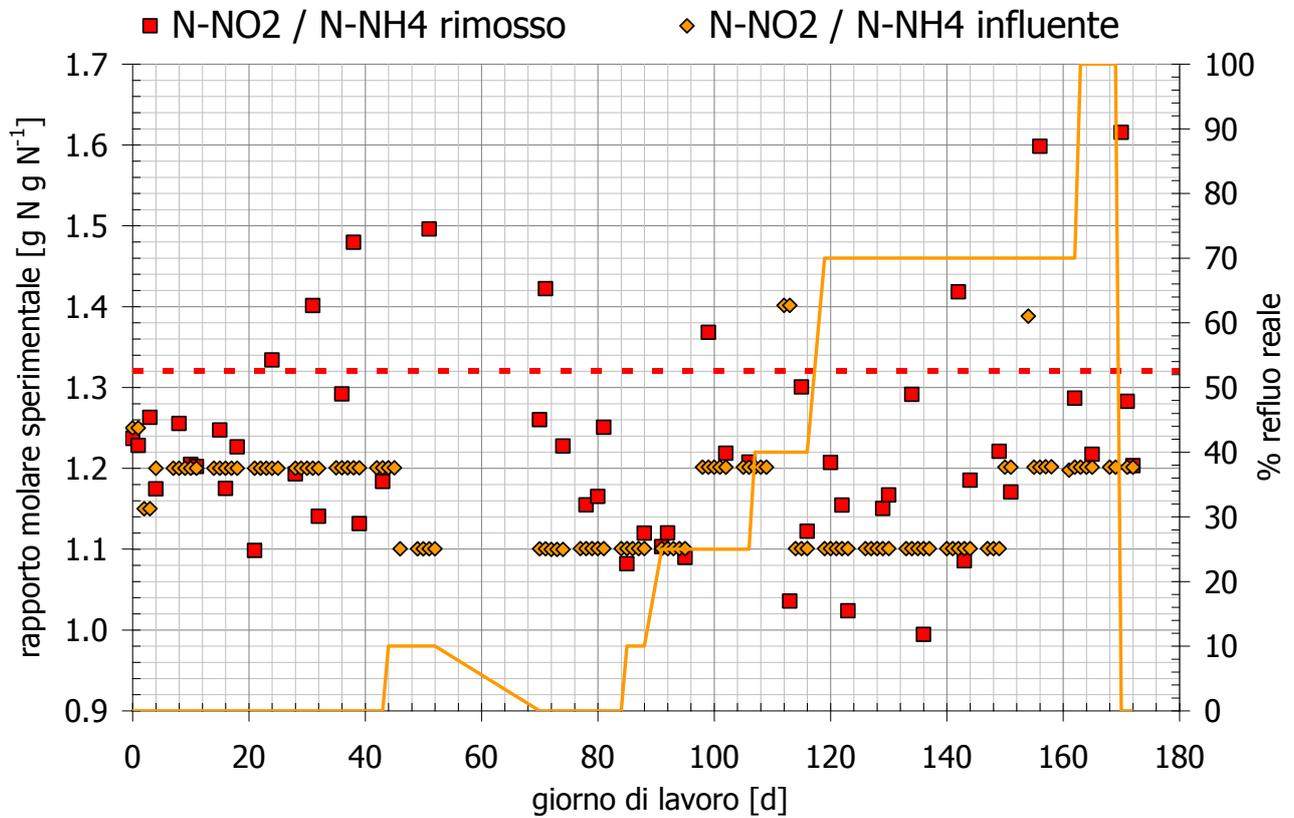


Figura 4.20 - Rapporto molare sperimentale N-NO₂/N-NH₄ rimosso e nell'influente; in arancione si evidenzia la frazione di refluo reale nell'alimento (scala di riferimento a destra)

4.2.2.2 Monitoraggio dell'attività

L'andamento dell'attività nel reattore SBR è stato monitorato analizzando il rateo massimo di rimozione dell'azoto all'interno del reattore, NRR_{max} , attraverso la conduzione periodica di test di attività (vedi par. 3.6.4.1.1). In Figura 4.21 sono rappresentati i valori di NRR_{max} ottenuti, confrontati con il NLR e con la frazione di refluo reale presente nell'influente, applicati nel corso della sperimentazione mentre in Tabella 4.8 sono riportati i risultati ottenuti nel corso delle prove; in particolare vengono specificati, oltre il NRR_{max} , anche le singole rimozioni delle specie azotate ed il rapporto molare ($\Delta N-NH_4^+$, $\Delta N-NO_2^-$, $\Delta NO_2^- / \Delta NH_4^+$), la rappresentatività della interpolazione dei dati ricavati dalle analisi (R^2 , deviazione standard), la percentuale di carico a cui si sta lavorando rispetto al massimo sostenibile dal sistema (NLR/NLR_{max}).

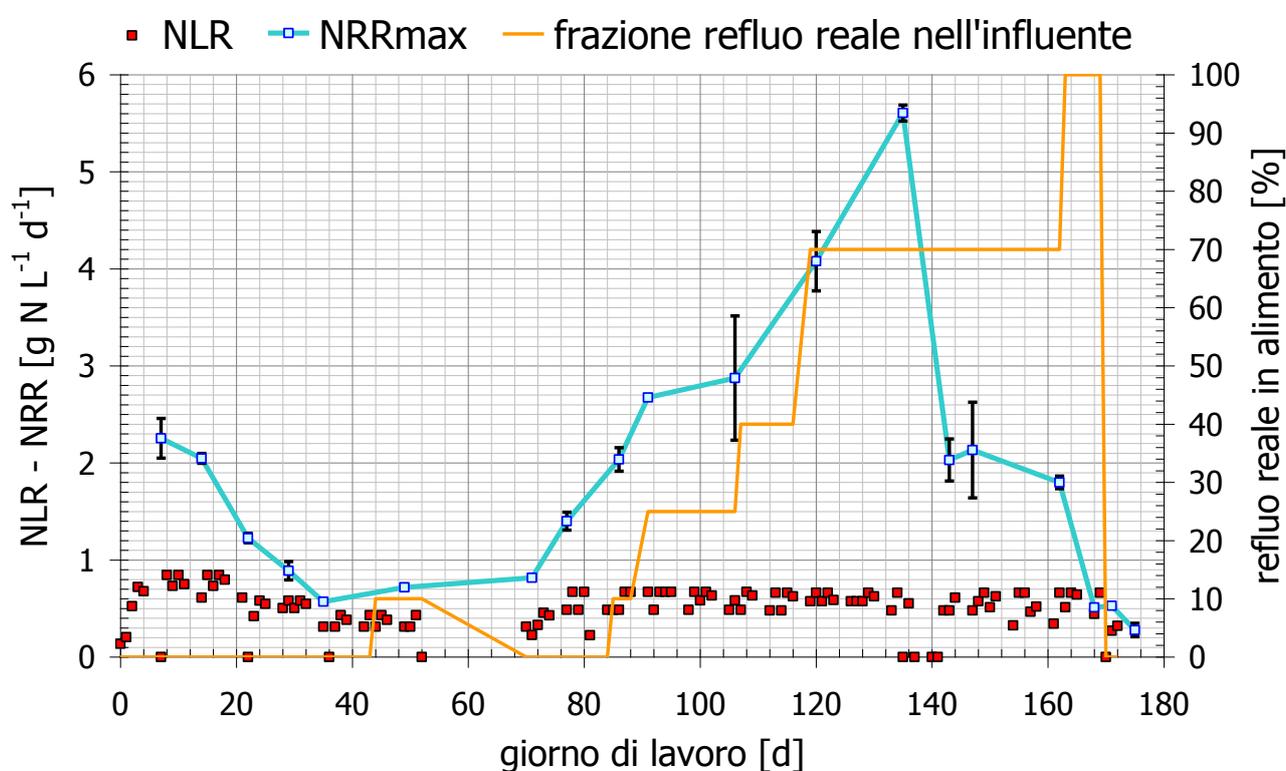


Figura 4.21 - NRR_{max} a confronto con il NLR applicato e la frazione di refluo reale nell'influente

Durante la fase iniziale di sperimentazione (giorno di lavoro da 0 a 43), in cui il reattore è stato alimentato con solo mezzo sintetico minerale, il NRR_{max} è calato da $2.13 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ il giorno 7 a $0.57 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ il giorno 35; quindi è lievemente aumentato al giorno 49 ($0.72 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), anche con refluo reale diluito al 10% nell'alimento, per poi mantenersi stabile fino a ripresa dell'attività dopo la chiusura estiva del laboratorio, a $0.82 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ il giorno 71. Il carico massimamente sostenibile è successivamente incrementato fino a $5.61 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ al giorno 135, in corrispondenza di una frazione di refluo reale raggiunta pari al 70% (dal giorno 119). Complessivamente, dalla ripresa della sperimentazione dopo l'interruzione estiva, trascurando la prima settimana di lento recupero dell'attività anammox, il NRR_{max} è aumentato del 300% circa in due mesi (dal giorno 77 al giorno 135).

Dal giorno di lavoro 137 l'attività nel reattore SBR è stata fermata per chiusura del laboratorio, mantenendo per 5 giorni il sistema a temperatura ambiente senza alimentazione; dopo la sosta (giorno 143) si è verificato un decremento nel NRR_{max} a $2.03 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, corrispondente ad una riduzione del 63.8%.

Il carico massimo sostenibile è quindi rimasto stabile in media attorno a $1.99 \pm 0.17 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ fino al giorno 162, prima del cambio di percentuale di refluo reale nell'alimento al 100% (senza diluizione).

Dal giorno di lavoro 163 il NRR_{max} è notevolmente diminuito, fino a $0.51 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ il giorno 169, e corrispondente ad una perdita del 71.6% della capacità di rimozione dell'azoto; il surnatante del reattore SBR è quindi stato lavato con mezzo sintetico minerale, al fine di ridurre la concentrazione di azoto totale in ingresso a 700 mg N L^{-1} , portando di conseguenza il NLR medio a 0.30 g N L^{-1} . In ogni caso non si è registrato un significativo recupero dell'attività anammox, con bassi valori osservati di NRR_{max} ($0.53 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ il giorno 171, $0.70 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ il giorno 175).

Nel corso delle prove di attività per la determinazione del NRR_{max} , è risultato un rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_2^-/\Delta\text{N-NH}_4^+$ pari a $1.29 \pm 0.28 \text{ g N g N}^{-1}$, suggerendo che il processo anammox è stato il principale responsabile dell'attività di rimozione nel reattore SBR, come già discusso nel precedente par. 4.2.2.1 (vedi Figura 4.18). Nonostante ciò il rapporto molare è aumentato nelle ultime tre prove a $1.70 \pm 0.33 \text{ g N g N}^{-1}$; questi risultati possono indicare una maggiore attività denitrificante nel reattore, come già accennato nel precedente par. 4.2.2.1.

Per quanto riguarda il rapporto NLR/NLR_{max} , si può notare che ogni superamento del 100% è corrisposto nella sperimentazione da valori elevati di concentrazione delle specie azotate; queste situazioni hanno reso necessario l'abbassamento del carico di azoto in ingresso, come già discusso in precedenza nel par. 4.2.2.1.

Tabella 4.8 - Dati riassuntivi delle prove di attività condotte

giorno di lavoro	$\Delta\text{N-NH}_4^+$	$\Delta\text{N-NO}_2^-$	NRR_{max}	R^2	dev.st.	$\text{NLR}/\text{NLR}_{\text{max}}$	$\Delta\text{NO}_2/\Delta\text{NH}_4$
[d]	[g L ⁻¹ d ⁻¹]	[g L ⁻¹ d ⁻¹]	[g L ⁻¹ d ⁻¹]	[-]	[g L ⁻¹ d ⁻¹]	[%]	[-]
7	1.33	0.92	2.25	0.976	0.20	33.85	1.45
14	1.21	0.83	2.05	0.997	0.05	41.27	1.46
22	0.67	0.56	1.23	0.994	0.05	51.67	1.19
29	0.37	0.34	0.89	0.999	0.09	61.23	1.10
35	0.31	0.26	0.57	0.995	0.03	108.10	1.20
49	0.50	0.30	0.72	0.994	0.03	72.06	1.65
71	0.48	0.34	0.82	0.997	0.02	47.62	1.41
77	0.80	0.60	1.40	0.982	0.09	41.50	1.33
86	1.20	0.83	2.04	0.993	0.12	29.70	1.45
91	1.15	1.52	2.67	1	0.00	33.91	0.76
106	1.23	1.64	2.88	0.907	0.64	21.04	0.75
120	2.28	1.80	4.08	0.988	0.31	18.52	1.27
135	2.56	3.05	5.61	1	0.08	16.17	0.84
143	1.18	0.85	2.03	0.977	0.22	29.77	1.38
147	1.23	0.91	2.13	0.900	0.49	40.13	1.35
162	1.09	0.71	1.80	0.997	0.06	24.01	1.53
168	0.30	0.22	0.51	0.971	0.02	161.03	1.37
171	0.33	0.20	0.53	1	0	-	1.69
175	0.19	0.09	0.28	0.885	0.07	145.08	2.03

4.2.2.3 Attività specifica anammox e contenuto in sostanza organica (COD)

A partire dai valori di NRR raggiunti nel corso della sperimentazione e dalla concentrazione di solidi sospesi volatili presenti nel reattore, è stata stimata l'attività specifica anammox (SAA) utilizzando la formula riportata nel par. 3.5.3.2.

Nel corso dell'attività la presenza di solidi sospesi volatili in ingresso al reattore è aumentata proporzionalmente con la frazione di refluo reale trattato.

In Figura 4.22 vengono rappresentate le concentrazioni dei solidi misurate sia sull'effluente che nel mixed liquor del reattore SBR; viene inoltre mostrata la frazione di volatili raggiunta nella miscela di fango.

La concentrazione dei solidi sospesi totali, relativi alla miscela di fango presente nell'SBR, è complessivamente diminuita nel corso della sperimentazione da 4.80 a 4.06 g TSS L⁻¹, come la concentrazione dei solidi sospesi volatili da 2.79 a 2.48 g VSS L⁻¹ (2.70±0.71 g VSS L⁻¹), mostrando entrambi un aumento iniziale con un massimo al giorno 91 (rispettivamente 6.30 g TSS L⁻¹ e 4.10 g VSS L⁻¹), e calando successivamente con un piccolo aumento nel finale del lavoro; ciò può essere ricondotto alle diverse tipologie di refluo reale utilizzate ed alle differenti frazioni di refluo applicate nel corso della sperimentazione. La frazione di volatili rispetto ai totali presente nel reattore è aumentata dal 53 al 61%, a sottolineare l'arricchimento della biomassa anammox.

La concentrazione di solidi nell'effluente è cresciuta notevolmente nel corso della sperimentazione, in particolare dal giorno 143, in corrispondenza sia di elevate frazioni di refluo reale (70% già da 24 giorni) che del cambio di tipologia di refluo, che ha comportato concentrazioni maggiori di solidi in ingresso come evidenziato in Tabella 4.13. Nonostante la durata della fase di sedimentazione del ciclo di lavoro fosse breve (5 minuti), i valori in uscita sono decisamente più bassi rispetto a quelli della miscela di fango nel reattore SBR; ciò conferma le ottime caratteristiche di sedimentabilità del fango sospeso.

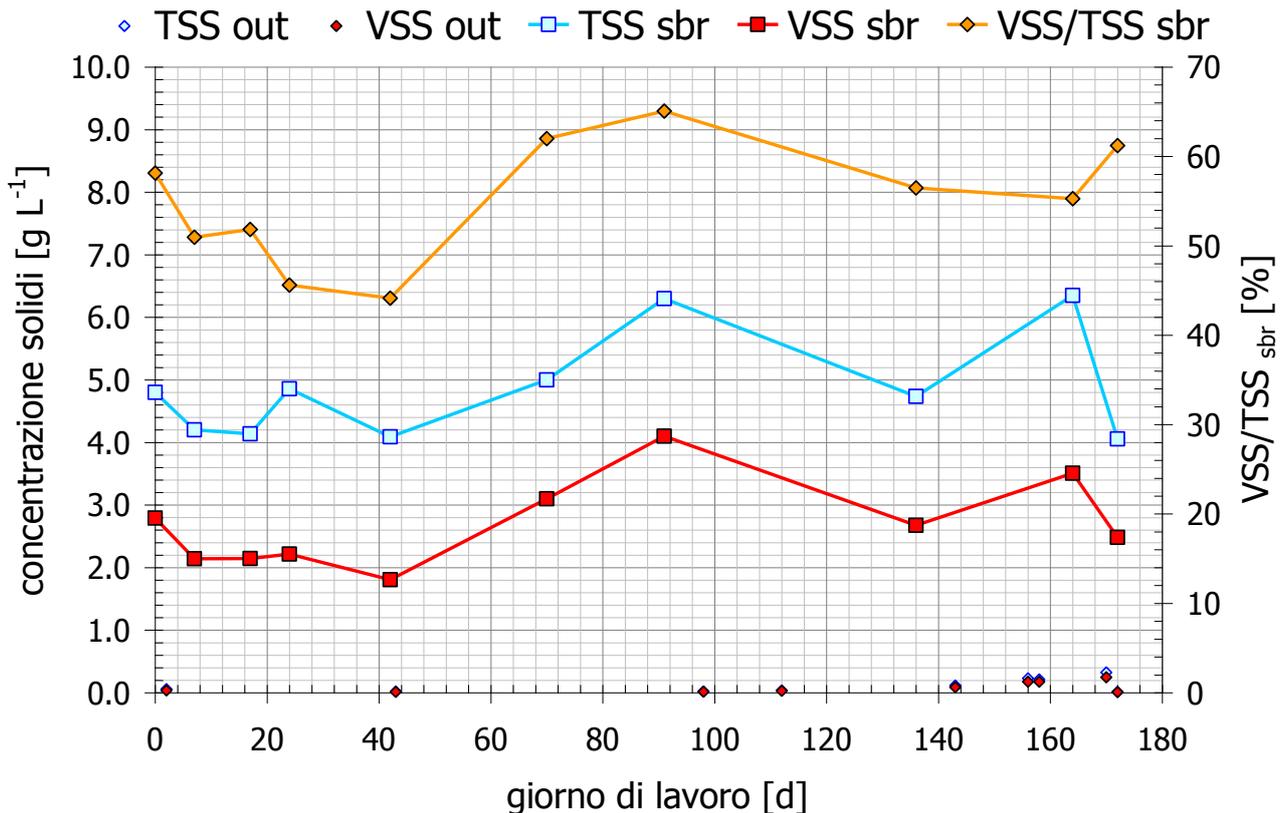


Figura 4.22 - Concentrazione dei solidi sospesi nell'effluente e nella miscela di fango; con il pedice "out" si indica l'effluente del reattore, con il pedice "sbr" si fa riferimento al mixed liquor

La SAA nel corso della sperimentazione è diminuita da 0.360 a 0.138 g N g VSS⁻¹ d⁻¹ (Figura 4.23), con valori in media pari a 0.18±0.09 g N g VSS⁻¹ d⁻¹ (considerando come specie azotate rimosse l'ammonio ed il nitrito). Il dimezzamento circa (62% di riduzione) dell'attività rispetto all'inizio del lavoro conferma in media una discreta ma non eccessiva inibizione dovuta all'effetto del refluo reale sulla popolazione batterica anammox, che risulta importante in particolare per influente costituito da solo refluo reale non diluito (100%); l'effetto della sostituzione al 70% in volume con l'inibente ha portato ad un abbassamento della SAA di circa il 36% (da 0.360 g N g VSS⁻¹ d⁻¹ iniziali a mediamente 0.230±0.024 g N g VSS⁻¹ d⁻¹).

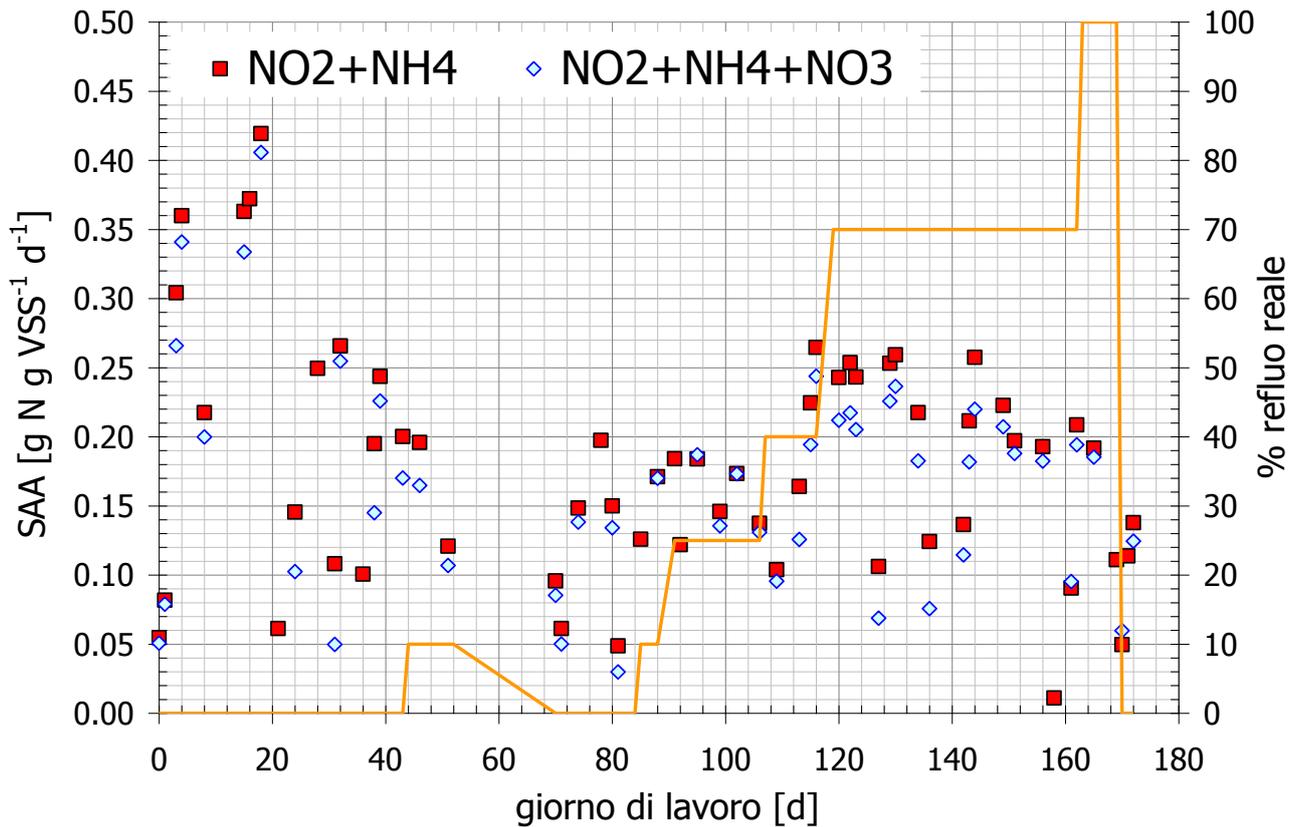


Figura 4.23 - Attività specifica anammox nel corso della sperimentazione, differenziata a seconda delle specie azotate considerate nel calcolo della stessa; in arancione si evidenzia la frazione di refluo reale nell'alimento (scala di riferimento a destra)

Per quanto riguarda la presenza nel sistema della sostanza organica, a partire dalle analisi di COD solubile effettuate sull'alimento in ingresso al reattore e sul surnatante effluente dall'SBR, si è stimata una rimozione di COD solubile variabile tra 5 e 45 mg sCOD L⁻¹ d⁻¹, dal giorno 0 al giorno 134 di lavoro.

Dal giorno 135 al giorno 165 si evidenziano alcune variazioni sostanziali nell'attività:

- dal giorno 154 è aumentata la concentrazione di solidi e di COD nell'influente al reattore SBR, dopo il cambio di tipologia del refluo reale (campione 2, Tabella 3.2);
- nei giorni dal 159 al 161 (fine settimana) il reattore è stato mantenuto a 15 °C senza alimentazione;
- dal giorno 163 è stata aumentata la frazione di refluo reale al 100%.

In conseguenza delle suddette modifiche alle caratteristiche dell'influente, si registra in uscita al reattore un aumento importante della concentrazione di COD, che raggiunge i 700 mg COD L⁻¹. Dato che tra il giorno 135 ed il giorno 165 non sono disponibili ulteriori dati di concentrazione di COD, e dal momento che il reattore non ha lavorato in stato stazionario, non è stato possibile stimare la rimozione del COD.

Al giorno 168 si è verificato un ulteriore aumento della concentrazione in termini di COD e di TSS nell'alimento, dovuto alla modifica della tipologia di refluo reale (campione 3, vedi Tabella 3.2) caratterizzato da un contenuto di COD e TSS molto più elevato dei precedenti campioni di refluo. Dal giorno 168 sino a termine della sperimentazione è stata

determinata una rimozione di sCOD pari a circa 185 mg COD L⁻¹ d⁻¹, applicando il bilancio dinamico di massa nel reattore SBR.

In Tabella 4.9 sono riassunte le concentrazioni di COD solubile nell'influente e nell'effluente del reattore, suddivise in funzione delle differenti frazioni di refluo reale presenti nell'alimento in ingresso al reattore (il sCOD è stato considerato escludendo la componente relativa ai nitriti).

Tabella 4.9 - Concentrazioni di COD in ingresso ed uscita dal reattore SBR nel corso della sperimentazione, suddivise per frazioni di refluo reale crescenti nell'influente

giorno di lavoro	% r.r.	sCOD _{in} [mg L ⁻¹]	sCOD _{out} [mg L ⁻¹]
2	0	-	-
44	10	92	80
105	25	266	180
120	40	260	186
135	70	454	444
165	100	1598	716
169	100	2629	1557

4.2.2.4 Risultati di letteratura

In Tabella 4.10 sono riportati i principali studi in letteratura riguardo l'applicazione del processo anammox al trattamento della frazione liquida del digestato zootecnico, a seguito di parziale nitrificazione. Tutti gli studi riportati sono relativi a digestato da deiezioni suine, mentre nel nostro studio il digestore è stato alimentato anche con pollina e colture energetiche (in particolare con mais). I risultati presenti in letteratura riguardano sistemi di lavoro che utilizzano refluo reale diluito in proporzioni maggiori rispetto alla presente sperimentazione (refluo diluito da 2 a 10 volte), e caratterizzato da concentrazioni di ammonio e nitrito influenti di circa 3÷4 volte inferiori a quelle mantenute nel nostro studio. Alcuni autori indicano la necessità di un pretrattamento preliminare dell'influente al fine di rimuovere i solidi presenti, attraverso un processo di chiari-flocculazione (Yamamoto et al., 2008) o di filtrazione (Yamamoto et al., 2011), considerando quest'ultimo come la migliore soluzione operativa. Altri autori hanno deciso di lavorare mantenendo valori di HRT estremamente bassi (0.2 d, Quiao et al. (2010)), con lo scopo di ridurre i potenziali effetti inibitori legati alla presenza di elevate concentrazioni di sostanze organiche lentamente biodegradabili. La presente sperimentazione è stata condotta mantenendo concentrazioni influenti di azoto totale stabili nel tempo, attorno a 1.32±0.18 mg N L⁻¹ e paragonabili a quelle attese in un impianto a scala reale. La frazione di refluo reale trattata è stata gradualmente aumentata fino al 100%, senza effettuare operazioni di pretrattamento sullo stesso refluo. Il NLR applicato è stato mantenuto costante nel corso della sperimentazione (0.54±0.15 g N L⁻¹ d⁻¹), anche se la massima capacità di rimozione di azoto nel reattore ha raggiunto i 5.61 g N L⁻¹ d⁻¹, in corrispondenza di una percentuale di refluo reale nell'SBR del 70% (giorno 135).

Tabella 4.10 - Confronto tra la presente sperimentazione ed i principali studi presenti in letteratura sul trattamento del digestato zootecnico

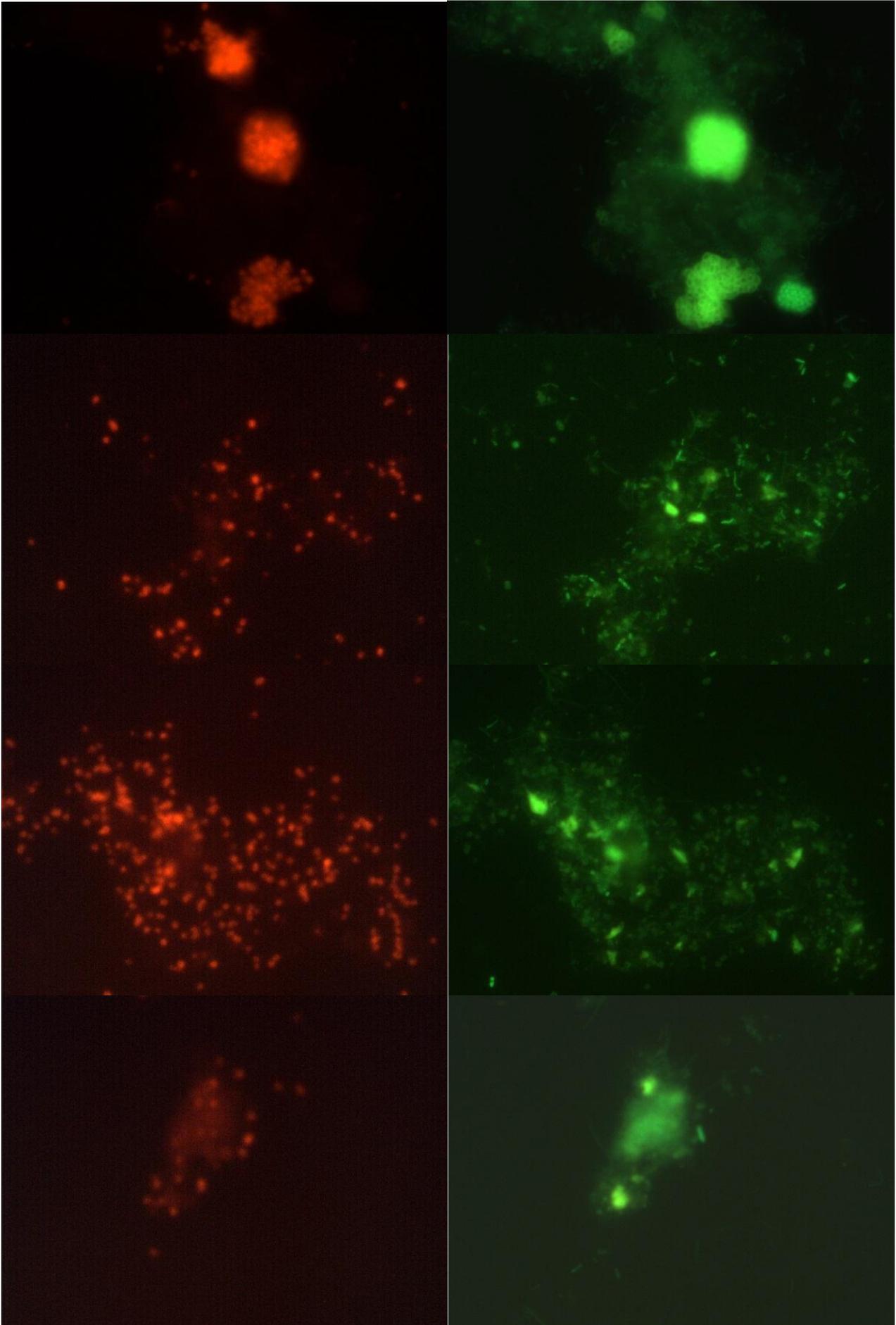
riferimento in letteratura	Hwang et al. (2005)	Yamamoto et al. (2008)	Quiao et al. (2010)	Yamamoto et al. (2011)	presente studio (2011)
tipologia del sistema di lavoro	reattore a letto di fango con flusso ascendente	reattore a letto fisso con flusso ascendente	reattore granulare	reattore a colonna con flusso ascendente	reattore SBR granulare
pretrattamento refluo influente	non indicato	chiari-flocculazione	non previsto	filtrazione su supporto in poliestere	non previsto
volume reattore [L]	1	2.85	0.73	3	6
temperatura di esercizio [°C]	35	35	30	30	36÷38
HRT applicato [d]	2.5	0.5	0.2	0.125	2.47±0.51
frazione refluo reale testata [%]	40	25	50	10-15	10-70
Concentrazione N-NH₄⁺ e N-NO₂⁻ influente [mg N L⁻¹]	213±32 323±34	76±4 111±4	213±94 212±94	117±6 130±15	655±15 744±15
NLR-NRR [g L⁻¹ d⁻¹]	1.36-0.72	0.39-0.22	4.10-3.12	2.20-2.00	0.57±0.11 0.49±0.15

4.2.2.5 Riscontri da analisi microbiologiche FISH

I risultati delle analisi FISH mostrano la presenza costante degli organismi anammox, all'interno della miscela di fango presente nel reattore SBR. Questa evidenza è confermata dal fatto che tutti gli organismi sono filogeneticamente affiliati con la specie anammox rilevata, quale Candidatus "Brocadia anammoxidans", che riflette la composizione dell'inoculo iniziale, e nessun cambiamento di popolazione è stato osservato durante la sperimentazione.

In Tabella 4.11 vengono mostrate alcune fotografie relative ad immagini FISH, ottenute in momenti successivi nel corso della sperimentazione (giorno di lavoro 0 - 50 - 98 - 113), mettendo a confronto i risultati ottenuti sul medesimo campione rispettivamente con la sonda BAN162 (per il Candidatus "Brocadia anammoxidans") e con le sonde EUB338I+EUB338II+EUB338III (per il rilevamento della maggior parte dei batteri, eubatteri).

Tabella 4.11 - Immagini FISH relative al Candidatus "Brocadia anammoxidans" (colonna a sinistra), a confronto con il rilevamento degli Eubatteri (colonna a destra), ottenute in momenti successivi nel corso della sperimentazione (righe dall'alto: giorno di lavoro 0 - 50 - 98 - 113)



5 Conclusioni

L'obiettivo generale di questa tesi è stato quello di esplorare la fattibilità del processo biologico avanzato anammox per ridurre il contenuto in azoto da reflui zootecnici (digestato agricolo), al fine di conformarsi alla Direttiva Europea sui nitrati (91/676/CEE). Questa tesi fa parte di un progetto più ampio (progetto BRAIN), in cui vengono considerati quali processi biologici per il trattamento della frazione liquida del digestato agricolo sia la nitrificazione-denitrificazione (processo definito DENO2) che la rimozione autotrofa dell'azoto in reattori separati (nitrificazione parziale e anammox). Il progetto BRAIN prevede sia uno studio su scala pilota in merito all'applicazione del processo DENO2, sia differenti studi a scala di laboratorio sul processo anammox; la presente tesi si è occupata dell'adattabilità del trattamento anammox in reattore granulare SBR, analizzando inoltre l'accrescimento e l'acclimatazione della popolazione batterica.

Arricchimento ed acclimatazione della biomassa anammox

La coltivazione in modalità continua tramite reattore SBR di tre dei campioni di fango arricchiti, ha consentito l'aumento costante della capacità di rimozione dell'azoto da parte della popolazione batterica, attraverso il processo anammox.

La fase sperimentale di arricchimento e di acclimatazione della biomassa anammox ha in generale mostrato un aumento del NRR proporzionale al carico di azoto applicato, che è stato incrementato da $0.013 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ del giorno 41 a $0.22 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ del giorno 122, a seguito di una fase di latenza iniziale di circa 40 giorni, durante i quali l'attività anammox analizzata è risultata molto bassa in quanto si sono accumulati nel reattore più della metà dell'ammonio e del nitrito alimentato. Questa fase di latenza iniziale potrebbe essere dovuta all'adeguamento della biomassa anammox alle condizioni di lavoro.

In seguito le concentrazioni di ammonio e nitrito nell'effluente sono rapidamente diminuite ($5 \pm 8 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ e $4 \pm 8 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$); inoltre la concentrazione di nitrati nell'effluente, dopo la fase di lag iniziale, è incrementata da 37 a $130 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, confermando l'intensificazione dell'attività anammox nel reattore.

L'attività specifica anammox nel reattore SBR a conclusione della sperimentazione è risultata pari a $0.58 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, con un aumento di circa 7 volte in 85 giorni, dopo la fase di latenza. La popolazione anammox si è dimostrata selezionabile con buona efficienza dopo arricchimento in fed-batch, con un periodo di acclimatazione in reattore SBR di circa 40 giorni, portando ad un'attività di rimozione anammox a regime stimata intorno al $85.1 \pm 3.8\%$. Questa percentuale è cresciuta notevolmente rispetto alla fase di latenza iniziale, passando dal $64 \pm 15\%$ al $85 \pm 4\%$; ciò evidenzia l'arricchimento e la selezione della popolazione batterica anammox sino ad una condizione di equilibrio del sistema.

La concentrazione di TSS, relativi alla miscela di fango presente nell'SBR, è diminuita nel corso della sperimentazione, mentre la concentrazione di VSS è lievemente aumentata

passando da 0.30 a 0.35 g VSS L⁻¹; la frazione di volatili rispetto ai totali presente nel reattore è aumentata notevolmente dal 53 al 78%, a sottolineare l'arricchimento della biomassa anammox in volatili e l'importante crescita della SAA. La concentrazione di solidi nell'effluente è rimasta piuttosto stabile nel corso della sperimentazione (10-15 mg L⁻¹ VSS-TSS), confermando le buone caratteristiche di sedimentabilità del fango sospeso.

I risultati positivi ottenuti hanno confermato che la soluzione di trattamento attraverso reattore SBR risulta una buona opzione per l'arricchimento della biomassa anammox, con una possibile riduzione dei tempi di arricchimento e selezione della popolazione batterica.

Processo anammox di trattamento del refluo

Le analisi dell'attività batterica anammox mediante metodo manometrico, effettuate in parallelo con la sperimentazione nel reattore SBR, hanno dimostrato di essere un valido strumento di monitoraggio del sistema nel corso dello studio, dal momento che il consumo totale del substrato limitante (nitrito) viene evidenziato con efficacia nei dati sperimentali dal cambiamento di pendenza della curva di pressione; la possibilità di avvalersi di questo strumento ha contribuito nella valutazione preventiva del carico di azoto sostenibile in ingresso al reattore SBR, oltre che ad evitare l'accumulo di nitrito nello stesso durante l'attività, evitando problematiche di inibizione della popolazione batterica.

Le prove manometriche di inibizione in batch hanno evidenziato una bassa influenza del refluo reale utilizzato sull'attività anammox, sia nel breve che nel lungo periodo (da 24÷72 ore fino a decine di giorni), in particolare con percentuali di sostituzione del surnatante comprese tra 0 e 70%. In alcuni casi inoltre si è notata una leggera crescita dell'attività anche dopo sostituzione del mezzo con il 70% di refluo reale, effetto che potrebbe indicare un'azione stimolante del refluo sulla biomassa anammox. L'inibizione diventa importante per percentuali maggiori (85÷100), in particolare per reflui contenenti pollina, registrando decrementi importanti della SAA già a 24 e 48 ore dall'inizio della prova (38% e 60%). Questi valori indicano con elevata probabilità un effetto inibente del refluo in queste proporzioni, e nello specifico della pollina, già nel breve periodo, che contribuisce al netto calo dell'attività anammox, persino maggiore dell'effetto della medesima sostituzione con refluo senza pollina. Adottando un refluo reale senza diluizione e senza pollina, l'inibizione a 24 ore risulta limitata, e diventa importante (calo del 34.4%) dopo 48 ore. Questo effetto negativo del refluo tal quale è confermato dal calo repentino di attività registrato nel reattore SBR, al passaggio dal 70% al 100% nell'alimento.

Queste considerazioni portano ad affermare con elevata probabilità che la condizione ottimale e più stabile in cui gestire il processo anammox, su reflui zootecnici della tipologia utilizzata nel presente studio, si raggiunge adottando una frazione di inibente compresa tra il 40 e il 70%.

In funzione dei test di attività ed inibizione condotti, il reattore SBR è stato alimentato con frazioni crescenti di refluo reale (effluente del DENO2), diluite con quantità decrescenti e proporzionali di mezzo sintetico minerale.

L'efficienza di rimozione del processo anammox è rimasta costantemente elevata nel corso della sperimentazione, stabile su valori di NRR/NLR del 90.6±8.1%, mentre il carico massimo di azoto trattabile (NRR_{max}) nel reattore è aumentato di circa 4 volte dall'inizio, raggiungendo 5.61 g N L⁻¹ d⁻¹. Il rapido aumento del NRR_{max} nel reattore può essere ricondotto sia ad una selezione ed una crescita importante della biomassa granulare

anammox, sia all'aumento del tasso di rimozione dell'azoto (NRR); la prima ipotesi è confermata dalla stima dell'apporto anammox al processo di rimozione dell'azoto, che evidenzia una percentuale di attività anammox costantemente superiore all'85%, e crescente dopo ogni aumento della frazione di inibente; la seconda è legata ad un probabile raggiungimento delle condizioni ottimali di lavoro del sistema (temperatura e/o nutrienti). L'aumento osservato del NRR_{max} nel reattore tra i giorni di lavoro 70 e 135 è infatti risultato contemporaneo all'aumento della frazione di refluo reale nell'alimento (dal 10 al 70%). Questo suggerisce che non si sono presentati effetti avversi del refluo reale sull'attività anammox, fino al mantenimento nel reattore di una percentuale di refluo reale pari al 70% in volume.

In seguito si sono registrati due momenti di calo dell'attività anammox. La prima diminuzione del NRR_{max} è stata registrata in corrispondenza della chiusura del laboratorio, durante la quale il reattore è stato mantenuto per 5 giorni a temperatura ambiente (15 °C) senza miscelazione, con una percentuale di refluo reale nel reattore pari al 70%. La seconda diminuzione ha avuto luogo dopo alcuni giorni di alimentazione di refluo reale non diluito (100%); in questa situazione le componenti organiche e i solidi alimentati nel reattore sono aumentati notevolmente, favorendo la crescita della biomassa eterotrofa. Per giustificare le perdite di attività anammox registrate durante la sperimentazione, possono essere effettuate le seguenti ipotesi:

- le perdite potrebbero essere state causate da sostanze già presenti nel refluo reale, con una concentrazione soglia inibitore che è stata raggiunta quando è stata ridotta la diluizione con mezzo sintetico (acidi fulvici, acidi umici, antibiotici);
- le perdite potrebbero derivare da sostanze prodotte nel reattore in seguito ad idrolisi della sostanza organica lentamente degradabile presente nell'influente. Il tasso di idrolisi può essere stato aumentato con il tempo, come la crescita della biomassa eterotrofa è stata sostenuta dalla sostanza organica alimentata durante la sperimentazione, con una maggiore concentrazione di COD e solidi volatili nell'influente; questa situazione potrebbe anche essere stata accentuata durante i 5 giorni di inattività a 15 °C.

Inoltre nel secondo caso la perdita di attività è occorsa dopo 3 giorni di alimentazione con solo refluo reale (non diluito), e potrebbe essere stata favorita dall'elevato contenuto in solidi e COD dell'influente.

Nel corso della sperimentazione l'attività specifica anammox è diminuita da 0.360 a 0.138 g N g VSS⁻¹ d⁻¹, con un calo del 62%; ciò conferma in media una discreta ma non eccessiva inibizione dovuta all'effetto del refluo reale sulla popolazione batterica anammox, che risulta importante in particolare per l'influente costituito da solo refluo reale non diluito (100%), mentre l'effetto della sostituzione al 70% in volume con l'inibente ha portato ad un abbassamento della SAA di circa il 36%.

I dati sperimentali disponibili sono insufficienti per trarre una conclusione definitiva sulle cause dell'inibizione sull'attività. Altre valutazioni sono pertanto necessarie per chiarire questi aspetti. Nel seguito sarebbe anche interessante analizzare se l'origine dell'inibizione è dovuta da composti solubili o particolati, al fine di individuare efficaci soluzioni di pretrattamento del refluo.

L'alimento influente al reattore SBR, utilizzato nel presente studio, è costituito dall'effluente del processo DENO2 (vedi par. 3.6.2), dove le concentrazioni delle specie

azotate sono state adeguate alle esigenze della sperimentazione mediante opportuno dosaggio di sali di ammonio e nitrito. Nonostante l'alimento testato sia differente dall'effettivo effluente di un processo di nitrificazione parziale, i risultati sperimentali ottenuti possono essere considerati indicativi della risposta della biomassa anammox a questa tipologia di refluo; difatti la presenza di potenziali inibitori, quali recalcitranti organici di metalli pesanti, non varia in modo significativo.

In conclusione si può affermare che il processo anammox risulta essere applicabile a questa tipologia di refluo, utilizzando una diluizione moderata dello stesso fino al 30% circa in volume sul totale in ingresso al reattore, in linea con quanto già verificato nelle prove manometriche di inibizione, senza la necessità di applicare alcun pretrattamento. Questo risultato deve essere confermato da una ulteriore sperimentazione a lungo termine in condizioni stabili. Da sottolineare inoltre il fatto che il sistema è sempre stato sottocaricato rispetto alle massime potenzialità di rimozione dell'azoto (al $37.5 \pm 15.8\%$), perciò esistono notevoli margini di miglioramento per quanto concerne la valutazione del livello di applicabilità del processo anammox.

Analisi complessiva della sperimentazione

Gli studi condotti a scala di laboratorio, quali l'arricchimento di biomassa anammox in reattore SBR e la valutazione dell'applicabilità del processo anammox a digestati zootecnici, hanno permesso di trarre le seguenti conclusioni sul processo anammox e sulle sue applicazioni pratiche:

- l'attività di monitoraggio del processo anammox attraverso i test manometrici è risultata essere un potente strumento per valutare l'effettiva capacità di rimozione dell'azoto, rilevando inoltre eventuali fenomeni e condizioni di inibizione o riduzione dell'attività, e favorendo quindi in questo modo la valutazione del carico di azoto sostenibile dal sistema;
- le prove di attività ed inibizione, essendo state condotte in parallelo con l'attività nel reattore SBR, hanno consentito di valutare preventivamente l'effetto del refluo reale a determinate diluizioni dello stesso nell'influente, e di programmare l'incremento del carico di azoto in ingresso, insieme alle informazioni fornite dai test di valutazione del massimo carico di azoto trattabile (NRR_{max}) condotti direttamente sul reattore;
- le fasi di latenza ed i periodi caratterizzati da ratei di crescita variabili dell'attività anammox, sono stati evidenziati in entrambe le sperimentazioni su scala di laboratorio, e sono probabilmente correlati a temporanee condizioni sub-ottimali nel reattore (ad esempio: temperatura elevata, mancanza di nutrienti) ma non sempre attribuibili a cause specifiche, a questo livello di studio;
- il reattore SBR a scala di laboratorio, inoculato con biomassa granulare anammox, ha consentito un soddisfacente tasso di rimozione dell'azoto in media pari a $0.54 \pm 0.07 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, con livelli di diluizione del refluo testato compresi tra il 30 ed il 60%; l'alimento influente è sembrato inoltre esercitare un effetto di stimolazione sulla crescita anammox, poiché il NRR_{max} è aumentato di 4 volte in 60 giorni raggiungendo i $5.61 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$;
- il processo anammox risulta ben applicabile a reflui zootecnici a condizione che venga considerata almeno una diluizione del 30% del refluo reale in esame, mentre

per diluizioni inferiori si verifica un calo notevole dell'attività anammox; l'inibizione potrebbe essere ricondotta ad uno o più composti già presenti nel refluo reale (ad esempio antibiotici, acidi fulvici, acidi umici) od a molecole che sono state prodotte nel reattore (ad esempio per idrolisi della sostanza organica lentamente degradabile).

Per quanto riguarda le prospettive future e le esigenze di ricerca, bisogna sottolineare la necessità di una sperimentazione a lungo termine per confermare pienamente la fattibilità del processo autotrofo anammox per il trattamento del digestato agricolo. Un impianto su scala pilota è già in fase di avviamento, in loco presso il reattore DENO2, il quale viene commutato in un reattore SBR a nitrificazione parziale seguito da un reattore SBR inoculato con biomassa anammox granulare; allo stesso modo il reattore SBR con biomassa granulare anammox a scala di laboratorio, utilizzato nella presente tesi, verrà alimentato in un prossimo studio con il refluo in uscita da un reattore par-nit MBR sempre presente nel laboratorio sperimentale, per valutare la fattibilità del processo in parallelo con il pilota di Corte Grande. Una sfida problematica sarà ottenere un effluente adatto per il reattore anammox in termini di rapporto molare $\Delta\text{N-NO}_2^-/\Delta\text{N-NH}_4^+$ stabile, con concentrazione pressoché nulla di nitrati e basso contenuto residuo di sostanza biodegradabile organica. Allo stesso modo saranno necessarie ulteriori analisi per identificare le cause dei fenomeni di inibizione dell'attività anammox evidenziati; studiando inoltre se l'origine dell'inibizione è da ricondurre a composti solubili o particolati, individuando efficaci opzioni preliminari di pretrattamento al fine di eliminare la necessità di diluizione del refluo e consentire l'acclimatazione a lungo termine.

6 Riferimenti

- Abeling, U. and Seyfried, C.F. (1992) Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater - nitrogen removal via nitrite. *Wat. Sci. Tech.* 26(5-6), 1007-1015.
- Abma, W.R., Schultz, C.E., Mulder, J.W., Van der Star, W.R.L., Strous, M., Tokutomi, T. and Van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Full scale granular sludge Anammox® process. *Water Sci. Technol.* 55 (8-9), 27-33.
- Abma, W. R., W. Driesen, R. Haarhuis, and M. C.M. van Loosdrecht (2009) Upgrading of sewage treatment plant by sustainable & cost-effective separate treatment of industrial wastewater, p. 185–194. In Lemtech Konsulting (ed.), Second IWA specialized conference: Nutrient Management in Wastewater Treatment Systems, Krakow, Poland.
- Ahn Y. H., Hwang I. S. and Min K. S. (2004). ANAMMOX and partial denitrification in anaerobic nitrogen removal from piggery waste. *Wat. Sci. Tech.*, 49(5-6),145-153.
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48 (5), 835–852.
- Arrojo, B., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L. and Mendez, R. (2006). Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR). *Journal of Biotechnology* 123 (4), 453-463.
- Bettazzi E., Caffaz S., Vannini C. and Lubello C. (2009). Nitrite inhibition and intermediates effects on Anammox bacteria: A batch-scale experimental study. *Process Biochemistry*, 45 , 573–580.
- Bicudo, J.R., Svoboda, I.F., 1995. Intermittent aeration of pig slurry – farm scale experiments for carbon and nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* 32 (12), 83–90.
- Blackburne R, Yuan Z. and Keller J. (2008) Demonstration of nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Water Res.* 42(8-9):2166-76.
- Bonmatí A., Flotats X. (2003) Air stripping of ammonia from pig slurry: characterisation and feasibility as a pre- or post-treatment to mesophilic anaerobic digestion. *Waste Management*;23(3):261-272.
- Bortone, G., Gemelli, S., Rambaldi, A., Tilche, A. (1992) Nitrification, denitrification and biological phosphate removal in sequencing batch reactors treating piggery wastewater. *Water Sci. Technol.* 26 (5–6), 977–985.
- Broda, E. (1977) Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 17: 491–493.
- Burton C.H. (2007) The potential contribution of separation technologies to the management of livestock manure. *Livestock Science* 112 (2007) 208–216.
- Canziani R., Emondi V., Garavaglia M., Malpei F., Pasinetti E., Buttiglieri G. (2006). Effect of oxygen concentration on biological nitrification and microbial kinetics in a cross-flow membrane bioreactor (MBR) and moving-bed biofilm reactor (MBBR) treating old landfill leachate. *Journal of Membrane Science*, 286, 202-212.
- Cervantes-Carrillo, F., Pérez, J. y Gómez, J. (2000). Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42, 73-82.
- Chamchoi N. and Nitorisavut S. (2007). Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere*, 66, 2225–2232.
- Choi E., Eum Y., Gil K. I. and Oa S. W. (2004). High strength nitrogen removal from nightsoil and piggery wastes. *Wat. Sci. Tech.*, 49(5-6), 97-104.
- Dapena-Mora A., Fernandez I., Campos J.L., Mosquera-Corral A., Mendez R., Jetten M.S.M. (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme Microbiol Technol.*, 40, 859-865.
- Dapena-Mora A., Van Hulle S.W.H., Campos J.L., Méndez-Pampin R., Vanrolleghem P.A. and Jetten M. (2004). Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results. *Chem. Technol. Biotechnol.*, 79, 1421–1428.
- Dapena-Mora, A., J. L. Campos, A. Mosquera-Corral, and R. Méndez (2006) Anammox process for nitrogen removal from anaerobically digested fish canning effluents. *Water Sci. Technol.* 53:265–274.
- De Graaff, M. S., G. Zeeman, H. Temmink, M.C. M. van Loosdrecht, and C. J. N. Buisman (2009) Combined anaerobic treatment and autotrophic nitrogen removal from black water. In Lemtech Konsulting (ed.),

- Proceedings of the Second IWA specialized conference: Nutrient Management in Wastewater treatment systems, 6-9 September, Krakow, Poland, 963–970.
- Deng L.W., Cai C. and Chen Z., The treatment of pig slurry by a full-scale Anaerobic Adding Raw Wastewater-Intermittent Aeration Process, *Biosystems Engineering* (2007), 98 (3), 327-334
- Dong X. e Tollner E.W. (2003). Evaluation of ANAMMOX and denitrification during anaerobic digestion of poultry manure. *Bioresource Technology*, 86, 139-145.
- Dosta J., Fernandez I., Vazquez-Padín J.R., Mosquera-Corral A., Campos J.L., Mata-Alvarez J., Mendez R. (2008) Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *Journal of hazardous materials*; 154(1):688.
- Dosta J., Galí A., Benabdallah El-Hadj T., Macé S., Mata-Alvarez, J. (2007) Operation and model description of a sequencing batch reactor treating reject water for biological nitrogen removal via nitrite. *Bioresour. Technol.* 98, 2065–2075.
- Dosta J., López-Palau S, Mata-Alvarez J. (2008) Study of the biological N removal over nitrite in a physico-chemical-biological treatment of digested pig manure in a SBR. *Water Sci Technol.*;58(1):119-25.
- Egli K., Fanger U., Alvarez P.J., Siegrist H., van der Meer J.R., Zehnder A.J. (2001). Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* 175, 198–207.
- Evans, M.R., Smith, M.P.W., Deans, E.A., Svoboda, I.F., Thacker, F.E., (1986). Nitrogen and aerobic treatment of slurry. *Agric. Wastes* 15, 205–213.
- Fernández I, Mosquera-Corral A, Campos JL, Méndez R. (2009) Operation of an anammox SBR in the presence of two broad-spectrum antibiotics. *Process Biochemistry.* 4;44(4):494-8.
- Fernández, I., Dosta J., Fajardo C., Campos J.L., Mosquera-Corral A., Méndez R. (2010) Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the Anammox process, *Journal of Environmental Management*, doi:10.1016/j.jenvman.2010.10.044.
- Fux C. (2003). Biological nitrogen elimination of ammonium-rich sludge digester liquids. PhD Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland. DISS. ETH NO. 15018.
- Fux C., Siegrist H.R. (2004) Nitrogen removal from sludge digester liquids by nitrification/denitrification or partial nitritation/anammox: environmental and economical considerations. *Water Science and Technology*, 50(10), 19–26.
- Fux, C., Marchesi, V., Brunner, I., Siegrist, H. (2004). Anaerobic ammonium oxidation of ammonium-rich waste streams in fixed-bed reactors. *Water Science and Technology* 49 (11/12), 77-82.
- Ganigué R., Lopez H., Balaguer M.D., Colprim J. (2007) Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. *Water Research*, 41:3317–3326.
- Grady, J., Daigger, G., Lim H. (1999). *Biological wastewater treatment*. Marcel Dekker: New York.
- Gut L. (2006) Assessment of a partial nitritation/anammox system for nitrogen removal, TRITA-LWR Licentiate Thesis 2034, ISSN 1650-8629, ISBN 91-7178-167-6.
- Gut L, Płaza E, Trela J, Hultman B, Bosander J. (2006) Combined partial nitritation/Anammox system for treatment of digester supernatant. *Wat. Sci Technol.* 53(12):149-59.
- Hellinga C, Schellen A.A.J.C, Mulder, J.W, Van Loosdrecht, M.C., Heijnen J. J (1998) "The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonia-rich wastewater". *Wat. Sci. Tech.*, 37 (9): 135-142.
- Helmer-Madhok, C., Schmid, M., Filipov, E., Gaul, T., Hippen, A., Rosenwinkel, K-H., Seyfried, C.F., Wagner, M. and Kunst, S. (2002). Deammonification in biofilm systems: population structure and function. *Water Sci. Technol.* 46 (1-2), 226-231.
- Hippen A., Rosenwinkel K.H., Baumgarten G., Seyfried C.F. (1997) Aerobic deammonification - a new experience in the treatment of wastewaters. *Wat. Sci. Tech.*35: 111-120.
- Hwang L.S., Min K.S., Choi E., Yun Z. (2005). Nitrogen removal from piggery waste using the combined SHARON and ANAMMOX process. *Wat. Sci. Tech.*, 52(10–11), 487–494.
- Isaka K., Suwa Y., Kimura Y., Yamagishi T., Sumino T., Tsuneda S. (2008) Anaerobic ammonium oxidation (anammox) irreversibly inhibited by methanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81:379–385.
- Jetten, M.S.M., Strous, M., Van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., Van Dongen, L., Van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., Van Loosdrecht, M.C.M. and Kuenen, J.G. (1999) The anaerobic oxidation of ammonia. *FEMS Microbiol. Reviews* 22 (5), 421-437.
- Joss A., Salzgeber D., Eugster J., König R., Rottermann K., Burger S., Fabijan P., Leumann S., Mohn J. and Siegrist H. (2009) Full-scale Nitrogen Removal from Digester Liquid with Partial Nitritation and Anammox in One SBR. *Environ. Sci. Technol.* 43: 5301-5306.
- Jubany I. G. (2007) Operation, modelling and automatic control of complete and partial nitrification of highly concentrated ammonium wastewater, PhD thesis, Universitat autònoma de Barcelona.

- Jubany I. G., Lafuente J., Baeza J.A., Carrera J. (2009) Total and stable washout of nitrite oxidizing bacteria from a nitrifying continuous activated sludge system using automatic control based on oxygen uptake rate measurements. *Water Research* 43, 2761–2772.
- Jung, J.Y., Kang, S.H., Chung, Y.C., Ahn, D.H. (2007) Factors affecting the activity of Anammox bacteria during start up in the continuous culture reactor. *Water Science and Technology* 55 (1/2), 459-468.
- Karakashev D., Schmidt J. E., and Angelidaki I., Innovative process scheme for removal of organic matter, phosphorus and nitrogen from pig manure, *Water Research*, 2008, 42(15), 4083-4090
- Kartal B., Rattray J., van Niftrik L.A., van de Vossenberg J., Schmid M.C., Webb R.I., Schouten S., Fuerst J.A., Damsté J.S., Jetten M.S., Strous M. (2007) Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria.. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 39-49.
- Kimura Y., Isaka K., Kazama F. and Sumino T. (2010) Effects of nitrite inhibition on anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86:359-365.
- Kuai L., W. Verstraete (1998). Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4500–4506.
- Kuenen J.G. (2008) Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature*, 6, 320-326.
- Li A., Sun G., Xu M. (2008) Recent patents on anammox process. *Recent Patents on Engineering*, 2(3), 189-194.
- Liang Z., Liu J. (2008) Landfill leachate treatment with a novel process: Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) combined with soil infiltration system. *Journal of Hazardous Material*, 151(1), 202.212.
- Liao P.H., Chen A., Lo K.V. (1995) Removal of nitrogen from swine manure wastewaters by ammonia stripping. *Bioresource Technology*; 54(1):17-20.
- Ling D. (2009) Experience from commissioning of full-scale DeAmmon® plant at Himmerfjorden (Sweden). *Proceedings IWA 2nd specialized conference "Nutrient management in wastewater treatment processes"* Krakow (PL), 6-9 September 2009, pp. 403-410.
- Lopez H., Puig S., Ganigué R., Rusalleda M., Balaguer M., Colprim J. (2008). Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters. *Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 233-241.
- Lotti T. (2011) Study of the anammox process: physiological aspects for full-scale implementation. PhD Thesis. Università della Basilicata (I), pp. 122.
- Mace, S., Mata-Alvarez, J., (2002) Utilization of SBR technology for wastewater treatment: an overview. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41, 5539–5553.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (1997). *Brock. Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Masse L., Massé D.I., Pellerin Y. (2007) The use of membranes for the treatment of manure: a critical literature review. *Biosystems Engineering* 12; 98(4):371-380.
- Maurer M., Schwegler P. And Larsen T.A. (2003) Nutrient in urine: energetic aspects of removal and recovery. *Water Sci. Technol.* 48(1), 37-46.
- Melse R.W. and Verdoes N., (2005) Evaluation of Four Farm-scale Systems for the Treatment of Liquid Pig Manure. *Biosystems Engineering.* 92 (1), 47–57
- Metcalf & Eddy (2003) *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*, 4^o Ed., revised by Tchobanoglous E., Burton F.L., Stensel H. D., Mc Graw Hill, ISBN 007-124140-X.
- Molinuevo B., Garcia M.C., Karakashev D., Angelidaki I. (2009). Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: Effect of organic matter content on process performance. *Bioresource Technology*, 100(7), 2171-2175.
- Møller, H.B., Lund, I., Sommer, S.G. (2000). Solid–liquid separation of livestock slurry: efficiency and cost. *Bioresource Technology*, 74, 223–229.
- Møller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K. (2002). Separation efficiency and particle size distribution in relation to manure type and storage conditions. *Bioresour. Technol.* 85, 189–196.
- Mosquera-Corral, A., Gonzalez, F., Campos, J.L., Mendez, R. (2005). Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochem.* 40, 3109–3118.
- Motta M., Arricchimento ed accrescimento di biomassa anammox per la rimozione autotrofa dell'azoto, Tesi di Laurea Magistrale, Anno Accademico 2008-2009, Relatore Ing. Elena Ficara.
- Mulder A. (2003) The quest for sustainable nitrogen removal technologies. *Water Science & Technology*, 48 (1) 67–75.
- Mulder A., Van de Graaf A.A., Robertson L.A., Kuenen J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 177-183.
- Münch, E.V., Lant, P. and Keller, J. (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.* 30 (2), 277-284.

- Noophan P., Sripiboon S., Damrongsri M., Munakata-Marr J. (2009) Anaerobic ammonium oxidation by *Nitrosomonas* spp. and anammox bacteria in a sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Management* 2;90(2):967-972.
- Obaja D, Macé S, Mata-Alvarez J. (2005) Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater. *Bioresource Technology* 1;96(1):7-14.
- Oleszkiewicz, J.A., (1986) Nitrogen transformations in an aerated lagoon treating piggery wastes. *Agric. Wastes* 16, 171–181.
- Park S., Bae W., Rittmann B.E. (2010) Operational boundaries for nitrite accumulation in nitrification based on minimum/maximum substrate concentrations that include effects of oxygen limitation, pH, and free ammonia and free nitrous acid inhibition. *Environ. Sci. Technol.* 44(1):335-42.
- Peng Y., Zhu G. (2006) Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 73 (1) 15-26.
- Picioreanu C., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (1997) Modelling of the effect of oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Water Sci. Technol.*, 36:147–156.
- Pollice A., Tandoi V., Lestingi C. (2002) Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Water Research*, 36 (10): 2541–2546.
- Preez, J., Norddahl, B., Christensen, K. (2005) The BIOREK concept: a hybrid membrane bioreactor concept for very strong wastewater. *Desalination* 183, 407–415.
- Pynaert K., Smets B.F., Beheydt D., Verstraete W. (2004) Start-up of autotrophic nitrogen removal reactors via sequential biocatalyst addition. *Environ. Sci. Technol.* 38(4) 1228-1235.
- Qiao S., Yamamoto, T., Misaka M., Isaka K., Sumino T., Bhatti Z., Furukawa K. (2010) High-rate nitrogen removal from livestock manure digester liquor by combined partial nitritation–anammox process. *Biodegradation* 21, 11–20.
- Ruscalleda M., Lopez H., Ganigué R., Puig S., Balaguer M.D., Colprim J. (2008) Heterotrophic denitrification on granular anammox SBR treating urban landfill leachate. *Water Sci. Technol.*, 58:1749–1755.
- Ruscalleda M., Puig S., Mora X., Lopez H., Ganigué R., Balaguer M.D., Colprim J. (2008) The effect of urban landfill leachate characteristics on the coexistence of anammox bacteria and heterotrophic Denitrifiers (2010) *Water Sci. Technol.*, 61: 1065-1071.
- Sánchez-Melsió A., Cáliz J., Dolores Balaguer M., Colprim J., Vila X. (2009) Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems. *Chemosphere* 75, 169–179.
- Scaglione D, Caffaz S, Bettazzi E, Lubello C. (2009) Experimental determination of Anammox decay coefficient. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*; 84(8): 1250–4.
- Siegrist, H. (1996). Nitrogen removal from digester supernatant. Comparison of chemical and biological methods. *Water Sci. Technol.* 34 (1-2), 399-406.
- Siegrist, H., S. Reithaar, G. Koch, P. Lais (1998) Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Water Sci. Technol.* 38:241–248.
- Sinha B., Annachatre A.P. (2007) Partial nitrification–operational parameters and microorganisms involved. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 6, 285–313.
- Sliemers A.O., Haaijer S.C.M., Stafsnes M.H., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. (2005) Competition and coexistence of aerobic ammonium and nitrite oxidising bacteria at low oxygen concentrations. *App Microbiol Biotech* 68:808–817
- Sliemers A. O., Haaijer S., Schmid M., Harhangi H., Verwegen K., Kuenen J. G. and Jetten M. S. M. (2004) Nitrification and Anammox with urea as the energy source. *System. Appl. Micro-biol.*, 27, 271-278.
- Sliemers, A. O., N. Derwort, J. L. C. Gomez, M. Strous, J. G. Kuenen, and M. S. M. Jetten. (2002). Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res.* 36:2475–2482.
- Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M. (1997) Effects of aerobic and micro-aerobic conditions on anaerobic ammonium oxidizing (Anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (6), 2446-2448.
- Strous M., Heijnen J.J., Kuenen J.G. and Jetten M.S.M. (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 589-596.
- Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M. (1999). Key physiological parameters of anaerobic ammonium oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 3248-3250.
- Strous, M. (2000). Microbiology of anaerobic ammonium oxidation. PhD Thesis. Technical University of Delft, The Netherlands.
- Strous M, Kuenen JG, Fuerst JA, Wagner M, Jetten MSM. (2002) The anammox case - A new experimental manifesto for microbiological co-physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* ; 81(1/4): 693 - 702.

- Szatkowska B, Cema G, Plaza E, Trela J, Hultman B. (2007) A one-stage system with partial nitrification and anammox processes in the moving-bed biofilm reactor. *Water Sci Technol.* 55(8-9):19-26.
- Szogi, A.A., Vanotti, M.B., Garcia-Gonzalez, M.C., Kunz, A. (2007). Development of ANAMMOX process for animal waste treatment: Experiences in the USA. In: *International Symposium on Air Quality and Waste Management for Agriculture*, 16-19 September, Broomfield, Colorado. 6 p. 2007 CDROM
- Tang C., Zheng P., Zhang L., Chen J., Mahmood Q., Chen X., Hu B., Wang C. and Yu Y. (2010). Enrichment features of anammox consortia from methanogenic granules loaded with high organic and methanol contents. *Chemosphere*, 79, 613-619.
- Third K.A., Paxman J., Schmid M., Strous M., Jetten M.S.M. and Cord-Ruwisch R. (2005). Enrichment of Anammox from Activated Sludge and Its Application in the CANON Process. *Microbial Ecology* 49, 236-244.
- Tornotti G., Sviluppo del processo di rimozione dell'azoto da reflui zootecnici mediante l'impiego di batteri anammox, Tesi di Laurea Magistrale, Anno Accademico 2009-2010, Relatore Ing. Elena Ficara.
- Tsushima, I., T. Kindaichi and Okabe S. (2007). Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research* 41(4): 785-794.
- Tukutomi T., Shibayama C, Soda S, Ike M. (2010) A novel control method for nitrification: The domination of ammonia-oxidizing bacteria by high concentrations of inorganic carbon in an airlift-fluidized bed reactor *Water Res.* Jul;44(14):4195-203.
- Turk O., Mavinic D.S. (1986) Preliminary assessment of a shortcut in nitrogen removal from wastewater. *Can. J. Civil Eng.*, 13:600-605.
- Van de Graaf A.A., de Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M. and Kuenen J.G. (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *J. Microbiol*, 142, 2187-2196.
- Van der Star, W. R. L., Abma, W. R., Blommers, D., Mulder, J.-W., Tokutomi, T., Strous, M., Picioreanu, C. & van Loosdrecht, M. C. M. (2007) Start-up of reactors for anoxic ammonium oxidation: experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res.* 41(18), 4149-4163.
- Van der Star, W.R.L., W.R. Abma, B. Kartal, M.C.M. Van Loosdrecht (2011) Application of the anammox process. in *Nitrification*. B.B. Ward, D.J. Arp and M.G. Klotz (eds). Washington, DC, ASM Press: 237-263.
- Van Der Star, Wouter R.L., Miclea AI, Van Dongen UGJM, Muyzer G, Picioreanu C, Van Loosdrecht MCM. (2008) The membrane bioreactor: A novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnol Bioeng*; 101(2):286-294.
- Van Dongen L.G.J.M., Jetten M.S.M. and van Loosdrecht M.C.M. (2001) *The Combined Sharon/Anammox Process: A Sustainable Method for N-removal from Sludge Water*. IWA Publishing, London.
- Van Dongen U., Jetten M.S., Van Loosdrecht, M.C. (2001) The SHARON-ANAMMOX process for treatment of ammonium rich wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 44:153-160.
- Van Hulle, S.W.H., Volcke, E.I.P., Teruel, J.L., Donckels, B., Van Loosdrecht, M.C.M. and Vanrolleghem, P.A. (2007). Influence of temperature and pH on the kinetics of the Sharon nitrification process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (5), 471-480.
- Van Hulle S.W.H., Vandeweyer H.J.P., Meesschaert B.D., Vanrolleghem P.A., Dejans P., Dumoulin A. (2010) Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams. *Chem .Eng J.* 8/1;162(1):1-20.
- Vanotti M.B., Szogi A.A., Kunz A., Gonzalez M. (2006) Development of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) technology using immobilized biomass from swine manure. In: Petersen, S.O., editor. *Proceedings of 12th Recycling of Agricultural Municipal and Industrial Residues (RAMIRAN)*, September 9-12, 2006, Aarhus, Denmark. p. 143-146.
- Vanotti, M.B., Szogi, A.A., Hunt, P.G., Millner, P.D., Humenik, F.J. (2007). Development of environmentally superior treatment system to replace anaerobic swine lagoons in the USA. *Bioresour. Technol.* 98, 3184-3194.
- Wang C., Lee P., Kumar M., Huang Y., Sung S. And Lin J. Simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and denitrification (SNAD) in a full-scale landfill-leachate treatment plant. *Journal of Hazardous Materials.* 175 (1-3), 622-628 (2010).
- Westerman, P.W., Bicudo, J.R., Kantardjieff, A., (2000). Upflow biological aerated filters for the treatment of flushed swine manure. *Bioresour. Technol.* 74, 181-190.
- Wett B. (2006). Solved upscaling problems for implementing deammonification of rejection water. *Water Sci. Technol.*, 53, 121-128.
- Wett B., Rauch W. (2003). The role of inorganic carbon limitation in biological nitrogen removal of extremely ammonia concentrated wastewater. *Water Research* 37 (5), 1100-1110
- Willers, H.C., ten Have, P.J.W., Derikx, P.J.L., Arts, M.W., (1993). Temperature dependency of nitrification and required anoxic volume for denitrification in the biological treatment of veal calf manure. *Bioresour. Technol.* 43, 47-52.

- Wyffels S., Boeckx P., Pynaert K., Zhang D., Van Cleemput O., Chen G., Verstraete W. (2004) Nitrogen removal from sludge reject water by a two-stage oxygen-limited autotrophic nitrification denitrification process. *Water Sci. Tech* 49:57–64.
- Yamamoto T., Takaki K., Koyama T., Furukawa K.(2008) Long-term stability of partial nitritation of swine wastewater digester liquor and its subsequent treatment by Anammox. *Bioresource Technology* 9;99(14):6419-6425.
- Yamamoto T., Wakamatsu S., Qiao S., Hira D., Fujii T. and Furukawa K. (2011) Partial nitritation and anammox of a livestock manure digester liquor and analysis of its microbial community. *Bioresource Technology* 102, 2342–2347.

7 Appendice

7.1 Tabelle e grafici relativi alle prove di attività ed inibizione manometrici in batch

Prova 1

Tabella 7.1 - Sintesi dei risultati della prima prova; viene qui analizzata la variazione del rateo di produzione e della SAA nel tempo, per ogni singolo campione

dosaggi	tempo [d]	bianco			25% r.r.		
		1			2		
		rateo produzione [mL N h ⁻¹]	%	SAA [g N gSV ⁻¹ d ⁻¹]	rateo produzione [mL N h ⁻¹]	%	SAA [g N gSV ⁻¹ d ⁻¹]
1	0	3.57	100.0	0.515	3.53	100.0	0.484
2	2	3.90	109.4	0.564	4.22	119.5	0.578
3	5	4.30	120.6	0.621	3.94	111.7	0.540
4	9	4.46	124.9	0.644	3.87	109.7	0.531
5	15	4.04	113.2	0.583	3.20	90.6	0.438

Tabella 7.2 - Sintesi dei risultati della prima prova; viene qui analizzata la variazione del rateo di produzione e della SAA in funzione del campione in bianco

dosaggi	tempo [d]	bianco			25% r.r.			
		1			2			
		rateo produzione [mL N h ⁻¹]	SAA [g N gSV ⁻¹ d ⁻¹]	%SAA	rateo produzione [mL N h ⁻¹]	SAA [g N gSV ⁻¹ d ⁻¹]	%SAA	□SAA [%]
1	0	3.57	0.515	100	3.53	0.484	93.9	-6.1
2	2	3.90	0.564	100	4.22	0.578	102.6	+2.6
3	5	4.30	0.621	100	3.94	0.540	86.9	-13.1
4	9	4.46	0.644	100	3.87	0.531	82.4	-17.6
5	15	4.04	0.583	100	3.20	0.438	75.1	-24.9

Prova 2

◆ campione in bianco ■ campione con 10% r.r.

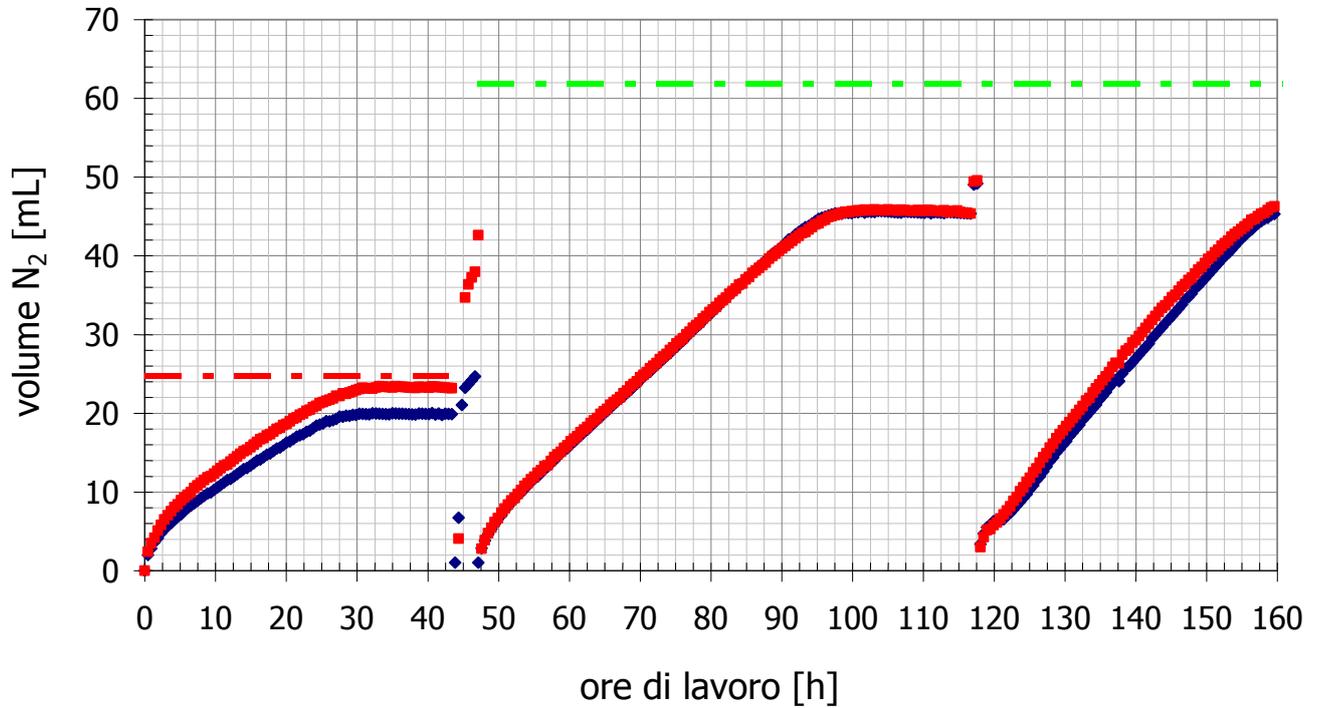


Figura 7.1 - Andamento della produzione di N_2 nella seconda prova di inibizione; il tratteggio indica la produzione stechiometrica attesa, in funzione dei dosaggi di $N-NO_2^-$

Prova 3

Tabella 7.3 - Sintesi dei risultati della terza prova; viene qui analizzata la variazione del rateo di produzione nel tempo, per ogni singolo campione

dosaggi	tempo [h]	bianco - 25% r.r.		60% r.r.		100% - r.r.	
		1		2		3	
		rateo produzione [mL N h ⁻¹]	%	rateo produzione [mL N h ⁻¹]	%	rateo produzione [mL N h ⁻¹]	%
1	0	5.65	80.7	5.78	92.8	5.49	90.2
2	24	7.00	100.0	6.23	100.0	6.09	100.0
3	48	6.82	97.5	5.21	83.6	4.57	75.0

Tabella 7.4 - Sintesi dei risultati della terza prova; viene qui analizzata la variazione della SAA nel tempo, per ogni singolo campione

campione	tempo [h]	dosaggi	rateo produzione [mL h ⁻¹]	SAA [g N g SV ⁻¹ d ⁻¹]	SAA%	□ SAA [%]
1	0	1	5.65	0.502	100	-
	24	2	7.00	0.622	100	-
	48	3	6.82	0.607	100	-
2	0	1	5.78	0.525	104.6	+4.6
	24	2	6.23	0.566	90.9	-9.1
	48	3	5.21	0.473	77.9	-22.1
3	0	1	5.49	0.478	95.2	-4.8
	24	2	6.09	0.530	85.2	-14.8
	48	3	4.57	0.398	65.6	-34.4

■ campione in bianco (25% r.r.) ◆ campione 60% r.r. ▲ campione 100% r.r.

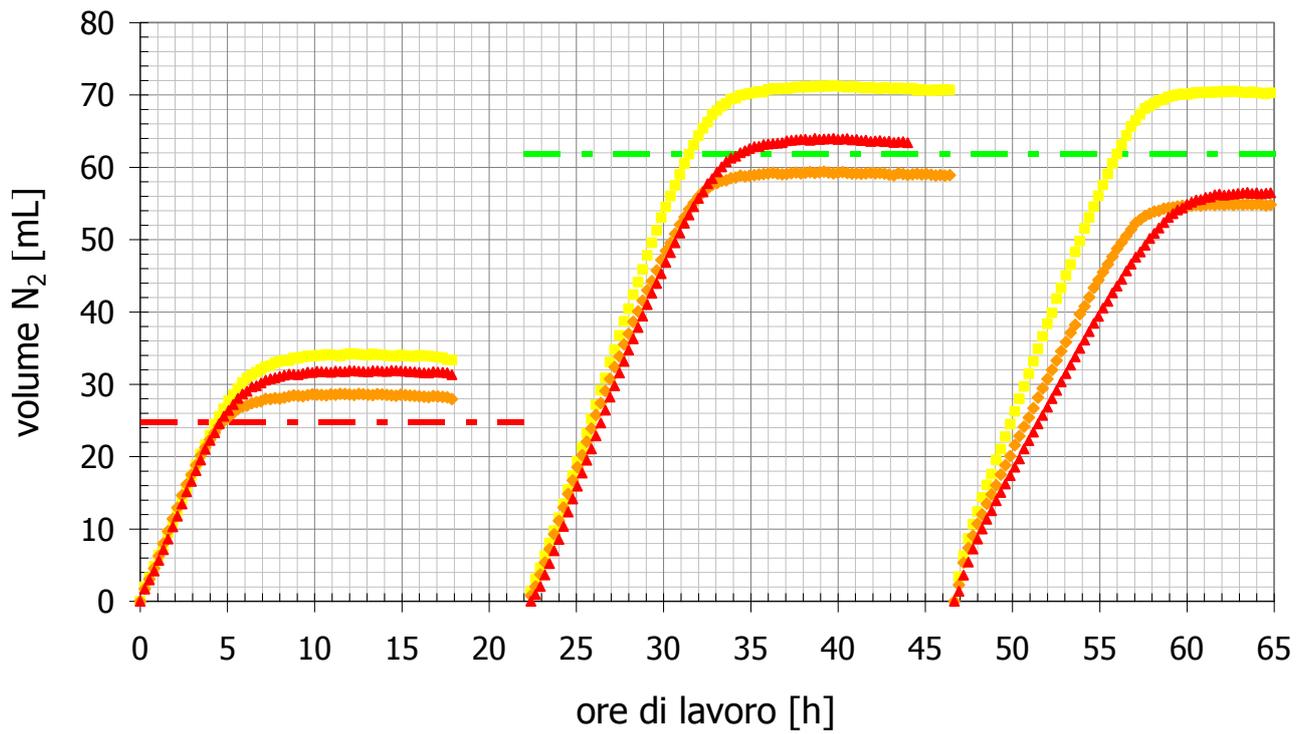


Figura 7.2 - Andamento della produzione di N₂ nella terza prova di inibizione; il tratteggio indica la produzione stechiometrica attesa, in funzione dei dosaggi di N-NO₂⁻

Prova 4

- ◆ campione in bianco (40% r.r)
- campione 70% r.r.
- ▲ campione 70% r.r. e pollina

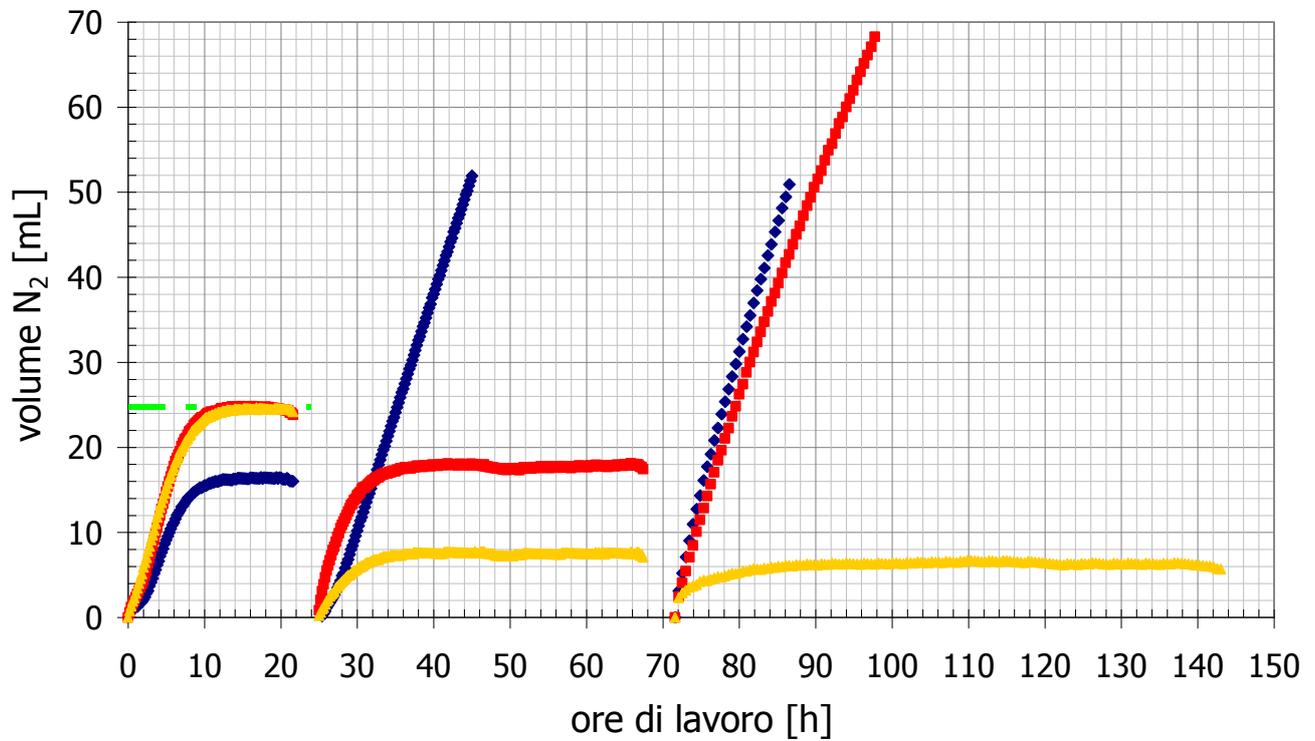


Figura 7.3 - Andamento della produzione di N_2 nella quarta prova di inibizione; il tratteggio indica la produzione stechiometrica attesa, in funzione dei dosaggi di $N-NO_2^-$

Prova 5

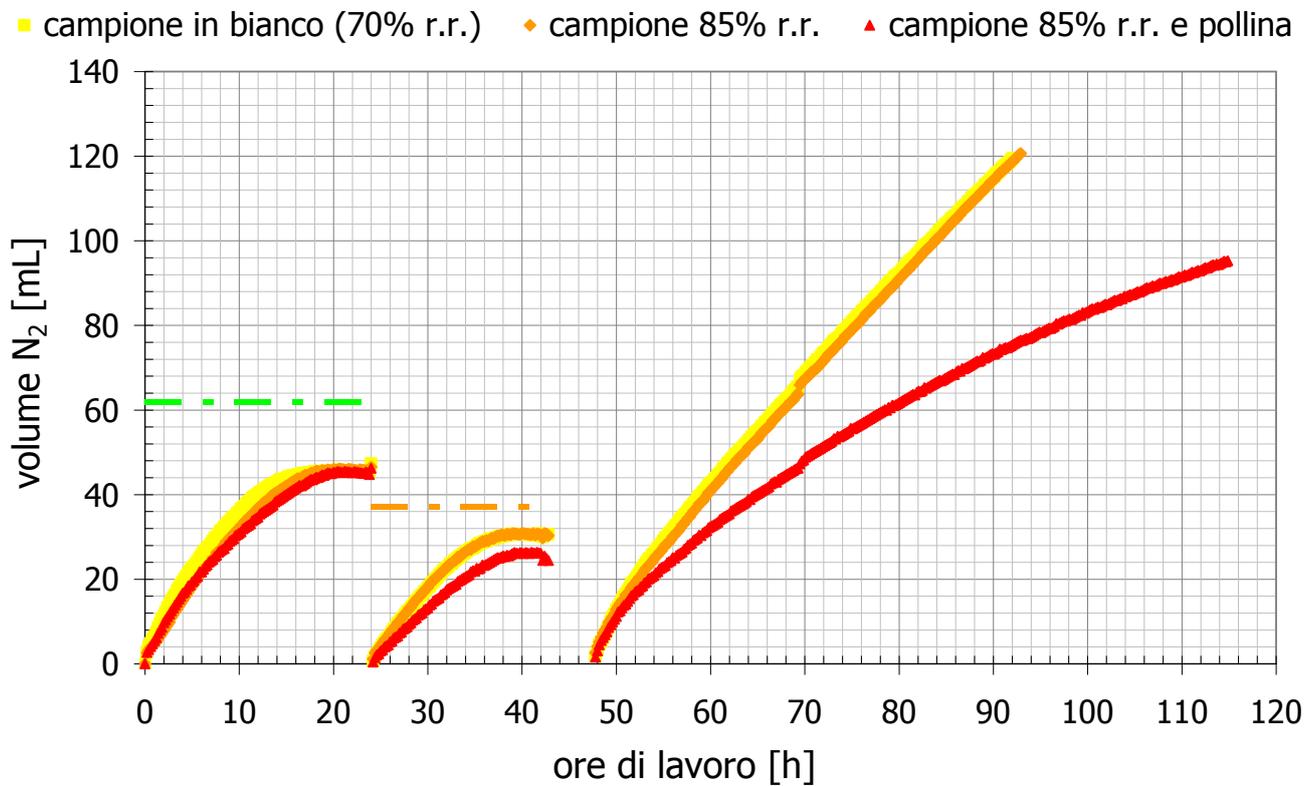


Figura 7.4 - Andamento della produzione di N₂ nella quinta prova di inibizione; il tratteggio indica la produzione stechiometrica attesa, in funzione dei dosaggi di N-NO₂⁻