

# 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



## **APPLICAZIONE DEI PROCESSI BIOLOGICI AUTOTROFI PER LA RIMOZIONE DELL'AZOTO DA DIGESTATO AGRO-ZOOTECNICO**

**Relatore: Ing. Elena Ficara**

**Correlatore: Ing. Davide Scaglione**

**Tesi di:**

**Fabrizio Berenato, Matr. 755516**

**Davide Ronchi, Matr. 750026**

**Anno Accademico: 2011/2012**



# Sommario

<b>Scopo della tesi .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>9</b>
1.1 Il ciclo dell'azoto.....	9
1.2 L'azoto come nutriente.....	10
<b>2. STATO DELL'ARTE.....</b>	<b>13</b>
2.1 Processi convenzionali di rimozione biologica dell'azoto .....	13
2.1.1 Rimozione biologica dell'azoto .....	13
2.1.2 Precipitazione chimica.....	18
2.1.3 Strippaggio dell'ammoniaca.....	18
2.2 Trattamenti dedicati al digestato agricolo .....	20
2.2.1 Separazione solido/liquido.....	20
2.2.2 Evaporazione e condensazione.....	21
2.2.3 Trattamenti a membrana.....	22
2.3 Criteri di scelta e considerazioni economiche .....	22
2.4 Il processo anammox .....	23
2.4.1 La scoperta dei batteri anammox.....	23
2.4.2 Struttura di un batterio anammox.....	25
2.4.3 Il processo anammox: stechiometria e cinetica .....	26
2.4.4 Inibizione dell'attività .....	31
2.4.5 Applicazione del processo anammox per il trattamento delle acque reflue .....	33
2.4.6 Configurazione in reattore singolo .....	34
2.4.7 Configurazione bifase: PARNIT e anammox.....	35
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>37</b>
3.1 Procedure.....	37
3.1.1 Alcalinità.....	37
3.1.2 Solidi sospesi totali e volatili.....	38
3.2 Analisi delle forme azotate e del COD .....	39
3.2.1 Modalità di campionamento.....	41
3.3 Metodo manometrico di stima dell'attività batterica .....	42
3.3.1 Introduzione al metodo manometrico .....	42
3.3.2 La strumentazione utilizzata e la metodica di prova .....	43
3.3.3 Trattamento dei dati delle prove manometriche .....	45

3.4	Reattore a sequenza di fasi SBR PARNIT .....	48
3.4.1	Struttura dell'impianto pilota SBR PARNIT .....	48
3.4.2	Funzionamento del reattore SBR PARNIT.....	50
3.4.3	Caratterizzazione dell'influente.....	53
3.4.4	Protocollo di monitoraggio del reattore SBR PARNIT.....	53
3.5	Reattore a sequenza di fasi SBR anammox .....	54
3.5.1	Struttura dell'impianto a scala di laboratorio SBR anammox.....	54
3.5.2	Inoculo e funzionamento del reattore SBR anammox.....	57
3.5.3	Caratterizzazione dell'influente.....	62
3.5.4	Protocollo di monitoraggio e gestione del reattore SBR anammox.....	62
3.6	Preparazione di soluzioni e reattivi .....	67
3.6.1	Preparazione alimento in ingresso al reattore SBR.....	67
3.6.2	Altre soluzioni .....	69
<b>4.</b>	<b>RISULTATI .....</b>	<b>71</b>
4.1	Risultati relativi alla gestione del reattore SBR PARNIT .....	71
4.1.1	Andamento delle concentrazioni di alcalinità totale.....	71
4.1.2	SRT e solidi sospesi totali e volatili .....	73
4.1.3	Caratteristiche dell'effluente.....	74
4.1.4	Prove di attività .....	80
4.2	Risultati delle prove manometriche .....	82
4.2.1	Determinazione dell'attività della biomassa pregressa.....	83
4.2.2	Determinazione dell'attività della nuova biomassa .....	92
4.2.3	Valutazione del recupero di attività in seguito a inibizione da nitrito .....	95
4.2.4	Analisi statistica degli errori .....	104
4.3	Risultati derivati dalla gestione del reattore SBR anammox.....	106
4.3.1	Caratteristiche qualitative dell'effluente.....	107
4.3.2	Monitoraggio dell'attività anammox.....	114
4.3.3	Monitoraggio dei parametri operativi d'interesse.....	118
4.3.4	Confronto con i risultati di letteratura.....	121
<b>5.</b>	<b>Conclusioni .....</b>	<b>123</b>
	Processo PARNIT .....	123
	Processo anammox .....	124
	Considerazioni globali e prospettive future .....	126
<b>6.</b>	<b>Riferimenti .....</b>	<b>129</b>
<b>7.</b>	<b>Appendice .....</b>	<b>137</b>

7.1	Conduzione delle prove manometriche .....	137
7.2	Risultati delle prove manometriche .....	138
7.2.1	Prova numero 2 .....	138
7.2.2	Prova numero 2 .....	139
7.2.3	Prova numero 3 .....	140
7.2.4	Prova numero 4 .....	141
7.2.5	Prova numero 5 .....	142
7.2.6	Prova numero 6 .....	143
7.2.7	Prova numero 7 .....	144
7.2.8	Prova numero 8 .....	146



## Scopo della tesi

La presente tesi è stata svolta presso i laboratori della sezione ambientale del DIAR (Dipartimento di Ingegneria Idraulica, Ambientale, Infrastrutture viarie, e Rilevamento) nell'ambito del progetto BRAIN (Biotecnologie per la Riduzione dell'Azoto dai digestati con processi Innovativi e per promuovere la sostenibilità economica ed ambientale della produzione del biogas), avviato nel 2010 e finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. L'obiettivo principale del progetto è l'identificazione e la messa a punto di tecnologie sostenibili ed economicamente vantaggiose da applicare al trattamento di reflui agro-zootecnici al fine di ridurre il contenuto di azoto associato ai digestati, a sostegno dello sviluppo della digestione anaerobica per la produzione di biometano.

In questo lavoro è stato analizzato il processo anammox (dall'acronimo ANaerobic AMMonium OXidation) applicato a reflui agro-zootecnici previa digestione anaerobica e trattamento di nitrificazione parziale (PARNIT) del digestato. La combinazione di questi processi prevede dapprima l'ossidazione parziale dell'azoto ammoniacale a nitroso con il processo PARNIT, per poi realizzare la rimozione degli ioni ammonio e nitrito dall'effluente operata dalla biomassa autotrofa anammox. Questi processi presentano notevoli vantaggi rispetto a quelli tradizionali tra cui la riduzione dei costi di gestione fino al 90%, la riduzione della produzione di fanghi del 90%, la riduzione di oltre il 60% della richiesta di ossigeno (assente per il processo anammox) e l'assenza della richiesta di carbonio organico. Le difficoltà incorrenti nello sviluppo di queste tecnologie sono dovute alla tipologia di refluo da trattare che è intrinsecamente diverso da uno scarico civile a causa dell'eventuale presenza di sostanze inibenti e di metalli pesanti e per la variabilità stagionale delle matrici digerite. Questi fattori rappresentano un'incognita e il loro verificarsi rischia di compromettere la stabilità del processo.

Il lavoro ha avuto come obiettivi specifici:

- la valutazione della fattibilità e della stabilità nel tempo dei processi autotrofi PARNIT e anammox al variare della percentuale di refluo reale alimentato al processo anammox;
- la valutazione dell'attività della biomassa anammox alimentata con diversi valori della percentuale di refluo reale e di concentrazioni di nutrienti.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Il ciclo dell'azoto

L'azoto è uno degli elementi più diffusi in natura e i suoi composti rivestono un ruolo fondamentale per la sopravvivenza degli esseri viventi in quanto costituenti di molecole quali proteine e DNA. Le trasformazioni subite dall'azoto nei diversi comparti sono descritte da un ciclo biogeochimico chiamato ciclo dell'azoto (Figura 1-1).

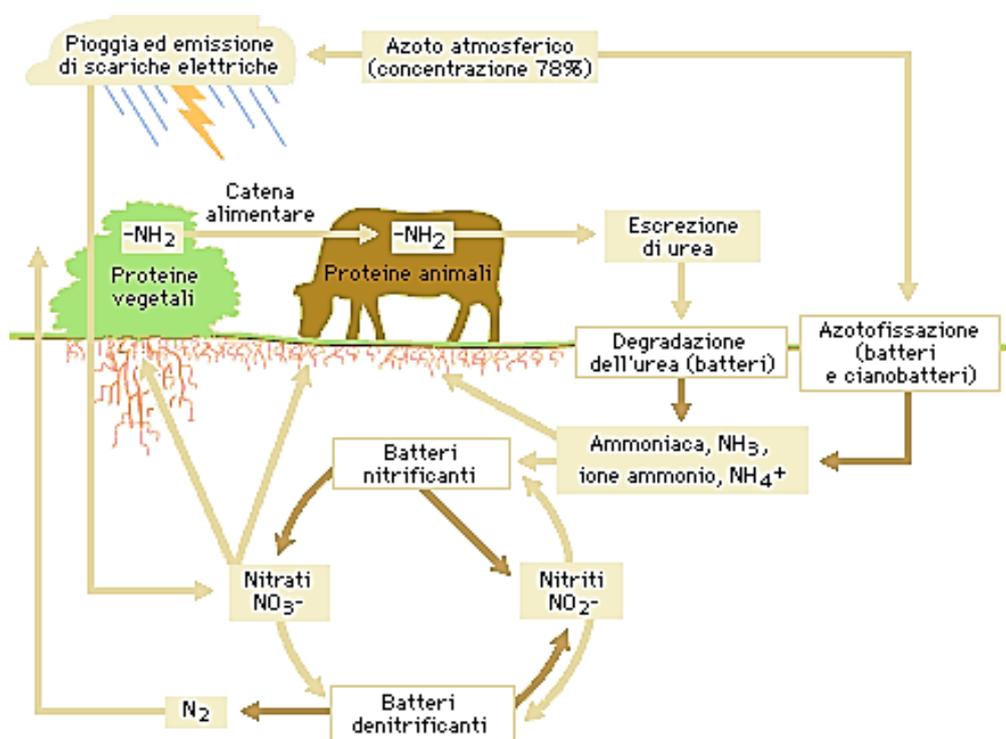


Figura 1-1 Il ciclo dell'azoto

Inizialmente l'azoto è trasferito nel suolo sotto forma di ione ammonio  $\text{NH}_4^+$  sia per fissazione dell'azoto atmosferico dovuta all'azione di microorganismi appartenenti ai generi *Clostridium* e *Azotobacter*, sia per il fenomeno della mineralizzazione operata da organismi degradatori che sono in grado di ammonificare l'azoto organico degli organismi morti.

Il passo successivo è la nitrificazione che prevede l'ossidazione dell'azoto prima a ione nitrito  $\text{NO}_2^-$  per l'azione dei batteri *Nitrosomonas* e poi a ione nitrato  $\text{NO}_3^-$  grazie ai batteri *Nitrobacter*. Gli ioni nitrato sono assimilati dai vegetali e questo permette l'ingresso dell'azoto nella catena alimentare degli organismi. A chiudere il ciclo c'è il processo di denitrificazione, dove microorganismi quali *Bacillus* e *Pseudomonas* riducono gli ioni nitrato producendo  $\text{N}_2$  gassoso che torna in atmosfera.

## 1.2 L'azoto come nutriente

L'intervento dell'uomo genera importanti immissioni di azoto nei comparti acqua e suolo alterando il naturale ciclo dell'azoto e causando svariati problemi di carattere ambientale, quali il fenomeno dell'eutrofizzazione e l'inquinamento di falde e corpi idrici superficiali. Con il tempo si è quindi reso indispensabile un controllo sulla sua introduzione nell'ambiente.

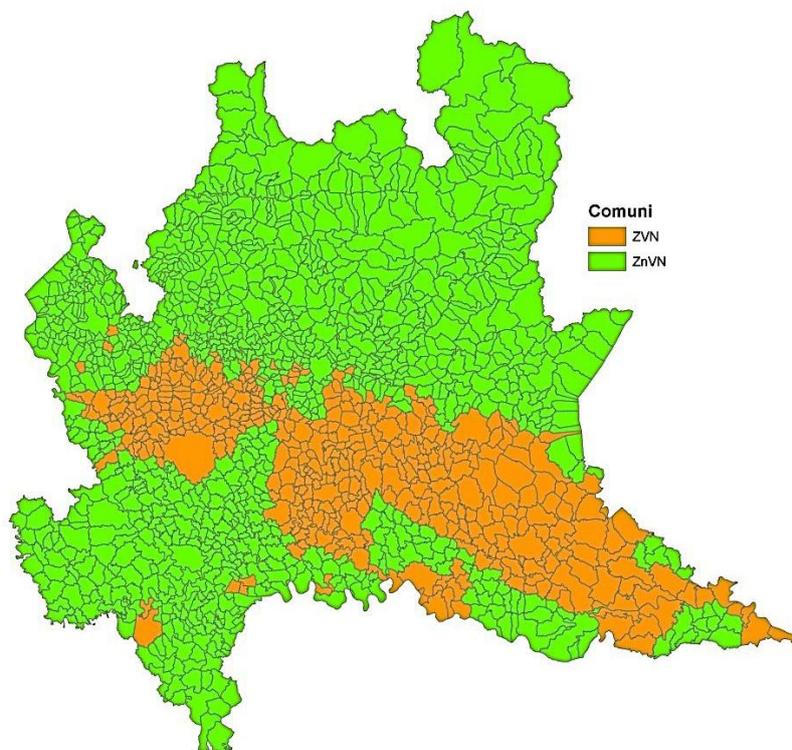
Oggigiorno le principali immissioni di azoto antropico sono dovute ai settori della zootecnia e dell'agricoltura. L'allevamento di bestiame e la gestione delle deiezioni animali generano immissioni di azoto sia nel suolo, prevalentemente come ammonio, sia nell'atmosfera come protossido di azoto  $\text{N}_2\text{O}$  (gas serra con GWP pari a 310). Per quanto riguarda l'agricoltura invece, la diffusa adozione della pratica delle concimazioni azotate è causa d'ingenti utilizzi di nitrato d'ammonio  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  come fertilizzante.

Al fine di ridurre gli impatti ambientali dovuti agli allevamenti di bestiame, è stata emanata dall'Unione Europea la direttiva comunitaria 91/676/CEE, meglio nota come direttiva nitrati, le cui innovazioni più rilevanti riguardano l'introduzione delle ZVN (Zone Vulnerabili da Nitrati di origine agricola) e la regolamentazione dell'utilizzazione agronomica dei reflui zootecnici.

Il recepimento della direttiva comunitaria è avvenuto per l'Italia tramite il Decreto Legislativo 152/99 e il Decreto Ministeriale 7 aprile 2006; per quanto riguarda la regione Lombardia, ciò è avvenuto tramite le delibere 5868/07 e IX/2208 del 14 settembre 2011 che hanno portato alla redazione dei così detti Piani d'Azione e alla classificazione del territorio. In particolare, circa il 56% della pianura lombarda è stato identificato come ZVN (*figura 1-2*)

con limite di spandimento pari a  $170 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$  e la restante superficie come ZNVN con limite di spandimento pari a  $340 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ y}^{-1}$ . Come si può notare dalla *figura 1-2*, le province maggiormente interessate sono quelle di Milano, Lodi, Cremona e Mantova.

La rigidità dei limiti normativi ha provocato l'insorgere di numerosi problemi dovuti alla presenza sul territorio di un elevato numero di allevamenti intensivi rispetto alle superfici idonee allo smaltimento del refluo zootecnico prodotto. Una soluzione a queste problematiche può essere fornita dalle nuove tecnologie che, in questo campo di applicazione, hanno visto un notevole sviluppo negli ultimi anni.



**Figura 1-2 ZVN e ZNVN nella regione Lombardia (ERSAF Lombardia, 2006)**



## 2. STATO DELL'ARTE

Allo stato attuale le soluzioni tecnologiche disponibili per il controllo delle specie azotate nelle acque reflue sono piuttosto ampie considerando la diversa provenienza dei reflui. Quantità, caratteristiche, variabilità e destinazione d'uso saranno la base decisionale per optare tra un processo di carattere biologico o per un processo di carattere chimico-fisico. Di seguito sono mostrate le tecnologie convenzionali per la rimozione dell'azoto dai reflui (*paragrafo 2.1*), i trattamenti dedicati al digestato agricolo (*paragrafo 2.2*) e il processo anammox (*paragrafo 2.4*).

### 2.1 Processi convenzionali di rimozione biologica dell'azoto

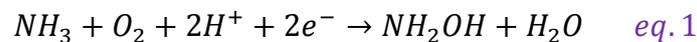
#### 2.1.1 Rimozione biologica dell'azoto

Tutti i sistemi per la rimozione biologica dell'azoto comprendono una zona aerobica nella quale ha luogo la nitrificazione e una zona anossica, o una frazione di tempo in cui deve essere mantenuta tale condizione per consentire la denitrificazione biologica. Si realizza così un modo per rimuovere biologicamente l'azoto dall'acqua attraverso l'ossidazione dell'azoto ammoniacale  $\text{NH}_4^+$  e la successiva riduzione dell'azoto nitrico  $\text{NO}_3^-$  ad azoto gas  $\text{N}_2$ . La nitrificazione si svolge in due stadi, nel primo *eq.2* definito nitrosazione, l'azoto ammoniacale  $\text{NH}_4^+$  viene ossidato ad azoto nitroso  $\text{NO}_2^-$ , nel secondo *eq.3* definito nitratazione, gli ioni nitrito vengono ossidati a ioni nitrato  $\text{NO}_3^-$ . Come per la rimozione del BOD anche per la nitrificazione i processi possono svolgersi sia a biomassa sospesa sia a biomassa adesa. Solitamente nel primo caso il processo è contestuale al processo di rimozione del BOD e ha luogo in una vasca di aerazione seguita da una sedimentazione e una linea di ricircolo. Dal momento che i batteri nitrificanti hanno un tasso di crescita più lento rispetto ai batteri eterotrofi, gli impianti progettati per far avvenire tale processo necessitano di un incremento del tempo di residenza idraulica HRT e dell'età del fango SRT rispetto agli impianti dedicati

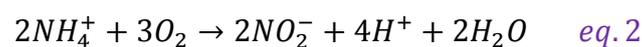
alla sola rimozione del BOD. Nel caso di sistema a biomassa adesa è necessario prevedere la preliminare rimozione spinta della sostanza organica carboniosa, se infatti risulta ancora presente BOD, i batteri eterotrofi predominano sui batteri nitrificanti sulla superficie del film fisso. I batteri autotrofi aerobici responsabili del processo di nitrificazione scoperti nel 1891 da Winogradsky appartengono ai generi *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* responsabili dell'ossidazione dell'ammonio AOB (Ammonium Oxidizing Bacteria) i primi e dell'ossidazione dell'azoto nitroso NOB (Nitrite Oxidizing Bacteria) i secondi. Negli anni Novanta vennero identificati altri generi batterici in grado di compiere le due fasi: *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosorobrio* tra gli AOB e *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitroeystis* tra gli NOB.

- AOB – Nitroso-batteri:

La nitrosazione nello specifico si può riassumere in due fasi, nella prima l'ammonio viene la convertito in idrossilammina e acqua [eq.1](#) mediante l'enzima ammonio mono-ossigenasi; nella seconda avviene l'ossidazione dell'idrossilammina ad azoto nitroso per mezzo dell'idrossilammina ossido–reduttasi.

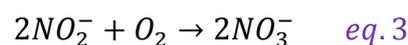


Più sinteticamente le due fasi appena descritte si possono riassumere nella già citata [eq.2](#).

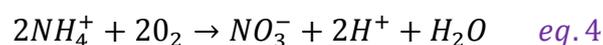


- NOB – Nitro-batteri:

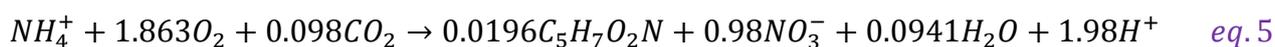
La reazione svolta per mezzo della biomassa NOB è la seguente:



La reazione di ossidazione totale considerando l'intervento di entrambe le tipologie di biomassa è invece descritta dall'[eq.4](#)



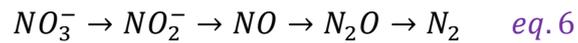
Prendendo in considerazione anche le reazioni di sintesi della biomassa (indicata come  $C_5H_7O_2N$ ), l'ossidazione dell'azoto ammoniacale a ioni nitrato, la riduzione dell'ossigeno ad acqua si può ottenere una reazione complessiva per la nitrificazione *eq.5* (Crites e Tchobanoglous, 1998).



L'equazione è bilanciata a meno degli errori di arrotondamento.

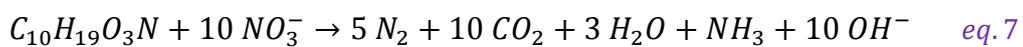
Si può osservare che per ogni grammo di azoto ammoniacale rimosso si impiegano 4,25 g di  $O_2$ , si producono 0,16 g di cellule batteriche, si consumano 7,07 g di alcalinità come  $CaCO_3$  e 0,308 g di  $CO_2$ . In fase progettuale è necessario considerare alcuni parametri fondamentali quali la concentrazione di BOD e azoto, l'alcalinità, la temperatura e la presenza di sostanze potenzialmente tossiche o inibenti, tra cui si ricordano i solventi organici, le ammine, le proteine, i tannini, i composti fenolici, gli alcoli, i cianati, gli eteri, i carbammati, il benzene, alcuni metalli (nichel, cromo e rame), l'ammoniaca in forma indissociata e l'acido nitroso. La cinetica è fortemente influenzata dal pH, e la velocità è infatti drasticamente rallentata per valori inferiori a 6,8 (Metcalf e Eddy, 2003).

Il passo successivo per la rimozione biologica dell'azoto è la denitrificazione operata da un'ampia varietà di batteri sia di tipo eterotrofo che di tipo autotrofo. Tra i batteri eterotrofi si ricordano *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Spirillum*, *Vibrio*, *Paracoccus* ma la specie *Pseudomonas* risulta essere la più comune e diffusa tra le specie denitrificanti essendo in grado di utilizzare come donatore di elettroni un'ampia varietà di sostanze organiche. La maggior parte dei batteri denitrificanti è di tipo aerobico facoltativo ovvero sono in grado di impiegare sia l'ossigeno che gli ioni nitrato e gli ioni nitrito come accettori di elettroni, alcuni di essi sono in grado di operare anche in ambiente anaerobico. Nel caso specifico di denitrificazione, l'assenza o la presenza in concentrazione limitata di ossigeno induce la produzione dell'enzima nitrato riduttasi che contribuisce al trasporto dell'idrogeno e degli elettroni verso l'accettore finale rappresentato dal nitrato. La reazione di denitrificazione si svolge per stadi successivi a partire dagli ioni nitrato passando per gli ioni nitrito, all'ossido nitrico, all'ossido nitroso ed infine all'azoto gassoso *eq.6*.



Come già ricordato, il donatore di elettroni e la fonte di carbonio per la sintesi di nuova biomassa è rappresentato da un'ampia varietà di sostanze organiche espresse in termini di COD solubile prontamente biodegradabile. Le fonti più comuni sono rappresentate dal liquame *eq.7*, dalle sostanze organiche prodotte dalla lisi batterica in fase endogena *eq.8* e da fonti esterne di carbonio (solitamente metanolo *eq.9* o acetato *eq.10*).

- Sostanza organica da liquame influente:



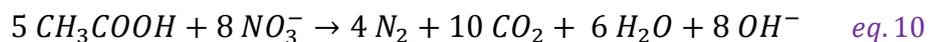
- Sostanza organica da lisi batterica in fase endogena:



- Sostanza organica da metanolo:

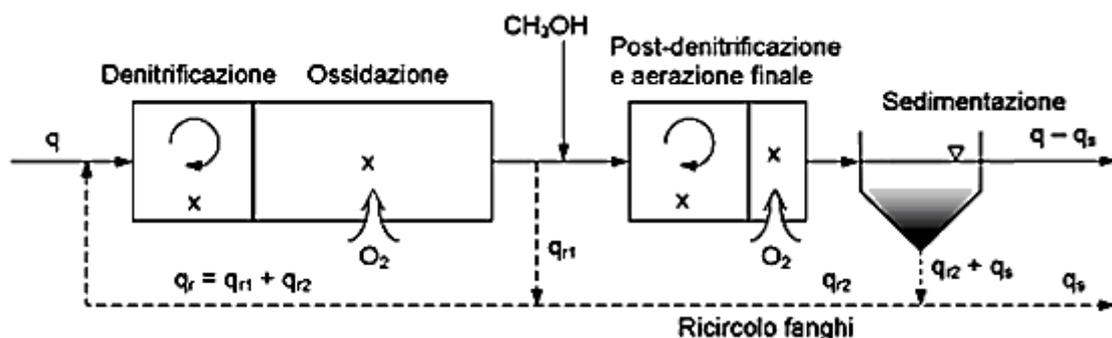


- Sostanza organica da acetato:



Contrariamente al processo di nitrificazione che consuma alcalinità il processo di denitrificazione eterotrofa produce 3,57 g CaCO<sub>3</sub> di alcalinità per ogni grammo di NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ridotto, reintegrandone così circa la metà. I batteri denitrificanti risultano meno sensibili dei nitrificanti alle variazioni di pH: non si apprezzano variazioni nelle cinetiche per valori di pH compresi tra 7 e 8, una riduzione è stata registrata per una riduzione di pH da 7 a 6 (Dawson e Murphy, 1972). La presenza di ossigeno disciolto può avere un effetto inibente sulla

riduzione dell'azoto nitrico, reprimendo l'enzima che catalizza la reazione; in letteratura si riporta una soglia critica pari a  $0,2 \text{ mg O}_2/\text{L}$  o anche superiore da sperimentazioni con colture di *Pseudomonas* o su fanghi attivi (Skerman e Macrae, 1957; Terai e Mori 1975; Dawson e Murphy, 1972). Il potenziale di denitrificazione e quindi l'efficienza di rimozione dell'azoto è governato essenzialmente dalla presenza di carbonio prontamente biodegradabile. Il minimo rapporto C/N è stato calcolato essere attorno a  $3,5 - 4,5 \text{ g COD/gN}$  (Henze et al. 1994) ma nella pratica valori attorno a  $6 - 11 \text{ gCOD/gN}$  sono necessari per completare la denitrificazione (Sun et al., 2010). In generale il rapporto C/N è strettamente legato alla qualità del carbonio organico introdotto e il metanolo ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) è il più impiegato per il costo relativamente basso, ma per ottenere le migliori efficienze di rimozione si utilizzano fonti miste. Un esempio di trattamento convenzionale con dosaggio di carbonio esterno è riportato in *figura 2-1*. Il refluo in ingresso al comparto biologico viene miscelato con una portata  $q_r$  composta da fanghi attivi  $q_{r1}$  e fanghi di supero  $q_{r2}$  ed entra nel comparto di denitrificazione dove l'azoto nitrico presente nella frazione  $q_{r1}$  viene ridotto ad  $\text{N}_2$  e successivamente il fango entra nel comparto aerato dove si verificano la rimozione del BOD e l'ossidazione dell'azoto ammoniacale ad azoto nitrico. All'effluente viene aggiunto del carbonio esterno (in questo caso metanolo) e viene trattato con una fase di post-denitrificazione seguita da una fase di aerazione finale che permette la rimozione del carbonio dosato in eccesso. In coda al processo biologico si trova un sedimentatore secondario da cui vengono estratti i fanghi di supero che sono parzialmente riciccolati ( $q_{r2}$ ) e parzialmente inviati alla linea di trattamento dei fanghi.



**Figura 2-1 Esempio di layout convenzionale per l'abbattimento biologico spinto dell'azoto (Bonomo, 2008)**

In generale i trattamenti biologici, se adeguatamente dimensionati e gestiti, permettono di raggiungere efficienze superiori al 90%.

### **2.1.2 Precipitazione chimica**

La precipitazione chimica sfrutta reazioni chimiche in grado di convertire ioni disciolti in soluzione in precipitati solidi insolubili decantabili. Viene solitamente impiegata per la rimozione di composti organici non biodegradabili, per l'azoto ammoniacale, per il fosforo e per i metalli pesanti (Li et al 1999). Nel caso specifico della rimozione dell'azoto, il processo consiste nella formazione della struvite o MAP ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) per aggiunta di cloruro di magnesio  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e fosfato acido di sodio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in qualità di precipitanti. La struvite precipita per pH superiori a 8, perciò qualora sia necessario si effettua il dosaggio di  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  o  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Il trattamento non richiede impianti sofisticati e può essere condotto in situ; inoltre la struvite prodotta può essere impiegata come fonte di azoto nei fertilizzanti solo se risulta di purezza accettabile e non contiene contaminanti come i metalli pesanti. In molti casi, la scarsa purezza rende necessari processi di affinamento che rendono il riutilizzo della struvite troppo costoso. In questo caso, la struvite risulta essere uno scarto del processo con necessità di adeguato trattamento. L'efficienza di rimozione sull'azoto è variabile nell'intervallo 70–90% in base ai dosaggi di magnesio e fosforo (1:1:1 su base molare N:Mg:P).

### **2.1.3 Strippaggio dell'ammoniaca**

L'azoto in forma di ammoniaca  $\text{NH}_3$  può essere trasferito dalla fase liquida alla fase gassosa attraverso il processo di desorbimento in opportune torri di strippaggio. Tale processo è regolato da tre ben note leggi fondamentali: la legge di Dalton che governa la distribuzione delle pressioni di una miscela gassosa, la legge di Henry che lega la concentrazione a saturazione di un gas in un liquido alla pressione del gas nell'aeriforme a contatto con il

liquido e la legge di Fick che regola la cinetica del trasferimento di massa. In particolare l'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale per desorbimento è funzione del pH, della temperatura e dell'efficienza di contatto aria-liquido. Per evitare che il rilascio in atmosfera di  $\text{NH}_3$  gas provochi forti odori in prossimità dell'impianto, l'ammoniaca desorbita dal liquido viene solitamente riconvertita in ione ammonio  $\text{NH}_4^+$ , all'interno di uno scrubber, mediante lavaggio acido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  o  $\text{HCl}$ ) incrementando così i costi di processo. Nella maggior parte dei casi in cui viene impiegato un processo di strippaggio con aria si possono generare alcuni problemi di natura operativa connessi al mantenimento dei valori del pH (prossimi a 10) necessari a mantenere l'efficienza richiesta, alla formazione di precipitati di carbonato di calcio all'interno della colonna di desorbimento e nelle tubazioni di alimentazione, nonché la diminuzione dell'efficienza nei periodi più freddi anche per rischio di formazione di ghiaccio che altera la geometria di contatto aria-liquido.

In alternativa allo strippaggio con aria esiste la possibilità di impiegare il vapore; il processo è del tutto simile al precedente ma le temperature in gioco sono superiori ai  $95^\circ\text{C}$ . Sebbene risulti economicamente oneroso viene proposto come possibile trattamento per i chiariti dei surnatanti di digestione anaerobica, preferibilmente per impianti di grande potenzialità. Ai già citati problemi di natura operativa riguardanti il mantenimento del pH e di intasamento dovuto a precipitati, se ne aggiungono di altri relativi al mantenimento di una determinata temperatura all'interno della torre di desorbimento e alla regolazione della portata di vapore (Metcalf & Eddy, 2003). Le efficienze raggiungibili sono dell'ordine dell' 80 - 90 % per contro oltre ai problemi operativi già descritti ci sono gli oneri economici per il dosaggio di reagenti ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$  necessaria al raggiungimento del pH operativo), i consumi energetici (riscaldamento, aerazione) e il trattamento e smaltimento dei residui. Non meno importante, sull'efficienza di rimozione agisce la ripartizione tra forma proteica e ammoniacale dell'azoto in ingresso al trattamento.

## **2.2 Trattamenti dedicati al digestato agricolo**

Vantaggi quali la produzione di biogas utilizzabile in centrali di cogenerazione e il riutilizzo dei reflui zootecnici come concimi hanno permesso una larga diffusione del processo di digestione anaerobica per il trattamento dei reflui zootecnici. In seguito a digestione anaerobica, il contenuto di azoto rimane circa invariato a meno di piccoli decrementi dovuti alla formazione di ammoniaca gassosa e alla precipitazione di struvite secondo temperatura e pH. Tra i metodi di rimozione dell'azoto già descritti, quelli appositamente rivolti al digestato agricolo sono lo strippaggio dell'ammoniaca, la precipitazione di sali d'ammonio e la nitrificazione/denitrificazione convenzionale e a questi processi si aggiungono i processi biologici innovativi: l'evaporazione e concentrazione, la separazione solido/ liquido e i trattamenti a membrana.

### **2.2.1 Separazione solido/liquido**

Il trattamento di separazione solido/liquido si basa sul principio di separare fisicamente la frazione solida da quella liquida, contenente alte concentrazioni di ammonio disciolto, di un fango. L'efficienza di rimozione dell'azoto è strettamente legata alla ripartizione tra forma sospesa (proteine) e forma disciolta (proteine ed ammoniaca) dell'azoto. Nel complesso la rimozione è blanda e agisce solo sulla quota parte di azoto presente in forma sospesa, ma affinché ci sia l'effettiva rimozione dell'azoto è necessario che alla separazione solido/liquido faccia seguito un trattamento biologico della frazione liquida. Per quanto riguarda la frazione solida questa può essere asportata e trattata separatamente ad esempio per produrre del compost. Il processo può comportare la modifica del rapporto N/P nei flussi uscenti, ovvero, il fosforo permane in maggioranza nella frazione solida, mentre l'azoto ammoniacale, in virtù della sua solubilità, permane nella frazione liquida. Le tecnologie disponibili sono molteplici e prevedono l'impiego di vagli, stacci, presse a vite, filtropresse a nastro e centrifughe; in particolare quest'ultime permettono di ottenere i migliori risultati consentendo la rimozione delle particelle più fini. I principali vantaggi derivanti dall'impiego

di questo processo sono: la riduzione dei rischi di intasamento nelle condotte, la produzione di una frazione solida compostabile, la possibilità di ottenere liquami chiarificati con bassi livelli di inerti grossolani, fosforo e metalli pesanti e facilitare l'applicazione di effluenti di allevamento ai terreni agricoli (Burton 2007). Ogniqualvolta si preveda una tecnologia per la rimozione dell'azoto dai digestati, è necessario anteporre questo trattamento.

## 2.2.2 Evaporazione e condensazione

Una tecnologia applicabile al digestato agricolo, spesso abbinata allo strippaggio dell'ammoniaca, è l'evaporazione e concentrazione. Il refluo da trattare è caricato in apposite camere dove, per innalzamento della temperatura e/o della pressione, l'acqua viene fatta evaporare. Questo processo prevede la formazione di un condensato e di un concentrato residuo fortemente salino dove si trovano alte concentrazioni di azoto ammoniacale; in particolare, affinché l'azoto venga trattenuto in forma di ammonio disciolto, è necessario mantenere il concentrato ad un pH prossimo a 5. Il processo viene eseguito in più stadi in serie dove il condensato viene trattato applicando temperature di esercizio progressivamente inferiori (figura 2-2). Con questa configurazione le efficienze di rimozione per questa tecnologia possono arrivare fino al 90%.

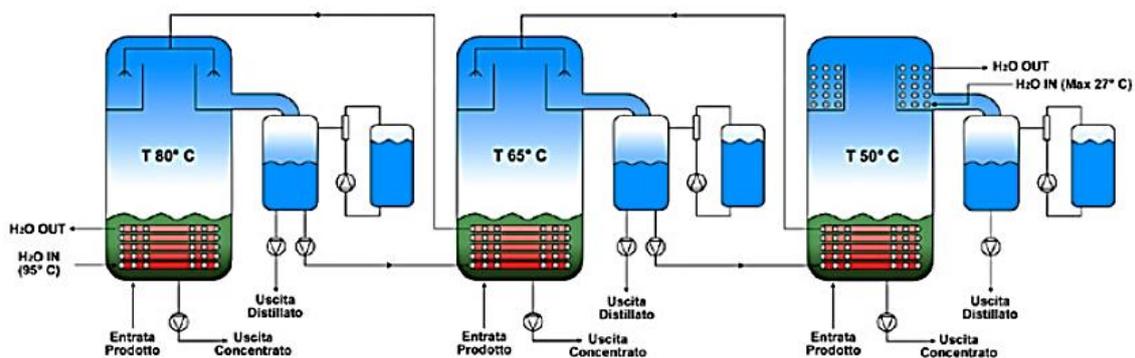


Figura 2-2 Esempio di sistema di trattamento per evaporazione e condensazione

### **2.2.3 Trattamenti a membrana**

Tra i processi di filtrazione su membrane semipermeabili che impiegano la pressione come forza motrice, l'osmosi inversa (RO) risulta essere l'unico trattamento possibile per la rimozione delle forme azotate presenti in forma ionica. Il processo si basa sulla filtrazione del digestato adeguatamente pretrattato, ottenendo in uscita due flussi distinti: il concentrato (o retentato) ad elevato contenuto salino, e il permeato che attraversa la membrana. La portata di concentrato può o meno essere ricircolata in alimento nella configurazione feed&bleed o smaltita in seguito a trattamenti di evaporazione condensazione o cristallizzazione. A causa di problemi di fouling della membrana soprattutto per polarizzazione per concentrazione non è possibile spingere oltre il 50% il fattore di recupero inteso come rapporto tra portata di permeato e portata di alimento. Il permeato ottenuto presenta ottime caratteristiche qualitative soprattutto per la completa rimozione della carica microbica, per contro mostra valori di pH in campo acido che devono essere necessariamente neutralizzati per poter prevenire fenomeni di corrosione dei manufatti. Il grande ostacolo nell'applicazione di questa tecnologia risiede soprattutto nei costi particolarmente elevati rispetto ad altre tecnologie, derivanti in larga misura della necessità di pretrattamenti spinti necessari al fine di evitare problemi di fouling e di massimizzare la durata delle membrane, nonché costi energetici e di smaltimento del concentrato.

### **2.3 Criteri di scelta e considerazioni economiche**

La scelta dello specifico trattamento è come di consueto funzione delle specifiche condizioni, nonché della fattibilità economica del processo stesso. Per fare un esempio, Maurer et al. (2003) hanno posto a confronto alcune tecnologie per la rimozione dell'azoto sul piano energetico. Dallo studio risulta che lo strippaggio con aria seguito da scrubber acido comporta in media un consumo di 90 MJ/kgN<sub>rimosso</sub>, la nitrificazione-denitrificazione con metanolo quale fonte di carbonio necessita invece di 109 MJ/kgN rimosso infine la

nitritazione parziale con processo solo autotrofo ha un consumo medio di 19 MJ/kg N rimosso.

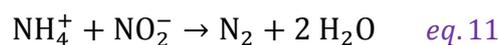
Per quanto riguarda i costi di trattamento, è stato stimato un costo medio di rimozione dell'azoto da digestati urbani pari a circa 1 euro/kgN<sub>rimosso</sub> utilizzando il processo autotrofo e 2-4 euro/kgN<sub>rimosso</sub> per le altre tecniche convenzionali (Van Hulle et al., 2010).

Naturalmente per poter scegliere il miglior processo non bisogna considerare solamente i costi energetici o, più in generale, considerare gli aspetti economici, sarebbe quindi preferibile un confronto tra alternative tramite LCA (Life Cycle Assessment); non sono tuttavia disponibili ad oggi confronti tra le tecnologie considerate basati su studi di tipo LCA.

## 2.4 Il processo anammox

### 2.4.1 La scoperta dei batteri anammox

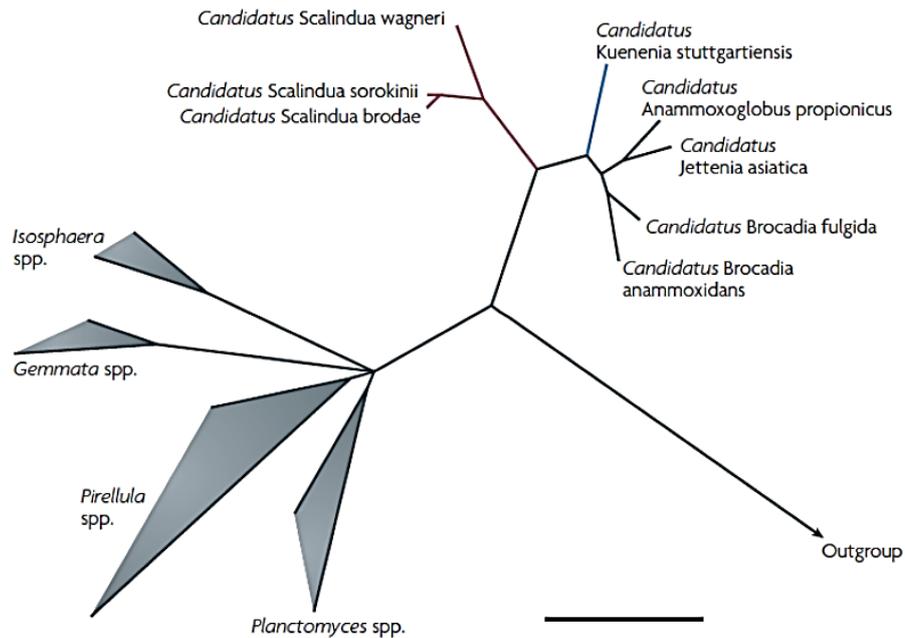
La denitrificazione e l'accumulo nei sedimenti furono per molti anni gli unici processi conosciuti dalla scienza per la rimozione dell'azoto dagli oceani, ad oggi se ne sono scoperti di altri, già nel 1941 Hamm e Thompson ritennero che l'ossidazione anaerobica dell'ammonio potesse essere uno dei processi di sequestro dell'azoto. Più di venti anni dopo, nel 1965, fu osservata la scomparsa dell'azoto ammoniacale in una colonna d'acqua, in condizioni anossiche (Richards, 1965). Ciò fu spiegato dall'ossidazione dell'ammonio con azoto nitrico *eq.11*.



Nel 1977 fu calcolata l'energia libera di Gibbs per questa ossidazione mostrando che la reazione è energeticamente favorita ( $\Delta G_0 = - 358 \text{ kJ / mol}$ ), (Broda, 1977). Il tassello mancante fu dato dalla prima evidenza diretta del processo anammox scoperto nel 1990 in un impianto di trattamento di acque reflue (Van de Graaf et al., 1990). Nel 1995, fu

osservata, nei fondali del Mar Nero, una zona di circa 20 m di spessore priva di ossigeno, ammonio e idrogeno solforato ma ricca in azoto nitrico (Murray et al. 1995). Si ipotizzò che l'ammonio fosse stato ossidato dall'azoto nitroso prima di venire a contatto con l'ossigeno. Nello stesso anno, il processo fu documentato per la prima volta in un reattore di denitrificazione a scala pilota nello stabilimento di produzione del lievito Gist – Brocades a Delft, Paesi Bassi (Mulder et al., 1995). In tale occasione venne assegnato, al potenziale processo, il nome anammox (anaerobic ammonium oxidation). Grazie ad esperimenti di marcatura con  $^{15}\text{N}$ , si dimostrò che la fonte di azoto molecolare era effettivamente rappresentata dall'ammonio e, in seguito ad analisi dei valori ottimali di temperatura e a trattamenti termici e con raggi gamma, si comprese che tale processo di conversione era di tipo biologico. In seguito a numerosi tentativi di arricchimento, un gruppo di ricerca condotto da Marc Strous operando con un reattore SBR (Sequencing Batch Reactor) riuscì ad ottenere una coltura di microorganismi anammox, sottolineando da subito il lento tasso di crescita con tempo di duplicazione pari approssimativamente a due settimane.

Da un'analisi al microscopio elettronico della coltura di arricchimento, si evidenziarono caratteristiche filogenetiche simili ai Planctomycetes; successive analisi sulle sequenze del gene 16S rRNA ne confermò la correlazione (Kuenen, 2008). Ad oggi, sono stati scoperti cinque generi di batteri anammox a cui, per la non capacità iniziale di essere mantenuti in coltura pura, venne attribuito lo stato tassonomico di Candidatus: Candidatus Brocadia (Strous et al., 1999; Kuenen e Jetten, 2001; Kartal et al., 2008), Candidatus Kuenenia (Schmid et al., 2000; Strous et al., 2006), Candidatus Anammoxoglobus (Kartal et al., 2007), Candidatus Jettenia (Quan et al., 2008) e Candidatus Scalindua (Kuypers et al., 2003; Schmid et al., 2003; van de Vossenberg et al., 2008). Quest'ultimo genere è stato spesso identificato in ambiente naturale: inizialmente nei sedimenti marini (Thamdrup and Dalsgaard, 2002), successivamente in colonna d'acqua del Mar Nero (Kuypers et al., 2003), nel Mar Artico (Rysgaard et al., 2004), nei sedimenti delle mangrovie subtropicali (Meyer et al., 2005) e infine nei sistemi lacustri (Schubert et al., 2006). In *figura 2-3* è riportato l'albero filogenetico dei batteri anammox basato sul gene 16S rRNA.

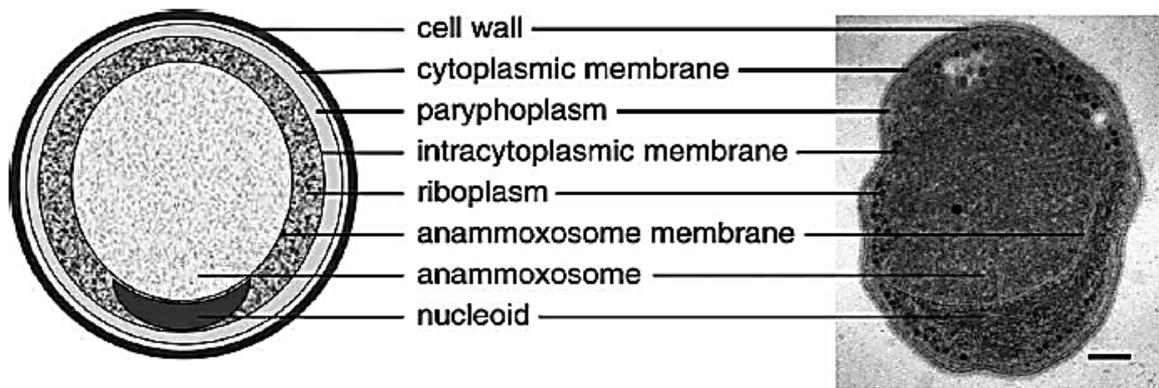


**Figura 2-3** Albero filogenetico dei batteri anammox basato sul gene 16S rRNA. La barra rappresenta il 10% di divergenza di sequenza (Kuenen, 2008)

## 2.4.2 Struttura di un batterio anammox

Visivamente i batteri anammox si presentano come ammassi granulari aventi colorazione variabile dal rosso intenso al marrone in funzione della percentuale di proteina Cytochrome responsabile del trasporto degli elettroni nella cellula (Jetten et al. 1999). I singoli batteri anammox di forma sferica (coccus) presentano generalmente un diametro inferiore a 1  $\mu\text{m}$ , derivando dall'ordine dei Planctomycetes, sono autotrofi anaerobici e chemiolitotrofi (van Niftrik et al., 2004). Due elementi caratterizzanti i Planctomycetes rispetto alle altre cellule batteriche sono: la presenza di organelli intracellulari legati alla membrana e l'assenza di peptidoglicano, polimero costituente la parete cellulare batterica (König et al., 1984; Liesack et al., 1986; Stackebrandt et al., 1986; Fuerst, 1995). All'interno della parete cellulare sono presenti due membrane, all'interno delle quali è presente un compartimento citoplasmatico chiamato *parifoplasma*. La membrana più interna intracitoplasmatica racchiude un altro compartimento cellulare, il *riboplasma* contenente i ribosomi, il DNA e un'altra membrana caratteristica dei batteri anammox chiamata *anammoxosoma* che occupa fino al 70% in

volume dell'intera cellula (Strous et al., 1999; Lindsay et al., 2001). Riepilogando, il citoplasma nei batteri anammox è costituito da tre compartimenti separati ciascuno da una membrana a singolo strato: il parifoplasma, il riboplasma e l'anammoxosoma privo di ribosomi (van Niftrik et al., 2008a; 2008b). In *figura 2-4* è mostrata la struttura di un batterio anammox.



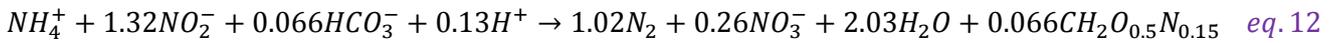
**Figura 2-4** Immagine schematica di un batterio anammox e fotografia al microscopio elettronico di *Candidatus Brocadia Anammoxidans*. (Van Niftrik et al., 2004)

Le membrane dei batteri anammox sono caratterizzate da strutture lipidiche uniche che comprendono catene idrocarburiche a 3 o 5 anelli ciclobutanici concatenati linearmente chiamati ladderani. I più comuni gruppi di testa dei ladderani sono la fosfocolina e la fosfoetanolamina, particolarmente abbondanti nell'anammoxosoma (Sinninghe Damsté et al., 2002). La struttura appena descritta si presenta in forma impaccata, ciò permette di rendere la membrana impermeabile a composti apolari, evitando la perdita degli intermedi metabolici quali ossido nitrico e idrazina.

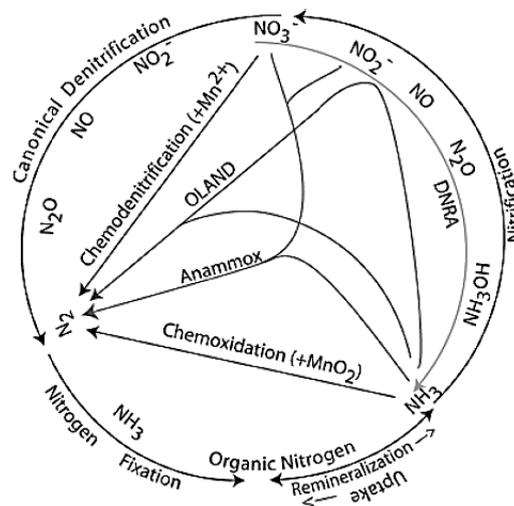
### **2.4.3 Il processo anammox: stechiometria e cinetica**

La stechiometria accettata per il processo anammox fu sperimentalmente proposta da Strous et al. (1998). Un'analisi dei bilanci di massa mostra che i batteri anammox utilizzano anidride carbonica CO<sub>2</sub> come fonte di carbonio per produrre biomassa (CH<sub>2</sub>O<sub>0,5</sub>N<sub>0,15</sub>) e il

nitrito  $\text{NO}_2^-$  non solo come accettore di elettroni per l'ossidazione dell'ammonio  $\text{NH}_4^+$  ma anche come donatore di elettroni per la riduzione dell'anidride carbonica.



In questa reazione, circa l'89% dell'azoto in ingresso sia in forma di ammonio che di nitrito viene convertito in azoto gas  $\text{N}_2$ , mentre il restante 11% viene ossidato a nitrato per produrre gli elettroni equivalenti richiesti per la sintesi di nuova biomassa (Strous et al., 1998). In accordo con la eq.12, è sempre necessaria una fonte di nitrito per soddisfare 1,32 mol $\text{NO}_2^-$ /mol $\text{NH}_4^+$ . Tale richiesta viene soddisfatta antepoendo al processo anammox una fase di nitrificazione parziale regolata in modo da ottenere l'ossidazione aerobica a nitrito di circa il 50% dell'azoto ammoniacale in ingresso. Si ha in questo modo un risparmio di circa il 63% della richiesta di ossigeno rispetto al trattamento biologico convenzionale. Inoltre, diversamente dal processo di denitrificazione, è totalmente assente la richiesta di una fonte di carbonio organico (Jetten et al. 1998; Van Dongen et al. 2001). In figura 2-5 sono rappresentati i processi di rimozione dell'azoto.



**Figura 2-5 Processi di rimozione dell'azoto (Brandes et al, 2007)**

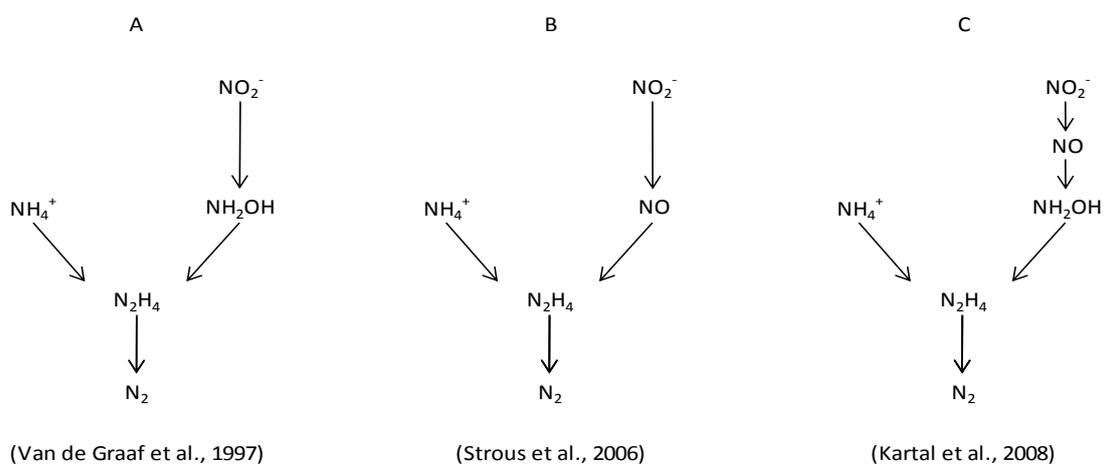
Il processo anammox è interessante ingegneristicamente anche per altre caratteristiche quali la bassa produzione di fango (Strous et al. 1998), dovuta alla bassa resa cellulare pari a circa 0,159–0,165 gCOD/g $\text{NH}_4^+$ , e la ridotta produzione di emissioni quali  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{NO}$

rapportate al carico di azoto nell'influenza (Kampschreuer et al. 2008; Pellicer – Nàcher et al. 2010).

Caratteristica fondamentale dei microorganismi anammox è il basso tasso di crescita pari a circa 0,065 1/d (Strous et al. 1998), altri autori documentano valori leggermente differenti ma in ogni caso compresi nell'intervallo 0,05 – 2 1/d (Tsushima et al., 2007; Van der Star et al., 2008; Lotti, 2011).

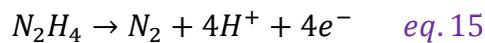
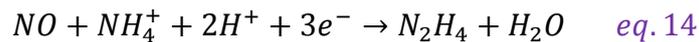
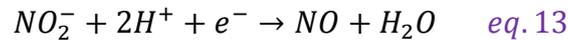
L'attività specifica anammox è fortemente influenzata dal pH e dalla temperatura. Valori di pH compresi tra 6,7 e 8,3 hanno permesso di ottenere buoni valori di attività con punte massime per pH prossimo a 8 con *Candidatus Brocadia Anammoxidans* (Jetten et al., 1998; Strous et al., 1999). Altri studi mostrano che è possibile adattare i batteri anammox in condizioni di pH elevato attorno al valore 9,3 (Ahn et al., 2004). Per quanto concerne la temperatura, si riportano in letteratura valori ottimali di 37 – 40°C (Strous et al., 1999), ma molteplici sono gli studi che riportano buone efficienze di rimozione a temperatura ambiente (Egli et al. 2001; Vázquez –Padìn et al., 2011; Yang et al. 2011b; Yang et al 2011a).

A livello biochimico risulta interessante conoscere il modo in cui lo ione ammonio viene utilizzato. In letteratura si trovano diversi studi sul possibile metabolismo anammox, tutti documentano la formazione dell'idrazina  $N_2H_4$  prima di ottenere l'azoto gassoso  $N_2$ . Inizialmente Van de Graaf et al. (1997) ipotizzò la riduzione dello ione nitrito a idrossilammina prima di formare l'idrazina che viene successivamente ossidata per ottenere azoto gassoso (figura 2-6, A).



**Figura 2-6 Possibili sequenze delle reazioni intercorrenti nel processo anammox**

Il pathway, ipotizzato da Strous et al. (2006) (*figura 2-6, B*) studiando *Kuenenia stuttgartensis*, comprende una serie di almeno tre reazioni redox: la riduzione del nitrito ad ossido nitrico *eq.13*, la condensazione dell'ossido nitrico e dell'ammonio a formare idrazina *eq.14*, l'ossidazione dell'idrazina ad azoto molecolare *eq.15*.



In seguito Kartal et al. (2008), ha individuato a monte una riduzione di elettroni da nitrito a ossido nitrico e poi a idrossilammina, successivamente l'idrossilammina si combina con l'ammonio a formare idrazina e quindi l'azoto gassoso (*figura 2-6, C*). In generale non fu prevista la conversione diretta del nitrito ad idrazina ma attraverso idrossilammina e ossido nitrico (Van de Star, 2008).

In seguito all'individuazione dell'idrazina-idrossilammina ossidoriduttasi (HAO), uno degli enzimi chiave del processo, è stato confermato che il processo anammox si svolge all'interno dell'anammoxosoma (Lindsay et al., 2001; Van Niftrik, 2008b); inoltre, dalla colorazione dell'enzima citocromo perossidasi, si è potuta evidenziare la presenza delle proteine citocromo c soprattutto sulla superficie interna dell'anammoxosoma; esse si ipotizza che partecipino alla catena di trasporto degli elettroni confermando così il ruolo energetico dell'anammoxosoma. Dallo studio del genoma di *K. stuttgartensis*, sono stati identificati i geni che codificano gli enzimi responsabili del metabolismo anammox: una nitrato-nitrito ossido reduttasi (NarGH), una ossido nitrico-nitrito ossidoreduttasi (Nir, Baker et al., 1997) e 9 enzimi, paraloghi divergenti, dell'idrossilammina-idrazina ossidoreduttasi (HAO/HZO, Hooper et al., 1997). La presenza dell'ossido nitrico-nitrito ossido reduttasi Nir è del tutto sorprendente poiché in precedenza (*figura 2-6, A*) l'ossido nitrico NO non era riconosciuto come intermedio del metabolismo anammox. Dal confronto del flusso di elettroni del metabolismo dei batteri AOB emerge una forte somiglianza con il metabolismo anammox, che vede in entrambi i casi il ruolo centrale rivestito dagli enzimi HAO/HZO responsabili dell'ossidazione, rispettivamente dell'idrossilammina e dell'idrazina (Jetten et al., 2009).

Nonostante l'individuazione dell'enzima idrossilammina ossidoriduttasi HAO, non fu ancora del tutto chiaro se l'idrossilammina partecipasse o meno nel metabolismo anammox.

Una recente sperimentazione condotta da Kartal et al. (2011), sempre sulla specie *K. stuttgartiensis*, ha permesso di individuare due possibili vie metaboliche: una già precedentemente individuata da Strous et al. (2006) che non prevede il passaggio dall'idrossilammina, e l'altra che prevede la partecipazione dell'idrossilammina quale intermedio di reazione. L'esperimento di Kartal et al. (2011) è stato condotto in 2 fasi: nella prima fase è stato dimostrato che l'ossido nitrico è un diretto precursore dell'idrazina, mentre nella seconda fase è stato riscontrato che batteri anammox incubati con ammonio e idrossilammina sono in grado di produrre idrazina. Questo conferma che entrambe le vie metaboliche ipotizzate sono percorribili, tuttavia non è ancora noto il fattore discriminante tra una via e l'altra.

Allo stato dell'arte, non si conoscono ancora due step della reazione: il primo è rappresentato dalla fase critica in cui l'ammonio si combina con l'ossido nitrico, tramite un legame azoto-azoto, a formare l'idrazina (*idrazina sintasi*) (Harhangi et al., 2012), mentre il secondo è rappresentato dalla riduzione del nitrito ad ammonio. Quest'ultima reazione viene effettuata dai batteri anammox in condizioni di stress (Strous e Jetten, 2004) ed è necessaria a spiegare anche la loro capacità (verificata sperimentalmente) di ridurre gli ioni nitrato ad azoto molecolare in assenza di ammonio e con acidi organici come unica fonte di carbonio (Güven et al., 2005; Kartal et al., 2007a). Recenti ricerche hanno infatti mostrato che gli anammox non sono strettamente chemiolitotrofi; oltre alla conversione di ammonio e nitrito, i batteri anammox sono anche in grado di ridurre sia il nitrato a nitrito e ad azoto gassoso, sia il nitrito ad ammonio, utilizzando acidi organici o lo ione ferroso ( $Fe^{2+}$ ) come donatori di elettroni (*figura 2-7*). La produzione di nitrito e/o ammonio serve ancora come substrato per il normale catabolismo anammox (Kartal et al., 2007). Per quanto riguarda gli accettori di elettroni, invece, oltre al nitrito i batteri anammox utilizzano anche  $Fe^{3+}$ , ossidi di manganese e nitrato (Strous et al., 2006).

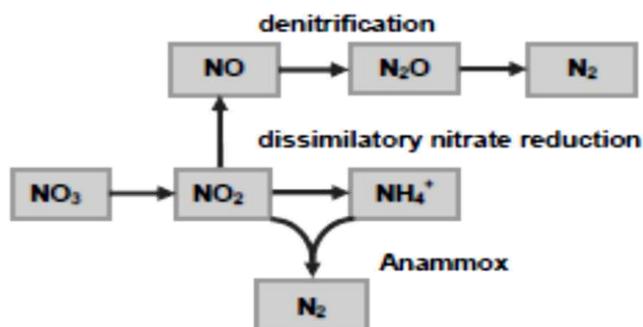


Figura 2-7 Complesso delle ossidazioni e delle riduzioni sostenute dai batteri anammox (Trita-LWR PsD Thesis 1053)

#### 2.4.4 Inibizione dell'attività

I batteri anammox si sono dimostrati sensibili a diverse condizioni ambientali che ne possono perturbare l'attività specifica, in primis l'ossigeno disciolto a bassi livelli in una quantità da 0,25% a 2% rispetto alla saturazione ne inibisce l'attività in maniera reversibile (Strus et al. 1997; Egli et al. 2001). L'attività viene completamente recuperata tornando alle condizioni anossiche. Un'alta concentrazione di azoto nitrico, oltre 1 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, invece non causa effetti negativi sui batteri anammox e neanche le elevate concentrazioni di azoto ammoniacale solitamente alimentate ai reattori hanno presentato effetti negativi e quindi la possibilità di inibizione non è stata presa in considerazione. Per quanto riguarda l'azoto nitroso, numerosi sono gli studi che ne documentano l'effetto inibente, per concentrazioni differenti in funzione della diversa tipologia di influente, nonostante sia l'accettore terminale di elettroni. Una riduzione dell'efficienza di rimozione si ha per concentrazioni dell'ordine dei 100 mgN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (Strous et al. 1999), altre ricerche riportano concentrazioni di oltre i 180 mgN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (Van de Graaf et al. 1996; Egli et al. 2001; Schmidt et al. 2003), altri ancora dimostrano la presenza di inibizione già per concentrazioni di 60–70 mgN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (Van Dongen et al. 2001; Arrojo et al. 2008) o addirittura di 30–50 mgN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L dopo sei giorni di esposizione (Fux et al. 2004). L'inibizione da azoto nitroso si è dimostrata irreversibile (Strous et al. 1999). La concentrazione che in grado di inibire il 50 % della biomassa (IC<sub>50</sub>) è stato stabilito essere pari a 350 mgN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L (Dapena - Mora et al. 2007). Del tutto contrastante con quanto affermato da Strous nel 1999 in merito all'irreversibilità dell'inibizione da nitrito

sono i risultati di una sperimentazione sia su breve che su lungo periodo testando sia un'alimentazione in batch che una in continuo condotta nel 2010 (Kimura et al.). Dall'esperimento in batch emerse che l'attività cominciava a decrescere giunti a concentrazioni oltre i 274 mgNO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L, mentre nel caso di alimentazione in continuo un decremento del 10% si ebbe per concentrazioni nell'alimento di oltre 750 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L; in seguito ad una sua diminuzione, dopo tre giorni venne a ripristinarsi la normale attività.

Anche la sperimentazione di Lotti (2012) è stata molto importante per lo studio dell'inibizione della biomassa a breve e lungo termine per opera di ossigeno e nitrito. I risultati hanno chiaramente dimostrato che all'aumentare del tempo di esposizione alle alte concentrazioni di nitrito si presentano perdite più elevate di attività specifica, in particolare, per esposizioni alle concentrazioni di 1000 mgN/L di nitrito, si verificano perdite di attività specifica del 20% circa per 2 ore di esposizione e del 90% circa per 24 ore di esposizione. È stata inoltre dimostrata l'incapacità da parte degli ioni nitrito di compromettere completamente il metabolismo anammox, in quanto anche in seguito alla esposizione a concentrazioni di nitrito pari a 6 gN/L la biomassa è stata in grado di recuperare fino al 47% dell'attività. Per quanto riguarda la presenza di ossigeno disciolto è stato dimostrato che l'inibizione è completamente reversibile per concentrazioni fino a 9 mgO<sub>2</sub>/L.

La presenza di sostanza organica invece non interferisce direttamente con il metabolismo dei microrganismi anammox, ma favorisce la crescita dei batteri eterotrofi denitrificanti, ad eccezione del metanolo che si è rivelato tossico (Dapena - Mora et al. 2007). La coesistenza con i batteri eterotrofi denitrificanti è possibile (Strous et al. 1997), ma il lento tasso di crescita dei batteri anammox li pone in svantaggio nella competizione per lo spazio e il substrato nel caso venga assicurato un continuo apporto di carbonio (Chamchoi et al. 2008; Lackner et al. 2008). Altri studi mostrano l'inattivazione dei batteri anammox per la presenza di acetato o altri composti organici alimentati con rapporto C/N prossimo a 2 (Chamchoi et al. 2008; Molinuevo et al. 2009). È stato verificato anche che durante lo start up del processo anammox in presenza di batteri eterotrofi denitrificanti si osserva una diminuzione dell'efficienza di rimozione dell'azoto. Tuttavia, assicurare la copresenza dei due ceppi batterici attraverso il controllo dell'azoto nitrico e del COD alimentato consente di ottenere un effluente di qualità migliore.

In letteratura si conferma inoltre che esistono altri composti esogeni che possono compromettere l'attività anammox, i più citati sono il cloruro di sodio, gli agenti flocculanti e gli antibiotici.

### **2.4.5 Applicazione del processo anammox per il trattamento delle acque reflue**

Il processo anammox vede molte applicazioni ed è attualmente utilizzato in molti impianti a scala di laboratorio che trattano un'ampia varietà di reflui ad alto contenuto di ammonio e con basso rapporto C/N, dal digestato (Van Dongen et al. 2001, Caffaz et al. 2006; Vlaeminck et al 2009), ai reflui zootecnici (Ahn et al. 2004; Hwang et al. 2006; Molinuevo et al. 2009), ai reflui dell'industria alimentare (Dapena – Mora et al 2006) al percolato di discarica (Siegrist et al 1998b; Egli et al. 2001; Zhang e Zhou 2006; Rusalleda et al. 2008, Liang et al. 2009; Li et al. 2010; Xu et al. 2010; Zhou e Yao 2010; Wang et al. 2011a). Il primo reattore anammox a scala reale con una volumetria di 70 m<sup>3</sup> è stato realizzato presso l'impianto di trattamento delle acque reflue di Sluisjesdijk (Rotterdam, Paesi Bassi) per il trattamento del digestato ed ha una capacità di trattamento di circa 750 kg N / giorno (Van der Star et al. 2007).

Il risparmio in termini di costi per i prodotti chimici e per l'aerazione risparmiata è stato ampiamente dimostrato. Nonostante ciò, gli impianti a scala reale sono solo in numero esiguo. Il problema principale nell'implementazione di questo processo risiede negli iniziali costi elevati per le attrezzature ingegneristiche, a cominciare dalla speciale configurazione dei reattori e dal raggiungimento di biomassa sufficiente per inoculare nuovi reattori. Entrambi i problemi sono fondamentalmente dovuti al lento tasso di crescita della biomassa anammox (Strous et al. 1998; Van der Star et al. 2007) che comporta lunghi tempi di start up e di arricchimento. Ad esempio il reattore a scala reale di Rotterdam ha richiesto più di due anni per ottenere una biomassa stabile e solo al 1235 giorno si è avviato il processo (Van der Star et al. 2007).

Come già detto in precedenza, l'ossidazione anaerobica dell'ammonio necessita di una fonte di nitrito, ottenibile attraverso il processo di nitrificazione parziale dell'ammonio nell'influenza. Sono possibili due alternative principali per combinare la nitrificazione parziale

con il processo anammox: la configurazione in singolo reattore e la configurazione in doppio stadio.

### 2.4.6 Configurazione in reattore singolo

La coesistenza tra batteri anammox e batteri ammonio ossidanti AOB può essere realizzata nello stesso reattore (*figura 2-9*). Tutte le realizzazioni impiantistiche (sia a biomassa sospesa che a biomassa adesa) che impiegano tale soluzione si basano sull'integrazione di entrambe i processi, dove il gradiente di ossigeno disciolto può essere ottenuto realizzando rispettivamente uno strato aerobico e uno anossico permettendo l'attività sia degli AOB che degli anammox (Gong et al. 2008; Bao et al. 2009; Xiao et al. 2009; Vlaeminck et al. 2010).

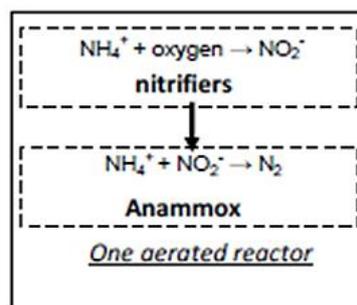


Figura 2-8 Schema teorico del processo configurato con un reattore singolo

Questa tipologia di sistema può essere ottenuta attraverso il mantenimento dell'ossigeno disciolto OD in condizioni limitanti. Parecchie tecnologie adoperano questa strategia, ad esempio il processo CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Removal Over Nitrite) (Kuai e Verstraete 1998; Third et al. 2001; Sliemers et al. 2003; Zhang et al. 2009), il processo OLAND (Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification) (Kuai e Verstraete 1998; Verstraete e Philips 1998; De Clippeleir et al. 2011) e il processo DEMON (Deammonification a pH- controllato) (Wett 2007) sono valide alternative che combinano la nitrificazione parziale e gli anammox. Il primo impianto a scala reale ad utilizzare il processo DEMON in configurazione SBR è stato realizzato per trattare le acque reflue dell'impianto centralizzato di Strass in Austria (Wett 2007). I risultati mostrano un abbattimento di circa il 40% sul

consumo di ossigeno con la conseguente riduzione di energia elettrica richiesta da 2,9 kWh/kgN a 1,16 kWh/kg N.

### 2.4.7 Configurazione bifase: PARNIT e anammox

In questa configurazione il reattore di nitrificazione parziale precede il reattore anammox (*figura 2-12*), in modo tale da poter gestire in modo autonomo e ottimizzato entrambi i processi.

Nel reattore di nitrificazione parziale (PARNIT) circa il 50% dell'ammonio deve essere convertito in nitrito per produrre la miscela adatta per il processo anammox sfruttando biomassa *Nitrosomonas*.



La concentrazione di ossigeno disciolto mantenuta nel reattore è 1,5–2 mgO<sub>2</sub>/L e le elevate concentrazioni di ammonio e nitrito garantiscono l'inibizione dei batteri nitrito ossidanti NOB, condizione cruciale per garantire la buona riuscita del processo. Il controllo del processo è solitamente eseguito tramite il controllo dell'alcalinità; è infatti noto dalla stechiometria che, mantenendo il rapporto molare ammonio/alcalinità pari a 1:1, si garantisce la nitrificazione del 50% circa dell'ammonio in quanto solo il 50% dei protoni prodotti dall'ossidazione dell'ammonio può essere bilanciato con la capacità tampone del bicarbonato. Il massimo rateo di ossidazione dell'ammonio per la biomassa si raggiunge per valori di pH compresi tra 7,5 e 8 e per temperature dell'ordine dei 30 °C (Groeneweg et al., 1994).

Per quanto riguarda il reattore anammox, vengono mantenute le condizioni anossiche in modo da creare le condizioni utili all'arricchimento degli specifici ceppi batterici. L'effettiva rimozione dell'azoto avviene principalmente ad opera dei batteri anammox e in piccola parte ad opera dei batteri eterotrofi denitrificanti. I principali parametri di funzionamento sono costituiti dal pH, temperatura, SRT e agitazione meccanica. In particolare, nel caso in cui

venga utilizzato un reattore con biomassa di tipo granulare, l'agitazione non deve essere troppo elevata per evitare di disgregare i granuli (Arrojo et al., 2006).

Il primo processo applicato combinando un sistema a due fasi è stato il processo SHARON (single reactor system for high ammonia removal over nitrite process) – ANAMMOX (Van Dongen et al. 2001) utilizzato per il trattamento dei fanghi da digestore nell'impianto di trattamento delle acque reflue di Rotterdam – Dokhaven.

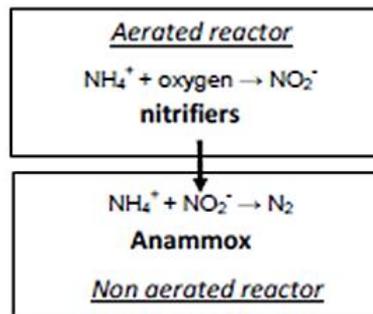


Figura 2-9 Schema teorico del processo configurato in due fasi

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Procedure

Le misurazioni di alcalinità e di solidi sospesi totali e volatili sono state realizzate in conformità con le procedure APAT IRSA-CNR contenute nel rapporto 29/2003.

#### 3.1.1 Alcalinità

L'alcalinità totale di un'acqua rappresenta la sua capacità di neutralizzare gli acidi ed è la somma di tutte le basi titolabili da un acido.

Per il calcolo dell'alcalinità è stato utilizzato il metodo potenziometrico che prevede l'aggiunta di volumi noti di soluzione di riferimento di acido cloridrico e l'annotazione, dopo ogni aggiunta, del valore del pH misurato con un pH-metro al fine di ricavare un punto di equivalenza. Individuato il punto di equivalenza, l'alcalinità totale  $T$  si calcola con la seguente formula:

$$T \left( \frac{meq}{l} \right) = \frac{b * N * 1000}{V} \quad eq.17$$

dove  $V$  rappresenta il volume del campione analizzato,  $N$  la normalità della soluzione di riferimento e  $b$  il dosaggio di acido necessario al raggiungimento del punto di equivalenza.

### 3.1.2 Solidi sospesi totali e volatili

Con il termine solidi sospesi s'intendono tutte quelle sostanze non disciolte di un campione che sono trattenute da un filtro a membrana quando il campione stesso è sottoposto a filtrazione.

La procedura non è stata seguita nei dettagli ma sono state apportate delle modifiche per adattare il metodo alle esigenze operative. Le modifiche più significative sono le seguenti:

- I filtri utilizzati sono stati del tipo *GF/C* (filtri in microfibra di vetro senza legante) di diametro medio dei pori pari a circa 1  $\mu\text{m}$  e non di 0,45  $\mu\text{m}$  come previsto;
- per la determinazione dei solidi sospesi totali i campioni sono stati lasciati in stufa a 105°C per 90 minuti invece di 60 minuti;
- la stufa a muffola è stata impostata per lavorare alla temperatura di 540°C invece di quella di 600°C suggerita dalla procedura.

I solidi sospesi totali (SST) e volatili (SSV) sono stati rispettivamente calcolati con le formule seguenti

$$SST \left( \frac{mg}{l} \right) = \frac{(M_1 - M_0) * 1000}{V} \quad eq. 18$$

$$SSV \left( \frac{mg}{l} \right) = \frac{(M_2 - M_1) * 1000}{V} \quad eq. 19$$

Dove  $M_0$  rappresenta il peso del filtro vuoto,  $M_1$  il peso del filtro dopo essiccamento in forno,  $M_2$  il peso del filtro dopo incenerimento in stufa a muffola e  $V$  il volume di campione filtrato. La determinazione dei solidi sospesi volatili fornisce una stima della sostanza organica contenuta nella frazione solida di un'acqua di scarico o di un fango attivo, per questo motivo la sua misura fornisce delle importanti indicazioni operative sugli impianti di trattamento delle acque. Va segnalata infine per questo metodo l'importanza del campionamento del refluo da filtrare; è infatti fondamentale che venga prelevato un campione rappresentativo e omogeneo.

### 3.2 Analisi delle forme azotate e del COD

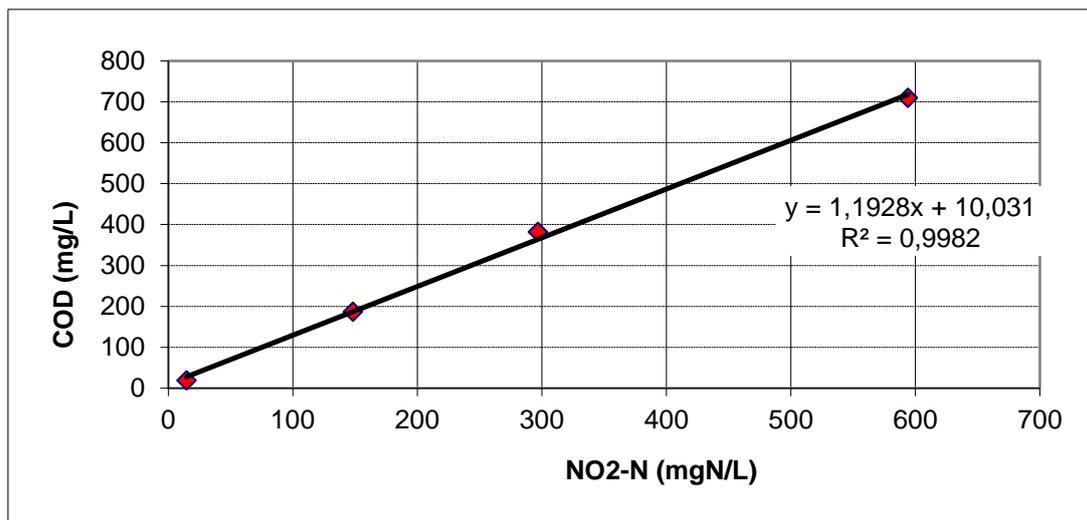
Una componente preponderante dell'attività sperimentale è costituita dalla determinazione delle concentrazioni delle specie di interesse, nello specifico sono state misurate le forme azotate: ione ammonio  $\text{N} - \text{NH}_4^+$ , ione nitrito  $\text{N} - \text{NO}_2^-$  e ione nitrato  $\text{N} - \text{NO}_3^-$  e la domanda chimica di ossigeno COD. Uno dei metodi più rapidi per ottenere un valore di concentrazione con ridotta entità di errore è costituito dai test in cuvetta con misurazione spettrofotometrica. A tal fine sono stati utilizzati specifici kit test commerciali (Hach Lange GmbH, Dusseldorf, Germany) con misura su spettrofotometro del tipo *Lange Xion500*. La procedura di misurazione prevede in generale la filtrazione del campione su filtro in acetato di cellulosa a  $0,45 \mu\text{m}$  per poter rimuovere la componente sospesa, problematica per una misura di tipo ottica. Per ogni singolo test vengono inoltre forniti gli estremi minimo e massimo di concentrazioni rilevabili; per questo motivo la fase di filtrazione deve essere preceduta da una fase di diluizione con acqua distillata ultrapura al fine di far cadere all'interno del range di misura del kit la concentrazione da misurare. In *tabella 3-1* si riportano i kit impiegati e i rispettivi range di concentrazioni.

**Tabella 3-1 Elenco dei kit usati**

<b>Specie analizzabile</b>	<b>Tipo di kit</b>	<b>Range di misura</b>
<b>N – NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Lange LCK 304	0.015 ÷ 2.0 mg l <sup>-1</sup>
	Lange LCK 303	2 ÷ 47 mg l <sup>-1</sup>
	Lange LCK 302	47 ÷ 130 mg l <sup>-1</sup>
<b>N – NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Lange LCK 341	0.015 ÷ 0.6 mg l <sup>-1</sup>
	Lange LCK 342	0.6 ÷ 6.0 mg l <sup>-1</sup>
<b>N – NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Lange LCK 339	0.23 ÷ 13.5 mg l <sup>-1</sup>
	Lange LCK 340	13.5 ÷ 35 mg l <sup>-1</sup>
<b>COD</b>	Lange LCK 314	15 ÷ 150 mg l <sup>-1</sup>

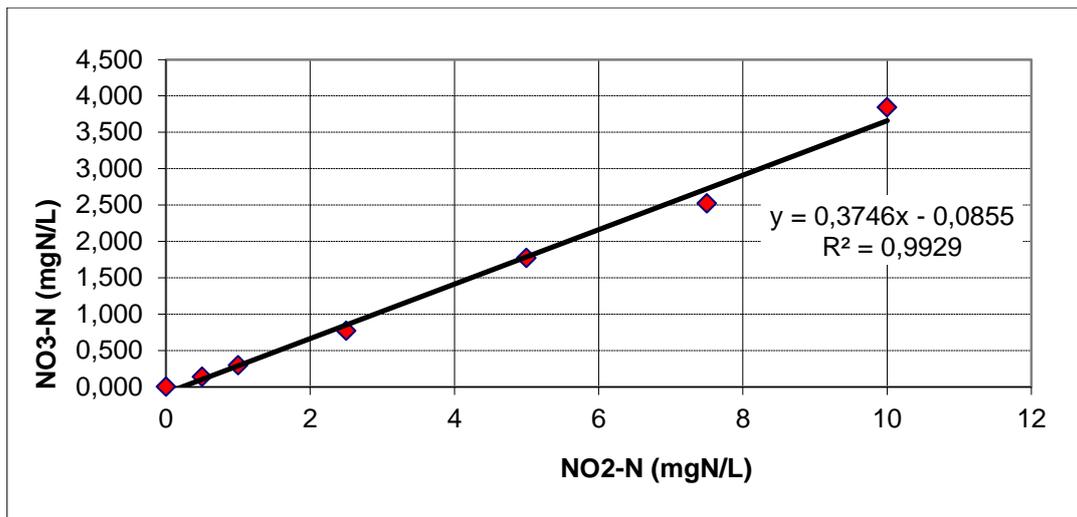
Più in dettaglio per quanto riguarda la misurazione del COD se viene effettuata la filtrazione a  $0,45 \mu\text{m}$  si otterrà il COD solubile altrimenti si misurerà il COD tal quale. In entrambi i casi la procedura per la valutazione della concentrazione di COD prevede il mantenimento alla temperatura di  $148 \text{ }^\circ\text{C}$  per 120 minuti delle cuvette prima della misura spettrofotometrica

Durante la sperimentazione sono emersi alcuni problemi di interferenza, in particolare nel caso del COD, la presenza di ioni nitrito nel campione comportano una rilevante sovrastima della misura. Per questo motivo si è provveduto alla quantificazione e alla successiva correzione delle misure eseguendo prove test di COD su campioni contenenti esclusivamente concentrazioni note di ioni nitrito come riportato in *grafico 3-1*.



**Grafico 3-1 Interferenza dovuta a ioni nitrito sulla misura del COD**

Si deduce che per ogni mg/l di N-NO<sub>2</sub>- presente si ha un contributo di 1,19 mg / l di COD da sottrarre alla misura finale del COD. Un altro interferente per la misura del COD, è lo ione cloruro che causa, come per lo ione nitrito, problemi di sovrastima, ma solo se contenuto in concentrazione superiore ai 1500 mg/l. In merito alle misure delle concentrazioni di azoto ammoniacale e di azoto nitroso non sono emerse interferenze rilevanti, maggiori indicazioni vengono segnalate del fornitore che ne indica di possibili rispettivamente con sostanze riducenti per il primo e con ioni rame per il secondo. Diversamente la misura dell'azoto nitrico è soggetta ad interferenza da ioni nitrito che ne causano una sovrastima, sebbene in misura inferiore rispetto al COD. Il procedimento seguito per quantificare e correggere tale interferenza è stato lo stesso già impiegato per la correzione del COD, misurando questa volta la concentrazione di azoto nitrico di diverse soluzioni a concentrazioni note di nitrito, nel *grafico 3-2* se ne apprezza l'entità.



**Grafico 3-2 Interferenza dovuta a ioni nitrito sulla misura dello ione nitrato**

Si ricava che per ogni mg/l di  $\text{N-NO}_2^-$  si ha un contributo pari a 0,37 mg / l di  $\text{N-NO}_3^-$  da sottrarre alla misura ottenuta dall'analisi. Un altro metodo prevede la completa eliminazione dell'interferenza tramite dosaggio in eccesso di acido solfamminico  $\text{NH}_3\text{SO}_3\text{H}$  che è in grado di reagire istantaneamente con gli ioni nitrito liberando azoto gassoso. Un dosaggio di 5-6 mg di acido solfamminico (quanto una punta di spatola) è sufficiente a rimuovere completamente gli ioni nitrito fino a concentrazioni di 20 mgN/L.

### 3.2.1 Modalità di campionamento

Le modalità di campionamento sono di estrema importanza al fine di ottenere un risultato significativo e sono differenti a seconda del campione desiderato.

Le analisi del contenuto delle forme azotate, del COD, dell'alcalinità e dei solidi sospesi in uscita sono state eseguite sull'effluente dei reattori e, per entrambi, il campionamento consiste nell'attendere la fase di scarico in coda al ciclo di lavoro dei reattori e nel prelievo di parte dello scarico. È importante avere l'accortezza di attendere alcuni minuti per consentire la pulizia preliminare del tubo di uscita e di avvinare il contenitore in cui viene raccolto il campione.

Per quanto riguarda il prelievo di campioni di sospensione batterica (mixed liquor), tipicamente utilizzati per eseguire analisi di solidi sospesi e di forme azotate durante la conduzione delle prove di attività, è stata utilizzata un'altra metodologia, differente per i 2 reattori.

Per il reattore anammox il campionamento ha previsto l'estrazione di una porzione di miscela sospesa tramite prelievo da una pescante attraverso l'utilizzo di una siringa graduata. Per ottenere un'elevata rappresentatività del campione è bene aumentare la velocità del miscelatore meccanico del reattore e iniettare alcuni ml di N<sub>2</sub> gas, prelevati dalla testa del reattore, al fine di pulire la pescante prima di prelevare il campione. Per il reattore PARNIT invece, il campionamento viene eseguito semplicemente estraendo una porzione di mixed liquor mediante una pescante. Non è necessario aumentare la miscelazione in quanto, non essendo composta da biomassa granulare, la sospensione è sempre ben miscelata.

### **3.3 Metodo manometrico di stima dell'attività batterica**

#### **3.3.1 Introduzione al metodo manometrico**

Le prove manometriche per la determinazione dell'attività biologica sono state condotte basandosi sul metodo introdotto da Dapena-Mora et al. (2007). In generale il metodo manometrico prevede la conduzione di una serie di prove in batch in cui viene misurata a intervalli regolari la sovrappressione che si genera all'interno di un recipiente sigillato ermeticamente. La sovrappressione è direttamente collegata alla produzione di gas (N<sub>2</sub> per gli anammox) da parte della biomassa attraverso la legge dei gas perfetti (eq.20). Noto l'andamento della produzione di gas nel tempo è possibile stimare l'attività batterica.

$$P * V = n * R * T \quad eq.20$$

dove V, R e T sono noti e rappresentano rispettivamente il volume dello spazio di testa, la costante dei gas perfetti pari a 0,0821 L\*atm/mol\*K e T la temperatura di esercizio, P è la



In generale la conduzione delle prove ha previsto l'allestimento di due o tre bottiglie contenenti una miscela di biomassa e di refluo sintetico. La composizione del refluo sintetico è riportata in *tabella 3-7*. Delle bottiglie preparate, una ha la funzione di bianco in cui le condizioni operative rimangono le medesime per l'intera durata delle prove, mentre sulle altre sono svolti i test e lavorano in condizioni diverse da quelle del bianco. L'arco di durata di una prova può andare da una a due settimane e varia con l'attività della biomassa e della tipologia della prova. Durante questo arco di tempo vengono periodicamente dosate delle soluzioni concentrate di ioni ammonio e nitrito; il consumo di questi da parte dei batteri anammox comporta una produzione di azoto gas che si accumula nello spazio di testa della bottiglia e genera una sovrappressione che viene letta della *OxiTop measuring Head* e, dopo che l'attività cessa a causa dell'esaurimento del nutriente limitante, si somministra un nuovo dosaggio. Tra un dosaggio e l'altro sono stati prelevati dei campioni di sospensione per la conduzione delle analisi sulle forme azotate. A fine prova si prelevano dei campioni per la stima dei solidi sospesi totali e volatili con i quali si calcolano le attività specifiche delle biomasse. I valori di attività specifica anammox (SAA) sono infine confrontati tra di loro prendendo quelli del bianco come riferimento e così facendo si possono valutare gli esiti delle prove.

Durante la sperimentazione sono state eseguite 8 prove caratterizzate da diverse finalità e classificabili in:

- prove per valutare l'attività della biomassa anammox utilizzata nelle precedenti sperimentazioni prima dell'avviamento del nuovo reattore SBR;
- prove per valutare l'attività della nuova biomassa, acquisita in data 4 maggio 2012, messa a contatto con diverse percentuali di refluo reale;
- prove per verificare il recupero di attività da parte della biomassa dopo inibizione.

La descrizione completa e dettagliata delle singole prove insieme ai rispettivi risultati è rimandata al *capitolo 4*.

### 3.3.3 Trattamento dei dati delle prove manometriche

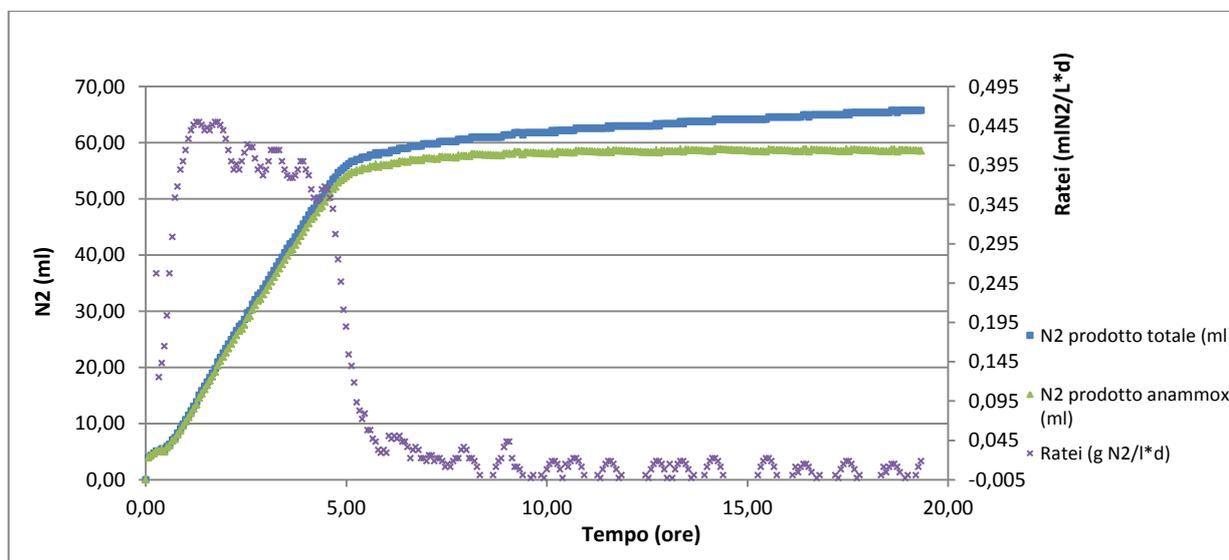
Viene qui descritta la procedura con cui vengono elaborati ed interpretati i dati manometrici. Sotto le ipotesi che la miscela si trovi inizialmente satura di N<sub>2</sub> e che la frazione dell'N<sub>2</sub> prodotto che si discioglie nella soluzione sia trascurabile è possibile applicare la legge dei gas perfetti, grazie alla quale si possono correlare i valori di sovrappressione letti dalla testa delle bottiglie con la quantità di azoto prodotto dall'attività batterica:

$$n \text{ (mmol)} = \frac{p * V_{testa}}{R * T} \quad eq. 21$$

$$V_{azoto} \text{ (ml)} = n * V_{m,ce} \quad eq. 22$$

In cui  $p$  rappresenta il valore di pressione letto dalla testa,  $V_{testa}$  il volume dello spazio di testa della bottiglia ottenuto come differenza tra il volume liquido contenuto e il volume totale della bottiglia,  $R$  la costante dei gas perfetti pari a 0,0821 L\*atm/K\*moli,  $T$  la temperatura di lavoro e  $V_{m,ce}$  il volume molare alle condizioni effettive di temperatura.

Calcolando l'azoto prodotto per ogni dato di pressione letto, si ottiene una serie di valori che diagrammati consentono di esaminare l'andamento della produzione di gas nel corso della prova. Un esempio è riportato nel *grafico 3-3*.



**Grafico 3-3 Esempio dell'andamento della produzione di N<sub>2</sub> durante una prova manometrica**

Il volume di gas prodotto calcolato con i valori letti dalle teste rappresenta l'azoto prodotto sia dai batteri anammox, che dai batteri denitrificanti; questa produzione è rappresentata

dalla curva  $N_2$  prodotto totale (blu nel grafico) che normalmente è composta da tre tratti con diversa pendenza: un tratto iniziale di acclimatazione seguito da un tratto centrale a forte pendenza, caratterizzato da un'intensa attività batterica, seguito a sua volta da un tratto finale a bassa pendenza rappresentante la sola attività denitrificante eterotrofa. Il flesso al termine del tratto centrale indica la cessazione dell'attività anammox causata dall'esaurimento di nitriti o ammonio disciolti. La curva netta della sola attività anammox ( $N_2$  prodotto anammox, in verde nel grafico 3-3) si ottiene semplicemente sottraendo il contributo dato dalla denitrificazione eterotrofa.

Il rateo medio di rimozione dell'azoto della biomassa anammox si ottiene dividendo la pendenza del tratto centrale della curva netta per la concentrazione dei solidi sospesi volatili della miscela.

$$\text{Rateo} \left( \frac{gN_2}{gSSV * d} \right) = \frac{\text{pendenza}_{tc} \left( \frac{gN_2}{L * d} \right)}{SSV \left( \frac{gSSV}{L} \right)} \quad \text{eq. 23}$$

Una volta calcolato il rateo è importante verificare la qualità del dato ottenuto, per questo motivo per ogni prova è necessario operare una verifica sia confrontando i volumi di azoto prodotti teoricamente da stechiometria con quelli ottenuti sperimentalmente, sia impostando un bilancio di massa sull'azoto a inizio e fine prova.

Le produzioni di azoto teoriche sono state calcolate considerando sia il solo processo anammox sia la presenza concomitante della denitrificazione e le equazioni coinvolte sono:

- Calcolo della produzione teorica di azoto molecolare da processo anammox:

$$\Delta N_{2,anammox} (mmol) = \Delta NH_4^+ * \left( \frac{N_2}{NH_4^+} \right)_{stec,anammox} \quad \text{eq. 24}$$

Dove  $\Delta NH_4^+$  rappresenta la differenza tra la quantità di ioni ammonio presente nella miscela a inizio e a fine prova e  $(N_2/NH_4^+)_{stec,anammox}$  rappresenta il rapporto molare stechiometrico tra la produzione di azoto e il consumo di ioni ammonio da parte della biomassa anammox. I valori di tutti i rapporti stechiometrici impiegati nell'elaborazione dei dati sono riportati in tabella 3-2;

- Calcolo della rimozione di ioni nitrato da parte della biomassa denitrificante:

$$\Delta NO_3^-_{stec,denit} (mmol) = \Delta NO_3^- + \Delta NH_4^+ * \left( \frac{NO_3^-}{NH_4^+} \right)_{stec,anammox} \quad eq.25$$

dove  $\Delta NO_3^-$  e  $\Delta NH_4^+$  rappresentano rispettivamente la differenza tra le quantità di ioni nitrato e ammonio presenti nella miscela a inizio e a fine prova e  $(NO_3^-/NH_4^+)_{stec,anammox}$  rappresenta il rapporto molare stechiometrico tra la produzione di nitrato e il consumo di ammonio da parte degli anammox;

- Calcolo della produzione teorica di azoto molecolare complessivo:

$$\Delta N_{2,totale} (mmol) = \Delta NH_4^+ * \left( \frac{N_2}{NH_4^+} \right)_{stec,anammox} + \Delta NO_3^- * \left( \frac{N_2}{NO_3^-} \right)_{stec,denit} \quad eq.26$$

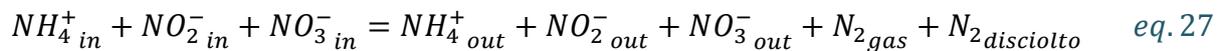
dove  $\Delta NO_3^-$  e  $\Delta NH_4^+$  rappresentano rispettivamente la differenza tra le quantità di ioni nitrato e ammonio presenti nella miscela a inizio e a fine prova mentre  $(N_2/NH_4^+)_{stec,anammox}$  e  $(N_2/NO_3^-)_{stec,denit}$  rappresentano rispettivamente i rapporti molari stechiometrici tra la produzione di azoto e il consumo di ammonio da parte degli anammox e tra la produzione di azoto e il consumo di nitrato da parte della biomassa eterotrofa denitrificante.

**Tabella 3-2 Valori dei rapporti stechiometrici impiegati nel trattamento dei dati delle prove manometriche**

Rapporto molare stechiometrico	Valore
$N_2/NH_4$ anammox	1,02
$NO_3/NH_4$ anammox	0,26
$N_2/NO_3$ denitrificanti	0,5

Il bilancio di massa delle forme dell'azoto è servito a verificare che l'azoto presente a fine prova in forma disciolta si ritrovasse a fine prova in parte disciolto ed in parte in forma gassosa. A questo scopo, sono state considerate le moli degli ioni ammonio, nitrito e nitrato

ad inizio e fine prova e l'azoto molecolare prodotto e presente a fine prova sia nella fase gassosa, sia in forma disciolta nella fase liquida (stimato secondo la legge di Henry):



Questo calcolo ha inoltre permesso di dimostrare che il contributo della frazione di gas disciolto nella fase liquida è trascurabile, come da ipotesi iniziale, in quanto influisce mediamente per meno dell'1% sul bilancio totale.

L'analisi degli errori calcolati sugli scostamenti tra le produzioni teoriche e sperimentali e tra l'azoto ad inizio e fine prova hanno fornito importanti indicazioni sull'affidabilità delle prove e sulle metodologie operative permettendo di affinarle continuamente e di ottenere dati di miglior qualità.

### **3.4 Reattore a sequenza di fasi SBR PARNIT**

In questo paragrafo sono riportati la descrizione e il protocollo di gestione del reattore pilota SBR PARNIT.

#### **3.4.1 Struttura dell'impianto pilota SBR PARNIT**

I reattori impiegati nella sperimentazione sono del tipo SBR (Sequencing Batch Reactor), ossia un reattore batch a sequenza di fasi. Questo tipo di reattore basa il proprio funzionamento sul susseguirsi di più fasi ognuna delle quali realizza un diverso processo. In generale i reattori SBR prevedono un funzionamento per cui a un certo volume minimo iniziale di sospensione batterica viene caricato un certo quantitativo di alimento fino al raggiungimento del volume massimo desiderato e, dopo un periodo di reazione e di sedimentazione, si scarica il surnatante fino a tornare nelle condizioni di partenza e il ciclo può ricominciare.

L'impianto pilota, fornito dall'azienda *Seam engineering*, è composto da due vasche adiacenti, svolgenti una il ruolo di reattore con una capacità utile di 800 litri e una capacità di lavoro di 680 litri e l'altra di accumulo, e da un modulo logico PLC (Programmable Logic Controller) che svolge il ruolo di gestione della strumentazione e di registrazione dei dati di processo. È possibile anche eseguire la gestione del processo tramite controllo in remoto grazie a un sistema denominato *PLT Line*.

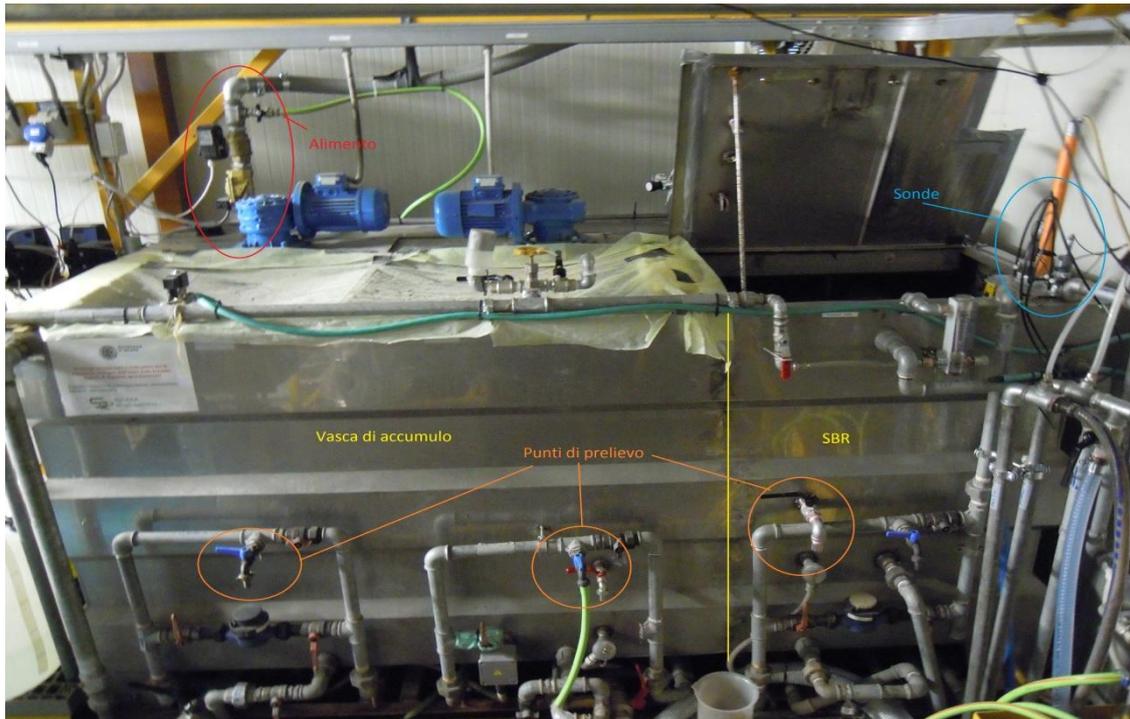
Entrambe le vasche sono dotate di:

- Una tubazione di alimento attraverso la quale l'influente viene caricato nella vasca di accumulo;
- 3 rubinetti per il prelievo di campioni in diversi punti, 2 per la vasca di accumulo e 1 per il reattore SBR;
- Un sistema di termostatazione costituito da resistenze immerse nel chiarito contenuto nella vasca di carico. Il reattore SBR non presenta un sistema di termostatazione autonomo in quanto il solo riscaldamento della vasca di carico è sufficiente per mantenere in tutto il sistema la temperatura desiderata di 30°C.

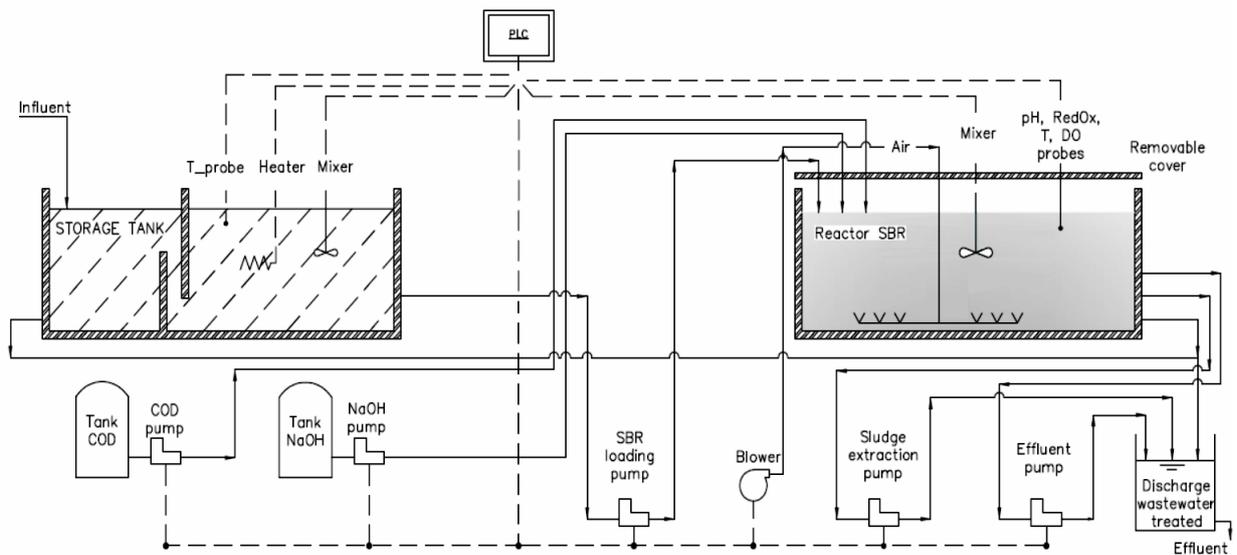
La vasca adibita al ruolo di reattore è ulteriormente fornita della seguente strumentazione:

- Una pompa temporizzata per lo scarico del surnatante a fine ciclo;
- Un sistema di aerazione dal fondo della vasca;
- Un sistema di miscelazione meccanico;
- 4 sonde per la registrazione in continuo di temperatura, pH, potenziale redox e ossigeno disciolto.

In *figura 3-2* sono mostrate la vasca di accumulo e il reattore SBR PARNIT, mentre in *figura 3-3* è riportato lo schema dell'impianto pilota PARNIT.



**Figura 3-2 Reattore SBR PARNIT**



**Figura 3-3 Schema dell'impianto pilota PARNIT**

### 3.4.2 Funzionamento del reattore SBR PARNIT

Il funzionamento del reattore ha previsto l'alternarsi di 5 diverse fasi così strutturate:

- Fase 1 – carico con areazione: il reattore inizialmente contenente un volume minimo pari a 600 litri di mixed liquor è caricato con l'alimento mediante una pompa temporizzata fino al raggiungimento del volume massimo di circa 680 litri.
- Fase 2 – aereazione: durante questa fase il volume è mantenuto costante e pari a quello massimo e la biomassa è mantenuta aerata e agitata allo scopo di favorire la reazione di nitrificazione parziale. La concentrazione di ossigeno disciolto è mantenuta tra 0,5 e 1 mgO<sub>2</sub>/L.
- Fase 3 – sedimentazione: l'agitazione è bloccata in modo da permettere la sedimentazione dei fiocchi di fango.
- Fase 4 – scarico: viene estratto surnatante in modo da diminuire il volume del mixed liquor nel reattore fino ad ottenere quello minimo. Una sonda di livello ferma la pompa di scarico quando il livello di surnatante nel reattore è pari a quello minimo desiderato.
- Fase 5 – Pausa: il sistema resta inattivo per 1 ora per motivi di semplicità gestionale. Così facendo infatti la durata complessiva del ciclo risulta di 6 ore ed è possibile eseguire 4 cicli completi nell'arco di una giornata.

La rappresentazione schematica del ciclo è riportata nella *tabella 3-3*:

**Tabella 3-3 Operazioni svolte dal reattore SBR PARNIT nelle varie fasi del ciclo di lavoro**

Azione \ Fase	Carico	Aerazione	Sedimentazione	Scarico	Pausa
Carico (L/d)	320				
Scarico (L/d)				302±35	
Miscelazione (rpm)	120	120			
Termostatazione (°C)	30	30	30	30	30
Aerazione					
DURATE DELLE SINGOLE FASI					
44 min	3 ore e 16 min		45 min	15 min	1 ora

La portata di scarico è mediamente inferiore a quella di carico in quanto una parte del volume di fango, mediamente 10,9 L/d, è stato estratto allo scopo di eseguire un controllo sul SRT. Il surnatante estratto viene scaricato in un pozzetto dal quale viene prelevato e ricircolato nella linea acque in testa all'impianto di depurazione dell'azienda agricola dove l'impianto pilota è sito.

Nonostante i fanghi siano di tipo fioccoso, la sedimentabilità è molto buona e per questo motivo un tempo di sedimentazione di 45 minuti è più che sufficiente per ottenere un effluente ben chiarificato.

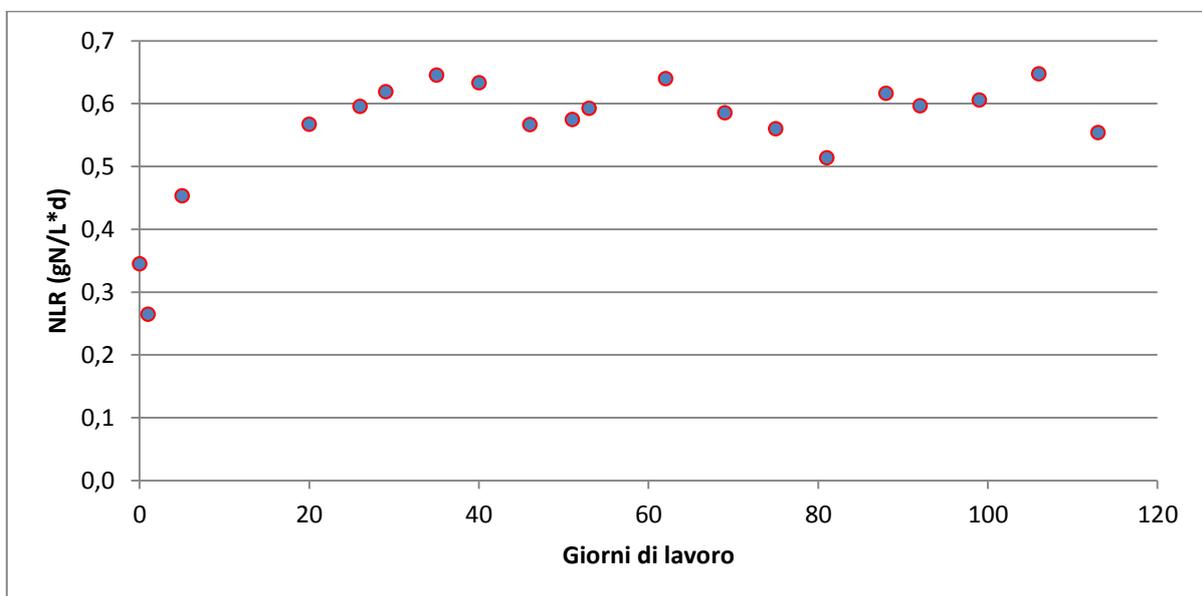
Il carico di azoto nell'influente NLR (Nitrogen Removal Rate, *grafico 3-4*) applicato durante la sperimentazione non è stato fissato a un valore desiderato, ma è dipeso dalle caratteristiche dell'influente.

Il NLR si calcola come:

$$NLR \left( \frac{gN}{L * d} \right) = \frac{NH_4^+ \text{ in } \left( \frac{gN}{L} \right) * V_{trattato} \left( \frac{L}{d} \right)}{V_{max}(L)} \quad eq. 28$$

Dove  $NH_4^+ \text{ in}$  rappresenta la concentrazione di ammonio in ingresso,  $V_{trattato}$  il volume di refluo trattato giornalmente e  $V_{max}$  il massimo volume raggiunto nel fermentatore.

In *grafico 3-4* si nota che i valori di NLR sono abbastanza costanti e compresi tra 0,51 e 0,65 gN/L\*d, eccetto per i primi giorni in cui sono stati mantenuti più bassi per favorire lo start-up dell'impianto.



**Grafico 3-4 Valori di NLR applicati**

In *tabella 3-4* sono invece riportati i valori dei principali parametri operativi per il reattore SBR PARNIT.

**Tabella 3-4 Parametri operativi fondamentali per il reattore SBR PARNIT**

Caratteristica	Valore max	Valore min	Media	Unità
HRT	3,58	2,13	2,22 <sub>+0,318</sub>	d
SRT	82,2	18,9	31,7 <sub>+18,2</sub>	d
NLR	0,640	0,260	0,559 <sub>+0,0966</sub>	gN/L*d

### 3.4.3 Caratterizzazione dell'influente

Il reattore PARNIT è situato presso un'azienda agricola nei pressi di Cremona ed il refluo reale con cui è alimentato è costituito principalmente dalla frazione liquida ottenuta a valle di una fase di centrifugazione operata sul digestato prodotto da flottato suinicolo, da pollina e mais in differenti quantità. L'effluente del processo PARNIT costituirà l'ingresso per il reattore anammox.

Nella *tabella 3-5* sono riportati tutti i valori minimi, massimi e medi assunti dai principali parametri operativi.

**Tabella 3-5 Caratteristiche fondamentali riguardanti l'influente del reattore SBR PARNIT**

Caratteristica	Valore max	Valore min	Media	Unità
Concentrazioni di NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> nell'influente	1370	942	1033 <sub>+470</sub>	mgN/L
Concentrazioni di NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> nell'influente	172	2,00	16,0 <sub>+44,9</sub>	mgN/L
Concentrazioni di NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> nell'influente	40,5	3,00	6,19 <sub>+9,78</sub>	mgN/L
Concentrazioni di azoto totale nell'influente	1,4	0,948	1,24 <sub>+0,978</sub>	gN/L
Concentrazioni di COD <sub>s</sub> nell'influente	3258	462	1873 <sub>+640</sub>	mgCOD/L
Concentrazioni di alcalinità nell'influente	7181	4200	6459 <sub>+702</sub>	mgCaCO <sub>3</sub> /L
BOD <sub>5</sub> totale dell'influente	1550	500	939 <sub>+310</sub>	gBOD <sub>5</sub> /L

### 3.4.4 Protocollo di monitoraggio del reattore SBR PARNIT

Il programma di monitoraggio è stato condotto eseguendo periodicamente le seguenti attività:

- Analisi per la determinazione delle forme azotate e del COD solubile in uscita dal reattore, svolte 2 volte alla settimana;
- Determinazione, una volta alla settimana, dei solidi sospesi totali e volatili del mixed liquor, dell'alimentazione e dello scarico del reattore;
- Analisi del contenuto di alcalinità nell'influente e nell'effluente, svolto 2 volte alla settimana;
- Conduzione di prove di attività nitrificante sul fango attivo, svolte ogni 15 giorni. Le prove sono state condotte con un titolatore automatico denominato MARTINA (Multiple Analyses Reprogrammable Titration Analyser; Artiga et al., 2005) fornito dall'azienda *SPES scpa* di Fabriano. Tramite titolazione pH/DO-stat a 6.5 mg/L di O<sub>2</sub>, pH = 8 e temperatura pari a 30°C è stato ricavato il massimo rateo di ossidazione dell'ammonio da parte della biomassa. Confrontando questi valori con i ratei di ammonio caricati giornalmente nel reattore, è stata infine calcolata la percentuale di carico massimo sostenibile con il quale è stato alimentato il reattore.

### **3.5 Reattore a sequenza di fasi SBR anammox**

In questo paragrafo sono riportati la descrizione e il protocollo di gestione del reattore SBR anammox.

#### **3.5.1 Struttura dell'impianto a scala di laboratorio SBR anammox**

Il reattore a scala di laboratorio utilizzato è prodotto dall'azienda *Pharmaring* ed è composto fondamentalmente da un fermentatore, da un'unità contenente le apparecchiature elettromeccaniche e un'unità logica; queste tre macro componenti sono in costante comunicazione tra loro. Il controllo sul processo può essere esercitato tramite uno schermo touchscreen montato sull'unità meccanica oppure tramite un PC connesso all'unità logica attraverso la quale è anche possibile scaricare le registrazioni dei dati di processo registrati.

Il fermentatore è di vetro della capacità di 4 litri ed è avvolto da una camicia esterna dentro la quale circola acqua allo scopo di termostatare il sistema. Esternamente è stato applicato un involucro di alluminio al fine di riparare la miscela dalla luce ed evitare l'indesiderata crescita di alghe autotrofe.

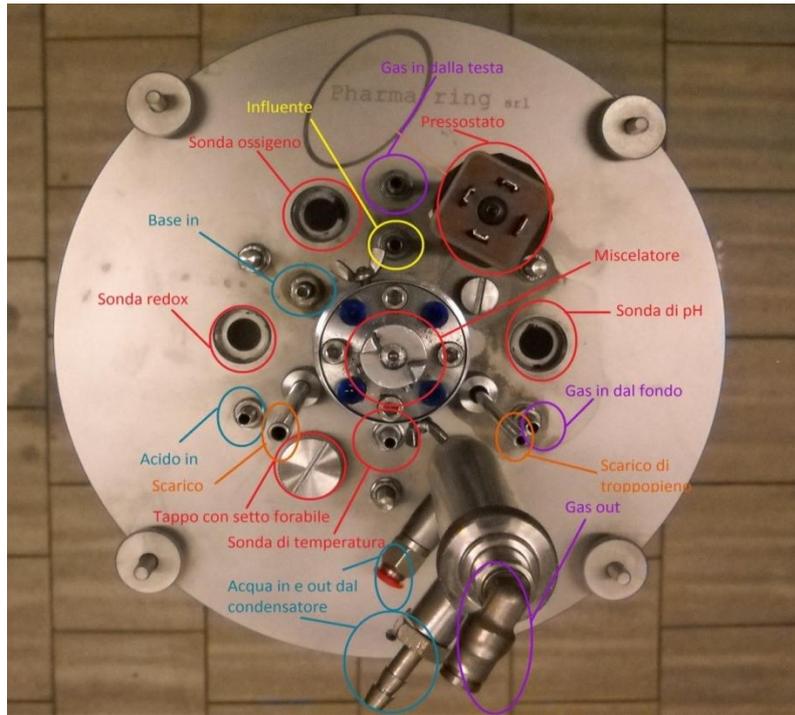
L'unità meccanica è il cuore del reattore e contiene le seguenti apparecchiature:

- 5 pompe peristaltiche adibite alle funzioni di scarico, scarico di emergenza da un troppopieno, carico, dosaggio di acido e dosaggio di base per il controllo del pH;
- 2 elettrovalvole, grazie alle quali si può insufflare gas dalla testa del fermentatore oppure dal fondo;
- Il sistema di termostatazione, composto di una resistenza e una pompa che permette la circolazione dell'acqua nella camicia esterna;
- 5 sonde che eseguono il controllo in continuo di potenziale redox, temperatura, pressione, concentrazione di ossigeno disciolto e pH all'interno del fermentatore.

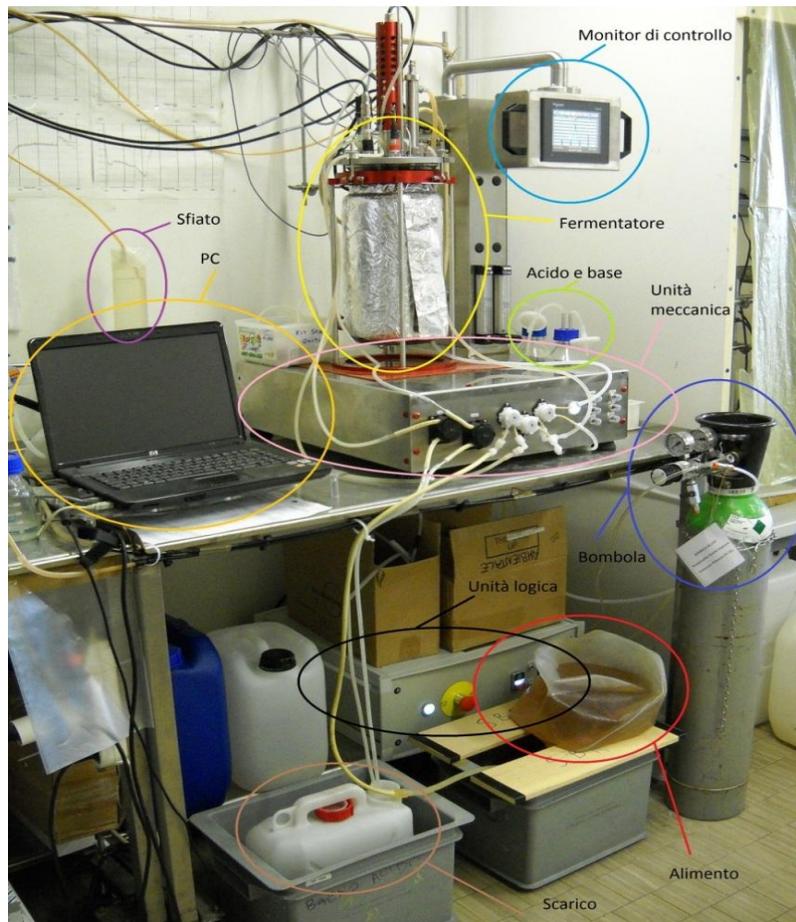
Il funzionamento completo dell'impianto a scala di laboratorio richiede anche l'utilizzo di:

- un contenitore collassabile contenente il refluo da caricare nel fermentatore che è collegata alla pompa di alimento;
- una tanica di raccolta dove far confluire il surnatante che viene scaricato ed, eventualmente, il mixed liquor scaricato in emergenza dal troppopieno. È importante che i tubi di scarico restino immersi al fine di impedire indesiderati ingressi di ossigeno nel fermentatore;
- un sistema di controllo della sovrappressione del gas nella testa del reattore. In questo caso è semplicemente costituito da uno sfiato posto sottobattente collegato con un tubo che esce dalla testa del reattore e affonda in un cilindro contenente acqua così da mantenere una sovrappressione di circa 20 millibar.
- una bombola contenente una miscela di gas composta per il 95% di N<sub>2</sub> e per il 5% di CO<sub>2</sub> e collegata alle elettrovalvole;
- 2 bottiglie contenenti acido (cloridrico 0,1N) e base (bicarbonato di sodio 1N) utilizzate per il controllo del pH.

In *figura 3-4* e in *figura 3-5* sono mostrati rispettivamente il dettaglio della piastra in testa al fermentatore con le connessioni realizzate e l'impianto completo.



**Figura 3-4** Dettagli della testa del reattore SBR



**Figura 3-5** Reattore SBR

### 3.5.2 Inoculo e funzionamento del reattore SBR anammox

Dopo un breve periodo di collaudo e messa a punto del reattore, è stato effettuato l'inoculo della biomassa anammox in data 9 maggio 2012 usando granuli provenienti dall'impianto di Dokhaven-Sluisjesdijk a Rotterdam (Van Der Star et al., 2007). Prima di inoculare è stato estratto un campione di biomassa umida dalla tanica di stoccaggio e su una parte di esso è stata fatta la stima dei solidi totali e volatili così da poter calcolare il quantitativo di granuli da pesare e inoculare nel fermentatore per raggiungere la concentrazione di SSV desiderata. I dettagli sono riportati in *tabella 3-6*.

**Tabella 3-6 Inoculo della biomassa nel reattore**

Frazione media di umidità rispetto al totale	86,4%	-
Frazione media di SSV rispetto ai SST	84,3%	-
Peso dei granuli umidi inoculati	111	g
SST inoculati	5,02	gSST / l
SSV inoculati	4,23	gSSV / l

Nel fermentatore è poi stato aggiunto refluo sintetico fino al raggiungimento del volume desiderato di 2,5 litri. In *figura 3-6* è riportata un'immagine del fermentatore ad inoculo avvenuto.



**Figura 3-6 Biomassa inoculata nel fermentatore**

Il funzionamento del reattore ha previsto l'alternarsi di 5 diverse fasi così strutturate:

- Fase 1 – carico: il reattore inizialmente contenente un volume minimo pari a 2,5 litri di mixed liquor è caricato con l'alimento attraverso l'azione di una pompa temporizzata fino al raggiungimento del volume massimo di 3 litri. La sovrappressione che si genera somministrando l'alimento è controllata dallo sfiato sottobattente.
- Fase 2 – reazione: durante questa fase il volume è mantenuto costante e pari quello massimo e la biomassa resta in agitazione allo scopo di favorire la rimozione dei nutrienti.
- Fase 3 – sedimentazione: l'agitazione è bloccata così da permettere ai granuli di sedimentare. Un periodo di sedimentazione di 15 minuti è più che sufficiente per ottenere un surnatante ben chiarificato.
- Fase 4 – scarico: una pompa a velocità variabile estrae surnatante in modo da riportare il volume del reattore ai 2,5 litri di partenza. La pompa è stata impostata in modo da scaricare un volume superiore a 0,5 litri per sicurezza, tuttavia il posizionamento della pescante è tale da impedire che il volume di mixed liquor scenda al di sotto quello minimo previsto. Onde evitare di operare in condizioni di depressione durante questa fase viene insufflato del gas dalla testa del reattore.
- Fase 5 – deossigenazione: prima che il ciclo riparta, dal fondo del reattore viene insufflato del gas per un periodo di 5 minuti così da mantenere la concentrazione di ossigeno disciolto ai livelli minimi.

La rappresentazione schematica del ciclo è apprezzabile dalla *tabella 3-7*.

La scelta di una fase di carico così lunga e con una portata così ridotta è dettata dalla necessità di mantenere un'alimentazione il più graduale possibile; una fase di carico più rapida causerebbe degli incrementi di concentrazione dei nutrienti più elevati e rischierebbe di rallentare l'attività batterica. Il controllo del pH è mantenuto attivo solo durante le fasi in cui è attiva anche la miscelazione per evitare che la sonda legga valori non rappresentativi e dosi acido o base portando il pH del mixed liquor a valori tali da danneggiare la biomassa. La miscelazione meccanica è stata mantenuta a 120 rpm per avere un'efficace omogeneizzazione della miscela senza che i granuli siano disgregati.

La durata totale del ciclo pari a 8 ore permette di eseguire 3 cicli completi nell'arco di una giornata con un tempo di ritenzione idraulica mediamente pari a 2 giorni.

**Tabella 3-7 Operazioni svolte dal reattore SBR anammox nelle varie fasi del ciclo di lavoro**

Azione \ Fase	Carico	Reazione	Sedimentazione	Scarico	Deossigenazione	
Carico (ml/min)	1,51					
Scarico (ml/min)				70		
Miscelazione (rpm)	120	120			120	
Termostatazione (°C)	35	35	35	35	35	
Controllo PH	7,7 ± 0,2	7,7 ± 0,2			7,7 ± 0,2	
Gas dalla testa (l/min)				0,5		
Gas dal fondo (l/min)					0,5	
DURATE DELLE SINGOLE FASI						
5 ORE E 30 MINUTI			2 ORE	15 MIN	10 MIN	5 MIN

La sperimentazione è stata condotta alimentando un influente contenente percentuali crescenti di refluo reale rispetto a quello sintetico. Dopo un breve periodo iniziale con alimento costituito solamente da refluo sintetico, la percentuale di refluo reale è stata incrementata a valori di 10%, 25%, 33% e 50%, come visibile nella *tabella 3-8*.

**Tabella 3-8 Percentuale di refluo reale nell'alimento del reattore e relativi giorni di funzionamento**

Percentuale di refluo reale nell'alimento	Dal giorno	Al giorno
0%	0	1
10%	2	26
25%	27	42
33%	43	60
50%	61	70

Allo scopo di evitare di stressare la biomassa, gli incrementi di percentuale di refluo reale sono stati eseguiti soltanto dopo aver verificato che l'attività anammox fosse in crescita o per lo meno stabile nel tempo.

Le concentrazioni di ioni ammonio e nitrito in alimento sono sempre state corrette aggiungendo i sali NaNO<sub>2</sub> e NH<sub>4</sub>Cl al fine di portarle ai valori desiderati e in seguito sono state eseguite delle analisi per verificare che le concentrazioni degli ioni ammonio e nitrito

fossero corrette. Il carico di azoto nell'influenza ha subito delle variazioni con il procedere della sperimentazione spaziando dal valore minimo di 0,35 gN/L\*d al valore massimo di 0,798 gN/L\*d.

Anche i valori del rapporto  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  hanno subito modifiche con il tempo variando dal valore massimo di 1,20 al minimo di 1,09 come si vede nei grafici 3-5 e 3-6.

La scelta di variare il rapporto tra nitrito e ammonio in alimento è stata dettata dagli sviluppi della sperimentazione in quanto rapporti più elevati sono stati causa di indesiderati accumuli di ioni nitrito. Questi accumuli si sono verificati in seguito all'adozione di rapporti  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  anche sottostechiometrici (paragrafo 4.2.1) che suggeriscono la probabile presenza di biomassa AOB nel sistema che, sebbene la concentrazione di ossigeno disciolto nel sistema sia molto bassa, comporta una leggera produzione di ioni nitrito.

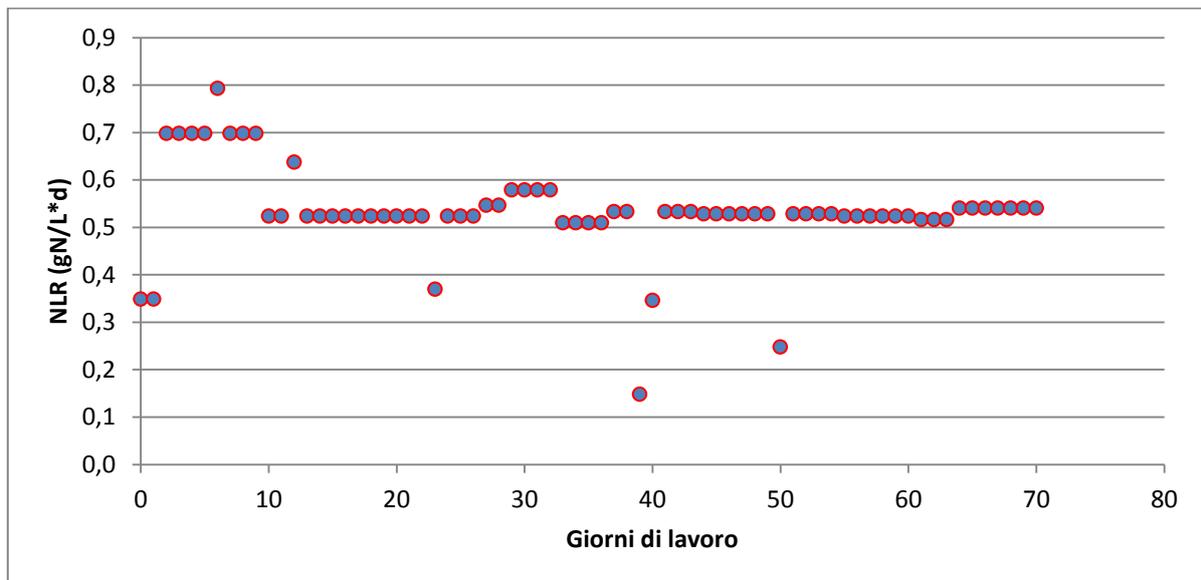
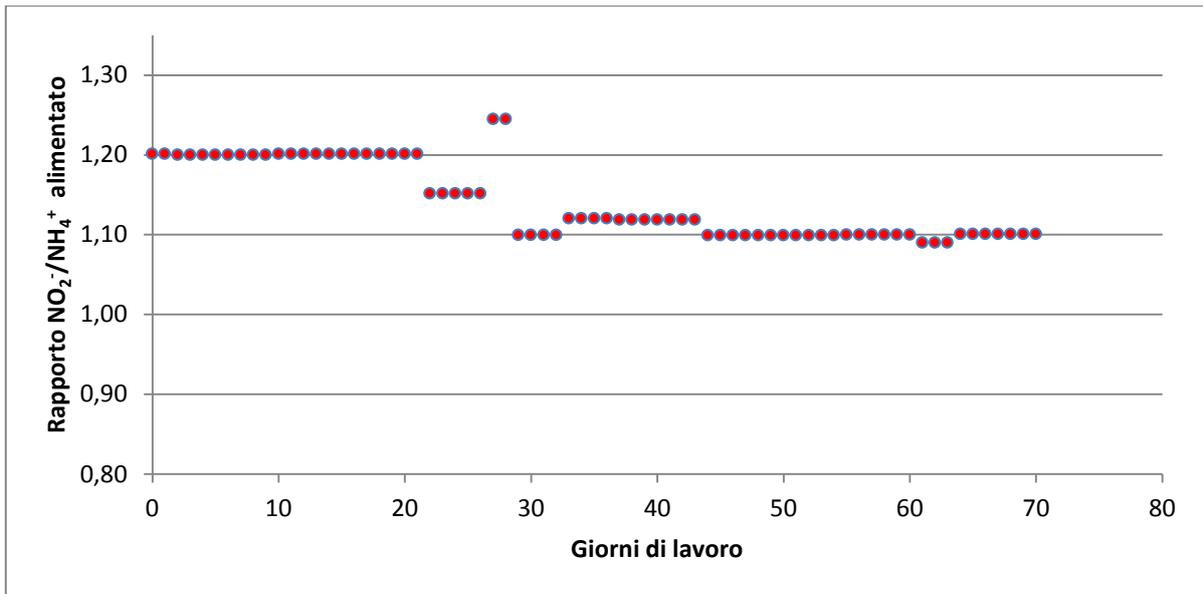
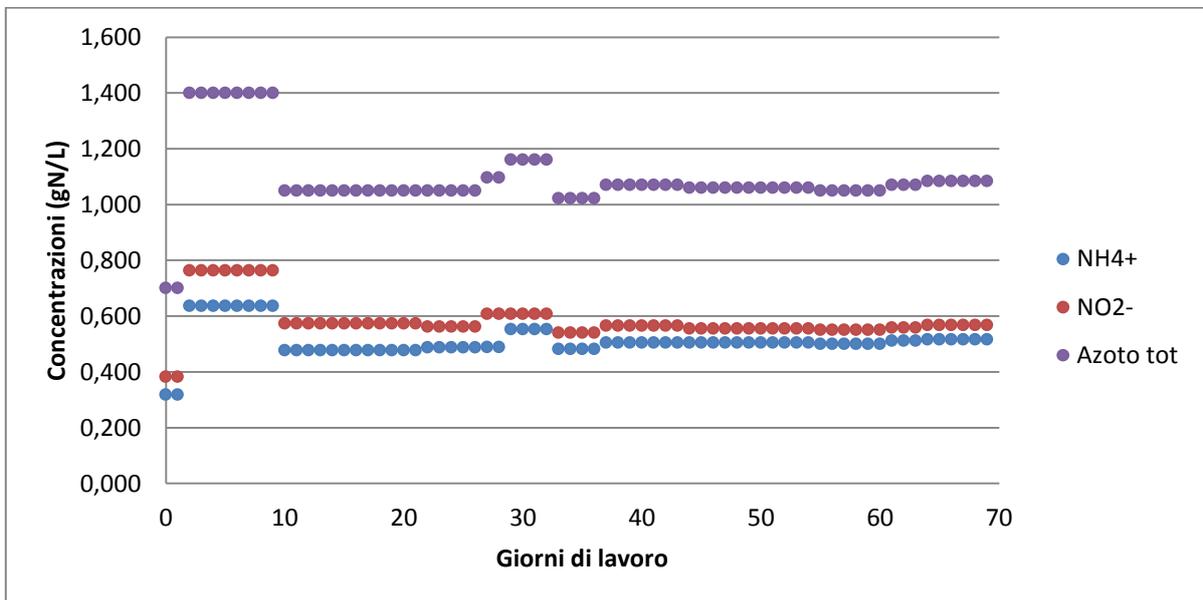


Grafico 3-5 Valori di NLR applicati durante la sperimentazione



**Grafico 3-6 Valori del rapporto  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  applicati durante la sperimentazione**

Nel *grafico 3-7* sono riportati i valori delle concentrazioni di azoto ammoniacale, nitroso e totale nell'influente.



**Grafico 3-7 Valori di concentrazioni di azoto ammoniacale, nitroso e totale nell'influente**

Sono riportati infine in *tabella 3-9* i valori dei parametri operativi principali adottati per il reattore SBR anammox.

**Tabella 3-9 Parametri operativi fondamentali per il reattore SBR anammox**

Caratteristica	Valore max	Valore min	Media	Unità
HRT	7,23	2,01	2,14 ±0,681	d
SRT	173,1	47,1	116,2 ±39,6	d
NLR	0,800	0,350	0,547 ±0,063	gN/L*d

### 3.5.3 Caratterizzazione dell'influente

L'influente è composto da una miscela di refluo sintetico (vedi *paragrafo 3.6.1*) e di refluo reale. Il refluo reale è costituito dall'effluente del reattore di nitrificazione parziale che è stato conservato settimanalmente e trasferito presso il laboratorio, dove è situato il reattore SBR anammox, all'interno di taniche che sono state stoccate in cella frigorifera a 4 °C.

Si riportano infine in *tabella 3-10* i valori minimo e massimo assunti dai principali parametri operativi e caratteristiche dell'influente.

**Tabella 3-10 Parametri fondamentali riguardanti il funzionamento del reattore SBR anammox**

Caratteristica	Valore max	Valore min	Media	Unità
Concentrazioni di $\text{NH}_4^+$ nell'influente	636	318	510 ±56,8	mgN/L
Concentrazioni di $\text{NO}_2^-$ nell'influente	763,6	382,0	582,7 ±72,9	mgN/L
Concentrazioni di $\text{NO}_3^-$ nell'influente	9,61	6,00	7,44 ±1,18	mgN/L
Concentrazioni di azoto nell'influente	1,41	0,71	1,10 ±0,128	gN/L
Concentrazioni di $\text{COD}_5$ nell'influente	603	100	328,1 ±157,4	mgCOD/L
Rapporto molare $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ nell'influente	1,24	1,09	1,14 ±0,048	-
$\text{BOD}_5$ dell'influente	70,0	10,0	32,9 ±19,1	gBOD <sub>5</sub> /L

### 3.5.4 Protocollo di monitoraggio e gestione del reattore SBR anammox

Le attività di gestione dell'impianto sono molteplici e prevedono sia misure analitiche che l'elaborazione dei dati ottenuti.

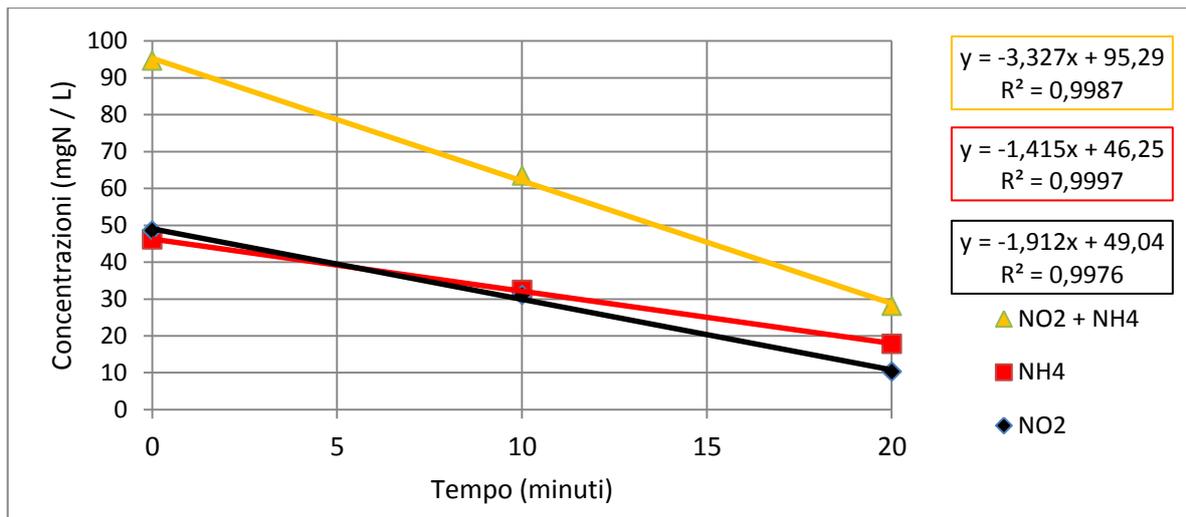
#### **3.5.4.1 Protocollo di monitoraggio**

Il programma di monitoraggio è stato condotto eseguendo settimanalmente le seguenti attività:

- Almeno 3 analisi complete per la determinazione delle forme azotate e del COD solubile in uscita dal reattore;
- Una determinazione dei solidi sospesi totali e volatili del mixed liquor e dello scarico del reattore. Nell'ultimo periodo di esercizio dell'impianto, quando la percentuale di refluo reale in ingresso è stata pari al 50%, è stata anche introdotta la determinazione dei solidi sospesi totali e volatili dell'alimento al fine di conseguire un più preciso bilancio dei solidi in ingresso e uscita dal sistema;
- Analisi granulometrica (PSD) della biomassa presente nel reattore, eseguita una volta nel corso dell'intera sperimentazione. Lo strumento utilizzato per l'analisi è il modello CILAS 1180 che utilizza una tecnologia brevettata (diffrazione laser e dispositivo a carica accoppiata, CCD), che consente in un'unica gamma la misura delle particelle tra 0,04 e 2.500 micron. Le particelle sottili sono misurate mediante diffrazione con il metodo Fraunhofer, mentre le particelle grossolane sono misurate con un real-time Fast Fourier Transform dell'immagine ottenuta con una fotocamera CCD, dotata di un'unità di elaborazione digitale.

#### **3.5.4.2 Prove di attività**

Le prove di attività rivestono un ruolo cruciale nella conduzione dell'attività sperimentale. Esse rappresentano il modo più preciso per la determinazione del massimo carico di azoto applicabile alla biomassa del reattore ( $NRR_{max}$ ), e sono state eseguite con cadenza settimanale o, per alcuni casi particolari, bisettimanale. La conduzione di una prova in generale prevede l'aggiunta impulsiva di ammonio e nitrito forando il setto in gomma posto sulla testa del fermentatore con una siringa. Dopo 10 minuti dall'iniezione si procede con l'estrazione di mixed liquor dal fermentatore e in seguito, a intervalli regolari, si effettuano altre 2 estrazioni; le concentrazioni di ioni ammonio e nitrito nei campioni vengono rappresentate in funzione del tempo. la pendenza della retta di regressione rappresenta il valore di  $NRR_{max}$  come  $mg\ N/(L \cdot min)$ . Un esempio di prova di attività è riportato nel *grafico 3-8*:



**Grafico 3-8 Esempio dei risultati ottenuti da una prova di attività**

Le rette di regressione nel *grafico 3-8* rappresentano il consumo di azoto ammoniacale, nitroso e totale. Moltiplicando il  $NRR_{max}$  per il volume del reattore è possibile calcolare la massima massa di azoto rimuovibile per unità di tempo. Questo valore è confrontato con il carico di azoto somministrato giornalmente (NLR) per avere una stima della percentuale a cui si sta caricando il reattore rispetto al massimo trattabile dalla biomassa.

$$NRR_{max} \left( \frac{gN}{d} \right) = \frac{NRR_{max} \left( \frac{g}{L * min} \right) * 60 \left( \frac{min}{ora} \right) * 24 \left( \frac{ore}{d} \right) * V(L)}{1000 \left( \frac{mg}{g} \right)} \quad eq. 29$$

$$Carico applicato (\%) = \frac{NLR \left( \frac{gN}{d} \right)}{NRR_{max} \left( \frac{gN}{d} \right)} \quad eq. 30$$

L'altra importante informazione ricavata dalle prove di attività è data dal confronto tra il rapporto  $NO_2^-/NH_4^+$  con cui i nutrienti sono rimossi e quello stechiometrico che è pari a 1,32. Questa informazione è importante per verificare che non vi siano reazioni parallele in concomitanza con quelle svolte dai batteri anammox. In particolare, nel caso in cui tale rapporto risulti superiore al valore stechiometrico allora vi è un contributo significativo della

biomassa eterotrofa denitrificante che, consumando nitrito, altera l'esito della prova causando una sovrastima dell'attività anammox. Per questo motivo, nel caso in cui si presenti questo inconveniente, il massimo carico applicabile si calcola considerando la sola rimozione dell'ammonio ( $NH_4RR$ ):

$$NRR_{max} \left( \frac{gN}{L * d} \right) = NH_4RR \left( \frac{gN}{L * d} \right) + NH_4RR \left( \frac{gN}{L * d} \right) * 1,32 \left( \frac{gNO_2^-}{gNH_4^+} \right) \quad eq.31$$

Sono inoltre stati calcolati, per ogni prova, il coefficiente di regressione  $R^2$  e l'errore standard SE, allo scopo di verificare la qualità dei dati ottenuti. L'errore standard è stato calcolato come:

$$SE = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad eq.32$$

Dove  $\sigma$  è la deviazione standard e  $n$  è la numerosità del campione.

### 3.5.4.3 Trattamento dei dati derivati dalla gestione del reattore

Il trattamento dei dati ha previsto il calcolo di tutti i seguenti parametri:

- SRT (Sludge Retention Time):

questo parametro rappresenta il tempo medio di ritenzione della biomassa nel reattore e si calcola come il rapporto tra la massa di solidi sospesi volatili contenuti nel reattore e la massa di solidi sospesi volatili in uscita considerando sia lo scarico che le estrazioni di campioni di mixed liquor:

$$SRT(d) = \frac{SSV_{reattore} \left( \frac{gSSV}{L} \right) * V_{min,sbr}(L)}{SSV_{out} \left( \frac{gSSV}{d} \right)} \quad eq.33$$

- NRR (Nitrogen Removal Rate):

il rateo di rimozione dell'azoto è stato calcolato con 2 diverse metodologie. Nel primo caso è stato calcolato un NRR parziale considerando solo gli ioni ammonio e nitrito, la

cui rimozione è l'obiettivo primario, mentre nel secondo caso sono stati considerati anche gli ioni nitrato. Il calcolo è stato effettuato con un bilancio di massa sull'azoto considerando come intervallo di tempo una giornata di lavoro:

$$NRR_{par} \left( \frac{gN_{rim}}{L * d} \right) = \frac{(NH_4^+_{in} + NO_2^-_{in})(gN) - (NH_4^+_{out} + NO_2^-_{out})(gN)}{\Delta t (d) * V_{max,sbr}(L)} \quad eq.34$$

$$NRR_{tot} \left( \frac{gN_{rim}}{L * d} \right) = \frac{(NH_4^+_{in} + NO_2^-_{in} + NO_3^-_{in})(gN) - (NH_4^+_{out} + NO_2^-_{out} + NO_3^-_{in})(gN)}{\Delta t (d) * V_{max,sbr}(L)} \quad eq.35$$

Nelle *equazioni 34* e *35* come ingresso sono stati considerati sia il carico di azoto alimentato con l'influente, sia la quota parte di azoto già presente nel mixed liquor accumulata nei cicli precedenti.

- Rapporto NRR/NLR:  
come per il caso precedente è stato calcolato sia in forma parziale considerando solamente ammonio e nitrito, sia in forma completa conteggiando anche il contributo del nitrato. Valori prossimi all'unità indicano che la biomassa è in grado di sostenere il carico di azoto alimentato, viceversa per valori bassi è bene diminuire il carico di azoto in ingresso al reattore.
- Ratei di rimozione di ammonio e nitrito e rateo di produzione di nitrato:  
sono stati calcolati allo stesso modo del NRR ma considerando ogni specie azotata singolarmente.

$$NH_4^+ RR_{par} \left( \frac{gNH_4^+_{rim}}{L * d} \right) = \frac{NH_4^+_{in}(gN) - NH_4^+_{out}(gN)}{\Delta t (d) * V_{max,sbr}(L)} \quad eq.36$$

$$NO_2^- RR_{par} \left( \frac{gNO_2^- rim}{L * d} \right) = \frac{NO_2^- in (gN) - NO_2^- out (gN)}{\Delta t (d) * V_{max,sbr}(L)} \quad eq.37$$

$$NO_3^- RR_{par} \left( \frac{gNO_3^- rim}{L * d} \right) = \frac{NO_3^- in (gN) - NO_3^- out (gN)}{\Delta t (d) * V_{max,sbr}(L)} \quad eq.38$$

- Rapporti molari sperimentali  $NO_2^-/NH_4^+$  e  $NO_3^-/NH_4^+$ :  
questi valori possono essere confrontati con quelli stechiometrici. Eventuali valori sperimentali discostanti da quelli stechiometrici indicano la presenza di reazioni concomitanti con quelle anammox.
- Attività Specifica Anammox (SAA):  
rappresenta la massa di azoto rimossa dalla biomassa per unità di tempo e di solidi sospesi volatili.

$$SAA \left( \frac{gN_{rim}}{gSSV * d} \right) = \frac{N_{rim} \left( \frac{gN}{d} \right)}{SSV_{sbr} \left( \frac{gSSV}{L} \right) * V_{max,sbr}(L)} = \frac{NRR \left( \frac{gN}{L * d} \right)}{SSV_{sbr} \left( \frac{gSSV}{L} \right)} \quad eq.39$$

Anche in questo caso è stata calcolata considerando soltanto azoto ammoniacale e nitroso e considerando anche l'azoto nitrico.

## 3.6 Preparazione di soluzioni e reattivi

### 3.6.1 Preparazione alimento in ingresso al reattore SBR

L'alimento in ingresso al reattore SBR, impiegato durante la sperimentazione è costituito da una miscela di refluo sintetico (detto anche soluzione madre) e refluo reale. La frazione volumetrica di refluo reale è stata progressivamente incrementata fino a raggiungere nelle

ultime settimane di sperimentazione il 50% sul totale. L'incremento è avvenuto gradualmente accertando, per ogni singola condizione di alimentazione, l'assenza di rilevanti variazioni nell'attività specifica anammox.

Il refluo sintetico è una soluzione contenete micro e macronutrienti necessari al metabolismo anammox, preparata come indicato in letteratura (Van de Graaf et al., 1996 e Lopez et al., 2008); in *tabella 3-11* se ne riporta la composizione.

**Tabella 3-11 Composizione dell'alimento sintetico**

Mineral medium			Soluzione II		
NaHCO <sub>3</sub>	1,05	g/l	EDTA	15	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0625	g/l	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,43	g/l
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,3	g/l	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,24	g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2	g/l	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,99	g/l
HCl 1N	2	ml/l	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,25	g/l
Soluzione I	1,25	ml/l	NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,22	g/l
Soluzione II	1,25	ml/l	NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,19	g/l
			NaSeO <sub>3</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	0,16	g/l
			H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,014	g/l

Soluzione I		
EDTA	5	g/l
FeSO <sub>4</sub>	5	g/l

Il refluo reale viene lasciato decantare prima di ogni impiego per consentire la separazione dell'eventuale frazione di solidi sospesi sedimentabili presenti. Stabilendo per l'ingresso: la frazione volumetrica sul totale di refluo reale, il carico di azoto totale e il rapporto *r* tra azoto nitrico e azoto ammoniacale, si determinano le rispettive proporzioni di refluo reale e di soluzione sintetica da miscelare. Nella condizione di primo avvio del reattore si adopera la sola soluzione sintetica e il carico di azoto prestabilito viene raggiunto per solo dosaggio di sali di ammonio e di nitrito quali NH<sub>4</sub>Cl e NaNO<sub>2</sub>. Con refluo reale invece è necessario preventivamente quantificare la concentrazione delle due specie azotate in questione e di conseguenza colmare il deficit di azoto aggiungendo i già citati sali azotati. Tenendo conto dell'alcalinità del refluo reale si effettua inoltre il dosaggio di bicarbonato di sodio per ottenere un valore pari a circa 1 g/l. La miscela così ottenuta viene trasferita in un contenitore collassabile da 10 l di capienza che assicura un ridotto spazio di testa e l'assenza

di aria in fase di alimentazione con pompa peristaltica. Prima di effettuare il collegamento della bag al reattore viene preliminarmente eseguita una fase di deossigenazione della durata di circa 15 minuti sotto cappa aspirante insufflando azoto gas tramite pietra porosa.

### **3.6.2 Altre soluzioni**

Durante l'attività sperimentale è emersa la necessità di avere a disposizione diverse soluzioni più o meno concentrate; in particolare oltre alla soluzione madre già descritta in precedenza sono state preparate tre soluzioni rispettivamente: N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> per dosaggio di NH<sub>4</sub>Cl, N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> per dosaggio di NaNO<sub>2</sub> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> per dosaggio di KNO<sub>3</sub>; ciascuna contenente una concentrazione pari a 10 g N/l. Le prime due sono state utilizzate di frequente per effettuare le aggiunte impulsive (spike) nelle prove manometriche [vedi par capitolo], l'altra è stata impiegata per lo più per il dosaggio di nitrato necessario al corretto mantenimento della biomassa anammox conservata in cella frigorifera.

Un'altra soluzione rivelatasi indispensabile nell'attività di progetto per differenti impieghi è la soluzione di acido cloridrico HCl preparata secondo necessità a diverse normalità, più comunemente 0,1 N per correggere il pH del reattore SBR, 1 N o 2 N per la determinazione dell'alcalinità. Essa si ottiene per diluzione in acqua ultrapura di un certo volume di soluzione concentrata di acido cloridrico al 37% di purezza.

Analogamente è stato necessario preparare una soluzione concentrata di bicarbonato di sodio 1 N utilizzata come base per il controllo in continuo del pH del reattore.



## 4. RISULTATI

In questo capitolo sono esposti tutti i risultati derivanti dall'attività sperimentale riguardanti la gestione del reattore pilota SBR PARNIT, le prove manometriche e la gestione del reattore SBR anammox a scala di laboratorio.

### 4.1 Risultati relativi alla gestione del reattore SBR PARNIT

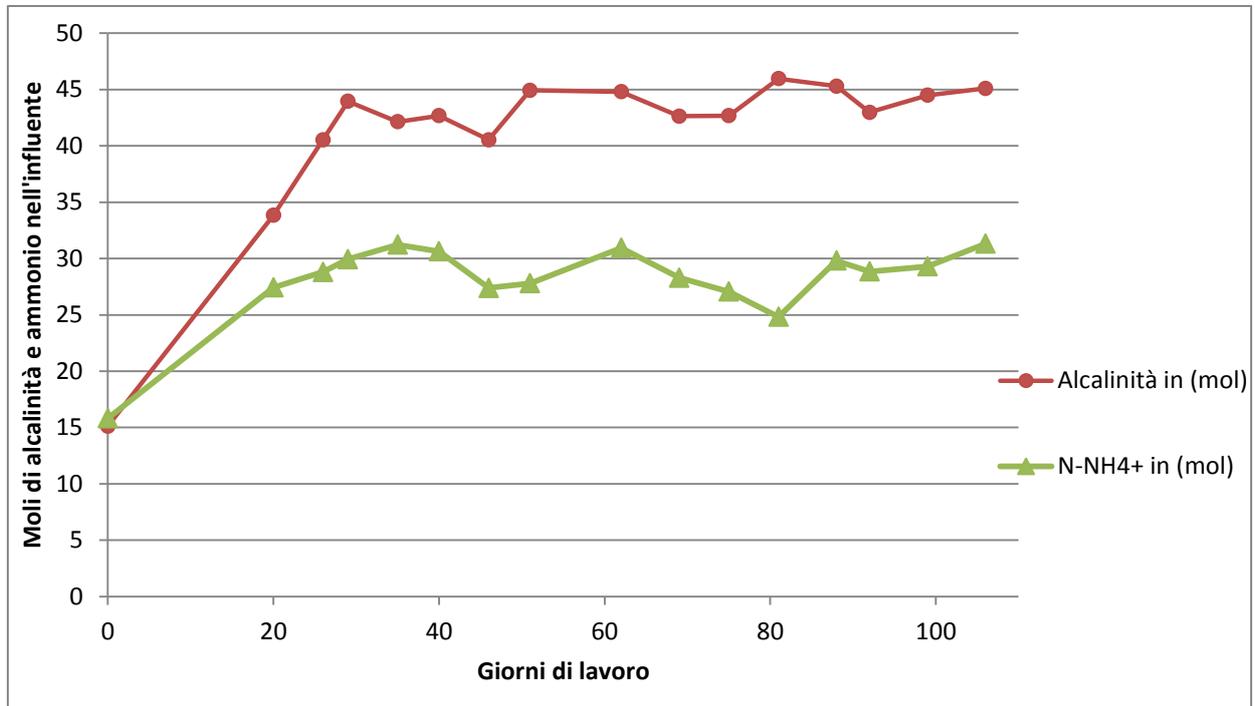
In questo paragrafo sono riportati i risultati ottenuti dalla gestione del reattore pilota SBR PARNIT. Come già esposto nel *paragrafo 2.4.7*, questa fase ha lo scopo di produrre una miscela con caratteristiche ideali per essere utilizzata come influente nella fase successiva anammox, convertendo circa il 50% dell'azoto ammoniacale in azoto nitroso.

Sono mostrati gli andamenti delle concentrazioni di alcalinità in ingresso e uscita (*paragrafo 4.1.1*), gli andamenti dei valori di SRT e delle concentrazioni dei solidi sospesi (*paragrafo 4.1.2*), le caratteristiche dell'effluente (*paragrafo 4.1.3*) e l'andamento dell'attività di nitrosazione (*paragrafo 4.1.4*).

#### 4.1.1 Andamento delle concentrazioni di alcalinità totale

Il controllo dell'alcalinità è fondamentale per il corretto funzionamento del processo PARNIT. Esaminando la stechiometria del processo si evince infatti che per ottenere la completa nitrificazione sono necessarie 2 moli di alcalinità per ciascuna mole di ioni ammonio e quindi per ottenere una nitrificazione parziale (*eq. 16*), in cui circa il 50% dell'ammonio viene convertito a nitrito, è indispensabile che il rapporto molare tra ammonio e alcalinità sia pari a 1. A causa delle elevate concentrazioni di alcalinità nell'influente è stato necessario precondizionarlo dosando acido cloridrico in modo da ridurre le moli di alcalinità e farle coincidere con quelle di ammonio. In *grafico 4-1* sono mostrate le moli di alcalinità

nell'influente prima di eseguire l'acidificazione e le moli di  $\text{N-NH}_4^+$  che coincidono con le moli di alcalinità nell'influente dopo acidificazione.



**Grafico 4-1 Moli di alcalinità presente nell'influente pre-acidificato e di ioni ammonio**

La mancata esecuzione di questa procedura causerebbe l'ottenimento di rapporti  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  nell'effluente troppo elevati, come peraltro è accaduto per i primi giorni (*grafico 4-29*); è stata infatti applicata la pratica dell'acidificazione soltanto dal giorno 20 in poi.

Sono sempre state eseguite importanti riduzioni di alcalinità, da un massimo di 21,1 moli  $\text{CaHCO}_3$ ,rimossi a un minimo di 10,9 moli  $\text{CaHCO}_3$ ,rimossi.

Nel *grafico 4-2* sono invece riportate le concentrazioni di alcalinità nell'influente, dopo acidificazione, e nell'effluente.

Si nota che l'alcalinità in uscita, eccetto per i primi 20 giorni in cui non è stato dosato acido, è sempre molto bassa e mediamente vale  $220,6 \pm 34,1$  mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ . Valori di concentrazione così bassi nell'effluente indicano un corretto utilizzo della pratica di acidificazione.

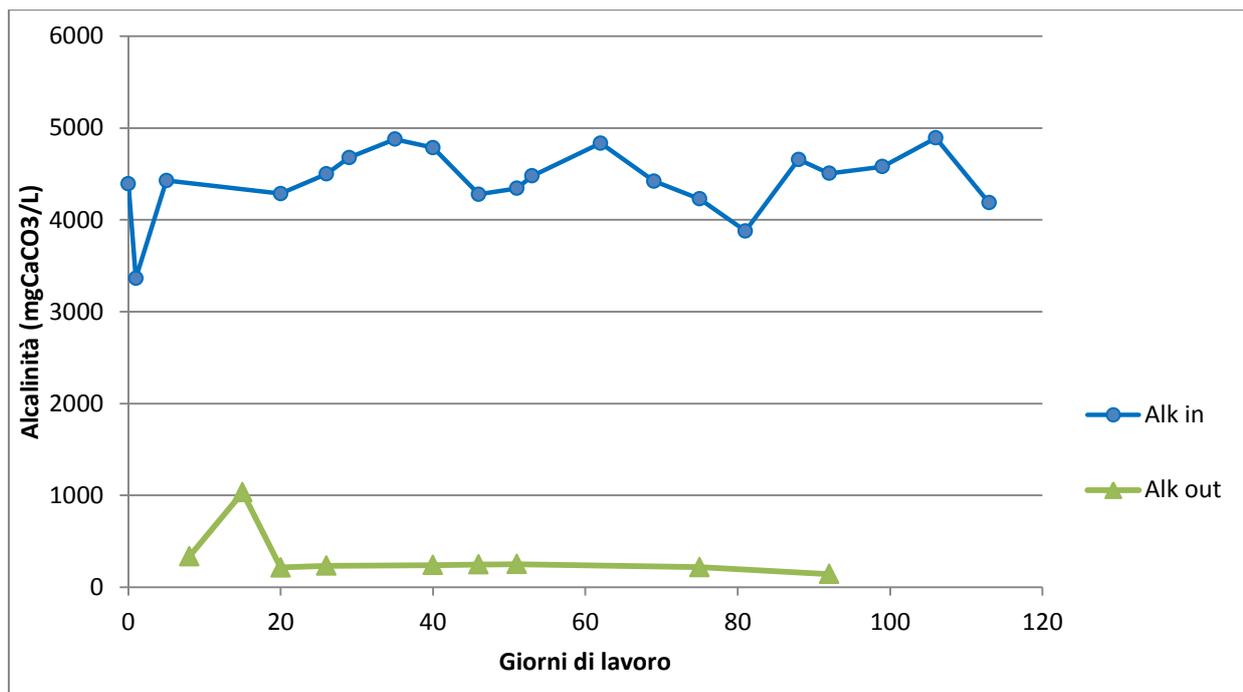


Grafico 4-2 Andamento dell'alcalinità nell'influenza e nell'effluente

#### 4.1.2 SRT e solidi sospesi totali e volatili

Nel *grafico 4-3* sono riportati i valori di SRT e l'andamento delle concentrazioni dei solidi sospesi totali e volatili nel mixed liquor del reattore.

Si è cercato di eseguire delle estrazioni di fango dal reattore in modo da mantenere un SRT di 20 giorni ma questa operazione si è rivelata difficoltosa e sono stati ottenuti valori di SRT mediamente di  $31,7 \pm 18,2$  giorni.

È possibile osservare che, nella prima metà della sperimentazione, il tempo di ritenzione dei fanghi assume un trend decrescente raggiungendo il minimo valore di 18,9 d il giorno 53 e questo ha causato anche il calo della concentrazione di SSV. Dal giorno 69 in poi non sono più state eseguite estrazioni e questo ha indotto la risalita dei valori di SRT che ha raggiunto il massimo di 82 d il giorno 109. È interessante notare che l'aumento di SRT negli ultimi giorni di sperimentazione non ha coinciso con un aumento della concentrazione di solidi sospesi nel mixed liquor. Una spiegazione a questo fenomeno è data dalla formazione di pannelli di biomassa che rivestendo le pareti del reattore causano la sottostima delle concentrazioni di SST e SSV nel fango attivo.

Le concentrazioni di solidi sospesi nel fango attivo sono direttamente confrontabili con l'andamento dei valori di SRT.

Dopo i primi 20 giorni in cui la concentrazione di solidi sospesi nel mixed liquor è andata aumentando dal valore di 2,9 gSSV/L al giorno 0 al valore di 6 gSSV/L, si osserva un calo progressivo delle concentrazioni di solidi sospesi nel tempo fino al raggiungimento del valore minimo di 2,7 gSSV/L il giorno 88, per poi risalire a 3,6 gSSV/L il giorno 109.

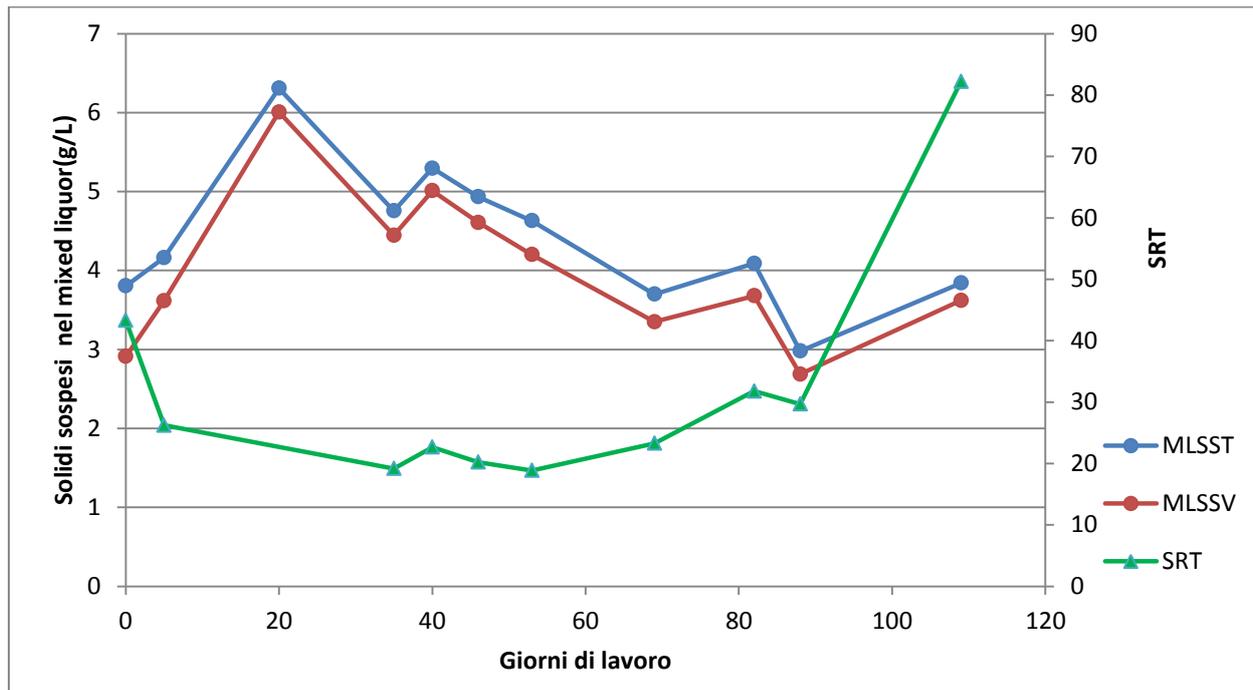


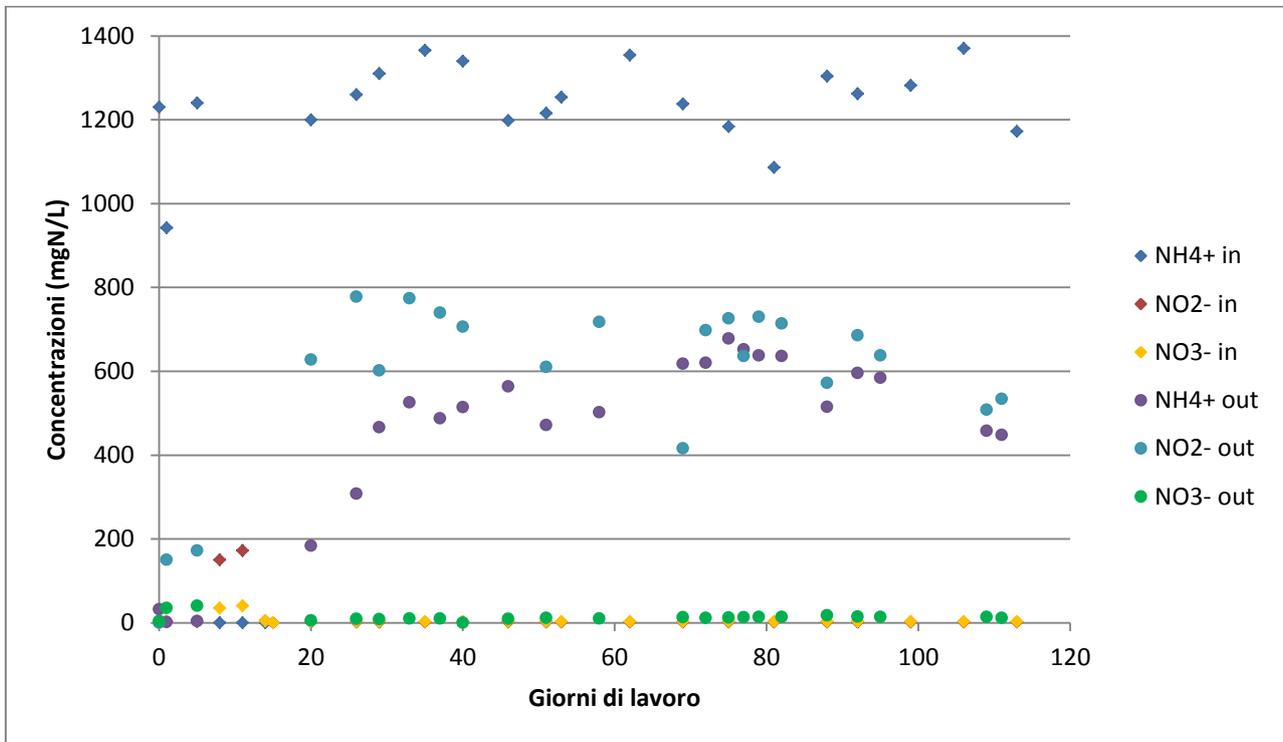
Grafico 4-3 Andamento dei valori di SRT e delle concentrazioni dei solidi sospesi nel mixed liquor

### 4.1.3 Caratteristiche dell'effluente

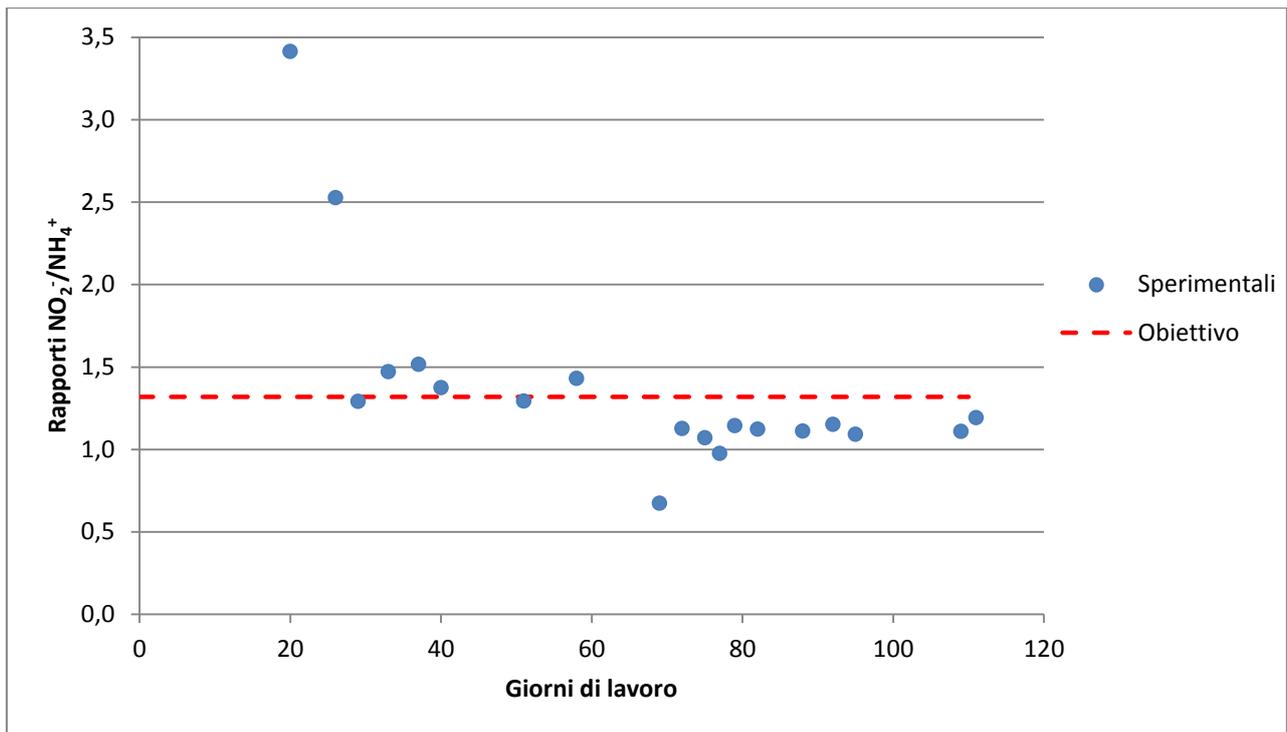
#### 4.1.3.1 Andamento delle concentrazioni delle forme azotate

Il monitoraggio e il continuo controllo del processo PARNIT sono cruciali al fine di ottenere un effluente con le caratteristiche adeguate per il successivo processo anammox. Come già discusso in precedenza, è importante che le concentrazioni di ioni nitrito e ammonio siano tra loro in un rapporto il più vicino possibile al valore di 1,32, e questo è possibile operando una corretta gestione del processo.

Nel *grafico 4-4* è mostrato l'andamento delle concentrazioni dell'azoto ammoniacale, nitroso e nitrico in ingresso e uscita dal reattore mentre in *grafico 4-5* sono mostrati i rapporti molari  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  ottenuti sperimentalmente e paragonati con quelli desiderati.



**Grafico 4-4** Andamento delle concentrazioni di ammonio, nitrito e nitrate in ingresso e uscita dal reattore durante il periodo di sperimentazione



**Grafico 4-5 Rapporti molari NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ottenuti sperimentalmente**

È possibile notare dal *grafico 4-4* che i valori delle concentrazioni delle forme azotate nel periodo iniziale non sono ottimali per il processo PARNIT, ma questo è dovuto allo start-up del reattore; dal giorno 29 in poi il processo ha funzionato in maniera soddisfacente.

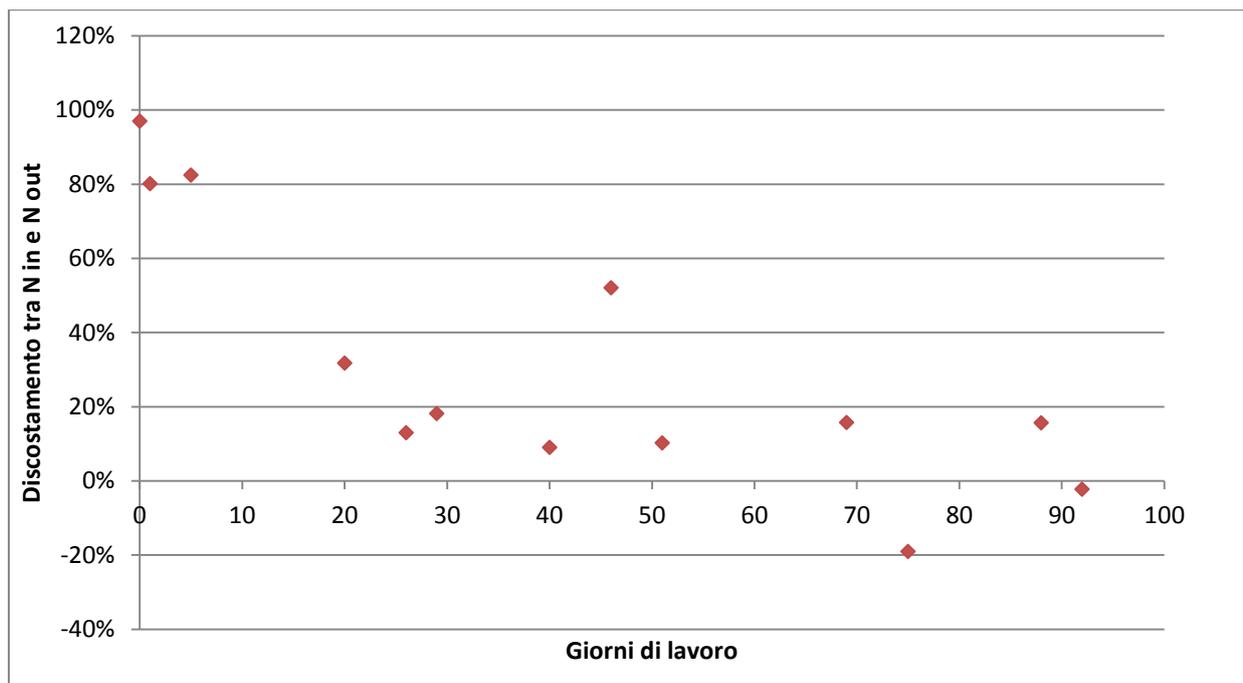
Le concentrazioni di ioni ammonio nell'influente sono mantenute abbastanza costanti e comprese tra valori di 1200 e 1400 mgN/L e che le concentrazioni di ioni nitrito e nitrato di poco superiori allo zero, salvo per i giorni 8 e 11 in cui raggiungono valori rilevanti. All'uscita invece, le concentrazioni di ammonio e nitrito sono più simili tra loro con i valori dei rapporti molari NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> che, eccetto per i giorni 20, 26 e 69, sono abbastanza vicini a quello desiderato di 1,32. In particolare si nota che dal giorno 72 in poi i rapporti sono leggermente più bassi di quello obiettivo e sono compresi tra 0,98 e 1,15 e questi valori sono compatibili con quelli adottati per l'influente del reattore anammox a scala di laboratorio (*paragrafo 3.5.3*). Per quanto riguarda i nitrati in uscita, eccetto i primi 5 giorni di lavoro, assumono sempre valori molto contenuti con un massimo di 17,8 mgN/L raggiunto il giorno 88; proprio la ridotta presenza di ioni nitrato nell'effluente è sintomo del verificarsi della voluta inibizione dei batteri NOB.

L'esecuzione dei bilanci di massa sull'azoto in ingresso e in uscita dal reattore ha permesso di verificare l'eventuale rimozione di azoto dal refluo per denitrificazione e i risultati sono mostrati nel *grafico 4-6*.

Lo scarto percentuale è stato ricavato confrontando la quantità di azoto in ingresso al sistema e la quantità di azoto uscente. Come azoto in ingresso sono stati considerati i contributi degli ioni ammonio, nitrito e nitrato mentre, per quanto riguarda l'azoto in uscita, sono stati considerati sia i carichi delle forme azotate disciolte nell'effluente sia il carico di azoto rimosso dal sistema con il fango di supero, che è stato stimato essere circa il 12% della frazione di solidi volatili.

Il processo di nitrosazione parziale prevede la conversione dell'azoto e non la sua rimozione quindi teoricamente l'azoto in ingresso dovrebbe essere uguale a quello in uscita, ma è attesa una leggera rimozione presumibilmente dovuta a un leggero strippaggio dell'ammoniaca favorito dall'aerazione, oppure a una denitrificazione eterotrofa degli ioni nitrito che può causare la riduzione completa ad  $N_2$  o la riduzione incompleta a  $N_2O$  e il conseguente trasferimento dell'azoto alla fase gassosa.

I risultati del *grafico 4-6* confermano che nel complesso è stata riscontrata una leggera rimozione dell'azoto dal refluo, mediamente del  $14 \pm 0,18\%$  escludendo i primi giorni di funzionamento in cui sono state riscontrate rimozioni superiori all'80% causate da un'intensa attività di denitrificazione, inevitabile durante il periodo di start-up. Per i giorni 75 e 92 invece è stata registrata una lieve produzione fittizia di azoto, probabilmente dovuta ad accumuli verificatisi nei giorni precedenti.



**Grafico 4-6 Frazione dell'azoto rimosso dal reattore ottenuta tramite bilanci di massa**

#### **4.1.3.2 Andamento delle concentrazioni di COD solubile**

La rimozione del COD dal refluo nelle fasi precedenti a quella anammox è cruciale al fine di garantirne un corretto funzionamento

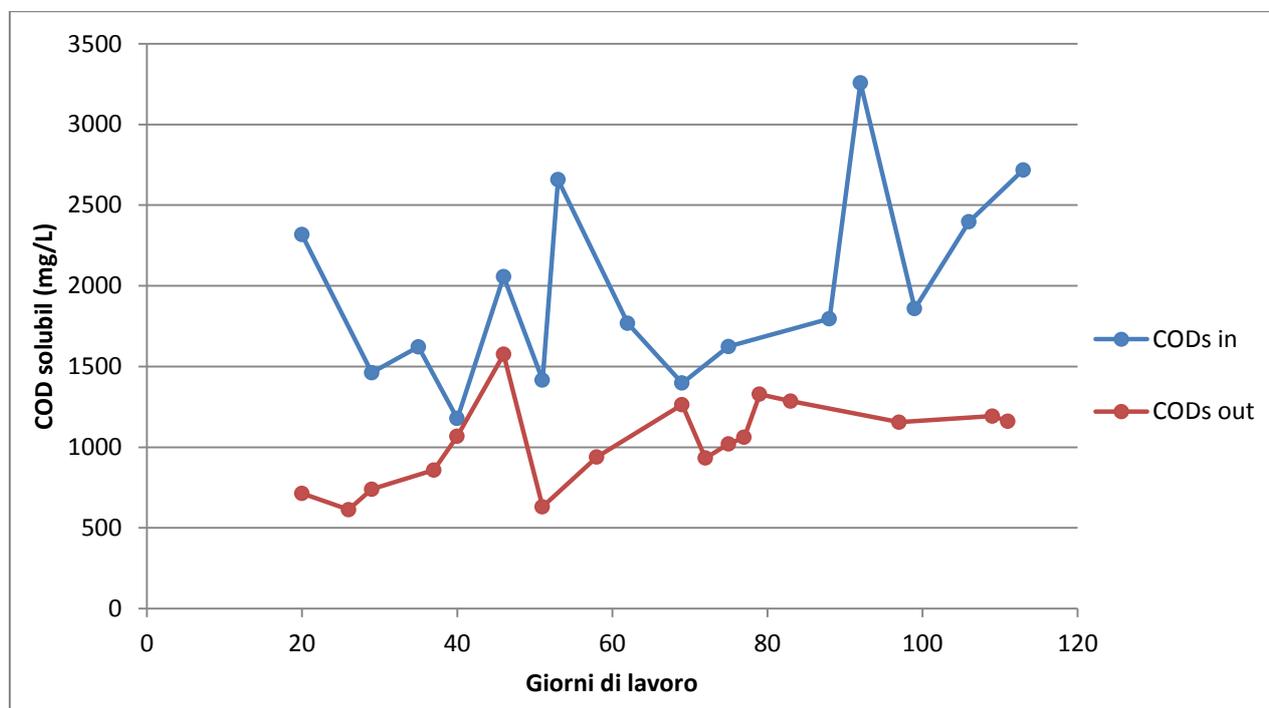
L'andamento delle concentrazioni di COD solubile in ingresso e uscita dal reattore PARNIT è mostrato nel *grafico 4-7*.

Come si può notare le concentrazioni di COD<sub>s</sub> nell'effluente sono sempre inferiori a quelle dell'influente ma la variabilità dei valori è elevata; le concentrazioni minima e massima per l'influente sono rispettivamente pari a 1067 mgCOD<sub>s</sub>/L (giorno 40) e 3258 mgCOD<sub>s</sub>/L (giorno 92), mentre per l'effluente sono 613 mgCOD<sub>s</sub>/L (giorno 26) e 1576 mgCOD<sub>s</sub>/L (giorno 46).

Anche l'entità della rimozione di COD solubile è molto variabile e va dal minimo di 74,8 gCOD<sub>s</sub> rimossi il giorno 40 al massimo di 1848 gCOD<sub>s</sub> rimossi il giorno 113. Mediamente il consumo di gCOD<sub>s</sub> è stato di 951,6±578,1 gCOD<sub>s</sub>.

La grande variabilità riscontrata è strettamente legata alle caratteristiche del refluo influente, intese come contenuto di sostanza organica che può essere più o meno digerita. Dai valori ottenuti è possibile dedurre che la possibile causa della modesta rimozione del

COD<sub>s</sub> nel periodo compreso tra i giorni 40 e 46 e il giorno 69 sono causati da un drastico calo di attività da parte dei batteri eterotrofi denitrificanti.

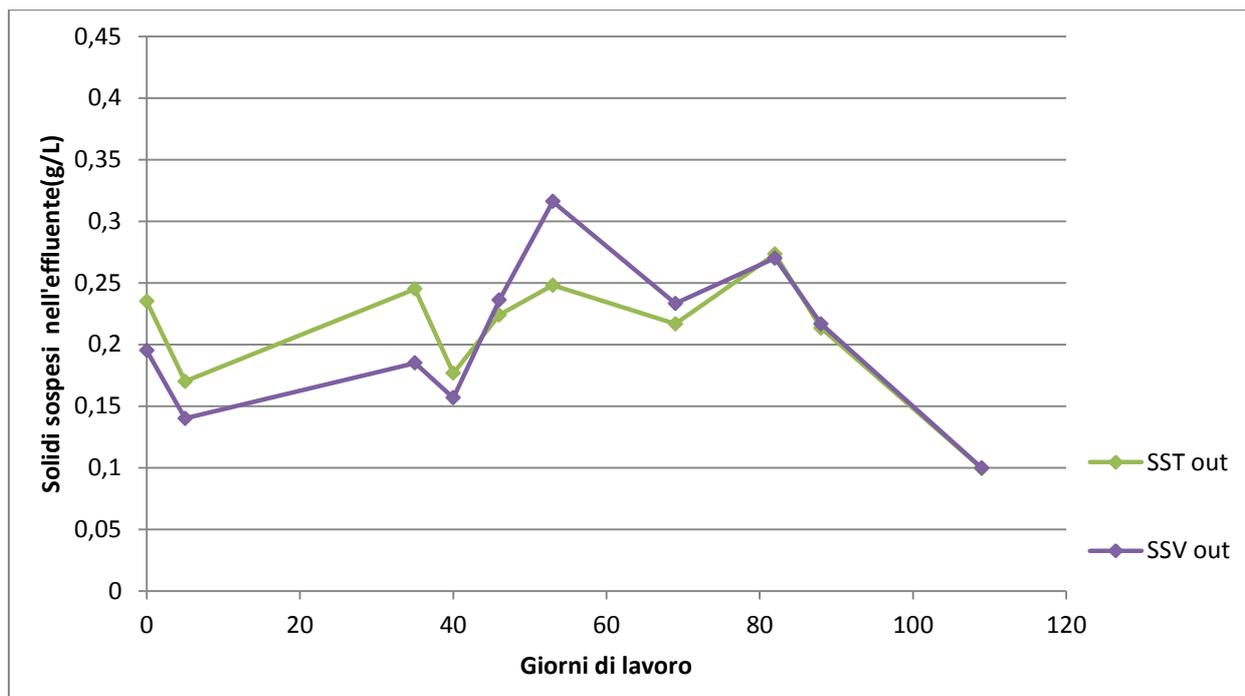


**Grafico 4-7 Concentrazioni di COD solubile in ingresso e uscita dal reattore PARNIT**

#### **4.1.3.3 Andamento delle concentrazioni dei solidi sospesi nell'effluente**

Sono riportate nel *grafico 4-8* le concentrazioni dei solidi sospesi totali e volatili nell'effluente del reattore PARNIT.

Si nota che per i giorni 46, 53 e 69 sono stati ottenuti valori di concentrazioni dei solidi sospesi volatili superiori a quelli totali. Questo è dovuto a errori nella stima delle concentrazioni che hanno presumibilmente portato a una sottostima dei solidi sospesi totali. Non considerando affidabili i valori ricavati per i giorni 46, 53 e 69, le concentrazioni dei solidi sospesi volatili si mantengono abbastanza stabili e su valori compresi tra 0,1 gSSV/L e 0,21 gSSV/L. Tali valori, se paragonati a quelli rilevati nell'effluente del reattore SBR anammox (*grafico 4-34*), indicano fuoriuscite di biomassa rilevanti; considerando però la scala del reattore e la natura fioccosa dei fanghi, i valori sono più che accettabili.



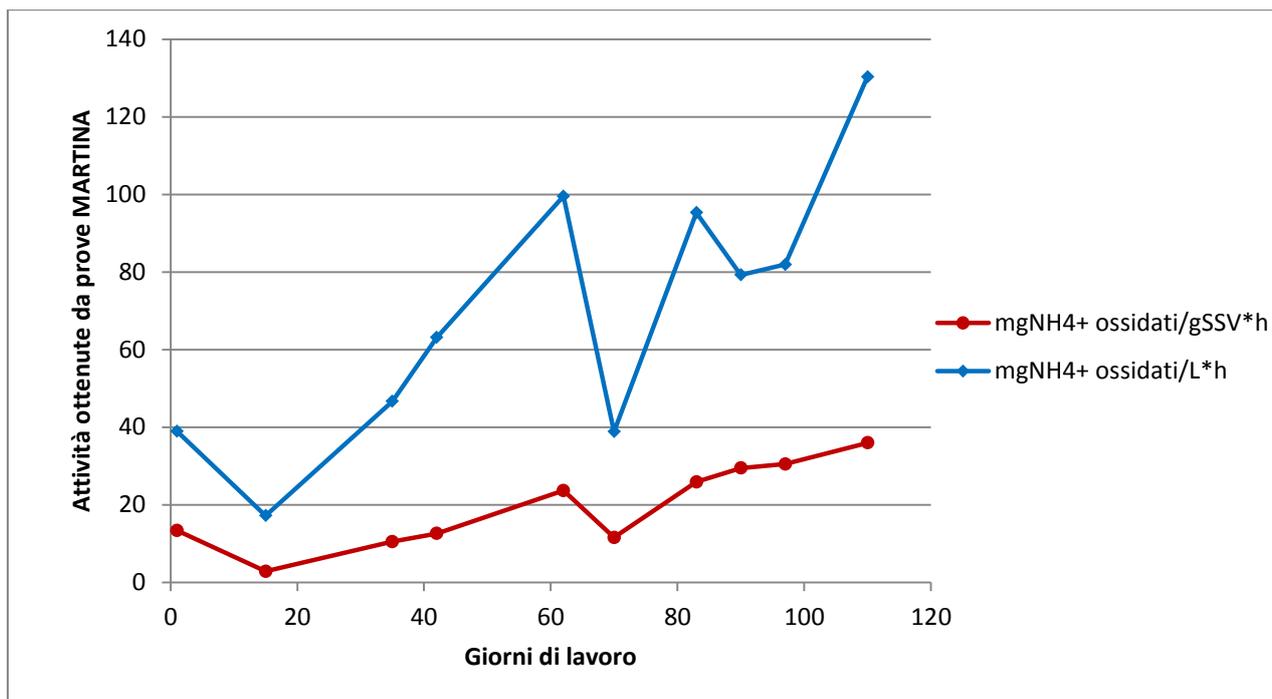
**Grafico 4-8 Andamento delle concentrazioni di SST ed SSV nell'effluente**

#### 4.1.4 Prove di attività

La conduzione delle prove di attività sulla biomassa presente nel reattore PARNIT hanno permesso di ottenere il massimo rateo di ossidazione dell'ammonio e la percentuale di carico massimo sostenibile con il quale è stato alimentato il reattore.

Nel *grafico 4-9* sono mostrati gli andamenti dell'attività specifica e dell'attività per unità di volume della biomassa.

Inizialmente si nota un andamento decrescente dovuto all'acclimatazione della biomassa che raggiunge il valore minimo di  $2,9 \text{ mgNH}_4^+_{\text{ox}}/\text{L}\cdot\text{h}$  e  $17,2 \text{ mgNH}_4^+_{\text{ox}}/\text{gSSV}\cdot\text{h}$  il giorno 15. Da qui in poi, come avvenuto per il reattore SBR anammox, l'attività presenta un andamento complessivamente crescente raggiungendo, il giorno 110, il picco massimo di  $130 \text{ mgNH}_4^+_{\text{ox}}/\text{L}\cdot\text{h}$  e  $36 \text{ mgNH}_4^+_{\text{ox}}/\text{gSSV}\cdot\text{h}$ . Si registra soltanto un episodio particolare al giorno 70 in cui i valori di attività sono diminuiti in maniera significativa e per questo episodio non è stata individuata una possibile causa.



**Grafico 4-9 Andamenti dell'attività specifica e dell'attività per unità di volume**

Nella *tabella 4-1* sono riportati invece i valori numerici della massima attività specifica, del rateo di ammonio alimentato e la percentuale di carico applicato rispetto al massimo.

Si nota che le percentuali di carico applicato rispetto al massimo sono molto variabili e vanno dal minimo del 34,3% del giorno 97 al massimo di 98,4% del giorno 70. Va segnalato che il valore del carico applicato rispetto al massimo ottenuto per giorno 15 e pari a 161,6% è scaturito da un guasto subito dalla centrifuga posta a monte della fase di nitrificazione parziale e la peggior qualità del refluo ha influito negativamente sull'attività.

È importante far notare che, nonostante il reattore venga caricato con una quantità di ammonio che la biomassa è teoricamente in grado di ossidare per la sua totalità, questo non avviene grazie al controllo sui parametri operativi quali l'alcalinità e l'aerazione.

**Tabella 4-1 Parametri ricavati dalla conduzione delle prove MARTINA**

<b>Giorno</b>	<b>Carico applicato (mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>/gSSV*h)</b>	<b>Carico trattabile (mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>/gSSV*h)</b>	<b>Carico (%)</b>
1	5,3	13,4	39,2%
15	4,6	2,9	161,6%
35	8,6	10,5	81,9%
42	7,9	12,6	63,1%
62	11,3	23,7	47,8%
70	11,4	11,6	98,4%
83	10,0	25,9	38,7%
90	14,1	29,5	47,8%
97	10,5	30,5	34,3%
110	-	36,0	-

## **4.2 Risultati delle prove manometriche**

Come accennato nel *capitolo 3* la prove manometriche sono state divise in 3 tipologie principali:

- determinazione dell'attività della biomassa anammox a disposizione, *par. 4.2.1*;
- determinazione dell'attività della nuova biomassa anammox, *par. 4.2.2*;
- prove per valutare il recupero di attività in seguito a inibizione da nitrito, *par. 4.2.3*.

È infine riportata in *paragrafo 4.2.4* l'analisi statistica degli errori ricavati dai bilanci di massa eseguiti sulle prove.

Il refluo reale impiegato nello svolgimento delle prove manometriche è costituito dall'uscita del reattore pilota di denitrificazione (DENO2) campionata in data 3 aprile 2012. In *tabella 4.2* sono mostrate le caratteristiche di tale refluo.

**Tabella 4-2 Caratteristiche qualitative del refluo reale impiegato per le prove manometriche**

<b>Caratteristica</b>	<b>Valore</b>	<b>Unità</b>
<b>Concentrazione di N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	121	mgN/L
<b>Concentrazione di N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	35	mgN/L
<b>Concentrazione di N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	12	mgN/L
<b>Concentrazione di COD<sub>s</sub></b>	751	mgCOD/L

### **4.2.1 Determinazione dell'attività della biomassa pregressa**

Nei prossimi *paragrafi* 4.2.1.1, 4.2.1.2, 4.2.1.3, 4.2.1.4 sono riportati i risultati delle prove manometriche eseguite allo scopo di valutare l'attività della biomassa utilizzata nelle sperimentazioni precedenti e stoccata in cella frigorifera per 3 mesi. Gli esiti di queste prove sono stati fondamentali per poter impostare la modalità con cui inoculare la stessa nel reattore SBR.

I confronti tra le attività specifiche della biomassa nelle presenti prove manometriche e le attività della stessa durante le precedenti sperimentazioni è riportata nel *paragrafo* 4.2.1.5.

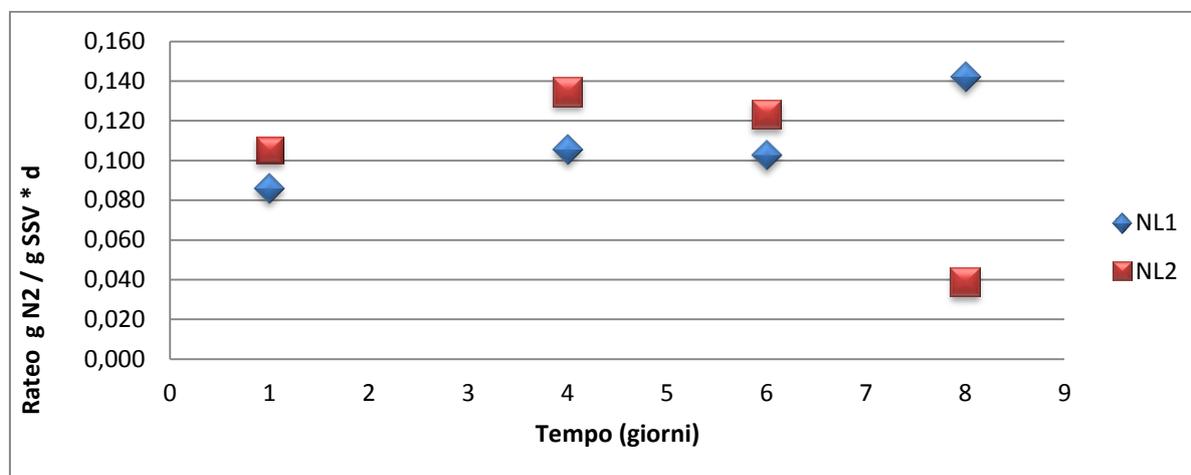
#### **4.2.1.1 Prova numero 1**

La prima prova è stata della durata di 8 giorni e ha previsto la somministrazione di 4 spike. Sono state utilizzate 2 bottiglie (siglate come *NL1* ed *NL2*) con una percentuale di refluo reale nella miscela pari allo 0%; è stata quindi eseguita una prova in doppio senza sostituzione di refluo. Gli esiti di questa prova sono visibili in *tabella* 4-3.

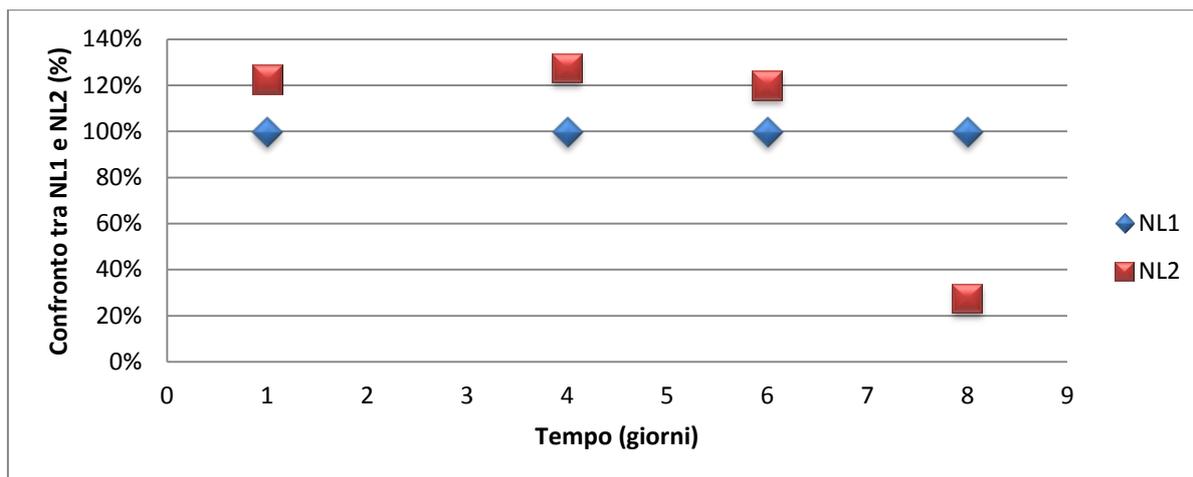
**Tabella 4-3 Esiti della prova manometrica numero 1**

Giorni	Bottiglia	$\Delta$ NH4 (mg/l)	$\Delta$ NO2 (mg/l)	$\Delta$ NO2/ $\Delta$ NH4	SAA (gN2/gSSV*d)	% SAA su NL1
1	NL1	11,0	16,1	1,47	0,086	100%
	NL2	13,1	18,8	1,43	0,105	123%
4	NL1	28,1	30,5	1,08	0,106	100%
	NL2	25,7	30,1	1,17	0,135	127%
6	NL1	28,2	31,1	1,10	0,103	100%
	NL2	27,8	31,1	1,12	0,123	120%
8	NL1	29,0	30,7	1,06	0,142	100%
	NL2	17,9	25,7	1,44	0,039	27%

Nelle colonne di *tabella 4-3* sono riportati i giorni di lavoro della biomassa, i consumi di ammonio e nitrito in termini di mgN/l, il loro rapporto tra il consumo di nitrito e ammonio, l'attività specifica anammox e il confronto percentuale tra le bottiglie utilizzando la *NL1* come riferimento. Nei *grafici 4-10* e *4-11* sono riportate rispettivamente le attività specifiche anammox ottenute nelle bottiglie *NL1* e *NL2* e il confronto in termini di percentuale tra le SAA fissando come riferimento quelle ricavate per la bottiglia *NL1*.



**Grafico 4-10 Attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 1**



**Grafico 4-11 Confronto percentuale tra le attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 1**

Il crollo dell'attività dopo l'ultimo spike nella bottiglia *NL2* è stato causato dall'aumento del valore di pH che, raggiungendo un valore di circa 8,5 punti, ha inibito l'attività stessa.

I rapporti di consumo tra gli ioni nitrito e gli ioni ammonio risultano superiori al valore stechiometrico dopo il primo spike. Questo fenomeno si presenta di frequente ed è dovuto alla presenza di una rilevante quantità di batteri eterotrofi denitrificanti. Negli spike successivi i rapporti risultano essere sottostechiometrici indicando quindi una netta diminuzione dell'attività denitrificante, salvo per l'ultimo valore della bottiglia *NL2* in cui l'attività anammox è fortemente rallentata.

Le motivazioni dell'ottenimento di rapporti  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  inferiori allo stechiometrico non sono ancora del tutto chiare, tuttavia secondo l'ipotesi più accreditata ciò è dovuto alla contestuale presenza di biomassa AOB e anammox.

#### **4.2.1.2 Prova numero 2**

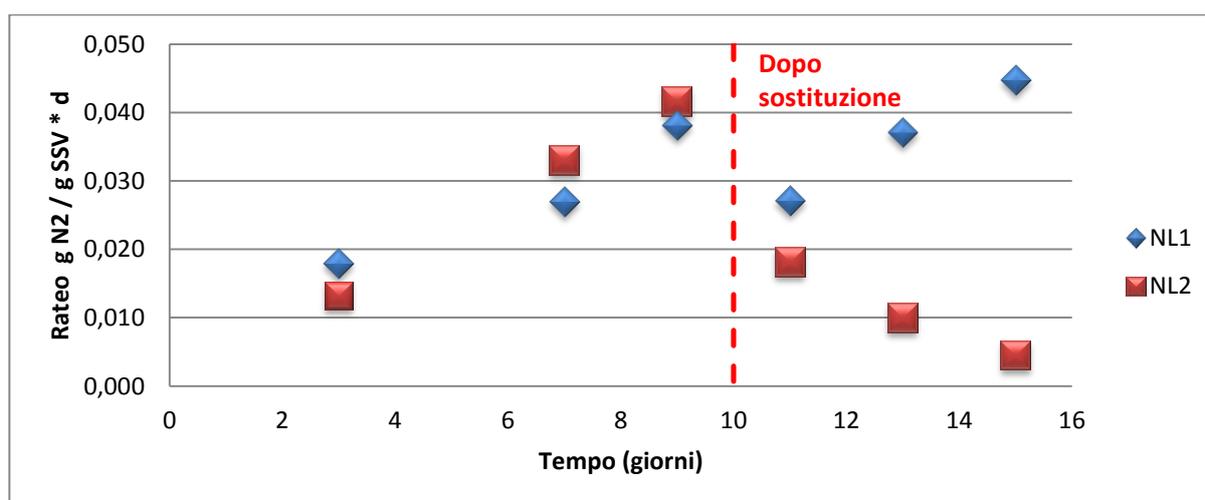
La seconda prova è stata condotta dal 19 marzo al 4 aprile 2012 e ha previsto l'esecuzione di 6 spike. In generale, la bottiglia *NL1* è sempre impiegata in queste prove come bianco mentre la bottiglia *NL2* subisce modifiche della percentuale di refluo reale in essa contenuto. In questa prova nella bottiglia *NL2*, dopo 9 giorni di lavoro, è stato sostituito il 50% del volume di refluo sintetico con altrettanto refluo reale. Per rendere le prove confrontabili tra loro è necessario che anche nel bianco avvenga una sostituzione, in questo caso però il

refluo sintetico estratto è sostituito con altro refluo sintetico. I risultati sono riportati in *tabella 4-4* e nei *grafici 4-12* e *4-13*.

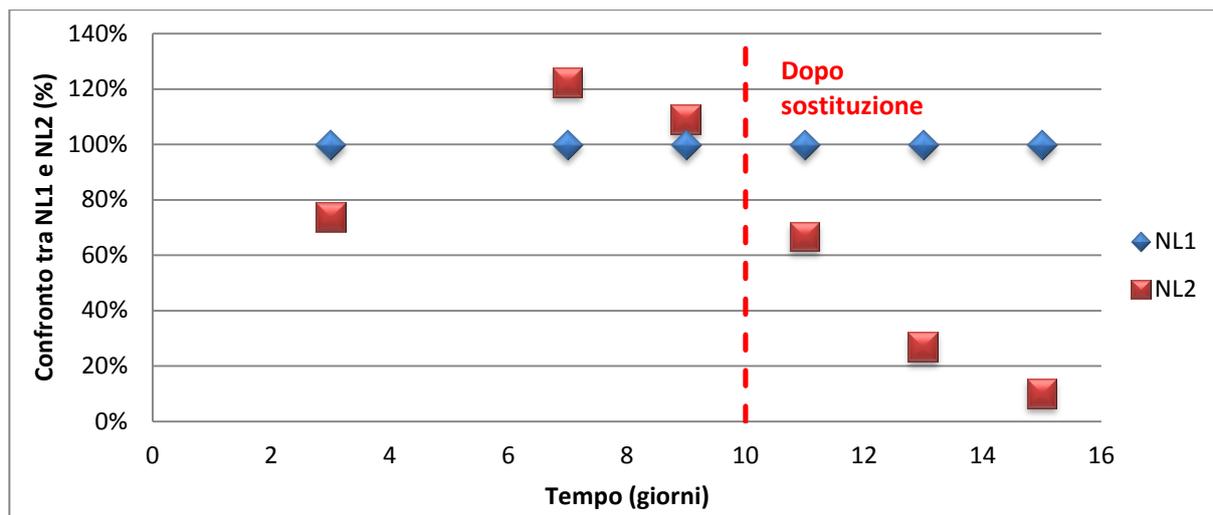
**Tabella 4-4** Esiti della prova manometrica numero 2

Giorni	Bottiglia	$\Delta$ NH4 (mg/l)	$\Delta$ NO2 (mg/l)	$\Delta$ NO2/ $\Delta$ NH4	SAA (gN2/gSSV*d)	% SAA su NL1
3	NL1	24,3	30,3	1,25	0,018	100%
	NL2	24,0	30,3	1,26	0,013	123%
9	NL1	38,9	55,6	1,43	0,027	100%
	NL2	38,3	45,6	1,19	0,033	127%
<b>Sostituzione con 50% di refluo reale in NL2</b>						
11	NL1	19,5	30,8	1,58	0,027	100%
	NL2	21,5	32,3	1,51	0,018	67%
13	NL1	30,0	31,3	1,04	0,037	100%
	NL2	26,0	23,5	0,90	0,010	27%
15	NL1	42,6	32,2	0,76	0,045	100%
	NL2	6,0	17,9	2,99	0,005	10%

Si segnala il fatto che tra il giorno 3 e il giorno 9 di lavoro sono stati somministrati 2 spike ma sono stati raggruppati in uno soltanto in quanto sono stati eseguiti in serie senza eseguire le analisi delle forme azotate prima della somministrazione del secondo; è stato tuttavia possibile calcolare i ratei per entrambi gli spike.



**Grafico 4-12** Attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 2



**Grafico 4-13 Confronto percentuale tra le attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 2**

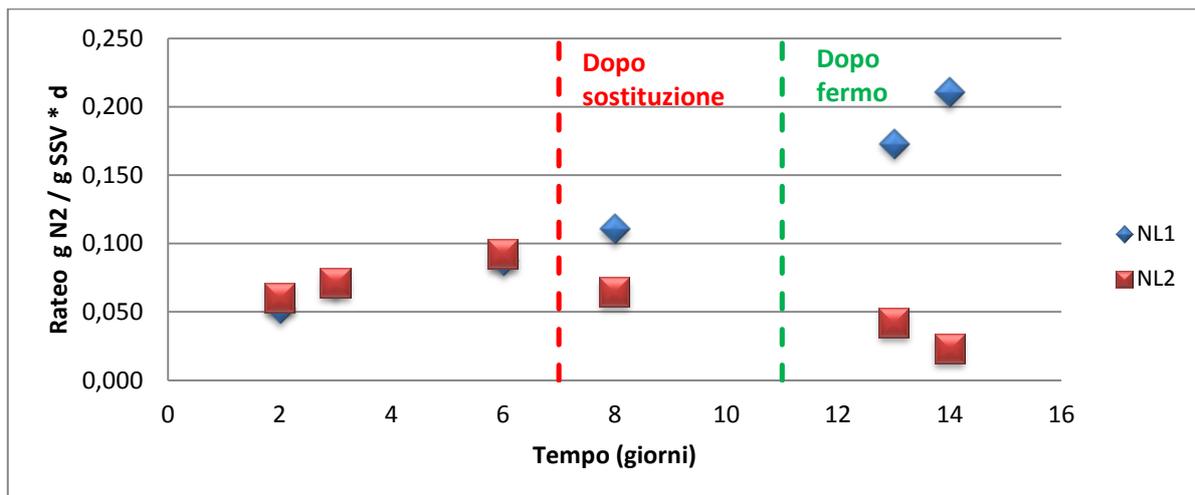
Per i primi 3 spike si è registrato un trend crescente dell'attività che passa da circa 0,015  $\text{gN}_2/\text{gSSV}\cdot\text{d}$  a circa 0,04  $\text{gN}_2/\text{gSSV}\cdot\text{d}$  con i valori delle SAA simili tra loro, ma dopo la sostituzione i comportamenti sono opposti; Il bianco dopo la sostituzione subisce un calo di attività, ma continua comunque con il trend positivo fino a raggiungere 0,045  $\text{gN}_2/\text{gSSV}\cdot\text{d}$  al giorno 15, mentre per la bottiglia NL2 l'attività scende costantemente fino ad assumere un valore pari al 10,1% di quella del bianco dopo soli 6 giorni.

#### 4.2.1.3 Prova numero 3

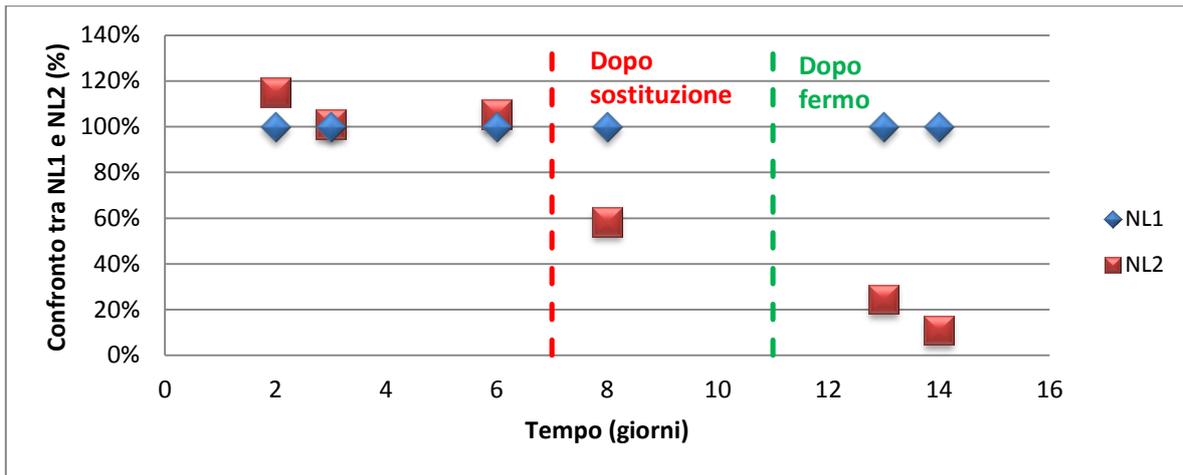
Questa prova è stata condotta dal 10 al 24 aprile e ha previsto la somministrazione di 6 spike. Lo scopo è quello di verificare gli effetti subiti dalla biomassa a seguito di una interruzione del riscaldamento e della somministrazione dei nutrienti; volendo confrontare i risultati ottenuti con quelli della prova numero 2 le condizioni di prova sono le medesime di quella precedente con la sostituzione del 50% di refluo nella bottiglia NL2 dopo 3 spike. Dopo lo spike numero 4 le bottiglie sono state lasciate a temperatura ambiente (oscillante tra i 20 e i 25 °C) per 3 giorni senza nessun dosaggio di nutrienti per poi riprendere con la normale conduzione della prova somministrando altri 2 spike. I risultati sono esposti nella *tabella 4-5* e nei *grafici 4-14* e *4-15*.

**Tabella 4-5 Esiti della prova manometrica numero 3**

Giorni	Bottiglia	$\Delta$ NH4 (mg/l)	$\Delta$ NO2 (mg/l)	$\Delta$ NO2/ $\Delta$ NH4	SAA (gN2/gSSV*d)	% SAA su NL1
2	NL1	24,9	30,6	1,23	0,053	100%
	NL2	20,1	31,0	1,55	0,060	115%
3	NL1	10,6	14,8	1,40	0,071	100%
	NL2	11,9	14,8	1,24	0,072	101%
6	NL1	26,5	32,7	1,23	0,087	100%
	NL2	28,3	32,2	1,14	0,092	105%
<b>Sostituzione con 50% di refluo reale in NL2</b>						
8	NL1	30,0	29,6	0,99	0,111	100%
	NL2	21,9	29,6	1,35	0,064	58%
<b>Bottiglie lasciate 3 giorni a T ambiente</b>						
13	NL1	25,0	29,6	1,18	0,173	100%
	NL2	22,1	29,5	1,34	0,042	24%
14	NL1	7,9	9,3	1,18	0,211	100%
	NL2	8,0	9,8	1,22	0,023	11%



**Grafico 4-14 Attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 3**



**Grafico 4-15 Confronto percentuale tra le attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 2**

Si può notare chiaramente dal *grafico 4-14* come l'attività del bianco presenta un trend crescente, anche dopo il periodo di fermo e che i valori di SAA sono circa il doppio di quelli ottenuti nella *prova 2* e crescono dagli 0,053 gN<sub>2</sub>/gSSV\*d del giorno 2 agli 0,211 gN<sub>2</sub>/gSSV\*d del giorno 14. La bottiglia *NL2* presenta invece un andamento crescente con valori di SAA sostanzialmente identici a quello del bianco per i primi 3 spike, salvo poi subire un crollo e perdere circa il 90% di attività rispetto al bianco in 6 giorni. In particolare, i valori di perdita di attività rispetto al bianco per gli spike dopo la sostituzione sono molto simili a quelli ottenuti nella *prova 2* e questo risultato sembra suggerire un'assenza di effetti del periodo di fermo sulla biomassa operante con il refluo reale; trovandosi di fronte a perdite di attività così significative è tuttavia difficile trarre conclusioni precise sulle entità dei diversi contributi della presenza di refluo reale e della condizione di fermo imposta.

#### 4.2.1.4 Prova numero 4

È stata condotta dal 3 al 16 maggio 2012 con la somministrazione di 6 spike. Visti i deludenti valori di attività ottenuti con il 50% di sostituzione del refluo, in questa prova sono state allestite 3 bottiglie in modo da avere un bianco (*NL1*), una bottiglia con sostituzione del 50% del refluo sintetico con reale (*NL2*) e una con sostituzione del 25% (*NL3*).

Per impossibilità tecniche, diversamente rispetto alle altre prove, la miscela di refluo e biomassa nelle bottiglie non è stata flussata con la miscela di gas N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> ma con solo azoto.

**Tabella 4-6 Esiti della prova manometrica numero 4**

Giorni	Bottiglia	$\Delta \text{NH}_4$ (mg/l)	$\Delta \text{NO}_2$ (mg/l)	$\Delta \text{NO}_2/\Delta \text{NH}_4$	SAA (gN <sub>2</sub> /gSSV*d)	% SAA su NL1
1	NL1	4,9	10,7	2,19	0,035	100%
	NL2	5,4	10,9	2,02	0,050	144%
	NL3	4,2	10,2	2,45	0,034	99%
4	NL1	27,6	32,5	1,18	0,046	100%
	NL2	24,2	32,1	1,33	0,054	116%
	NL3	22,9	33,6	1,47	0,038	82%
Sostituzione con 50% di refluo reale in NL2						
Sostituzione con 25% di refluo reale in NL3						
7	NL1	32,8	30,8	0,94	0,015	100%
	NL2	7,9	-1,6	-	0,010	69%
	NL3	-13,5	-14,5	1,08	-	-
8	NL1	32,8	30,8	0,94	0,008	100%
	NL2	-27,0	24,2	-0,89	-	-
	NL3	-5,0	37,8	-7,56	-	-
11	NL1	2,1	22,7	10,83	0,006	100%
	NL2	-9,5	8,1	-0,85	-	-
	NL3	-13,5	9,3	-0,69	-	-
13	NL1	6,4	10,6	1,66	0,051	100%
	NL2	2,0	-0,8	-0,40	0,057	126%
	NL3	4,5	5,9	1,31	0,037	72%

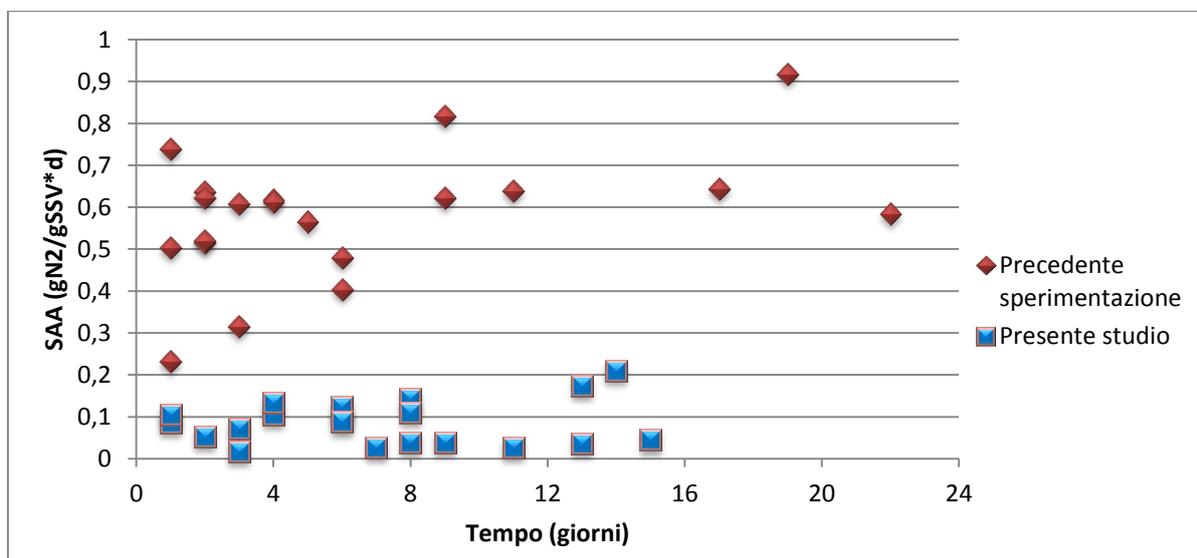
In *tabella 4-6* si nota che i risultati ottenuti sono stati insoliti, specialmente dopo la sostituzione con refluo reale con l'impossibilità di calcolare diversi valori di attività per le bottiglie *NL2* e *NL3* a causa della non interpretabilità delle curve di produzione di N<sub>2</sub> ricavate. Come previsto, tra uno spike e l'altro, è stato necessario eseguire una correzione del pH che ha raggiunto sempre valori superiori agli 8 punti influenzando negativamente sull'attività anammox; questo tuttavia da solo non giustifica la produzione di ioni ammonio o nitrito come è accaduto negli spike 3, 4, 5, 6 per le bottiglie *NL2* e *NL3* che è spiegabile solamente dalla partecipazione di reazioni concorrenti e dall'inibizione della biomassa anammox causata dall'aumento di pH dovuto all'assenza di CO<sub>2</sub> disciolta. Possibili errori umani sono esclusi dall'accettabilità degli errori ricavati dai bilanci di massa sulle forme azotate ma ciò nonostante i valori di attività ottenuti dopo la sostituzione non sono stati considerati affidabili in quanto gli errori ottenuti confrontando le produzioni di N<sub>2</sub> stechiometriche e

sperimentali sono molto elevati. Per questo motivo non sono stati riportati i grafici con le attività specifiche e i confronti percentuali.

#### 4.2.1.5 Confronto con i risultati ottenuti nella precedente sperimentazione

I valori di SAA ottenuti nelle precedenti prove sono stati messi a confronto con quelli della precedente sperimentazione condotta tra i mesi di maggio e ottobre 2011. Del presente studio sono state considerate le attività specifiche ottenute da tutti i bianchi esclusi quelli della prova numero 4 per motivi di inaffidabilità dei risultati, mentre per la sperimentazione precedente sono stati considerati 18 valori di SAA ricavati dai bianchi di 5 diverse prove.

I dati completi utilizzati per il confronto sono riportati nel *grafico 4-16*.



**Grafico 4-16 Confronto tra i valori di SAA ottenuti nel presente studio e nella precedente sperimentazione**

Per maggior chiarezza in *tabella 4-7* le attività specifiche sono state raggruppate in 3 classi a seconda del numero di giorni di lavoro dopo il quale sono state ricavate e ne è stata fatta la media.

**Tabella 4-7 Confronto tra i valori di SAA ottenuti nel presente studio e nella precedente sperimentazione**

Giorni di lavoro	SAA precedente sperimentazione (2011)	SAA presente studio (2012)	Confronto percentuale
< 4	0,538	0,082	15,24%
5 ÷ 9	0,577	0,084	14,56%
> 10	0,696	0,099	14,22%

Dal confronto emerge che la biomassa durante il periodo di stoccaggio ha perso circa l'85% della sua attività e questa perdita pare irreversibile in quanto nemmeno per periodi di lavoro superiori ai 10 giorni si notano dei miglioramenti.

In seguito a questi risultati si è deciso di inoculare il reattore SBR con della nuova biomassa.

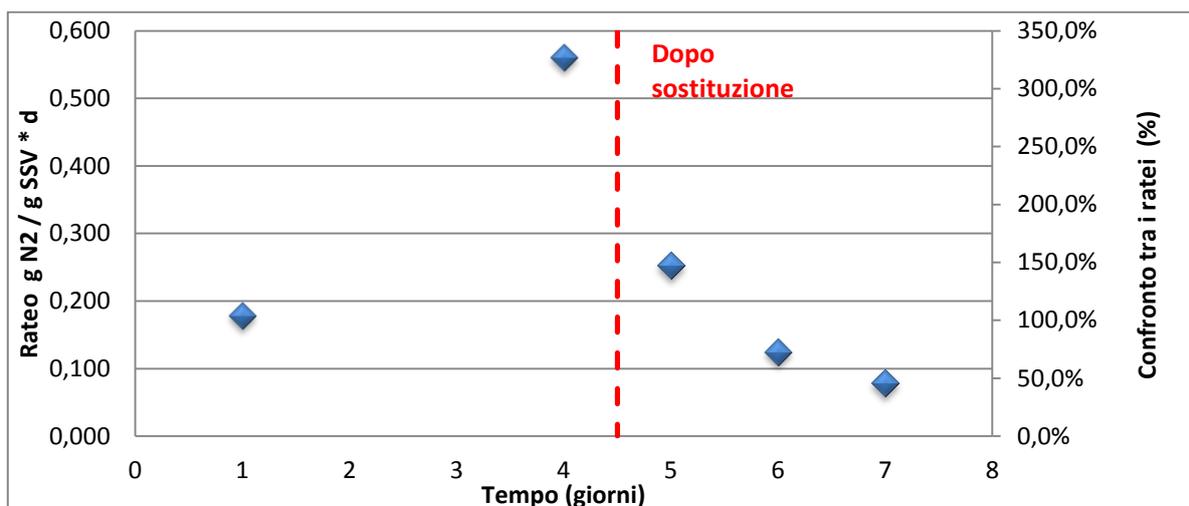
## 4.2.2 Determinazione dell'attività della nuova biomassa

### 4.2.2.1 Prova numero 5

La nuova biomassa anammox è stata ricevuta in data 3 maggio 2012 e su di essa è stata condotta la prova numero 5 al fine di valutarne l'attività specifica. Per carenza di strumenti è stata allestita solo una bottiglia (NL1) in cui, dopo 4 giorni di lavoro come bianco, è stata eseguita una sostituzione del 25% della miscela con refluo reale; l'attività specifica della biomassa dopo sostituzione è quindi stata confrontata con quella ottenuta al termine del primo spike. I risultati della prova sono riportati in *tabella 4-8* e in *grafico 4-17*.

**Tabella 4-8 Esiti della prova manometrica numero 5**

Giorni	Bottiglia	$\Delta \text{NH}_4$ (mg/l)	$\Delta \text{NO}_2$ (mg/l)	$\Delta \text{NO}_2/\Delta \text{NH}_4$	SAA (gN <sub>2</sub> /gSSV*d)	% SAA su spike1
3	NL1	40,3	54,5	1,35	0,178	100%
4	NL1	50,5	35,2	0,70	0,561	314%
Sostituzione con 25% di refluo reale in NL1						
6	NL1	46,5	50,2	1,08	0,253	142%
7	NL1	45,3	50,8	1,12	0,124	70%
10	NL1	16,8	51,6	3,08	0,079	44%



**Grafico 4-17 Attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 3 e confronto percentuale rispetto al primo spike**

Si nota che dopo il primo spike l'attività aumenta fino a un valore in linea con quelli della precedente sperimentazione per poi diminuire di circa il 50% rispetto all'attività assunta al giorno 1 a causa della presenza del refluo reale. Non avendo un bianco con cui paragonare i risultati ottenuti non è tuttavia possibile stabilire con precisione quale sia stata l'entità dell'effetto del refluo reale sulla biomassa. Per questo motivo la prova è stata ripetuta (*prova 6*) utilizzando più bottiglie per poter confrontare tra loro i risultati.

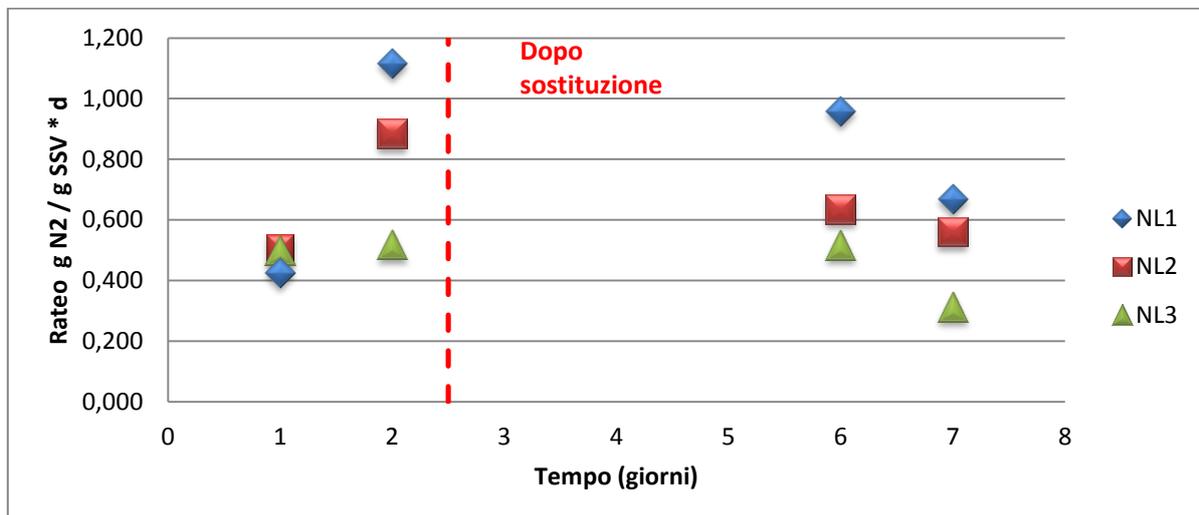
#### 4.2.2.2 Prova numero 6

Questa prova della durata di 7 giorni ha previsto la preparazione di 3 bottiglie: una come bianco e due con la sostituzione del 25% (*NL2*) e del 50% (*NL3*) della miscela con refluo reale dopo 2 giorni. Gli esiti della prova sono visibili in *tabella 4-9*, in *grafico 4-18* e in *grafico 4-19*. I risultati sono positivi considerando sia gli elevati valori di SAA nel bianco, che sono stati piuttosto elevati raggiungendo come massimo gli 1,116 gN<sub>2</sub>/gSSV\*d il giorno 2, sia l'andamento delle bottiglie *NL2* e *NL3*. Si nota infatti che dopo 5 giorni dalla sostituzione, la biomassa della bottiglia *NL2* ha un'attività specifica pari all'84% di quella del bianco, sintomo di una bassa inibizione da parte del refluo reale sulla biomassa quando esso è presente per il 25% nella miscela. Per quanto riguarda la *NL3*, l'attività specifica a fine prova è scesa al 47% rispetto al bianco con un valore pari a 0,314 gN<sub>2</sub>/gSSV\*d e ciò rappresenta un risultato

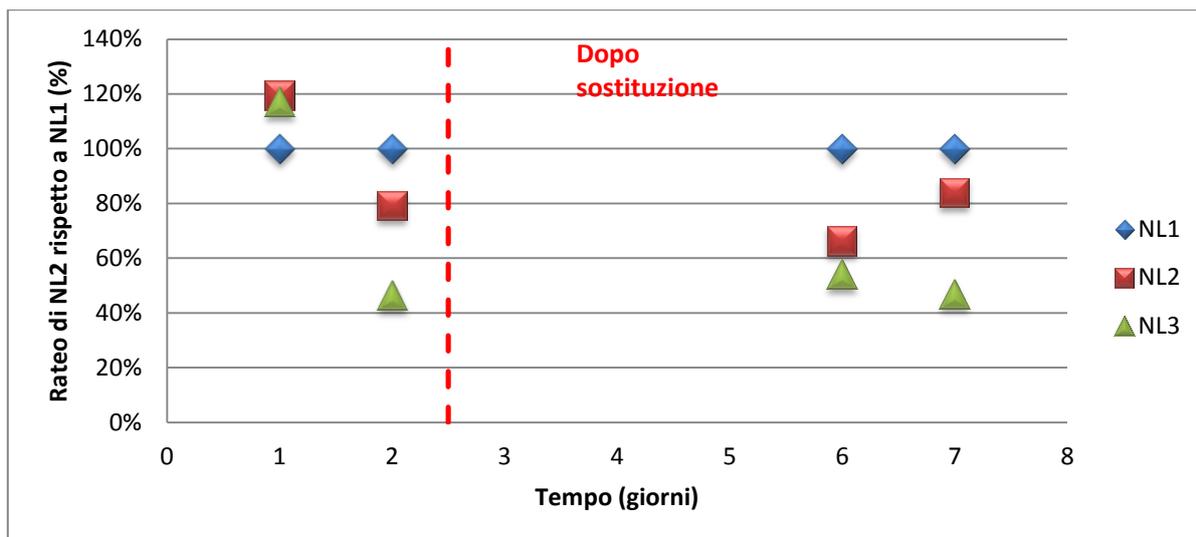
soddisfacente se paragonato a quello ottenuto nella *prova 2* dove, dopo 6 giorni di lavoro, la biomassa aveva perso il 90% della sua attività arrivando a 0,005 gN<sub>2</sub>/gSSV\*d.

**Tabella 4-9 Esiti della prova manometrica numero 6**

Giorni	Bottiglia	SAA (gN <sub>2</sub> /gSSV*d)	% SAA su NL1
1	NL1	0,425	100%
	NL2	0,507	119%
	NL3	0,498	117%
2	NL1	1,116	100%
	NL2	0,883	79%
	NL3	0,519	46%
Sostituzione con 25% di refluo reale in NL2			
Sostituzione con 50% di refluo reale in NL3			
6	NL1	0,957	100%
	NL2	0,634	66%
	NL3	0,518	54%
7	NL1	0,668	100%
	NL2	0,560	84%
	NL3	0,314	47%



**Grafico 4-18 Attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 6**



**Grafico 4-19 Confronto percentuale tra le attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 6**

### 4.2.3 Valutazione del recupero di attività in seguito a inibizione da nitrito

Come già detto nel *paragrafo 2.4.4*, alte concentrazioni di ioni nitrito causano un'inibizione della biomassa anammox che per lunghi tempi di esposizione può essere non reversibile. Durante la gestione di un impianto è possibile che si verifichino degli accumuli indesiderati di ioni nitrito nel mixed liquor tali da mettere a rischio il corretto funzionamento del processo e quando ciò accade solitamente la manovra che si esegue è il lavaggio del reattore, si rimuove cioè il più possibile del surnatante del reattore, previa sedimentazione, e lo si sostituisce con altrettanto refluo sintetico in modo tale da abbattere la concentrazione di  $\text{NO}_2^-$ . Questa tecnica è efficace, ma di difficile applicabilità su impianti a una scala superiore a quella pilota visti i volumi in gioco, si è quindi pensato a un metodo alternativo al lavaggio. A inibizione avvenuta, la prova consiste nell'eseguire un dosaggio di acetato di sodio  $\text{CH}_3\text{COONa}$  che, essendo una fonte di carbonio rapidamente degradabile, sostiene il metabolismo dei microorganismi eterotrofi denitrificanti consentendo loro di ridurre a  $\text{N}_2$  parte del nitrito presente nel mixed liquor portandone la concentrazione a livelli accettabili per la biomassa anammox. Gli studi di Van de Graaf et al. (1996) hanno dimostrato che la presenza di acetato non disturba il metabolismo anammox e si suppone possa avere un effetto positivo su di

esso. Secondo l'ipotesi più accreditata la CO<sub>2</sub> prodotta dalla biomassa eterotrofa denitrificante, consumando l'acetato di sodio, viene utilizzata dalla biomassa anammox. L'applicabilità di questo metodo è stata studiata attraverso la conduzione della *prova 7* e della *prova 8*.

#### 4.2.3.1 Prova numero 7

Per questa prova della durata di 12 giorni sono state allestite 3 bottiglie. Dopo 4 giorni di funzionamento in bianco nelle bottiglie *NL2* e *NL3* gli ioni nitrito sono stati portati alla concentrazione di 200mgN/l per provocare l'inibizione della biomassa anammox contenuta in esse, in seguito alla *NL2* è stato eseguito il lavaggio e alla *NL3* è stato dosato acetato di sodio. È stato deciso di somministrare alla biomassa acetato in quantità sottostechiometrica e di frazionare il dosaggio in modo che ne venisse fornito il 50% al giorno 5 e il restante 50% al giorno 6. Finché la concentrazione di ioni nitrito nella *NL3* non è scesa sotto i 50mgN/L, negli spike successivi a quello del giorno 4 è stato dosato soltanto ammonio per favorire il consumo di NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. In *tabella 4-10* sono riportati per maggior chiarezza i dosaggi di nitrito e di acetato, mentre i risultati della prova sono riportati in *tabella 4-11*, *grafico 4-20* e *grafico 4-21*.

**Tabella 4-10 Dosi di ioni nitrito e acetato di sodio somministrate nelle bottiglie *NL2* e *NL3* dal giorno 4 al giorno 6 della prova numero 7**

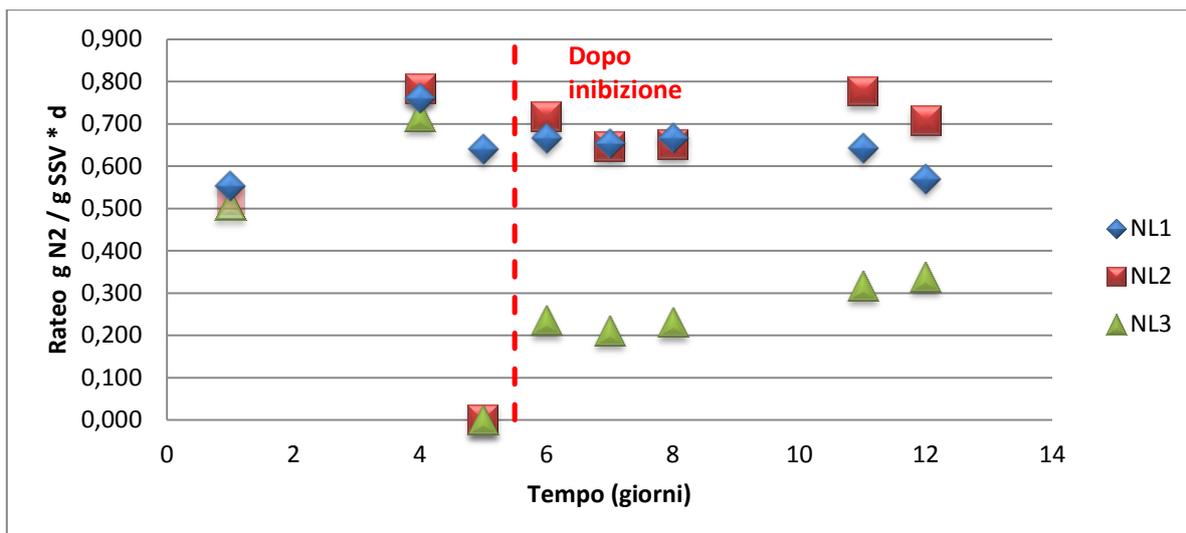
Giorni	Bottiglia	Dosaggio NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mgN/L)	Dosaggio CH <sub>3</sub> COONa (mgCOD/L)	Dosaggio NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgN/L)
4	NL2	200	0	50
	NL3	200	0	50
5	NL2	50	0	50
	NL3	0	300	0
6	NL2	50	0	50
	NL3	0	300	50

Esaminando i risultati si nota che, dopo 24 ore dall'alto dosaggio di nitrito (giorno 5), la biomassa è stata completamente inibita, per questo motivo non è stato possibile calcolare l'attività specifica. L'attività nel bianco ha avuto un andamento abbastanza costante mantenendosi mediamente tra gli 0,6 e gli 0,7 gN<sub>2</sub>/gSSV\*d e la biomassa nella *NL2* dopo il

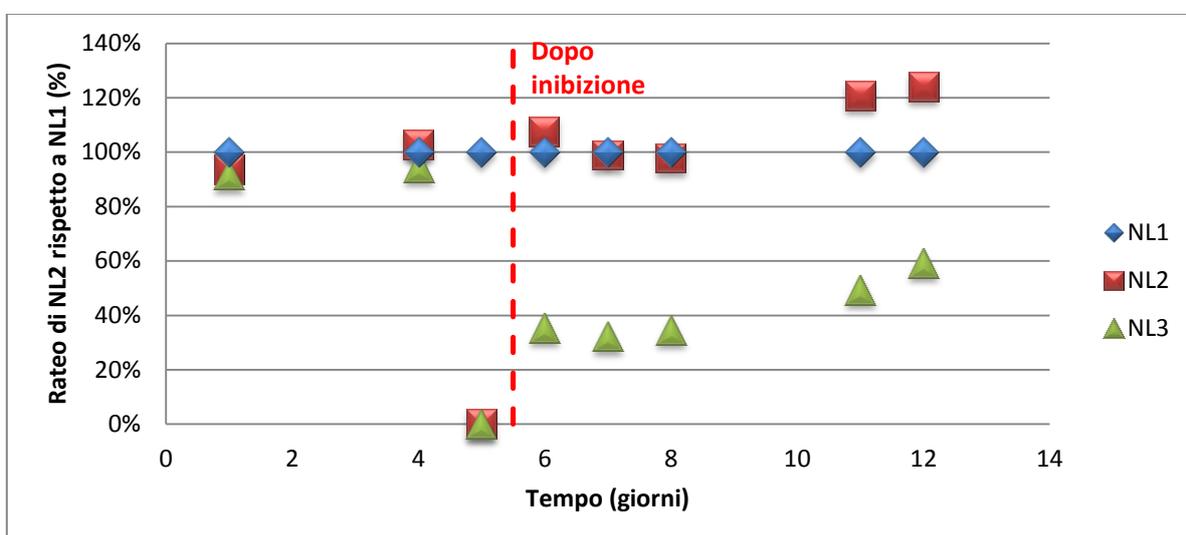
lavaggio ha recuperato completamente l'attività tornando ai livelli del bianco, analogamente a quanto ottenuto da *Lotti et al. (2012)*. Per quanto riguarda la biomassa della NL3 dopo l'inibizione, in cui si è verificata una perdita del 65% dell'attività, si osserva un trend crescente di attività fino a raggiungere il valore di 0,338 gN<sub>2</sub>/gSSV\*d, il 59% rispetto al bianco, a fine prova.

**Tabella 4-11 Esiti della prova manometrica numero 7**

Giorni	Bottiglia	Δ NH4 (mg/l)	Δ NO2 (mg/l)	ΔNO2/ΔNH4	SAA (gN2/gSSV*d)	% SAA su NL1
1	NL1	43,81	53,28	1,22	0,554	100%
	NL2	51,1	54,55	1,07	0,519	94%
	NL3	42,85	49,73	1,16	0,508	92%
4	NL1	74,93	74,48	0,99	0,761	100%
	NL2	69,92	77,71	1,11	0,782	103%
	NL3	72,73	75,19	1,03	0,718	94%
5	NL1	48,19	54,53	1,13	0,641	100%
	NL2	4,33	-2,01	-0,46	-	-
	NL3	11,34	10,09	0,89	-	-
6	NL1	48,1	53,01	1,10	0,667	100%
	NL2	37,39	42,34	1,13	0,717	107%
	NL3	49,23	55,5	1,13	0,236	35%
7	NL1	45,49	53,5	1,18	0,654	100%
	NL2	45,1	51,07	1,13	0,647	99%
	NL3	51,49	59,1	1,15	0,211	32%
8	NL1	47,21	54,99	1,16	0,666	100%
	NL2	48,87	51,13	1,05	0,651	98%
	NL3	52,04	77,16	1,48	0,231	35%
11	NL1	73,4	77,99	1,06	0,644	100%
	NL2	74,59	74,79	1,00	0,777	121%
	NL3	62,87	71,22	1,13	0,317	49%
12	NL1	49,9	53,88	1,08	0,571	100%
	NL2	53,49	50,93	0,95	0,707	124%
	NL3	45,48	53,05	1,17	0,338	59%



**Grafico 4-20 Attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 7**



**Grafico 4-21 Confronto percentuale tra le attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 7**

#### 4.2.3.2 Prova numero 8

Questa prova è stata strutturata in maniera analoga alla precedente, ma apportando delle modifiche al fine di aumentarne l'accuratezza. In particolare sulla bottiglia NL2 è stato deciso di eseguire il lavaggio dopo aver esposto la biomassa ad alte concentrazioni di nitrito per almeno 24 ore, mentre per la NL3 il dosaggio dell'acetato è stato eseguito in 3 diversi momenti e, nel sottotappo delle bottiglie OxiTop, sono state inserite delle pastiglie di soda in grado di assorbire la CO<sub>2</sub> prodotta dai batteri denitrificanti.

Un'altra differenza rispetto alla prova precedente è stato il fatto che un solo dosaggio di 200mgN/l di ioni nitrito non è stato sufficiente a indurre l'inibizione della biomassa anammox, ma è stato necessario ripetere l'operazione il giorno successivo.

I dettagli riguardanti le somministrazioni di acetato e di nitrito sono riportati in *tabella 4-12*.

**Tabella 4-12 Dosi di ioni nitrito e acetato di sodio somministrate nelle bottiglie NL2 e NL3 dal giorno 4 al giorno 6 della prova numero 8**

Giorno	Bottiglia	Dosaggio NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mgN/L)	Dosaggio CH <sub>3</sub> COONa (mgCOD/L)	Dosaggio NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mgN/L)
4	NL2	200	0	50
	NL3	200	0	50
5	NL2	200	0	50
	NL3	200	0	50
6 ore 10.00	NL2	0	0	50
	NL3	0	150	0
6 ore 17.00	NL3	0	150	0
7	NL2	0	0	50
	NL3	0	300	50
Eseguito lavaggio sulla bottiglia NL2				

I risultati completi della prova sono riportati in *tabella 4-13*, *grafico 4-22* e *grafico 4-23*.

Tabella 4-13 Esiti della prova manometrica numero 8

Giorno	Bottiglia	$\Delta \text{NH}_4$ (mg/l)	$\Delta \text{NO}_2$ (mg/l)	$\Delta \text{NO}_2/\Delta \text{NH}_4$	SAA (gN <sub>2</sub> /gSSV*d)	% SAA su NL1
1	NL1	48,8	52,9	1,08	0,634	100,00%
	NL2	45,6	52,5	1,15	0,534	84%
	NL3	47,6	52,2	1,10	0,609	96%
4	NL1	72,5	72,6	1,00	0,764	100%
	NL2	67,7	74,5	1,10	0,640	84%
	NL3	73,3	73,7	1,01	0,860	113%
5	NL1	52,4	57,9	1,10	0,609	100%
	NL2	52,8	65,3	1,24	0,488	80%
	NL3	52,4	62,1	1,19	0,567	93%
6	NL1	50,5	61,6	1,22	0,582	100%
	NL2	50,1	61,6	1,23	0,476	82%
	NL3	6,8	9,3	1,38	-	-
7	NL1	42,4	52,6	1,24	0,584	100%
	NL2	43,1	61,0	1,42	0,534	91%
	NL3	42,9	58,0	1,35	0,410	70%
Esecuzione del lavaggio sulla NL2						
8	NL1	50,8	63,8	1,26	0,410	100%
	NL2	51,1	64,7	1,27	0,276	50%
	NL3	50,6	15,8	0,31	0,214	39%
11	NL1	51,2	63,9	1,25	0,270	100%
	NL2	52,1	63,2	1,21	0,136	50%
	NL3	49,2	70,2	1,43	0,074	27%
12	NL1	-3,1	-27,7	9,01	-	-
	NL2	52,7	64,7	1,23	0,482	-
	NL3	49,9	65,4	1,31	0,317	-

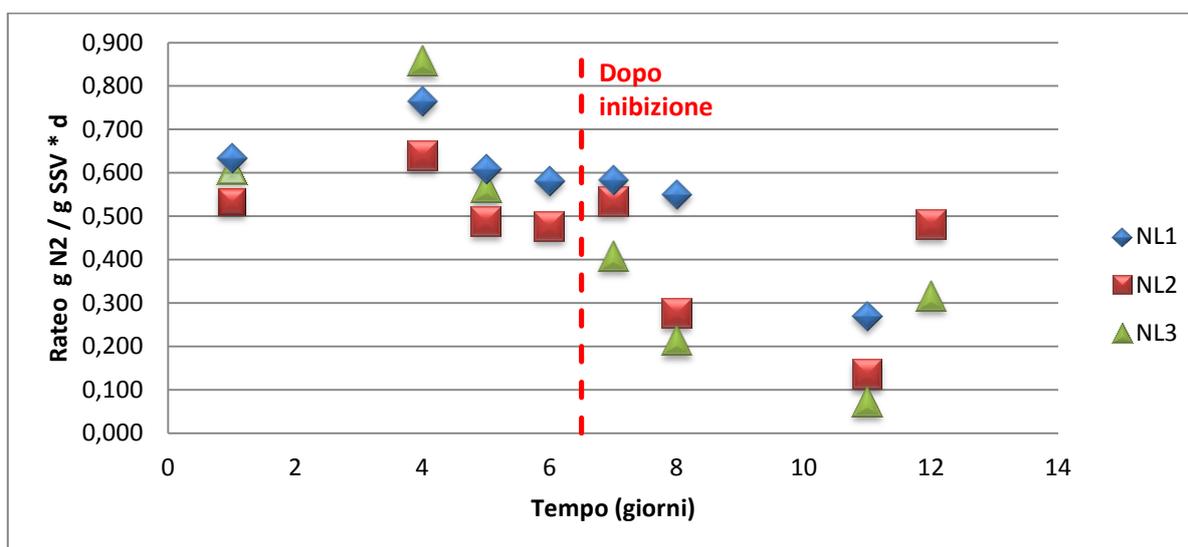
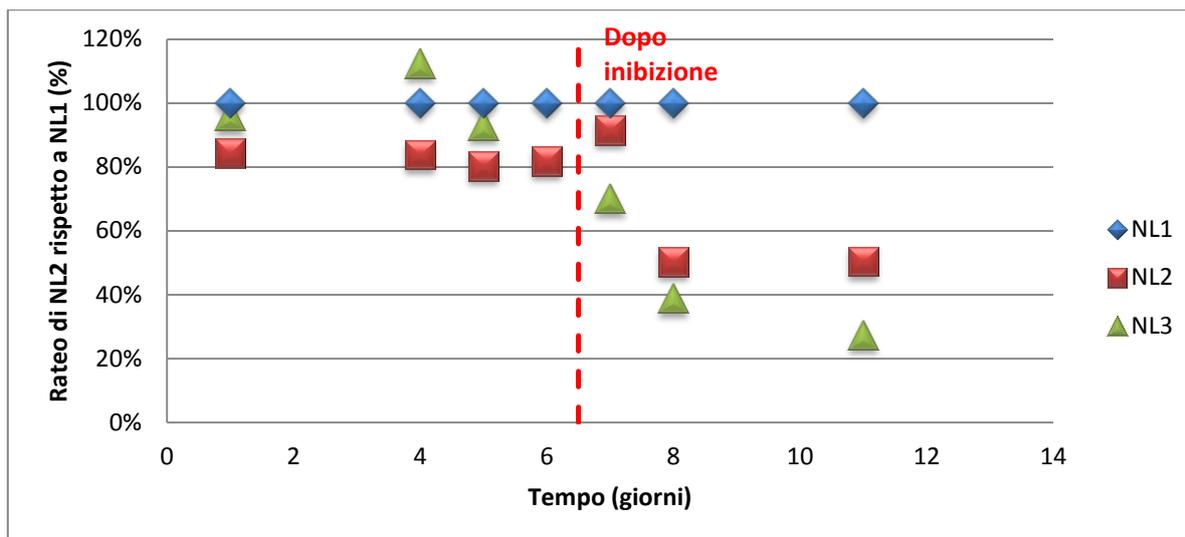


Gráfico 4-22 Attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 8



**Grafico 4-23 Confronto percentuale tra le attività specifiche delle biomasse nelle bottiglie impiegate nella prova 8**

Il dato di SAA per la *NL1* al termine della prova non è disponibile e non è stato quindi possibile ricavare il confronto percentuale al giorno 12.

Si possono notare molteplici differenze rispetto alla *prova 7*, la più importante è il fatto che in questo caso l'inibizione della biomassa è stata solo parziale e si è verificata solo per la *NL3* e che per raggiungere questa condizione è stato necessario eseguire 2 spike con alte concentrazioni di nitriti. Questo può essere stato causato dalla maggiore dimensione dei granuli impiegati in questa prova grazie alla quale la biomassa è stata meno esposta al contatto con gli ioni nitrito. La differenza di risposta alle alte concentrazioni di nitrito tra la biomassa della bottiglia *NL2*, che ha subito un'inibizione trascurabile, e quella della *NL3*, che è stata completamente inibita, resta comunque un fatto anomalo al quale non è stato possibile dare una spiegazione. Le altre differenze sono date dal calo del 50% dell'attività registrato nella *NL2* dopo il lavaggio e l'andamento decrescente dei valori di SAA nella *NL3* che, 5 giorni dopo il primo dosaggio di acetato di sodio, ha perso il 73% dell'attività che è scesa a 0,074 gN<sub>2</sub>/gSSV\*d. Questi risultati in contrasto con quelli ottenuti nella *prova 7* sono attribuibili al più alto tempo di contatto tra la biomassa e le alte concentrazioni di ioni nitrito che, come anche mostrato da *Scaglione et al. (2012)* e da *Lotti et al. (2012)*, accentua l'effetto inibente del nitrito.

Non sono invece presenti significative differenze tra il bianco della prova attuale e quello della prova precedente.

### 4.2.3.3 Confronto con i risultati di letteratura

Gli esiti delle prove di inibizione sono stati confrontati con i più recenti studi riportati in letteratura e riportati in *tabella 4-14*.

**Tabella 4-14 Confronto tra il recupero di attività ottenuto in seguito a inibizione da nitrito per il presente studio e i principali studi di letteratura**

	Lotti et al. (2012)	Scaglione et al. (2012)	Presente studio - Prova 7 (2012)		Presente studio - Prova 8 (2012)	
	Lavaggio	Lavaggio	Lavaggio	Acetato	Lavaggio	Acetato
<b>Ammonio (mgN/L)</b>	50	50	50	50	50	50
<b>Nitrito (mgN/L)</b>	200	200	200	200	200	200
<b>Esposizione (h)</b>	24	24	12	12	36	36
<b>Recupero di attività (%)</b>	> 90	80	100	59	50	27

Il confronto tra i risultati del presente studio e gli altri studi dimostra che l'inibizione diventa più importante all'aumentare del tempo di esposizione alle alte concentrazioni di nitrito.

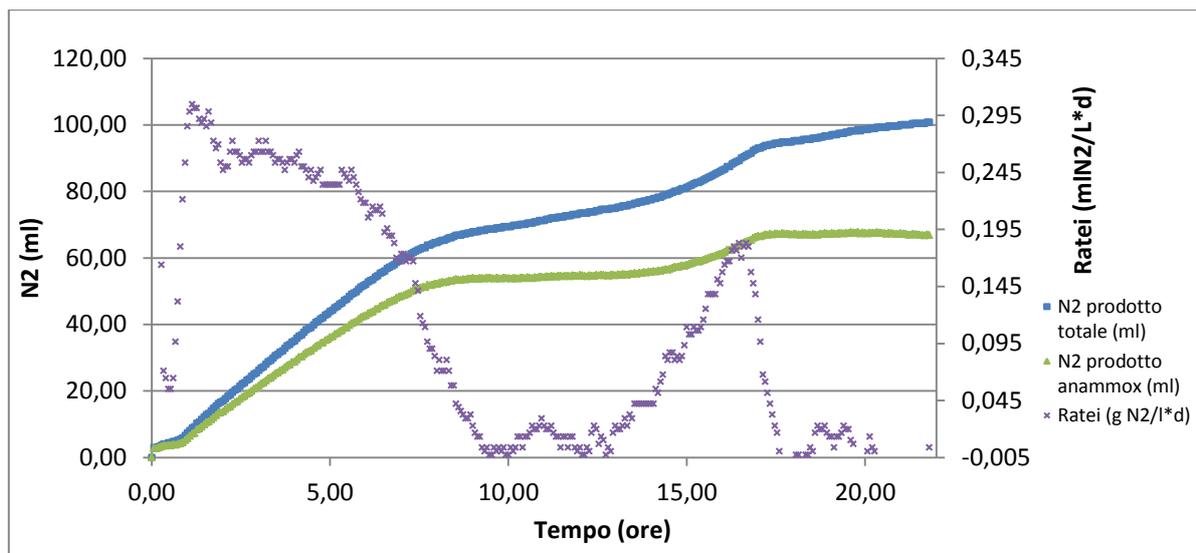
Dopo il lavaggio il recupero di attività da parte della biomassa per la prova 7 è stato del 100% risultando maggiore di quello ottenuto negli altri studi con tempo di esposizione superiore, viceversa per la prova 8 il recupero è stato solo del 50% risultando più basso del recupero ottenuto nelle altre sperimentazioni con tempi di esposizione inferiori.

Anche per quanto riguarda il recupero in seguito al dosaggio di acetato l'entità dell'inibizione dipende dal tempo di esposizione, ma il recupero dell'attività è più modesto rispetto a quello che si ottiene con il lavaggio.

### 4.2.3.4 Andamento dell'attività anammox in presenza di acetato di sodio

È interessante mostrare la singolarità dell'andamento della produzione di gas N<sub>2</sub> da parte della biomassa anammox in seguito al dosaggio di acetato di sodio nella miscela.

Nel grafico 4-24 è riportato a titolo di esempio il risultato ottenuto dalla NL3 dopo il primo dosaggio di acetato eseguito nella *prova 7*.



**Grafico 4-24 Andamento della produzione di N<sub>2</sub> in seguito a dosaggio di acetato di sodio**

Si nota un andamento della produzione di azoto inusuale con la curva che, escludendo la fase di acclimatazione iniziale, è composta da 4 tratti divisi da 3 netti cambi di pendenza; l'attività è buona nelle prime 8 ore, in seguito subisce un forte rallentamento per circa 6 ore per poi risalire improvvisamente per un breve periodo di tempo e infine riabbassarsi e mantenere una pendenza costante finale che rappresenta l'attività della biomassa denitrificante eterotrofa.

Va fatto notare che la curva riportata nel *grafico 4-24* è affidabile sia per il fatto che gli errori ricavati dal trattamento dei dati sono molto contenuti sia per il fatto che lo stesso andamento qualitativo è stato riscontrato anche nella curva estrapolata dai dati ricavati dopo il dosaggio di acetato nella *prova 8*.

Non è stato possibile eseguire indagini approfondite a riguardo, tuttavia le ipotesi formulate per l'andamento dell'attività anammox in presenza di acetato di sodio sono: la possibile formazione e accumulo di intermedi di reazione con effetti inibenti sulla biomassa che inibiscono il processo fino a quando non vengono consumati oppure il possibile esaurimento dell'acetato di sodio disciolto che lascerebbe la biomassa eterotrofa senza carbonio organico rapidamente biodegradabile. È stato eseguito un semplice calcolo numerico considerando la quantità di acetato dosato e la stechiometria della biomassa eterotrofa denitrificante ed è stato così riscontrato che il raggiungimento del primo flesso della curva si verifica in concomitanza con l'esaurimento dell'acetato disciolto.

#### 4.2.4 Analisi statistica degli errori

È stata eseguita un'analisi statistica degli errori ottenuti dall'elaborazione dei dati delle prove manometriche.

I dati sono stati ripuliti dagli outlier, considerando come tali valori di errore superiori all'80%, e trattati come 3 categorie distinte:

- errori dovuti al discostamento tra la produzione di N<sub>2</sub> stechiometrica e sperimentale considerando la sola biomassa anammox (eq.24), chiamati errori "anammox";
- errori dovuti al discostamento tra la produzione di N<sub>2</sub> stechiometrica e sperimentale considerando sia la biomassa anammox che la biomassa eterotrofa denitrificante (eq.26), chiamati errori "totali";
- errori dovuti al discostamento tra l'azoto ad inizio e fine prova ricavati dal bilancio di massa (eq.27), chiamati errori "bilanci".

In *tabella 4-15* sono riportate tutte le analisi statistiche di base eseguite sulle 3 categorie di errore considerandone il valore assoluto.

**Tabella 4-15** Analisi statistiche degli errori ricavati dai risultati delle prove manometriche

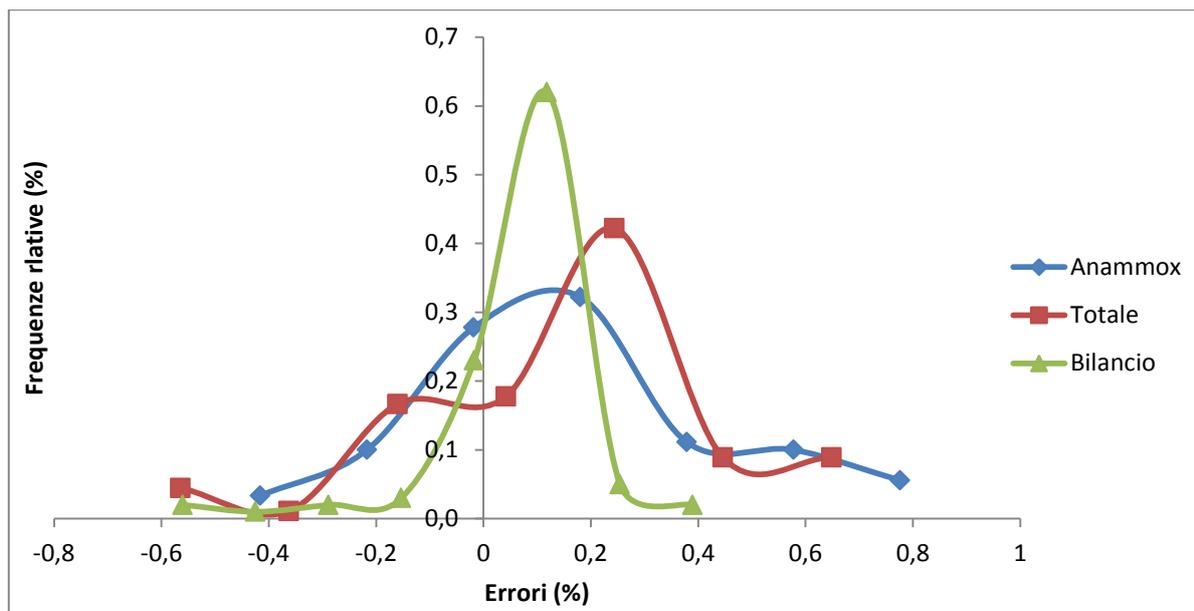
Proprietà	Anammox	Totale	Bilancio
<b>Numerosità del campione</b>	90	90	100
<b>Numero di outlaiers</b>	6	6	1
<b>Media</b>	20,9%	21,3%	7,9%
<b>Errore standard</b>	0,02	0,02	0,01
<b>Deviazione standard</b>	19,5%	18,6%	12,0%
<b>Varianza campionaria</b>	3,8%	3,5%	1,5%
<b>Minimo</b>	0,2%	0,2%	0,1%
<b>Primo quartile</b>	6,4%	7,8%	1,2%
<b>Mediana</b>	14,0%	15,3%	4,2%
<b>Terzo quartile</b>	29,4%	27,9%	6,6%
<b>Massimo</b>	77,6%	76,7%	69,6%
<b>Moda</b>	-	-	0,5%
<b>Curtosi</b>	0,60	0,85	11,05
<b>Asimmetria</b>	1,20	1,24	3,10

Si nota che la media, la varianza campionaria e il valore del terzo percentile degli errori sui bilanci sono molto bassi, sintomo di un'elevata precisione nella conduzione delle prove. I dati riguardanti le attività anammox e totali sono invece caratterizzati da medie e variabilità più elevate e questo non suggerisce un'alta affidabilità dei valori dei ratei ricavati dalle prove; ciò è probabilmente dovuto alla presenza di reazioni concorrenti ai processi anammox e di denitrificazione eterotrofa.

Non è stata riscontrata alcuna tendenza di incremento o diminuzione delle entità degli errori all'aumentare del numero di spike successivi sulla stessa bottiglia.

È stata in seguito indagata la distribuzione degli errori considerando in questo caso il loro segno; valori positivi indicano sovrastime, viceversa per quelli negativi. Dopo aver suddiviso i valori in classi secondo il metodo di Sturges sono state calcolate le frequenze relative per ciascuna classe e plottate. L'esito è visibile nel *grafico 4-25*.

Le distribuzioni presentano un andamento qualitativamente simile a quello di una normale con la maggior parte della massa decentrata sull'asse positivo delle ascisse. Questo fatto indica una tendenza a sovrastimare le produzioni di gas e ad avere una quantità di azoto maggiore in uscita rispetto all'ingresso ed è spiegabile con l'esistenza dell'effetto di acclimatazione e con la presenza di biomassa eterotrofa denitrificante. L'acclimatazione è dovuta al fatto che le bottiglie a inizio prova si trovano a una temperatura di poco inferiore ai 35°C mantenuti nell'incubatrice per cui nella fase iniziale, l'espansione del gas nella testa delle bottiglie, causa un aumento di pressione non dovuto all'attività batterica. La presenza di batteri eterotrofi denitrificanti provoca anch'essa un piccolo aumento di pressione a causa della produzione di anidride carbonica da parte della biomassa stessa.



**Grafico 4-25 Distribuzione delle frequenze relative degli errori ricavati dai risultati delle prove manometriche**

Sono stati in seguito calcolati gli intervalli di confidenza per la media delle 3 popolazioni considerando la varianza ignota e gli intervalli di confidenza per la varianza e i risultati sono mostrati in *tabella 4-16*.

**Tabella 4-16 Intervalli di confidenza per media e varianza**

IC	Anammox	Totale	Bilancio
$\mu$	$17,5\% < \mu < 24,3\%$	$18,0\% < \mu < 24,6\%$	$5,9\% < \mu < 9,9\%$
$\sigma^2$	$3,0\% < \sigma^2 < 5,0\%$	$2,8\% < \sigma^2 < 4,5\%$	$1,2\% < \sigma^2 < 1,9\%$

È infine stato condotto il test non parametrico di Kolmogorov-Smirnov di buon adattamento sulle distribuzioni del *grafico 4-16* per verificare l'adattabilità con una distribuzione normale standardizzata ma gli esiti sono stati in tutti i casi negativi.

### 4.3 Risultati derivati dalla gestione del reattore SBR anammox

In questo paragrafo sono illustrati i risultati ottenuti dalla gestione del reattore SBR anammox a scala di laboratorio. Si mostreranno in particolare le caratteristiche

dell'effluente (*paragrafo 4.3.1*), gli andamenti dell'attività anammox (*paragrafo 4.3.2*) e dei parametri operativi d'interesse monitorati durante la sperimentazione (*paragrafo 4.3.3*) quali il contenuto di solidi sospesi, i valori di SRT e la granulometria della biomassa. È riportato infine (*paragrafo 4.3.4*) un confronto tra i risultati ricavati dalla presente sperimentazione e quelli presenti in letteratura.

### **4.3.1 Caratteristiche qualitative dell'effluente**

#### **4.3.1.1 Andamento delle concentrazioni delle forme azotate**

Una parte fondamentale della gestione del reattore consiste nella valutazione della qualità del refluo scaricato e questo è stato possibile elaborando i dati ricavati dall'esecuzione periodica delle analisi chimiche per la determinazione delle forme azotate.

Nel *grafico 4-26* sono riportati gli andamenti delle concentrazioni di ioni ammonio, nitrito e nitrato nell'influyente e nell'effluente in funzione della percentuale di refluo reale nell'influyente, e nei *grafici 4-27* e *4-28* gli andamenti rispettivamente dei ratei di rimozione dell'azoto parziali, non considerando cioè gli ioni nitrato, ( $\text{NH}_4^+\text{RR}$ ,  $\text{NO}_2^-\text{RR}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{RR}$  e  $\text{NRR}_{\text{par}}$ ) e totale ( $\text{NRR}_{\text{tot}}$ ) e gli andamenti del rapporto NRR/NLR parziale e totale.

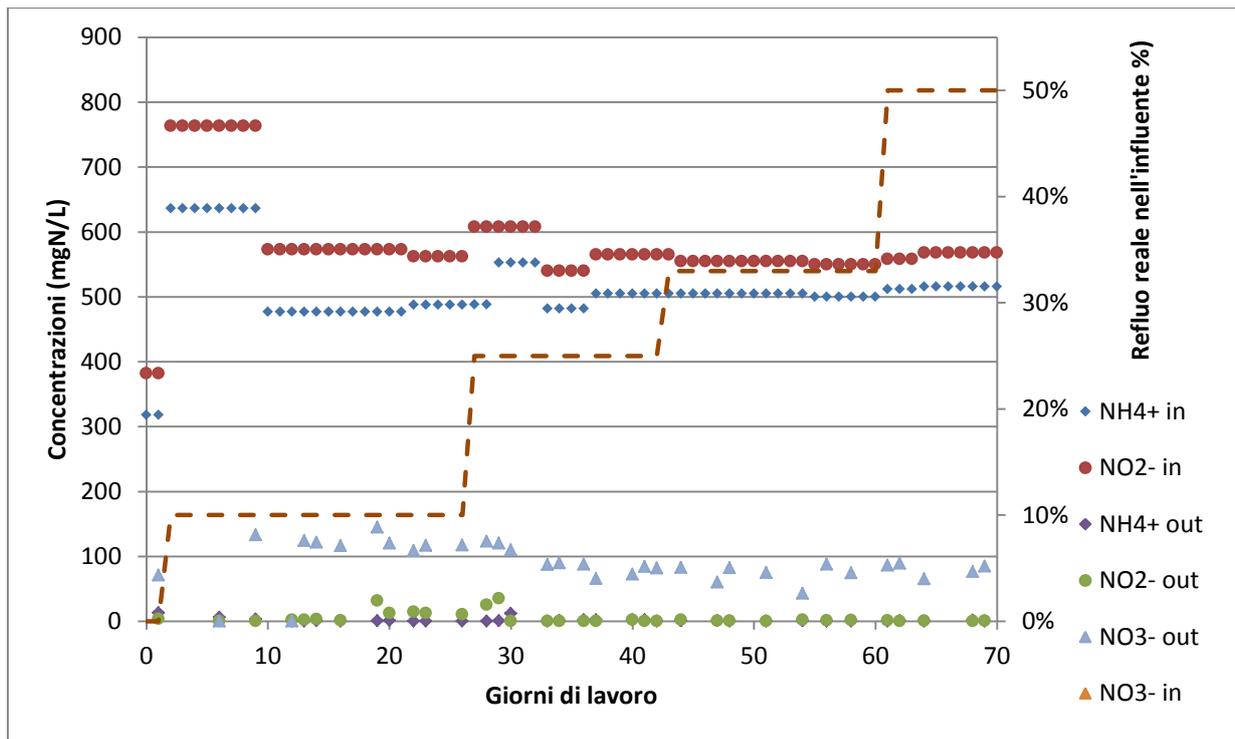


Grafico 4-26 Andamenti delle forme azotate in ingresso e uscita al reattore SBR durante il periodo di sperimentazione

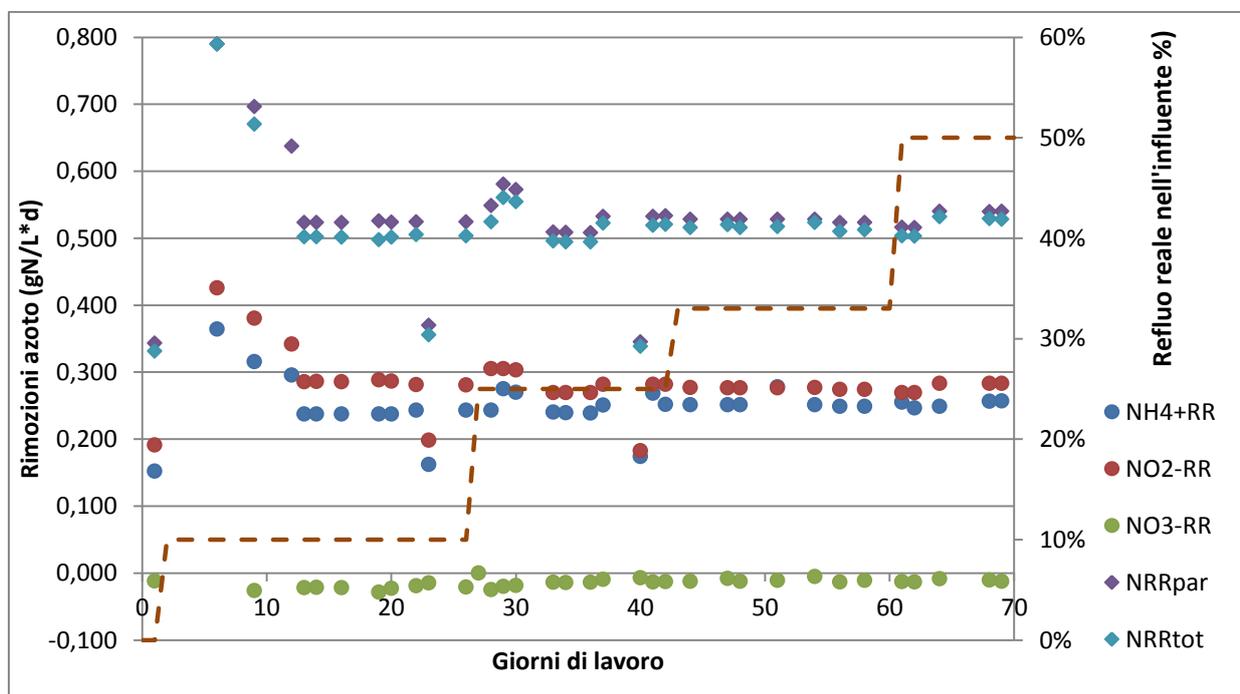
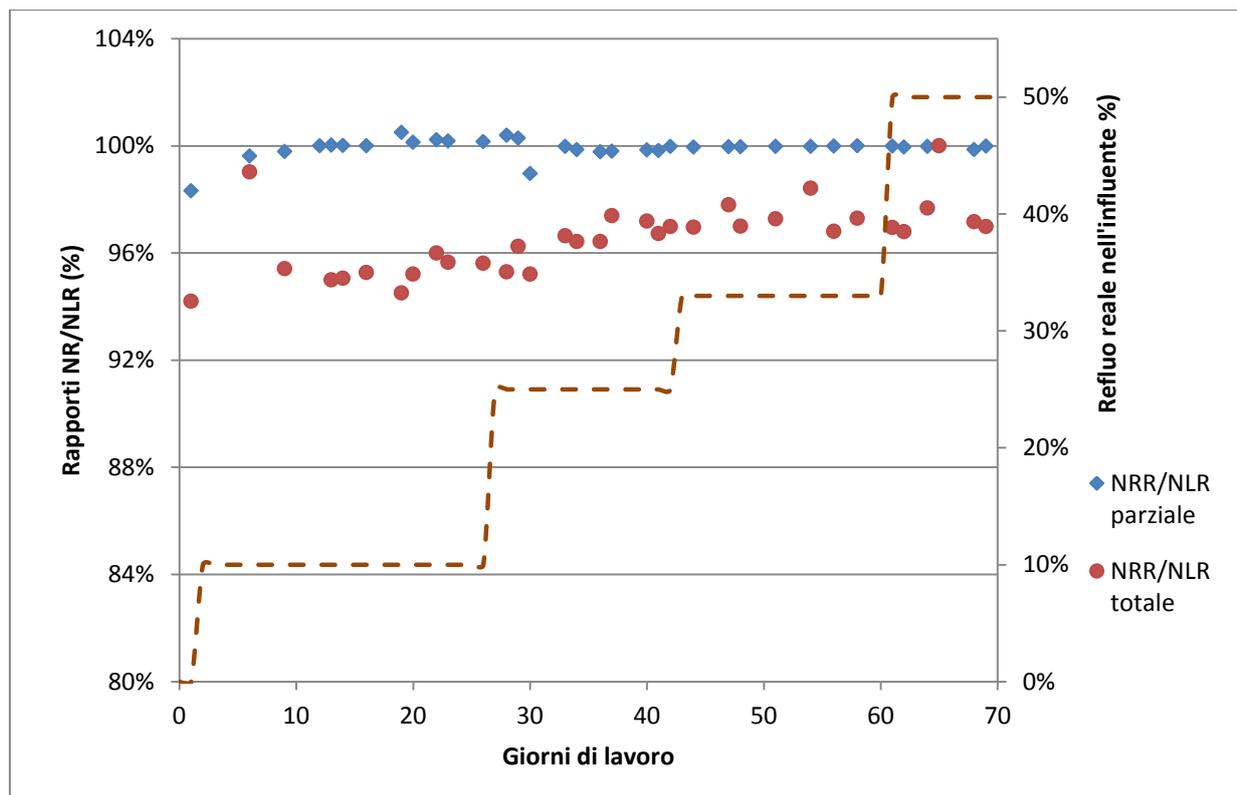


Grafico 4-27 Andamenti dei ratei di rimozione parziali e totali di azoto



**Grafico 4-28 Andamenti dei rapporti NRR/NLR parziali e totali**

Dal giorno 2 al giorno 9 il carico di azoto complessivo in ingresso al sistema è stato di circa 1.4gN/L a differenza di quello mantenuto per il resto della sperimentazione che è stato compreso tra 1,05 e 1,1 gN/L.

Osservando l'andamento delle concentrazioni in uscita dal reattore si nota che non sono mai stati registrati accumuli significativi di ioni ammonio e nitrito nel mixed liquor che indicano sia una buona efficienza complessiva del sistema, come apprezzabile dall'andamento dei rapporti NRR/NLR, sia il fatto che il reattore è stato sottocaricato rispetto alle sue potenzialità. Si è verificato soltanto un episodio di accumulo di nitrito che ha raggiunto la concentrazione di 35mgN/L al giorno 29 e il problema è stato risolto riducendo il rapporto  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  dell'influyente da 1,20 a 1,10.

Da notare sono anche le concentrazioni di nitrati nell'effluente e l'andamento della loro produzione. Fino al giorno 33, ovvero 5 giorni dopo aver incrementato la percentuale di refluo reale nell'alimento al 25%, la concentrazione di  $\text{NO}_3^-$  si mantiene stabilmente al di sopra di 100mgN/l salvo poi decrescere per raggiungere un nuovo equilibrio su concentrazioni comprese mediamente tra 70 e 80mgN/L; in generale la concentrazione di ioni nitrato nell'effluente diminuisce all'aumentare della percentuale di refluo reale trattato.

È anche possibile apprezzare in *grafico 4-27* l'andamento decrescente del rateo di produzione di nitrato all'aumentare della percentuale di refluo reale nell'influente e in *grafico 4-28* come il calo della produzione di  $\text{NO}_3^-$  comporti un minore scarto tra i valori di NRR/NLR parziali e totali.

Sempre in *grafico 4-28* si nota come, escludendo i giorni 1 e 30, le efficienze di rimozione dell'azoto parziali siano sempre superiori al 99%, sintomo di una elevata efficienza e di una corretta scelta dei parametri operativi. Si nota che tra il giorno 19 e il giorno 29 i valori di  $\text{NRR/NLR}_{\text{par}}$  sono superiori all'unità. Questo perché il calcolo del NRR è stato eseguito con un bilancio di massa che, oltre a quello nell'influente e nell'effluente, considera anche l'azoto presente nel mixed liquor e tali valori si spiegano con il consumo di ammonio o nitrito che è stato accumulato nei giorni precedenti.

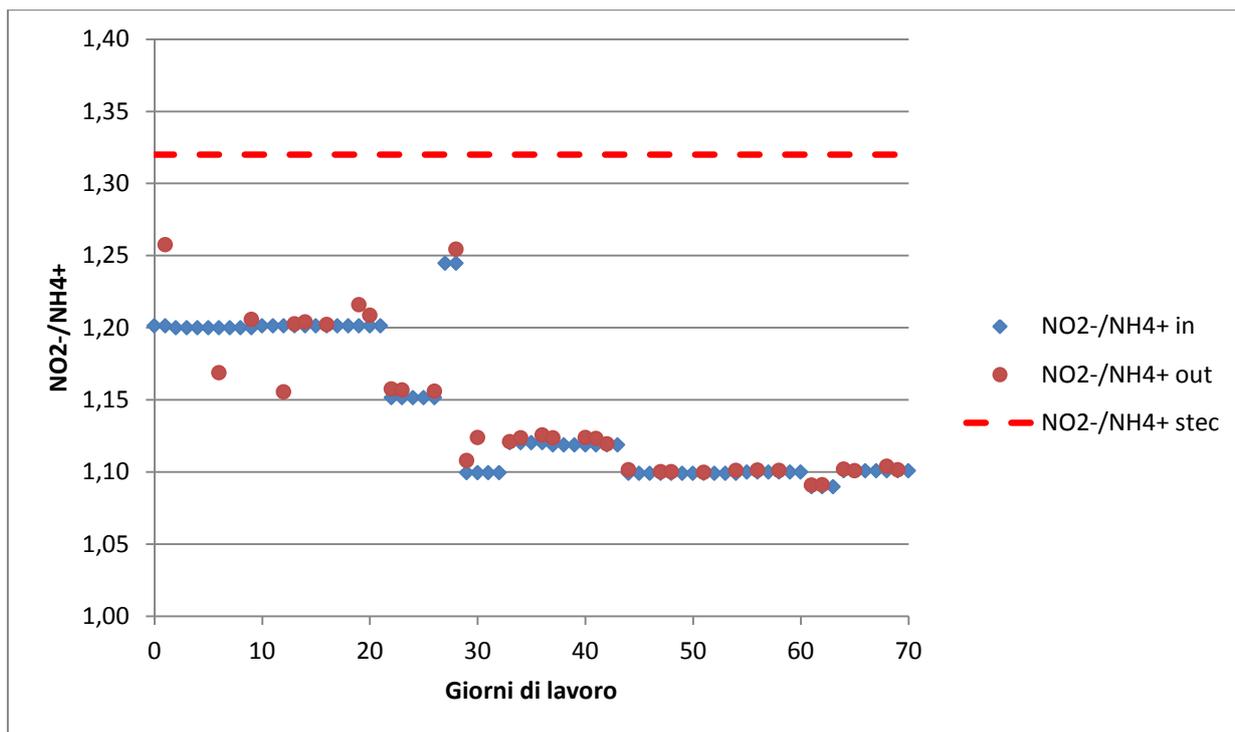
Nella *tabella 4-17* sono riportate le medie dei principali parametri dell'effluente per le diverse percentuali di refluo reale.

**Tabella 4-17 Riassunto delle caratteristiche medie dell'effluente al variare della percentuale di refluo reale nell'alimento**

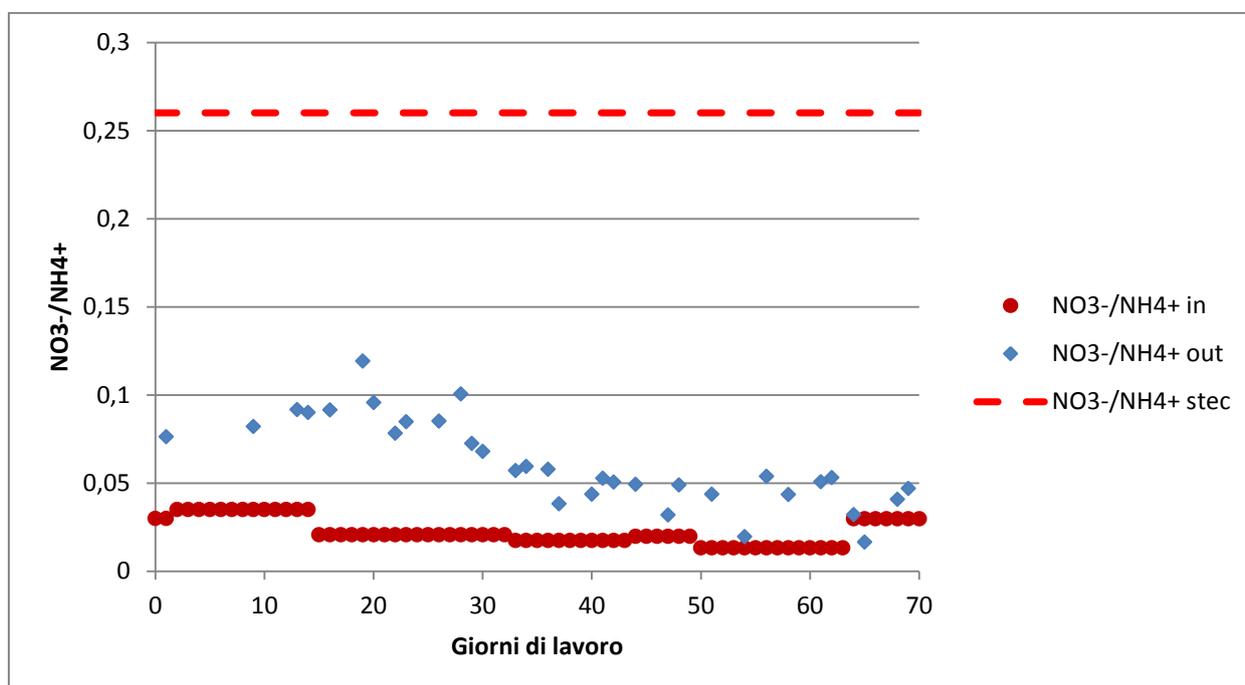
Refluo reale	$\text{NH}_4^+$ out (mgN/L)	$\text{NO}_2^-$ out (mgN/L)	$\text{NO}_3^-$ out (mgN/L)	NRR/NLR par	NRR/NLR tot
0,00%	13,1	3,8	71,0	98,3%	94,2%
10,00%	1,1	7,6	122,6	100,1%	95,7%
25,00%	2,3	6,3	92,3	99,9%	96,5%
33,00%	0,5	1,3	72,2	100,0%	97,4%
50,00%	0,6	0,7	80,3	100,0%	97,6%

#### 4.3.1.2 Andamento dei rapporti molari $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Nei *grafici 4-29* e *4-30* sono mostrati i valori dei rapporti molari di rimozione  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  e confrontati con quelli stechiometrici introdotti da Strous et al. (1998) che sono rispettivamente pari a 1,32 e 0,26.



**Grafico 4-29** Confronto tra i rapporti molari  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  ottenuti sperimentalmente e quelli stechiometrici



**Grafico 4-30** Confronto tra i rapporti molari  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  ottenuti sperimentalmente e quelli stechiometrici

Nel *grafico 4-29* si nota che, per i primi giorni, i rapporti molari riferiti ai consumi di ammonio e nitrito si discostano leggermente dai rapporti relativi all'influente e questo ha comportato la necessità di correggere il rapporto in ingresso a seconda dei risultati ottenuti durante la conduzione della sperimentazione al fine di evitare accumuli di nutrienti nel mixed liquor. A partire dal giorno 29 il rapporto è stato fissato al valore di 1,1 e questo ha portato a ottenere rapporti molari riferiti all'influente e al consumo di nutrienti sostanzialmente identici tra loro. In ogni caso va sottolineato il fatto che i rapporti hanno sempre assunto valori sottostechiometrici. Le cause di questo adeguamento del consumo di nutrienti con i rapporti molari relativi all'influente non sono del tutto chiare. L'unica possibile spiegazione a questo fenomeno sarebbe l'aumento dell'attività AOB, tuttavia, a causa della conformazione del reattore, è molto molto difficile spiegare l'ingresso di ossigeno all'interno del fermentatore.

Per quanto riguarda il *grafico 4-30* si può notare che anche in questi caso i rapporti sperimentali sono notevolmente inferiori a quelli stechiometrici. I rapporti relativi al consumo di nitrato e ammonio presentano un andamento decrescente nel tempo fino a raggiungere valori simili a quelli relativi all'influente durante gli ultimi 6 giorni. Un netto calo dei rapporti si registra dal giorno 29 in poi, evento che avviene in concomitanza con il calo del rateo di produzione degli ioni nitrato visibile anche in *grafico 4-27*. Questo episodio è attribuibile all'aumento dell'attività denitrificante che si ottiene con l'incremento della quantità di carbonio organico presente nell'alimento.

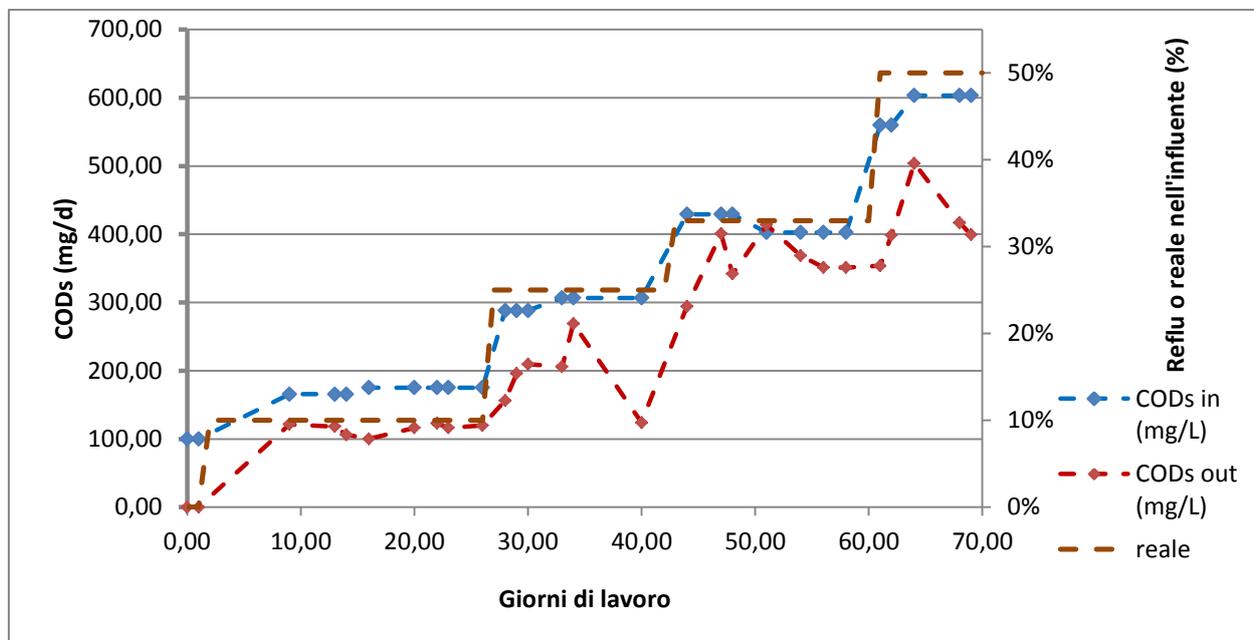
Valori di questi rapporti inferiori allo stechiometrico indicano un maggior consumo di ioni ammonio rispetto a quello che ci si attenderebbe dal processo anammox e questo fatto, così come riscontrato anche per le prove manometriche (*paragrafo 4.2.1.1*), è presumibilmente dovuto alla presenza di biomassa AOB nel sistema concomitante alla presenza, seppur minima, di ossigeno.

#### **4.3.1.3 Andamento delle concentrazioni di COD solubile**

Il COD (domanda chimica di ossigeno) è utilizzato come indice per individuare la quantità di sostanze disciolte ossidabili chimicamente presenti in un campione; le analisi sono state eseguite sia sull'influente sia sull'effluente e ne è stato monitorato l'andamento. L'importanza del controllo di questo indicatore risiede nella verifica che si ottiene sulla

qualità del processo; valori di COD<sub>s</sub> in uscita stazionari e inferiori a quelli in ingresso indicano un buon funzionamento complessivo del sistema, viceversa aumenti importanti di COD<sub>s</sub> nel breve periodo indicano il possibile malfunzionamento del sistema con possibili accumuli di sostanze disciolte o peggio la morte e la successiva idrolisi di una porzione della biomassa. È stato anche dimostrato (Sabumon et al., 2007) che elevati contenuti di materiale organico inducono effetti negativi sulla crescita della biomassa anammox che non è in grado di sostenere la competizione con la biomassa eterotrofa denitrificante.

I risultati, in funzione del tempo e della percentuale di refluo reale nell'alimento, sono riportati in *grafico 4-31*. Va segnalato che le concentrazioni di COD<sub>s</sub> sono state misurate al netto del contenuto di ioni nitrito al fine di evitare interferenze sulla misura (*paragrafo 3.2*).



**Grafico 4-31 Andamento delle concentrazioni di COD solubile in ingresso e uscita dal reattore sbr in funzione della percentuale dei refluo reale contenuta nell'influente**

Si nota subito come l'andamento delle concentrazioni di COD solubile in ingresso al sistema seguano l'andamento del contenuto di refluo reale nell'influente passando dai 100 mgCOD<sub>s</sub>/L dei primi giorni di sperimentazione ai 603 mgCOD<sub>s</sub>/L della fine, e questo è dovuto all'elevato contenuto di COD nel refluo reale rispetto a quello sintetico.

Per quanto riguarda le concentrazioni nell'effluente, si nota anche in questo caso un andamento qualitativamente simile a quello della percentuale di refluo reale nell'alimento

assumendo però valori inferiori a quelli del COD solubile in ingresso. Il valore massimo è stato di 503 mgCOD<sub>s</sub>/L al giorno 64.

La rimozione di COD<sub>s</sub> è variata dal valore massimo di 182 mgCOD<sub>s</sub>/L\*d (59,6% sull'ingresso) registrata il giorno 40 al valore minimo di 28,59 mgCOD<sub>s</sub>/L\*d (6,7% sull'ingresso) registrata il giorno 47. La rimozione media di COD<sub>s</sub> espressa come percentuale rispetto all'ingresso è stata del 29±12%.

Non sono stati riscontrati episodi che hanno previsto importanti aumenti delle concentrazioni di COD<sub>s</sub> fino a valori superiori a quelli dell'influente.

### **4.3.2 Monitoraggio dell'attività anammox**

Come già accennato al *paragrafo 3.5.4.2*, la conduzione di periodiche prove di attività ha permesso di calcolare il massimo rateo di rimozione dell'azoto NRR<sub>max</sub> da parte della biomassa anammox.

In *tabella 4-18* insieme ai NRR<sub>max</sub> sono riportati i valori dei coefficienti R<sup>2</sup> e degli errori standard (SE in tabella) calcolati per le rette di regressione ottenute dai dati delle prove di attività, e i valori dei rapporti NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

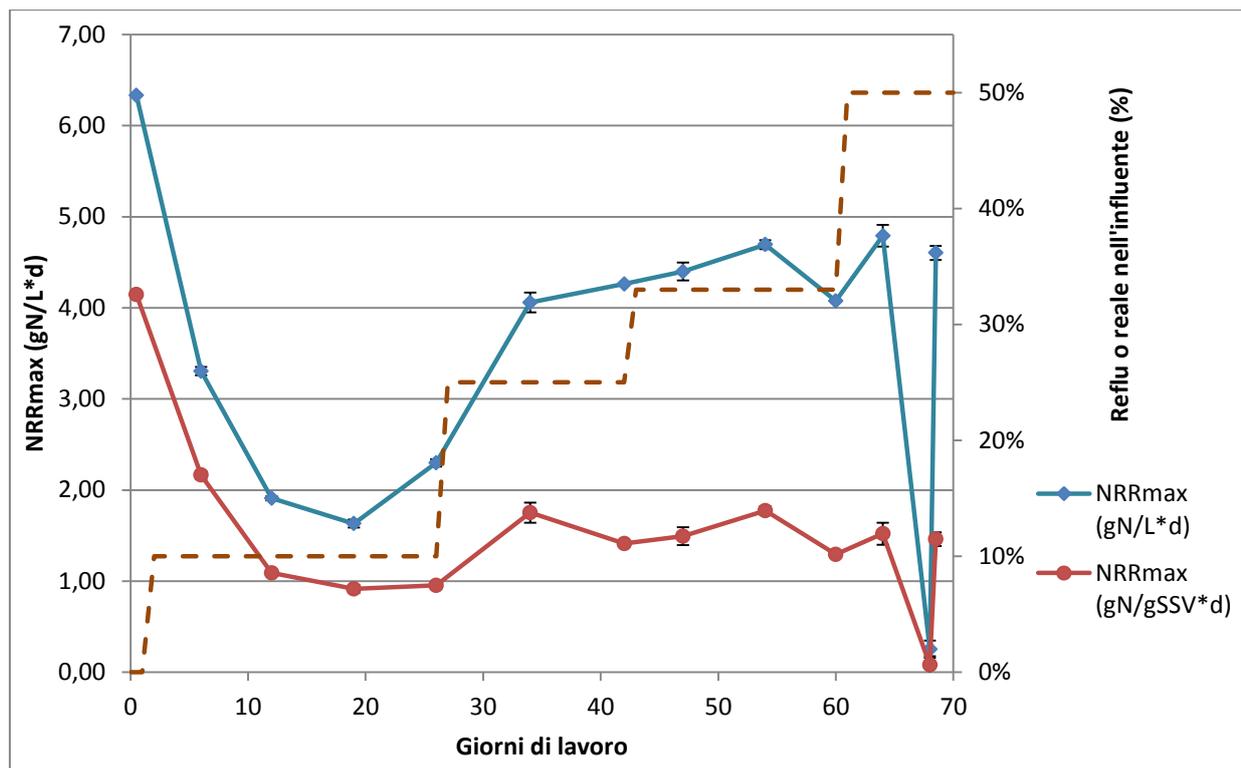
**Tabella 4-18 Parametri ricavati dalla conduzione delle prove di attività**

<b>Giorno</b>	<b>NRR<sub>max</sub> (gN/L*d)</b>	<b>NRR<sub>max</sub> (gN/gSSV*d)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>SE</b>	<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>
<b>0</b>	6,33	4,15	100,0%	-	1,22
<b>6</b>	3,16	2,16	100,0%	0,05	1,43
<b>12</b>	1,91	1,09	100,0%	0,02	1,20
<b>19</b>	1,63	0,91	99,8%	0,04	1,27
<b>26</b>	2,29	0,95	99,9%	0,04	1,33
<b>34</b>	4,02	1,75	99,9%	0,11	1,34
<b>42</b>	4,15	1,41	100,0%	-	1,38
<b>47</b>	4,40	1,49	99,9%	0,10	1,32
<b>54</b>	4,69	1,77	100,0%	0,05	1,31
<b>60</b>	4,08	1,29	100,0%	0,01	1,30
<b>64</b>	4,73	1,52	99,9%	0,12	1,35
<b>68 - 1</b>	0,21	0,08	77,1%	0,10	1,80
<b>68 - 2</b>	4,60	1,46	99,9%	0,08	1,04

Non considerando quanto successo durante la prima prova di attività svolta il giorno 68, si può dire che tutti i risultati delle prove condotte sono più che affidabili in quanto presentano valori del coefficiente R<sup>2</sup> molto elevati e vicini all'unità ed errori standard molto contenuti.

I valori dei rapporti molarì NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sono vicini a quello stechiometrico pari a 1,32 e sono superiori ad esso solo in 5 occasioni, segno di un'attività denitrificante eterotrofa ridotta ma non assente; la presenza di una piccola quantità di biomassa eterotrofa denitrificante non può essere esclusa in quanto, come è possibile apprezzare dal *grafico 4-27*, la concentrazione di ioni nitrato è diminuita progressivamente con l'aumentare della percentuale di refluo reale nell'influente.

Nel *grafico 4-32* sono riportati i valori del massimo rateo di rimozione, calcolati sia per unità di volume sia per unità di solidi sospesi volatili, messi a confronto con la percentuale di refluo reale nell'influente.



**Grafico 4-32 Andamenti dei valori di  $NRR_{max}$  in funzione della percentuale di refluo reale nell'influente**

Nel primo giorno di lavoro, caricando il reattore con solo refluo sintetico, il valore di  $NRR_{max}$  è il più elevato registrato ed è pari a 6,33 gN/L\*d. Dal giorno 3 in poi, l'influente è stato preparato con il 10% di refluo reale e questo ha provocato un significativo calo dell'attività che ha raggiunto il valore minimo di 1,63 gN/L\*d al giorno 19. Questo fatto è causato dall'acclimatazione della biomassa al digestato suinicolo con cui sono alimentati e che è intrinsecamente diverso dal refluo civile con il quale la biomassa era stata coltivata prima dell'inoculo nel reattore SBR. Nei giorni successivi, si nota un importante aumento dei valori di  $NRR_{max}$  fino al giorno 34 in cui si raggiungono i 4,02 gN/L\*d. In particolare, si nota come dopo il passaggio al 25% di refluo reale nell'influente l'attività abbia un brusco aumento passando a un valore quasi doppio rispetto alla prova precedente; questo può essere interpretato come un effetto benefico dato dalla presenza di una frazione di refluo reale presente nell'alimento che contiene numerosi micro e macro nutrienti grazie ai quali la crescita e l'attività anammox è favorita. Questo effetto si può notare dopo che la biomassa si è acclimatata con questo tipo di refluo, motivo per cui nelle prove manometriche in batch, dopo la sostituzione di refluo reale, l'andamento di attività è generalmente decrescente nel

tempo. Dal giorno 34 in poi, i valori di  $NRR_{max}$  mantengono un andamento stabile e l'incremento della percentuale di refluo reale fino al 50% non sembra nuocere al processo.

È importante segnalare l'episodio verificatosi il giorno 68 in cui l'attività è crollata al valore di  $0,21 \text{ gN/L}\cdot\text{d}$ . Dopo aver mantenuto per alcune ore la biomassa in costante miscelazione ma senza alimentazione, è stata ripetuta la prova di attività e il risultato è stato in linea con quelli dei giorni precedenti; è stato quindi concluso che si è verificata una temporanea e reversibile inibizione della biomassa, causata quasi certamente dall'ingresso indesiderato di una piccola quantità di ossigeno nel sistema.

Si può notare anche come l'andamento del rateo di rimozione massimo dell'azoto specifico sia qualitativamente analogo a quello riferito all'unità di volume. Dal giorno 34 in poi, l'attività specifica ha mantenuto un andamento piuttosto stabile con un valore medio, escludendo quello del giorno 58, pari a circa  $1,52 \text{ gN/gSSV}\cdot\text{d}$ . Va fatto notare che c'è la possibilità che i valori dei ratei di rimozione massimi dell'azoto specifici possono essere stati sovrastimati a causa delle difficoltà nell'esecuzione di un prelievo omogeneo di solidi dal mixed liquor che può aver provocato una sottostima del contenuto di solidi sospesi volatili.

Sono riportati infine, nella *tabella 4-19*, i rapporti  $NLR/NRR_{max}$ . I valori sono stati bassi, specialmente dal giorno 34 in poi in cui i valori non hanno superato il 12,7%, conferma del fatto che il carico di azoto fornito alla biomassa è stato di molto inferiore alla loro potenzialità. Si nota che per la prima prova del giorno 68 il rapporto è stato del 214,5% a causa dell'inibizione della biomassa; precauzionalmente è stato deciso di sospendere l'alimento fino al ripristino dell'attività.

**Tabella 4-19 Valori dei rapporti  $NLR/NRR_{max}$  ottenuti dalle prove di attività**

<b>Giorno</b>	<b><math>NLR/NRR_{max}</math></b>
<b>0</b>	5,5%
<b>6</b>	24,0%
<b>12</b>	33,4%
<b>19</b>	32,1%
<b>26</b>	22,8%
<b>34</b>	12,6%
<b>42</b>	12,5%
<b>47</b>	12,0%
<b>54</b>	11,3%
<b>60</b>	12,7%
<b>64</b>	11,3%
<b>68</b>	214,5%
<b>68</b>	11,7%

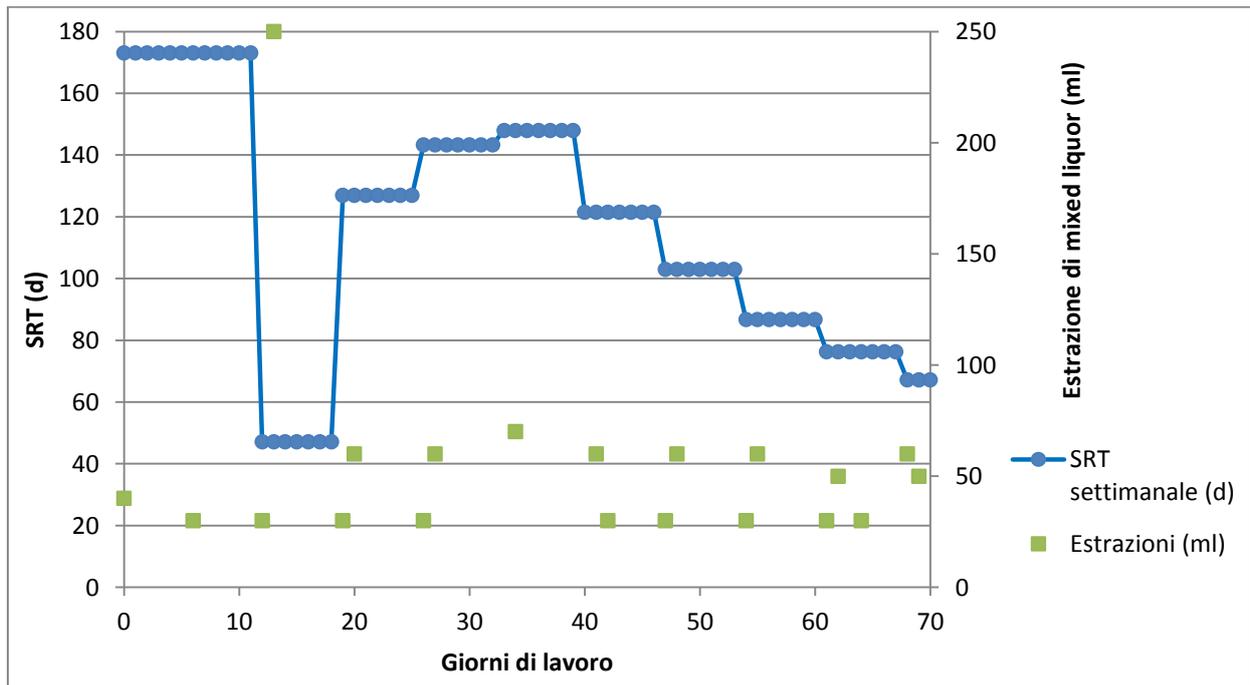
### 4.3.3 Monitoraggio dei parametri operativi d'interesse

#### 4.3.3.1 SRT e solidi sospesi totali e volatili

Il monitoraggio periodico delle concentrazioni dei solidi sospesi totali e volatili presenti nel mixed liquor e nell'effluente ha permesso il calcolo dell'attività specifica della biomassa (*paragrafo 4.3.2*) e del tempo di ritenzione dei fanghi.

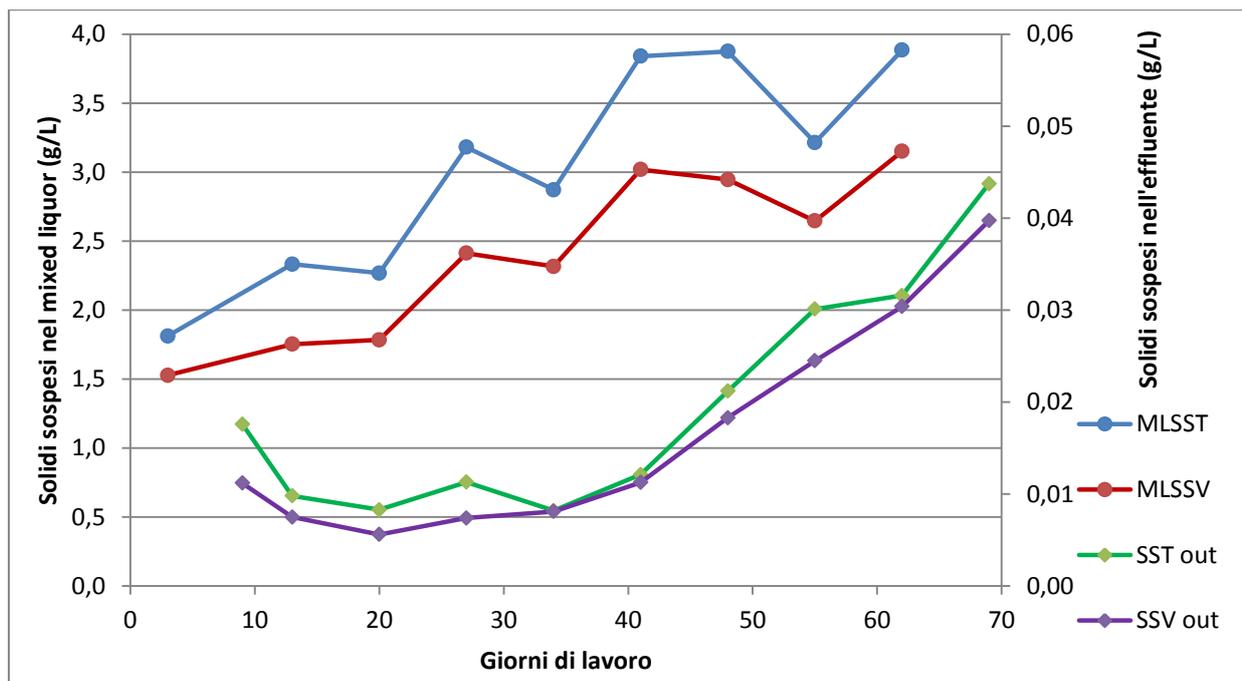
Nel *grafico 4-33* sono riportati i valori di SRT calcolati come media settimanale e le entità delle estrazioni di mixed liquor dal fermentatore.

I valori di SRT hanno avuto un andamento crescente dalla seconda settimana (47d) alla quinta settimana in cui ha raggiunto il massimo registrato (148d) per poi assumere un andamento decrescente sino alla fine della sperimentazione. Il calo del SRT si spiega con l'intensificazione della conduzione delle prove di attività che comportano importanti estrazioni di biomassa.



**Grafico 4-33** Andamento dei valori di SRT calcolati settimanalmente e delle estrazioni di biomassa

Gli andamenti delle concentrazioni di SST e SSV sono invece riportate nel *grafico 4-34*.



**Grafico 4-34 concentrazioni dei solidi sospesi nel mixed liquor (sbr) e nell'effluente (out)**

È visibile come concentrazioni di solidi sospesi siano aumentate costantemente nel tempo dal valore di 1,53 gSSV/L misurato dopo 2 giorni al valore di 3,02 gSSV/L al giorno 41 per poi mantenersi abbastanza costanti durante l'ultimo mese intorno al valore di 3 gSSV/L.

Per quanto riguarda i solidi sospesi in uscita si nota un costante aumento delle concentrazioni dal giorno 20 (6 mgSSV/L) al giorno 69 (40 mgSSV/L) e ciò è dovuto all'aumento della percentuale di refluo reale nell'influyente che ha causato un aumento dei solidi colloidali in ingresso al sistema. Ciò nonostante le concentrazioni di solidi sospesi volatili nell'effluente sono molto basse se paragonate a quelle del mixed liquor, indice di una buona sedimentabilità del fango.

#### **4.3.3.2 Analisi granulometrica della biomassa**

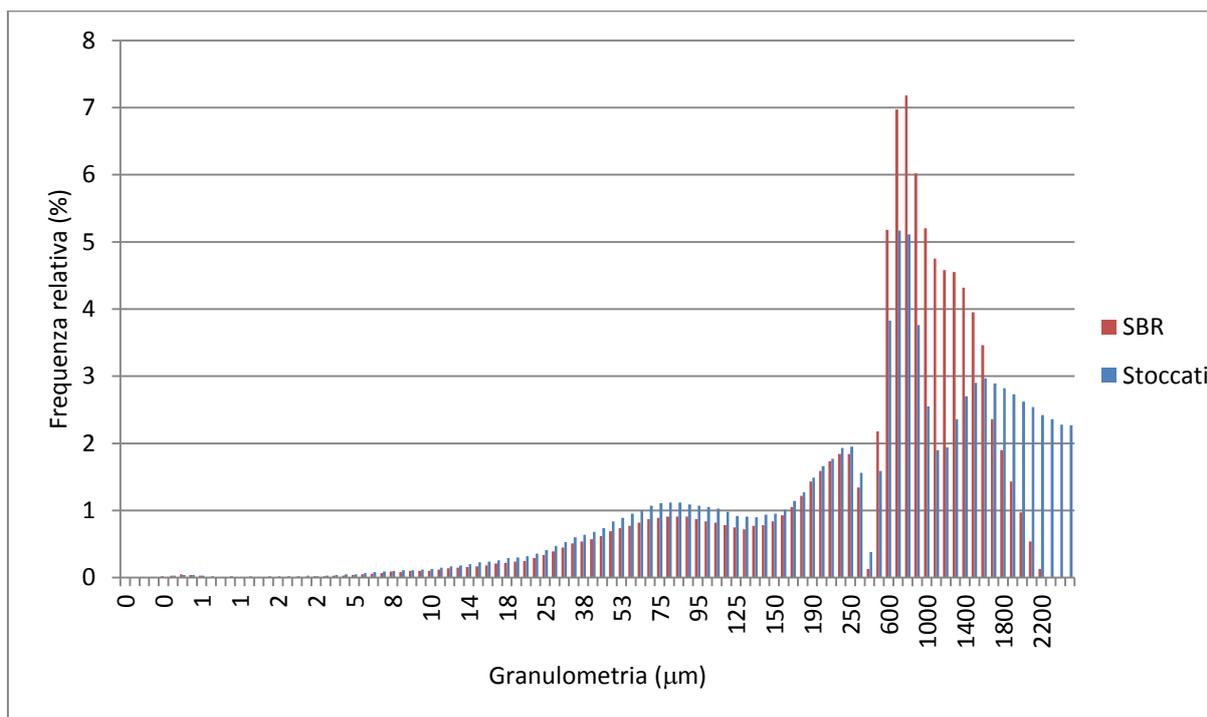
Questa analisi è stata eseguita soltanto una volta nel corso della sperimentazione e ha fornito la granulometria della biomassa dopo 13 giorni dall'inoculo e di quella stoccata.

Questa analisi ha permesso un confronto tra la granulometria della biomassa stoccata e quella della biomassa inoculata.

I risultati del confronto sono visibili nella *tabella 4-20* e nel *grafico 4-35*.

**Tabella 4-20 Tabella riassuntiva del confronto tra la granulometria della biomassa inoculata e quella stoccata**

Caratteristica	Anammox Stoccati	Anammox SBR	Unità
10° percentile	50,8	71,0	μm
50° percentile	616,0	676,2	μm
90° percentile	1766,0	1376,7	μm



**Grafico 4-35 Istogramma delle frequenze relative al variare relative alla granulometria della biomassa anammox inoculata e stoccata**

Si nota che dagli 0 ai 600 μm la granulometria dei due campioni è molto simile con i valori dei percentili 10 e 50 simili tra loro e con le frequenze relative delle classi pari a 0 per diametri dei granuli inferiori agli 8 μm.

Per granulometrie superiori ai 600 μm le distribuzioni differiscono tra loro; gli anammox contenuti nel reattore presentano frequenze relative molto alte per le classi fino a 1600 μm e frequenze piuttosto basse fino a 2200 μm, viceversa la biomassa stoccata presenta frequenze abbastanza regolari per le classi fino a 2500 μm. La differenza tra i due campioni per le elevate granulometrie può essere attribuita all'effetto dell'agitazione meccanica all'interno del fermentatore che causa la disgregazione dei granuli di grosse dimensioni, oppure alla difficoltà incontrata nell'esecuzione di un campionamento rappresentativo di

biomassa dalle taniche di stoccaggio al momento dell'inoculo a causa dell'elevata sedimentabilità dei granuli.

#### 4.3.4 Confronto con i risultati di letteratura

In questo paragrafo è proposto un confronto tra i risultati ottenuti sperimentalmente e i principali studi presenti in letteratura. In *tabella 4-21* è riportato il confronto con 4 diversi studi e con i risultati ottenuti nella precedente sperimentazione (Rizzardini 2012).

**Tabella 4-21 Confronto tra il presente studio e i principali studi in letteratura**

Caratteristica	Hwang et al. (2005)	Ahn et al. (2004)	Qiao et al. (2009)	Yamamoto et al. (2008)	Rizzardini (2012)	Presente studio (2012)
Reattore	UASB	UASB	Granulare miscelato	UASB	SBR	SBR
Volume (L)	1	0,5	0,73	2,85	6	3
Tempertura (°C)	35	35	30	35	36 - 38	35
HRT (d)	2,5	5	0,2	0,5	2,47±0,51	2
Refluo reale (%)	40	50	50	25	10 - 70	0 - 50
NH4+ in (mgN/L)	213±32	2150±170	213±94	76±4	655±15	510±51
NO2- in (mgN/L)	323±34	1800	212±94	111±4	744±15	583±72
NLR (gN/L*d)	1,36	1,02	4,1	0,39	0,57±11	0,55±0,09
NRR (gN/L*d)	0,72	0,66	3,12	0,22	0,49±15	0,51±0,07

Come si può notare le condizioni operative mantenute negli altri studi sono molto differenti rispetto al presente studio. Escludendo la precedente sperimentazione, sono utilizzati in 3 studi su 4 dei reattori UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket). I tempi di ritenzione idraulica sono piuttosto bassi al fine di escludere potenziali rischi di inibizione dovuti ad accumuli di sostanze organiche lentamente degradabili, fatta eccezione per Ahn et. Al (2004).

Le concentrazioni dei nutrienti in ingresso, eccetto per Ahn et al. (2004), sono inferiori rispetto a quelle adottate in questo lavoro, tuttavia, in questo studio, è stato scelto di lavorare con le concentrazioni mostrate in *tabella 4-21* per rispecchiare le condizioni attese

in un impianto a scala reale. Per lo stesso motivo sono stati mantenuti valori di NLR contenuti rispetto agli altri studi.

Si nota infine che i valori di NRR non sono molto elevati se paragonati ai valori di NLR, salvo per il presente studio e per la precedente sperimentazione.

## 5. Conclusioni

In generale, lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare l'applicabilità del processo biologico anammox per la rimozione dell'azoto da reflui di natura zootecnica al fine di raggiungere la conformità con la Direttiva Europea sui nitrati (91/676/CEE). La tesi è stata svolta nell'ambito del progetto BRAIN avviato nel 2010 con lo scopo di identificare e sviluppare processi sostenibili ed economicamente vantaggiosi da applicare al trattamento di digestati di reflui agro-zootecnici. All'interno del progetto è considerato il processo biologico anammox studiato nella configurazione bifase, ovvero con una fase di nitrificazione parziale PARNIT seguita dalla fase anammox.

Lo svolgimento della tesi ha previsto, in particolare, la gestione di un reattore SBR a scala pilota PARNIT, situato presso l'azienda agricola Corte Grande SRL a Casaleto di Sopra (CR), lo studio del processo anammox e la gestione di un reattore SBR a scala di laboratorio anammox situato presso i laboratori della sezione ambientale del DIIAR.

### Processo PARNIT

La gestione del reattore di nitrificazione parziale ha permesso di ottenere importanti conferme sul processo PARNIT.

La coltivazione della biomassa AOB si è rivelata relativamente semplice ed efficace: in seguito a un periodo iniziale di 20 giorni, durante i quali è stata eseguita la conversione del processo da DENO2 a PARNIT, l'attività della biomassa AOB ha mostrato un andamento nel complesso crescente raggiungendo, a fine sperimentazione, il valore di  $36 \text{ mgNH}_4^+ \text{ ossidati/L} \cdot \text{h}$ . È stato registrato soltanto un episodio critico al giorno 70, quando l'attività ha subito un calo significativo per cause sconosciute.

L'inibizione della biomassa NOB, dimostrata dalle basse concentrazioni di nitrato in uscita  $13 \pm 8,5 \text{ mgN/L}$ , è stata facilmente ottenuta mantenendo una concentrazione di ossigeno disciolto compresa tra 0,5 e 1  $\text{mgO}_2/\text{L}$ . Altre pressioni selettive sono costituite dalla elevata concentrazione di ammoniaca libera ad inizio ciclo e di acido nitroso alla fine della fase aerobica.

È possibile affermare, in generale, che le caratteristiche dell'effluente del reattore PARNIT sono assolutamente compatibili con quelle richieste per l'alimentazione del reattore anammox.

In questo senso la correzione dell'alcalinità dell'influente si è dimostrato un valido strumento di controllo del processo. I rapporti molarari  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  nell'effluente sono stati abbastanza costanti nel tempo con valori mediamente di  $1,18 \pm 0,19$ . Le concentrazioni di COD solubile medie sono state di  $1029 \pm 251$  mgCOD<sub>s</sub>/L, valori relativamente contenuti e tali da non favorire un'eccessiva crescita di biomassa eterotrofa denitrificante e la conseguente competizione con la biomassa anammox.

L'unica criticità riscontrata ha riguardato il controllo della concentrazione di biomassa all'interno del reattore: la formazione di pannelli di biomassa sulle pareti interne del reattore ha reso difficoltosa la stima del contenuto di solidi e, di conseguenza, il controllo del SRT. Questo fatto non ha tuttavia portato a significativi problemi ed è presumibile che possa essere risolto adottando una diversa configurazione della vasca di aerazione o un diverso tipo di miscelazione.

Nel complesso è quindi possibile affermare che il processo PARNIT si è dimostrato ben applicabile al trattamento del refluo preso in esame, con uno start-up relativamente semplice e rapido e con la produzione di un effluente con caratteristiche adeguate per il successivo trattamento anammox, e che non presenta importanti criticità.

### **Processo anammox**

La sperimentazione condotta sia attraverso le prove manometriche, sia attraverso la gestione del reattore SBR, ha permesso di ricavare importanti informazioni sul processo anammox.

Le prove manometriche sono state un potente strumento di monitoraggio dell'attività batterica permettendo di stimarne l'entità senza interferire con il funzionamento del reattore. Particolarmente importanti sono state le prime 4 prove eseguite sulla biomassa stoccata, in quanto hanno permesso di verificare che l'attività specifica è scesa circa del 75%

rispetto a quella rilevata durante la precedente sperimentazione e che sarebbe stato necessario sostituire la vecchia biomassa.

Altrettanto importanti sono state le prove condotte sulla nuova biomassa. La sostituzione con refluo reale ha evidenziato un'influenza della presenza del refluo stesso sull'attività batterica che ha subito un calo di attività specifica, rispetto al bianco, del 16% e del 53% per percentuali di refluo reale rispettivamente del 25% e del 50% dopo 5 giorni dalla sostituzione.

Le prove d'inibizione hanno confermato che le elevate concentrazioni di ioni nitrito inducono l'inibizione della biomassa che è più severa per tempi di esposizione più alti tra la biomassa stessa e le alte concentrazioni di nitrito. Il lavaggio è risultato essere il metodo più efficace per il recupero dell'attività in quanto consente un recupero totale in tempi brevi, tuttavia la difficoltà di applicazione di tale metodo ad un impianto a più ampia scala è difficoltosa ed è necessario lo studio di altri metodi quali il dosaggio di acetato di sodio che si è dimostrata un'interessante alternativa. In generale va comunque sottolineato che in seguito ad inibizione delle biomassa, qualunque sia il metodo utilizzato, è necessario intervenire tempestivamente poiché il ripristino dell'attività batterica risulta essere tanto più rapido e completo quanto è minore il tempo di contatto tra la biomassa e le alte concentrazioni di nitrito.

Per quanto riguarda il reattore SBR si può affermare che la coltivazione della biomassa ha richiesto tempi relativamente lunghi, con un periodo di acclimatazione iniziale di 26 giorni e la necessità di aumentare la percentuale di refluo reale nell'influente gradualmente al fine di non stressare la biomassa; nel complesso sono stati necessari 60 giorni di lavoro per poter raggiungere le condizioni adeguate per alimentare il 50% di refluo reale nell'influente.

L'effluente del reattore ha sempre presentato ottime caratteristiche con concentrazioni medie di ammonio, nitrito e nitrato rispettivamente di  $1,6 \pm 3$  mgN/L,  $5 \pm 8,9$  mgN/L e  $88,4 \pm 32$  mgN/L. Le percentuali di azoto totale rimosso sono sempre state molto elevate, mediamente del  $96,4 \pm 1,1\%$ , dimostrando un'elevata efficienza complessiva del processo. Sono anche state riscontrate sensibili rimozioni di COD solubile con concentrazioni nell'effluente e rimozioni medie pari a  $242,5 \pm 129,2$  mgCOD<sub>s</sub>/L e  $29 \pm 12\%$ .

L'attività specifica anammox, escludendo i primi 26 giorni di acclimatazione, ha mantenuto un andamento stabile nel tempo e compreso tra  $1,3$  gN<sub>rimosso</sub>/gSSV\*d e  $1,8$  gN<sub>rimosso</sub>/gSSV\*d,

senza risentire negativamente dell'aumento di refluo reale nell'influente ma traendone beneficio; in particolare, il passaggio dal 10% al 25% di refluo reale nell'alimento ha portato ad un aumento di attività pari a circa il 44%.

Oltre ai lunghi tempi di avvio la grande criticità del processo è data dal rischio di incorrere in inibizione della biomassa che può essere dovuta alla presenza di ossigeno disciolto, a delle punte di concentrazioni di ioni nitrito nell'influente o alla presenza di sostanze inibenti quali antibiotici, farmaci o microinquinanti organici e inorganici contenuti nel refluo reale. Sarebbe quindi importante che le caratteristiche del refluo reale siano mantenute stabili nel tempo, tuttavia ciò non è possibile vista la natura del refluo trattato in quanto la composizione del digestato varia stagionalmente.

### **Considerazioni globali e prospettive future**

Considerando i risultati ottenuti in merito alle buone caratteristiche della qualità degli effluenti e le elevate efficienze di rimozione dell'azoto, la combinazione dei processi PARNIT e anammox per il trattamento di digestati di reflui agro-zootecnici risulta essere molto promettente per applicazioni su più larga scala. Questi processi rappresentano una valida alternativa ai trattamenti tradizionali di rimozione dell'azoto soprattutto per i minori costi gestionali derivanti dal ridotto consumo di ossigeno e di reagenti. A ciò si contrappongono le difficoltà dovute all'attuale mancanza di conoscenza in campo impiantistico a causa dell'assenza d'impianti a scala reale operanti su questa tipologia di reflui, è quindi necessaria la conduzione di sperimentazioni a lungo termine su più ampia scala. La grande sfida per l'implementazione dei processi a scala reale è data dalla produzione di un refluo con caratteristiche il più costanti possibile nel tempo con il processo PARNIT e il suo diretto utilizzo, senza dover correggere le concentrazioni delle forme azotate e i rapporti molarari  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ , come influente per il processo anammox.

È altresì necessario condurre ulteriori studi per identificare i composti che sono causa dell'inibizione batterica e delle possibili soluzioni a questo problema, quali pretrattamenti o interventi applicabili in risposta all'avvenuta inibizione; in questo senso la conduzione delle prove d'inibizione ha suggerito spunti per possibili sperimentazioni future. In particolare, sarebbe interessante eseguire studi più approfonditi e su più ampia scala per confrontare

l'applicazione dei diversi metodi proposti per il recupero dell'attività in seguito ad inibizione e per verificare l'effettiva applicabilità del metodo che prevede il dosaggio di acetato di sodio, che appare promettente.

Infine, la conduzione di uno studio LCA completo su entrambi i processi costituirebbe una preziosa fonte di informazioni, evidenziando i punti di forza e le criticità dei processi e permettendone quindi un perfezionamento.



## 6. Riferimenti

- 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.
- Arrojo B., Mosquera-Corral A., Campos J.L., Méndez R.. Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR). *Journal of Biotechnology* 123 (2006) 453–463.
- Arrojo B., Figueroa M., Mosquera-Corral A., Campos J.L., Méndez R.. Influence of gas flow-induced shear stress on the operation of the Anammox process in a SBR. *Chemosphere*, Volume 72, Issue 11, August 2008, Pages 1687–1693.
- Baker S.C., Saunders N.F., Willis A.C., Ferguson S.J., Hajdu J. and Fülöp V. (1997). Cytochrome cd1 structure: unusual haem environments in a nitrite reductase and analysis of factors contributing to beta-propeller folds. *J Mol Biol* 269:440–455.
- Bonomo L. (2008). Trattamenti delle acque reflue. McGrawhill, ISBN 978-88-386-6518-9
- Burton C.H. (2007). The potential contribution of separation technologies to the management of livestock manure. *Livestock Science* 112 (2007) 208–216.
- Caffaz S., Lubello C., Canziani R., Santianni D., Autotrophic nitrogen removal from anaerobic supernatant of Florence's WWTP digesters. *Water science and technology*, 2006, vol. 53, no12, pp. 129-137
- Chamchoi N., Nitorisavut S., Schmidt J.E.. Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) and denitrification. *Bioresource Technology* 99 (2008) 3331–3336.
- Crites R., Tchobanoglous G.. *Small and Decentralized Wastewater Treatment Systems*. 1998, McGraw-Hill, San Francisco.
- Dalsgaard T., Thamdrup B.. Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. *Applied & Environmental Microbiology* 68 (2002) 3802–3808.
- Dapena-Mora A., Campos J.L., Mosquera-Corral A. and Méndez R.. Anammox process for nitrogen removal from anaerobically digested fish canning effluents. *Water science and Technology* Vol 53 No 12 pp 265–274 Q IWA Publishing 2006.
- Dapena-Mora A., Fernandez I., Campos J.L., Mosquera-Corral A., Mendez R., Jetten M.S.M.. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007) 859–865.
- Dawson R.N., Murphy K.L.. The temperature dependency of biological denitrification. Department of Chemical Engineering, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada.
- De Clippeleir H., Yan X., Verstraete W. and Vlaeminck S.E.. OLAND is feasible to treat sewage-like nitrogen concentrations at low hydraulic residence times. *Applied Microbiology and Biotechnology* Volume 90, Number 4 (2011), 1537-1545.
- De Sanctis G.. Sviluppo di tecnologie innovative per la rimozione dell'azoto da reflui zootecnici tramite microorganismi anammox. Tesi di laurea (2012)
- 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.
- Eilersen A.M., Henze M., Klotz L., Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge, *Water Research* 28 (1994) 1329–1336.

- Fuerst J.A.. (1995). The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology* 141:1493–1506.
- Fux C., Marchesi V., Brunner I., Siegrist H.. Anaerobic ammonium oxidation of ammonium-rich waste streams in fixed-bed reactors, *Water Science & Technology* 49 (11–12) (2004) 77–82.
- Gong Z., Yang F., Liu S., Bao H., Hu S., Furukawa K.. Feasibility of a membrane-aerated biofilm reactor to achieve single-stage autotrophic nitrogen removal based on Anammox. *Chemosphere* 69 (2007) 776–784.
- Groeneweg J., Sellner B., Tappe W.. Ammonia oxidation in nitrosomonas at NH<sub>3</sub> concentrations near km: Effects of pH and temperature. *Water Research* Volume 28, Issue 12, December 1994, Pages 2561–2566.
- Güven D., Dapena A., Kartal M.B., Schmid M.C., Maas B., van de Pas-Schoonen K., Sözen S., Mendez R., Op den Camp H.J.M., Jetten M.S.M., Strous M., Schmidt I.(2005). Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria, *Applied & Environmental Microbiology* 71:1066–1071.
- Harhangia H.R., Mathilde Le Roya, Theo van Alena, Bao-lan Huab, Joost Groena, Boran Kartal, Susannah G. Tringec, Zhe-Xue Quand, Mike S. M. Jettena and Huub J. M. Op den Camp. Hydrazine Synthase, a Unique Phylomarker with Which To Study the Presence and Biodiversity of Anammox Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* (2011).
- Hisayoshi Terai and Takeshi Mori. Studies on phosphorylation coupled with denitrification and aerobic respiration in *Pseudomonas denitrificans*. *Journal of plant research*, Volume 88, Number 3 (1975), 231-244, DOI: 10.1007/BF02489309.
- Hooper A.B., Vannelli T., Bergmann D.J. and Arciero D.M.. (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:59–67.
- 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.
- Kampschreur M.J., Temmink H., Kleerebezem R., Jetten M., Van Loosdrecht M.C.M.. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research* 43 (2008) 4093–4103.
- Kartal B., Kuypers M.M.M., Lavik G., Schalk J., Op den Camp H.J.M., Jetten M.S.M. and Strous M. (2007a). Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ Microbiol* 9:635–642.
- Kartal B., Rattray J., van Niftrik L., van de Vossenberg J., Schmid M., Webb R.I., Schouten S., Fuerst J.A., Sinninghe Damsté J.S., Jetten M.S.M. and Strous M. (2007b). *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* gen. nov., sp. nov., a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 30 (1) 39–49.
- Kartal B., van Niftrik L., Rattray J., van de Vossenberg J., Schmid M.C., Damsté J.S.S., Jetten M.S.M. and Strous M. (2008). *Candidatus "Brocadia fulgida"*: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol Ecol* 63:46–55.
- Kartal B., Wouter J. Maalcke, Naomi M. de Almeida, Irina Cirpus, Jolein Gloerich, Wim Geerts, Huub J. M. Op den Camp, Harry R. Harhangia, Eva M. Janssen-Megens, Kees-Jan Francoijs, Hendrik G. Stunnenberg, Jan T. Keltjens, Mike S. M. Jetten & Marc Strous, Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* 479, 127–130 (03 November 2011).
- Kimura Y., Isaka K., Kazama F., Sumino T. (2010). Effects of nitrite inhibition on anaerobic ammonium oxidation. *Appl Microbiol Biot* 86:359–365

- König E., Schlesner H. and Hirsch P.. (1984). Cell wall studies on budding bacteria of the Planctomyces/Pasteuria group and on a Prosthecomicrobium sp.. *Arch Microbiol* 138:200–205.
- Kuai L., Verstraete W.. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification–denitrification system. *Applied & Environmental Microbiology* 64 (1998) 4500–4506.
- Kuenen J.G. (2008) Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature*, 6, 320-326.
- Kuypers M.M.M., Sliemers A.O., Lavik G., Schmid M., Jørgensen B.B., Kuenen J.G., Sinninghe Damsté J.S., Strous M. and Jetten M.S.M.. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422:608–611.
- 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. (1998) The anaerobic oxidation of ammonia. *FEMS Microbiol. Reviews* 22 (5), 421-437.
- Jetten M.S.M., Strous M., van de Pas-Schoonen K.T., Schalk J., van Dongen U.G.J.M., Van De Graaf A.A., Logemann S., Muyzer G., van Loosdrecht M.C.M., Kuenen J.G.. The anaerobic oxidation of ammonium, *FEMS Microbiology Reviews* 22 (1999) 421–437.
- Jetten M.S.M., Wagner M., Fuerst J., Van Loosdrecht M., Kuenen G., Strous M.. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('ANAMMOX') process, *Current Opinion in Biotechnology* 12 (2001) 283–288.
- Jetten M.S.M., Op den Camp H.J.M., Kuenen J.G. and Strous M.. (2009). Description of the family Brocadiales. In: Krieg N.R., Staley J.T., Hedlund B.P., Paster B.J., Ward N., Ludwig W. and Whitman W.B., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 4, Heidelberg, Germany: Springer (in press).
- Jetten Mike S.M., van Niftrik L., Strous M., Kartal B., Keltjens Jan T., and Huub J. M. Op den Camp. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2009; 44(2–3): 65–84.
- Lackner S., Terada A., Smets B.F.. Heterotrophic activity compromises autotrophic nitrogen removal in membrane-aerated biofilms: results of a modeling study. *Water Research* 42 (2008) 1102–1112.
- Li X.Z., Zhao Q.L., Hao X.D.. Ammonium removal from landfill leachate by chemical precipitation. *Waste Management* Volume 19, Issue 6, October 1999, Pages 409–415.
- 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.
- Liesack W., König H., Schlesner H. and Hirsch P.. (1986). Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the Pirella/Planctomyces group. *Arch Microbiol* 145:361–366.
- Lindsay M.R., Webb R.I., Strous M., Jetten M.S.M., Butler M.K.. Forde RJ and Fuerst JA. (2001). Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives of Microbiology* 175:413–429.
- Lotti T., van der Star W.R.L., Kleerebezem R., Lubello C., van Loosdrecht M.C.M.. The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Research* 46 (2012) 2559-2569.
- 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.

- 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.
- Metcalf & Eddy (2003) *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*, 4<sup>o</sup> Ed., revised by Tchobanoglous E., Burton F.L., Stensel H. D., Mc Graw Hill, ISBN 007-124140-X.
- Meyer R.L., Risgaard-Petersen N. and Allen D.E.. (2005). Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Appl Environ Microbiol* 71:6142–6149.
- Molinuevo B., Garcia M.C., Karakashev D., Angelidaki I.. Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: effect of organic matter content on process performance. *Bioresource Technology* 100 (2009) 2171–2175.
- Murray James W., Codispoti Loius A., Friederich Gernot E.. Oxidation-Reduction Environments, The Suboxic Zone in the Black Sea. *Aquatic Chemistry*, Chapter 7, pp 157–176.
- Pellicer-Nàcher C., Shengpeng Sun, Susanne Lackner, Akihiko Terada, Frank Schreiber, Qi Zhou, and Barth F. Smets. Sequential Aeration of Membrane-Aerated Biofilm Reactors for High-Rate Autotrophic Nitrogen Removal: Experimental Demonstration. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44 (19), pp 7628–7634.
- Qiao S., Yamamoto T., Misaka M., Isaka K., Sumino T., Bhatti Z. and Furukawa K.. High-rate nitrogen removal from livestock manure digester liquor by combined partial nitrification–anammox process. *Biodegradation* Volume 21, Number 1 (2010), 11-20
- Quan Z., Rhee S., Zuo J., Yang Y., Bae J., Park R., Lee S., Park Y.. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammonium oxidizing (anammox) reactor. *Environmental Microbiology* 10 (11) (2008) 3130–3139.
- Richards FA. (1965). Anoxic basins and fjords, pp. 611–643. In: Ripley JP and Skirrow G, eds. *Chemical Oceanography*, London and New York: Academic Press.
- Rizzardini D.. Processo biologico anammox per la rimozione dell’azoto dai digestati zootecnici. Tesi di laurea (2012).
- 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.
- Rysgaard S., Glud R.N., Risgaard-Petersen N., Dalsgaard T., Denitrification and anammox activity in arctic marine sediments, *Limnology & Oceanography* 49 (2004) 1493–1502.
- Sabumon P.C.. Anaerobic ammonia removal in presence of organic matter: a novel route. *Journal of Hazardous Materials* 149 (2007) 49–59.
- Scaglione D, Caffaz S, Bettazzi E, Lubello C. (2009) Experimental determination of Anammox decay coefficient. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*; 84(8): 1250–4.
- Scaglione D., Ruscalleda M., Ficara E., Balaguer M.D., Colprim I.. Response to high nitrite concentrations of anammox biomass from two SBR fed on synthetic wastewater and landfill leachate. *Chemical Engineering Journal* (2012).
- Schmid M., Twachtmann U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M., Metzger J.W., Schleifer K.H., Wagner M.. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Systematic and Applied Microbiology* 23 (2000) 93–106.
- Schmid M., Walsh K., Webb R., Rijpstra W.I.C., Van de Pas-Schoonen K., Verbruggen M.J., Hill T., Moffett B., Fuerst J., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S., Harris J., Shaw P., Jetten M., Strous M.. Candidatus “*Scalindua brodae*”, sp. nov., Candidatus “*Scalindua wagneri*”, sp.

- nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Systematic & Applied Microbiology* 26 (2003) 529–538.
- Schubert C.J., Durisch-Kaiser E., Wehrli B., Thamdrup B., Lam P. and Kuypers M.M.M.. (2006). Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environ Microbiol* 8:1857–1863.
- Siegrist H., Reithaar S., Koch G., Lais P.. Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Water Science & Technology* 38 (8–9) (1998) 241–248.
- Sinninghe Damsté J.S., Strous M., Rijpstra W.I.C., Hopmans E.C., Geenevasen J.A.J., Van Duin A.C.T., Van Niftrik L.A., Jetten M.S.M.. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* 419 (2002) 708–712.
- Skerman V.B.D., MacRae I.C.. The influence of oxygen availability on the degree of nitrate reduction by *Pseudomonas denitrificans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1957, 3(3): 505-530, 10.1139/m57-055.
- Sliekers O.A., Third K., Abma W., Kuenen J.G., Jetten M.S.M.. CANON and Anammox in a gas-lift reactor, *FEMS Microbiology Letters* 218 (2003) 339–344.
- Stackebrandt E., Wehmeyer U. and Liesack W.. (1986). 16S ribosomal RNA- and cell wall analysis of *Gemmata obscuriglobus*, a new member of the order Planctomycetales. *FEMS Microbiol Lett* 37:289–292.
- 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 J.G., Fuerst J.A., Wagner M., Jetten M.S.M.. (2002). The anammox case - A new experimental manifesto for microbiological co-physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* ; 81(1/4): 693 - 702.
- Strous M., Pelletier E., Mangenot S., Rattei T., Lehner A., Taylor M.W., Horn M., Daims H., Bartol-Mavel D., Wincker P., Barbe V., Fonknechten N., Vallenet D., Segurens B., Schenowitz-Truong C., Médigue C., Collingro A., Snel B., Dutilh B.E., et al. (2006). Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* 440:790–794.
- Third K.A., Sliekers O., Kuenen J.G., Jetten M.S.M.. The CANON system (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *System & Applied Microbiology* 24 (2001) 588–596.
- Tsushima I., Ogasawara Y., Kindaichi T., Satoh H., Okabe S.. Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water Research* 41 (8) (2007) 1623–1634.

- van de Graaf A.A., Peter de Bruijn, Lesley A. Robertson, Mike S. M. Jetten and J. Gijs Kuenen, Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* August 1996 vol. 142 no. 8 2187-2196
- Van de Graaf A.A., De Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G.. Autotrophic growth of anaerobic ammonium oxidation on the basis of <sup>15</sup>N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 143 (1997) 2415–2421.
- Van de Vossenberg J., Rattray J.E., Geerts W., Kartal B., van Niftrik L., van Donselaar E.G., Sinninghe Damsté J.S., Strous M. and Jetten M.S.M.. (2008), Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production. *Environ Microbiol* 10:3120–3129.
- Van der Star W.R.L., Abma W.R., Blommers D., Mulder J.W., Tokutomi T., Strous M., Picioreanu C. and van Loosdrecht M.C.M.. (2007). Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research* 41:4149–4163.
- Van der Star W.R.L., Miclea A.I., van Dongen U.G.J.M., Muyzer G., Picioreanu C., van Loosdrecht M.C.M.. The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnology and Bioengineering* 101 (2008) 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 Nitritation process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82 (5), 471-480.
- Van Hulle S.W.H., Vandeweyer H.J.P., Meesschaert B.D., Vanrolleghem P.A., Dejjans 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.
- Van Niftrik L.A., Fuerst J.A., Sinninghe Damsté J.S., Kuenen J.G., Jetten M.S.M., Strous M., The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria, *FEMS Microbiology Letters* 233 (2004) 7–13.
- Van Niftrik L.A., Geerts W.J.C., van Donselaar E.G., Humbel B.M., Webb R.I., Fuerst J.A., Verkleij A.J., Jetten M.S.M. and Strous M.. (2008a). Linking ultrastructure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: Cell plan, glycogen storage, and localization of cytochrome c proteins. *J Bacteriol* 190:708–717.
- Van Niftrik L.A., Geerts W.J.C., van Donselaar E.G., Humbel B.M., Yakushevskaya A., Verkleij A.J., Jetten M.S.M. and Strous M.. (2008b). Combined structural and chemical analysis of the anammoxosome: A membrane-bounded intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *J Struct Biol* 161:401–410.
- Vazquez-Padrín J.R., Fernandez R., Morales N., Campos J.L., Mosquera-Corral A. and Mendez R.. Autotrophic nitrogen removal at low temperature. *Water Science & Technology* 9 63.6 9 (2011).

- Verstraete W., Philips S.. Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution* Volume 102, Issue 1, Supplement 1, 1998, Pages 717–726.
- Vlaeminck S.E.. Biofilm and granule applications for one-stage autotrophic nitrogen removal. Phd Thesis, Ghent University, Belgium, 2009.
- 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).
- Wang C.C., Kumar M., Lan C.J. & Lin J.G.. Landfill-leachate treatment by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process. *Desalination and Water Treatment* Volume 32, Issue 1-3, 2011.
- Wett B.. Development and implementation of a robust deammonification process. *Water Science & Technology* 56 (7) (2007) 81–88.
- Xiao Y., Zeng G.M., Yang Z.H., Liu Y. Sh., Ma Y.H., Yang L., Wang R.J., Xu Zh. Y.. Coexistence of nitrifiers, denitrifiers and Anammox bacteria in a sequencing batch biofilm reactor as revealed by PCR-DGGE. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 106, Issue 2, pages 496–505, February 2009.
- Xu Z.Y., Zeng G.M., Yang Z.H., Xiao Y., Cao M., Sun H.S., Ji L.L., Chen Y.. Biological treatment of landfill leachate with the integration of partial nitrification, anaerobic ammonium oxidation and heterotrophic denitrification. *Bioresource Technology* Volume 101, Issue 1, January 2010, Pages 79–86.
- Yamamoto T., Takaki K., Koyama T., Furukawa K.(2008). Long-term stability of partial nitrification of swine wastewater digester liquor and its subsequent treatment by Anammox. *Bioresource Technology* 99(14):6419-6425.
- Zhang H. and Zhou S.. Treating leachate mixture with anaerobic ammonium oxidation technology. *Journal of Central South University of Technology* Volume 13, Number 6 (2006), 663-667.
- Zhou S., Yao J.. Rapid enrichment and acclimation of anaerobic ammonium oxidation by using activated sludge from a landfill leachate treatment plant. *International journal of food, agriculture and environment*, 2010, vol. 8 (2), n<sup>o</sup>2, pp. 1133-1137.



## 7. Appendice

### 7.1 Conduzione delle prove manometriche

In generale l'allestimento delle prove prevede una fase iniziale che consiste nel riempimento delle bottiglie con un certo quantitativo di biomassa anammox e un volume di refluo sintetico. La fase successiva consiste nell'operare un flussaggio di gas, composto di azoto per il 95% e da anidride carbonica per il 5%, all'interno della bottiglia attraverso una pietra porosa che permette la disgregazione del gas in piccole bolle garantendo un migliore scambio tra la fase liquida e quella gassosa. La presenza di anidride carbonica nella miscela è fondamentale per garantire un controllo del pH all'interno della bottiglia che altrimenti rischierebbe di salire a livelli troppo alti rallentando così l'attività batterica. Al fine di garantire l'assenza di ossigeno, sia disciolto sia nello spazio di testa della bottiglia, è bene flussare per almeno 15 minuti la soluzione e per altri 2 minuti lo spazio di testa attraverso il rubinetto A (*figura 3-1*). Al termine di questa operazione si chiudono con cura tutte le aperture in modo da garantire la perfetta tenuta del sistema. Si può così procedere alla somministrazione degli spike, ossia all'iniezione, attraverso il setto B, di una certa quantità di soluzioni a concentrazione nota di  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  e  $\text{NH}_4\text{-N}$  in modo da portare le concentrazioni della fase liquida a un valore noto desiderato. Somministrato lo spike, si procede all'operazione di sfiato della bottiglia al fine di annullare la sovrappressione generate durante le operazioni di flussaggio. Ciò avviene collegando un'estremità di un tubo di gomma al rubinetto A e immergendo l'altra estremità sotto battente in un becher riempito d'acqua così da evitare indesiderati ingressi di ossigeno. Eseguite tutte queste operazioni le bottiglie sono collocate in un'incubatrice che le mantiene alla temperatura costante di 35°C. Quando la biomassa ha terminato il consumo dei nutrienti forniti con lo spike si procede al prelievo di un campione dalle bottiglie per l'esecuzione delle analisi delle forme azotate e il controllo pH e, dopo aver riflussato ed eventualmente corretto il pH, si può eseguire lo spike successivo. Raccolti i dati necessari alla valutazione dell'esito della prova, si esegue un'analisi dei solidi sospesi totali e volatili contenuti nelle bottiglie e si procede al trattamento dei dati.

## 7.2 Risultati delle prove manometriche

### 7.2.1 Prova numero 2

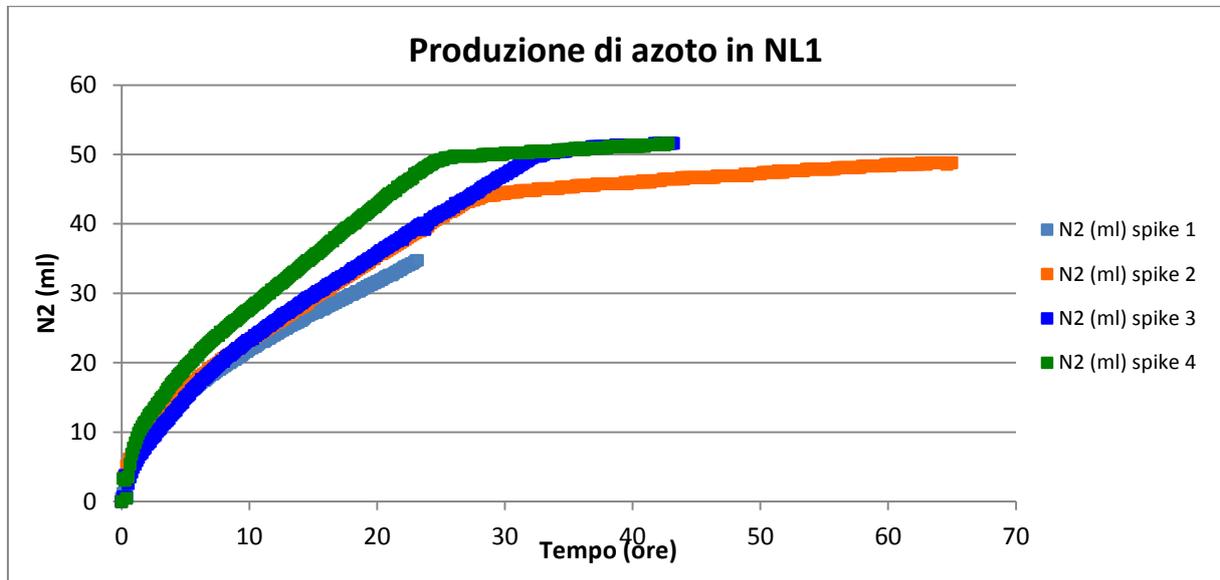


Grafico 7-1 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL1 nella prova 1

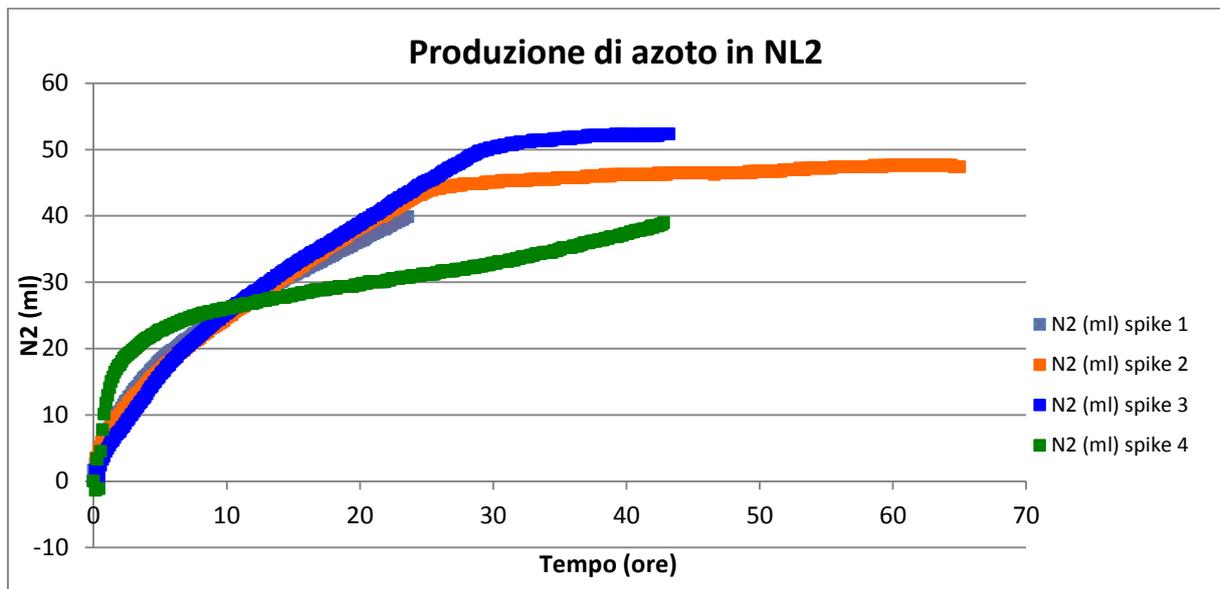


Grafico 7-2 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL2 nella prova 1

## 7.2.2 Prova numero 2

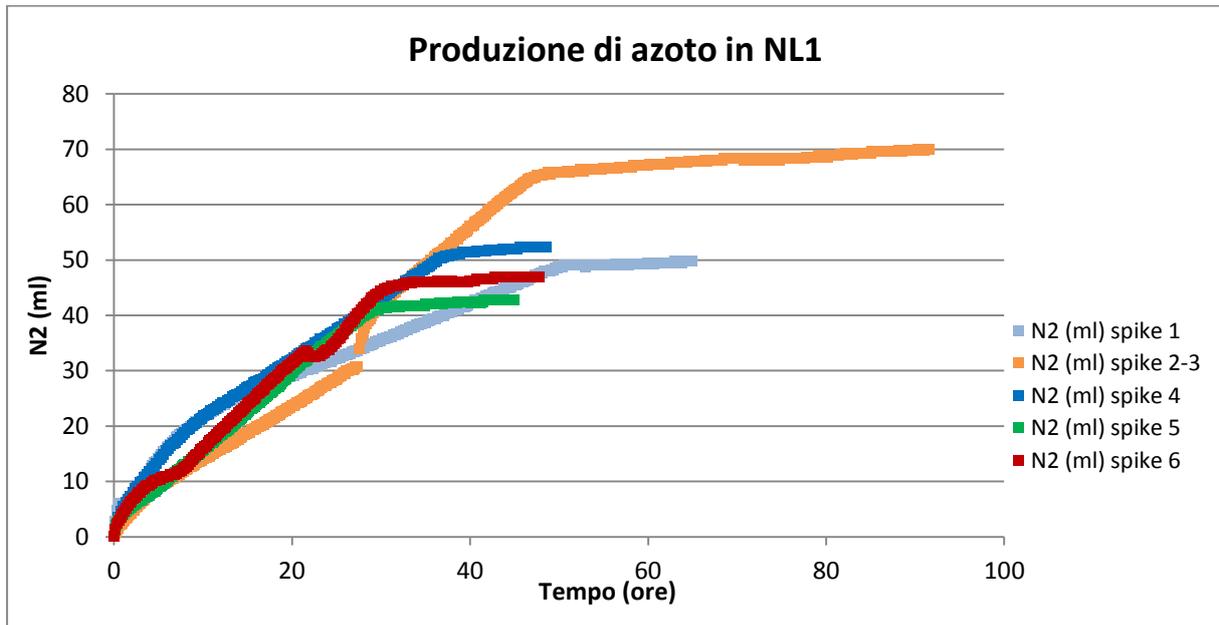


Grafico 7-3 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL1 nella prova 2

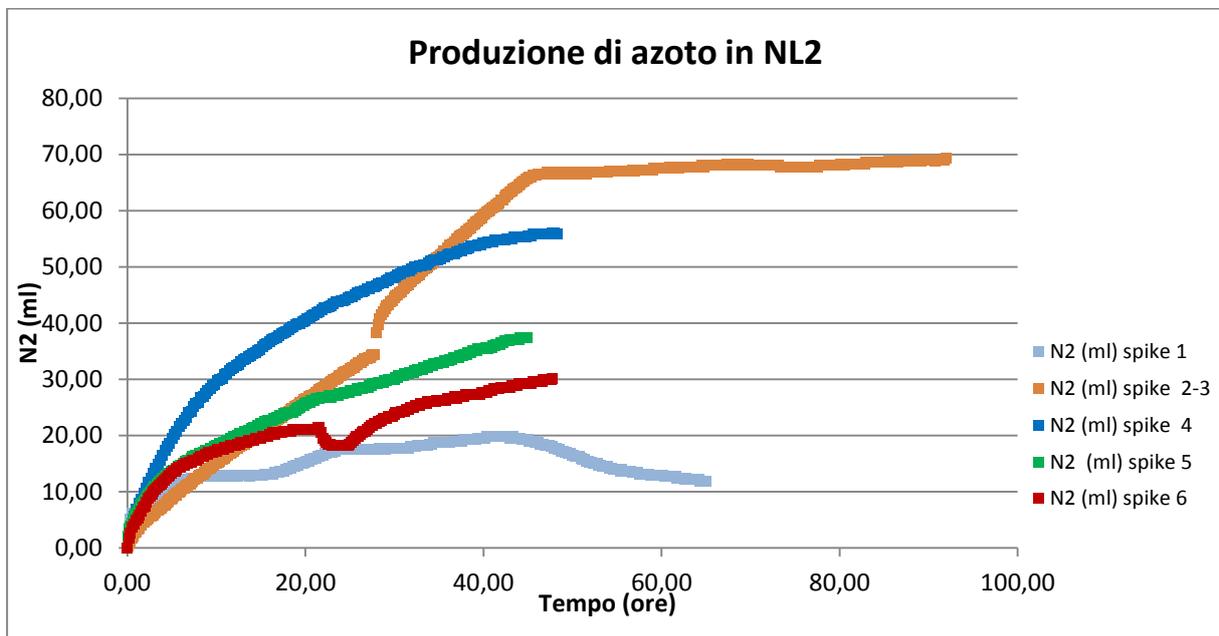


Grafico 7-4 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL2 nella prova 2

### 7.2.3 Prova numero 3

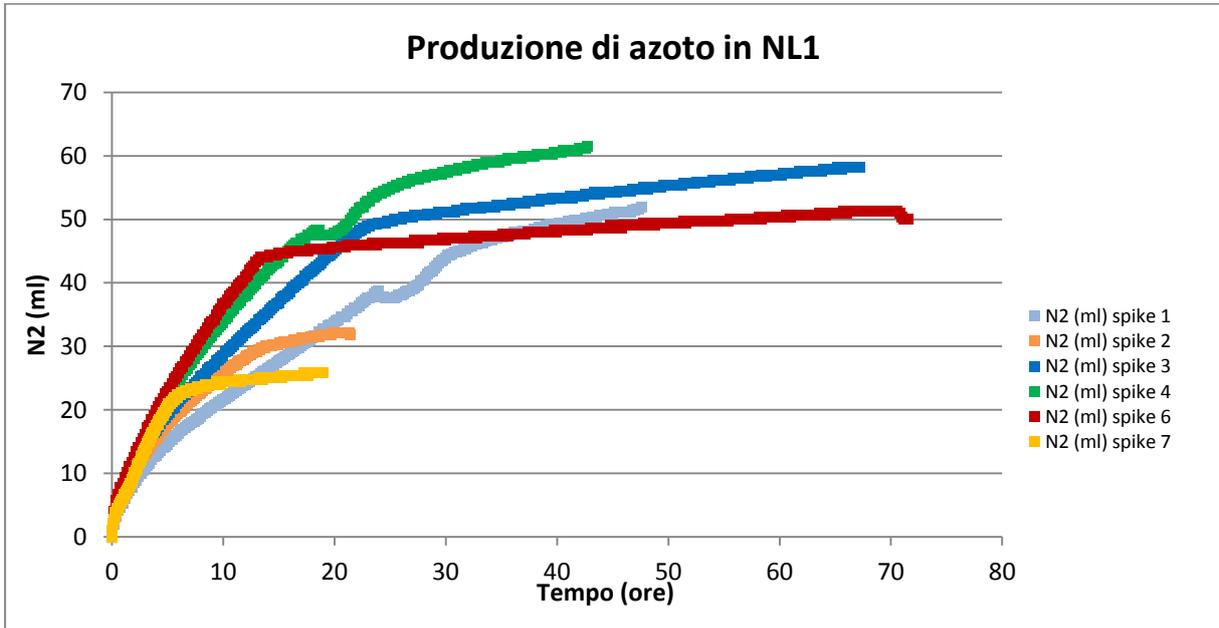


Grafico 7-5 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL1 nella prova 3

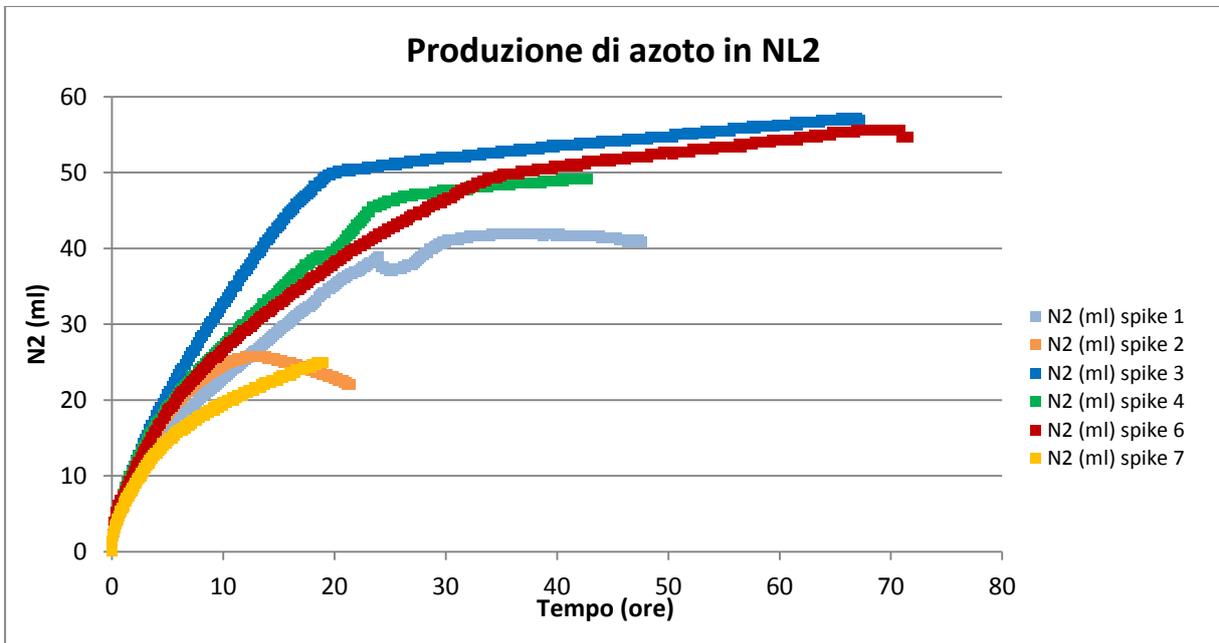


Grafico 7-6 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL2 nella prova 3

## 7.2.4 Prova numero 4

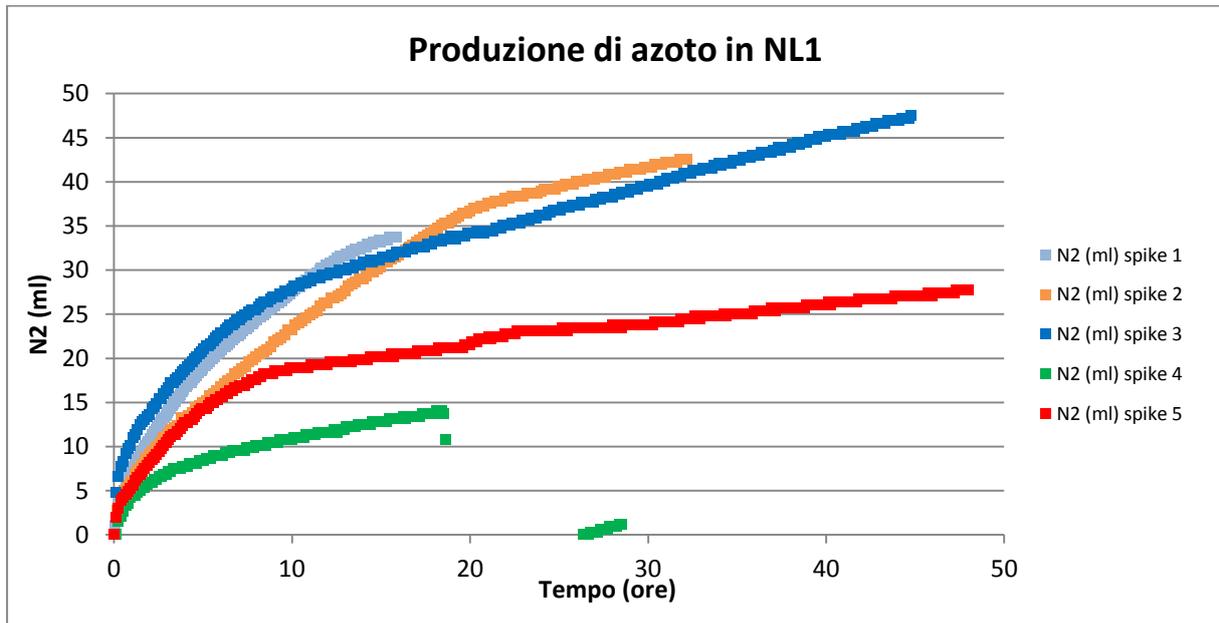


Grafico 7-7 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL1 nella prova 4

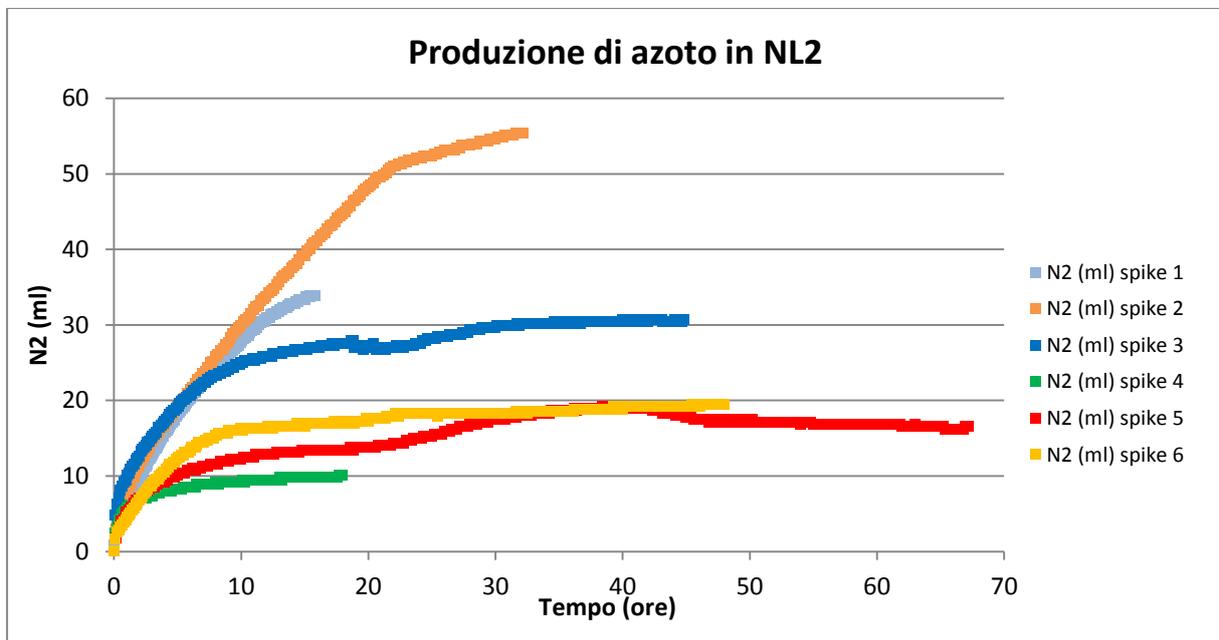


Grafico 7-8 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL2 nella prova 4

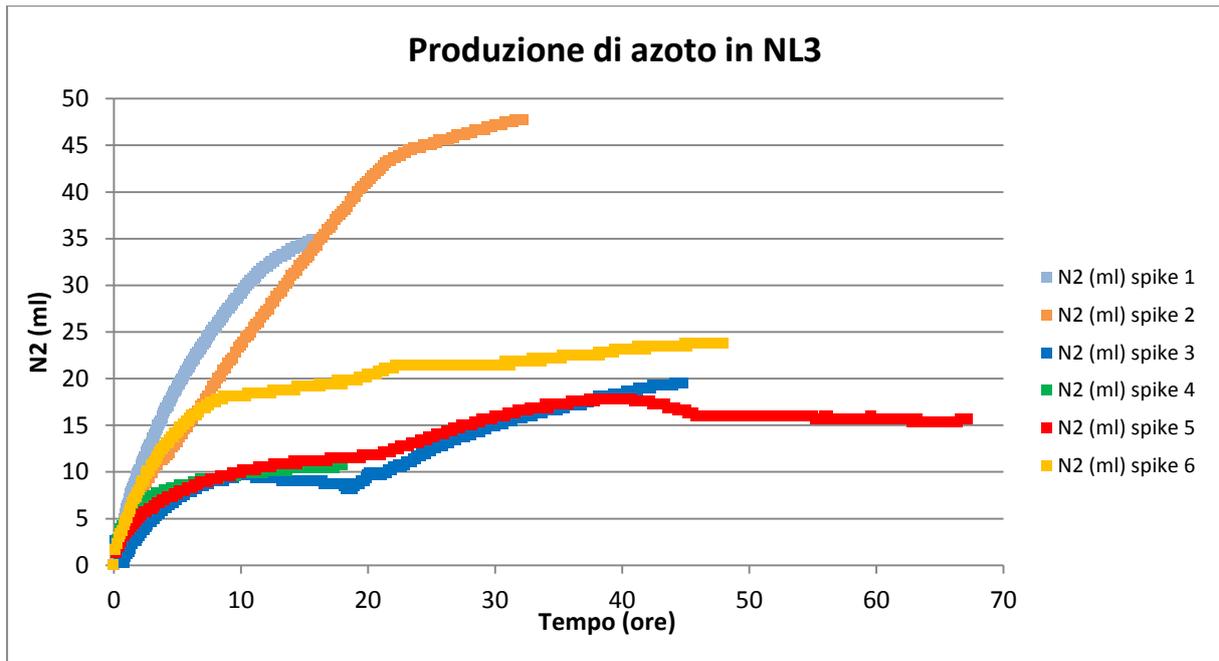


Grafico 7-9 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL3 nella prova 4

### 7.2.5 Prova numero 5

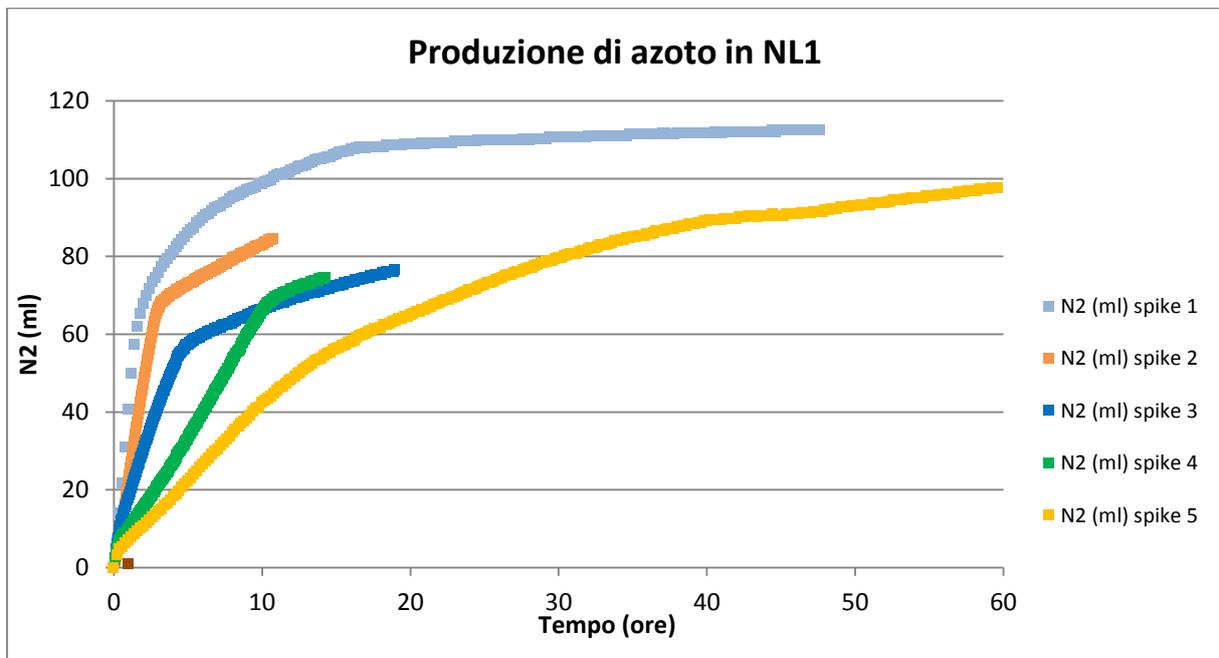


Grafico 7-10 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL1 nella prova 5

## 7.2.6 Prova numero 6

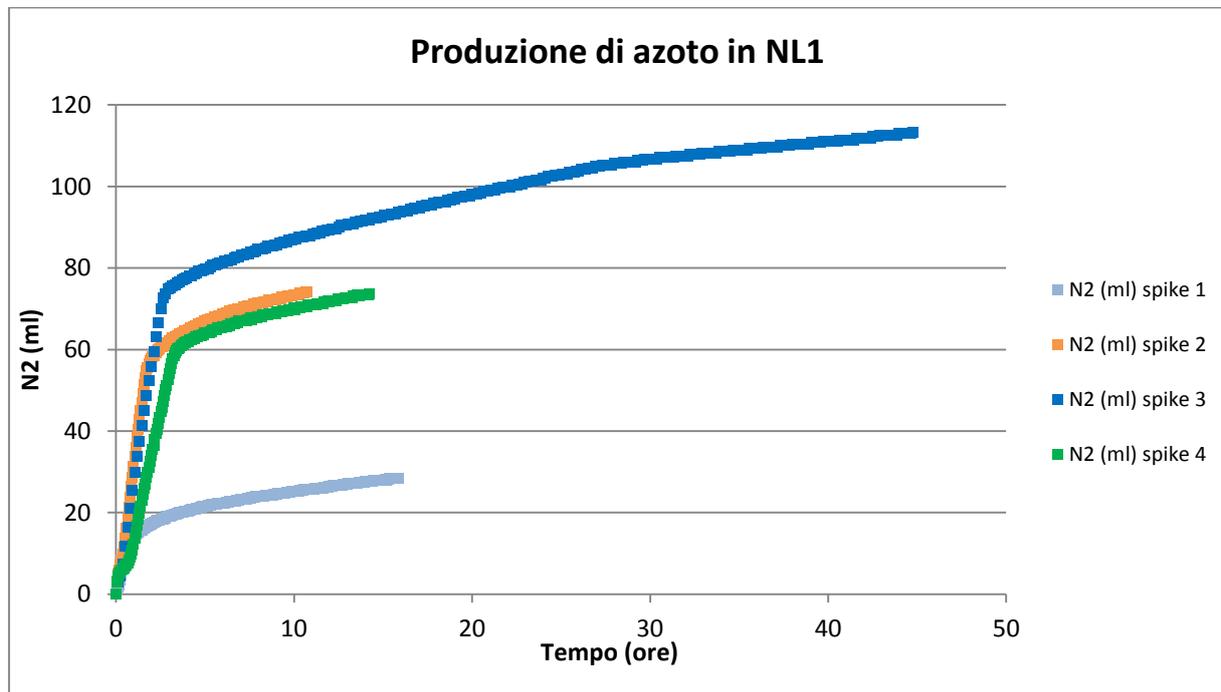


Grafico 7-11 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL1 nella prova 6

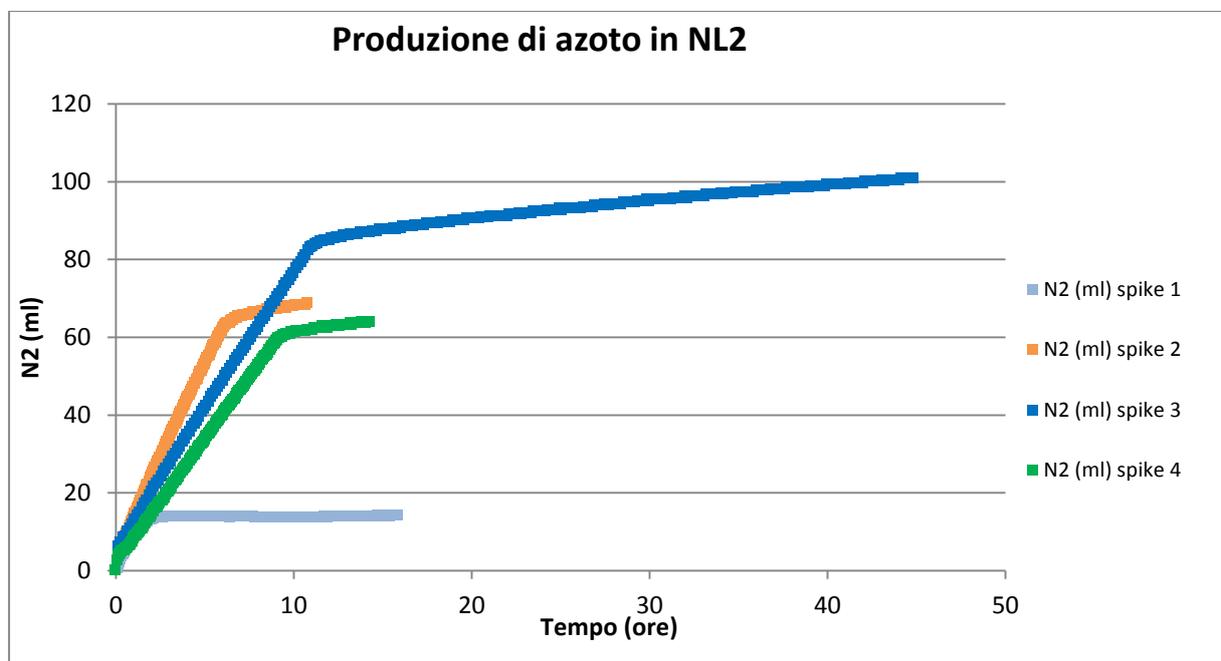


Grafico 7-12 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL2 nella prova 6

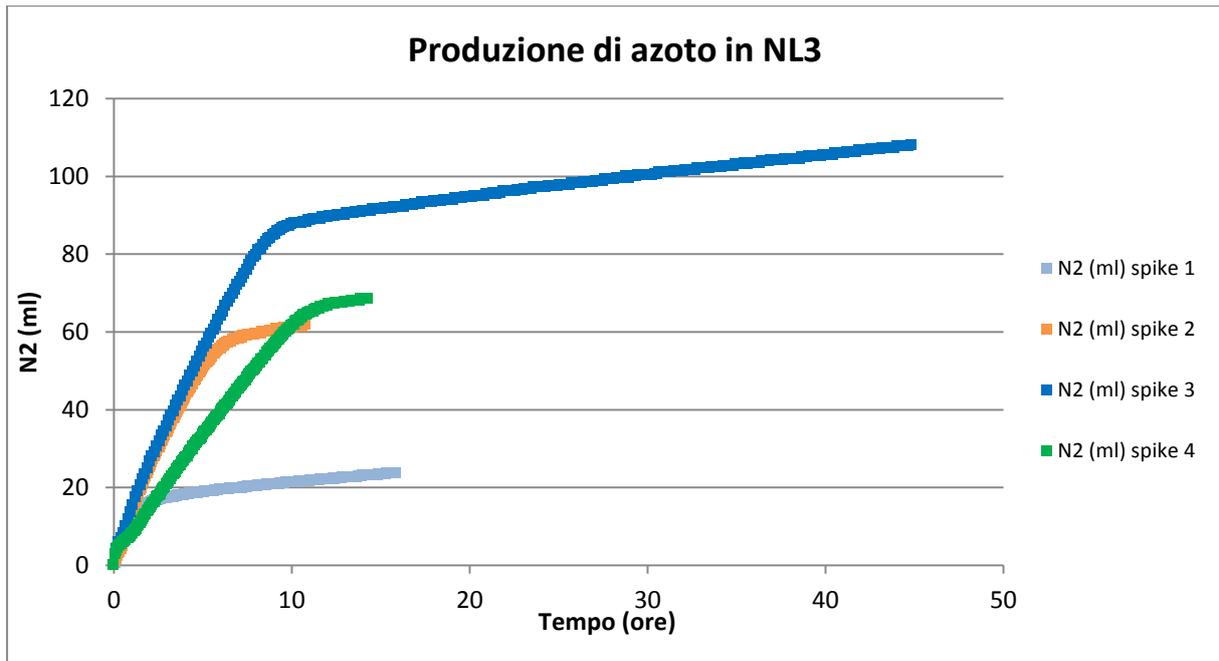


Grafico 7-13 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL3 nella prova 6

### 7.2.7 Prova numero 7

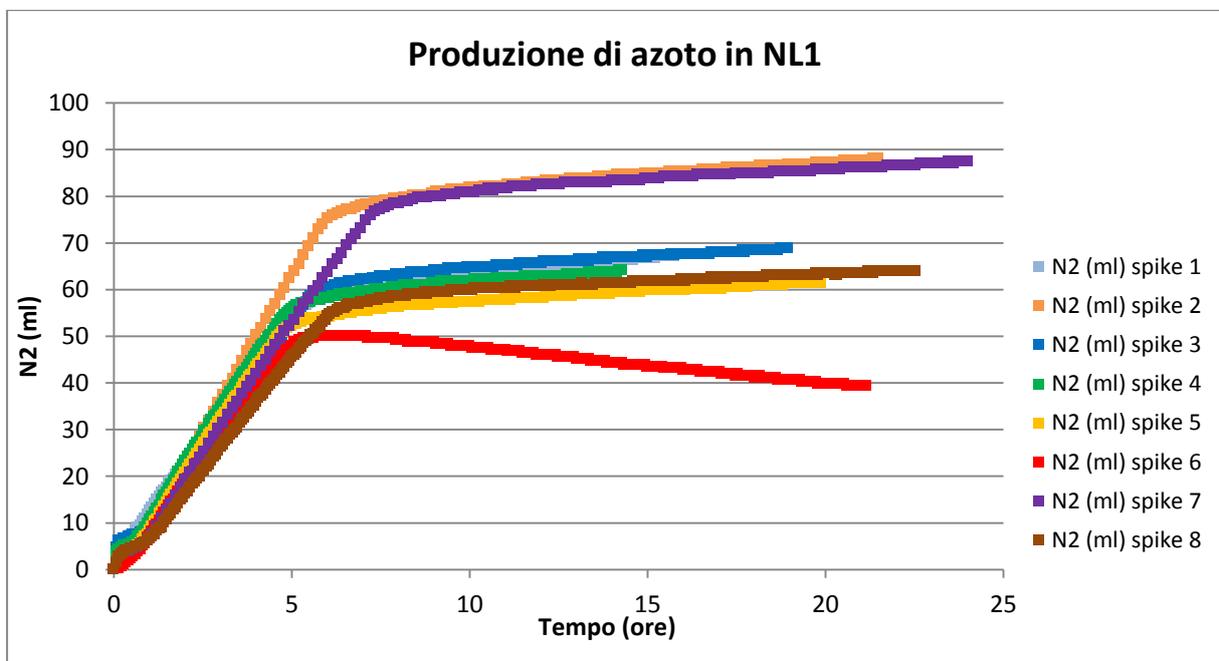


Grafico 7-14 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL1 nella prova 7

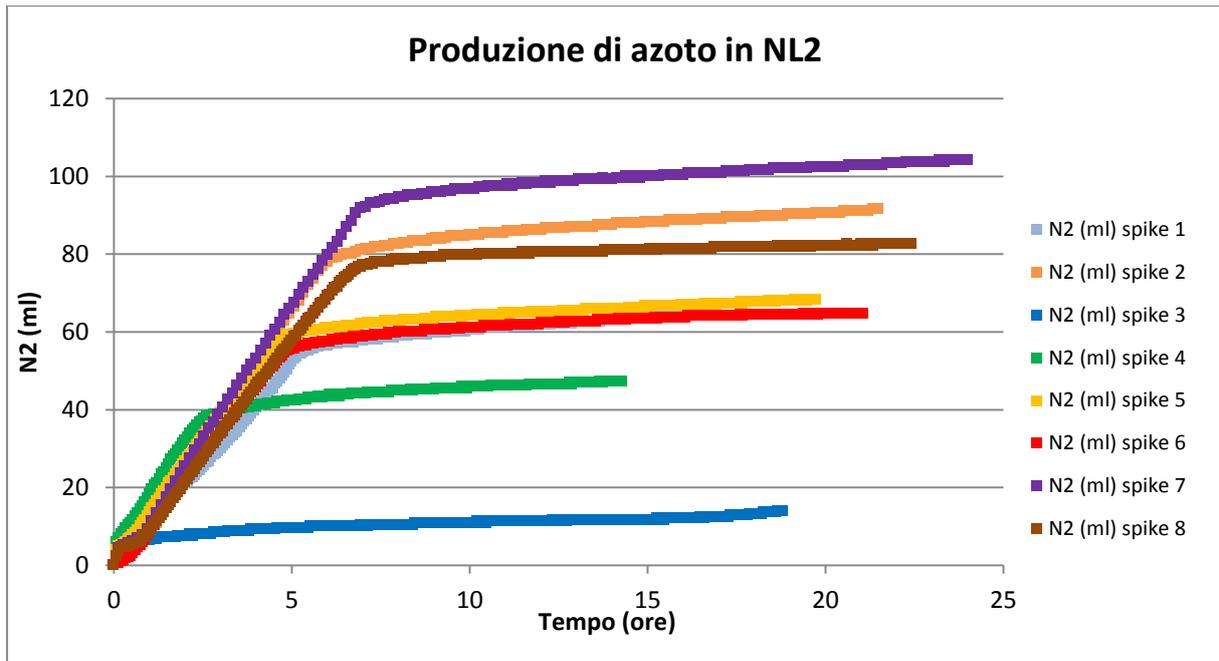


Grafico 7-15 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL2 nella prova 7

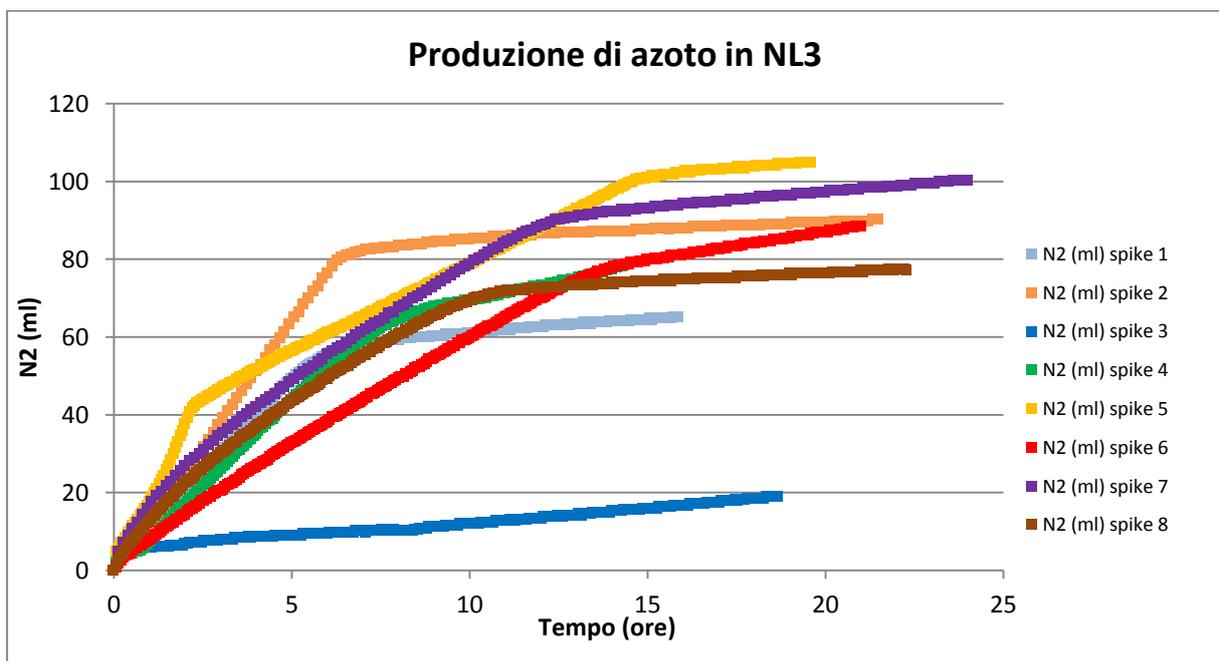


Grafico 7-16 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL3 nella prova 7

## 7.2.8 Prova numero 8

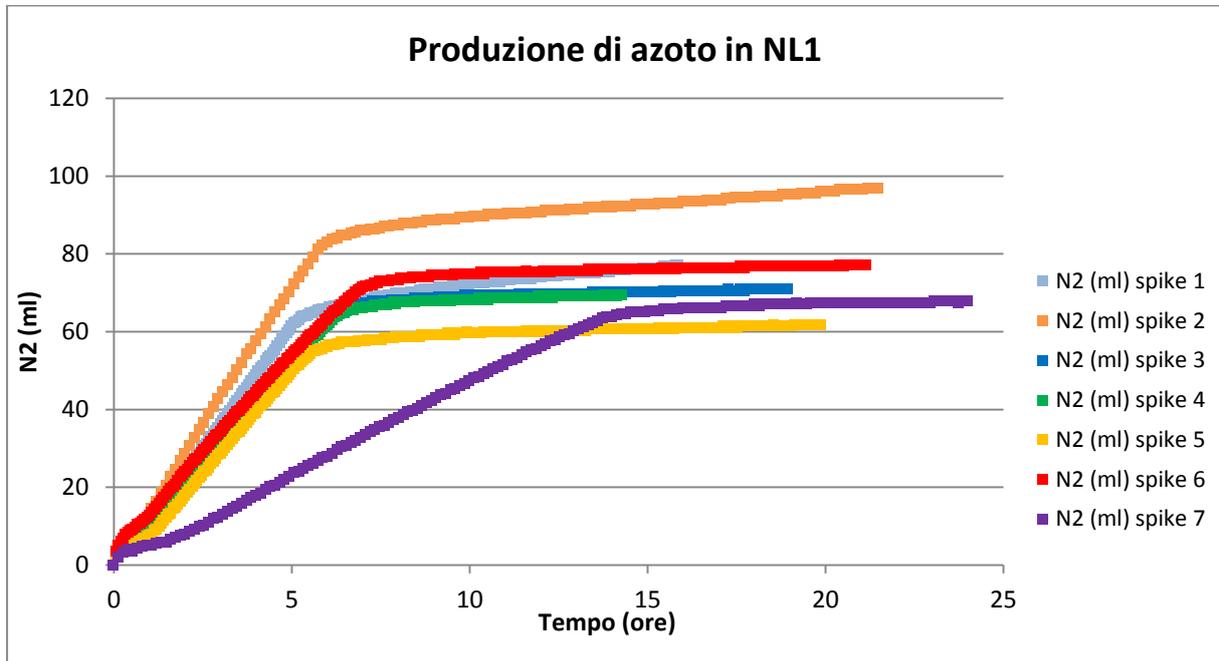


Grafico 7-17 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL1 nella prova 8

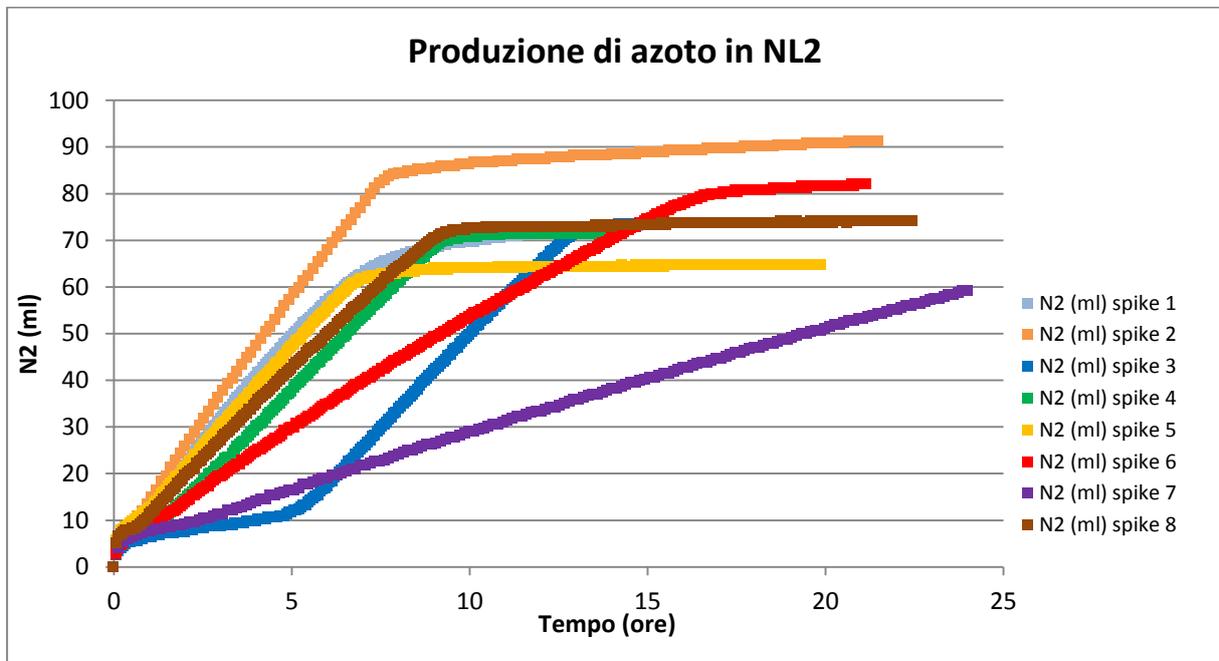


Grafico 7-18 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL2 nella prova 8

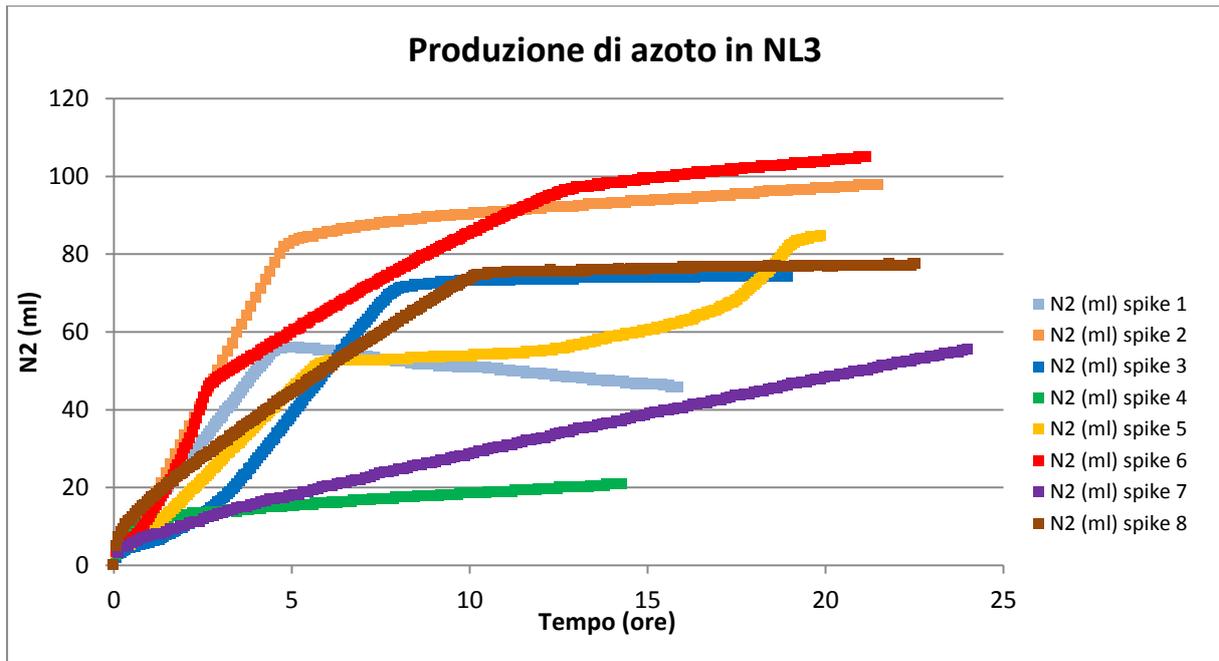


Grafico 7-19 Andamento delle produzioni di N<sub>2</sub> per la bottiglia NL3 nella prova 8