

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria Civile, Ambientale e Territoriale

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



**PROCESSI BIOLOGICI AUTOTROFI  
MBR PER LA RIMOZIONE  
DELL'AZOTO DA DIGESTATI DI  
ORIGINE AGROZOOTECNICA**

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Ing. Francesca Malpei

Correlatore: Ing. Aronne Teli

Tesi di laurea magistrale di:

Marco Lamperti Matr. 764984

Anno accademico 2012/2013



*« I thought of that old joke. You know, this guy goes to his psychiatrist and says, "Doc, my brother's crazy. He thinks he's a chicken." And the doctor says, "Well why don't you turn him in?" The guy says, "I would, but I need the eggs." Well, I guess that's pretty much how I feel about relationships— you know, they're totally irrational and crazy and absurd, but, I guess we keep going through it because most of us need the eggs».*

*(Woody Allen)*



# Ringraziamenti

Si ringraziano la Chiar.ma Prof.ssa Ing. Francesca Malpei e l'Ing. Aronne Teli per la professionalità e la disponibilità dimostrate nei confronti del candidato durante la produzione della presente tesi di laurea magistrale.

Si porgono anche i più sentiti ringraziamenti all'Ing. Elena Ficara per il supporto fornito durante la sperimentazione in laboratorio.

Si ricordano anche l'Ing. Glauco Menin, l'Ing. Ruggero Tardivo, il P.I. Enrico Gelmi e la Dott.ssa Laura Romele per quei consigli indispensabili all'attività sperimentale.

Si rammentano anche il Dott. Ing. Fabrizio Berenato, il Dott. Ing. Davide Ronchi, l'Ing. Diego Rizzardini e la Dott.ssa Gaia De Sanctis per i momenti divertenti vissuti assieme durante le lunghe giornate di lavoro in laboratorio.

Infine si ringraziano coloro che in questi anni con la loro vicinanza e il loro sostegno hanno permesso il raggiungimento di questo importante obiettivo.



# Sintesi

La presente tesi ha come scopo quello di implementare tecnologie sostenibili ed economicamente vantaggiose per la rimozione dell'azoto dai digestati agrozootecnici tramite processi anaerobici. Dopo una preliminare analisi dei processi tradizionali sono stati valutati quelli più innovativi e in particolar modo quello legato all'utilizzo della biomassa Anammox (*ANAerobic AMMonium OXidation*) e alla sua applicabilità in bioreattori a membrana (*Membrane Biological Reactor*, MBR).

L'influente, dovendo avere particolari concentrazioni di nitrito per operare l'ossidazione anossica, deve provenire da una fase di parziale nitrosazione (Parnit) da anteporre a quella Anammox.

Avendo a disposizione un solo MBR, la sperimentazione si è suddivisa in due momenti: il primo per lo studio del processo di parziale nitrosazione (Parnit) e il secondo per quello del processo Anammox.

Lo studio qui descritto si occupa quindi dell'ottimizzazione delle condizioni operative di un pilota MBR per:

- ottenere un effluente con caratteristiche idonee al processo Anammox, cioè con rapporto azoto nitroso/azoto ammoniacale tendente a 1 (Parnit);
- ossidare in ambiente privo di ossigeno l'azoto ammoniacale alimentato contestualmente con l'azoto nitroso - che svolge il ruolo di accettore di elettroni (Anammox)

Per il Parnit si è controllato dapprima il DO e l'SRT per evitare la totale nitrosazione dell'azoto ammoniacale alimentato mediante mezzo sintetico. Con il graduale passaggio all'influente reale interferenti con la sonda dell'ossigeno hanno portato a regolare l'attività mediante pH, portato da 7,00 (condizioni ottimali per l'ossidazione aerobica) a 6,50 (attività leggermente rallentata). Salvo problematiche di regolazione dell'SRT nel primo periodo e le difficoltà tecniche riscontrate nel controllo dell'aerazione – facilmente risolvibili con strumenti più sofisticati e precisi – non si sono rilevate complicazioni considerevoli: la biomassa per la nitrosazione ha lavorato molto bene nell'MBR, ed è risultato anche abbastanza semplice regolarne il grado di attività. La rimozione del COD solubile è

---

decisamente efficace (> 90%) per concentrazioni intorno ai 1000 mg L<sup>-1</sup>. Meno incisiva (circa 50%) per concentrazioni superiori (1700 mg L<sup>-1</sup>), ma sempre e comunque alta per il COD totale (mediamente > 80%).

I veri problemi sono stati rilevati sul *fouling* della membrana dopo il passaggio graduale all'alimento reale. I lavaggi fisici hanno permesso di prolungare l'utilizzo del modulo filtrante, ma senza mai ristabilire le condizioni iniziali, indice di *fouling* di tipo irreversibile, rimovibile solo per via chimica. Gli EPS e gli SMP, però, non sembrano essere responsabili di tale problematica: non risultano infatti essere correlati in alcun modo con l'aumento della pressione transmembrana (TMP). Probabilmente lo sporco è stato dovuto a colloidi presenti nel reale alimentato.

Per il processo Anammox si è utilizzato un alimento avente diversi rapporti r tra azoto nitroso e ammoniacale fino a trovare nel valore 0,9 quello più adatto al trattamento. Rapporti maggiori hanno evidenziato acculi di nitrito (inibente per l'Anammox), segno di un'attività aerobica ad opera di AOB causata da potenziali infiltrazione di ossigeno.

L'influenza impiegato è stato pian piano modificato passando da uno totalmente sintetico ad uno totalmente reale.

L'analisi dei ratei di rimozione han mostrato una probabile attività denitrificante durante tutta sperimentazione. Inoltre grazie a prove di attività periodiche è stato possibile stabilire il rateo di rimozione massima e l'attività specifica della biomassa Anammox che si sono attestati rispettivamente su valori medi di 5 g<sub>N</sub> d<sup>-1</sup> (con massimi oltre i 10 g<sub>N</sub> d<sup>-1</sup>) e 0,4 g<sub>N</sub> g<sup>-1</sup><sub>MLVSS</sub> d<sup>-1</sup> (con massimi prossimi agli 0,9 g<sub>N</sub> g<sup>-1</sup><sub>MLVSS</sub> d<sup>-1</sup>).

I rapporti tra NLR e NRRmax (sempre inferiori al 30% e tendenzialmente compresi tra 15 e 20% con minimi inferiori al 10%) hanno messo in luce l'effettiva possibilità di aumentare i carichi di azoto (ammoniacale e nitrico) ulteriormente, sempre facendo attenzione a non superare i 50 mg L<sup>-1</sup> (o ancor peggio i 100 mg L<sup>-1</sup>) di nitrito nel *mixed liquor*, concentrazione parzialmente (o totalmente) inibente per la biomassa Anammox.

Anche in questo caso la problematica maggiore è stata determinata dal *fouling* della membrana anche se in modo diverso: la TMP ha iniziato ad alzarsi gradualmente dopo il lento passaggio all'alimento reale. Gli EPS e gli SMP sembrano essere correlati e quindi il tipo di *fouling* atteso dovrebbe essere di tipo irreversibile e quindi rimovibile solo per via chimica. In realtà la correlazione è stata data dall'aumento progressivo della biomassa nel reattore (oltre i 3 g<sub>VSS</sub> L<sup>-1</sup>) causata da una maggiore disponibilità di nutrienti dell'influenza reale. Infatti a seguito dei lavaggi fisici effettuati la membrana tornava su TMP del tutto simili a quelle iniziali. Il *fouling* quindi è stato determinato prettamente dall'effetto torta sul modulo. I fiocchi di fango erano infatti molto più numerosi ad occhio durante l'impiego dell'alimento reale per i motivi suddetti.

# Indice dei contenuti

<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>III</b>
<b>SINTESI</b> .....	<b>V</b>
<b>INDICE DEI CONTENUTI</b> .....	<b>VII</b>
<b>INDICE DELLE FIGURE</b> .....	<b>XI</b>
<b>INDICE DEI GRAFICI</b> .....	<b>XIII</b>
<b>INDICE DELLE TABELLE</b> .....	<b>XVII</b>
<b>CAPITOLO 1 INTRODUZIONE E SCOPO</b> .....	<b>1</b>
1.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	1
1.2 ARTICOLAZIONE DELLA TESI .....	2
<b>CAPITOLO 2 STATO DELL'ARTE</b> .....	<b>3</b>
2.1 PROCESSI BIOLOGICI PER LA RIMOZIONE DELL'AZOTO .....	3
2.1.1 <i>Processi tradizionali</i> .....	3
2.1.2 <i>Processi biologici innovativi per la rimozione dell'azoto da reflui agrozootecnici</i> ..	7
2.2 BIOREATTORI A MEMBRANA .....	17
2.2.1 <i>Configurazione dei reattori a membrana</i> .....	17
2.2.2 <i>Processi a membrana</i> .....	18
2.2.3 <i>Trattamenti aerobici, anaerobici e anossici</i> .....	24
2.2.4 <i>Fouling</i> .....	25
2.3 PROCESSI ANAMMOX CON MBR.....	29
2.3.1 <i>Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor</i> .....	29
2.3.2 <i>A Novel Tool to Grow Anammox Bacteria as Free Cells</i> .....	32
2.3.3 <i>Enrichment and biofilm formation of Anammox bacteria in a non-woven membrane reactor</i> .....	33
2.3.4 <i>Impact of reactor configuration on anammox process start-up: MBR versus SBR</i> .....	36
<b>CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>39</b>

---

3.1 CONFIGURAZIONE DEL PILOTA .....	39
3.1.1 MBR Parnit.....	42
3.1.2 MBR Anammox.....	43
3.2 PROCEDURE E METODI DI ANALISI .....	44
3.2.1 Misura degli EPS e degli SMP.....	44
3.2.2 Alcalinità.....	48
3.2.3 Analisi delle forme azotate e del COD.....	48
3.3 PROVE DI ATTIVITÀ.....	51
3.4 LAVAGGI DELLA MEMBRANA .....	52
3.5 PREPARAZIONE DI SOLUZIONI E REATTIVI .....	54
3.5.1 Preparazione dell'alimento.....	54
3.5.2 Soluzioni acide e basiche.....	57
3.6 CARATTERISTICHE DELL'INFLUENTE.....	57
3.6.1 Parnit.....	57
3.6.2 Anammox.....	58
3.7 INOCULO .....	61
3.7.1 Parnit.....	61
3.7.2 Anammox.....	61
3.8 PROTOCOLLO DI AVVIO E CONDUZIONE DEL REATTORE .....	61
3.8.1 Parnit.....	61
3.8.2 Anammox.....	62
<b>CAPITOLO 4 FUNZIONAMENTO OPERATIVO E RISULTATI DELL'MBR</b>	
<b>PARNIT .....</b>	<b>63</b>
4.1 CONDIZIONI OPERATIVE.....	63
4.1.1 Uso dell'antischiuma.....	67
4.1.2 Controllo della portata dell'aeratore.....	67
4.2 PRESTAZIONI DEL PROCESSO BIOLOGICO.....	68
4.2.1 Andamento della concentrazione di biomassa.....	68
4.2.2 Nitrosazione parziale.....	70
4.3 ANDAMENTO DELLE CONCENTRAZIONI DI COD .....	73
4.4 MONITORAGGIO DELLE PRESTAZIONI IDRAULICHE E FOULING DI MEMBRANA .....	75
4.4.1 Andamento della TMP.....	75
4.4.2 Monitoraggio degli SMP e degli EPS.....	76
<b>CAPITOLO 5 FUNZIONAMENTO OPERATIVO E RISULTATI DELL'MBR</b>	
<b>ANAMMOX.....</b>	<b>79</b>
5.1 CONDIZIONI OPERATIVE .....	79

---

---

5.2 PRESTAZIONI DEL PROCESSO BIOLOGICO .....	81
5.2.1 <i>Andamento della concentrazione di biomassa</i> .....	81
5.2.2 <i>Processo Anammox</i> .....	82
5.3 MONITORAGGIO DELLE PRESTAZIONI IDRAULICHE E <i>FOULING</i> DI MEMBRANA .....	89
5.3.1 <i>Andamento della TMP</i> .....	89
5.3.2 <i>Monitoraggio degli SMP e degli EPS</i> .....	91
<b>CAPITOLO 6 CONCLUSIONI</b> .....	<b>95</b>
6.1 MBR PARNIT .....	95
6.2 MBR ANAMMOX .....	96
6.3 PROSPETTIVE FUTURE .....	97
<b>CAPITOLO 7 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b> .....	<b>99</b>



## Indice delle figure

Figura 2.1 Schema di trattamento per l'abbattimento spinto dell'azoto, con fasi di pre-denitrificazione e di post-denitrificazione con uso di fonte di carbonio esterna e con aerazione terminale	7
Figura 2.2 Albero filogenetico dei microrganismi Anammox. La barra rappresenta il 10% di divergenza di sequenza (Kuenen, 2008)	10
Figura 2.3 Fotografia al microscopio di un batterio Anammox ( <i>Candidatus Kuenenia</i> )	11
Figura 2.4 Metabolismo dell'Anammox secondo Van de Graaf et al. (1997), Strous et al. (2006) e Kartal et al. (2008)	12
Figura 2.5 Schema di un impianto MBR <i>side-stream</i> (a) e <i>a membrana sommersa</i> (b)	18
Figura 2.6 Sezione di una membrana asimmetrica per UF al microscopio elettronico: è evidente la differenza tra le ampiezze dei pori (Richardson, 2002).	21
Figura 2.7 I diversi flussi a seconda della tipologia di membrana (Teli, 2010)	22
Figura 2.8 Varie tipologie di <i>fouling</i> : blocco completo (a), <i>standard blocking</i> (b), blocco intermedio (c) ed effetto torta (d) (non in scala) (Judd, 2010)	26
Figura 2.9 Meccanismi di <i>fouling</i> in un MBR (non in scala) (Teli, 2010)	27
Figura 2.10 Schema dell'impianto. (1) MSBR, (2) agitatore, (3) modulo filtrante, (4) contenitore dell'influente, (5) pompa peristaltica per l'alimentazione dell'influente, (6) pompa di permeazione, (7) contenitore dell'effluente e (8) unità logica	30
Figura 2.11 Schema dell'impianto. (1) contenitore dell'influente, (2) pompa peristaltica per l'alimentazione dell'influente, (3) sonda per la regolazione del livello, (4) fermentatore, (5) agitatore, (6) pompa di permeazione, (7) modulo filtrante, (8) uscita effluente, (9) misuratore pressione trans membrana, (10) misuratore della pressione di testa e (11) bombola di Argon e CO <sub>2</sub>	34
Figura 3.1 Il Fermentatore in funzione	40
Figura 3.2 Schermo della <i>Diaferm unit</i>	41
Figura 3.3 Struttura principale dell'impianto per la parziale nitrosazione.	43
Figura 3.4 Struttura principale dell'impianto Anammox.	44

---

Figura 3.5 Spettrofotometro di massa	49
Figura 3.6 Kit per la misurazione del COD	49
Figura 3.7 Modulo filtrante estratto subito dopo un <i>TMP-jump</i>	53
Figura 3.8 Modulo filtrante dopo un lavaggio chimico	54
Figura 3.9 Provenienza degli alimenti utilizzati per le due fasi della sperimentazione.	56

## Indice dei grafici

Grafico 3.1 Interferenza dei nitriti nella misurazione del COD	51
Grafico 3.2 Interferenza dei nitriti nella misurazione dei nitrati	51
Grafico 3.3 Concentrazioni di $N - NH_4^+$ ( $mg L^{-1}$ ), TSS e VSS ( $g L^{-1}$ ) in ingresso al fermentatore dell'MBR Parnit	58
Grafico 3.4 Concentrazioni di $N - NH_4^+$ , $N - NO_2^-$ , $N - NO_3^-$ e COD in ingresso al fermentatore dell'MBR Anammox	60
Grafico 3.5 Rapporto $r$ tra $N - NO_2^-$ e $N - NH_4^+$ nell'alimento dell'MBR Anammox	60
Grafico 4.1 Andamento della temperatura nell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	66
Grafico 4.2 Andamento del pH e dei dosaggi delle soluzioni per la regolazione del pH. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	66
Grafico 4.3 Andamento della portata dell'aeratore e del DO nell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	68
Grafico 4.4 Andamento dei MLVSS e dei MLTSS dell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	69
Grafico 4.5 Andamento delle concentrazioni di MLVSS e dell'SRT (media mobile settimanale) nell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	69
Grafico 4.6 Andamento delle concentrazioni di azoto nitroso e ammoniacale nell'effluente dell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	71
Grafico 4.7 Andamento della frazione di azoto nitroso nell'uscita dell'MBR Parnit e della portata dell'aeratore. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	71
Grafico 4.8 Andamento del COD solubile in entrata e uscita e del COD totale in entrata all'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	74

---

Grafico 4.9 Andamento della TMP durante la sperimentazione sull'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della <i>relaxation estesa</i> e quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante	75
Grafico 4.10 Andamento della TMP e delle concentrazioni di MLVSS durante la sperimentazione sull'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della <i>relaxation estesa</i> e quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante	76
Grafico 4.11 Andamento della componente dei carboidrati degli EPS e degli SMP. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della <i>relaxation estesa</i> e quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante	77
Grafico 4.12 Andamento della componente proteica degli EPS e degli SMP. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della <i>relaxation estesa</i> e quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante	77
Grafico 5.1 Andamento del pH e della temperatura nell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	81
Grafico 5.2 Andamento delle concentrazioni di MLSS dell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	82
Grafico 5.3 Andamento delle concentrazioni di azoto ammoniacale, nitrico e nitroso in uscita dall'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	84
Grafico 5.4 Andamento dei ratei di rimozione NRR/NLR totali e parziali per l'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	84
Grafico 5.5 Andamento dei rapporti molari di rimozione $N - NO_2 - / N - NH_4 +$ stechiometrici e dell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	86
Grafico 5.6 Andamento dei rapporti molari di rimozione $N - NO_3 - / N - NH_4 +$ stechiometrici e dell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato	87
Grafico 5.7 Andamento della TMP durante la sperimentazione sull'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della <i>relaxation estesa</i> , quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante quella viola il	

- 
- lavaggio chimico con HCl e quella bordeaux l'installazione di un nuovo  
modulo filtrante 90
- Grafico 5.8 Andamento della componente dei carboidrati degli EPS e degli  
SMP dell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di  
alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della *relaxation*  
*estesa*, quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del  
modulo filtrante quella viola il lavaggio chimico con HCl e quella  
bordeaux l'installazione di un nuovo modulo filtrante 92
- Grafico 5.9 Andamento della componente proteica degli EPS e degli SMP dell'MBR  
Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale  
utilizzato, quella arancione l'inserimento della *relaxation estesa*, quelle  
verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante  
quella viola il lavaggio chimico con HCl e quella bordeaux l'installazione di  
un nuovo modulo filtrante 93



## Indice delle tabelle

Tabella 2.1 Parametri operativi dell'MSBR di Trigo et al. (2006)	30
Tabella 2.2 Composizione dei mezzi utilizzati da Trigo et al. (2006)	31
Tabella 2.3 Parametri operativi dell'MBR di Van der Star et al. (2008)	32
Tabella 2.4 Composizione dei mezzi utilizzati da Van der Star et al. (2008)	32
Tabella 2.5 Parametri operativi dell'MBR di Ni et al. (2009)	34
Tabella 2.6 Composizione del mezzo utilizzato da Ni et al. (2009)	34
Tabella 2.7 Parametri operativi dei reattori di Tao et al. (2011)	37
Tabella 2.8 Composizione del mezzo utilizzato da Tao et al. (2011)	37
Tabella 3.1 Composizione dei campioni usati in fase di calibrazione	47
Tabella 3.2 Composizione dei campioni usati in fase di calibrazione	48
Tabella 3.3 Kit utilizzati, <i>range</i> di misura e tipologia del kit	50
Tabella 3.4 Composizione della <i>soluzione madre</i>	55
Tabella 3.5 Caratteristiche alimento MBR Parnit	57
Tabella 3.6 Caratteristiche alimento MBR Anammox	58
Tabella 3.7 Protocollo di monitoraggio dell'MBR Parnit con relativa cadenza temporale	61
Tabella 3.8 Protocollo di monitoraggio dell'MBR Anammox con relativa cadenza temporale	62
Tabella 4.1 Parametri operativi dell'MBR Parnit	64
Tabella 4.2 F/M applicati	65
Tabella 4.3 Indici statistici dei MLVSS in g L <sup>-1</sup> in relazione all'SRT imposto	70
Tabella 4.4 Frazioni di azoto ammoniacale e nitroso nell'effluente in funzione della percentuale volumetrica di influente reale utilizzata	73
Tabella 4.5 Rendimenti di rimozione del COD solubile e del COD totale	74
Tabella 4.6 TMP in funzione della percentuale volumetrica di influente reale utilizzata	76
Tabella 5.1 Parametri operativi dell'MBR Anammox	80
Tabella 5.2 Pianificazione della <i>relaxation estesa</i> sull'MBR Anammox	80

---

Tabella 5.3 Caratteristiche medie dell'effluente al variare della frazione reale in ingresso	85
Tabella 5.4 Parametri ricavati dalle prove di attività sull'MBR Anammox	88
Tabella 5.5 NLR / $NRR_{max}$ ottenuti dalle prove di attività sull'MBR Anammox	89
Tabella 5.6 TMP in funzione della percentuale volumetrica di influente reale utilizzata	91

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE E SCOPO

### 1.1 Obiettivo dello studio

La presente tesi è stata svolta nei laboratori del DICA (Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale) in seno al 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), finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali e a cui è stato dato avvio nel 2010.

Il fine di tale progetto è quello di implementare tecnologie sostenibili ed economicamente vantaggiose per la rimozione dell'azoto dai digestati agrozootecnici tramite processi anaerobici.

Lo studio qui descritto si occupa del processo biologico Anammox (*ANAerobic AMMonium OXidation*) implementato in un MBR (*Membrane Biological Reactor*). I microrganismi Anammox sono in grado di ossidare l'azoto ammoniacale in ambienti anossici utilizzando l'azoto nitroso come accettore di elettroni. L'influente dovrà avere pertanto particolari concentrazioni di nitrito, ottenibili grazie ad una fase di parziale nitrosazione (Parnit) da anteporre a quella Anammox.

Avendo a disposizione un solo MBR, la sperimentazione si è dunque suddivisa in due momenti: il primo per lo studio del processo di parziale nitrosazione (Parnit) e il secondo per quello del processo Anammox. Dal punto di vista temporale i due momenti sono stati invertiti (Anammox dal mese di giugno al mese di dicembre 2011 e Parnit dal mese di marzo al mese di luglio 2012).

I processi sopra descritti presentano numerosi vantaggi tra cui l'assenza di richiesta di carbonio organico, la riduzione di oltre il 60% della domanda di ossigeno, la diminuzione fino al 90% della produzione di fanghi e un crollo dei costi di gestione (anche del 90%).

La tecnologia MBR invece assicura ingombri ridotti, buone capacità di disinfezione, carichi volumetrici maggiori e minore produzione di fanghi. Inoltre la membrana agisce come una barriera per i colloidali e aumenta il tempo di contatto tra biomassa e refluo a favore di una maggiore biodegradazione rispetto ai processi convenzionali.

Le problematiche riscontrate sono duplici. Da una parte sono legate alla tipologia di refluo da sottoporre a trattamento: l'alimento utilizzato, sia per l'MBR Parnit, sia per l'MBR Anammox, è profondamente diverso da uno scarico di tipo civile, a causa della presenza di alcuni elementi e/o composti inibenti, quali metalli pesanti, della variabilità stagionale di alcuni componenti e dell'elevate concentrazioni di azoto a fronte delle più modeste quantità di sostanza organica.

Dall'altra il *fouling* della membrana – a seconda della scelta ingegneristica effettuata - o riduce il flusso transmembrana o aumenta a dismisura la pressione transmembrana (TMP) con evidenti conseguenze strutturali sulla membrana stessa.

L'obiettivo è dunque quello di valutare la fattibilità e la stabilità dei processi Parnit e Anammox in un bioreattore a membrana.

## 1.2 Articolazione della tesi

La tesi descrive, nel Capitolo 2, qual è ad oggi lo stato dell'arte relativamente a:

- rimozione dell'azoto tramite processi biologici;
- processi MBR;
- utilizzo di MBR per rimozione dell'azoto tramite processi Anammox.

Il primo paragrafo si occupa di descrivere i processi tradizionali confrontandoli con altri più innovativi, tra cui, quelli oggetto dello studio: Parnit e Anammox. Il secondo, invece, esplica meglio la configurazione dei bioreattori a membrana, i loro utilizzi (aerobici, anaerobici e anossici) e le loro principali problematiche (*fouling*). Infine il terzo paragrafo descrive l'esperienza acquisita riguardo l'utilizzo degli MBR per i processi di rimozione dell'azoto mediante Anammox.

Il Capitolo 3 ha l'obiettivo di illustrare la configurazione degli impianti di cui ci si è avvalsi durante la sperimentazione. In questo capitolo vengono anche descritti le metodiche analitiche, gli strumenti utilizzati e le procedure adottate.

Nel Capitolo 4 e nel Capitolo 5 vengono descritti invece i funzionamenti operativi, le problematiche riscontrate e i risultati raccolti rispettivamente del processo Parnit e del processo Anammox. Essi verranno poi raccolti e riassunti nel capitolo conclusivo.

# CAPITOLO 2

## STATO DELL'ARTE

In questo capitolo verrà descritto lo stato dell'arte dei trattamenti di rimozione dell'azoto dai reflui (Paragrafo 2.1), dei reattori a biomembrana (MBR) e dell'utilizzo di questi ultimi per il controllo dei composti azotati mediante processo Anammox (Paragrafo 2.3).

### 2.1 Processi biologici per la rimozione dell'azoto

Le tecnologie attualmente disponibili per la rimozione dei composti azotati dai reflui sono numerose e presentano diverse caratteristiche in termini di applicabilità, conoscenza, economicità, problematicità e fattibilità tecnologica. Nei successivi paragrafi verranno descritte le più tradizionali e quelle che impiegano gli *ANAerobic AMMonium OXidation bacteria* (Anammox).

#### 2.1.1 Processi tradizionali

L'azoto nei liquami urbani e agrozootecnici è prevalentemente presente sotto forma organica e ammoniacale. La sua rimozione nei trattamenti primari dei reflui civili è limitata alla componente sedimentabile con rendimenti circa del 10% (Bonomo, 2008). Nei processi biologici per il solo l'abbattimento dell'inquinamento organico, invece, le reazioni di sintesi batterica permettono la sua rimozione tramite allontanamento con il fango di supero. I quantitativi sono modesti e si attestano attorno al 5% del BOD abbattuto (Bonomo, 2008). Si sono resi pertanto necessari trattamenti più spinti sempre per via biologica con fasi ossidative di nitrificazione e riduttive di denitrificazione in sequenza.

## Nitrificazione

La prima fase avviene in aerobiosi e vede la trasformazione dell'azoto ammoniacale  $\text{NH}_4^+$  in azoto nitroso  $\text{NO}_2^-$  prima e nitrico  $\text{NO}_3^-$  poi. Come per la rimozione della sostanza organica tale processo può avvenire sia a biomassa sospesa sia a biomassa adesa.

Nel primo caso il processo – generalmente contestuale a quello per la rimozione del BOD – si serve di una vasca di aerazione, di un sedimentatore e di un sistema di ricircolo del fango.

I tassi di crescita dei batteri nitrificanti sono generalmente più bassi rispetto a quelli dei batteri eterotrofi e si rendono pertanto necessari degli accorgimenti sul tempo di residenza idraulica HRT e sull'età del fango SRT nel momento in cui i processi di ossidazione dei composti azotati siano previsti contestualmente a quelli di rimozione del BOD.

Nel caso in cui si utilizzi, invece, un sistema a biomassa adesa è necessario prevedere la preliminare rimozione spinta della sostanza organica carboniosa. I batteri eterotrofi, infatti, in presenza di BOD, predominano sui batteri nitrificanti sulla superficie del film fisso.

Le popolazioni di batteri nitrificanti sono autotrofe - in quanto in grado di utilizzare carbonio inorganico per la sintesi cellulare - aerobiche obbligate, per le quali quindi l'ossigeno libero funge da accettore di elettroni.

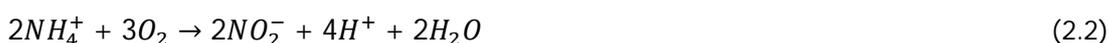
I batteri che operano l'ossidazione dell'azoto ammoniacale sono dei detti *Ammonium Oxidizing Bacteria* (AOB) e sono dei generi *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosorobrio*.

I batteri che operano l'ossidazione dell'azoto nitroso invece sono detti *Nitrite Oxidizing Bacteria* (NOB) e sono dei generi *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitroeystis*.

Gli AOB operano in realtà due reazioni: nella prima l'azoto ammoniacale viene convertito in idrossilammina tramite l'enzima ammonio-mono-ossigenasi (Eq. (2.1)), mentre nella seconda l'idrossilammina viene ossidata ad azoto nitroso mediante l'enzima idrossilammina-ossido-reduttasi.



Più sinteticamente si possono esprimere entrambi i processi con:



Gli NOB invece ossidano l'azoto nitroso secondo la seguente reazione:

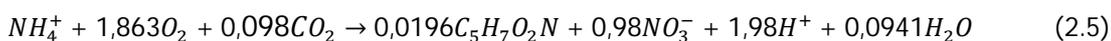


Il primo stadio (nitrosazione) è caratterizzato da cinetiche più lente e che risultano pertanto limitanti per l'intero processo. Risulta dunque difficile un accumulo di nitriti nel sistema.

La reazione complessiva di ossidazione risulta essere quindi:



Se si vogliono considerare anche le reazioni di sintesi della biomassa (indicata come  $C_5H_7O_2N$ ), si ottiene una reazione complessiva di ossidazione:



Per ogni grammo di azoto ammoniacale rimosso vengono dunque consumati 4,25 g di ossigeno libero e 0,308 g di anidride carbonica – diminuendo così l'alcalinità - e vengono prodotti 0,16 g di cellule batteriche (Bonomo, 2008).

Le reazioni di sintesi della biomassa avvengono a particolari condizioni di pH e temperatura e sono influenzate fortemente dalle concentrazioni di BOD e azoto.

Se per la temperatura il *range* è quello tipico per ogni coltivazione batterica (25 ÷ 35 C°), il pH risulta un parametro fondamentale per l'attività degli AOB e degli NOB: la massima resa si ha per valori compresi tra 7,5 e 8 (Metcalf & Eddy, 2003), mentre per pH inferiori a 6,8 la velocità delle reazioni risulta fortemente ridotta (Metcalf & Eddy, 2003).

### Denitrificazione

La fase successiva di denitrificazione avviene invece in anossia ed è operata dai batteri sia eterotrofi sia autotrofi: *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Spirillum*, *Vibrio*, *Paracoccus* e il più diffuso *Pseudomonas*.

Gran parte dei batteri denitrificati sono tipo aerobico facoltativo ossia in grado di utilizzare sia l'ossigeno sia gli ioni di azoto nitroso e nitrico come accettori di elettroni nelle reazioni di ossidazione biologica.

La presenza dunque di ossigeno interferisce con i processi di denitrificazione, inibendo l'enzima catalizzatore. La soglia individuata in letteratura (Bonomo, 2008) è di 0,2 mg L<sup>-1</sup>.

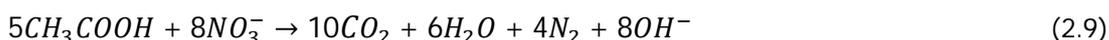
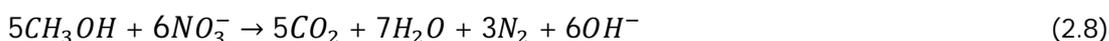
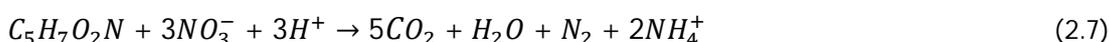
Alcuni generi di batteri denitrificanti possono operare anche in anaerobiosi in caso di assenza sia di ossigeno libero sia di nitrati (Bonomo, 2008).

La reazione di denitrificazione si sviluppa per fasi successive che porta lo ione nitrato a divenire azoto gassoso N<sub>2</sub> passando per ione nitrito, ossido nitrico e ossido nitroso.

Lo stadio di denitrificazione necessita di grandi quantitativi di substrato organico prontamente biodegradabile (in termini di rbCOD) che fornisca il carbonio necessario alla

sintesi e funga da donatore di elettroni nei processi dissimilativi di respirazione (Bonomo, 2008).

Le fonti più comuni di rbCOD sono quelle derivanti dal carbonio interno (Eq. (2.6)), ovvero la sostanza organica biodegradabile presente nei reflui addotti ai trattamenti biologici, dal carbonio esterno, costituito da composti organici rapidamente biodegradabili come metanolo  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Eq. (2.8)) o acido acetico  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Eq. (2.9)), o dal carbonio endogeno (Eq. (2.7)), costituito dalla componente organica biodegradabile risultante dai fenomeni di lisi delle cellule batteriche.



Risulta evidente che il processo di denitrificazione è fortemente influenzato dalla presenza di rbCOD. Henze et al. (1994) suggeriscono come rapporto carbonio/azoto valori compresi tra 3,5 e 4,5  $\text{g}_{\text{COD}} / \text{g}_\text{N}$ . Nella pratica in realtà son ben più elevati a causa di consumi aggiuntivi dovuti all'eventuale presenza di nitriti e di ossigeno libero. In termini di  $\text{CH}_3\text{OH}$  si può calcolare l'rbCOD con la seguente formula suggerita da Bonomo (2008):



E' evidente dalle formule sopra descritte che le reazioni di denitrificazione producono alcalinità, a differenza di quelle di nitrificazione viste sopra: 3,57 g di  $\text{CaCO}_3$  di alcalinità per ogni grammo di azoto nitrico ridotto (Bonomo, 2008).

Secondo Bonomo (2008) i batteri denitrificanti risultano molto meno sensibili al pH di quanto non lo siano i batteri nitrificanti: non si sono verificati infatti particolari rallentamenti delle cinetiche per pH compresi tra 7 e 9. Solo scendendo a pH 6 si sono riscontrate delle variazioni in negativo (Dawson & Murphy, 1972).

### Configurazioni impiantistiche

Esistono diverse configurazioni impiantistiche che prevedono o pre-denitrificazione o post-denitrificazione oppure entrambe le soluzioni. Vi sono anche impianti che prevedono una post-denitrificazione parziale con uso di carbonio interno.

Nel caso di reflui agrozootecnici ad alto contenuto di azoto si preferisce la configurazione della Figura 2.1, che rappresenta uno schema di trattamento con fasi di pre-denitrificazione e post-denitrificazione per via dei carichi elevati (in termini di azoto). Il refluo in ingresso al comparto biologico viene miscelato con una portata  $q_r$  somma della portata dei fanghi attivi  $q_{r1}$  e dei fanghi di supero  $q_{r2}$ . La fase di pre-denitrificazione innesca delle reazioni di riduzione dell'azoto nitrico, apportato con  $q_{r1}$ , ad  $N_2$ . Nella successiva fase aerobica avviene sia la rimozione del substrato organico sia l'ossidazione dell'azoto ammoniacale ad azoto nitrico. Prima di entrare nella successiva fase di post-denitrificazione, all'effluente viene aggiunto del carbonio esterno ( $CH_3OH$ ), utile vista la precedente fase aerobica per la rimozione del BOD. Prima di accedere al sedimentatore secondario il refluo viene aerato per rimuovere il carbonio esterno in eccesso. Nel sedimentatore secondario avviene poi l'estrazione dei fanghi di supero ( $q_{r2} + q_s$ ), una cui quota viene ricircolata ( $q_{r2}$ ) e un'altra inviata alla linea di trattamento dei fanghi ( $q_s$ ).

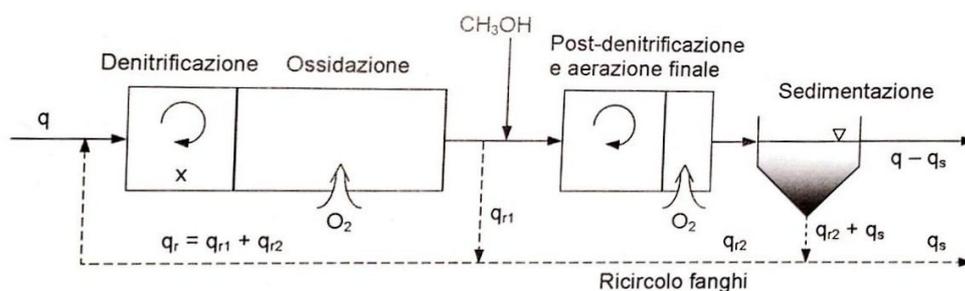


Figura 2.1 Schema di trattamento per l'abbattimento spinto dell'azoto, con fasi di pre-denitrificazione e di post-denitrificazione con uso di fonte di carbonio esterna e con aerazione terminale

## 2.1.2 Processi biologici innovativi per la rimozione dell'azoto da reflui agrozootecnici

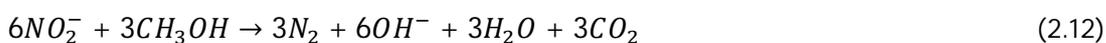
I processi di tipo biologico convenzionali sono diffusi e applicati anche su reflui concentrati quali i reflui agrozootecnici.

La recente diffusione della tecnologia di digestione anaerobica, con conseguente drastica riduzione dell'rbCOD nel digestato, ha incoraggiato lo sviluppo di soluzioni alternative. Infatti reflui di digestione sono caratterizzati da concentrazioni di azoto molto elevate ( $> 500 \text{ mg}_N \text{ L}^{-1}$ ), ben superiori a quelle tipiche dei reflui civili e da un contenuto di sostanza organica biodegradabile in genere non sufficiente per la denitrificazione tradizionale.

Recenti esperienze alla scala laboratorio su reflui suinicoli, soprattutto negli USA (Vanotti et al., 2006; Szogi et al., 2007) ed in Corea, (Dong & Tollner, 2003; Ahn et al., 2004) stanno già dimostrando l'applicabilità dei processi che verranno descritti poco più avanti.

## ***Trattamento biologico di rimozione dell'azoto "via nitrito"***

La soluzione più semplice dal punto di vista impiantistico e della stabilità operativa è quella che impiega una nitrosazione ed una successiva denitrosazione:



Il risparmio rispetto al processo tradizionale è lampante (Abeling & Seyfried, 1992): il fabbisogno di ossigeno si riduce del 25%, si può operare con minori concentrazioni di ossigeno disciolto (DO) – con una conseguente maggiore efficacia di dissoluzione dell'ossigeno - il fabbisogno rbCOD in denitrosazione si riduce del 40% e l'ingombro delle vasche di reazione è più contenuto.

Il vantaggio complessivo di questo processo risulta strettamente correlato con il carico di ammoniaca da rimuovere e con il rapporto N/COD del refluo da trattare.

La biomassa utilizzata non è diversa da quella che opera negli impianti convenzionali: sono le condizioni operative ad essere diverse: il fine è sopprimere gli NOB.

Il più noto e diffuso sistema in grado di creare questo tipo di condizioni è il processo SHARON (*Single reactor High-activity Ammonia Removal Over Nitrite*) che evita stabilmente l'ossidazione del nitrito a nitrato (nitratazione), mantenendo un'età del fango molto bassa con temperature di lavoro tra i 30 e i 40 °C.

## ***Trattamento biologico Anammox***

### ***Scoperta e filogenesi***

Per moltissimo tempo si pensava non fosse possibile ossidare l'azoto ammoniacale in ambienti anossici (Kuenen, 2008). Solo con Broda (1977) si prese in considerazione tale possibilità anche se ancora era ritenuta non praticabile dal punto di vista biologico.

Nel 1986 Arnold Mulder osservò per la prima volta - in un reattore di denitrificazione a scala pilota nello stabilimento di produzione del lievito Gist – Brocades (Delft, Paesi Bassi) - la scomparsa di azoto ammoniacale e la produzione azoto gassoso (Mulder et al., 1995).

Il nome che fu dato a questo processo fu appunto Anammox (*ANAerobic AMMonium OXidation*). Non era ancora certo però se l'ossidazione dell'ammonio in ambienti privi di ossigeno fosse una reazione chimica spontanea o mediata biologicamente.

Si utilizzarono così dell'ammonio marcato con  $^{15}\text{N}$  e dei nitrati marcati con  $^{14}\text{N}$  in alimento ad un reattore a letto fluido a scala di laboratorio per verificare se l'azoto gassoso avesse origine ammoniacale. I risultati furono sorprendenti: l'azoto gassoso era una miscela di  $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$  (Mulder et al., 1995; Van de Graaf et al., 1996).

Prove successive mediante raggi gamma e trattamenti termici dimostrarono ulteriormente che ci si trovava effettivamente davanti a una reazione di tipo biologico e che tali batteri preferivano il nitrito al nitrato per l'ossidazione dell'azoto ammoniacale (Kuenen, 2008) secondo la reazione:



La reazione Anammox fu riprodotta a scala di laboratorio utilizzando campioni prelevati dall'impianto pilota, ma la produzione di azoto gassoso cessava nel giro di 24 ÷ 48 ore e diversi arricchimenti non riuscirono comunque a prolungare la reazione. La soluzione finale si trovò nello sviluppo di un sistema che comprendesse un reattore a letto fluidizzato alimentato in continuo con un mezzo minerale, contenente ammonio e nitriti (piuttosto che nitrato) (Kuenen, 2008).

I test a marcatura  $^{15}\text{N}$  rivelarono inoltre che la combinazione di  $^{14}\text{N}$ -ammonio con  $^{15}\text{N}$ -idrossilammina produceva  $^{14,15}\text{N}_2$  (Van de Graaf et al., 1997). Questa scoperta indicò che l'ammonio non veniva ossidato subito a idrossilammina, come nel caso aerobico, e che l'idrossilammina reagisse con l'ammonio per formare un composto intermedio. Si ipotizzò che fosse l'idrazina.

Nel 1997 l'identità del batterio Anammox non era ancora chiara perché una coltura pura non poteva essere ottenuta e gli arricchimenti erano troppo grezzi per determinare anche i soli tassi di crescita batterica e le proprietà cinetiche.

Utilizzando un reattore SBR (*Sequencing Batch Reactor*) Marc Strous (Strous et al., 1998; Kuenen, 2008) riuscì ad isolare una coltura di microrganismi di tipo Anammox. Il principale ostacolo nel purificare il batterio fu, ed è ancora, il suo tasso di crescita estremamente basso, con un tempo di duplicazione di circa due settimane.

Grazie ad analisi al microscopio elettronico furono riscontrate caratteristiche filogenetiche simili ai *Planctomycetes*, che successivi studi sulle sequenze genetiche del gene 16S rRNA confermarono (Kuenen, 2008).

Attualmente sono noti cinque generi di batteri Anammox (Figura 2.2) a cui, per l'incapacità iniziale di essere mantenuti in coltura pura, viene attribuito lo stato tassonomico di

*Candidatus*: *Candidatus Anammoxoglobus* (Kartal et al., 2007a), *Candidatus Brocadia* (Strous et al., 1999; Kartal et al., 2008), *Candidatus Jettenia* (Quan et al., 2008), *Candidatus Kuenenia* (Schmid et al., 2000; Strous et al., 2006), e *Candidatus Scalindua* (Kuypers et al., 2003; Schmid et al., 2003; Van de Vossenberg et al., 2008).

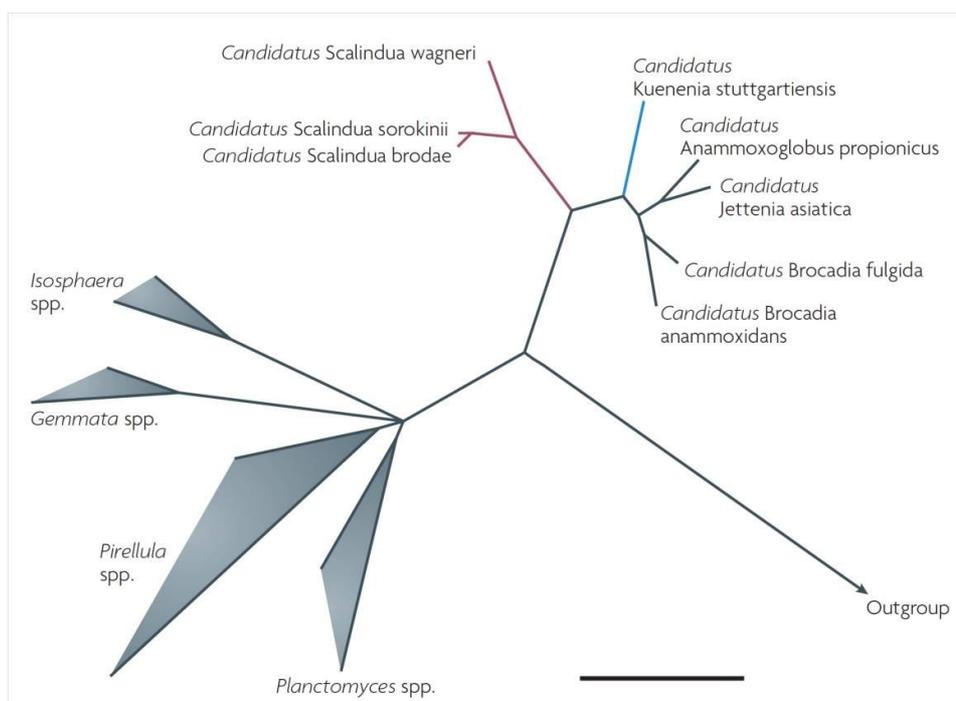


Figura 2.2 Albero filogenetico dei microrganismi Anammox. La barra rappresenta il 10% di divergenza di sequenza (Kuenen, 2008)

### Struttura degli Anammox bacteria

La biomassa Anammox si presenta come un ammasso granulare di colorazione variabile (rosso, rosa o marrone), funzione della percentuale di citocromo presente, ovvero la proteina responsabile del trasporto degli elettroni nella cellula. Appariranno pertanto rossi, rosa o marroni alla vista. La forma di questi microrganismi è tendenzialmente sferica (cocchi) con diametri inferiori al micrometro (Figura 2.3).

Essendo strettamente imparentati con i *Planctomycetes*, presentano organelli intracellulari legati alla membrana e possiedono una parete cellulare priva di peptidoglicano, polimero responsabile della rigidità della cellula (Konig et al., 1984; Liesack et al., 1986; Stackebrandt et al., 1986; Fuerst, 1995).

In aggiunta alla parete cellulare i *Planctomycetes* sono dotati di due membrane, tra le quali vi si trova del materiale citoplasmatico denominato parifloasma. La membrana più interna degli Anammox – detta intracitoplasmatica - custodisce un ulteriore compartimento dove vi si trovano i ribosomi (riboplasma), il DNA e un'altra membrana chiamata anammoxosoma

che racchiude all'incirca il 70% del volume della cellula batterica (Strous et al., 1999; Van Niftrik et al., 2008a; Van Niftrik et al., 2008b).

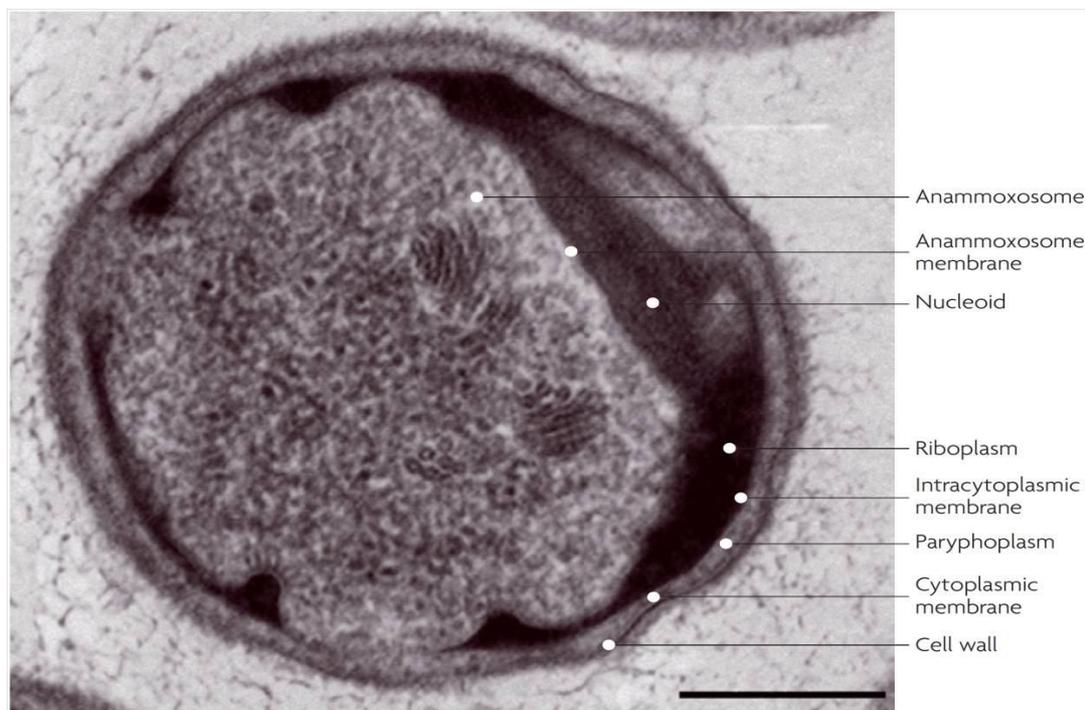
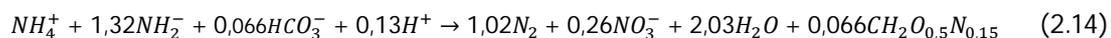


Figura 2.3 Fotografia al microscopio di un batterio Anammox (*Candidatus Kuenenia*) (Kuenen, 2008)

### Stechiometrie e cinetiche

Gli Anammox sono autotrofi anaerobici e chemiolitotrofi e, come detto nei paragrafi precedenti, la prima stechiometria di processo fu proposta da Strous et al. (1998). Un'analisi dei bilanci di massa mostrò che l'organismo utilizzava l'anidride carbonica come fonte di carbonio per la produzione di biomassa ( $\text{CH}_2\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,15}$ ) e che il nitrito non funzionava solo come un accettore di elettroni per l'ossidazione di ammonio, ma anche come un donatore di elettroni per la riduzione della  $\text{CO}_2$  (Strous et al., 1998; Kuenen, 2008;).

Se circa l'89% dell'azoto in ingresso (ammoniacale e nitroso) viene convertito in  $\text{N}_2$ , il restante 11% viene invece ossidato ad azoto nitrico per produrre gli elettroni equivalenti richiesti per la sintesi di nuova biomassa (Strous et al., 1998).



Secondo l'equazione (2.14) è sempre necessario un rapporto tra  $N - NO_2^-$  e  $N - NH_4^+$  pari a 1,32 ed è pertanto necessario prevedere un processo di nitrosazione parziale (Parnit) a monte del processo Anammox, così da ottenere un'ossidazione aerobica ad azoto nitroso del 50% circa dell'azoto ammoniacale in ingresso.

Rispetto ai processi biologici tradizionali Anammox non richiede carbonio organico prontamente biodegradabile (rbCOD in fase di denitrificazione) e la nitrosazione permette di risparmiare circa il 63% dell'ossigeno (Jetten et al. 1998; Van Dongen et al. 2001).

Inoltre il processo Anammox ha una produzione di fango piuttosto bassa, grazie alle rese cellulari piuttosto contenute ( $0,159 \div 0,165 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{g}_{\text{N-NH}_4^+}$ ). Anche il rapporto tra emissioni ( $CO_2$ ,  $N_2O$  e  $NO$ ) e carico di azoto influente è decisamente ridotto rispetto a quelli rintracciabili nei trattamenti tradizionali (Kampschreuer et al. 2008; Pellicer – Nàcher et al. 2010). Tutte peculiarità che lo rendono ingegneristicamente interessante.

Un'altra delle particolarità fondamentali della biomassa Anammox è il già citato basso tasso di crescita pari a circa  $0,065 \text{ d}^{-1}$  (Strous et al. 1998), già ravvisato nelle prime ricerche su questo microorganismo.

L'attività dell'Anammox è fortemente influenzata dal pH e – in secondo luogo - dalla temperatura. Il *range* ottimale è stato individuato per valori di pH compresi tra 6,7 e 8,3, con massimi intorno a 8,0 per *Candidatus Brocadia Anammoxidans* (Jetten et al., 1998; Strous et al., 1999), e di temperatura oscillanti tra i 37 e i 40 °C (Strous et al., 1999). Ulteriori ricerche hanno dimostrato che è comunque possibile adattare gli Anammox ad habitat particolarmente alcalini (9,3) (Ahn et al., 2004) o a temperature prossime a quella ambiente (Egli et al. 2001; Vázquez –Padín et al., 2011).

Oggetto fondamentale dello studio sugli Anammox è stato, ed è ancora, il loro metabolismo. Già Van de Graaf et al. (1997) ipotizzarono la riduzione dello ione nitrito ad idrossilammina a monte della formazione dell'idrazina che viene poi ossidata ad azoto gassoso (Figura 2.4 (A)).

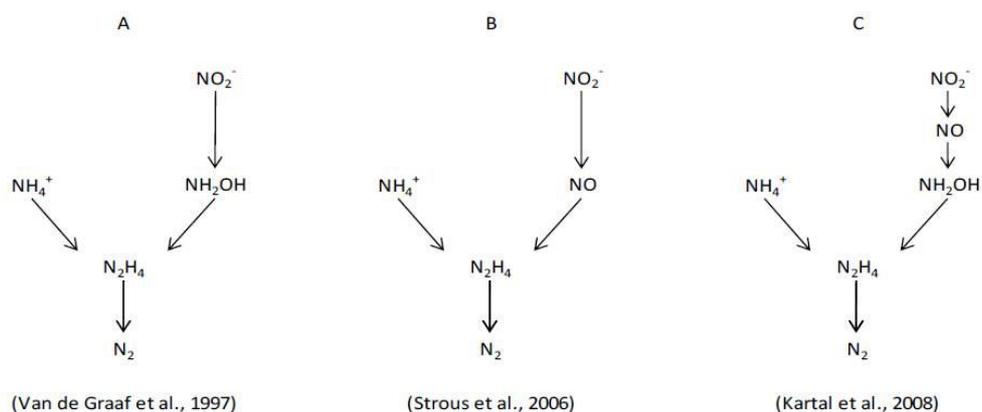


Figura 2.4 Metabolismo dell'Anammox secondo Van de Graaf et al. (1997), Strous et al. (2006) e Kartal et al. (2008)

Strous et al. (2006) individuarono nel metabolismo Anammox una serie di almeno tre reazioni (Figura 2.4 (B)): la riduzione del nitrito ad ossido nitrico (Eq. (2.15)), la condensazione dell'ossido nitrico e dell'ammonio a formare idrazina (Eq. (2.16)) e l'ossidazione dell'idrazina ad azoto molecolare (Eq. (2.17)).



Con Kartal et al. nel 2008, si individuò una riduzione aggiuntiva (Figura 2.4 (C)): da ossido nitrico a idrossilammina con la conseguente combinazione dell'idrossilammina con l'ammonio al fine di formare l'idrazina.

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). Dalla colorazione dell'enzima citocromo perossidasi, si è potuto evidenziare che le proteine citocromo sono soprattutto presenti sulla superficie interna dell'anammoxosoma. Si suppone che esse partecipino alla catena di trasporto degli elettroni rafforzando così il ruolo energetico dell'anammoxosoma.

Dagli studi sul genoma del *Kuenenia Stutgartiensis* si identificarono i geni che codificano gli enzimi responsabili del metabolismo Anammox: il nitrato-nitrito ossido reduttasi (NarGH), l'ossido nitrico-nitrito ossidoreduttasi (Nir) (Baker et al., 1997) e nove enzimi, paraloghi divergenti, dell'idrossilammina-idrazina ossidoreduttasi (HAO e HZO rispettivamente) (Hooper et al., 1997). La presenza dell'enzima Nir fu giudicata singolare visto che in precedenza l'ossido nitrico NO non era riconosciuto come intermedio del metabolismo Anammox (Figura 2.4 (A)).

Questo importante ruolo degli enzimi HAO e HZO fa emergere rilevanti similarità con il metabolismo dei batteri AOB, per i quali l'ossidazione dell'idrossilammina e dell'idrazina rimane fondamentale per il proprio metabolismo (Jetten et al., 2009).

Nonostante l'individuazione dell'enzima HAO non fu chiaro da subito il ruolo dell'idrossilammina nel metabolismo Anammox, visto che Strous nel 2006 non la prevedeva come composto intermedio.

Kartal et al. nel 2011 dimostrarono che l'ossido nitrico era un diretto precursore dell'idrazina, e che i microrganismi Anammox incubati con ammonio e idrossilammina erano in grado di produrre idrazina. Con questo studio si riuscì a dimostrare che entrambe le vie metaboliche

erano praticabili. Ad oggi, però, non si conosce ancora quale sia il fattore discriminante tra l'una e l'altra.

Molte sono ancora le domande senza risposta riguardo il metabolismo Anammox: come avviene la combinazione tra ammonio e ossido nitrico, tramite legame azoto-azoto, per formare l'idrazina (Harhangi et al., 2011) o come ha luogo la riduzione dell'azoto nitroso ad azoto ammoniacale.

Quest'ultima reazione è stata identificata da Strous & Jetten (2004) in particolari condizioni di stress per l'Anammox ed è necessaria per spiegare la capacità della biomassa di ridurre gli ioni nitrato ad azoto gassoso in assenza di ammonio, utilizzando acidi organici come unica fonte di carbonio (Güven et al., 2005; Kartal et al., 2007a). Recenti studi hanno infatti mostrato che gli Anammox non sono strettamente chemiolitotrofi: oltre alla conversione di ammonio e nitrito sono anche in grado di ridurre sia il nitrato a nitrito e ad azoto molecolare, sia il nitrito ad ammonio, utilizzando acidi organici o lo ione  $Fe^{2+}$  come donatori di elettroni.

### Inibizione

L'ossigeno disciolto (DO) è uno dei principali inibenti dell'attività Anammox. Già con percentuali dello 0,25% in volume (condizioni standard) risulta infatti compromessa, anche se reversibilmente (fino al 2%). (Strous et al. 1997; Egli et al. 2001).

Se alte concentrazioni di azoto ammoniacale e nitrico ( $> 1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) non hanno mostrato effetti negativi sulla biomassa, sono numerose le ricerche che documentano un effetto inibente irreversibile a causa di accumuli di azoto nitroso (Strous et al., 1999). Se Strous et al. (1999) individuano una prima riduzione dell'efficienza di rimozione oltre i  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , altri vedono questa soglia più alta ( $180 \text{ mg L}^{-1}$  per Van de Graaf et al. (1996)) o più bassa (fino a  $30\div 50 \text{ mg L}^{-1}$  per sei giorni di esposizione per Fux et al. (2004)).

Dapena - Mora et al. (2007) individuarono invece la concentrazione in grado di inibire il 50% della biomassa ( $IC_{50}$ ) nel valore di  $350 \text{ mg}_{N-NO_2} \text{ L}^{-1}$ : osservazione del tutto discordante con quanto affermato da Strous nel 1999 in merito all'irreversibilità dell'inibizione da nitrito.

Kimura et al. (2010) documentarono da un esperimento in batch che l'attività iniziava a decrescere oltre i  $274 \text{ mg}_{N-NO_2} \text{ L}^{-1}$ , mentre nel caso di alimentazione in continuo si rilevò un decremento del 10% per concentrazioni nell'alimento di oltre  $750 \text{ mg}_{N-NO_2} \text{ L}^{-1}$ . L'inibizione si rilevò però reversibile, in quanto - in seguito ad una diminuzione dell'azoto nitroso nell'influente - dopo tre giorni venne a ripristinarsi la normale attività.

Lotti nel 2012 dimostrò che all'aumentare del tempo di esposizione ad alte concentrazioni di azoto nitroso si verificavano perdite più elevate di attività specifica. In particolare, per esposizioni alle concentrazioni di  $1000 \text{ mg}_{N-NO_2} \text{ L}^{-1}$ , si riscontravano perdite del 20% circa per 2 ore di esposizione e del 90% circa per 24 ore di esposizione.

Nella medesima ricerca si dimostrò l'incapacità degli ioni nitrito di pregiudicare completamente il metabolismo Anammox: in seguito ad esposizioni a concentrazioni di azoto nitroso pari a  $6 \text{ mg}_{\text{N-NO}_2^-} \text{ L}^{-1}$  la biomassa diede prova di recuperi dell'attività prossimi al 50%. Sempre Lotti (2012) dimostrò la completa reversibilità dell'inibizione da DO fino a concentrazioni vicine alla saturazione.

La presenza di sostanza organica invece, pur non interferendo direttamente con il metabolismo Anammox, favorisce la crescita dei batteri eterotrofi denitrificanti (Dapena - Mora et al. 2007) e il lento tasso di crescita dei batteri Anammox li pone in svantaggio nella competizione per lo spazio e il substrato (Chamchoi et al. 2008; Lackner et al. 2008). Altri ricerche documentano un effetto inibente dell'acetato e altri composti organici alimentati con rapporti carbonio/azoto prossimi a 2 (Chamchoi et al. 2008; Molinuevo et al. 2009).

Esistono anche altri composti che possono compromettere l'attività Anammox come gli antibiotici, il cloruro di sodio e gli agenti flocculanti.

### *Gli Anammox nel trattamento delle acque*

Il processo Anammox trova molte applicazioni – in particolare a scala di laboratorio - solitamente con reflui ad alto contenuto di ammonio e basso rapporto di carbonio/azoto.

Il primo reattore Anammox a scala reale – con una volumetria di  $70 \text{ m}^3$  - fu realizzato presso l'impianto di trattamento delle acque reflue di Sluisjesdijk (Rotterdam, Paesi Bassi) per il trattamento del digestato. Tuttora in funzione ha una capacità di trattamento di circa  $750 \text{ kg}_\text{N} \text{ d}^{-1}$  (Van der Star et al. 2007).

Nonostante il risparmio dato dal minor utilizzo di reagenti e dalla minor ossigenazione richiesta, gli impianti a scala reale non sono certo numerosi.

Il freno principale all'implementazione di questa tecnologia è da ricercarsi nei costi elevati per le attrezzature ingegneristiche: la particolare configurazione dei reattori e la lenta crescita della biomassa sono i due principali problemi.

### *Configurazioni impiantistiche*

La necessità di un processo di parziale nitrosazione (Parnit) a monte del processo Anammox apre a diverse soluzioni impiantistiche.

#### **Configurazione a reattore singolo**

La presenza contestuale di biomassa Anammox e AOB può essere tranquillamente realizzata nonostante le diverse esigenze dei due ceppi batterici. Gli impianti di questo tipo si basano sull'integrazione, appunto, di entrambi i processi, dove il gradiente di DO può essere ottenuto realizzando uno strato aerobico e uno anossico, permettendo così sia l'attività degli

AOB sia degli Anammox (Gong et al. 2007; Bao et al. 2009; Xiao et al. 2009; Vlaeminck et al. 2009).

Tale strategia può essere ottenuta mediante il mantenimento dell'ossigeno disciolto in condizioni limitanti. Il processo CANON (*Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*) (Kuai & Verstraete 1998; Third et al. 2001; Sliekers et al. 2003; Zhang et al. 2006), il processo OLAND (*Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification*) (Kuai & Verstraete 1998; Verstraete & Philips 1998; De Clippeleir et al. 2011) e il processo DEMON (*DEAMmonification a pH controllato*) (Wett, 2007) sono validi esempi di combinazione della nitrosazione parziale con gli Anammox.

### **Configurazione bifase**

Questa configurazione prevede due reattori distinti posti in sequenza: Parnit prima e Anammox poi. Questo approccio permettere di ottimizzare i processi senza cercare soluzioni di compromesso tra i due generi batterici.

Nel reattore di nitrosazione parziale (Parnit) avviene la trasformazione di circa il 50% dell'azoto ammoniacale in azoto nitroso, così da produrre la miscela adatta per il processo Anammox successivo.

La concentrazione di DO nel reattore è compresa tra gli 1,5 e i 2,0 mg<sub>O2</sub> L<sup>-1</sup>. Gli NOB sono inibiti dalle alte concentrazioni di ammonio e nitrito, che garantiscono l'inesistenza di fenomeni di nitratazione dell'azoto nitroso.

Il controllo del processo è solitamente affidato al controllo dell'alcalinità, infatti, mantenendo il rapporto molare ammonio/alcalinità pari a 1, si garantisce la nitrosazione del 50% circa dell'azoto ammoniacale, poiché solo il 50% dei protoni prodotti dall'ossidazione dello ione ammonio può essere bilanciato con la capacità tampone del bicarbonato.

Il massimo rateo di rimozione 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).

Nel reattore Anammox vengono mantenute condizioni anossiche in modo da creare le condizioni utili all'arricchimento degli specifici generi batterici. L'effettiva rimozione dell'azoto avviene principalmente ad opera dei batteri Anammox e solo in piccola parte da batteri eterotrofi denitrificanti. I principali parametri di funzionamento sono costituiti dal pH, dalla temperatura, dall'SRT e dall'agitazione meccanica. Quest'ultimo parametro – a prima vista poco importante – è invece fondamentale nel qual caso si utilizzi un reattore a biomassa granulare: miscele troppo energiche potrebbero disaggregare i granuli, inficiando sulla resa del processo (Arrojo et al., 2006).

Il primo impianto con un sistema bifase è stato per il processo SHARON (*Single reactor system for High Ammonia Removal Over Nitrite process*) – Anammox (Van Dongen et al. 2001), adoperato per il trattamento dei fanghi da digestore nell'impianto di trattamento delle acque reflue di Rotterdam – Dokhaven.

## 2.2 Bioreattori a membrana

I bioreattori a membrana (*Membrane BioReactor*, MBR) combinano un processo a fanghi attivi con una diretta separazione solido-liquido mediante filtrazione su membrana (micro o ultrafiltrazione) in sostituzione del solito passo di sedimentazione (Bonomo, 2008; Teli, 2010). Gli MBR hanno numerosi vantaggi: ingombro ridotto, buona capacità di rimozione della carica microbica, carico volumetrico maggiore e minore produzione di fanghi (Teli, 2010). Inoltre la membrana agisce come una barriera per i colloidali e aumenta il tempo di contatto tra biomassa e refluo a favore di una maggiore biodegradazione rispetto ai processi convenzionali a fanghi attivi (Teli, 2010). In un MBR si possono anche riscontrare migliori condizioni di crescita per i batteri. Infatti tale soluzione favorisce la selettività delle specie batteriche in funzione della loro capacità di formare fiocchi ben sedimentabili. Altri microrganismi, per quanto adatti a biodegradare gli inquinanti, non sono in grado di aggregarsi in colonie di dimensioni sufficienti ( $> 100 \mu\text{m}$ ) e vengono così dilavati nello scarico senza avere la possibilità di svilupparsi in quantità significative per la depurazione (Bonomo, 2008). Grazie alle elevate età del fango (SRT), inoltre, si formano comunità batteriche specifiche e con caratteristiche di degradazione più efficaci rispetto al substrato organico nell'effluente (Teli, 2010).

La tecnologia MBR è quindi considerata efficace per acque reflue civili e industriali. I principali inconvenienti sono legati per lo più al *fouling* (sporcamento) della membrana e alle sue conseguenze in termini di costi di manutenzione e di funzionamento (Le-Clech et al., 2006; Meng et al., 2009; Teli, 2010).

### 2.2.1 Configurazione dei reattori a membrana

Si distinguono due configurazioni MBR: *side-stream* o *a membrana sommersa* (Bonomo, 2008; Teli, 2010) (Figura 2.5). Gli MBR *side-stream* furono i primi bioreattori a membrana e furono commercializzati alla fine degli anni '60 (Bemberis et al., 1971). Essi prevedono membrane collocate in uno scompartimento distinto dal reattore biologico. Il retentato viene pertanto ricircolato al reattore. Sia la pressione transmembrana (TMP) sia la velocità del flusso di attraversamento della membrana (CFV) sono determinate dalla pompa di ricircolo con conseguenti elevate richieste di energia a causa delle alte pressioni e dei flussi volumetrici imposti (Judd, 2010).

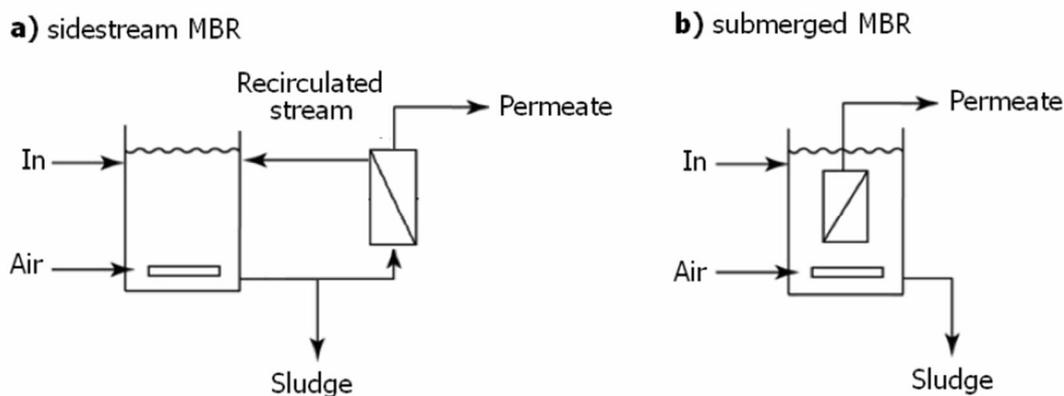


Figura 2.5 Schema di un impianto MBR *side-stream* (a) e *a membrana sommersa* (b)  
(Teli, 2010)

La configurazione sommersa consiste in un modulo filtrante direttamente immerso nel bioreattore, eliminando così il circuito di ricircolo. Inoltre le pompe, impiegate in aspirazione, permettono grandi risparmi dal punto di vista energetico, ma flussi decisamente più contenuti (10 ÷ 30 LMH) rispetto alla configurazione *side-stream* (40 ÷ 100 LMH) (Teli, 2010).

Oltretutto i moduli delle membrane utilizzati in molti MBR a membrana sommersa sono contenuti sia nelle dimensioni, sia nei costi; peculiarità che rendono possibile utilizzare più membrane nel medesimo bioreattore.

Tuttavia gli MBR *side-stream* hanno il vantaggio di essere più robusti, di resistere meglio alle sollecitazioni meccaniche e di essere più flessibili per il controllo della velocità del flusso di attraversamento della membrana (Teli, 2010). Inoltre gli MBR *side-stream* consentono più facilmente la sostituzione del modulo e i lavaggi chimici in situ senza rischi per la biomassa (Judd, 2010). Ora sono per lo più utilizzati nel trattamento delle acque reflue industriali, in cui la portata affluente e le caratteristiche degli inquinanti hanno maggiore variabilità (Evenblij, 2006).

## 2.2.2 Processi a membrana

La filtrazione mediante membrana è un processo di separazione in cui una membrana agisce come barriera permettendo ad alcuni componenti fisici o chimici di passare più facilmente attraverso di essa rispetto ad altri (permselectività). Il grado di selettività dipende ovviamente dalla dimensione dei pori della membrana (Bonomo, 2008).

La membrana più grossolana, associata alla microfiltrazione (MF), può rifiutare particolato, mentre la membrana più selettiva, associata all'osmosi inversa (RO), può respingere anche

ioni monovalenti (Teli, 2010). Nel complesso i quattro processi di separazione a membrana in cui l'acqua costituisce il permeato prodotto sono: l'osmosi inversa (RO), la nanofiltrazione (NF), l'ultrafiltrazione (UF) e la microfiltrazione MF (Judd, 2010). In MF e UF la chimica delle membrane non gioca un ruolo importante nel processo di separazione (Lonsdale, 1982). Tuttavia essa influenza notevolmente le prestazioni del processo per via delle interazioni tra inquinanti, componenti attivi del fango e membrana.

La dimensione dei pori può essere definita in termini di diametro efficace equivalente dei pori, normalmente in  $\mu\text{m}$ , o in massa equivalente – in Dalton (Da) - della più piccola molecola che la membrana è in grado di respingere: il MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) (Teli, 2010).

Alle membrane per la microfiltrazione è quindi assegnata una dimensione caratteristica dei pori in  $\mu\text{m}$ , ma il valore esatto dipende dal metodo di misurazione. Per membrane UF la selettività è definita dal MWCO. La relazione che intercorre tra MWCO e dimensione dei pori è dipendente dalla natura fisica e chimica della molecola di soluto (Judd & Jefferson, 2003). Inoltre per una membrana UF con una data distribuzione di dimensioni di pori esiste una relazione tra il MWCO e il coefficiente di rifiuto del soluto  $R_C$ :

$$R_C = 1 - \frac{C_P}{C_F} \quad (2.18)$$

dove  $C_F$  è la concentrazione del soluto riferimento nel flusso di alimentazione e  $C_P$  la concentrazione nel permeato.

L'MWCO nominale è normalmente definito come il peso molecolare di un soluto per cui l' $R_C$  è uguale a 0,95. L'MWCO assume valori tipicamente compresi nell'intervallo 2000 – 100000, anche se si riscontrano più facilmente misurazioni intorno a 10000 (Richardson, 2002).

La dimensione effettiva dei pori per membrane NF e RO influenza poco il processo, dato che ci sono altri meccanismi di setacciatura semplice che determinano in modo più sensibile le prestazioni delle membrane (Judd & Jefferson, 2003). Le prestazioni di queste membrane possono essere valutate in base alla loro effettiva permselectività, ovvero la misura del rigetto dei contaminanti fondamentali da parte della membrana, fissati taluni parametri.

Le membrane NF, che hanno una componente di rifiuto carica, sono generalmente progettate per essere selettive per ioni polivalenti e monovalenti, mentre le membrane RO sono concepite per respingere tutte le specie diverse dall'acqua (Judd & Jefferson, 2003).

Per i processi a membrana NF e RO vengono applicate delle pressioni per forzare il passaggio dell'acqua attraverso la membrana. Se non vi è flusso di retentato l'operazione è denominata "*dead-end*", se il retentato circola costantemente allora l'operazione è chiamata *cross-flow*. Il

*cross-flow* implica che, per un singolo passaggio di alimentazione dell'acqua attraverso la membrana, solo una frazione viene convertita in permeato (Teli, 2010).

Questa frazione viene definita secondo un parametro chiamato "conversione" o "recupero". Nel caso di otturazione dei pori, la resistenza alla filtrazione aumenta in funzione del deposito delle particelle e dell'adsorbimento. Viene così utilizzata dell'insufflazione di aria per promuovere la turbolenza così da limitare la deposizione. Per processi a flusso incrociato questa deposizione continuerà finché le forze aderenti sono bilanciate dalle forze abrasive del fluido (liquido o una combinazione di aria e liquido) (Judd, 2010).

### *Materiali e configurazione delle membrane*

Le membrane possono essere costituite principalmente da due tipologie di materiali:

- polimerici;
- ceramici.

Queste ultime non sono le più utilizzate, nonostante le ottime proprietà termiche ed idrauliche, a causa del loro costo elevato (Le-Clech et al., 2006).

Le membrane polimeriche erano inizialmente costituite da materiali cellulosici naturali. Oggi hanno trovato maggior impiego composti sintetici, come la poliammide, il polisulfone, il policarbonato o fluoruro di polivinile, per la loro migliore stabilità chimica e migliore resistenza alla degradazione (Teli, 2010).

La maggior parte delle membrane MF hanno una struttura simmetrica dei pori e possono avere una porosità prossima all'80%. Membrane UF hanno una struttura asimmetrica con pori di 1 ÷ 2 micron con uno strato superficiale dotato di cavità di diametro più grande (anche 100 micron) (Figura 2.6).

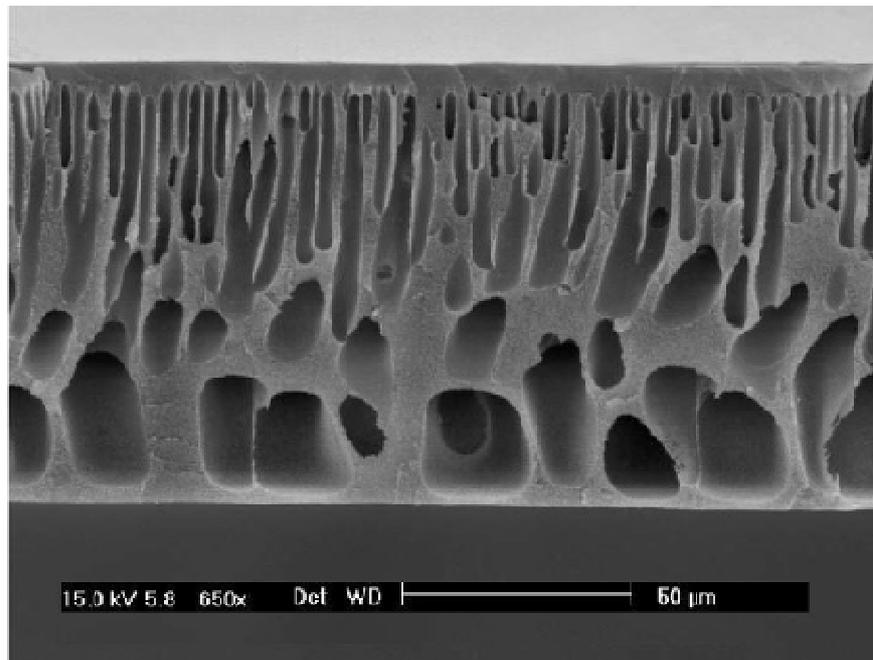


Figura 2.6 Sezione di una membrana asimmetrica per UF al microscopio elettronico: è evidente la differenza tra le ampiezze dei pori (Richardson, 2002).

Tale struttura asimmetrica è essenziale se si vogliono ottenere ragionevoli tassi di permeazione (Teli, 2010).

Le membrane polimeriche sono generalmente fabbricate per avere una elevata porosità superficiale e un *range* ristretto delle dimensioni dei pori, così da fornire un rigetto più selettivo possibile (Teli, 2010). Inoltre i materiali impiegati devono avere una certa resistenza termica e chimica, per via delle condizioni estreme a cui sono sottoposte le membrane in fase di lavaggio (Teli, 2010).

La configurazione della membrana, cioè la geometria e il modo in cui viene montata e orientata in relazione al flusso di acqua, è cruciale nel determinare il rendimento globale del processo. Altre considerazioni ingegneristiche riguardano il modo in cui i vari elementi della membrana, cioè le singole unità, sono alloggiati nei vari moduli.

Per gli MBR esistono fondamentalmente tre configurazioni principali che permettono la promozione di una certa turbolenza e una strategia di pulizia efficiente (Teli, 2010):

- lamiera piana (FS);

- fibra cava (HF);
- multitubolare (MT).

Secondo Judd (2007) è meglio utilizzare le membrane FS e HF in una configurazione sommersa all'interno del bioreattore, a differenza delle membrane MT per cui sarebbero preferibili usi *side-stream*.

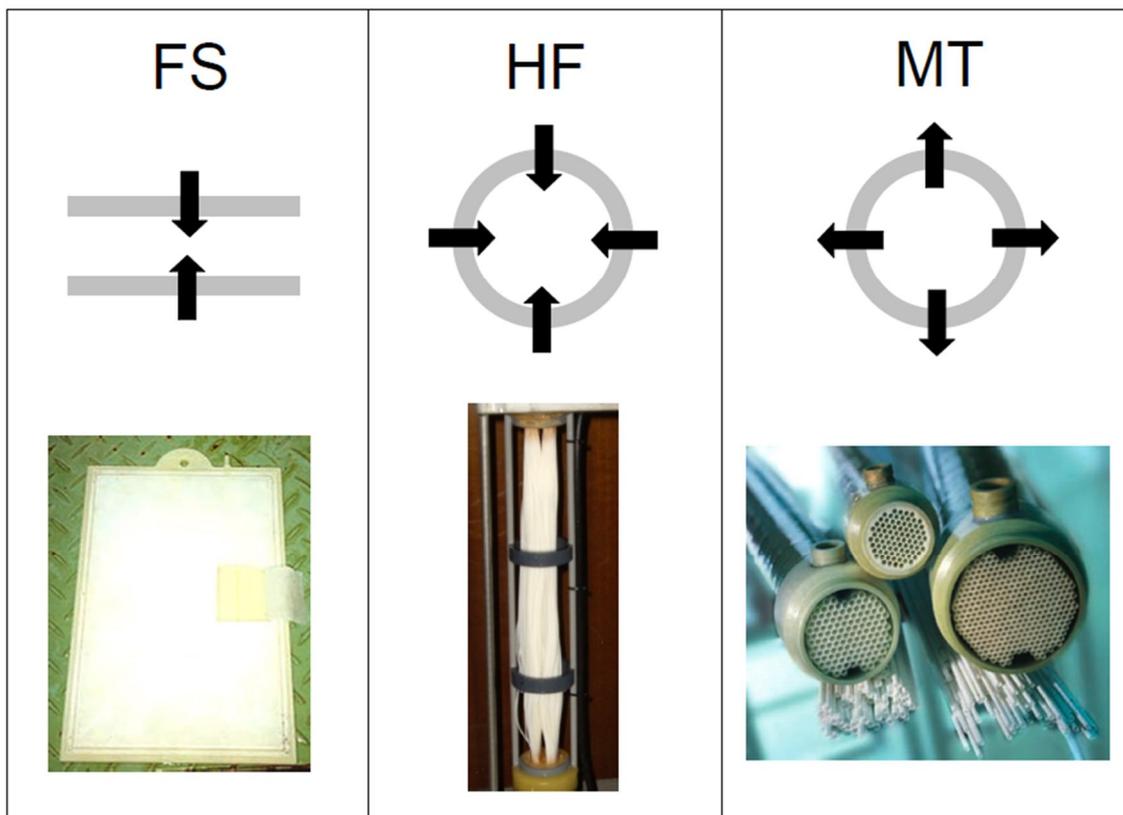


Figura 2.7 I diversi flussi a seconda della tipologia di membrana (Teli, 2010)

Un parametro importante nell'MBR è la distanza interstiziale, che è definita da:

- il diametro del tubo per il MT;
- la distanza tra i filamenti per un HF;
- la larghezza del canale per un FS.

La densità di fibre nell'HF è dunque un parametro critico, poiché se troppo alto si ridurrà il divario interstiziale con eventuali rischi di intasamento (Teli, 2010). D'altra parte i moduli HF sono molto resistenti e difficilmente danno luogo a rotture o deformazioni in caso di

flusso invertito, tipicamente utilizzato in procedure di pulizia fisica che viene eseguita invertendo il flusso ad un tasso 2 ÷ 3 volte superiore al flusso diretto.

Il costo degli HF è più competitivo rispetto a quello degli FS, che richiedono però più apparecchiature (sistema di controlavaggio) (Teli, 2010).

Per gli FS e gli MT è disponibile una gamma più ampia di materiali. Essi possono avere una maggiore resistenza agli agenti chimici e al calore, a volte necessario per alcune applicazioni industriali (Teli, 2010).

Poiché sia gli FS che gli HF sono immersi nel reattore biologico aerato e lavorano con concentrazioni di MLSS simili, entrambi i sistemi sono destinati adattarsi al volume del serbatoio biologico aerato. Tuttavia il volume occupato dagli FS è molto maggiore e quindi si prevede l'utilizzo di bioreattori più grandi (Teli, 2010).

### Equazione generale della filtrazione a membrana

Ad oggi non è possibile fornire un'equazione, o un insieme di equazioni, che permetta la previsione del tasso di permeazione della membrana o il rigetto di talune sostanze (Richardson, 2002). L'equazione generale della membrana non è altro che un tentativo di indicare i fattori che possono essere importanti nel determinare la velocità di permeazione per processi in pressione (Richardson, 2002):

$$J = \frac{TMP - \Delta\Pi}{\mu_T \cdot R} \quad (2.19)$$

dove J è il flusso, cioè la quantità di fase liquida che passa attraverso una unità di superficie per unità di tempo, TMP è la pressione transmembrana, cioè la differenza di pressione applicata attraverso la membrana (che è la forza motrice del processo),  $\Delta\Pi$  rappresenta la differenza di pressione osmotica attraverso la membrana ed è rilevante solo per RO,  $\mu_T$  è la viscosità dinamica del permeato alla temperatura T ed R è la resistenza totale idraulica offerta dalla membrana e dalla regione interfacciale ad essa adiacente.

Come risultato, considerando UF e MF, l'equazione generale assume la forma dell'equazione di Darcy per processi a membrana:

$$J = \frac{TPM}{\mu_T \cdot R} \quad (2.20)$$

Poiché flusso e TMP sono correlati, i processi di filtrazione a membrana possono essere eseguiti in flusso continuo o a pressione costante. Convenzionalmente, però, si è soliti fissare il valore del flusso e quindi determinare il valore appropriato per la TMP (Judd, 2010).

Gli effetti della temperatura sulla viscosità sono i seguenti:

$$\mu_T = \mu_{20} \cdot f_T \quad (2.21)$$

$$f_T = e^{-0,0239 \cdot (T-20)} \quad (2.22)$$

Altro parametro importante è la permeabilità P utile a misurare l'effetto di sporcamento durante la filtrazione. È normalmente citata come il rapporto tra flusso e TMP:

$$P = \frac{J}{TMP} = \frac{1}{\mu_{20} \cdot f_T \cdot R} = \frac{1}{\mu_{20} \cdot e^{-0,0239 \cdot (T-20)} \cdot R} \quad (2.23)$$

La permeabilità P è correlata dunque alla resistenza idraulica R. Quindi l'aumento di *fouling* implica inevitabilmente un aumento di R, per questo P è un indicatore dell'effetto di sporcamento della membrana. La permeabilità, però, è funzione anche della temperatura e conseguentemente si deve normalizzare il flusso operativo ad una temperatura di riferimento per un confronto dei risultati:

$$P = \frac{P_{20}}{f_T} \quad (2.24)$$

$$P_{20} = \frac{1}{\mu_{20} \cdot R} \quad (2.25)$$

In conclusione  $P_{20}$  è funzione solo di R e  $\mu_{20}$ . Quest'ultimo parametro è considerato come un valore costante, solitamente pari alla viscosità dell'acqua a 20 °C, che è 0,001 Pa s<sup>-1</sup>, e di conseguenza  $P_{20}$  è un ottimo parametro per misurare gli effetti di sporcamento nel tempo.

### 2.2.3 Trattamenti aerobici, anaerobici e anossici

Visto che la funzione biologica non è alterata dalla membrana, l'MBR può essere progettato con vasche anossiche e anaerobiche per effettuare la rimozione biologica dei nutrienti (BNR), come nei tradizionali processi a fanghi attivi (Teli, 2010). In uno scenario meno comune, un unico serbatoio può essere utilizzato sia per la degradazione biologica anossica, sia per quella aerobica, considerando l'uso prolungato di aerazione intermittente (Nagaoka & Nemoto, 2005; Yeom et al, 1999).

La filtrazione effettuata in fase aerobica gode delle proprietà *anti-fouling* delle correnti d'aria provocate dagli aeratori; fenomeni di *fouling* particolarmente rilevanti sono stati riscontrati solo al cessare dell'insufflazione d'aria (Jiang et al, 2005; Psoch & Schiewer, 2005). Inoltre,

la rimozione biologica dei nutrienti può essere progettata secondo una configurazione con una zona anaerobica preliminare al fine di rimuovere biologicamente il fosforo (Teli, 2010). Il trattamento anaerobico per la rimozione del COD è realizzabile in un MBR anche in forma più efficiente. La degradazione anaerobica consiste in un percorso complesso di reazioni in parallelo e in serie. Tali reazioni includono idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi. Per quanto riguarda i lavaggi delle membrane di solito vengono realizzati mediante aerazione nei trattamenti aerobici *a membrana sommersa*, mentre risulta più problematico nei trattamenti anaerobici. Insufflazione con il gas dello spazio di testa sembra essere efficace sia per membrane polimeriche sommerse (Fawehinmi et al, 2004; Stuckey & Hu, 2003), sia per membrane ceramiche in configurazioni *side-stream* (Kayawake et al, 1991).

## 2.2.4 Fouling

Per *fouling* della membrana si intendono vari fenomeni legati al rifiuto di solidi e al loro accumulo (deposizione e/o adsorbimento) sulla superficie della membrana stessa (Judd, 2010). Tutti questi fenomeni portano ad una riduzione della permeabilità, cioè ad una riduzione del flusso di permeato o ad un aumento della pressione transmembrana (a seconda della modalità di funzionamento). Il risultato inevitabile è la perdita delle grandi superfici necessarie per la filtrazione, la necessità di maggiori velocità del flusso di attraversamento della membrana, costi aggiuntivi per via della maggiore energia e l'utilizzo di reagenti per i lavaggi (Drews, 2010).

Il *fouling* può avvenire attraverso diversi meccanismi di tipo fisico-chimico e biologico. Grace (1956) nei suoi studi scoprì il legame tra i meccanismi di filtrazione e il rifiuto di contaminanti che causano incrostazioni (Figura 2.8):

- blocco completo, cioè l'occlusione dei pori da parte di particelle senza sovrapposizioni;
- *standard blocking*, cioè il deposito di particelle più piccole rispetto alla dimensione dei pori della membrana sulle pareti dei pori stessi, riducendone così la dimensione;
- blocco intermedio, cioè l'occlusione dei pori per via della sovrapposizione di particelle;
- effetto torta, ovvero il deposito di particelle più grandi della dimensione dei pori della membrana sulla superficie della membrana stessa.

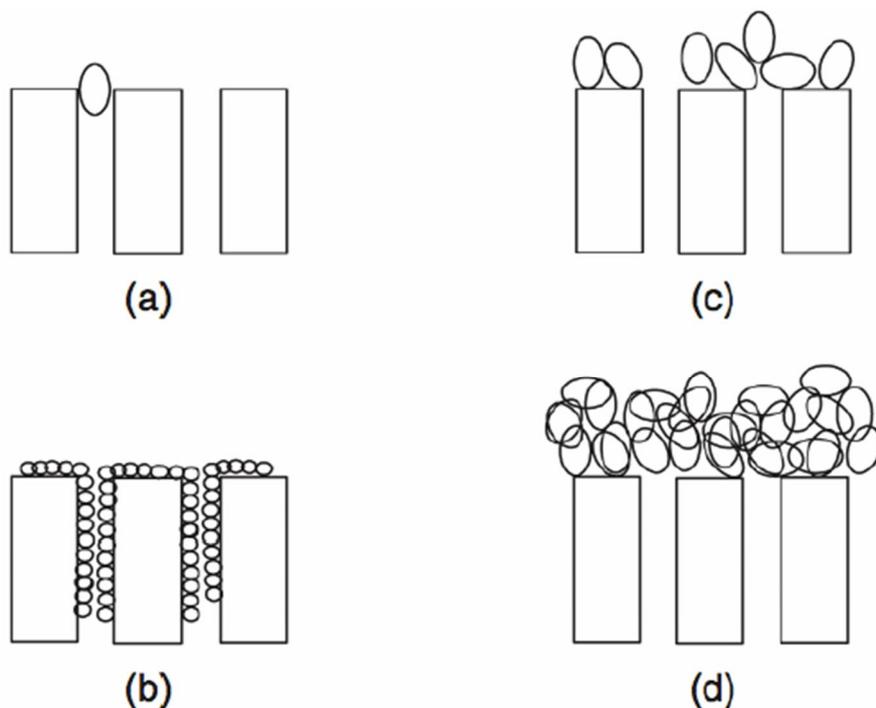


Figura 2.8 Varie tipologie di *fouling*: blocco completo (a), *standard blocking* (b), blocco intermedio (c) ed effetto torta (d) (non in scala) (Judd, 2010)

La resistenza di membrana viene aumentata dai componenti del *mixed liquor* (ML) accumulati (deposizione e/o adsorbimento) sulla superficie della membrana stessa (Judd, 2010). Tale aumento viene descritto da Lim & Bai (2003) e da Bae & Tak (2005):

$$R = R_m + R_c + R_f + R_{cp} \quad (2.26)$$

Secondo il modello la resistenza alla filtrazione  $R$  comprende quindi una serie di componenti:

- la resistenza  $R_m$  della membrana;
- la resistenza data dallo strato di torta  $R_c$ ;
- la resistenza causata dalla formazione di gel sulla superficie della membrana o di incrostazioni e/o fenomeni di adsorbimento all'interno dei pori  $R_f$ ;
- la resistenza membrana/regione interfacciale della soluzione determinata dalla concentrazione di polarizzazione  $R_{cp}$ .

La resistenza della membrana è funzione del materiale di cui è costituita, dalla dimensione dei pori, dalla porosità superficiale (percentuale della superficie coperta dai pori) e dallo spessore della membrana.

La torta e le resistenze incrostanti sono associate al meccanismo di filtrazione e sono quindi funzione dei solidi da filtrare.

Inoltre la velocità ortogonale alla superficie, causata dal flusso di permeato, determina anch'essa il tasso del *fouling* per via dei trasporti convettivi innescati.

Le resistenze generate dal *fouling* possono essere ridotte promuovendo la turbolenza e riducendo il flusso del permeato (Teli, 2010)

Per quanto riguarda la concentrazione di polarizzazione (CP), che è legata al processo di osmosi inversa (RO) descrive la tendenza del soluto ad accumularsi sull'interfaccia membrana/soluzione (Evenblij, 2006).

I materiali rigettati tendono ad accumularsi in prossimità della membrana (Figura 2.9) formando uno strato il cui spessore è determinato interamente dall'idrodinamica del sistema: maggiore sarà la turbolenza più sottile sarà lo strato (Judd, 2010).

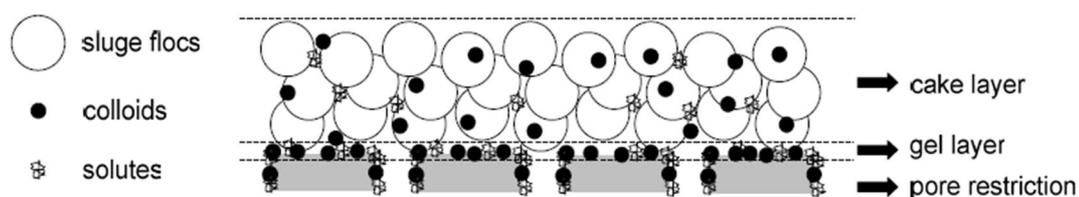


Figura 2.9 Meccanismi di *fouling* in un MBR (non in scala) (Teli, 2010)

Tuttavia per l'MF e l'UF la resistenza data dalla concentrazione di polarizzazione può essere trascurabile per l'alto peso molecolare dei materiali rifiutati (Lim & Bai, 2003; Evenblij, 2006).

In generale la resistenza  $R_m$  domina solo quando il *fouling* è assente o è stato eliminato da procedure di pulizia (fisica o chimica).

Tradizionalmente con il termine *fouling reversibile* ci si riferisce alla formazione di incrostazioni che possono essere rimosse con mezzi fisici come il risciacquo o il rilassamento (*relaxation*), ovvero l'interruzione della permeazione a fronte di un continuo scuotimento della membrana mediante bolle d'aria (Judd, 2007). Queste due tecniche possono essere utilizzate in combinazione.

Il *fouling* irreversibile (o *fouling* permanente) è invece legato alla formazione di incrostazioni che possono essere rimosse solo attraverso lavaggi chimici, da effettuarsi con acidi minerali o organici, soda caustica o, più comunemente per gli MBR, ipoclorito di sodio. Esso può essere effettuato sia in situ sia ex situ.

La pulizia fisica è meno onerosa rispetto alla pulizia chimica e generalmente ha durate piuttosto limitate. Essa non richiede prodotti chimici e offre meno rischi di degrado della membrana. D'altra parte, è anche meno efficace della pulizia chimica. Infatti i lavaggi fisici rimuovono solo i solidi grossolani che formano la torta di fango.

Diversamente la pulizia chimica rimuove il materiale più tenace come i gel (Drews, 2010).

Tuttavia, la permeabilità della membrana originale vergine non viene mai recuperata nemmeno dopo una pulizia chimica. Permane infatti una resistenza residua che può essere definita come *fouling irre recuperabile* (Judd, 2010) che si accumula nel corso degli anni e determina la vita di una membrana.

Dal punto di vista dei componenti, incrostazioni nel MBR possono essere classificati in tre grandi categorie:

- *biofouling*;
- *fouling organico*;
- *fouling inorganico*.

Con *biofouling* ci si riferisce alla deposizione, alla crescita, e al metabolismo delle cellule batteriche sulla membrana (Pang et al, 2005; Wang et al, 2005). Il *biofouling* può iniziare con la deposizione di una singola cellula o di gruppo di cellule sulla superficie della membrana. Successivamente queste si moltiplicano formando uno strato di gel.

Con *fouling organico* in un MBR ci si riferisce alla deposizione di biopolimeri extracellulari, principalmente proteine e polisaccaridi, sulla membrana. A causa delle piccole dimensioni, i biopolimeri possono depositarsi sulle membrane più facilmente a causa del flusso di permeato e rappresentano la frazione irre recuperabile del *fouling*.

In generale, il *fouling* nell'MBR è determinato essenzialmente da *biofouling* e *fouling organico* piuttosto che da incrostazioni inorganiche (Teli, 2010).

Il *fouling inorganico* agisce principalmente in due modi: precipitazione chimica e precipitazione biologica. La precipitazione chimica avviene quando la concentrazione della sostanza chimica supera la concentrazione di saturazione. La precipitazione biologica, invece, è frutto di quei fenomeni in cui gli ioni metallici possono essere catturati dai gruppi funzionali acidi ( $R - COOH$ ) formando complessi e costruendo un compatto strato di gel (Teli, 2010).

## ***Biopolimeri extracellulari***

Occorre un approfondimento particolare sui già citati biopolimeri extracellulari visto il loro grande ruolo nel fenomeno del *fouling* irreversibile. Essi possono essere classificati come sostanze polimeriche extracellulari (EPS) quando sono legati ai fiocchi, e prodotti

microbici solubili (SMP), quando liberamente sospesi o disciolti nel surnatante come composti solubili colloidali (Drews, 2010). In particolare gli EPS sono costituiti da proteine, polisaccaridi, acidi nucleici, lipidi e acidi umici e si trovano al di fuori o sulla superficie cellulare. Gli SMP possono essere definiti come l'insieme dei composti organici che vengono rilasciati in soluzione dal metabolismo cellulare e dal decadimento della biomassa (Barker & Stuckey, 1999).

La loro determinazione si affida a diverse metodologie, fondate su particolari procedimenti di estrazioni e stima di alcune delle loro componenti (nella presente tesi proteine e carboidrati).

Cho et al. (2005) trovarono una stretta relazione tra le concentrazioni degli EPS e la resistenza specifica della torta  $R_c$ .

Al contrario, poiché la matrice EPS svolge un ruolo importante nella interazione idrofoba tra le cellule e quindi nella formazione di fiocchi, è stato rilevato che una diminuzione dei livelli di EPS può causare il deterioramento dei fiocchi (Liu & Fang, 2003) e, di conseguenza, problematiche legate all'attività del processo.

## 2.3 Processi Anammox con MBR

Un'alternativa per ottenere la ritenzione completa delle biomasse nei processi Anammox è l'uso di reattori a membrana biologica (MBR) (Trigo, 2006). Poiché l'MBR conserva tutti gli organismi, potrebbe essere idealmente adatto alla lenta crescita delle culture Anammox, migliorando così l'avvio del processo (Trigo, 2006). La ricerca bibliografica ha messo in luce quattro pubblicazioni significative: *Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor* (Trigo et al., 2006), *The Membrane Bioreactor: A Novel Tool to Grow Anammox Bacteria as Free Cells* (Van der Star et al., 2008), *Enrichment and biofilm formation of Anammox bacteria in a non-woven membrane reactor* (Ni et al., 2009) e *Impact of reactor configuration on anammox process start-up: MBR versus SBR* (Tao et al., 2011).

### 2.3.1 *Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor*

Trigo et al. nel 2006 pubblicarono i risultati riguardanti una sperimentazione su un MSBR (*Membrane Sequencing Batch Reactor*) (Figura 2.10), i cui parametri operativi sono in Tabella 2.1.

Tabella 2.1 Parametri operativi dell'MSBR di Trigo et al. (2006)

Durata sperimentazione	Cicli	T	Agitazione	pH	Diametro pori membrana	MLVSS al giorno 0	HRT
giorni	h	°C	rmp	-	µm	g L <sup>-1</sup>	giorni
375	6	37	75	7,8 – 8,7	0,04	0,125	1

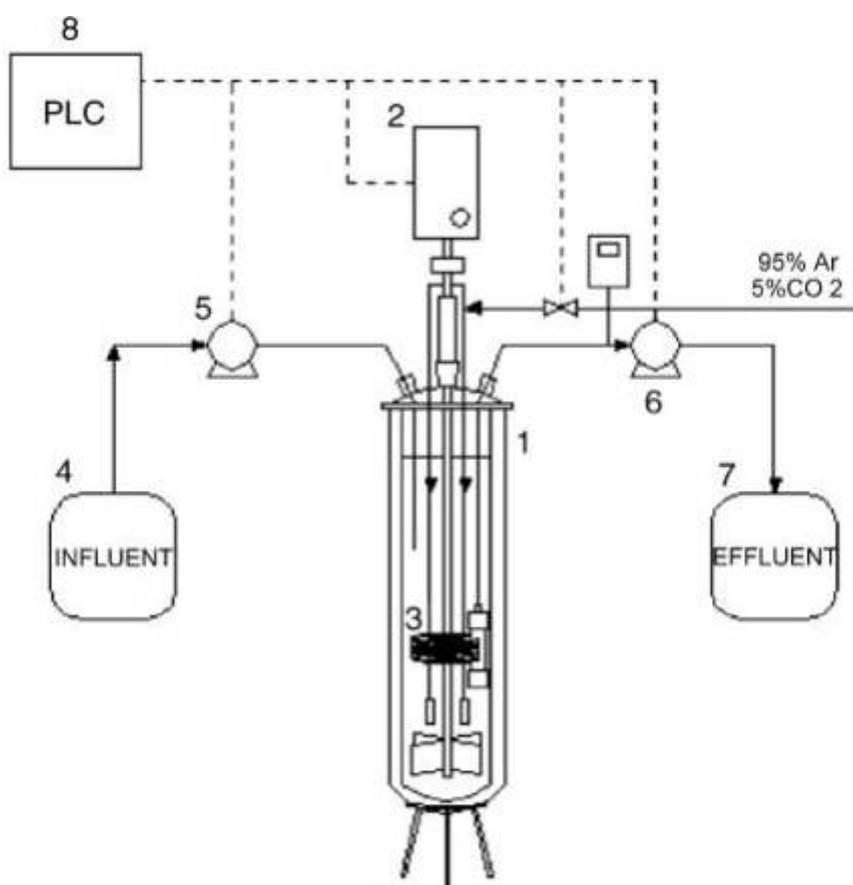


Figura 2.10 Schema dell'impianto. (1) MSBR, (2) agitatore, (3) modulo filtrante, (4) contenitore dell'influente, (5) pompa peristaltica per l'alimentazione dell'influente, (6) pompa di permeazione, (7) contenitore dell'effluente e (8) unità logica

Furono individuati tre periodi di funzionamento in relazione agli influenti sintetici impiegati (Tabella 2.2):

- giorni 0 ÷ 80: mezzo 1 o "di Van de Graaf et al. (1996)";
- giorni 80 ÷ 181: mezzo 2 o "di Van de Graaf et al. (1996) – modificato 1";
- giorni 183 ÷ 375: mezzo 3 o "di Van de Graaf et al. (1996) – modificato 2".

Tabella 2.2 Composizione dei mezzi utilizzati da Trigo et al. (2006)

<b>Nutriente</b>	<b>Mezzo 1</b>	<b>Mezzo 2</b>	<b>Mezzo 3</b>
u.m.	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	75,3 – 283,4	66,4 – 79,7	66,4 - 1727
NaNO <sub>2</sub>	83,7 – 315,4	73,9 – 88,7	73,9 - 1823
NaNO <sub>3</sub>	8,5	8,5	8,5
KHCO <sub>3</sub>	1000	1000	1000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	10	10
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	226	22,6	22,6
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	58,6	58,6	58,6
FeSO <sub>4</sub>	6,25	6,25	6,25
EDTA	6,25	6,25	6,25
Elementi in tracce	1,25 ml L <sup>-1</sup>	1,25 ml L <sup>-1</sup>	1,25 ml L <sup>-1</sup>

Trigo et al. (2006) misero in luce l'interazione della precipitazione dei sali sulla superficie della biomassa con l'attività degli Anammox. Il tasso di rimozione dell'azoto diminuì infatti da 100 a soli 10 mg<sub>N</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> durante il primo periodo. La membrana agì infatti come una barriera impenetrabile per i precipitati inorganici e in modo molto più sensibile rispetto agli SBR convenzionali, causando l'accumulo di circa il 50% dei NVSS nel fango attivo. Tale risultato dimostrò che erano necessarie delle modifiche alle concentrazioni di calcio e fosforo del mezzo brevettato da Van de Graaf et al. (1996), visto che questo era all'origine dei precipitati interferenti. Con l'utilizzo degli alimenti 2 e 3 gli NVSS diminuirono fino al 18% e conseguentemente anche il fenomeno di inibizione svanì e i tassi di rendimento si attestarono sui 142 mg<sub>N</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> nel terzo periodo. Nel secondo periodo invece non si verificarono miglioramenti significativi dei tassi di rimozione che permanevano su valori piuttosto bassi (anche 5 mg<sub>N</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

Il *fouling* non diede problematiche rilevanti: si giudicò pertanto sufficiente il lavaggio fisico in controcorrente con permeato al termine di ogni ciclo di 6 ore.

Il sistema mantenne una buona attività anche nei periodi in cui era stata rilevata una piccola quantità di nitriti accumulati e una sporadica galleggibilità dei fanghi.

Inoltre, la crescita della biomassa non fu di tipo sospeso, ma in granuli, con un aspetto irregolare. Questo potrebbe essere un risultato della tendenza dei microrganismi Anammox a crescere in biofilm o granuli, fattore molto positivo per le membrane, in quanto diminuisce il rischio di *fouling* irreversibile.

### 2.3.2 A Novel Tool to Grow Anammox Bacteria as Free Cells

Van der Star et al. nel 2008 utilizzarono un MBR alimentato in continuo, i cui parametri operativi sono in Tabella 2.3.

L'atmosfera fu controllata tramite insufflazione di una miscela di 95% di argon e 5% di anidride carbonica.

Tabella 2.3 Parametri operativi dell'MBR di Van der Star et al. (2008)

Durata sperimentazione	T	Agitazione	pH	Diametro pori membrana	HRT	SRT (dal giorno 31)
giorni	°C	rmp	-	µm	giorni	giorni
> 250	38	160	7,1 ÷ 7,5	0,1	2	16 poi 12

Il reattore fu coperto con uno strato di PVC per evitare la crescita di organismi fototrofi e dunque produttori di ossigeno. Come alimento si utilizzò quello previsto da Van de Graaf et al. (1996) con qualche modifica nelle concentrazioni dei componenti.

Il tasso di rimozione si attestò solo dopo quattro settimane a  $800 \text{ mg}_{\text{N-NO}_2} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

L'SRT non fu controllato per i primi 30 giorni, poi si passò ad estrazioni giornaliere di 0,5 L per avere così un SRT di circa 16 giorni. Al giorno 70 fu abbassata la concentrazione di nitrito, così da fissare il rapporto tra azoto nitroso e ammoniacale a 0,83.

Nel giorno 85 si verificò un conversione incompleta del nitrito e l'alimento sintetico fu pertanto modificato nelle sue componenti, riducendo le concentrazioni di calcio e magnesio del 75% (fenomeni di precipitazione si erano verificati come nella sperimentazione di Trigo et al. del 2006) (Tabella 2.4).

Tabella 2.4 Composizione dei mezzi utilizzati da Van der Star et al. (2008)

Nutriente	u.m.	Periodo iniziale	Periodo finale
Ammonio	$\text{mg}_{\text{N}} \text{ L}^{-1}$	1680	1680 poi 1400
Nitrito	$\text{mg}_{\text{N}} \text{ L}^{-1}$	1680	1680
Calcio	$\text{mg}_{\text{N}} \text{ L}^{-1}$	164	41

Bicarbonato	mg <sub>C</sub> L <sup>-1</sup>	179	179
Magnesio	mg L <sup>-1</sup>	39	9,9
EDTA	mg <sub>C</sub> L <sup>-1</sup>	6,0	6,0
Fosfati	mg <sub>P</sub> L <sup>-1</sup>	5,7	5,7
Ferro	mg L <sup>-1</sup>	2,5	2,5
Estratto di lievito	mg L <sup>-1</sup>	-	1,0

Il reattore rimase in funzione per più di 250 giorni con aggiustamenti all'SRT (da 16 a 12 giorni) e alle concentrazioni di ammonio (da 120 mM a 100 mM).

Il *fouling* fu più problematico nei primi 60 giorni di funzionamento, ma non portò mai all'intasamento della membrana prima della sostituzione del modulo programmata ogni 10 giorni (insostenibile per un impianto a scala reale). I lavaggi chimici furono effettuati ex situ con particolari detergenti (Tergazyme, Alconox, NY). L'installazione della nuova membrana non generò mai particolari disturbi dell'attività durante i primi 120 giorni. Successivamente, invece, l'attività impiegò più di un'ora per ripartire a causa delle infiltrazioni di ossigeno, inibente per l'attività Anammox.

Durante il periodo a SRT pari a 12 giorni, furono effettuate delle prove di attività che vedevano l'aumento del flusso dell'influente per circa 1 ÷ 2 ore. I risultati dimostrarono che non vi furono accumuli di nitrito e che il reattore operava tra il 70 e il 90% della sua capacità reale.

Pur dando buoni risultati dal punto di vista dei rendimenti di rimozione, dunque, la sperimentazione di Van der Star et al. Registrò problematiche più forti per ciò che riguarda il *fouling*: sostituzioni frequenti con rallentamenti dell'attività causate dalle inevitabili infiltrazioni di ossigeno.

Furono fatte anche delle analisi sulle comunità microbiche presenti. Se all'inoculo era principalmente presente il *Candidatus Brocadia*, col passare del tempo il *Candidatus Kueneenia Stuttgartiensis* divenne il principale componente della biomassa Anammox. Risultati confermati sia dall'analisi della sequenza del gene 16S rRNA, sia mediante FISH, sia dal microscopio a contrasto di fase.

### **2.3.3 Enrichment and biofilm formation of Anammox bacteria in a non-woven membrane reactor**

Ni et al. (2009) utilizzarono un reattore a membrana in tessuto non tessuto di configurazione *side-stream* alimentato in continuo (ANMR), il cui schema è visibile nella Figura 2.11.

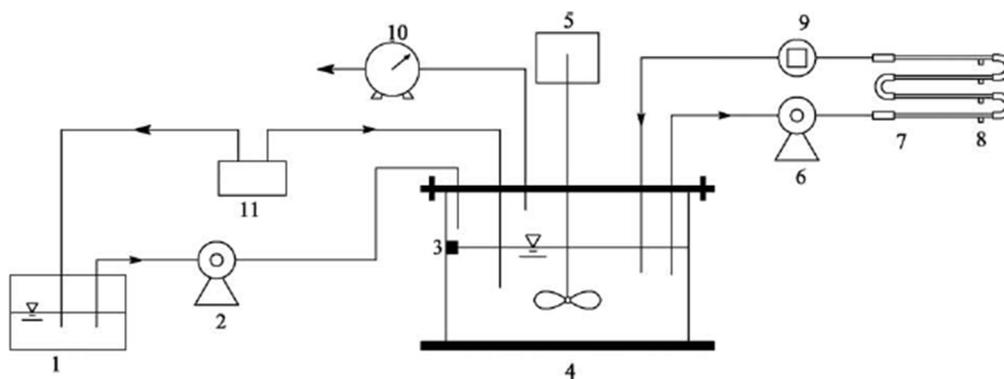


Figura 2.11 Schema dell'impianto. (1) contenitore dell'influente, (2) pompa peristaltica per l'alimentazione dell'influente, (3) sonda per la regolazione del livello, (4) fermentatore, (5) agitatore, (6) pompa di permeazione, (7) modulo filtrante, (8) uscita effluente, (9) misuratore pressione trans membrana, (10) misuratore della pressione di testa e (11) bombola di Argon e CO<sub>2</sub>

Le condizioni operative furono quelle rappresentate in Tabella 2.5.

Tabella 2.5 Parametri operativi dell'MBR di Ni et al. (2009)

Durata sperimentazione	T	Agitazione	pH	Diametro pori membrana	MLVSS al giorno	HRT
giorni	°C	rmp	-	µm	g L <sup>-1</sup>	giorni
260	35	120 poi 100	7,5 ÷ 8,0	1,0	0,500	2,5 poi 2,0 e infine a < 1,0

Dopo l'inoculazione si è registrato un tasso di conversione di 18,4 mg<sub>N-NO<sub>2</sub></sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con un carico di azoto pari a 21,2 mg<sub>N-NO<sub>2</sub></sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Durante il periodo iniziale (fino al giorno 67), l'NLR è stato gradualmente aumentato da 40,6 a 160 mg<sub>N</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con una diminuzione dell'HRT da 2,5 giorni a 2 giorni. Si è arrivati infine ad un NLR di oltre 1100 mg<sub>N</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e un HRT di 1 giorno. In Tabella 2.6 vi sono le caratteristiche dell'influente sintetico alimentato.

Tabella 2.6 Composizione del mezzo utilizzato da Ni et al. (2009)

KHCO <sub>3</sub>	500	mg L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27,2	mg L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	180	mg L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	120	mg L <sup>-1</sup>

EDTA	20	mg L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,43	mg L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,24	mg L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,99	mg L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,25	mg L <sup>-1</sup>
NaMoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,22	mg L <sup>-1</sup>
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,19	mg L <sup>-1</sup>
NaSeO <sub>3</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	0,21	mg L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,014	mg L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub>	5	mg L <sup>-1</sup>

Dopo 1 mese le efficienze di rimozione dell'azoto ammoniacale e nitroso si sono assestate sul 90% e sull'80%, rispettivamente. Dal 64° giorno, quasi il 100% di nitrito è stato rimosso e l'efficienza di rimozione dell'azoto totale ha raggiunto l'88,5%, indice di un'elevata attività dei batteri Anammox nel reattore.

Per questo motivo si aumentò l'NLR a 510 mg<sub>N</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> dal giorno 70 al giorno 150, mantenendo un rapporto r tra azoto nitroso e ammoniacale pari a 0,9. Allo stesso tempo, l'HRT fu ridotto a 1 giorno.

Durante questo periodo, l'efficienza di rimozione del nitrito rimase prossima al 100%, mentre l'efficienza di rimozione dell'ammonio scese sotto il 90% al giorno 124 con un HRT di circa 1,5 giorni. Intanto, l'efficienza di rimozione dell'azoto totale calava fino al valore dell'80,7%.

La letteratura ha dimostrato che i batteri Anammox sono parzialmente inibiti con concentrazioni di 50 mg<sub>N-NO2</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> e completamente inattivi per quelle superiori ai 100 mg<sub>N-NO2</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Jetten et al., 2001). Per questi motivi è importante mantenere il sistema con concentrazioni di azoto nitroso inferiori al livello tossico (Pyanert et al., 2004), specialmente durante la fase iniziale del processo.

L'attività di biomassa Anammox iniziò infatti a diminuire dal giorno 174, quando le concentrazioni di influenti furono aumentate oltre i 310 mg<sub>N</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Le concentrazioni dei nitriti si attestarono intorno ai mg<sub>N-NO2</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> causando un crollo dell'efficienza di rimozione dell'azoto totale (53,4%).

La configurazione *side-stream* ha delle implicazioni diverse rispetto al convenzionale MBR con modulo filtrante sommerso per ciò che riguarda il *fouling*.

L'ML viene pompato all'interno delle fibre della membrana con eventuali depositi interni di materiale responsabile dello sporramento.

Inizialmente sono richieste basse velocità del flusso e basse pressioni transmembrana per sviluppare uno spessore sufficiente di biofilm. La TMP venne aumentata lentamente, a causa del deposito di biomassa sulla superficie interna della membrana.

La TMP fu regolata in un *range* di 0,5 ÷ 3 psi da una valvola di controllo della pressione. Il flusso è variato tra gli 0,7 e gli 1,7 LMH. Non è stata effettuata alcuna sostituzione del modulo filtrante e successivamente alla formazione di un biofilm maturo non si è riscontrato alcun problema legato al *fouling*. Il controlavaggio fu in grado infatti di ripristinare completamente le condizioni iniziali. Durante la fase iniziale i cicli di pulizia furono eseguiti meno di tre volte al mese, anche se il controlavaggio non ha mai portato a significative perdite di biomassa.

### **2.3.4 Impact of reactor configuration on anammox process start-up: MBR versus SBR**

Una configurazione del reattore con ritenzione elevata di biomassa è essenziale per il processo Anammox per via del basso tasso di crescita. Il bioreattore a membrana (MBR) e il reattore a sequenza di fasi (SBR) sono largamente applicati per il trattamento delle acque reflue (Shannon et al, 2008;.. Gao et al, 2010).

L'MBR è in grado di impedire l'inibizione del prodotto e la fuoriuscita di cellule in sospensione (Jagersma et al., 2009). Diversi studi hanno dimostrato che un MBR sommerso è un ottimo strumento per l'arricchimento dei microrganismi a crescita lenta come gli archaea metanotrofici (Meulepas et al., 2009) e batteri Anammox (Van der Star et al., 2008). Tuttavia la condizione anaerobica in un MBR può essere spesso interrotta a causa delle frequenti sostituzioni dei moduli filtranti a causa del *fouling* (Gao et al., 2009).

L'obiettivo di Tao et al. (2011) fu quello di valutare l'avvio del processo Anammox sia su un EMBR (MBR con membrana esterna), sia su un SBR.

La sperimentazione operò su tre diverse configurazioni: R1, R2 ed R3: R1 fu attivato come SBR e al giorno 218 fu modificato per divenire un EMBR assumendo il nome di R2, R3 venne messo in funzione nel medesimo giorno con una configurazione EMBR.

Il tempo effettivo tra una sostituzione di modulo filtrante e l'altra fu di 26 ÷ 35 giorni per R2 e 31 ÷ 37 giorni per R3.

I parametri operativi sono riassunti in Tabella 2.7.

Tabella 2.7 Parametri operativi dei reattori di Tao et al. (2011)

Reattore	Durata sperimentazione	T	DO	pH	Diametro pori membrana	MLVSS al giorno	HRT
-	giorni	°C	mg L <sup>-1</sup>	-	µm	g L <sup>-1</sup>	giorni
R1	218	31 ± 1	< 0,06	7,3 ± 0,4	-	0,300	2,0
R2	178	31 ± 1	< 0,08	7,1 ± 0,7	0,4	-	2,0
R3	242	31 ± 1	< 0,08	7,5 ± 0,5	0,4	5,000	2,0

L'alimento sintetico impiegato è descritto in Tabella 2.8. Per quanto riguarda i carichi di azoto nitroso e ammoniacale sono andati gradualmente aumentando da 50 mg L<sup>-1</sup> dei primi giorni fino a 300 mg L<sup>-1</sup> dell'ultimo periodo.

Tabella 2.8 Composizione del mezzo utilizzato da Tao et al. (2011)

KHCO <sub>3</sub>	10	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,074	mM
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,034	mM
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,24	mM
FeSO <sub>4</sub> e EDTA	0,040	mM
Elementi in tracce	1,25	Mg L <sup>-1</sup>

Il dilavamento della biomassa fu riscontrato in particolare sull'SBR (R1). Se negli EMBR i TSS nell'effluente infatti si attestarono sui 3,0 mg L<sup>-1</sup> nel reattore a sequenza di fasi questi erano compresi in un intervallo tra i 7,5 e 19,4 mg L<sup>-1</sup>.

Durante l'impiego dell'R1 si ebbero tre fasi: una di instabilità, una di stabilità e una di inibizione. La prima fu determinata dal cambiamento ambientale degli Anammox che richiesero tre settimane di ambientamento dopo l'inoculo. In questo periodo vi fu una vera e propria moria di biomassa con un conseguente accumulo di ammonio e denitrosazione del nitrito grazie al COD prodotto dalla lisi cellulare.

Dal giorno 20 in poi questo fenomeno si interruppe e l'attività Anammox si riprese portando la rimozione dell'ammonio all'83,7% e del nitrito al 92,5% a fronte di un aumento del rateo di azoto alimentato (NLR) da 0,03 a 0,13 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (giorni 21 ÷ 147). Quando le concentrazioni di nitrito superarono i 10 mM si ebbe una vera e propria inibizione – per il 25 ÷ 40% causata

dal nitrito - con un crollo delle rimozioni di azoto ammoniacale e nitroso (47% e 78% rispettivamente). Dopo il giorno 218 la biomassa cambiò colore: da marrone a color ruggine. Per l'R2 non vi fu un periodo di instabilità – lavorando in pratica sul precedente R1 trasformato in EMBR – e l'NLR fu aumentato da 0,05 a 0,25 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, il doppio rispetto a quanto era stato fatto per R1.

Solo col superamento dei 17 mM nel fermentatore si ebbe un vero effetto di inibizione – per il 5 ÷ 10% causata dal nitrito - con una leggera diminuzione delle rimozioni di azoto ammoniacale e nitroso (78% e 94% rispettivamente). Evidente è la resistenza all'inibizione rispetto a R1 e la capacità di sopportare carichi ben più considerevoli.

Per R3, infine, si registrò un periodo di adattamento di 25 giorni, dopo il quale l'NLR fu aumentato da 0,04 a 0,23 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Durante questa fase la biomassa cambiò colore: da marrone scuro ad uno molto più chiaro.

Quando si accumularono più di 13 mM di nitrito iniziò una fase di inibizione che fece perdere il 50% di capacità di rimozione dell'ammonio.

L'incremento medio giornaliero dell'attività specifica Anammox è stato di 3,2, 77,8 e 3,6 g<sub>N</sub> g<sup>-1</sup>v<sub>SS</sub> rispettivamente in R1, R2 e R3. Sulla base dei tassi specifici, l'aumento giornaliero dell'attività relativa è stato di 0,60, 6,38 e 1,06% rispettivamente in R1, R2 e R3, suggerendo che l'EMBR fosse probabilmente migliore per l'arricchimento dei batteri Anammox piuttosto che per l'avvio di un nuovo reattore con inoculo a bassa attività. In ogni caso, però, l'MBR ha garantito prestazioni migliori dell'SBR.

# CAPITOLO 3

## MATERIALI E METODI

In questo capitolo verranno esplicitati i metodi di analisi e i materiali utilizzati nelle due fasi della sperimentazione.

In particolare si approfondiranno le configurazioni dei due reattori pilota, le analisi effettuate e i protocolli di monitoraggio impiegati. Inoltre verranno anche descritte le caratteristiche del fango inoculato e dell'influente impiegato.

### 3.1 Configurazione del pilota

Il reattore a scala di laboratorio è composto da due unità: il fermentatore e la *Diaferm unit*, che contiene sia le apparecchiature elettromeccaniche sia l'unica logica.

Tutte le variabili di processo (temperatura, aerazione, pH, velocità dell'agitatore, ...) possono essere regolate tramite una pulsantiera con annesso schermo e un pc.

Il fermentatore (Figura 3.1) è un involucro di vetro dalla capacità di 9 L con un coperchio di tenuta in acciaio. La parte superiore dell'unità contiene una serie di aperture per collegare i tubi per i flussi di liquidi e gas, le sonde di temperatura, pH e ossigeno disciolto, un misuratore di pressione relativa con funzioni di registrazione (30 dati registrati ogni ora), un interruttore di livello connesso al sistema di controllo della *Diaferm unit* con funzioni di commutazione per la pompa di scarico (la pompa si accende quanto il *mixed liquor* supera la quota di 6,7 L).

Il modulo filtrante, invece, è fissato tramite un tubo di acciaio al suddetto coperchio di tenuta e si colloca a circa 10 centimetri dal fondo del fermentatore.

Le connessioni con l'esterno permettono:

- l'alimentazione dell'influenta, delle soluzioni per la regolazione del pH, dell'aria di ricircolo (alla base della membrana) e del permeato di ricircolo;
- lo scarico del permeato e del fango di spurgo (se prevista regolazione dell'SRT).



Figura 3.1 Il Fermentatore in funzione

La regolazione della temperatura è assicurata tramite una piastra riscaldante a resistenza elettrica alla base del fermentatore e un dito freddo in cui circola acqua di rete.

Il controllo del pH avviene tramite il dosaggio di opportune soluzioni acide e/o alcaline attraverso pompe peristaltiche attivate dalla *Diaferm unit* in funzione dei dati inviati in tempo reale dalla sonda.

La *Diaferm unit* è composta da uno schermo (Figura 3.2) e una pulsantiera per la visualizzazione e la regolazione dei parametri di processo e un set di tre pompe peristaltiche utilizzate in modo differente nei due processi.



Figura 3.2 Schermo della *Diaferm unit*

Per controllare le portate, calcolate su un HRT appropriato, vengono utilizzate delle pompe peristaltiche a velocità variabile che sono collegate alla precitata sonda di livello. La pompa di processo per la filtrazione è collegata direttamente alla membrana. Al fine di assicurare che il flusso totale sia comparabile ai dati presenti in letteratura ( $5 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , LMH), il flusso totale della pompa di processo è fissato più alto del flusso dell'effluente (determinato invece in funzione dell'HRT stabilito). La parte eccedente viene pertanto ricircolata nel reattore. Un misuratore di pressione relativa con funzioni di registrazione ( $30 \text{ dati h}^{-1}$ ) è stato inserito nella linea di aspirazione della pompa in modo da poter valutare la pressione transmembrana (TMP). Un timer è stato utilizzato per eseguire la *relaxation* (RX) della membrana, ovvero brevi, ma frequenti, interruzioni della permeazione, utili ad evitare i fenomeni di *fouling*, mentre un altro temporizzatore ha regolato la *relaxation estesa* (RX<sub>ext</sub>) della membrana, ovvero un rilassamento di maggior durata rispetto alla succitata RX, scandito su intervalli di tempo più ampi (ore) al fine di porre rimedio all'acuirsi dei fenomeni di *fouling*.

Il gas dello spazio di testa viene in parte ricircolato, usando una pompa a vuoto, e quindi trasferito ad un diffusore di gas interno al modulo filtrante, al fine di generare bolle grossolane che riducano il rischio di incrostazioni sulla superficie della membrana. Il tasso di *sparging* impiegato è controllato mediante un misuratore di flusso del gas e una valvola (5 L min<sup>-1</sup>).

Uno sfiato posto sottobattente permette il controllo della sovrappressione del gas in testa al reattore. I condensatori collocati sulla linea sulla linea di ricircolo del gas di testa e una tanica per la raccolta dello scarico completano il quadro.

### 3.1.1 MBR Parnit

La struttura dell'impianto per la parziale nitrosazione (Figura 3.3) presenta in aggiunta allo schema precedentemente descritto:

- un'ulteriore pompa per il controllo dell'età del fango (SRT) tramite spurgo;
- un aeratore per l'insufflazione d'aria alla base del fermentatore;
- un contenitore per il refluo di alimento con opportuno sistema di miscelazione per mantenere uniforme la concentrazione dei solidi sospesi;
- due bottiglie contenenti rispettivamente una soluzione acida (HCl) e una soluzione basica (NaHCO<sub>3</sub>) per la regolazione automatica del pH;
- una sonda di livello per il controllo del volume spurgato all'interno di un apposito recipiente.

Il controllo dell'ossigeno disciolto avviene mediante la regolazione della dimensione delle bolle d'aria insufflata (più fini sono le bolle, più facilmente l'ossigeno verrà disciolto). L'aria è immessa alla base del fermentatore, proprio al di sotto delle pale del miscelatore: maggiore sarà la velocità dell'agitatore più fini saranno le bolle di aria insufflata. Quindi la *Diaferm unit* regolerà gli rpm del miscelatore (all'interno di un dato *range*) in funzione dei dati inviati dalla sonda ossigeno.

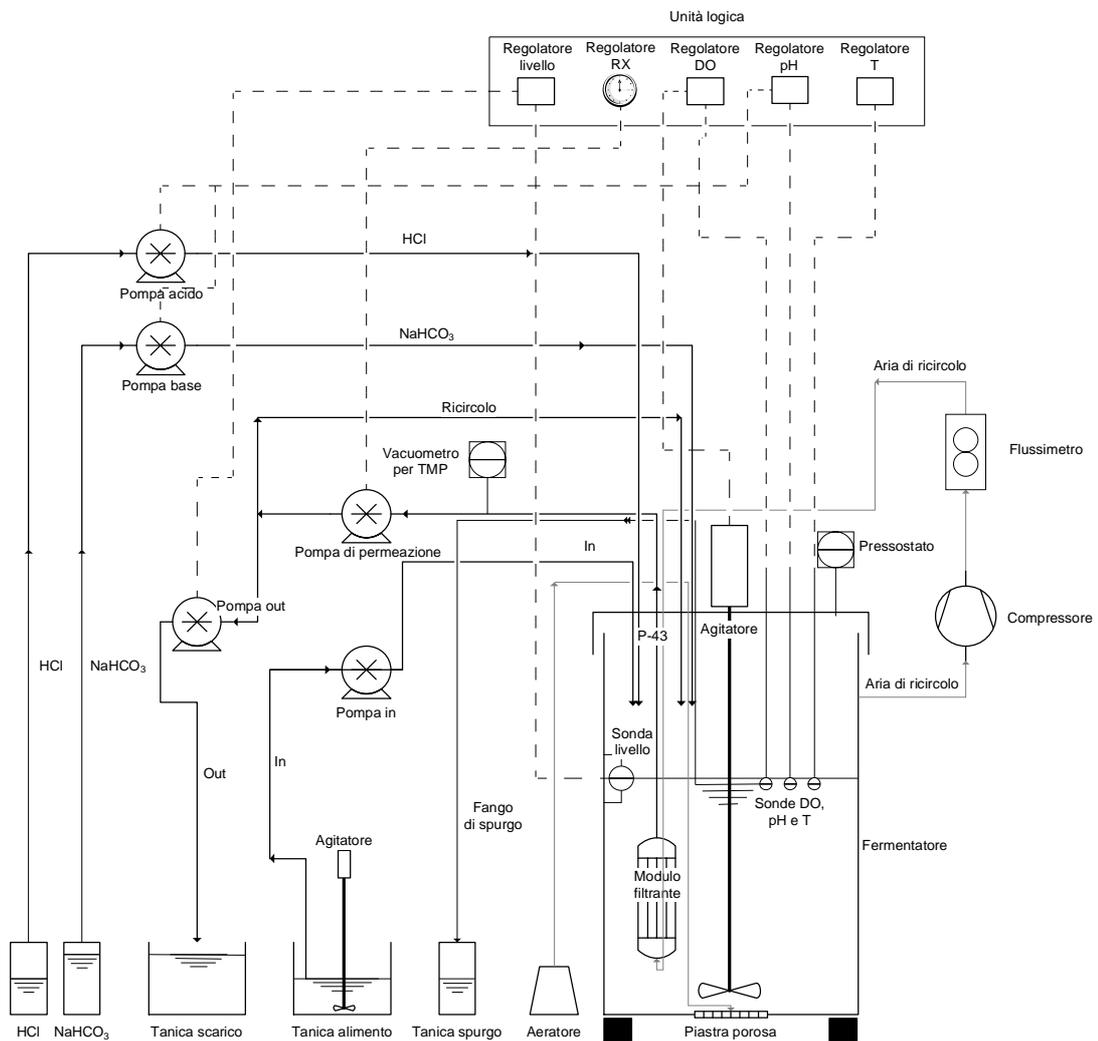


Figura 3.3 Struttura principale dell'impianto per la parziale nitrificazione.

### 3.1.2 MBR Anammox

La struttura dell'impianto con processo Anammox (Figura 3.4) presenta in aggiunta allo schema di base:

- una bombola contenente una miscela di gas composta al 95% da  $N_2$  e al 5% di  $CO_2$  che viene insufflata secondo necessità;
- un contenitore collassabile per l'influente;
- una bottiglia contenente una soluzione acida (HCl) per la regolazione automatica del pH.

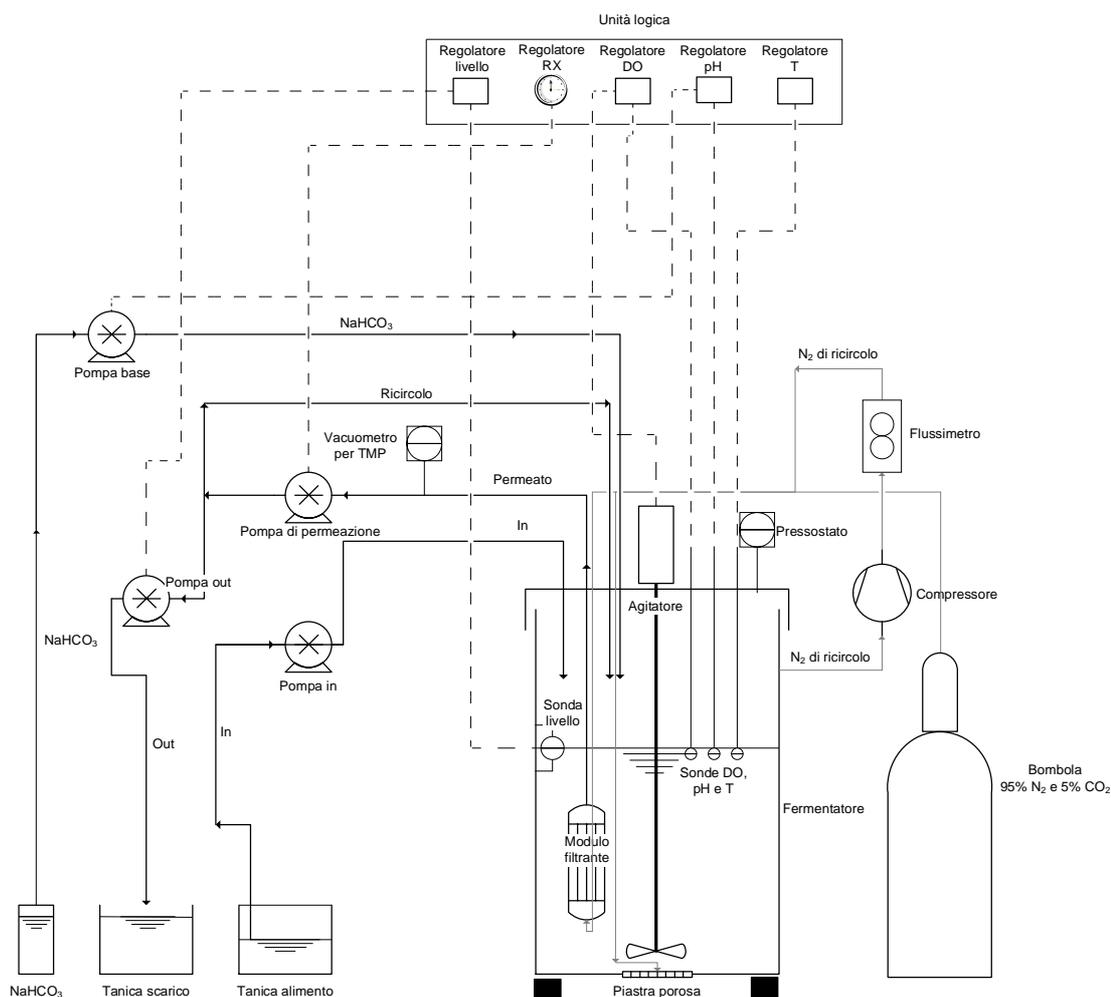


Figura 3.4 Struttura principale dell'impianto Anammox.

## 3.2 Procedure e metodi di analisi

Qui verranno elencate le varie procedure e metodi di analisi necessari per le sperimentazioni effettuate. Le misurazioni di alcalinità e di solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) sono realizzate in conformità con le procedure APAT IRSA-CNR contenute nel rapporto 29/2003.

### 3.2.1 Misura degli EPS e degli SMP

I fiocchi di fango attivo sono costituiti principalmente da microrganismi, componenti ionici, colloidali, particelle minerali e *extra-cellular polymeric substances* (EPS).

Gli EPS non sono altro che biopolimeri prodotti dall'attività batterica attraverso la superficie della cellula. Se solubili vengono definiti SMP (*Soluble Microbial Product*) (vedi Paragrafo 2.2.4). Essendo costituiti principalmente da materiale proteico e da carboidrati, la loro stima si effettua tramite la misura di questi due loro componenti.

La fase di estrazione degli SMP (Antonelli et al., 2011) prevede in sequenza:

- la centrifugazione di un campione di *mixed liquor* (80 ml) a 3800 rpm per 10 minuti;
- la separazione del surnatante dal pellet;
- filtrazione in pressione del surnatante con carta filtro (0,45  $\mu\text{m}$ );
- stoccaggio del permeato in congelatore in attesa delle successive analisi.

Per estrarre gli EPS invece:

- si riporta a volume (80 ml) il *becker* contenente il pellet precedentemente separato dal surnatante;
- si riscalda a bagnomaria la soluzione così ottenuta fino a  $75 \div 80$  °C;
- dopo 10 minuti a questa temperatura si procede ad ulteriore centrifugazione a 3800 rpm per ulteriori 10 minuti;
- si separa il surnatante dal pellet;
- si filtra in pressione il surnatante con carta filtro (0,45  $\mu\text{m}$ );
- si stocca il permeato in congelatore in attesa delle successive analisi.

La misurazione delle concentrazioni di proteine e carboidrati seguono rispettivamente i metodi di Lowry e di Dubois. Essi si fondano sulla determinazione di una retta di calibrazione che mette in relazione l'assorbanza di specifiche lunghezze d'onda emesse dallo spettrofotometro con concentrazioni note di complessi proteici e di carboidrati.

In questo modo, a seconda dell'assorbanza (con lunghezza d'onda  $\lambda$  pari 750 nm per le proteine e 490 per i carboidrati) del nostro campione opportunamente trattato con specifici reattivi, è possibile determinare le concentrazioni di proteine e carboidrati.

Si è evidenziata un'interazione del nitrito nella misurazione sia dei carboidrati sia delle proteine. Si è pertanto dosato in eccesso acido solfamminico  $\text{NH}_3\text{SO}_3\text{H}$  che, reagendo istantaneamente con gli ioni  $\text{NO}_2^-$ , libera azoto gassoso. Si è osservato che  $5 \div 6$  mg di  $\text{NH}_3\text{SO}_3\text{H}$  sono sufficienti a rimuovere completamente l'azoto nitroso fino a concentrazioni di  $20 \text{ mg}_{\text{N-NO}_2} \text{ L}^{-1}$ .

## ***Metodo di Lowry***

Il metodo di Lowry per la misurazione delle proteine prevede una serie di operazioni da effettuare sul campione. In fase di calibrazione tale campione sarà composto da determinate soluzioni aventi concentrazioni note di soluzione proteica standard.

Il kit per la misurazione delle proteine contiene:

- 2 g di reattivo di Lowry;
- 1 bottiglietta di reattivo di Folin & Ciocalteu;
- 2 mg di standard proteico.

La soluzione proteica standard si prepara aggiungendo circa 5 ml di acqua deionizzata ultrapura al recipiente in cui è contenuto lo standard proteico.

I reagenti necessari sono la *Folin & Ciocalteu working solution* e la soluzione di Lowry (*Lowry Reagent Solution*).

La prima si prepara miscelando 18 ml reattivo di Folin & Ciocalteu e 90 ml di acqua deionizzata ultrapura. La seconda invece aggiungendo 40 ml di acqua deionizzata ultrapura al contenitore del reattivo di Lowry.

La procedura prevede quindi:

- il prelievo di 1 ml di campione e il suo travaso in una cuvetta adatta per la misurazione spettrofotometrica;
- l'aggiunta di 1 ml di soluzione di Lowry;
- la miscelazione rapida della soluzione ottenuta;
- l'aggiunta, dopo 20 minuti, di 0,5 ml di *Folin & Ciocalteu working solution*;
- la miscelazione rapida ed immediata della soluzione ottenuta;
- la misurazione dell'assorbanza a lunghezza d'onda pari a 750 nm da effettuarsi tra i 30 e i 60 minuti dopo l'ultima miscelazione.

Per ogni serie di misurazioni e in fase calibrazione è prevista la determinazione di un bianco, ovvero di un campione composto da acqua deionizzata ultrapura.

Nella fase di calibrazione, invece, si sono utilizzate diverse percentuali volumetriche di soluzione proteica standard nella preparazione dei campioni (Tabella 3.1).

Tabella 3.1 Composizione dei campioni usati in fase di calibrazione

<b>Soluzione proteica standard</b>	<b>Acqua deionizzata ultrapura</b>	<b>Concentrazione di proteine</b>
ml	ml	mg l <sup>-1</sup>
0	1,000	0
0,120	0,880	0,048
0,250	0,750	0,100
0,500	0,500	0,200
0,750	0,250	0,300
1,000	0	0,400

### ***Metodo di Dubois***

Anche il metodo di Dubois prevede una serie di operazioni e la preparazione o l'uso di alcuni reattivi quali una soluzione di fenolo concentrato al 5% e dell'acido solforico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato al 99%.

Per il primo si è effettuata una diluizione di 5 ml di fenolo concentrato al 90% in 85 ml di acqua deionizzata ultrapura, mentre il secondo era già a disposizione dell'operatore nel reagentario del laboratorio.

La procedura prevede quindi:

- il prelievo di 0,75 ml di campione e il suo travaso in una cuvetta adatta per la misurazione spettrofotometrica;
- l'aggiunta di 0,75 ml di soluzione di fenolo concentrato al 5%;
- l'aggiunta di 3,75 ml di acido solforico;
- la miscelazione rapida ed immediata della soluzione ottenuta;
- un'ulteriore miscelazione dopo 10 minuti;
- la misurazione dell'assorbanza a lunghezza d'onda pari a 490 nm da effettuarsi tra i 30 e i 60 minuti dopo l'ultima miscelazione.

La fase di calibrazione ha visto l'utilizzo di soluzioni di glucosio diluito in acqua deionizzata ultrapura e, come per le proteine, si sono previste diverse concentrazioni di C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> nella preparazione dei campioni (Tabella 3.2).

Tabella 3.2 Composizione dei campioni usati in fase di calibrazione

<b>Concentrazione di C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (mg l<sup>-1</sup>)</b>	0	3,75	7,50	15	30	60	120
---	---	------	------	----	----	----	-----

### 3.2.2 Alcalinità

L'alcalinità totale di una soluzione non è altro che 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 una soluzione di HCl e l'annotazione, ogni volta, del valore di pH misurato tramite un pH-metro, così da poter ricavare un punto di equivalenza.

Trovato il punto di equivalenza, l'alcalinità totale A (meq L<sup>-1</sup>) si calcola con la seguente formula:

$$A = \frac{d \times N \times 1000}{V} \quad (3.1)$$

dove d è il dosaggio di acido necessario al raggiungimento del punto di equilibrio, N la normalità della soluzione di riferimento e V il volume del campione analizzato.

### 3.2.3 Analisi delle forme azotate e del COD

Fondamentale per la valutazione dell'attività sperimentale è costituita dalla determinazione delle concentrazioni dei composti chimici di interesse: forme azotate e la domanda chimica di ossigeno (COD). Per forme azotate intendiamo lo ione ammonio NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, lo ione nitrito NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e lo ione nitrato NO<sub>3</sub><sup>-</sup> misurati in mg<sub>N</sub> L<sup>-1</sup>.

Il metodo utilizzato per determinare le concentrazioni dei suddetti composti è costituito dai test in cuvetta con misurazione spettrofotometrica (Figura 3.5).



Figura 3.5 Spettrofotometro di massa

Tramite l'utilizzo di specifici kit commerciali (Figura 3.6) con misura su spettrofotometro è possibile far assumere una data colorazione alla soluzione composta dal campione (eventualmente diluito) con specifici reagenti. La procedura prevede in prima battuta la filtrazione del campione su filtro in acetato di cellulosa a  $0,45\ \mu\text{m}$  per poter eliminare i SS che interferirebbero notevolmente con una lettura di tipo ottico. Ovviamente per le analisi sul permeato questa pratica si è rivelata inutile, visto che il campione raccolto è già filtrato dalla membrana.



Figura 3.6 Kit per la misurazione del COD

Per il COD esistono due tipi di misurazione: se il campione su cui si effettua il test è filtrato otterremo il COD solubile, quello totale altrimenti. In entrambi i casi la soluzione di campione (eventualmente diluito) e reattivo va portata a 148 °C per un tempo pari a 2 ore.

Per ogni test vi sono intervalli specifici di lettura da parte dello spettrofotometro, per questo è necessario a volte diluire il campione con acqua deionizzata ultrapura, così che la concentrazione da determinare ricada all'interno del *range* di misura (Tabella 3.3).

Tabella 3.3 Kit utilizzati, *range* di misura e tipologia del kit

Specie da analizzare	Range di misura	Tipologia kit
-	mg L <sup>-1</sup>	-
COD	15 ÷ 150	Lange LCK 314
N – NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,015 ÷ 2,000	Lange LCK 304
	2 ÷ 47	Lange LCK 303
	47 ÷ 130	Lange LCK 302
N – NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,015 ÷ 0,600	Lange LCK 341
	0,6 ÷ 6,0	Lange LCK 342
N – NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,23 ÷ 13,50	Lange LCK 339
	13,5 ÷ 35,0	Lange LCK 340

Durante la sperimentazione si sono evidenziate delle interazioni dell'azoto nitroso con la misurazione dei nitrati e del COD: questi ultimi infatti risultavano sempre più sovrastimati in presenza di concentrazioni sempre più elevate di nitriti. Attraverso prove test di COD e di azoto nitrico effettuate su campioni contenenti unicamente note quantità di nitrito di sodio è stato possibile determinare l'entità dell'interazione, così da poter poi correggere i risultati ottenuti dalla misurazione del COD (Grafico 3.1) e dei nitrati (Grafico 3.2).

Lo studio ha evidenziato che per ogni mg L<sup>-1</sup> di N – NO<sub>2</sub><sup>-</sup> si ha un contributo di 1,19 mg L<sup>-1</sup> sulla misura del COD e di 0,37 mg L<sup>-1</sup> sulla misura dei nitrati.

Oltre alla correzione matematica a valle delle analisi è possibile ovviare alle interazioni eliminando l'interferente subito dopo l'estrazione del campione, dosando in eccesso acido solfammonico NH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H che, reagendo istantaneamente con gli ioni NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, libera azoto gassoso. Si è osservato che 5 ÷ 6 mg di NH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H sono sufficienti a rimuovere completamente l'azoto nitroso fino a concentrazioni di 20 mg<sub>N-NO2</sub>- L<sup>-1</sup>.

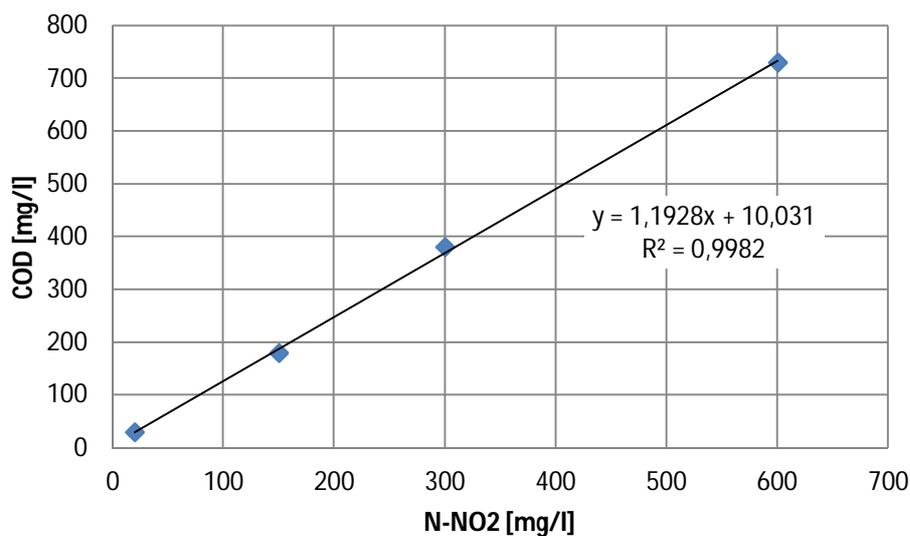


Grafico 3.1 Interferenza dei nitriti nella misurazione del COD

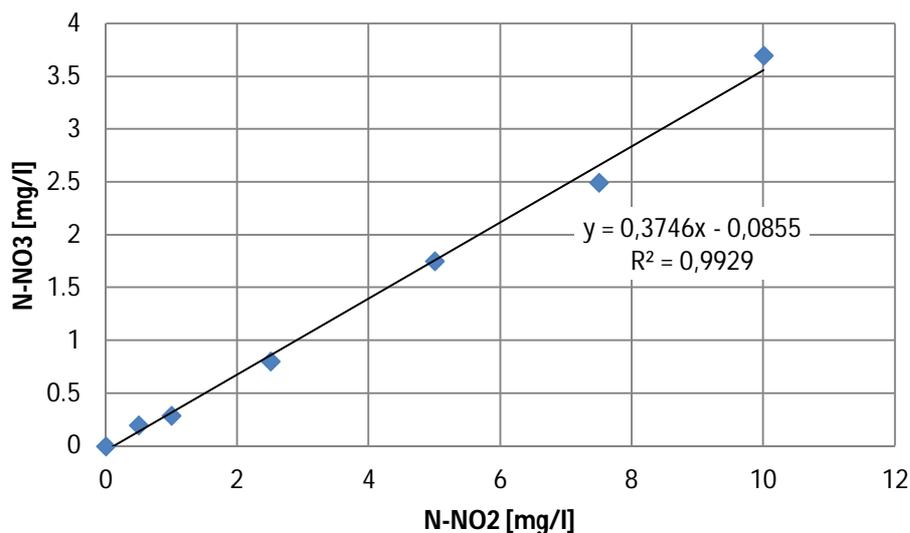


Grafico 3.2 Interferenza dei nitriti nella misurazione dei nitrati

### 3.3 Prove di attività

Le prove di attività sono state impiegate nella fase di sperimentazione Anammox e sono fondamentali per determinare il massimo carico di azoto applicabile alla biomassa ( $NRR_{max}$ ) e sono state eseguite con cadenza settimanale, salvo eccezioni.

Una prova di attività prevede l'aggiunta impulsiva di sali di ammonio ( $NH_4Cl$ ) e di nitrito di ( $NaNO_2$ ) attraverso un'apposita apertura con chiusura ermetica posta sul coperchio di tenuta

del fermentatore. Dopo 10 minuti si è proceduto con più misurazioni delle concentrazioni di nitrito e ammonio nel permeato (generalmente 3) con frequenza temporale costante. Le concentrazioni di ioni ammonio e nitrito sono state poi rappresentate in funzione del tempo: la pendenza della retta di regressione rappresenterà il valore di  $NRR_{max}$  come  $mg_N L^{-1} min^{-1}$ . Grazie all' $NRR_{max}$  è possibile determinare la massima massa di azoto rimuovibile per unità di tempo ( $g_N d^{-1}$ ), conoscendo il volume di ML nel reattore (generalmente 6,2 L).

Questo valore è stato rapportato con il carico di azoto somministrato quotidianamente (NLR) per avere una stima della percentuale di carico della biomassa nel fermentatore rispetto alle sue potenzialità.

L'altra importante informazione ricavata dalle prove di attività è stata data dal confronto tra il rapporto dei ratei di rimozione dell'azoto nitroso e ammoniacale e quello stechiometrico, pari a 1,32. Questa informazione ha permesso di verificare la sussistenza di reazioni parallele in concomitanza con quelle svolte dalla biomassa Anammox. Nel caso in cui  $r$  risulti superiore al valore stechiometrico, infatti, è fortemente probabile una significativa presenza di biomassa eterotrofa denitrificante, che, consumando azoto nitroso, altera l'esito della prova causando una sovrastima del processo Anammox. Per questo motivo, nei casi in cui si sia presentato  $r > 1,32$  nell'effluente,  $NRR_{max}$  si è calcolato considerando la sola rimozione dell'ammonio ( $NH_4^+RR$ ):

$$NRR_{max} = NH_4^+RR + NH_4^+RR \times 1,32 \quad (3.4)$$

Sono stati calcolati il coefficiente di regressione  $R^2$  e l'errore standard SE, allo scopo di verificare la qualità dei dati ottenuti.

Viene definita invece attività specifica Anammox (SAA):

$$SAA = \frac{N_{rim}}{MLVSS \times \Delta t} \quad (3.5)$$

ovvero l'azoto rimosso per unità di biomassa nell'unità di tempo.

### 3.4 Lavaggi della membrana

I lavaggi della membrana si rendono necessari periodicamente a causa del fenomeno del *fouling* (Figura 3.7) che riduce la capacità di permeazione (Paragrafo 2.2.4).

Sono stati effettuati sia lavaggi fisici sia lavaggi chimici. Il primo è constato nella semplice rimozione fisica della biomassa e dei gel depositatisi sopra e tra le fibre della membrana (*fouling* reversibile) ed è stata effettuata tramite un getto di acqua corrente. I tempi della

pulizia fisica sono particolarmente ridotti e legati unicamente ai procedimenti di estrazione, pulizia e reinserimento del modulo filtrante.

Il lavaggio chimico invece permette una migliore pulizia tramite ossidazione dei composti che provocano *fouling* irreversibile e prevede l'immersione della membrana in una soluzione di NaClO (200 ppm) per un tempo superiore a 5 giorni (Figura 3.8).



Figura 3.7 Modulo filtrante estratto subito dopo un *TMP-jump*



Figura 3.8 Modulo filtrante dopo un lavaggio chimico

## 3.5 Preparazione di soluzioni e reattivi

### 3.5.1 Preparazione dell'alimento

L'alimento in ingresso all'MBR, differente nei due tipi di sperimentazione, è costituito da una miscela sintetico/reale. La frazione volumetrica di influente reale è stata progressivamente incrementata per la fase di sperimentazione sul processo Anammox, mentre si è passati in una sola settimana da una soluzione totalmente sintetica ad una al 100% reale per quella sul processo Parnit.

L'alimento sintetico viene preparato direttamente in laboratorio addizionando alla cosiddetta *soluzione madre* sale di ammonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e acetato di sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) per il Parnit e sali di ammonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e di nitrito ( $\text{NaNO}_2$ ) per l'Anammox. L'acetato di sodio viene fornito come sostanza organica (COD) indispensabile per le reazioni di sintesi batterica.

La *soluzione madre* è composta da micro e macronutrienti (Tabella 3.4), utili al metabolismo cellulare, disciolti in acqua di rete (Van de Graaf et al., 1996; Lopez et al., 2008).

Come si vedrà poi nel Capitolo 4 e nel Capitolo 5 non si sono verificate le problematiche riscontrate da Trigo et al. (2006) e da Van der Star (2008), nonostante le concentrazioni di sali di magnesio, di calcio e di fosforo simili a quelle previste da Van de Graaf et al. (1996).

Tabella 3.4 Composizione della *soluzione madre*

NaHCO <sub>3</sub>	1050	mg L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	62,5	mg L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	300	mg L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	200	mg L <sup>-1</sup>
HCl 1 N	2	ml L <sup>-1</sup>
EDTA	25	mg L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5375	mg L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,3	mg L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,2375	mg L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,3125	mg L <sup>-1</sup>
NaMoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,275	mg L <sup>-1</sup>
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,2375	mg L <sup>-1</sup>
NaSeO <sub>3</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	0,2	mg L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,055	mg L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub>	6,25	mg L <sup>-1</sup>

Gli influenti utilizzati sono stati un chiarito risultante da una separazione solido/liquido a valle di una digestione anaerobica di un refluo agrozootecnico per il Parnit e l'effluente di un reattore SBR di nitrosazione e di denitrosazione avente come alimento il suddetto chiarito (Figura 3.9).

Per l'MBR Anammox non è stato utilizzato un alimento "ideale" e infatti si sono rese necessarie delle aggiunte correttive di sali di nitrito e di ammonio (NaNO<sub>2</sub> e NH<sub>4</sub>Cl). Questa scelta deriva dalla necessità di studiare la fattibilità dell'inserimento di soli reattori MBR Anammox in impianti esistenti senza prevedere una fase a monte di parziale nitrosazione.

L'impianto descritto (in nero in Figura 3.9) è situato presso l'azienda agricola Corte Grande SRL a Casaletto di Sopra (CR). La parte in blu invece sono gli MBR (Parnit e Anammox) a scala di laboratorio utilizzati durante le due fasi della sperimentazione (si ricorda che il reattore è uno solo ed è stato utilizzato per i due processi in due periodi temporali differenti).

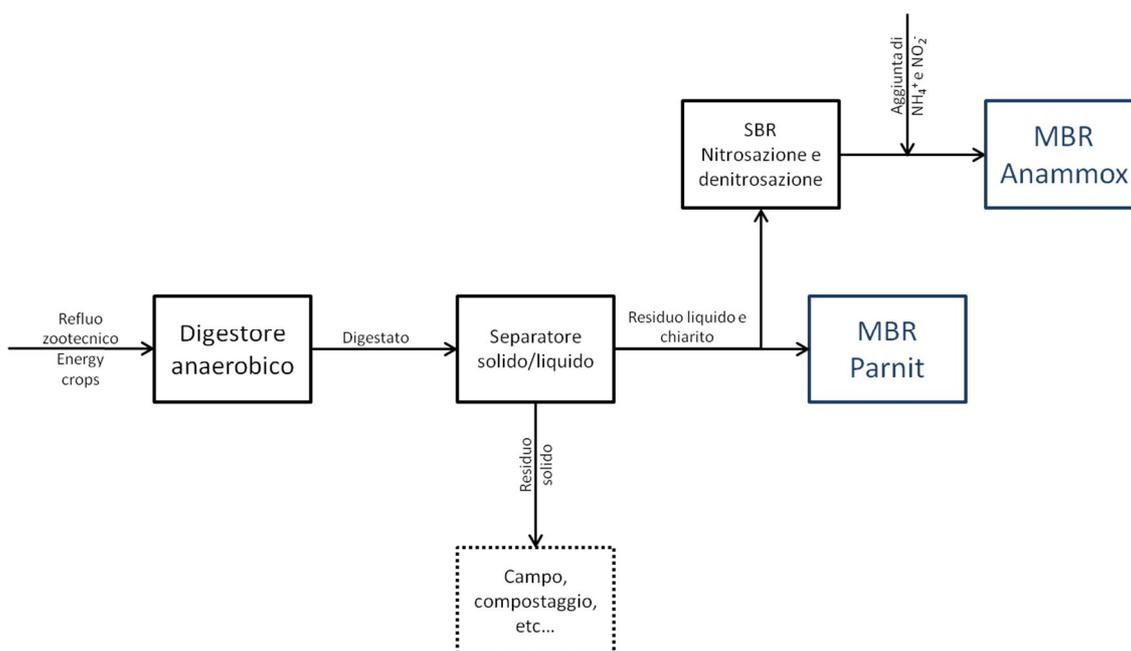


Figura 3.9 Provenienza degli alimenti utilizzati per le due fasi della sperimentazione.

Per rimuovere gli eventuali SS sedimentabili presenti, prima di ogni impiego, si lascia decantare la frazione di alimento reale per qualche ora e si utilizza il surnatante. Il dosaggio dei sali di nitrito e di ammonio è fondamentale per il processo Anammox ed è funzione del prestabilito rapporto  $r$  tra ioni nitrito e ioni ammonio. Quando si utilizza l'influente reale è utile verificare che  $r$  venga rispettato. In caso contrario si provvederà a correggere attraverso l'aggiunta di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o  $\text{NaNO}_2$ .

La determinazione di tale rapporto è frutto dell'analisi dei dati sull'effluente (eventuali accumuli di azoto nitroso o ammoniacale) e considerando che la stechiometria lo prevede pari a 1,32 (vedi Eq. (2.14)).

Per l'alimento del MBR Anammox si adotta un'alcalinità pari ad  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  da correggere in caso di valori difforni del reale con bicarbonato di sodio  $\text{NaHCO}_3$ .

I contenitori per l'influente sono differenti per i due tipi di trattamento. Se infatti per il Parnit l'alimento viene travasato direttamente in una tanica collegata al fermentatore, per l'Anammox si utilizza una sacca collassabile (chiusa ermeticamente e in grado di deformarsi durante lo svuotamento) in cui viene preliminarmente insufflato azoto gassoso tramite pietra porosa, così da deossigenare l'influente.

### 3.5.2 Soluzioni acide e basiche

Per la regolazione automatica del pH si rende necessaria la preparazione di soluzioni a pH acido e basico. Come soluzione acida si è utilizzato acido cloridrico 0,5 ÷ 1 N a seconda delle necessità diluendo l'HCl concentrato al 37% in acqua deionizzata ultrapura.

Per la soluzione basica si è invece impiegato NaHCO<sub>3</sub> 1 M.

## 3.6 Caratteristiche dell'influente

### 3.6.1 Parnit

L'influente sintetico è stato alimentato fino al giorno 67. A seguito di varie prove di soluzioni composte con diverse frazioni crescenti di influente reale, si è passati all'utilizzo di solo alimento reale dal giorno 82 (

Tabella 3.5).

Tabella 3.5 Caratteristiche alimento MBR Parnit

Giorni	Alcalinità	COD	COD <sub>s</sub>	N – NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	TSS	VSS	% reale (numero batch)
-	gNaHCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	g L <sup>-1</sup>	g L <sup>-1</sup>	%
1 ÷ 29	4,50	1000	-	1300	-	-	0
30 ÷ 34	4,50	1000	-	650	-	-	0
35 ÷ 44	4,50	1000	-	1300	-	-	0
56 ÷ 64	4,50	1000	-	1300	-	-	0
66	4,50	1000	-	1300	-	-	0
67 ÷ 70	7,00	1950	1210	1400	0,455	0,310	100 (I)
75 ÷ 76	5,00	970	605	700	0,227	0,155	50 (I)
77 ÷ 81	6,10	1450	900	1050	0,341	0,232	75 (I)
82 ÷ 85	7,00	1950	1210	1400	0,455	0,310	100 (I)
86 ÷ 99	7,20	2760	1710	1430	0,484	0,330	100 (II)
100 ÷ 110	7,10	2800	1680	1400	0,475	0,330	100 (III)

Le misurazioni di COD solubile, TSS e VSS sull'alimento sono disponibili solo per i periodi in cui sono state impiegate frazioni volumetriche di influente reale diverse da zero.

Per tutto il periodo in cui è stato impiegato l'influente sintetico (Grafico 3.3) la concentrazione dell'azoto ammoniacale alimentata è stata costante (1,3 g<sub>N</sub> L<sup>-1</sup>). Con l'inizio dell'impiego dell'influente reale la concentrazioni di ammonio è stata diversa per i diversi *batch* adoperati e in funzione della frazione volumetrica utilizzata.

L'alimento è stato preparato con cadenza settimanale regolare: lunedì (7 L), mercoledì (7 L) e venerdì (12 L).

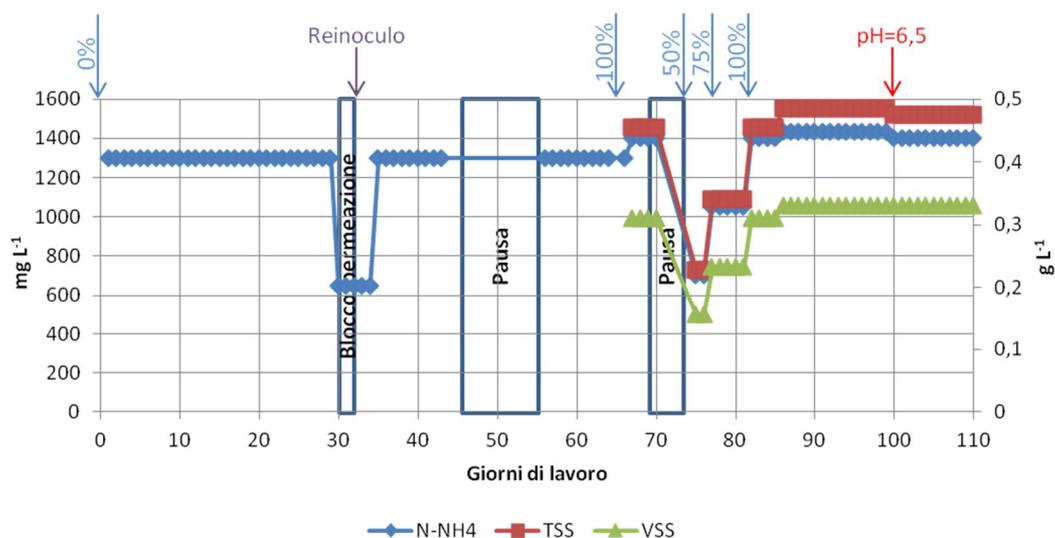


Grafico 3.3 Concentrazioni di  $N - NH_4^+$  (mg L<sup>-1</sup>), TSS e VSS (g L<sup>-1</sup>) in ingresso al fermentatore dell'MBR Parnit

### 3.6.2 Anammox

Dopo i primi cinquanta giorni di sperimentazione con alimento totalmente sintetico, si sono iniziate ad alimentare frazioni sempre crescenti di influente reale (Tabella 3.6).

Tabella 3.6 Caratteristiche alimento MBR Anammox

Giorni	$N - NH_4^+$	$N - NO_2^-$	$N - NO_3^-$	COD	% reale
-	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	%
1 - 7	291	334	-	-	0
8 - 9	700	770	-	-	0
10 - 12	-	-	-	-	0
13 - 14	250	250	-	-	0
15 - 16	350	280	-	-	0
17 - 19	500	400	-	-	0

20 - 21	632	568	-	-	0
23 - 26	667	533	-	-	0
27 - 28	632	568	-	-	0
29 - 32	667	533	-	-	0
33 - 35	-	-	-	-	0
36 - 37	526	474	-	-	0
38 - 41	474	426	-	-	0
43	474	426	-	-	0
48 - 49	474	426	-	-	0
50 - 53	474	426	8	138	10
55 - 58	474	426	8	138	10
76	236	213	-	-	0
77 - 84	342	308	-	-	0
85 - 90	526	474	-	-	0
91 - 96	526	474	8	138	10
97 - 111	526	474	20	345	25
112 - 121	526	474	32	552	40
122 - 143	526	474	55	966	70
148	526	2800	55	966	70
149 - 155	316	284	55	966	70
157 - 159	333	267	55	966	70
161 - 162	444	355	12	1547	70
163 - 166	526	474	12	2210	70
168 - 170	526	474	18	2210	100
172 - 173	526	474	18	2210	100
174 - 175	526	474	56	1530	100
176	-	-	-	-	0
177	368	332	-	-	0
178 - 181	123	111	-	-	0

Si noti che nei giorni 10 – 12, 33 – 35 e 176 è stata alimentata *soluzione madre* per via di un accumulo di azoto nitroso nel fermentatore.

Nel Grafico 3.4 sono mostrati gli andamenti delle concentrazioni in ingresso dei composti azotati e del COD. Le concentrazioni di COD sono andate crescendo – come previsto - con la frazione di reale alimentata. Nel Grafico 3.5 si mostra il rapporto  $r$  tra azoto nitroso e ammoniacale. L'equilibrio è stato trovato a 0,9 – alquanto sottostechiometrico. Valori più alti provocavano infatti un accumulo di nitrito nel fermentatore. Si suppone che questo

fenomeno sia causato dall'attività di AOB parallela a quella della biomassa Anammox, probabilmente provocata da infiltrazioni di ossigeno.

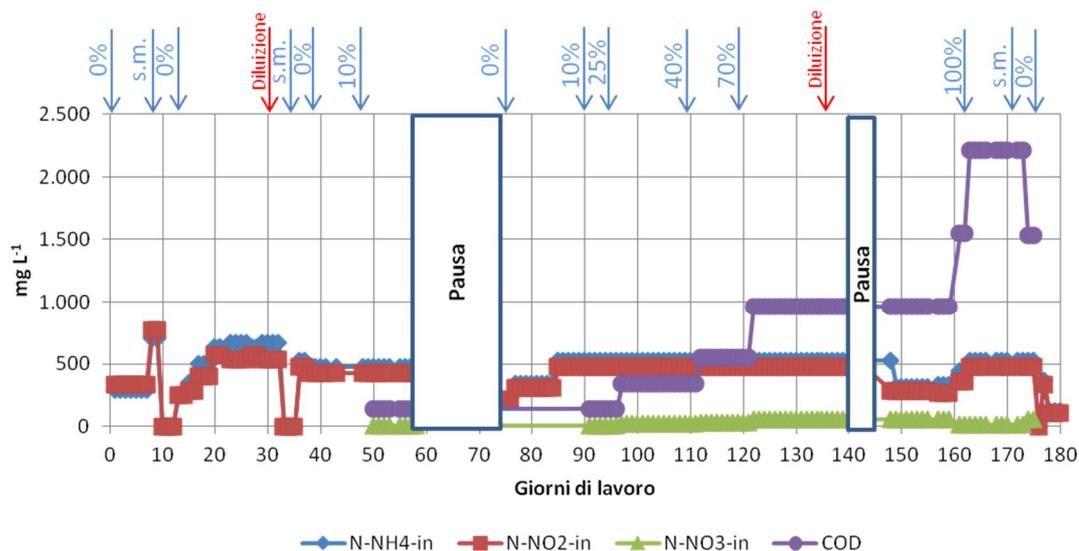


Grafico 3.4 Concentrazioni di  $N - NH_4^+$ ,  $N - NO_2^-$ ,  $N - NO_3^-$  e COD in ingresso al fermentatore dell'MBR Anammox

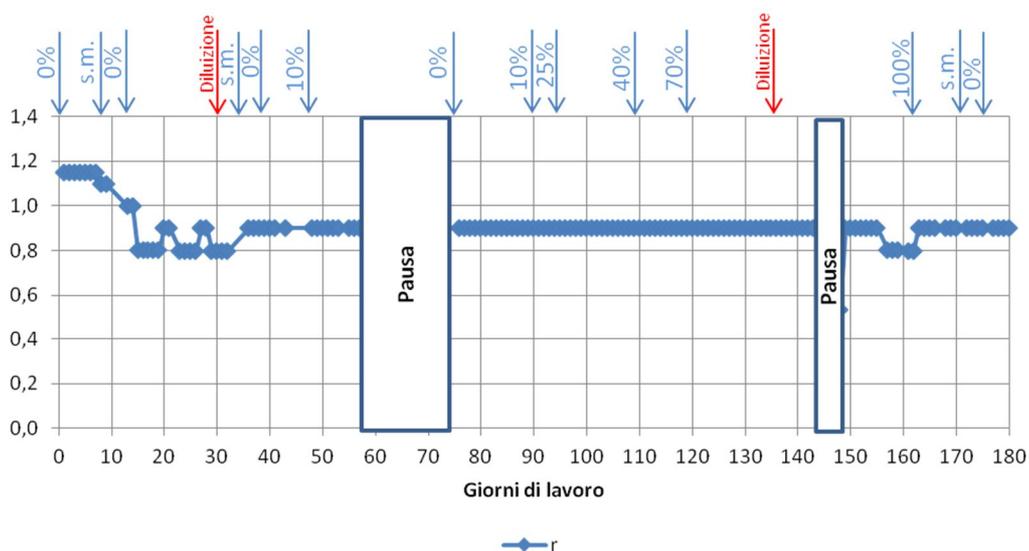


Grafico 3.5 Rapporto  $r$  tra  $N - NO_2^-$  e  $N - NH_4^+$  nell'alimento dell'MBR Anammox

L'alimento è stato preparato con cadenza settimanale regolare: lunedì (10 L) e mercoledì (10 L) e venerdì (10 L).

## 3.7 Inoculo

### 3.7.1 Parnit

In data 14 marzo 2012 (giorno 0), impiegando il fango attivo proveniente dal reattore pilota SBR Parnit in costruzione presso l'azienda Corte Grande SRL, è stato effettuato l'inoculo. Prima di questa operazione la biomassa è stata caratterizzata, così da stabilire la quantità da inoculare in funzione della concentrazione di MLVSS desiderata (3,0 g L<sup>-1</sup>). Nel fermentatore è stata poi addizionata *soluzione madre* fino al raggiungimento del volume stabilito: 6,7 L (corrispondente a circa 6,2 L di ML).

Al giorno 33 è stata reinoculata la biomassa spurgata nei giorni precedenti (1,6 gvss). L'operazione si è resa necessaria per via di un calo drastico del fango attivo (< 0,7 gvss L<sup>-1</sup>) causato da un eccessivo spurgo.

### 3.7.2 Anammox

In data 7 giugno 2011 (giorno 0) si è effettuato l'inoculo della biomassa Anammox utilizzando granuli provenienti dall'impianto di Dokhaven-Sluisjesdijk a Rotterdam (Van Der Star et al., 2007). Prima di questa operazione la biomassa è stata caratterizzata, così da stabilire la quantità da inoculare in funzione della concentrazione di MLVSS desiderata (2,4 g L<sup>-1</sup>).

Nel fermentatore è stata poi addizionata *soluzione madre* fino al raggiungimento del volume stabilito: 6,7 L (corrispondente a circa 6,2 L di ML).

## 3.8 Protocollo di avvio e conduzione del reattore

### 3.8.1 Parnit

Il protocollo di monitoraggio dell'MBR Parnit è mostrato in Tabella 3.7.

Tabella 3.7 Protocollo di monitoraggio dell'MBR Parnit con relativa cadenza temporale

Operazione	Cadenza
Misurazione concentrazioni di NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> nell'effluente	4 volte a settimana

Misurazione concentrazioni di $\text{NO}_2^-$ nell'effluente	4 volte a settimana
Misurazione concentrazioni di $\text{NO}_3^-$ nell'effluente	2 volte al mese
Misurazione concentrazioni di COD nell'effluente	2 volte a settimana
Misurazione concentrazioni di MLTSS e MLVSS	2 volte a settimana
Misurazione concentrazioni di EPS e SMP nel ML	Ogni 3 settimane
Controllo TMP	Quotidiano
Controllo funzionamento delle sonde (T, pH, OD e livello)	2 volte a settimana
Controllo portata dell'aeratore $Q_{\text{aeratore}}$	Quotidiano
Controllo volume delle soluzioni per la regolazione del pH	Quotidiano
Rimozione di eventuali occlusioni nei tubi	Una volta a settimana
Sostituzione tubazioni sottoposte a stress dalle pompe	Una volta a settimana

### 3.8.2 Anammox

Il protocollo di monitoraggio dell'MBR Anammox è mostrato in Tabella 3.8.

Tabella 3.8 Protocollo di monitoraggio dell'MBR Anammox con relativa cadenza temporale

<b>Operazione</b>	<b>Cadenza</b>
Misurazione concentrazioni di $\text{NH}_4^+$ nell'effluente	3 volte a settimana
Misurazione concentrazioni di $\text{NO}_2^-$ nell'effluente	3 volte a settimana
Misurazione concentrazioni di $\text{NO}_3^-$ nell'effluente	3 volte a settimana
Misurazione concentrazioni di MLTSS e MLVSS	Ogni 3 settimane
Misurazione concentrazioni di EPS e SMP nel ML	Ogni 2 settimane
Controllo TMP	Quotidiano
Controllo funzionamento delle sonde (T, pH e livello)	2 volte a settimana
Controllo portata dell'aeratore $Q_{\text{aeratore}}$	Quotidiano
Controllo volume della soluzione per la regolazione del pH	Quotidiano
Controllo pressione nel fermentatore $P_{\text{fermentatore}}$	Quotidiano
Rimozione di eventuali occlusioni nei tubi	Una volta a settimana
Sostituzione tubazioni sottoposte a stress dalle pompe	Una volta a settimana
Prova di attività	Una volta a settimana

# CAPITOLO 4

## FUNZIONAMENTO OPERATIVO E RISULTATI DELL'MBR PARNIT

Questo trattamento ha come obiettivo l'ottimizzazione delle condizioni operative del pilota MBR per ottenere un effluente con caratteristiche idonee alla successiva fase Anammox, cioè con rapporto azoto nitroso/azoto ammoniacale tendente a 1.

### 4.1 Condizioni operative

In Tabella 4.1 si possono osservare i parametri operativi dell'MBR Parnit. Il flusso transmembrana  $J$  è stato mantenuto costante per tutta la durata della sperimentazione Parnit e così la temperatura  $T$ , la *relaxation*  $RX$ , il DO, la sovrappressione del fermentatore  $P_{\text{fermentatore}}$ , la portata in ingresso  $Q_{\text{in}}$  e la portata d'aria di ricircolo  $Q_{r\_aria}$ .

La *relaxation estesa*  $RX_{\text{ext}}$  è stata inserita al giorno 85 per via dell'intensificarsi del *fouling*.

Il pH – come spiegato nel Paragrafo 4.1.2 – è stato modificato al giorno 100 (da 7,0 a 6,5) ai fini di regolazione dell'attività (Grafico 4.2). La portata dell'aeratore  $Q_{\text{aeratore}}$  può anch'essa essere regolata ed è stata mantenuta su valori compresi tra 50 e 75 ml min<sup>-1</sup> fino al giorno 83 dove problematiche con sonda DO hanno portato ad erronee modifiche di tale parametro. L'HRT è funzione del volume  $V$  di ML nel fermentatore e della portata in ingresso  $Q_{\text{in}}$  (3 L d<sup>-1</sup>) secondo la seguente formula:

$$HRT = \frac{V}{Q_{in}} \quad (4.1)$$

Durante i periodi caratterizzati dalla presenza di schiuma (interferente con la sonda di livello), l'HRT ha risentito delle interferenze con la sonda di livello che sovradimensionavano l'ML presente nel fermentatore, attivando la pompa di scarico e diminuendo conseguentemente il V nel reattore. Per questo motivo in quel periodo abbiamo avuto HRT leggermente più bassi.

L'SRT è stato controllato per limitare le concentrazioni degli AOB, che avrebbero altrimenti ossidato totalmente l'azoto ammoniacale. Lo spurgo del fango costituisce uno dei metodi più efficaci per controllare l'attività della biomassa nel fermentatore.

Avendo il fango estratto la medesima concentrazione di biomassa presente nel fermentatore, la formula per il calcolo dell'SRT istantaneo si riduce a:

$$SRT = \frac{V}{Q_s} \quad (4.2)$$

Inizialmente è stata imposta un'età del fango di 5 giorni, sulla base di elaborazioni teoriche fondate sulle cinetiche di reazione, ma si è presto rivelata eccessiva (Grafico 4.4 e Grafico 4.6): diminuzione drastica dei MLVSS e innalzamento delle concentrazioni di azoto ammoniacale. Si è pertanto provveduto a rimodulare più volte la portata dello spurgo  $Q_s$  a seconda dei risultati delle concentrazioni in uscita fino ad ottenere rapporti vicino a uno per SRT vicini ai 13 giorni.

Il drastico abbassamento dell'SRT dal giorno 83 è da imputarsi in parte all'aumento della  $Q_s$  per diminuire l'attività della biomassa a seguito dell'intensa aerazione fornita dopo le problematiche date dalla sonda ossigeno, e in parte alla diminuzione del volume V di ML nel fermentatore a causa delle problematiche sopraccitate innescate dalla schiuma.

In Tabella 4.2 sono invece mostrati gli F/M applicati sia per il COD sia per l'azoto ammoniacale.

Tabella 4.1 Parametri operativi dell'MBR Parnit

Giorni	-	0 ÷ 12	13 ÷ 32	33 ÷ 44	56 ÷ 82	83 ÷ 84	85 ÷ 100	101 ÷ 110
<b>J</b>	LMH	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<b>RX</b>	min <sub>off</sub> : min <sub>on</sub>	1 : 8	1 : 8	1 : 8	1 : 8	1 : 8	1 : 8	1 : 8
<b>RX<sub>ext</sub></b>	h <sub>off</sub> : h <sub>on</sub>	-	-	-	-	-	1 : 11	1:11
<b>pH</b>	-	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	6,5
<b>T</b>	°C	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
<b>DO</b>	mg l <sup>-1</sup>	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-
<b>P<sub>fermentatore</sub></b>	mbar	6 ÷ 7	6 ÷ 7	6 ÷ 7	6 ÷ 7	6 ÷ 7	6 ÷ 7	6 ÷ 7
<b>Q<sub>in</sub></b>	L d <sup>-1</sup>	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
<b>Q<sub>aeratore</sub></b>	ml min <sup>-1</sup>	50 ÷ 75	50 ÷ 75	50 ÷ 75	50 ÷ 75	300	100	100

<b>Q<sub>r,aria</sub></b>	L min <sup>-1</sup>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<b>HRT</b>	d	2	2	2	2	1,8	1,8	1,8
<b>SRT</b>	d	5	13	10	13	5	5	5

Tabella 4.2 F/M applicati

<b>Giorni</b>	<b>F/M<sub>cod</sub></b>	<b>F/M<sub>N-NH4+</sub></b>
-	g <sub>cod</sub> g <sup>-1</sup> MLVSS d <sup>-1</sup>	g <sub>N-NH4+</sub> g <sup>-1</sup> MLVSS d <sup>-1</sup>
4	1,42	1,85
11	1,73	2,25
15	2,38	3,09
18	2,31	3,00
21	2,81	3,65
26	2,88	3,75
29	4,72	3,07
32	1,81	1,18
36	3,33	4,33
39	3,00	3,90
43	3,80	4,05
56	4,29	5,57
60	2,91	3,79
67	13,30	9,55
75	3,80	2,75
81	4,60	4,44
85	9,67	7,09
89	8,28	4,29
93	8,28	4,29
99	3,91	1,95
110	6,00	3,00

La temperatura (Grafico 4.1) è stata di 30 °C per tutta la durata della sperimentazione, a parte nei giorni 16 ÷ 19 nei quali la piastra riscaldante non ha funzionato a causa del malfunzionamento di un fusibile, poi sostituito.

Nel Grafico 4.2 si può notare che i dosaggi delle soluzioni acida e basica sono tutt'altro che costanti. Nonostante il processo di nitrosazione produca acidità, si possono notare numerosi e sostanziosi dosaggi di HCl. La motivazione è da addurre alla forte alcalinità dell'influente che, nei momenti di calo dell'attività, tendeva a spostare il pH su valori più elevati.

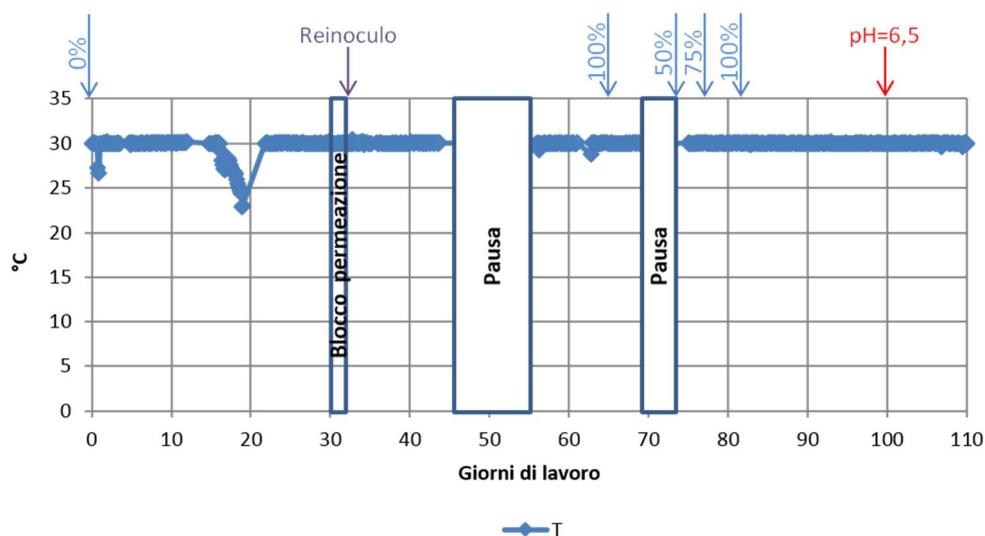


Grafico 4.1 Andamento della temperatura nell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

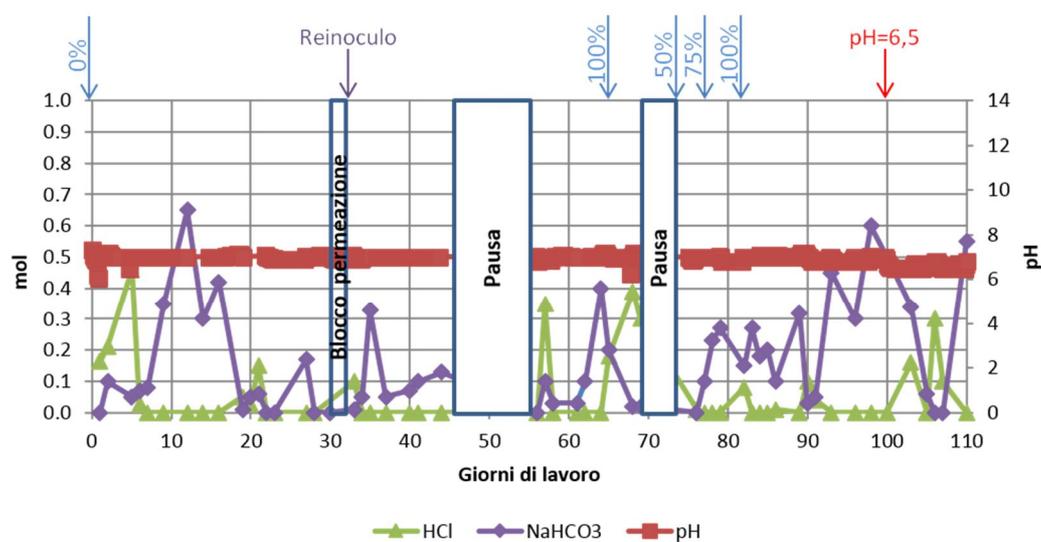


Grafico 4.2 Andamento del pH e dei dosaggi delle soluzioni per la regolazione del pH. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

Nei giorni 45 ÷ 55, 65 e 71 ÷ 74 la sperimentazione è stata interrotta a causa di problematiche meccaniche, chiusura del laboratorio o indisponibilità dell'operatore.

### 4.1.1 Uso dell'antischiuma

Il passaggio all'influente reale ha generato problemi sul controllo del volume di ML nel fermentatore, a causa di schiume che – bagnando la sonda di livello – provocavano l'indesiderato funzionamento della pompa di scarico, facendo così calare il volume di ML presente nel reattore (fino a 4,7 L).

Si è reso pertanto necessario l'utilizzo di antischiuma diluito all'1% (3 mL d<sup>-1</sup>) (giorno 79).

### 4.1.2 Controllo della portata dell'aeratore

Fin dai primi giorni la portata dell'aeratore è risultata poco controllabile a causa di problematiche tecniche della linea aria (ripiegamenti del tubo) e dell'aeratore, ma il controllo automatico del DO ha assicurato che la concentrazione di ossigeno non superasse mai i 0,4 mg L<sup>-1</sup>.

L'antischiuma però si è rivelato un interferente per la sonda ossigeno che ha fortemente sottostimato la concentrazione del DO presente nel fermentatore. Così – a fronte di concentrazioni di DO rilevate molto basse, nonostante le alte velocità del miscelatore (circa 300 rpm) – si è deciso di aumentare la portata dell'aeratore a 300 mL min<sup>-1</sup> che ha inevitabilmente causato la crescita dell'attività degli AOB e dunque l'ossidazione di quasi tutto l'azoto ammoniacale. Accortisi dell'errore, si è corretta di nuovo la portata d'aria, pur mantenendola su valori superiori rispetto a quelli iniziali, e si è intervenuti sul pH (6,5) piuttosto che sul DO per la regolazione dell'attività batterica.

Nel Grafico 4.3 è evidente che alle portate d'aria più elevate dei giorni successivi al 78° non corrispondevano concentrazioni di DO maggiori: la sonda ossigeno non era più affidabile.

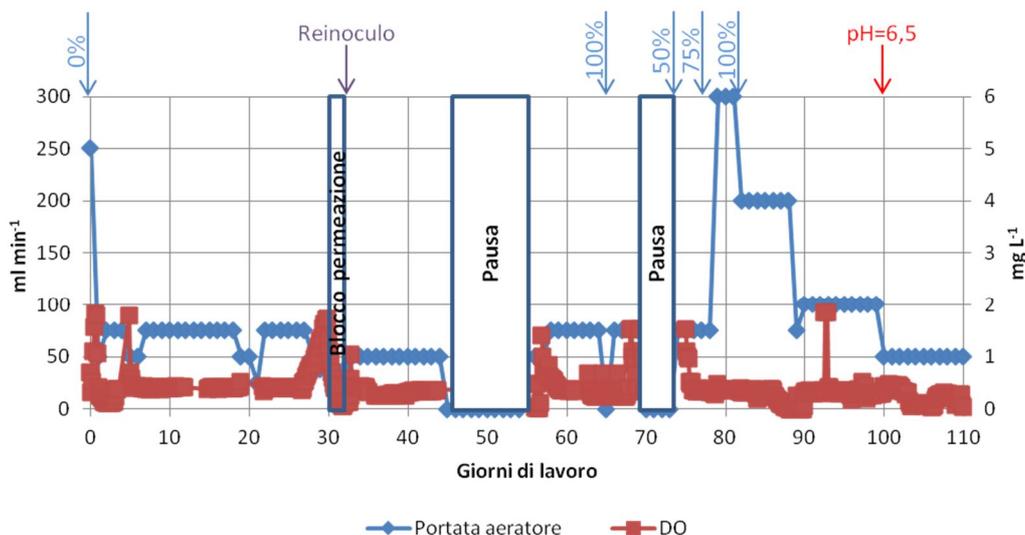


Grafico 4.3 Andamento della portata dell'aeratore e del DO nell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

## 4.2 Prestazioni del processo biologico

### 4.2.1 Andamento della concentrazione di biomassa

Nel Grafico 4.4 si mostra l'andamento delle concentrazioni di solidi sospesi nell'ML. La concentrazione iniziale di MLVSS (circa 2,0 gvss L<sup>-1</sup>) si è ridotta fino a quasi 0,5 gvss L<sup>-1</sup>, a causa degli spurghi effettuati per stabilizzare l'SRT sul valore di 5 ÷ 6 giorni (Grafico 4.5).

L'eccessivo dilavamento della biomassa e il crollo della temperatura dal giorno 16 al giorno 19, infatti, hanno portato dal giorno 20 al giorno 30 ad un aumento delle concentrazioni di azoto ammoniacale (Paragrafo 4.2.2) a scapito di quello nitroso.

Si è deciso pertanto di reinoculare la biomassa spurgata dei giorni precedenti (1,6 gvss), così da far riprendere l'attività batterica. A seguito di questo evento anche l'SRT è stato ricalibrato intorno a valori di 13 giorni.

A seguito delle problematiche esposte nel Paragrafo 4.1.2, dopo il giorno 80 la biomassa ha risentito del maggiore DO ed è pertanto aumentata fino a valori superiori ai 2,0 g L<sup>-1</sup> e ha provocato la nitrosazione di quasi tutto l'azoto ammoniacale. Vista l'impossibilità di controllare il DO, si è optato per un minor SRT (5 ÷ 6 giorni) per diminuire la biomassa nel fermentatore e un pH pari a 6,5 per rallentare la sua attività.

I penultimi valori di MLVSS e MLTSS sono da considerarsi frutto di errori di misura in quanto in controtendenza rispetto a quanto ci si aspetta a seguito di una diminuzione dell'SRT.

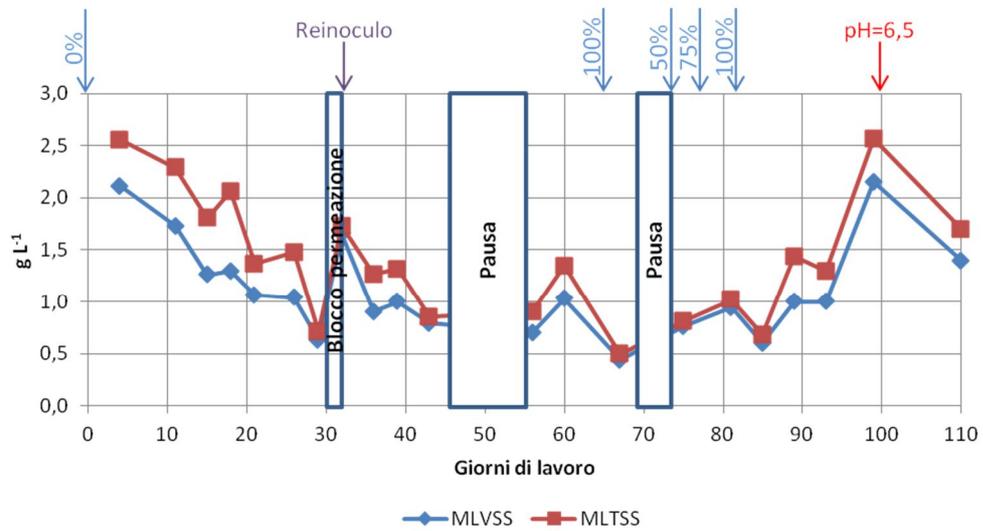


Grafico 4.4 Andamento dei MLVSS e dei MLTSS dell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

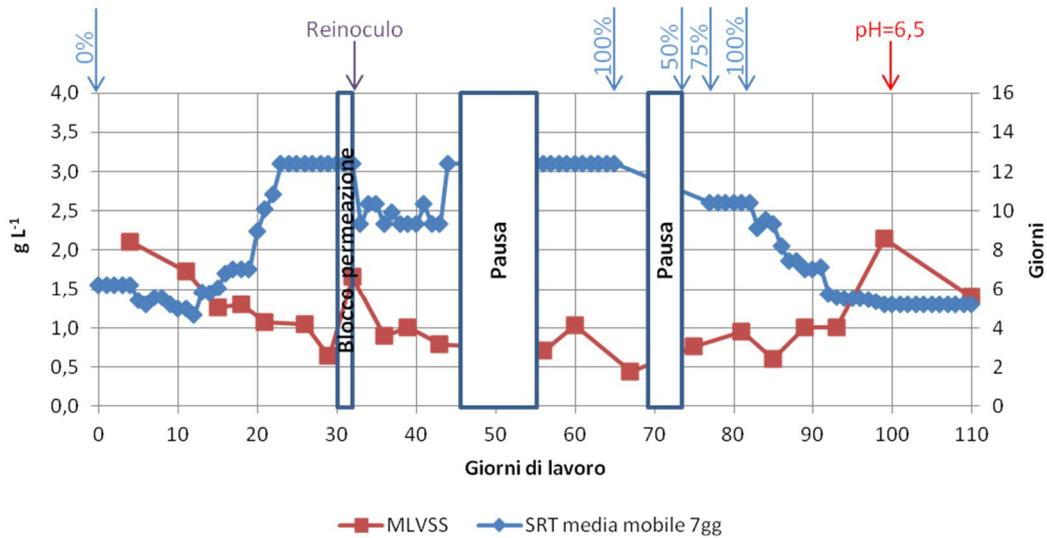


Grafico 4.5 Andamento delle concentrazioni di MLVSS e dell'SRT (media mobile settimanale) nell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

In Tabella 4.3 sono elencati media, massimo, minimo e deviazione standard dei MLVSS per i vari periodi a differenti SRT.

Come si può vedere gli effetti dell'SRT (spurgo del fango) è reversibile, ma solo dopo qualche giorno.

Tabella 4.3 Indici statistici dei MLVSS in g L<sup>-1</sup> in relazione all'SRT imposto

Giorni	SRT	Media	Massimo	Minimo	Deviazione standard
0 - 12	5	1,920	2,110	1,730	0,269
13 - 32	13	1,265	1,655	1,040	0,246
33 - 44	10	0,897	1,000	0,790	0,105
56 - 82	13	0,734	1,030	0,440	0,242
83 - 110	5	1,231	2,150	0,605	0,586

## 4.2.2 Nitrosazione parziale

Nel Grafico 4.6 e nel Grafico 4.7 vengono mostrati gli andamenti temporali delle concentrazioni di azoto ammoniacale e nitroso nell'effluente e la frazione di azoto nitroso in relazione con la portata dell'aeratore. Il controllo dell'attività di nitrosazione infatti è stato condotto dapprima considerando l'SRT e la portata dell'aeratore.

Nel Grafico 4.6 si osserva che tra il giorno 6 e il giorno 20 gran parte dell'azoto ammoniacale introdotto ha subito nitrosazione (Tabella 4.4). Il nitrito infatti si è attestato su concentrazioni dell'ordine dei 700 mg L<sup>-1</sup>. Impostando un SRT di 5 giorni, però, ha comportato, come già detto precedentemente, un crollo delle concentrazioni di MLVSS ed il dilavamento della biomassa AOB. Il reinocolo al giorno 33 e il mantenimento dell'SRT a 13 giorni ha consentito di operare, dal 35 all'80% circa, con una nitrosazione parziale - seppur variabile – tra il 40 ed il 60%.

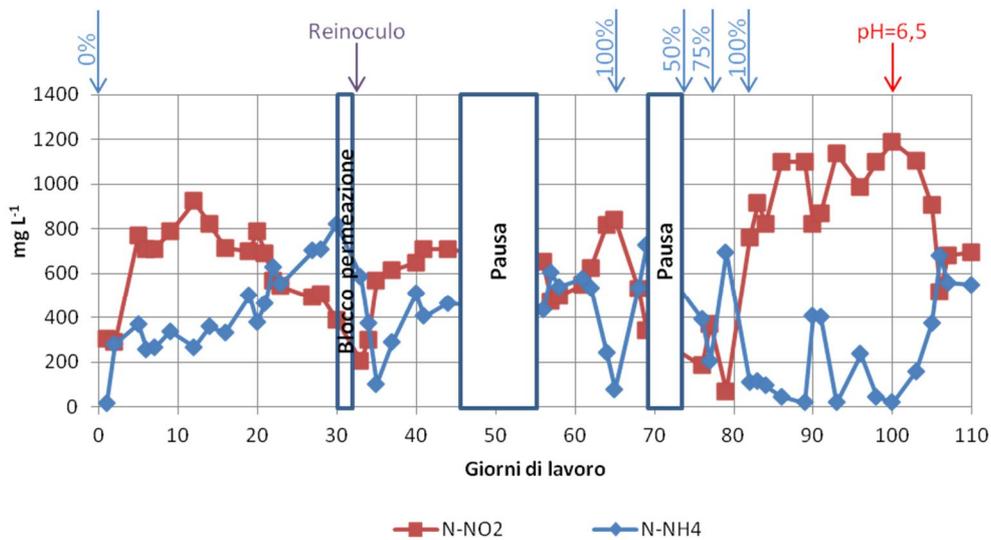


Grafico 4.6 Andamento delle concentrazioni di azoto nitroso e ammoniacale nell'effluente dell'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

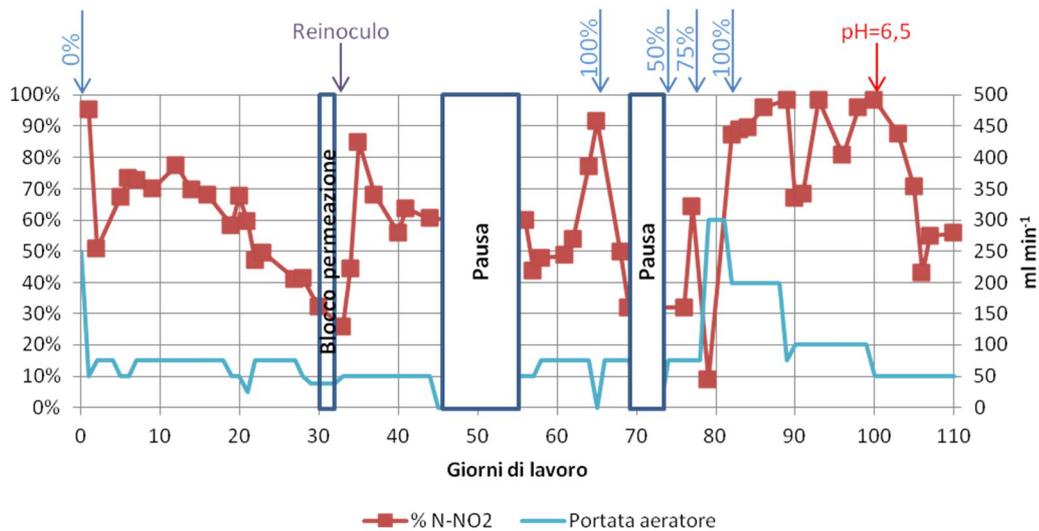


Grafico 4.7 Andamento della frazione di azoto nitroso nell'uscita dell'MBR Parnit e della portata dell'aeratore. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

Mantenendo la portata d'aria su un valore costante ( $75 \pm 15 \text{ ml min}^{-1}$ ) (vedi Grafico 4.7) e impostando il controllo automatico del DO ( $0,40 \text{ mg L}^{-1}$ ) non si sono avuti particolari problemi fino al passaggio all'alimento reale.

Questo infatti ha dato origine a schiume che hanno interferito con il controllo del volume di ML nel fermentatore (come già detto nel Paragrafo 4.1.2). L'utilizzo di antischiuma si è reso

pertanto necessario con i conseguenti effetti di errori di lettura da parte della sonda ossigeno che ha aumentato gli rpm del miscelatore fino al valore massimo impostato (300), così da favorire la diluizione dell'aria insufflata. Successivamente l'operatore – visionando valori di DO prossimi allo 0 – ha aumentato ulteriormente la portata d'aria fino a 300 mL min<sup>-1</sup>. L'aumento delle concentrazioni di nitrito ha suggerito un controllo sull'effettivo DO tramite una sonda pulita, dimostrando l'interferenza dell'antischiuma sulle letture di ossigeno disciolto.

Dopo aver reimpostato la portata d'aria a 75 mL min<sup>-1</sup> si è eliminato il controllo automatico del DO e si è impostata la velocità del miscelatore sul valore medio tenuto nelle settimane precedenti di 180 rpm (giorno 88).

La mancanza di una lettura corretta sul DO si è fatta però sentire, non riuscendo a diminuire l'eccessiva nitrosazione. Si è stabilito così di lavorare su un terzo parametro: il pH.

L'attività risulta infatti frenata per ambienti alcalini o acidi. Si è deciso di operare fissando il pH a 6,5 (giorno 100) ed in questo modo la percentuale di azoto ammoniacale ossidata a nitrito è gradualmente scesa fino al 50%. Si è riusciti così a riportare la nitrosazione intorno a valori più che buoni con rapporto azoto nitroso/azoto ammoniacale pari a 0,83. Questo numero, infatti, per quanto lontano dallo stechiometrico 1,32 si è rivelato invece piuttosto vicino a quello che ha permesso un buon funzionamento del processo Anammox (0,9), come si evidenzierà nel capitolo successivo.

Nei giorni 64 e 65 si è verificato un improvviso aumento dell'azoto nitroso. Il motivo è da imputare ad un blocco dell'alimentazione per motivazioni tecniche: i batteri hanno così rimosso tutto l'azoto ammoniacale senza che esso venisse sostituito da altro in ingresso.

Nella Tabella 4.4 si evidenzia l'insussistenza di sostanziali differenze negli effluenti risultanti da diverse frazioni volumetriche di alimento reale. Il mezzo sintetico risulta più carico di azoto nitroso a causa dell'intensa attività registrata inizialmente, fenomeno verificatosi più significativamente anche alla fine della sperimentazione, in concomitanza all'impiego dell'influente reale, per via delle problematiche sulla regolazione del DO (vedi Paragrafo 4.1.2). I valori massimi e i valori minimi rispecchiano queste peculiarità, fatta eccezione per quelli ottenuti nei periodi di impiego di alimento al 75% reale: risultano sia per l'azoto ammoniacale sia per l'azoto nitroso molto elevati i massimi e molto contenuti i minimi. Il motivo è da ricercare nel Grafico 4.7: si può notare infatti che la crescita delle concentrazioni di nitrito - per via della troppa aerazione - è avvenuta proprio in durante l'impiego dell'influente al 75% reale e a valle di un periodo con concentrazioni di ammonio piuttosto elevate.

Tabella 4.4 Frazioni di azoto ammoniacale e nitroso nell'effluente in funzione della percentuale volumetrica di influente reale utilizzata

% reale	Media		Massimo		Minimo		Deviazione standard
	N – NH <sub>4</sub>	N – NO <sub>2</sub>	N – NH <sub>4</sub>	N – NO <sub>2</sub>	N – NH <sub>4</sub>	N – NO <sub>2</sub>	
0	40%	60%	74%	95%	5%	26%	16%
50	52%	48%	68%	64%	36%	32%	23%
75	47%	53%	91%	87%	13%	9%	40%
100	26%	74%	68%	98%	2%	32%	22%

### 4.3 Andamento delle concentrazioni di COD

La rimozione del COD nelle fasi precedenti a quella Anammox è fondamentale per assicurarsene un buon funzionamento. Nel Grafico 4.8 si mostra l'andamento del COD solubile in uscita in relazione con il COD in entrata (solubile e totale): durante il periodo di utilizzo di alimento sintetico le rimozioni del COD è stata circa del 90% con concentrazioni in uscita sempre inferiori ai 200 mg L<sup>-1</sup>. Con l'impiego crescente di un influente reale il COD solubile in uscita dal reattore ha superato i 500 mg L<sup>-1</sup>, ma a fronte di un alimento con concentrazioni superiori ai 1600 mg L<sup>-1</sup>.

I rendimenti di rimozione (Tabella 4.5) risultano fortemente in funzione delle concentrazioni di COD totale in ingresso: si va da valori superiori al 90% per concentrazioni di 1000 mg L<sup>-1</sup> di COD solubile a valori intorno al 50% per concentrazioni attorno ai 1700 mg L<sup>-1</sup>.

La rimozione totale invece si mantiene su valori sempre piuttosto elevati: sempre sopra l'80% fatta eccezione per il giorno 67 dove comunque più dei due terzi del COD in ingresso è stato rimosso.

Il COD è andato crescendo con l'impiego di frazione reale impiegata in completa controtendenza rispetto ai rendimenti.

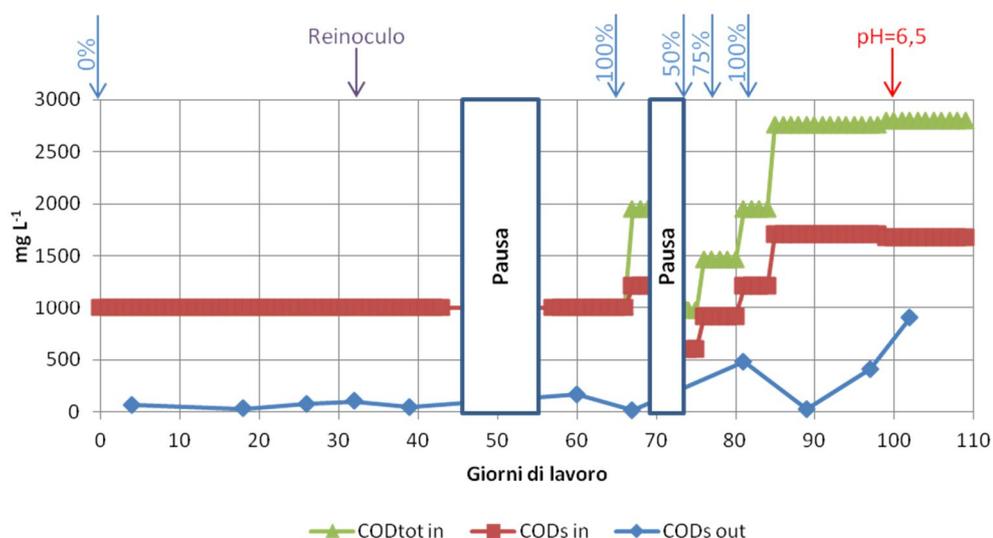


Grafico 4.8 Andamento del COD solubile in entrata e uscita e del COD totale in entrata all'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

Tabella 4.5 Rendimenti di rimozione del COD solubile e del COD totale

Giorno	$\eta_{sol}$	$\eta_{tot}$
4	93,1%	93,1%
18	96,7%	96,7%
26	92,6%	92,6%
32	89,8%	89,8%
39	95,0%	95,0%
60	83,4%	83,4%
67	98,7%	99,2%
81	60,5%	99,1%
89	98,5%	85,1%
97	76,0%	67,6%
102	46,1%	93,1%

## 4.4 Monitoraggio delle prestazioni idrauliche e fouling di membrana

### 4.4.1 Andamento della TMP

Come si evidenzia nel Grafico 4.9 per tutto il periodo di utilizzo di alimento sintetico la pressione transmembrana si è mantenuta su valori contenuti (10 ÷ 25 mbar). Con l'impiego dell'alimento reale i fenomeni di *fouling* hanno cominciato a manifestarsi con veri e propri picchi della TMP. Inizialmente (giorno 85) si è inserita una *relaxation estesa* con 1 ora di stop ogni 11 di funzionamento, ma nei giorni subito successivi (90, 95 e 106) si sono verificati dei picchi a cui è seguito un lavaggio fisico (Grafico 4.9). Nel giorno di dismissione del reattore (110) si è verificato un vero e proprio *TMP-jump* con pressioni transmembrana triplicate rispetto a quelle dei giorni precedenti (oltre 430 mbar).

I MLVSS, come si può vedere nel Grafico 4.10, non si direbbero responsabili dell'aumento della TMP: alla loro diminuzione del giorno 110 è subito seguito il *TMP-jump* più importante di tutta la sperimentazione sull'MBR Parnit.

Una verifica ulteriore sarà fatta nel Paragrafo 4.4.2 in cui verranno valutati gli EPS e gli SMP – principali responsabili del *fouling* irreversibile – nell'ML.

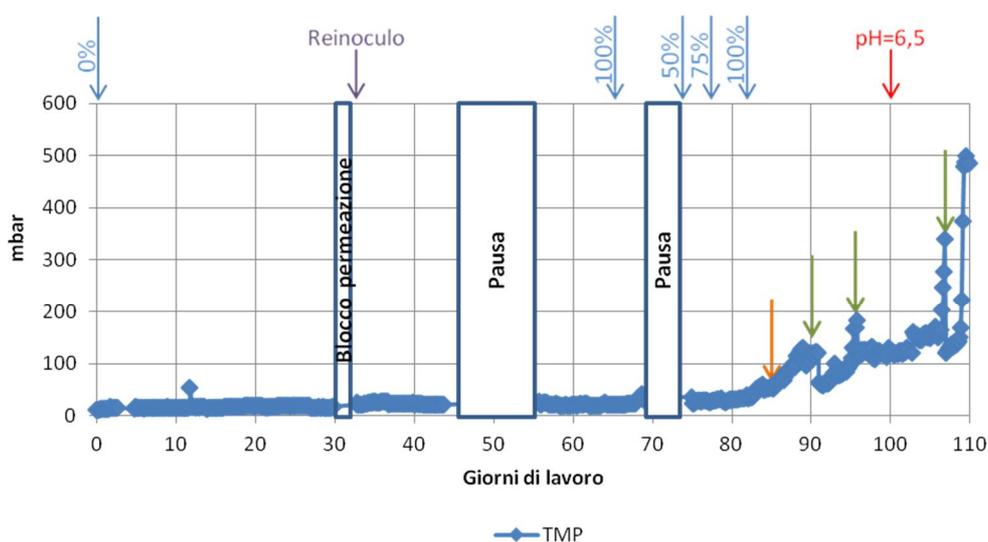


Grafico 4.9 Andamento della TMP durante la sperimentazione sull'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della *relaxation estesa* e quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante

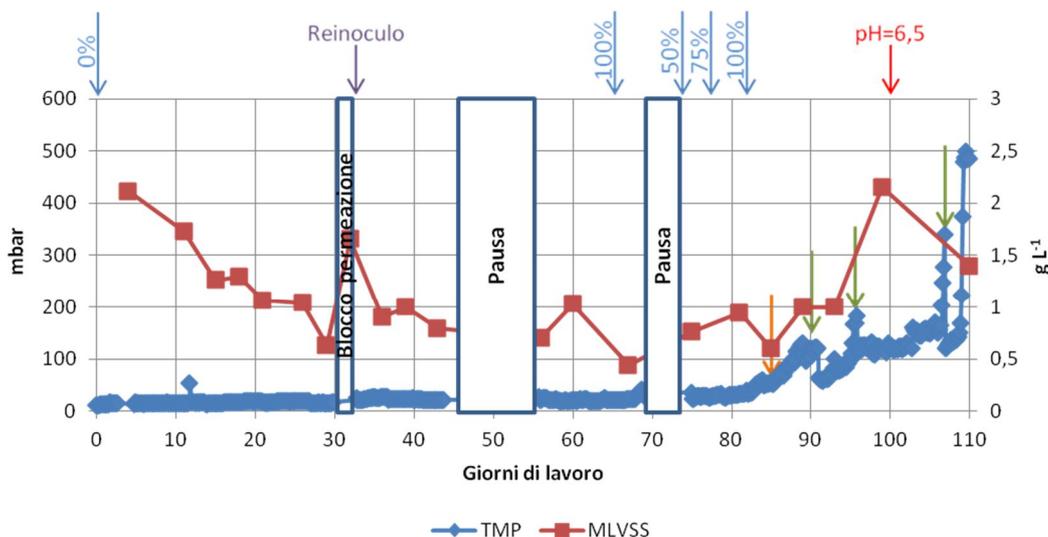


Grafico 4.10 Andamento della TMP e delle concentrazioni di MLVSS durante la sperimentazione sull'MBR Parnit. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della *relaxation estesa* e quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante

In Tabella 4.6 si può notare ancora meglio la correlazione tra la crescita della TMP e l'aumento della frazione reale impiegata. Oltre ai valori medi, anche i massimi e i minimi dimostrano che la problematica del *fouling* è divenuta sempre più problematica col crescere della percentuale di alimento reale impiegato.

Tabella 4.6 TMP in funzione della percentuale volumetrica di influente reale utilizzata

% reale	Media	Massimo	Minimo	Deviazione standard
0	19,007	53,900	11,479	3,913
50	28,004	36,013	22,947	2,858
75	30,457	38,585	26,053	2,669
100	110,267	498,449	22,603	73,921

#### 4.4.2 Monitoraggio degli SMP e degli EPS

Come si può notare dal Grafico 4.11 e dal Grafico 4.12 non vi sono particolari correlazioni tra la concentrazione degli EPS e degli SMP del ML con il *fouling* della membrana. Eppure esso non può dirsi di tipo reversibile, in quanto in seguito ai lavaggi fisici la TMP non torna sui valori iniziali, ma sempre più alti dopo ogni ciclo di *TMP-jump*/lavaggio fisico.

La responsabilità è dunque da cercare in particolari colloidali presenti nell'influento reale o nell'utilizzo dell'antischiuma. Il fenomeno infatti ha iniziato a manifestarsi nei giorni successivi all'impiego contestuale dell'alimento reale e dell'antischiuma.

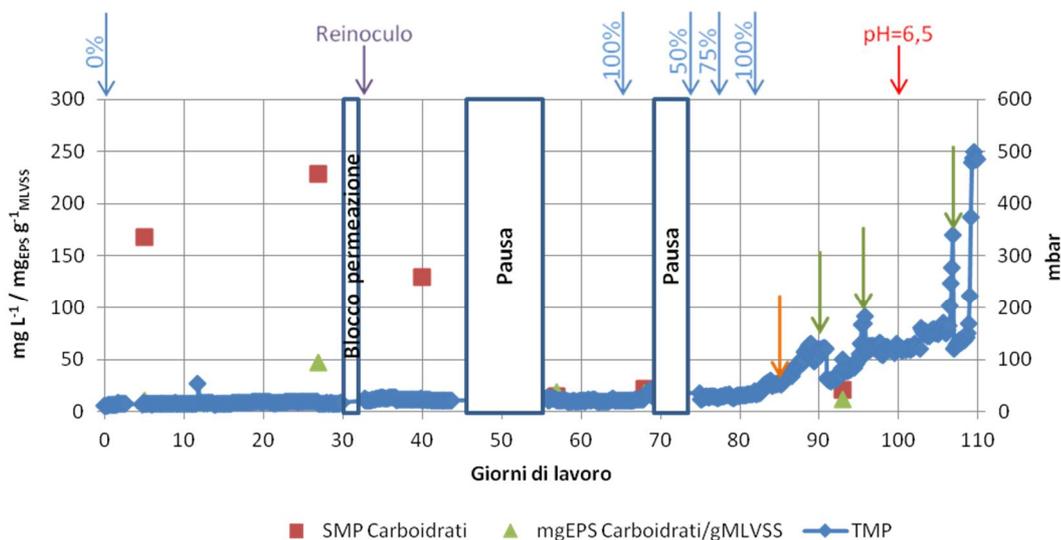


Grafico 4.11 Andamento della componente dei carboidrati degli EPS e degli SMP. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della *relaxation estesa* e quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante

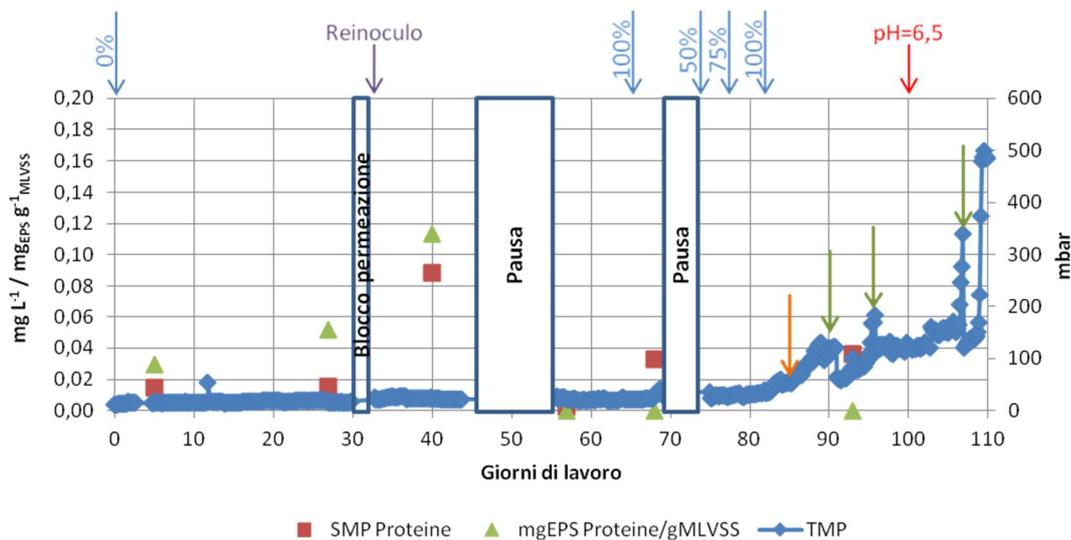


Grafico 4.12 Andamento della componente proteica degli EPS e degli SMP. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della *relaxation estesa* e quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante



# CAPITOLO 5

## FUNZIONAMENTO OPERATIVO E RISULTATI DELL'MBR ANAMMOX

Il processo Anammox ha come obiettivo l'ottimizzazione delle condizioni operative del pilota MBR per ossidare in ambiente privo di ossigeno l'azoto ammoniacale alimentato contestualmente con l'azoto nitroso - che svolge il ruolo di accettore di elettroni.

### 5.1 Condizioni operative

In Tabella 5.1 si possono osservare i parametri operativi dell'MBR Anammox. Il flusso transmembrana  $J$  è stato mantenuto costante per tutta la durata della sperimentazione Parnit e così la temperatura  $T$  (Grafico 5.1), il pH (Grafico 5.1), la sovrappressione del fermentatore  $P_{\text{fermentatore}}$ , la portata in ingresso  $Q_{\text{in}}$  e la portata d'aria di ricircolo  $Q_{r\_aria}$ .

La *relaxation*  $RX$  è stata più volte modificata per far fronte alle problematiche del fouling, presenti in particolare nei primi 40 giorni e verso la fine della sperimentazione (> 70% alimento reale).

La *relaxation estesa*  $RX_{\text{ext}}$  è stata inserita al giorno 168 per via dell'intensificarsi del fenomeno del *fouling* (vedi Tabella 5.2).

L'HRT è funzione del volume  $V$  dell'ML nel fermentatore e della portata in ingresso  $Q_{\text{in}}$  (3 L d<sup>-1</sup>) secondo la seguente formula:

$$HRT = \frac{V}{Q_{in}} \quad (5.1)$$

Essendosi mantenuti costanti entrambi i parametri anche l'HRT non ha subito modificazioni.

L'SRT non è stato controllato e infatti non si sono effettuati spurghi. Ricordando che la formula per il calcolo dell'SRT istantaneo è:

$$SRT = \frac{V}{Q_s} \quad (5.2)$$

Si nota che a fronte di un volume costante di ML nel fermentatore V (6,2 L) si sono avute  $Q_s$  pari a 0 con conseguenti SRT superiori alla durata della sperimentazione (180 giorni).

Tabella 5.1 Parametri operativi dell'MBR Anammox

Giorni	-	0 ÷ 23	24 ÷ 55	76 ÷ 132	133 ÷ 143	148 ÷ 154	155 ÷ 167	168 ÷ 180
<b>J</b>	LMH	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<b>RX</b>	min <sub>off</sub> : min <sub>on</sub>	0,5 : 4	1 : 2	0,5 : 4	0,5 : 3	0,5 : 4	1 : 2	1 : 1,5
<b>RX<sub>ext</sub></b>	h <sub>off</sub> : h <sub>on</sub>	-	-	-	-	-		Tabella 5.2
<b>pH</b>	-	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
<b>T</b>	°C	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0
<b>P<sub>fermentatore</sub></b>	mbar	8 ÷ 10	8 ÷ 10	8 ÷ 10	8 ÷ 10	8 ÷ 10	8 ÷ 10	8 ÷ 10
<b>Q<sub>in</sub></b>	L d <sup>-1</sup>	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
<b>Q<sub>r_aria</sub></b>	L min <sup>-1</sup>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<b>HRT</b>	d	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
<b>SRT</b>	d	> 180	> 180	> 180	> 180	> 180	> 180	> 180

Tabella 5.2 Pianificazione della *relaxation estesa* sull'MBR Anammox

Giorni	ON	OFF
168	11 ore	1 ora
169 - 170	5 ore	1 ora
171 - 174	2,5 ore	0,5 ore
175 - 181	116 min	50 min

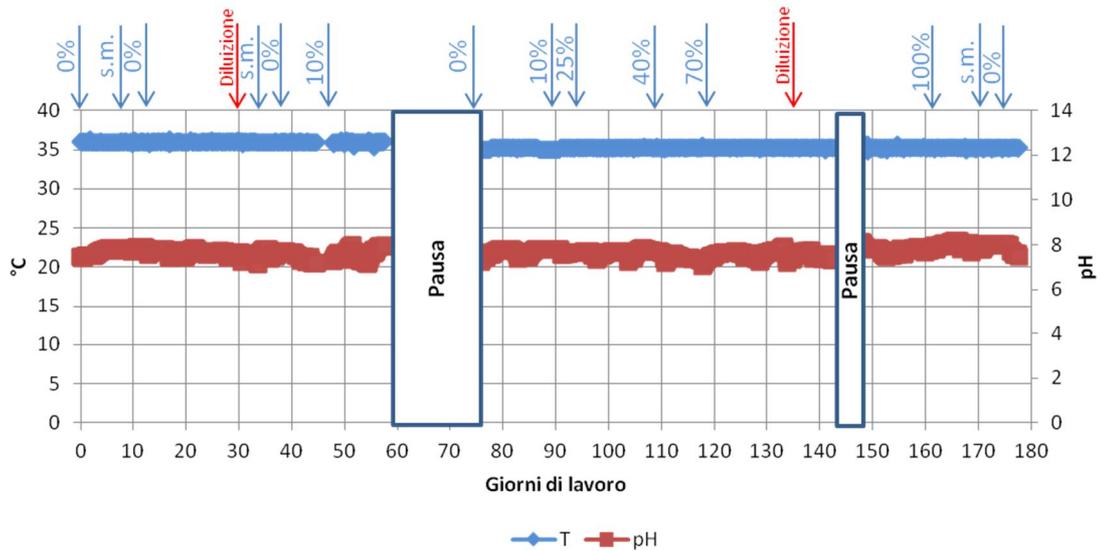


Grafico 5.1 Andamento del pH e della temperatura nell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

Nei giorni 56 ÷ 75 e 143 ÷ 147 la sperimentazione è stata interrotta a causa della chiusura del laboratorio. Nei giorni 128 e 153 si è reso necessario fermare il reattore a causa di *TMP-jump*. Nei giorni 31 e 141 sono stati sostituiti 2 L di surnatante nel fermentatore con 2 L di *soluzione madre* a causa di un accumulo di nitriti (inibenti della biomassa Anammox) e ammonio.

## 5.2 Prestazioni del processo biologico

### 5.2.1 Andamento della concentrazione di biomassa

Nel Grafico 5.2 si mostrano gli andamenti delle concentrazioni di MLTSS e MLVSS. Nel primo periodo è evidente il calo di MLVSS, imputabile alla lenta e graduale acclimatazione della biomassa Anammox di cui si è già parlato nel Paragrafo 2.1.2.

E' visibile inoltre come questa sia aumentata costantemente nel tempo, dopo la pausa estiva (giorno 78), dal valore di 1,18  $g_{vss} L^{-1}$  al valore di 4,10  $g_{vss} L^{-1}$  del giorno 174. La causa è da ricercare nella maggiore disponibilità di nutrienti nell'alimento reale e ad una tendenza, dunque, della biomassa a crescere di più e più rapidamente dopo la prima fase di acclimazione.

Si nota inoltre che i MLTSS sono cresciuti molto di più rispetto ai MLVSS, segnale della graduale crescita di frazione reale impiegata. Nell'influenza reale infatti la quota di solidi

inorganici è considerevole e conseguentemente il rapporto VSS/TSS tende a calare mano a mano che la percentuale di reale cresce.

Questa tesi trova anche supporto nell'ultimo dato registrato che mette in evidenza un calo della biomassa a fronte dell'impiego di un alimento sintetico, a seguito di problematiche con la TMP.

Il calo registrato al giorno 140 è da imputare alla diluizione effettuata il giorno 132 a causa del blocco della pompa di permeazione (diverse ore) con il conseguente innalzamento del volume di ML a più di 8 L.

La prima diluizione (giorno 30) invece non sembra aver influenzato particolarmente un calo già in atto. Questa operazione fu effettuata dall'operatore per via dell'accumularsi di nitriti dell'effluente: 2 L di ML furono sostituiti con 2 litri di *soluzione madre*.

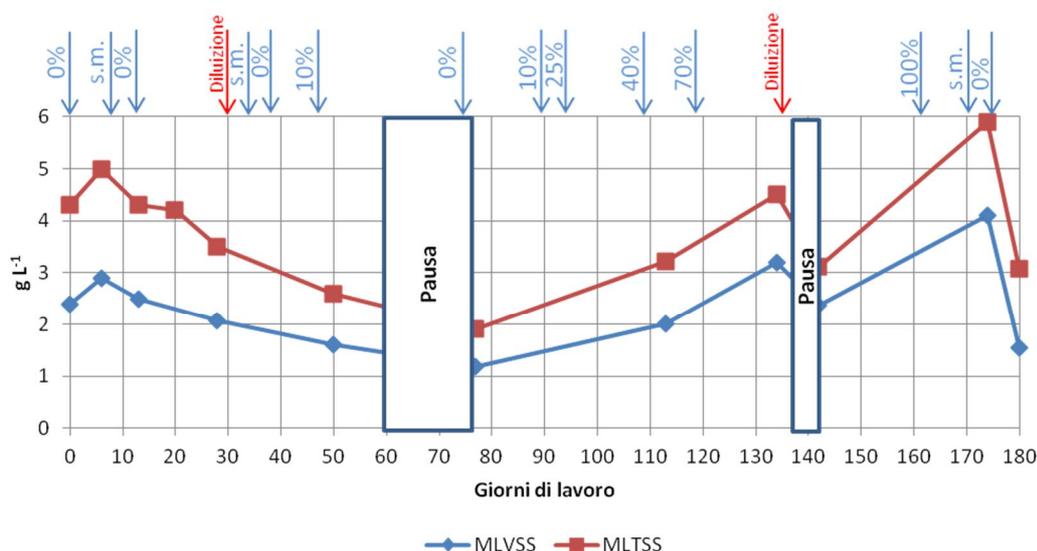


Grafico 5.2 Andamento delle concentrazioni di MLSS dell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

## 5.2.2 Processo Anammox

### ***Concentrazioni in uscita e ratei di rimozione***

Nel Grafico 5.3 sono mostrati gli andamenti delle concentrazioni di azoto ammoniacale, nitrico e nitroso in uscita dall'MBR Anammox.

Si può notare un primo periodo di stabilizzazione, coincidente circa coi primi 40 giorni di questa fase della sperimentazione in cui le concentrazioni oscillano sensibilmente. Si

evidenzia qui l'accumulo di nitrito del giorno 30 a cui si è fatto accenno nel paragrafo precedente e a cui è seguita una diluizione nelle modalità spiegate sopra.

Dopo il 40° giorno gli andamenti sono divenuti più omogenei con concentrazioni di nitrito prossime allo zero, quelle di ammonio quasi sempre inferiori ai 50 mg L<sup>-1</sup> e quelle di nitrato oscillanti tra i 100 e i 150 mg L<sup>-1</sup>.

Definiti:

$$NRR_{par} = \frac{(N-NO_2^-_{in} + N-NH_4^+_{in}) - (N-NO_2^-_{out} + N-NH_4^+_{out})}{\Delta t \times V} \quad (5.3)$$

$$NRR_{tot} = \frac{(N-NO_2^-_{in} + N-NO_3^-_{in} + N-NH_4^+_{in}) - (N-NO_2^-_{out} + N-NO_3^-_{out} + N-NH_4^+_{out})}{\Delta t \times V} \quad (5.4)$$

$$NLR_{par} = \frac{(N-NO_2^-_{in} + N-NH_4^+_{in})}{\Delta t \times V} \quad (5.5)$$

$$NLR_{tot} = \frac{(N-NO_2^-_{in} + N-NO_3^-_{in} + N-NH_4^+_{in})}{\Delta t \times V} \quad (5.6)$$

dove  $N - NO_2^-_{in}$ ,  $N - NO_3^-_{in}$  e  $N - NH_4^+_{in}$  sono i carichi in entrata di azoto nitroso, nitrico e ammoniacale rispettivamente, mentre  $N - NO_2^-_{out}$ ,  $N - NO_3^-_{out}$  e  $N - NH_4^+_{out}$  quelli in uscita,  $V$  è il volume nel fermentatore e  $\Delta t$  il tempo di rimozione per  $NRR_{par}$  e  $NRR_{tot}$  e di alimentazione per  $NLR_{par}$  e  $NLR_{tot}$ .

L'andamento dei ratei di rimozione parziale  $NRR_{par}/NLR_{par}$  (non considerano la componente nitrica) (Grafico 5.4), è più che buona a partire dal giorno 40 e suggerisce di poter aumentare ulteriormente i carichi di azoto (ammoniacale e nitroso) in ingresso, in quanto i valori si assestano vicino all'unità suggerendo una rimozione quasi completa dei carichi di azoto alimentati. Il rateo di rimozione complessivo  $NRR_{tot}/NLR_{tot}$ , invece, oscilla su valori compresi tra il 70 e l'80%. Il confronto tra i ratei di rimozione e la concentrazioni in uscita suggerisce di valutare la possibilità di una denitrificazione eterotrofa in atto dal giorno 170 in poi. Vi è infatti un calo dei tassi di rimozione a fronte di un aumento delle concentrazioni azoto ammoniacale e nitroso e un calo dell'azoto nitrico.

Sempre nel Grafico 5.3 si può notare che i nitrati crescono in una fase subito successiva all'aumento della frazione reale per poi diminuire col passare dei giorni. Tendenzialmente si nota un calo delle concentrazioni di azoto nitrico nell'effluente al crescere della percentuale di alimento reale utilizzato.

Questa caratteristica si rivela anche nel Grafico 5.4 dove la differenza tra i ratei complessivi e parziali va a ridursi mano a mano che la frazione reale all'ingresso aumenta. Ciò sembra dunque suggerire un'attività denitrificante eterotrofa in atto.

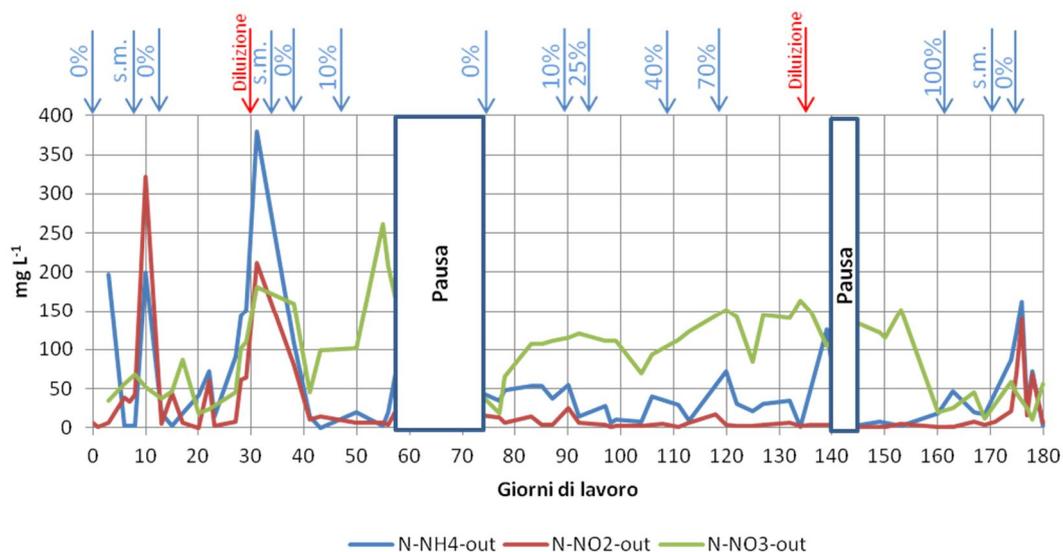


Grafico 5.3 Andamento delle concentrazioni di azoto ammoniacale, nitrico e nitroso in uscita dall'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

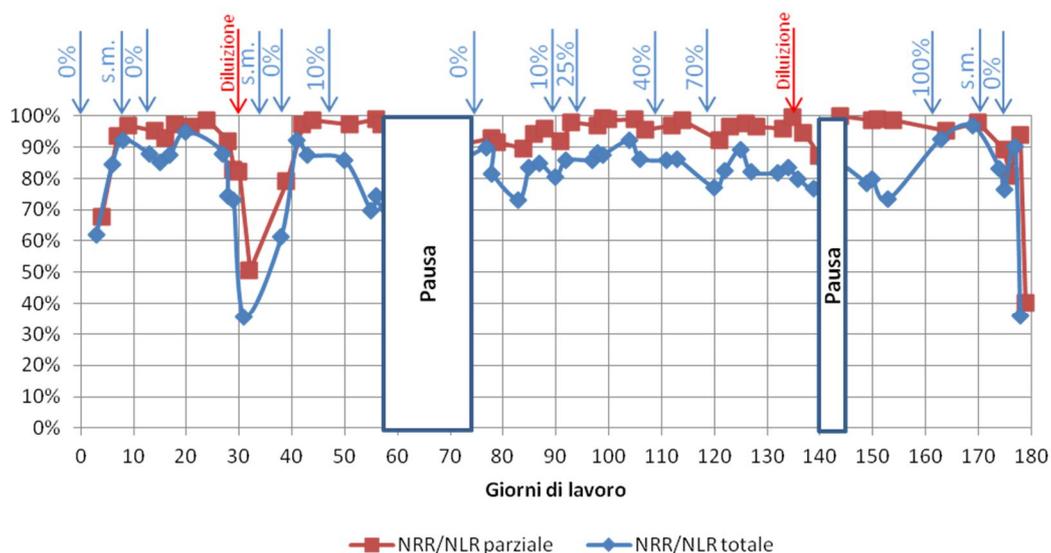


Grafico 5.4 Andamento dei ratei di rimozione NRR/NLR totali e parziali per l'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

Nella Tabella 5.3 sono riassunte le caratteristiche medie dell'effluente a seconda della miscela sintetico/reale utilizzata. Vengono così messe in luce le peculiarità già espresse riguardo la rimozione dell'azoto ammoniacale e nitroso che non variano significativamente al crescere della percentuale di influente reale e la riduzione delle concentrazioni di azoto nitrico nell'effluente a seguito di una maggiore frazione volumetrica di ingresso reale. Queste caratteristiche riflettono poi nei ratei medi di rimozione: a  $\text{NRR}_{\text{par}}/\text{NLR}_{\text{par}}$  pressoché costante corrisponde un  $\text{NRR}_{\text{tot}}/\text{NLR}_{\text{tot}}$  in crescita. Questa pare un'ulteriore conferma all'attività eterotrofa denitrificante ipotizzata sopra.

Tabella 5.3 Caratteristiche medie dell'effluente al variare della frazione reale in ingresso

% reale	$\text{N} - \text{NH}_4^+_{\text{out}}$	$\text{N} - \text{NO}_2^-_{\text{out}}$	$\text{N} - \text{NO}_3^-_{\text{out}}$	$\frac{\text{NRR}_{\text{tot}}}{\text{NLR}_{\text{tot}}}$	$\frac{\text{NRR}_{\text{par}}}{\text{NLR}_{\text{par}}}$
	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	32 ± 27	17 ± 17	104 ± 41	92 ± 2	83 ± 5
10	29 ± 34	10 ± 10	159 ± 63	94 ± 5	79 ± 7
25	20 ± 14	2 ± 1	99 ± 18	97 ± 1	87 ± 2
40	40 ± 44	5 ± 1	129 ± 20	95 ± 4	81 ± 6
70	30 ± 33	2 ± 1	131 ± 26	96 ± 3	82 ± 4
100	75 ± 53	31 ± 33	38 ± 25	88 ± 9	85 ± 10

### ***Rapporti molari***

Nel Grafico 5.5 e nel Grafico 5.6 sono mostrati i valori dei rapporti molari di rimozione  $\text{N} - \text{NO}_2^- / \text{N} - \text{NH}_4^+$  e  $\text{N} - \text{NO}_3^- / \text{N} - \text{NH}_4^+$ , così da confrontarli poi con quelli stechiometrici introdotti da Strous et al. (1998) che sono rispettivamente pari a 1,32 e 0,26.

Si nota che il rapporto  $\text{N} - \text{NO}_2^- / \text{N} - \text{NH}_4^+$  tende ad essere inferiore a quello stechiometrico per tutta la durata della sperimentazione. In particolare si nota che tali valori sono del tutto simili a quelli in ingresso, evento particolarmente curioso e a cui non si è trovata una vera e propria spiegazione se non nella possibilità di reazioni particolari e non previste operate dagli Anammox. L'unico superamento del rapporto stechiometrico si ha in corrispondenza del già noto accumulo di nitrito al giorno 30.

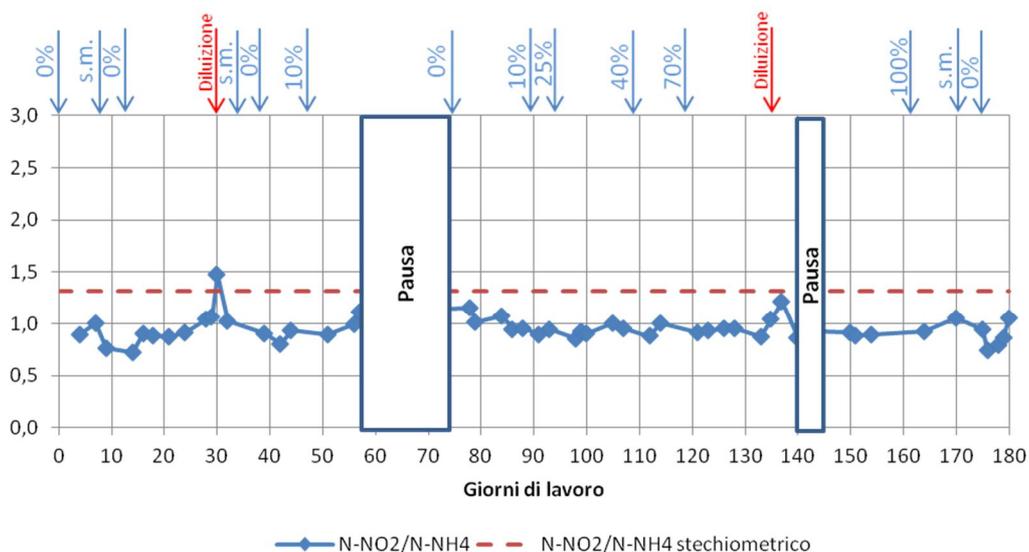


Grafico 5.5 Andamento dei rapporti molar di rimozione  $N-NO_2^- / N-NH_4^+$  stechiometrici e dell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

Anche per ciò che riguarda  $N-NO_3^- / N-NH_4^+$  si riscontra una tendenza a mantenere rapporti sottostechiometrici che calano ulteriormente con l'aumento della frazione reale nell'influente. Questa peculiarità è attribuibile all'aumento dell'attività denitrificante che si ottiene con l'incremento della quantità di carbonio organico presente nell'alimento reale.

I rapporti sovrastechiometrici registrati prima della pausa estiva e nei giorni subito successivi sono da imputare ad infiltrazioni di ossigeno – causate da manovre tecniche sul reattore - che hanno favorito la crescita di biomassa nitratante (NOB).

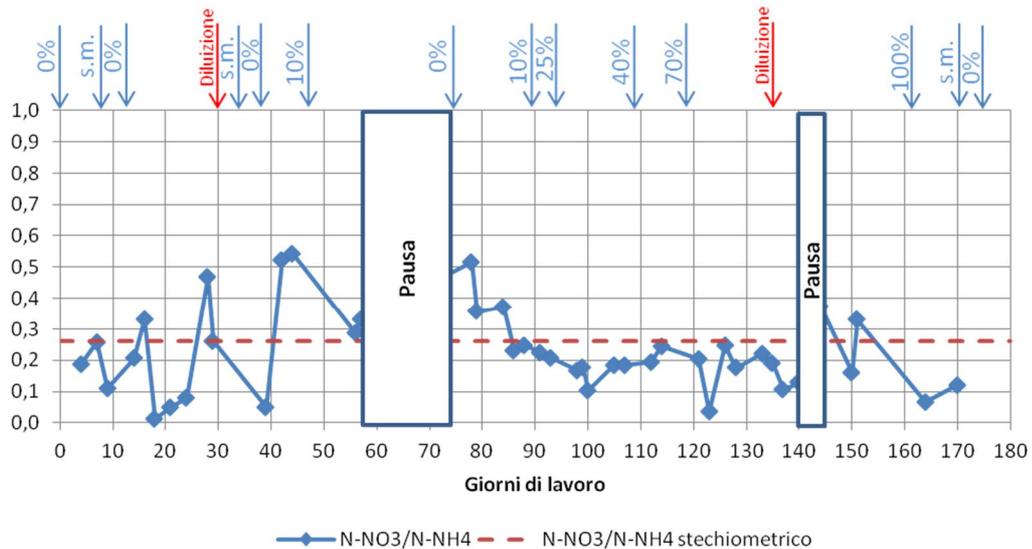


Grafico 5.6 Andamento dei rapporti molari di rimozione N – NO<sub>3</sub><sup>-</sup> / N – NH<sub>4</sub><sup>+</sup> stechiometrici e dell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato

### **Massimo rateo di rimozione dell'azoto**

La conduzione delle periodiche prove di attività (vedi Paragrafo 3.3) ha permesso di calcolare il massimo rateo di rimozione dell'azoto  $NRR_{max}$  da parte della biomassa Anammox. In Tabella 5.4 insieme ai  $NRR_{max}$  sono riportati i valori dei coefficienti  $R^2$ , l'errore standard SE e i valori dei rapporti azoto nitroso/azoto ammoniacale.

Tutti i risultati delle prove condotte sono più che affidabili in quanto mostrano valori del coefficiente  $R^2$  vicini all'unità.

L'attività è stata in continua crescita – salvo qualche oscillazione - fino al dato del giorno 141. Da qui in poi è andata calando fino a al valore di 0,10 g<sub>N</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> del giorno 180. La responsabilità è da ricercarsi nelle infiltrazioni di ossigeno causate dai continui lavaggi fisici mediante rimozione del modulo filtrante (vedi Paragrafo 5.3). Si ricorda infatti l'effetto inibente dell'O<sub>2</sub> sulla biomassa Anammox.

Nei giorni 141 e 149, durante la conduzione della prova di attività, sono stati effettuati solo due campionamenti successivi all'aggiunta impulsiva dei sali di ammonio e nitrito.

Come già detto nel Paragrafo 3.3, il calcolo dell' $NRR_{max}$  è stato effettuato diversamente per i casi in cui i rapporti dei ratei di rimozione dell'azoto nitroso e dell'azoto ammoniacale fossero superiori ad 1,32 a causa dell'implicita attività denitrificante in atto: in tali casi l' $NRR_{max}$  è stato calcolato utilizzando il rateo di rimozione dell'ammonio (vedi Eq. (3.4)). In realtà si è accettato un *range* di circa il 10% sopra il rapporto stechiometrico (1,45).

Questo fenomeno si è verificato nei giorni 13, 20, 83, 97, 141 e 177. Si noti come il fenomeno si verifichi meno spesso dopo l'aumento della frequenza dei lavaggi fisici effettuati nell'ultimo periodo (vedi Paragrafo 5.3).

Al giorno 175 vi è un altro fenomeno interessante: il rateo di rimozione dell'azoto nitroso vale 0. Tale fenomeno si spiega con la totale inibizione (reversibile visto il risultato di due giorni dopo) della biomassa Anammox.

Tabella 5.4 Parametri ricavati dalle prove di attività sull'MBR Anammox

<b>Giorno</b>	<b>NRR<sub>max</sub></b>	<b>NRR<sub>max</sub></b>	<b>SAA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>SE</b>	<b>mg<sub>N</sub>-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /mg<sub>N</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>
-	g <sub>N</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	g <sub>N</sub> d <sup>-1</sup>	g <sub>N</sub> g <sup>-1</sup> MLVSS d <sup>-1</sup>	-	-	-
13	0,41	2,57	0,17	0,96	0,06	1,45
20	0,73	4,51	0,29	1,00	0,03	1,86
28	0,64	4,20	0,34	0,99	0,04	1,18
35	0,79	5,36	0,48	1,00	0,02	1,13
41	0,83	7,15	0,66	0,93	0,22	0,68
56	0,50	3,05	0,31	0,97	0,05	1,33
77	0,40	2,64	0,36	1,00	0,02	1,17
83	0,32	2,00	0,27	0,99	0,02	1,87
85	0,67	4,12	0,47	1,00	0,01	1,33
92	0,85	5,50	0,49	1,00	0,04	1,23
97	1,06	6,56	0,56	1,00	0,07	1,51
112	1,46	10,25	0,83	0,99	0,13	1,05
126	2,00	13,19	0,89	0,98	0,27	1,18
141	1,44	8,96	0,61	1,00	-	1,80
149	0,46	5,90	0,32	1,00	-	0,13
167	0,84	5,89	0,32	0,87	0,33	1,05
175	0,46	3,33	0,13	0,93	0,13	0,00
177	0,47	2,90	0,16	0,75	0,30	1,61
180	0,10	0,59	0,06	0,97	0,04	3

In Tabella 5.5 si possono osservare i rapporti NLR / NRR<sub>max</sub>. I valori sono piuttosto bassi (generalmente intorno al 15 ÷ 20%), confermando il fatto che il carico di azoto fornito alla biomassa è stato di molto inferiore alle sue potenzialità.

I valori sono tendenzialmente risaliti verso la fine della sperimentazione confermando un certo grado di inibizione della biomassa operata.

Tabella 5.5 NLR /  $NRR_{max}$  ottenuti dalle prove di attività sull'MBR Anammox

<b>Giorno</b>	<b><math>\frac{NLR}{NRR_{max}}</math></b>
13	17%
20	25%
28	21%
35	10%
41	12%
56	22%
77	22%
83	24%
85	20%
92	16%
97	13%
112	8%
126	7%
141	9%
149	8%
167	16%
175	23%
177	22%
180	28%

## 5.3 Monitoraggio delle prestazioni idrauliche e fouling di membrana

### 5.3.1 Andamento della TMP

Prima della pausa estiva è stato utilizzato un modulo filtrante che ha dato numerosi problemi (Grafico 5.7) e che ha richiesto una continua manutenzione attraverso l'impiego di lavaggi fisici (giorni 22 e 42) e chimici (giorno 33). Dopo la pausa estiva è stata sostituita con una nuova che ha mantenuto la TMP su valori piuttosto bassi (<40 mbar) fino a quando è stata alimentata una miscela al 40% reale. Un primo *TMP-jump* vi è stato al giorno 128, una settimana dopo del passaggio ad un influente al 30% sintetico. La pressione transmembrana

ha quasi raggiunto 700 mbar ed è stato necessario un lavaggio fisico per riportarla a valori più compatibili al processo.

Nei giorni 151, 155 e 159 altri *TMP-jump* han fatto la loro comparsa rendendo così il problema più frequente. I lavaggi fisici effettuati non hanno la peculiarità di risolvere il problema per lunghi periodi anche se riportavano sempre la TMP su valori ridotti nelle ore subito successive alla pulizia. La problematica principale sta nell'esposizione dell'ML a all'atmosfera con rischi di inibizione causati dall'ossigeno.

Col il passaggio ad un alimento al 100% reale alla problematica del *fouling* è stata opposta una *relaxation estesa* di un'ora ogni undici di funzionamento (giorno 165) (poi ulteriormente aumentata fino a 50 minuti di rilassamento ogni 116 di funzionamento), ma il picco di TMP al giorno 170 è stato il segnale che l'accorgimento preso non era sufficiente a far fronte allo sporco della membrana.

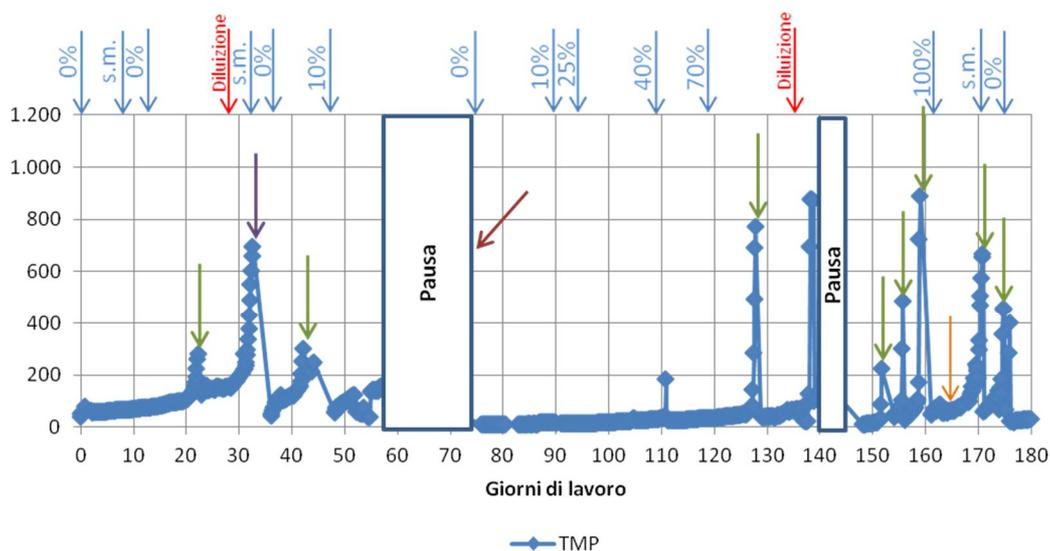


Grafico 5.7 Andamento della TMP durante la sperimentazione sull'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della *relaxation estesa*, quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante quella viola il lavaggio chimico con HCl e quella bordeaux l'installazione di un nuovo modulo filtrante

Nella Tabella 5.6 risulta evidente che la TMP relativa alla seconda membrana impiegata va a crescere con la frazione di alimento reale impiegata. La prima membrana risulta avere un *fouling* irre recuperabile talmente elevato da averne ormai compromesso l'utilizzo.

Si nota che, quando si è tornati ad alimentare solo sintetico, la TMP non è tornata sui valori iniziali, questo si spiega con il *fouling* irreversibile depositatosi sulla membrana, rimovibile solo per via chimica (Tabella 5.6).

Tabella 5.6 TMP in funzione della percentuale volumetrica di influente reale utilizzata

	% reale	Media	Massimo	Minimo	Deviazione standard
<b>Prima membrana</b>	0	101,176	697,089	9,323	98,778
	10	107,983	158,300	39,259	40,009
<b>Seconda membrana</b>	0	13,383	18,800	9,323	2,943
	10	14,948	16,634	13,823	0,752
	25	26,682	185,275	14,778	15,675
	40	32,662	40,797	26,528	4,190
	70	93,958	889,133	11,253	157,680
	100	126,172	668,000	21,045	144,171
<b>Seconda membrana fase finale</b>	0	37,496	401,809	21,045	61,621

### 5.3.2 Monitoraggio degli SMP e degli EPS

Come si può notare dal Grafico 5.8 e dal Grafico 5.9 che mostrano gli andamenti delle concentrazioni degli SMP e degli EPS (componente proteica e dei carboidrati) sembra esserci una correlazione tra questi ultimi e pressione transmembrana. Come detto precedentemente, infatti, queste componenti cellulari sono le principali responsabili del *fouling* irreversibile e dell'aumento quindi della TMP.

L'osservazione fatta precedentemente, però, riguardo i valori di TMP successivi ai lavaggi fisici fanno scartare quest'ipotesi: se la responsabilità fosse delle componenti polimeriche extracellulari sarebbe necessario un lavaggio chimico per ripristinare le condizioni iniziali (*fouling* irrecuperabile a parte). Dunque lo sporco della membrana è da imputarsi interamente all'effetto torta della biomassa Anammox che tende ad impaccarsi tra le fibre e far aumentare così la TMP.

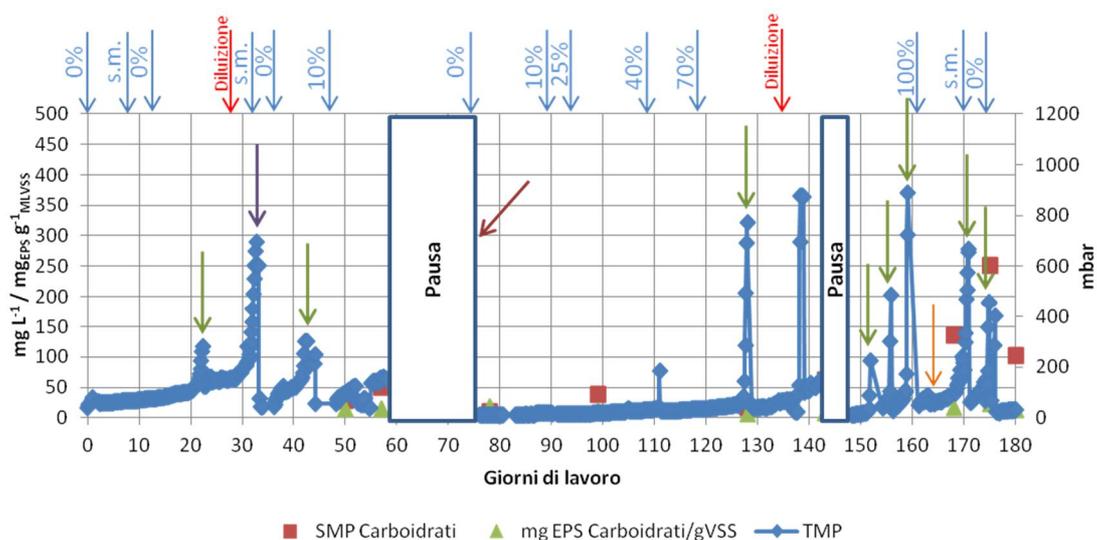


Grafico 5.8 Andamento della componente dei carboidrati degli EPS e degli SMP dell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della *relaxation estesa*, quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante quella viola il lavaggio chimico con HCl e quella bordeaux l'installazione di un nuovo modulo filtrante

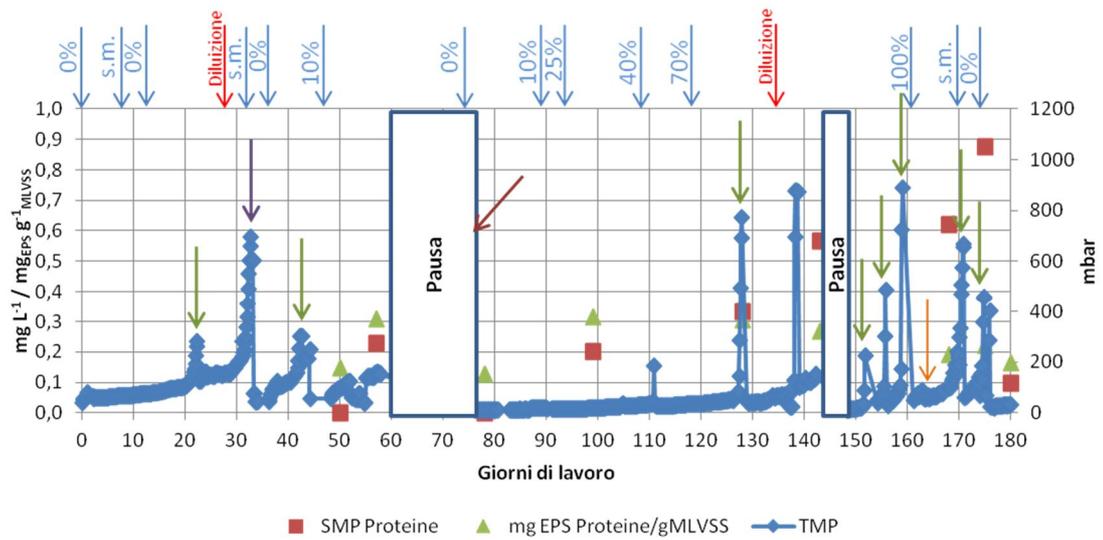


Grafico 5.9 Andamento della componente proteica degli EPS e degli SMP dell'MBR Anammox. Le frecce blu indicano la percentuale di alimento reale utilizzato, quella arancione l'inserimento della *relaxation estesa*, quelle verdi i lavaggi fisici della membrana con estrazione del modulo filtrante quella viola il lavaggio chimico con HCl e quella bordeaux l'installazione di un nuovo modulo filtrante



# CAPITOLO 6

## CONCLUSIONI

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare l'applicabilità dei processi biologici Parnit e Anammox per la rimozione dell'azoto da chiariti di natura agrozootecnica a MBR. Avendo a disposizione un solo MBR a scala di laboratorio, la sperimentazione si è divisa in due fasi: la prima, di 180 giorni, in cui si è sperimentata la biomassa Anammox e la seconda, di 110 giorni, in cui si è valutata l'applicabilità del processo Parnit.

### 6.1 MBR Parnit

Il processo Parnit ha dato dei buoni risultati per quanto riguarda la nitrosazione dell'azoto ammoniacale. Le difficoltà riscontrate con l'utilizzo dell'influento sintetico sono state relegate per lo più alla regolazione dell'attività che si è rivelata a volte o troppo intensa (totale nitrosazione dell'ammonio in ingresso) o troppo scarsa (scarsa ossidazione dell'ammonio).

Importanti parametri per impedire una totale nitrosazione sono stati il DO e l'SRT. Inizialmente età del fango troppo basse hanno ridotto notevolmente le concentrazioni di biomassa nel reattore (in termini di MLVSS) con un crollo delle concentrazioni di nitrito nell'effluente. Un dimezzamento della porta di spurgo (da 1 a 0,5 L d<sup>-1</sup>) e un controllo automatico sul DO (0,40 mg L<sup>-1</sup>) hanno permesso il raggiungimento di rapporti tra azoto ammoniacale e azoto nitroso vicini a 1.

Col passaggio all'alimento reale si sono ripresentate problematiche di regolazione a causa dell'utilizzo dell'antischiama e delle sue interferenze con la sonda ossigeno. Si è pertanto deciso di non intervenire più tanto sul DO e di lavorare sul pH che è stato portato da 7 a 6,5, diminuendo così l'attività della biomassa.

Il COD solubile a valle del trattamento è risultato decisamente ridotto, anche se si sono ottenuti risultati migliori su concentrazioni in ingresso più modeste (oltre il 90% per 1000 mg L<sup>-1</sup> nell'influente) e meno significative su quelle più elevate (poco meno del 50% per più di 1500 mg L<sup>-1</sup> nell'influente).

Questo parametro è di importante valutazione visto che risulta inibente per l'attività Anammox successiva.

Sull'andamento delle forme azotate dunque le uniche problematiche significative sono da addurre alle difficoltà operative per la regolazione dell'attività batterica in modo preciso. Strumenti più sofisticati possono garantire risultati più precisi.

Il vero problema riscontrato sul processo MBR Parnit riguarda il *fouling*: se durante l'utilizzo dell'alimento sintetico non vi sono stati *TMP-jump*, con l'impiego dell'influente reale la problematica si è fatta invece sentire: nonostante l'inserimento di una *relaxation estesa* e di ripetuti lavaggi fisici il fenomeno non ha smesso di crescere in frequenza.

La membrana estratta successivamente ad episodi di *TMP-jump* non ha presentato impaccamenti superficiali, quanto un vero e proprio sporco difficilmente rimovibile per via fisica (*fouling* irreversibile).

Si è inoltre dedotto dal confronto con le concentrazioni di EPS e SMP che il *fouling* non sia determinato dalla biomassa, non essendoci alcuna correlazione tra crescita della TMP e quantità di EPS e SMP presenti nel *liquor*. La causa dello sporco, dunque, potrebbe essere legata a colloidali del chiarito alimentato.

## 6.2 MBR Anammox

L'attività Anammox, escludendo i primi 40 giorni di acclimatazione, ha mantenuto un andamento pressoché stabile nel tempo con valori compresi tra 0,29 e 0,36 g<sub>N</sub> g<sup>-1</sup><sub>MLVSS</sub> d<sup>-1</sup>. Anche gli ultimi giorni presentano dati di attività piuttosto bassi (misura del giorno 177) a causa di un'inibizione data probabilmente dall'infiltrazione indesiderata di ossigeno.

Oltre quindi ai tempi di avvio piuttosto lunghi si sono riscontrati problematiche riguardo l'infiltrazione di ossigeno nel fermentatore. Gli accorgimenti messi in atto e la conformazione stessa del reattore riducevano questa possibilità, ma i ripetuti lavaggi fisici hanno più volte portato all'apertura del fermentatore mettendo così in contatto il ML con l'aria.

L'attività non ha mostrato particolari differenze a seconda delle miscele sintetico/reale alimentate.

L'andamento dei ratei di rimozione parziale è piuttosto buono, attestandosi quasi sempre sopra il 90%. Anche quello dei ratei di rimozione totale oscilla tra il 70 e il 90% confermando una buona capacità della biomassa Anammox di rimuovere i composti azotati.

I rapporti molari tra azoto nitroso e ammoniacale presentano andamenti per lo più sottostechiometrici suggerendo reazioni parallele a quelle messe in atto dal processo Anammox, probabilmente innescate da infiltrazioni di ossigeno.

L'andamento dei rapporti molari tra azoto nitrico e ammoniacale è anch'esso sottostechiometrico nella fase successiva alla pausa estiva. Questa peculiarità è attribuibile all'aumento dell'attività denitrificante che si ottiene con l'incremento della quantità di carbonio organico presente nell'alimento reale.

La vera problematica anche qui rimane il *fouling* che interessa particolarmente l'attività quando l'influente diviene totalmente reale.

I lavaggi fisici sono stati fatti sempre più di frequente (una volta ogni 4 giorni) con il conseguente rischio di corpose infiltrazioni di ossigeno nel fermentatore.

Lo sporcamento dato dalla biomassa Anammox è differente rispetto a quello visto nel processo Parnit: i *TMP-jump* sono per lo più frutto di veri e propri impaccamenti superficiali (effetto torta), facilmente rimovibile per via fisica, ma anche facilmente e velocemente riformabili.

La biomassa, infatti, è andata via via aumentando con l'influente reale e rendendo pertanto più frequente l'effetto torta.

Non risultano evidenti fenomeni di *fouling* irreversibile, visti i valori contenuti della TMP a seguito dei lavaggi fisici. Gli EPS e gli SMP, quindi, per quanto sembrino correlati con i *TMP-jump*, non devono aver inciso significativamente sulla TMP. Una maggiore turbolenza potrebbe dunque risolvere facilmente il problema.

## 6.3 Prospettive future

Dai risultati ottenuti si evince la bontà tecnologica dei processi descritti. Un'applicazione a scala più ampia può essere d'aiuto per comprendere se certe difficoltà tecniche sono effettivamente superabili e se non si presentino altre problematiche.

Se infatti sono numerosi i benefici di un passaggio dalle tecnologie tradizionali a quelle esposte, l'esperienza nel campo è ridotta, in particolare nel campo impiantistico, mancando impianti a scala reale operanti su questa tipologia di reflui.

A fianco di questi studi si consigliano dei test su impianti di laboratorio incentrati in particolar modo sulla risoluzione delle questioni legate al *fouling*, il vero problema riscontrato durante la sperimentazione. La valutazione sull'efficacia di lavaggi fisici in controcorrente per quanto riguarda il Parnit e di una maggiore turbolenza per ciò che riguarda l'Anammox sembrano determinanti per un giudizio più completo sulla tecnologia esposta nella presente tesi.



# CAPITOLO 7

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Antonelli M. , Bialek K., Teli A., Influence of Thermal Extraction of Extracellular Polymeric Substances on Cell Integrity in Activated Sludge and Membrane Bioreactor Samples, *Water Environment Research* 83, no 2 (p. 100-106), 2011.

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.

Bae T.H., Tak T.M. (2005). Interpretation of fouling characteristics of ultrafiltration membranes during the filtration of membrane bioreactor mixed liquor. *Journal of Membrane Science*, 264, 151–160.

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.

Barker D.J., Stuckey D.C. (1999). A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. *Water Research*, 33, 3063-3082.

Bemberis I., Hubbard P.J., Leonard F.B. (1971). Membrane sewage treatment systems – potential for complete wastewater treatment. *American Society of Agricultural Engineers Winter Meeting*, 71-878, 1–28.

Bonomo L. (2008). *Trattamenti delle acque reflue*. McGrawhill, ISBN 978-88-386-6518-9

Bao, L., K. Fang, T. Cai, J. Wang, L. Yang, L. Cui, J. Han, L. Ding, & Y. Luo. 2009b. "Learning of content knowledge and development of scientific reasoning ability: A cross culture comparison." *Am. J. Phys.* 77(12): 1118-1123;

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.

Cho J., Song K.G., Yun H., Ahn K.H., Kim J.Y., Chung T.H. (2005). Quantitative analysis of biological effect on membrane fouling in submerged membrane bioreactor. *Water Science and Technology*, 51(6-7), 9-18.

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 (1972).

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.

Drews A. (2010). Membrane fouling in membrane bioreactors—Characterisation, contradictions, cause and cures. *Journal of Membrane Science*, 363(1-2), 1-28.

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.

Evenblij (2006). Filtration characteristics in membrane bioreactors. PhD Thesis. Technical University of Delft.

---

Fawehinmi F., Lens P., Stephenson T., Rogalla F., Jefferson B. (2004). The influence of operating conditions on extracellular polymeric substances (eps), soluble microbial products (smp) and bio-fouling in anaerobic membrane bioreactors, in: Proceedings of Water Environment – Membrane Technology Conference, Seoul, Korea.

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.

Gao, D.W., Fu, Y., Tao, Y., Wu, W.M., An, R., Li, X.X., 2009. Current research and development of controlling membrane fouling of MBR. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 2993–2998.

Gao, D.W., Peng, Y.Z., Wu, W.M., 2010. Kinetic model for biological nitrogen removal using shortcut nitrification–denitrification process in sequencing batch reactor. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5015–5021.

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.

Grace H.P. (1956). Structure and performance of filter media. I. The internal structure of filter media. *AIChE Journal*, 2(3), 307-315.

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).

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.

Jagersma, G.C., Meulepas, R.J.W., Heikamp-de Jong, I., Gieteling, J., Klimiuk, A., Schouten, S., Damste, J.S.S., Lens, P.N.L., Stams, A.J.M., 2009. Microbial diversity and community structure of a highly active anaerobic methane-oxidizing sulfate-reducing enrichment. *Environ. Microbiol.* 11, 3223–3232.

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., 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).

Jiang T., Kennedy M.D., Guinzbourg B.F., Vanrolleghem P.A., Schippers J.C. (2005). Optimising the operation of a mbr pilot plant by quantitative analysis of the membrane fouling mechanism. *Water Science and Technology*, 51, 19-25.

Judd S. (2007). The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology*, 26(2), 109-116.

Judd S. (2010). *The MBR Book. Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment*. 2nd ed. Elsevier, Oxford.

Judd S. and Jefferson B. (2003). *Membranes for Industrial Wastewater Recovery and Re-use*. Elsevier, Oxford.

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. Harhangi, 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).

Kayawake E., Narukami Y., Yamagata M. (1991). Anaerobic digestion by a ceramic membrane enclosed reactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71, 122.

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.

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.

Le-Clech P., Chen V., Fane A.G. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment, *Journal of Membrane Science*. 284, 17–53.

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.

Lim A.L., Bai R. (2003) Membrane fouling and cleaning in microfiltration of activated sludge wastewater. *J. Membr. Sci.*, 216, 279–290.

Lindsay M.R., Webb R.I., Strous M., Jetten M.S.M., Butler M.K., Forde RJ and Fuerst JA. (2001). Cell compartmentalisation in planctomyces: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives of Microbiology* 175:413–429.

Liu Y., Fang H.H.P. (2003). Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 33, 237-273.

Lonsdale H.K. (1982). The growth of membrane technology. *Journal of Membrane Science*, 10(2-3), 81-181.

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.

Meng F., Chae S., Drews A., Kraume M., Shin H., Yang F. (2009). Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): Membrane fouling and membrane material. *Water Research*, 43 (6), 1489-1512.

Metcalf & Eddy (2003) *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*, 4° Ed., revised by Tchobanoglous E., Burton F.L., Stensel H. D., Mc Graw Hill, ISBN 007-124140-X.

Meulepas, R.J.W., Jagersma, C.G., Gieteling, J., Buisman, C.J.N., Stams, A.J.M., Lens, P.N.L., 2009. Enrichment of anaerobic methanotrophs in sulfate-reducing membrane bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 458–470.

---

Mulder, A., Vandegraaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G., and Qn (1995) Anaerobic Ammonium Oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *Fems Microbiology Ecology* 16: 177-183.

Nagaoka H., Nemoto H. (2005). Influence of extracellular polymeric substances on nitrogen removal in an intermittently-aerated membrane bioreactor. *Water Science and Technology*, 51, 151-158.

Ni S.Q., Lee P.H., Fessehaie A., Gao B.Y., Sung S.. Enrichment and biofilm formation of Anammox bacteria in a non-woven membrane reactor. *Bioresource Technology* 101 (2010) 1792–1799.

Pang C.M., Hong P., Guo H., Liu W.T. (2005). Biofilm formation characteristics of bacterial isolates retrieved from a reverse osmosis membrane. *Environmental Science and Technology*, 39(19), 7541-7550.

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.

Pyanert, K., Smets, B.F., Beheydt, D., Verstraete, W., 2004. Start-up of autotrophic nitrogen removal reactors via sequential biocatalyst addition. *Environ. Sci. Technol.* 38 (4), 1228–1235.

Psoch C., Schiewer S. (2005). Long-term study of an intermittent air sparged mbr for synthetic wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 260, 56-65.

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.

Richardson J.F. (2002). *Chemical Engineering, Volume 2*. Elsevier, Oxford

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.

Shannon, M.A., Bohn, P.W., Elimelech, M., Georgiadis, J.G., Marinas, B.J., Mayes, A.M., 2008. Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature* 452, 301–310.

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., Jetten M.S.M. (2004). Anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 99-117.

Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M. (1999). Key physiological parameters of anaerobic ammonium oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 3248-3250.

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.

Stuckey D.C., Hu A. (2003). The submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBR): an intensification of anaerobic wastewater treatment, Presented at the IWA Leading Edge Conference on Drinking Water and Wastewater Treatment Technologies, Noordwijk/Amsterdam, The Netherlands.

Tao Y., Gao D.W., Fu Y., Wu M.W., Ren N.Q.. Impact of reactor configuration on anammox process start-up: MBR versus SBR. *Bioresource Technology* 104 (2012) 73–80

Teli A.. Treatment of industrial wastewaters by anoxic-aerobic and anaerobic membran bioreactors. Tesi di dottorato (2010).

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.

Trigo C., Campos J.L., Garrido J.M., Méndez R.. Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor. *Journal of Biotechnology* 126 (2006) 475–487.

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 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-Padín 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 S., Guillen G., Hoek E.M.V. (2005). Direct observation of microbial adhesion to membranes. *Environmental Science and Technology*, 39(17), 6461-6469.

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.

Yeom I.T., Nah Y.M., Ahn K.H. (1999). Treatment of household wastewater using an intermittently aerated membrane bioreactor. *Desalination*, 124, 193-203.

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.