



REGIONE AUTONOMA  
DELLA SARDEGNA

Università degli Studi di Cagliari

## **DOTTORATO DI RICERCA**

in

**GEOINGEGNERIA E TECNOLOGIE AMBIENTALI**

Ciclo XXVI

### **Sviluppo di tecnologie alternative per il trattamento biologico di reflui ad elevato contenuto di azoto**

Settore scientifico disciplinare di afferenza  
Ingegneria Sanitaria Ambientale (ICAR/03)

Presentata da:

Ing. Marianna Perra

Coordinatore Dottorato

Prof. Ing. Aldo Muntoni

Tutor

Prof. Ing. Alessandra Carucci

Esame finale anno accademico 2012 – 2013

“Lo studio e la ricerca della verità rappresentano una sfera di attività in cui è permesso di rimanere bambini per tutta la vita.”

Albert Einstein

# *Sommario*

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>7</b>
---------------------------	----------

## **CAPITOLO I – L’INQUINAMENTO DA AZOTO**

1.1 Il ciclo dell’azoto .....	9
1.2 Impatto umano sul ciclo dell’azoto .....	10
1.3 Effetti dell’inquinamento da azoto sulla qualità dell’aria .....	12
1.4 Effetti dell’inquinamento da azoto sulla qualità delle acque .....	13
1.5 Acque reflue ad elevato contenuto di azoto .....	14
1.5.1 Acque provenienti dal trattamento di disidratazione dei fanghi .....	14
1.5.2 Reflui zootecnici .....	15
1.5.3 Percolato di discarica .....	15
1.5.4 Acque reflue industriali .....	15

## **CAPITOLO II – LA NORMATIVA SULLE ACQUE**

2.1 La normativa comunitaria .....	18
2.1.1 L’evoluzione della normativa comunitaria .....	18
2.1.2 La Direttiva Nitrati 91/676/CEE .....	19
2.1.3 La Direttiva Quadro 2000/60/CE .....	20
2.1.4 La Direttiva 2006/118/CE .....	21
2.2 La normativa italiana .....	21
2.2.1 Il Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31 .....	22
2.2.2 Il Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 .....	22
2.2.3 Il Decreto Legislativo 16 marzo 2009, n. 30 .....	24

## **CAPITOLO III – I SISTEMI DI RIMOZIONE DELL’AZOTO DALLE ACQUE REFLUE**

3.1 Classificazione dei sistemi di rimozione.....	25
3.2 I sistemi di trattamento chimico-fisici .....	25
3.2.1 Clorazione al breakpoint. ....	26
3.2.2 Filtrazione con membrane .....	26
3.2.2.1 Microfiltrazione ed Ultrafiltrazione.....	27
3.2.2.2 Osmosi inversa .....	27

3.2.2.3 Elettrodialisi .....	27
3.2.3 Precipitazione di struvite.....	28
3.2.4 Scambio ionico.....	28
3.2.5 Separazione meccanica.....	29
3.2.6 Stripping dell'ammoniaca .....	29
<b>3.3 I sistemi di trattamento biologici .....</b>	<b>30</b>
3.3.1 Nitrificazione.....	30
3.3.1.1 Stechiometria della nitrificazione .....	31
3.3.1.2 Cinetiche di crescita .....	32
3.3.1.3 Fattori limitanti.....	33
3.3.2 Denitrificazione.....	36
3.3.2.1 Aspetti microbiologici.....	36
3.3.2.2 Stechiometria della denitrificazione .....	37
3.3.2.3 Cinetiche di crescita .....	37
3.3.2.4 Fattori limitanti.....	38
<b>3.4 I sistemi di trattamento biologici alternativi .....</b>	<b>40</b>
3.4.1 Il sistema a doppio stadio SHARON-ANAMMOX.....	40
3.4.2 Il sistema a stadio singolo CANON .....	41
3.4.3 Il sistema SHARON-Denitrificazione .....	42
<b>3.5 Confronto tra i sistemi di rimozione dell'azoto .....</b>	<b>42</b>

## **CAPITOLO IV – IL PROCESSO SHARON**

4.1 Generalità e stechiometria.....	45
4.2 Parametri che influenzano il processo SHARON .....	45
4.2.1 Temperatura.....	46
4.2.2 Età del fango .....	47
4.2.3 Ossigeno disciolto .....	48
4.2.4 Ammoniaca libera e acido nitroso.....	49
4.2.5 Carbonio inorganico.....	51
4.2.6 pH.....	51
4.2.7 Altri inibitori .....	52

## **CAPITOLO V – IL PROCESSO ANAMMOX**

5.1 Generalità e stechiometria.....	53
5.2 Aspetti microbiologici .....	54
5.3 Fattori influenti sul processo.....	56
5.3.1 Concentrazione di nitriti e azoto ammoniacale.....	56
5.3.2 Fosfati e solfuri .....	58

5.3.3 Ossigeno disciolto .....	58
5.3.4 Carbonio organico .....	59
5.3.5 Temperatura e pH.....	60
5.3.6 Concentrazione della biomassa .....	61
5.3.7 Altri fattori .....	62

## **CAPITOLO VI – MATERIALI E METODI**

6.1 Processo SHARON .....	64
6.1.1 Apparato sperimentale.....	64
6.1.2 Inoculo .....	65
6.1.3 Alimentazione del reattore SHARON .....	66
6.1.3.1 Influyente sintetico .....	66
6.1.3.2 Refluo reale .....	67
6.1.4 Test in batch di tossicità .....	68
6.1.4.1 Set up del sistema .....	68
6.1.4.2 Principio di funzionamento e modalità dei test.....	68
6.1.4.3 Elaborazione dei dati .....	70
6.2 Processo ANAMMOX.....	72
6.2.1 Apparato sperimentale.....	72
6.2.2 Inoculo .....	74
6.2.3 Alimentazione del reattore ANAMMOX .....	75
6.2.4 Test in batch di tossicità .....	77
6.3 Metodi analitici .....	78
6.4 Sperimentazione presso l’Università Tecnica di Delft .....	79
6.4.1 Processo ANAMMOX – Massima attività specifica .....	79
6.4.2 Processo CANON - Apparato sperimentale .....	79
6.4.3 Processo CANON - Inoculo .....	81
6.4.4 Processo CANON - Alimentazione.....	81
6.4.5 Processo CANON – Metodi analitici .....	83

## **CAPITOLO VII – PROCESSO SHARON: RISULTATI E DISCUSSIONE**

7.1 Start up e incremento della concentrazione di azoto ammoniacale .....	84
7.2 Integrazione del refluo reale di raffineria .....	88
7.2.1 STEP I.....	88
7.2.2 STEP II.....	91
7.2.3 STEP III .....	93
7.2.4 Test in batch di tossicità .....	95
7.2.5 Conclusioni al termine della fase sperimentale .....	103

7.3 Ottimizzazione del processo SHARON in vista del trattamento successivo .....	105
7.3.1 RUN I.....	105
7.3.2 RUN II .....	107
7.3.2.1 Test in batch di tossicità .....	110
7.3.3 Conclusioni al termine della fase sperimentale .....	112

## **CAPITOLO VIII – PROCESSO ANAMMOX: RISULTATI E DISCUSSIONE**

8.1 Fase I.....	114
8.2 Fase II.....	122
8.2.1 Test in batch di tossicità .....	127
8.3 Fase III .....	129
8.4 Conclusioni al termine della sperimentazione .....	132

## **CAPITOLO IX – EFFETTO DELLA TEMPERATURA SUI PROCESSI BIOLOGICI INNOVATIVI**

9.1 Influenza della temperatura sul processo ANAMMOX .....	135
9.1.1 Determinazione della massima attività specifica ANAMMOX.....	136
9.1.2 Determinazione dell'energia di attivazione .....	138
9.2 Avviamento di un reattore CANON a 15 °C .....	140
9.2.1 Analisi FISH .....	142
9.3 Conclusioni .....	147

## **CONCLUSIONI GENERALI..... 148**

## **BIBLIOGRAFIA..... 151**

# Introduzione

L'eccessiva presenza di azoto è uno degli elementi di maggior preoccupazione per quanto concerne le acque reflue, in quanto comporta diversi rischi ambientali e per la salute umana.

Attualmente è in aumento la produzione di acque reflue caratterizzate da elevati contenuti di azoto (prevalentemente sottoforma di azoto ammoniacale) e scarsa presenza di sostanza organica biodegradabile, derivanti ad esempio dalla digestione anaerobica di reflui zootecnici, dei fanghi negli impianti di depurazione delle acque o della frazione organica dei rifiuti solidi urbani, nonché da processi di raffinazione (industria petrolchimica).

I processi chimico-fisici (es. stripping con vapore) per il trattamento di reflui fortemente carichi di azoto sono in generale caratterizzati da elevati costi di investimento e di esercizio, nonché da una notevole complessità impiantistica, che ne rendono spesso poco conveniente l'applicazione.

I trattamenti biologici convenzionali prevedono la completa ossidazione (nitrificazione) dell'azoto ammoniacale a nitrato, a sua volta convertito in azoto molecolare gassoso ( $N_2$ , denitrificazione) in condizioni anossiche (cioè in assenza di ossigeno molecolare,  $O_2$ ) ed in presenza di una sufficiente quantità di sostanza organica biodegradabile (già presente nel refluo o aggiunta dall'esterno, ad es. metanolo). Tuttavia, l'azoto ammoniacale in concentrazioni elevate esercita sugli stessi microrganismi atti alla sua rimozione un effetto tossico e inibente, ed inoltre richiede l'aggiunta di metanolo che comporta un aumento notevole dei costi di esercizio: i processi convenzionali basati sulla nitrificazione e denitrificazione biologica dei composti azotati, sebbene più semplici ed economici rispetto ai trattamenti chimico-fisici ed idonei a trattare reflui di origine prevalentemente domestica, appaiono dunque scarsamente applicabili a tali tipologie di reflui.

Nasce quindi l'esigenza di sviluppare nuove tecnologie, alternative a quelle convenzionali ed in grado di competere con esse in termini economici e di efficienza depurativa, per il trattamento biologico di reflui caratterizzati da elevate concentrazioni di azoto ammoniacale.

Il Dottorato di Ricerca è stato incentrato sullo sviluppo e ottimizzazione di una tecnologia innovativa di trattamento biologico a "doppio stadio" (SHARON-ANAMMOX) per la rimozione dell'azoto da reflui ad elevato contenuto di azoto ammoniacale, che si ponga come valida alternativa ai trattamenti chimico-fisici ed a quelli biologici convenzionali, non adatti agli alti carichi.

In particolare, il lavoro svolto ha riguardato lo studio sulla trattabilità, mediante il processo biologico combinato SHARON-ANAMMOX, dei reflui derivanti dall'attività di raffinazione

petrolifera svolta presso gli impianti della SARAS SpA, caratterizzati da un elevato contenuto di azoto ammoniacale e dalla contemporanea presenza di composti altamente tossici quali cianuri, fenoli e solfuri: è stata valutata la possibile integrazione del processo chimico-fisico di strippaggio con vapore (attualmente applicato in raffineria) con il processo biologico combinato SHARON-ANAMMOX, con l'obiettivo di innalzare fino a 2000 mg<sub>N</sub>/l il valore di soglia previsto in uscita dalla colonna di strippaggio (attualmente fissato a 25 mg<sub>N</sub>/l partendo da un valore iniziale di circa 4000 mg<sub>N</sub>/l) e di trattare il refluo a valle della colonna stessa mediante il sistema biologico, determinando un notevole risparmio in termini di costi operativi.

Durante il periodo di Dottorato all'estero, svolto presso l'Università Tecnica di Delft (Olanda), è stata valutata l'influenza della temperatura sul processo ANAMMOX, mediante test in batch realizzati al fine di determinare le massime attività specifiche e le energie di attivazione dei batteri a diverse temperature. È stato inoltre possibile avviare un reattore per lo studio del processo a "stadio singolo" (CANON) alla temperatura di 15 °C, per la futura applicazione di tale sistema al trattamento di reflui civili, anche in Paesi con un clima caratterizzato da basse temperature, o nel periodo invernale.

La presente tesi è suddivisa in nove Capitoli. I primi cinque offrono una panoramica sull'origine e gli effetti dell'inquinamento da azoto, sulle diverse tecniche di rimozione dell'azoto dalle acque reflue e sulla normativa vigente in materia di tutela delle acque dall'inquinamento. Sono inoltre illustrati dettagliatamente i processi SHARON e ANAMMOX, per la rimozione autotrofa dell'azoto. La parte sperimentale del Dottorato di Ricerca è invece descritta dal Capitolo VI al Capitolo IX.

# CAPITOLO I

## L'inquinamento da azoto

### 1.1 Il ciclo dell'azoto

L'azoto è uno degli elementi essenziali per la crescita di tutte le specie animali e vegetali ed è presente nell'ecosistema in vari tipi di composti organici più o meno complessi ed in varie forme, legate tra loro da una serie di processi chimici, fisici e biologici che costituiscono il cosiddetto ciclo dell'azoto.

L'azoto gassoso ( $N_2$ ) costituisce oltre il 78% dell'atmosfera terrestre, anche se in questa forma risulta relativamente inerte e non direttamente utilizzabile dalla maggior parte degli organismi viventi; esso viene reso disponibile per le piante e gli animali attraverso il processo di *fissazione*, che può essere atmosferica, biologica o industriale.

Nel primo caso la trasformazione dell'azoto molecolare avviene attraverso l'energia prodotta da fenomeni ionizzanti, come radiazioni cosmiche e fulmini, incendi o combustioni ad alta temperatura; tale energia consente la combinazione tra l'ossigeno e l'azoto atmosferico dando luogo alla formazione di ossidi di azoto ( $NO_x$ ), i quali raggiungono direttamente il suolo tramite l'acqua contenuta nelle precipitazioni sotto forma di acido nitrico ( $HNO_3$ ).

La fissazione biologica invece produce azoto ammoniacale attraverso un particolare enzima, la nitrogenasi, presente in alcuni ceppi batterici, che scinde il legame elettronico fra gli atomi dell'azoto atmosferico ( $N_2$ ) per dare origine a composti di azoto e idrogeno. I batteri fissatori di azoto si dividono in due gruppi: quelli che vivono liberi nel terreno e quelli che vivono in simbiosi con le piante. I microrganismi simbiotici dipendono direttamente da alcune piante da cui ricevono energia e sostanze nutritive. Tra questi i *Rhizobium leguminosarum* sono batteri azotofissatori che penetrano all'interno delle radici delle piante leguminose e provocano la formazione di noduli radicali dentro cui fissano l'azoto atmosferico. I batteri che vivono liberi nel terreno dipendono indirettamente dalle piante per l'apporto energetico oppure ricavano energia direttamente dalle radiazioni luminose, come nel caso dei *Cianobatteri* (alghe azzurre) che accoppiano la fissazione dell'azoto con la fotosintesi. Questi possono inoltre formare associazioni simbiotiche con piccole felci acquatiche o con funghi.

La fissazione industriale dell'azoto è la principale interferenza umana nel ciclo dell'azoto. Tale processo avviene ad elevata temperatura ( $500^\circ C$ ) e pressione (200 atm), con l'ausilio di catalizzatori metallici a base di nichel, osmio e ferro.

L'azoto organico presente nelle piante e negli animali, in seguito alla loro morte, rientra a far parte del ciclo dell'azoto sotto forma di ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) attraverso il processo di *ammonificazione* ad opera di batteri ammonificanti. Con il processo di *nitrificazione* l'ammonio viene ossidato a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e successivamente a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e, infine, l'azoto ritorna in atmosfera allo stato gassoso in seguito alla riduzione del nitrato nel processo di *denitrificazione* (Figura 1.1).

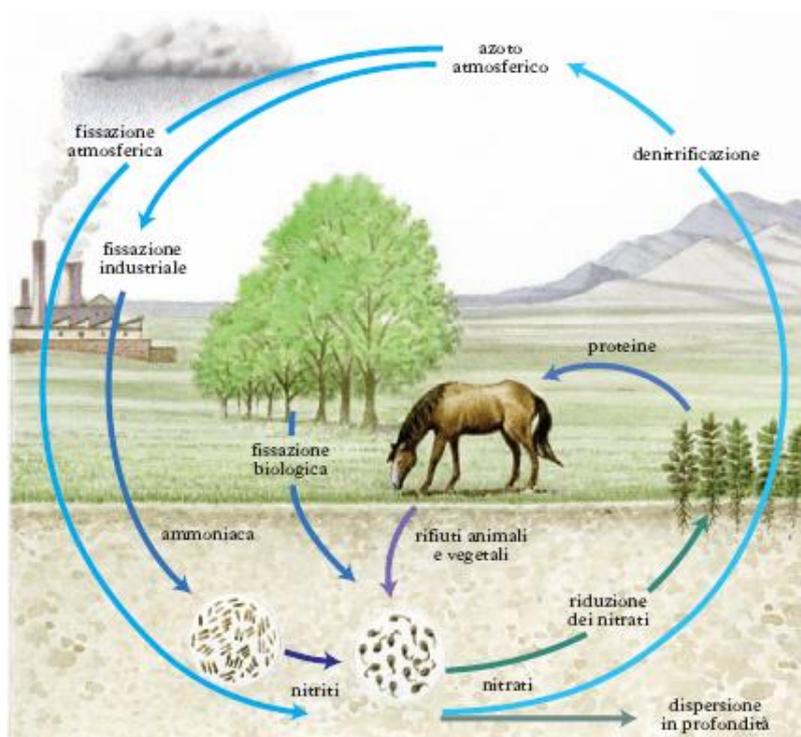


Figura 1.1: Il ciclo dell'azoto (www.treccani.it).

## 1.2 Impatto umano sul ciclo dell'azoto

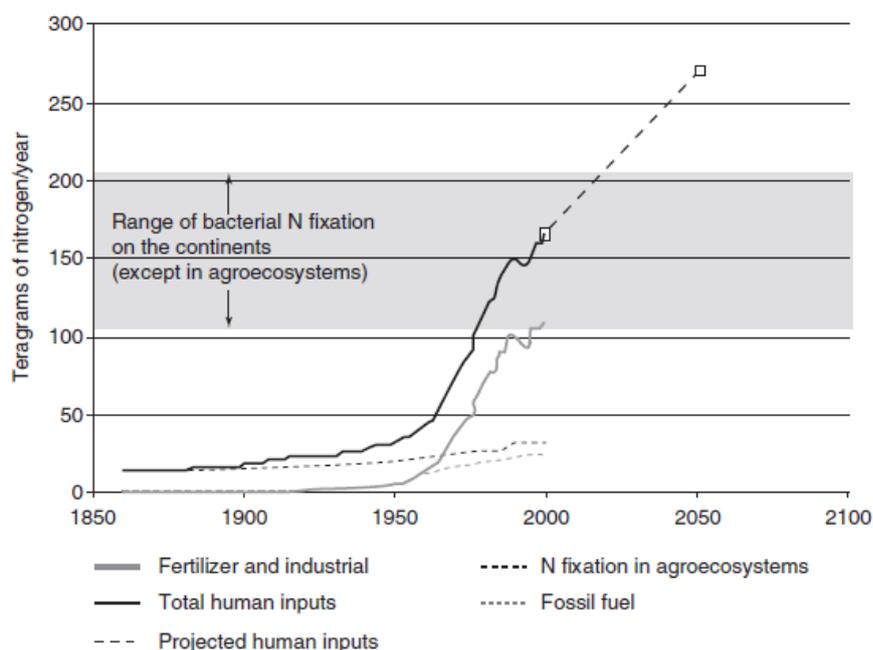
Negli ultimi cinquant'anni, le attività umane hanno alterato notevolmente il ciclo dell'azoto, più di qualsiasi altro elemento, aumentando la sua disponibilità e mobilità nelle acque, nell'atmosfera e nei suoli. Mentre in passato la principale fonte di azoto fissato era prodotta dal processo di fissazione biologica, oggi l'azoto derivante da attività antropiche supera di gran lunga quello prodotto naturalmente da tutti gli ecosistemi del pianeta (Figura 1.2).

L'utilizzo di fertilizzanti azotati di sintesi si è diffuso notevolmente e oltre la metà della quantità totale di azoto fissato industrialmente è utilizzata per la loro produzione. Nonostante la scoperta del processo di fissazione industriale dell'azoto risalga ai primi anni del '900,

l'utilizzo di tale sistema per la produzione di concimi azotati non è stato ampiamente utilizzato fino al 1950 e da allora il tasso di utilizzo è incrementato molto rapidamente. Oggi la sintesi di fertilizzanti inorganici rappresenta circa il 60% dell'azoto totale fissato attraverso le attività umane (a livello globale), il resto deriva principalmente dalla produzione di colture in grado di fissare l'azoto (in simbiosi con batteri azoto-fissatori) e dalla combustione di combustibili fossili.

La combustione di combustibili fossili catalizza la reazione tra  $O_2$  e  $N_2$ , comportando il rilascio di gas di azoto (ossidi), genericamente indicati come  $NO_x$ , particolarmente pericolosi per la salute umana in quanto tossici, oltre che altamente inquinanti.

Nel complesso, la fissazione dell'azoto umana (compresa la produzione di fertilizzanti, la combustione di combustibili fossili e la produzione di colture agricole che fissano l'azoto) è aumentata globalmente di circa quattro volte tra il 1960 e il 2010 e continua ad aumentare. Nel 2000, le attività umane hanno fissato azoto con una velocità di circa 170 Tg/anno, ovvero più di 1 gN/(m<sup>2</sup> anno) in media su tutta la superficie delle terre emerse (Tartowski e Howarth, 2013).



**Figura 1.2:** Confronto tra produzione di azoto per fissazione da attività umane e fissazione naturale (Tartowski e Howarth, 2013).

L'azoto proveniente da fonti umane può inoltre viaggiare per lunghe distanze nell'ambiente: l'azoto dei fertilizzanti applicati ai campi agricoli può lisciviare nelle acque sotterranee e superficiali e colpire gli ecosistemi a valle oppure volatilizzare nell'atmosfera sotto forma di ammoniaca e quindi essere ridistribuito su terreni non agricoli, comprese le foreste, o come  $NO_x$ . La volatilizzazione di ammoniaca in atmosfera può provenire anche dalle deiezioni

animali. Nei paesi sviluppati, circa la metà dell'azoto utilizzato come fertilizzante è inglobato nelle colture raccolte che vengono utilizzate in gran parte per nutrire bestiame e pollame. Gran parte dell'azoto in queste materie prime finisce nelle deiezioni animali, con una probabilità elevata di volatilizzazione.

I composti azotati reattivi sono solitamente trasportati attraverso l'atmosfera solo per poche centinaia di chilometri fino ad un massimo di circa 1000 km, così come accade per l'azoto trasportato attraverso i fiumi e le correnti oceaniche. Come risultato, l'alterazione del ciclo dell'azoto non è uniforme sulla terra e i più grandi cambiamenti sono concentrati nelle zone di maggior densità di popolazione e maggiore produzione agricola.

La velocità con cui l'attività umana ha accelerato il ciclo dell'azoto varia ampiamente tra le regioni del mondo. A livello globale, l'uso di fertilizzanti azotati sintetici continua ad aumentare, anche se negli USA e in molti altri paesi sviluppati l'uso di fertilizzanti è cambiato poco dal 1980: è diminuito in Europa occidentale e ancor più nella ex Unione Sovietica. In Cina, tuttavia, l'uso di fertilizzanti azotati di sintesi è aumentato di 2,5 volte dal 1980 al 2000 e continua a crescere ad un tasso di oltre il 4% all'anno. Negli ultimi quindici anni la Cina ha utilizzato un terzo di tutti i fertilizzanti azotati inorganici prodotti su scala globale. L'incremento nella produzione dell'azoto nei paesi in via di sviluppo ha permesso una notevole crescita della produzione alimentare e ha decisamente ridotto la fame, ma le conseguenze ambientali stanno diventando sempre più evidenti.

### **1.3 Effetti dell'inquinamento da azoto sulla qualità dell'aria**

L'utilizzo di fertilizzanti azotati per l'incremento della produzione agricola ha diversi effetti sulla qualità dell'aria. L'agricoltura risulta la principale fonte di emissioni di ammoniaca: circa i due terzi dell'ammoniaca prodotta a livello globale ogni anno deriva da attività agricole. Inoltre le emissioni di  $N_2O$  derivanti dal processo di denitrificazione nei suoli agricoli sono stimate essere il 65% delle emissioni globali. Ci sono molti rischi sanitari e ambientali connessi con l'azoto in forma gassosa. Alte concentrazioni di NO e  $N_2O$  a basse quote possono produrre ozono, che induce malattie respiratorie. Ad altitudini medie, l' $N_2O$  agisce come un gas serra con una lunga persistenza nell'atmosfera. Nella stratosfera, sotto l'azione della luce ultravioletta, l' $N_2O$  può esaurire l'ozono. Inoltre, gli ossidi di azoto reagiscono con l'umidità atmosferica per formare acido nitrico, che è la causa delle piogge acide. Il ritorno dell'azoto atmosferico reattivo sulla superficie terrestre è un fenomeno comunemente noto come deposizione atmosferica e si verifica principalmente come deposizione contemporanea

di biossido di zolfo e ammoniaca. Il trasporto e la deposizione di azoto atmosferico è diventato il processo di distribuzione dominante dell'azoto reattivo su scala globale. Secondo molti autori, la deposizione di azoto ha un impatto negativo sugli ecosistemi, causando effetti negativi quali l'eutrofizzazione e la tossicità negli ecosistemi acquatici, l'acidificazione del suolo, la mobilità dell'alluminio, e la riduzione della capacità del suolo di sequestro del carbonio negli ecosistemi terrestri.

## **1.4 Effetti dell'inquinamento da azoto sulla qualità delle acque**

L'eccessiva presenza di azoto nelle acque comporta effetti negativi sia sull'ambiente che sulla salute umana. La presenza di nitriti nelle acque potabili è stata associata alla metaemoglobinemia e a tumori del tratto digestivo. La metaemoglobinemia, comunemente nota come "sindrome del bambino blu", causa una diminuzione della capacità di trasporto dell'ossigeno nel sangue da parte dell'emoglobina che talvolta può portare anche alla morte. Inoltre i nitriti, possono combinarsi con le ammine e generare nitrosammine, composti potenzialmente cancerogeni. Per tutti questi motivi la concentrazione massima ammissibile di nitriti nelle acque potabili è di 0,5 mg/l in tutta l'Unione Europea. Anche la presenza di nitrati nelle acque è considerata pericolosa in quanto questi sono facilmente convertiti a nitriti in determinate circostanze. Fino a poco tempo fa si pensava che concentrazioni superiori a 40-50 mg/l di nitrati comportassero un alto rischio di metaemoglobinemia, soprattutto nei bambini. Tuttavia, recenti studi epidemiologici non hanno trovato una chiara associazione tra nitrati nell'acqua potabile e metaemoglobinemia. Ciononostante, esistono dei limiti rigorosi per le concentrazioni ammissibili di nitrati nelle acque potabili in molti paesi. Questo limite è di 50 mg/l nell'UE e 48 mg/l negli Stati Uniti, in accordo con le raccomandazioni dell'OMS stabilite nel 1970 e riconfermate nel 2004. Le concentrazioni di nitrato nelle acque che percolano nel terreno sono spesso molto elevate, talvolta anche superiori ai limiti consentiti dalla normativa, soprattutto nelle zone di allevamento intensivo. Le acque superficiali invece raramente superano i limiti perché questi sono rapidamente utilizzati dalla vegetazione.

Per quanto concerne l'impatto ambientale, il principale effetto dell'inquinamento da azoto sui sistemi acquatici è l'eutrofizzazione, ovvero l'aumento della produttività primaria dell'ecosistema (eccessiva crescita delle piante e decadimento) come risultato di un eccessivo apporto di nutrienti. L'eutrofizzazione può essere provocata da eccessivi apporti di azoto, fosforo, o entrambi, a seconda dell'ecosistema interessato. Solitamente, gli ecosistemi d'acqua dolce sono limitati dalla disponibilità di fosforo, pertanto quantità eccessive di questo

nutriente possono provocare eutrofizzazione. Al contrario, nei sistemi marini o di estuario, in genere limitati dall'azoto, l'eutrofizzazione può essere dovuta a quantità eccessive di questo elemento. L'eutrofizzazione provoca diversi effetti ecologici e tossicologici negli ecosistemi acquatici. Improvvisi aumenti nella produzione primaria generano grandi quantità di materia organica in decomposizione e di conseguenza comportano l'instaurarsi di condizioni di ipossia e anossia nelle acque di fondo e nei sedimenti. A sua volta, questo provoca la morte di pesci e animali acquatici in generale, talvolta su larga scala, con la formazione di composti tossici (ad esempio  $H_2S$ , idrogeno solforato), perdita di biodiversità, e, in generale, acque torbide e maleodoranti. Le condizioni eutrofiche favoriscono anche la proliferazione di alghe, come i cianobatteri, che rilasciano tossine durante la crescita o durante la lisi cellulare. Ulteriori problemi legati alla crescita di queste alghe sono il cattivo sapore dell'acqua potabile e la formazione, durante il processo di clorazione, di trialometani che risultano essere cancerogeni. Alte concentrazioni di composti azotati, come l'ammoniaca, possono essere direttamente tossiche per gli animali acquatici, compromettendo la loro capacità di crescere e riprodursi. Questi tipi di condizioni comportano il divieto temporaneo o, nei casi peggiori, permanente di pesca creando gravi problemi economici alle comunità che dipendono da tali attività.

In risposta a questi problemi, molte nazioni hanno emanato leggi per ridurre l'inquinamento da azoto. Nel 1991, l'Unione Europea ha emanato la direttiva sui nitrati, che ha stabilito una serie di pratiche di gestione per gli agricoltori tali da ridurre l'inquinamento idrico causato da nitrati provenienti da fonti agricole (Cap.2, par 2.1.2).

## **1.5 Acque reflue ad elevato contenuto di azoto**

Le acque reflue caratterizzate da un elevato contenuto di azoto hanno diversa provenienza. Di seguito verranno illustrate le principali tipologie in vista di un eventuale trattamento mediante i processi biologici innovativi.

### **1.5.1 Acque provenienti dal trattamento di disidratazione dei fanghi**

Negli impianti di trattamento delle acque reflue i fanghi di supero sono trattati mediante digestione anaerobica seguita da disidratazione. In seguito a questo trattamento l'acqua separata dai fanghi, caratterizzata da elevate concentrazioni di azoto ammoniacale, viene normalmente riciclata in testa al trattamento delle acque reflue, con un incremento del carico

di azoto in una misura di circa il 30% nonostante essa costituisca solo una piccola percentuale del flusso totale. L'abbattimento del carico di azoto proveniente dalla digestione dei fanghi può pertanto contribuire a ridurre la concentrazione di azoto negli effluenti degli impianti di trattamento delle acque reflue e soddisfare maggiormente i limiti di scarico per le concentrazioni di azoto.

### **1.5.2 Reflui zootecnici**

I reflui derivanti dall'attività agrozootecnica, se impiegati in modo irrazionale o immessi fuori del sistema agricolo, costituiscono un'elevata fonte di inquinamento, nonostante le loro caratteristiche li rendano idonei al reimpiego in agricoltura quali fertilizzanti o ammendanti.

La composizione degli effluenti zootecnici è variabile a seconda della specie allevata, delle tecniche di allevamento, delle modalità di raccolta e manipolazione delle deiezioni; tuttavia questi sono caratterizzati da concentrazioni elevate di COD, azoto e fosforo.

### **1.5.3 Percolato di discarica**

Il percolato proveniente dalle discariche controllate è un'acqua di rifiuto complessa e fortemente inquinata. Le caratteristiche qualitative dipendono dalla composizione dei rifiuti e variano notevolmente in funzione del tempo; tuttavia il percolato risulta simile all'acqua proveniente dal trattamento di disidratazione dei fanghi in quanto spesso viene ricircolato, con una conseguente riduzione del tenore di COD e un aumento del tenore di azoto.

### **1.5.4 Acque reflue industriali**

Anche i processi industriali possono generare reflui con elevato tenore di azoto (Tabella 1.1).

I flussi industriali con un alto contenuto di COD sono talvolta trattati mediante digestione anaerobica, producendo reflui particolarmente carichi di azoto. Alcuni esempi possono essere trovati nel settore farmaceutico, nelle concerie, nel trattamento dei rifiuti di macelli e industrie di lavorazione di patate.

L'eventuale presenza di sostanze recalcitranti o tossiche incrementa, inoltre, la concentrazione di COD, solitamente già molto elevata.

Le acque reflue delle concerie contengono anche cromo, acido e cloruro, con conseguenti effetti negativi sul processo di nitrificazione.

Le acque reflue dell'industria petrolifera sono caratterizzate dalla presenza di sostanze come fenoli, solfuri, cianuri, potenzialmente tossiche e inibenti per l'attività dei microrganismi.

**Tabella 1.1:** Reflui industriali contenenti azoto (Gerardi, 2002).

Contaminante	Industria
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Automobilistica
	Chimica
	Produzione carbone
	Fertilizzanti
	Alimentare
	Percolato di discarica
	Allevamento bestiame
	Macellerie
	Petrolchimica
	Farmaceutica
	Metallurgica
	Raffineria
	Conceria
	Militare
Surnatante da digestione anaerobica dei fanghi	
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Inibitori della corrosione
	Percolato (pretrattato)
	Macelleria (pretrattato)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Acciaieria
	Percolato (pretrattato)
	Macelleria
	Acciaieria

# CAPITOLO II

## La normativa sulle acque

L'acqua è una risorsa fondamentale per la vita umana; è un diritto di cui tutti devono poter godere e pertanto la sua carenza, i rischi correlati all'esaurimento delle scorte e la sua tutela dall'inquinamento costituiscono una priorità cui far fronte in prospettiva di uno sviluppo sostenibile per noi e per le generazioni future.

L'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE), in collaborazione con l'Agenzia di Valutazione Ambientale olandese (PBL), ha recentemente pubblicato l'"Environmental Outlook to 2050" concentrandosi su quattro importantissime tematiche (cambiamento climatico, biodiversità, acque e impatto dell'inquinamento sulla salute umana), già identificate nel precedente "Environmental Outlook to 2030", e proponendo diverse politiche da adottare per migliorare il futuro scenario mondiale. Per ciascuna tematica sono state definite le problematiche "rosse", ovvero quelle che necessitano di un celere intervento. Per quanto riguarda le acque si evidenziano la quantità della risorsa idrica, la qualità delle acque sotterranee e l'uso e l'inquinamento agricolo. Secondo il documento, se non si migliorerà la gestione delle acque e non si adotteranno dei sistemi adeguati, potranno esserci solo dei peggioramenti e anche la disponibilità di acqua non potrà essere garantita. Si prevede che oltre il 40% della popolazione mondiale nel 2050 vivrà in gravi condizioni di stress idrico, anche in conseguenza del fatto che in molte regioni del mondo, le acque sotterranee sono sfruttate più velocemente di quanto possano essere ricaricate e risultano sempre più inquinate. Tra il 1960 e il 2000 il tasso di esaurimento delle acque sotterranee è più che raddoppiato, raggiungendo oltre 280 km<sup>3</sup> all'anno: l'esaurimento delle acque sotterranee potrebbe diventare la più grande minaccia per l'agricoltura e per l'approvvigionamento idrico in diversi Paesi nei prossimi decenni. Anche la qualità delle acque superficiali è destinata a peggiorare a causa degli apporti eccessivi di nutrienti provenienti dall'agricoltura e dei sistemi di depurazione delle acque non sufficientemente efficienti con un incremento dell'eutrofizzazione, della perdita della biodiversità e delle malattie.

È pertanto necessario, promuovere un uso più efficiente delle risorse idriche, migliorarne la qualità e investire in infrastrutture "verdi", in un'ottica di futura cooperazione tra gli Stati.

Se si considera lo stato attuale delle risorse idriche in Europa risulta evidente che la situazione non è così grave come in alcune regioni del mondo, tuttavia la relazione dell'Agenzia Europea dell'Ambiente (AEA) "Water resources across Europe – confronting water scarcity and

drought” del 2009 sottolinea che, mentre nel sud dell'Europa continuano a sussistere i maggiori problemi dovuti a carenza di acqua, lo stress idrico è in aumento anche in alcune regioni del nord. Diminuire la domanda, ridurre al minimo la quantità di acqua estratta e aumentare l'efficienza del suo uso, sono sicuramente delle azioni da promuovere nel breve termine, senza dimenticare che migliorarne la qualità, rispettando i limiti allo scarico imposti dalla Normativa, diventa uno strumento fondamentale nella sfida per la tutela di questa risorsa.

## **2.1 La normativa comunitaria**

### **2.1.1 L'evoluzione della normativa comunitaria**

La legislazione ambientale europea ha sempre considerato molto importante la tutela delle risorse idriche. A partire dagli anni '70 sono state sviluppate infatti una serie di direttive e decisioni. Le prime direttive emanate tra il 1970 e il 1985 erano volte alla determinazione dei requisiti qualitativi delle acque in funzione del proprio uso:

- acqua potabile e acqua destinata al consumo umano;
- acque minerali;
- acque di balneazione;
- acque dolci idonee alla vita dei pesci;
- acque destinate alla molluschicoltura.

Le direttive avevano dunque come obiettivo primario la riduzione e, successivamente, l'eliminazione dell'inquinamento delle risorse idriche, possibilmente alla fonte. Una volta definito un ambiente idrico in base all'uso ed i relativi obiettivi di qualità, la Comunità tendeva a rendere compatibile l'utilizzazione della risorsa da parte di vari utenti, assicurando un'equa ripartizione dell'acqua, in quantità corrispondente ai bisogni degli utilizzatori, e di qualità adatta alla destinazione. Gli obiettivi di qualità erano basati su parametri espressi in termini di concentrazione delle sostanze inquinanti o di intensità degli incidenti ambientali. Ogni direttiva, poi, definiva i parametri qualitativi differenziati in rapporto alla categoria delle acque superficiali, indicava la frequenza dei campionamenti, i metodi per il campionamento e l'analisi dei campioni sui quali effettuare il controllo di qualità.

La presenza di una serie di atti legislativi comunitari così numerosi, però, ha presto evidenziato l'esigenza di dare alla materia una disciplina unitaria, coerente e in grado di affrontare tutte le criticità che si andavano presentando nella gestione delle risorse idriche.

A partire dai primi anni '90 sono state elaborate proposte alternative per un nuovo approccio alle politiche idriche, tuttavia, a causa della complessità del tema, il procedimento legislativo è stato piuttosto difficoltoso. Attualmente la normativa europea di riferimento consiste sostanzialmente di tre Direttive (676/91, 60/2000 e 118/2006) che verranno illustrate nei paragrafi successivi.

### **2.1.2 La Direttiva Nitrati 91/676/CEE**

Nel contesto dell'inquinamento da azoto delle acque, merita una particolare attenzione l'emanazione da parte della Comunità Europea della Direttiva 676/91 del 12 dicembre 1991, meglio nota come Direttiva Nitrati, con l'obiettivo di ridurre l'inquinamento delle acque causato direttamente o indirettamente dai nitrati di origine agricola, oltre che prevenire qualsiasi ulteriore inquinamento di questo tipo. A tal fine gli Stati membri sono stati chiamati a individuare le cosiddette Zone Vulnerabili da Nitrati di origine agricola (ZVN), ovvero quei territori dove vengono rilasciati composti azotati in acque che risultano già inquinate o che potrebbero diventarlo in conseguenza di tali scarichi, per le quali devono essere sviluppati dei piani d'azione specifici che gli agricoltori sono obbligatoriamente tenuti ad attuare. Gli Stati membri hanno inoltre dovuto definire codici di buone pratiche agricole, da attuarsi su base volontaria nel rispettivo territorio. La designazione delle zone vulnerabili deve essere inoltre rivista periodicamente, al fine di monitorare l'efficacia dei programmi d'azione ed eventualmente modificarli, con lo scopo di garantire che siano in linea con gli obiettivi della direttiva. Tali programmi devono includere una serie di misure previste dalla direttiva, relative, ad esempio, ai periodi in cui è proibita l'applicazione di fertilizzanti, alla capacità minima richiesta di stoccaggio degli effluenti di allevamento e alle regole per il controllo dell'applicazione dei fertilizzanti sui terreni adiacenti ai corpi idrici o sui terreni in forte pendenza, al fine di ridurre il rischio di contaminazione delle acque. Tutti gli Stati membri hanno elaborato uno o più programmi d'azione. La maggior parte di tali programmi comprende tutte le misure fondamentali richieste dalla Direttiva, incluso il limite di 170 kg di azoto per ettaro all'anno proveniente dagli effluenti di allevamento e il contenuto massimo ammissibile di nitrati nelle acque dolci pari a 50 mg/L. È tuttavia necessario che alcuni programmi stabiliscano delle regole più stringenti in materia di disposizioni riguardo lo

stoccaggio di effluenti d'allevamento, l'applicazione equilibrata di fertilizzanti e la definizione di periodi in cui l'applicazione degli stessi è proibita.

La Direttiva Nitrati è successivamente diventata parte integrante della Direttiva Quadro sulle acque (2000/60/CE); inoltre la Direttiva 2006/118/CE, relativa alla protezione dall'inquinamento e dal degrado delle acque sotterranee, conferma che le concentrazioni di nitrati non devono superare la soglia di 50 mg/l.

### **2.1.3 La Direttiva Quadro 2000/60/CE**

La Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio dei Ministri istituisce il quadro per un'azione comunitaria in materia di acque basata su un approccio integrato alla pianificazione e gestione della risorsa idrica al fine di assicurarne un uso sostenibile, equilibrato ed equo. La direttiva unifica tutte le precedenti normative di settore, ed indica una nuova linea di interventi al fine di assicurare la protezione dell'ambiente idrico, inteso nella sua totalità, nell'ambito del territorio comunitario.

Per la prima volta in una normativa comunitaria si cerca di integrare le esigenze ambientali con le esigenze economiche e sociali. Più in particolare, la direttiva si fonda sui principi di precauzione e prevenzione, obbliga alla protezione delle acque superficiali interne, delle acque di transizione, delle acque costiere e sotterranee soprattutto attraverso un uso razionale e promuovendo l'integrazione delle normative rilevanti.

Inoltre, per considerare compiutamente l'intero ciclo delle acque si ritiene necessario superare i confini amministrativi di Province, Regioni e Stati e gestire questa risorsa attraverso una pianificazione a livello di bacino idrografico.

Viene favorita l'azione preventiva e l'eliminazione delle potenziali situazioni di rischio, si mira alla riduzione delle emissioni di sostanze pericolose, fino alla loro eliminazione, con l'ausilio di un adeguato sistema di sanzioni in linea con il principio "chi inquina paga".

Il quadro normativo così delineato mira ad un utilizzo idrico sostenibile fondato sulla protezione a lungo termine delle risorse idriche e che contribuisca a mitigare gli effetti delle inondazioni o della siccità, considerando l'aspetto sociale, legato alla protezione delle persone dai rischi per la sicurezza e per la salute, l'aspetto economico, poiché si prevede l'accesso efficiente della popolazione e delle attività produttive alle risorse e l'aspetto ambientale, che prevede la conservazione delle risorse e la difesa delle loro funzioni ecologiche anche per le generazioni future.

In questo senso non è più sufficiente, come accadeva in passato, soffermarsi sulla caratterizzazione chimico-fisica del corpo idrico, o sul rispetto di determinati limiti di concentrazione di sostanze, ma è necessario tener conto anche della funzionalità ecologica dei corpi idrici che deve essere mantenuta e migliorata.

Dunque, gli Stati membri vengono chiamati ad intraprendere misure concrete per impedire il deterioramento dello stato di tutti i corpi idrici superficiali e sotterranei. L'obiettivo globale, da raggiungere entro il 2015, è quello di ottenere un "buono stato" di tutte le acque dell'Unione Europea, attraverso piani di gestione attuati a livello di singoli bacini idrografici, avendo come riferimento parametri ed indicatori ecologici, idrologici e chimico-fisici. La Direttiva individua pertanto le cosiddette sostanze prioritarie e sostanze pericolose prioritarie per le quali istituisce standard di qualità ambientale (SQA) che gli Stati membri devono rispettare. E' prevista inoltre una revisione periodica dell'elenco di tali sostanze, ed eventualmente degli SQA. La successiva Direttiva 2008/105/CE del 16 dicembre 2008 ha infatti sostituito e aggiornato l'Allegato X della Direttiva 2000/60/CE, contenente l'elenco sopracitato, e ridefinito gli SQA per tali sostanze. L'ultimo aggiornamento dell'Allegato X è relativo alla Direttiva 2013/39/UE del 12 agosto 2013.

#### **2.1.4 La Direttiva 2006/118/CE**

La Direttiva 118/2006 istituisce misure specifiche per prevenire e controllare l'inquinamento delle acque sotterranee, come previsto dalla Direttiva 2000/60/CE. Queste misure comprendono in particolare i criteri per valutare il buono stato chimico delle acque sotterranee.

Ai fini della valutazione dello stato chimico di un corpo o di un gruppo di corpi idrici sotterranei gli Stati membri utilizzano le norme di qualità delle acque sotterranee indicate nell'allegato I (che per i nitrati prevede un valore massimo di 50 mg/l) e i valori soglia per gli inquinanti e gli indicatori di inquinamento che devono essere stabiliti dagli Stati membri secondo la procedura descritta nell'Allegato II, parte A, tenuto conto almeno dell'elenco contenuto nell'Allegato II, parte B.

## **2.2 La normativa italiana**

La tutela delle acque, in Italia, viene attualmente contemplata dal D.Lgs. 152/06 e dal D.Lgs. 30/09. La normativa definisce la disciplina generale per la tutela delle acque superficiali,

marine e sotterranee, perseguendo, come obiettivi, la prevenzione, la riduzione dell'inquinamento ed il risanamento dei corpi idrici inquinati, il miglioramento dello stato delle acque e la protezione di quelle destinate a particolari usi. Il D.Lgs. 31/01 garantisce inoltre la qualità delle acque destinate al consumo umano.

### **2.2.1 Il Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31**

Il Decreto Legislativo 31/2001 disciplina la qualità delle acque destinate al consumo umano al fine di proteggere la salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque, garantendone la salubrità e la pulizia. Esso fornisce i parametri e i rispettivi valori limite per la dichiarazione di conformità al consumo umano.

### **2.2.2 Il Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152**

Attraverso il Decreto Legislativo 152/2006, "Norme in materia ambientale", è stata recepita in Italia la Direttiva 2000/60/CE. La lunga serie di disposizioni correttive e successive integrazioni evidenzia le non poche difficoltà incontrate nel recepimento e nell'adempimento degli obiettivi preposti.

Il Decreto, articolato in sei parti, disciplina nella Parte III la difesa del suolo e la lotta alla desertificazione, la tutela delle acque dall'inquinamento e la gestione delle risorse idriche. Riprendendo le definizioni della normativa europea di riferimento, assegna le competenze ai vari organismi pubblici, enti e altri soggetti. Definisce inoltre i vari bacini idrografici presenti nel territorio italiano. Al fine della tutela e del risanamento delle acque superficiali e sotterranee, la Parte III individua gli obiettivi minimi di qualità ambientale per i corpi idrici significativi e gli obiettivi di qualità per specifica destinazione per i corpi idrici, da garantirsi su tutto il territorio nazionale. L'obiettivo di qualità ambientale è definito in funzione della capacità dei corpi idrici di mantenere i processi naturali di autodepurazione e di supportare comunità animali e vegetali ampie e ben diversificate. L'obiettivo di qualità per specifica destinazione individua lo stato dei corpi idrici idoneo ad una particolare utilizzazione da parte dell'uomo, alla vita dei pesci e dei molluschi.

Nella Sezione II della Parte III e negli Allegati 6 e 7 vengono ripresi i punti già visti nella normativa europea riguardanti l'individuazione delle aree sensibili e vulnerabili e la loro revisione. Vengono quindi individuati i corpi idrici già eutrofizzati o probabilmente esposti a prossima eutrofizzazione, in assenza di interventi specifici protettivi, per i quali è richiesta

l'eliminazione degli elementi nutritivi, responsabili dello stato di eutrofizzazione, quali azoto e fosforo. Le ZVN sono individuate tenendo conto dei carichi (specie animali, intensità e tipologia di allevamento e dei reflui, modalità di applicazione al terreno, fertilizzazione in uso e colture) e dei fattori ambientali. I fattori ambientali dipendono dalle caratteristiche litostrutturali, idrogeologiche e idrodinamiche, dalle capacità di attenuazione del suolo, dalle caratteristiche climatiche e idrologiche, dall'ordinamento colturale e dalle pratiche agricole. Sono inoltre riconfermate le limitazioni riguardo il quantitativo massimo di azoto consentito che si attesta su 170 kg/ha/anno.

La Sezione II regola anche la disciplina degli scarichi. I limiti di emissione allo scarico, indicati nell'Allegato 5 alla Parte Terza del decreto, dei vari parametri sono differenziati in funzione della provenienza delle acque reflue (urbane o industriali) e del corpo ricettore (acque superficiali e fognature o suolo).

In particolare, per quanto riguarda l'azoto, i valori soglia per lo scarico in corpi idrici superficiali e in fognatura imposti dalla normativa (Tabella 3, Allegato 5 alla Parte III del Decreto) sono riportati nella Tabella 2.1.

**Tabella 2.1:** Valori limite di emissione in acque superficiali e in fognatura (D.Lgs. 152/2006).

Parametri	Scarico in acque superficiali	Scarico in fognatura
Azoto ammoniacale	≤ 15 (mgNH <sub>4</sub> /l)	≤ 30 (mgNH <sub>4</sub> /l)
Azoto nitroso	≤ 0,6 (mgN/l)	≤ 0,6 (mgN/l)
Azoto nitrico	≤ 20 (mgN/l)	≤ 30 (mgN/l)

I limiti di emissione per le aree sensibili relativi all'azoto totale e al fosforo totale (Tabella 2, Allegato 5 alla Parte III del Decreto) risultano ovviamente più restrittivi rispetto a quelli per lo scarico in corpi idrici superficiali e in fognatura, come indicato nella Tabella 2.2.

**Tabella 2.2:** Limiti di emissione per gli impianti di acque reflue urbane recapitanti in aree sensibili (D.Lgs. 152/2006).

Parametri (media annua)	Potenzialità impianto in abitanti equivalenti (a.e.) (1)			
	10000÷100000		>100000	
	Concentrazione	% di riduzione (2)	Concentrazione	% di riduzione (2)
<b>Azoto totale</b> (mgN/l)	≤ 15	70÷80	≤ 10	70÷80

(1) 1 a.e.= carico organico biodegradabile avente una richiesta di ossigeno a 5 giorni (BOD<sub>5</sub>) pari a 60 grammi di ossigeno al giorno;

(2) riduzione in relazione al carico dell'influente.

Per le acque reflue urbane e industriali che recapitano sul suolo (Tabella 4, Allegato 5 alla Parte III del Decreto), il limite dell'azoto totale imposto dalla normativa è di 15 mgN/l. Esiste, inoltre, il divieto diretto di scarico nelle acque sotterranee di sostanze che influiscono sfavorevolmente sull'equilibrio dell'ossigeno, in particolare ammoniaca e nitriti.

### **2.2.3 Il Decreto Legislativo 16 marzo 2009, n. 30**

Il D.Lgs. 30/09 integra le disposizioni per prevenire o limitare le immissioni di inquinanti nelle acque sotterranee, già previste nel D.Lgs. 152/06, e mira a prevenire il deterioramento dello stato di qualità di tutti i corpi idrici sotterranei. Ai fini del raggiungimento o del mantenimento del buono stato delle acque sotterranee entro il 22 dicembre 2015, il D.Lgs. 30/09 si applica ai corpi idrici sotterranei, comprese le acque di prima falda, identificati sulla base dei criteri tecnici riportati nell'Allegato 1 e definisce misure specifiche per prevenire e controllare l'inquinamento e il depauperamento delle acque sotterranee.

# CAPITOLO III

## I sistemi di rimozione dell'azoto dalle acque reflue

### 3.1 Classificazione dei sistemi di rimozione

I sistemi di rimozione dell'azoto si possono classificare in due principali categorie in funzione del tipo di processo su cui essi si basano. Si hanno pertanto i sistemi di rimozione biologica e i sistemi di rimozione chimico-fisici. L'applicazione di una determinata tipologia dipende fondamentalmente dalla provenienza del refluo da trattare e di conseguenza anche dal carico che lo contraddistingue ovvero dalla concentrazione di azoto in esso presente.

I reflui caratterizzati da elevate concentrazioni di azoto ammoniacale (superiori al g/l), generalmente reflui industriali, sono trattati con metodi chimico-fisici, altamente efficienti ma caratterizzati da elevati costi di gestione.

Per i reflui a basso-medio carico aventi una concentrazione di azoto ammoniacale non superiore ai 100 mgN/l, come i reflui urbani, i sistemi di trattamento solitamente utilizzati sono quelli biologici, basati sui processi di nitrificazione e denitrificazione, sicuramente più economici rispetto ai sistemi chimico-fisici e che consentono di raggiungere le efficienze di rimozione desiderate.

Infine, negli ultimi trent'anni sono stati scoperti e sviluppati dei nuovi sistemi biologici per il trattamento di reflui caratterizzati da elevate concentrazioni di azoto (da 100 mgN/l fino a 5000 mgN/l) e un basso rapporto C/N che risultano essere altamente competitivi con i metodi chimico-fisici perché altamente efficienti, se ben gestiti, e decisamente meno onerosi.

### 3.2 I sistemi di trattamento chimico-fisici

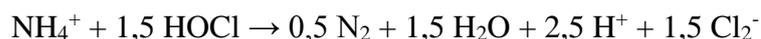
I metodi chimico-fisici che consentono la rimozione dell'azoto sono numerosi. Tra questi si riportano:

- clorazione al breakpoint;
- filtrazione con membrane;
- precipitazione di struvite;
- scambio ionico;
- separazione meccanica;
- stripping dell'ammoniaca.

In seguito si descriveranno brevemente i metodi citati.

### 3.2.1 Clorazione al breakpoint

La clorazione al breakpoint è un processo chimico che avviene mediante l'aggiunta di cloro in elevate concentrazioni sotto forma di acido ipocloroso (HOCl). Questo, essendo un forte agente ossidante, reagisce molto rapidamente con l'ammoniaca presente nel refluo producendo cloroammine e dicloroammine. La distribuzione tra queste due forme risulta governata dalle velocità di formazione, a loro volta dipendenti dal pH e dalla temperatura. Successivamente una parte delle cloroammine è convertita a tricloruro di azoto (NCl<sub>3</sub>), la parte restante è ossidata ad azoto gassoso e protossido di azoto (N<sub>2</sub>O) e il cloro viene ridotto a ione cloruro. L'ulteriore aggiunta di cloro, fino al cosiddetto punto di "breakpoint", comporta l'ossidazione del tricloruro di azoto formato. La reazione che riassume la conversione dell'ammonio ad azoto gassoso durante il processo di clorazione può essere così espressa:



Per dosaggi superiori al punto di breakpoint, una qualsiasi aggiunta di cloro si tradurrà in un proporzionale aumento della quantità di cloro libero disponibile (sotto forma di ipoclorito). Questo processo risulta essere chiaramente molto costoso a causa degli elevati dosaggi di cloro; inoltre, richiede grandi quantità di agenti alcalini (CaCO<sub>3</sub>), per neutralizzare l'acidità prodotta, che comportano l'incremento dei solidi disciolti totali ma anche dei costi del trattamento. Infine, potrebbe anche risultare necessario un trattamento ulteriore per la rimozione del cloro residuo.

### 3.2.2 Filtrazione con membrane

Il processo di filtrazione si basa sul principio di separazione fisica che consente la separazione del materiale particolato e colloidale da un liquido. Nei processi di filtrazione a membrana le dimensioni dei pori di queste ultime sono tali da consentire di rimuovere anche le sostanze disciolte (dimensioni comprese tra 0,0001-1 µm). Le membrane agiscono come barriere selettive in grado di trattenere determinati costituenti presenti nel liquido e consentire invece il passaggio di altri. Tra questi processi si hanno la microfiltrazione, l'ultrafiltrazione, la nanofiltrazione, l'osmosi inversa e l'elettrodialisi.

### ***3.2.2.1 Microfiltrazione ed Ultrafiltrazione***

Le membrane utilizzate in questi processi hanno dimensioni dei pori di 0,1-10  $\mu\text{m}$  nella microfiltrazione e di 0,001-0,1  $\mu\text{m}$  nell'ultrafiltrazione. A seconda della direzione del flusso che attraversa la loro superficie, si possono avere diverse configurazioni: a flusso tangenziale o a flusso ortogonale. Sono processi che dipendono strettamente dalla pressione e il funzionamento del processo può essere controllato adottando tre diverse modalità operative. Tali modalità sono rappresentate da: funzionamento a flusso costante e pressione transmembrana variabile nel tempo (crescente); funzionamento a flusso variabile nel tempo (decrescente) e pressione transmembrana costante; funzionamento a flusso e pressione transmembrana variabili nel tempo. Solitamente la più utilizzata è quella a flusso costante, anche se è risultato che la modalità operativa più efficace ai fini del trattamento è quella nella quale sia il flusso che la pressione variano nel tempo.

### ***3.2.2.2 Osmosi inversa***

Quando due soluzioni a concentrazioni di soluto differenti sono separate con una membrana semipermeabile, attraverso di essa si crea una differenza di potenziale chimico. Il liquido tende a passare attraverso la membrana dalla soluzione a concentrazione minore (a potenziale chimico maggiore) verso la soluzione a concentrazione maggiore (a potenziale chimico minore): in un sistema di volume finito il passaggio avviene fintanto che la differenza di pressione bilancia la differenza di potenziale chimico e le due soluzioni raggiungono la stessa concentrazione. Tale differenza di pressione è detta pressione osmotica e dipende dalle caratteristiche del soluto, dalla sua concentrazione e dalla temperatura. Il fenomeno dell'osmosi è reversibile: esercitando dal lato della soluzione più concentrata una pressione maggiore della pressione osmotica, si consente alle molecole del solvente di passare verso la soluzione meno concentrata e in tal caso il processo prende il nome di osmosi inversa. Solitamente il processo di osmosi inversa è utilizzato per la dissalazione delle acque. Nel trattamento delle acque reflue invece questa consente di rimuovere i costituenti disciolti residui da trattamenti avanzati di filtrazione su letto granulare o di microfiltrazione.

### ***3.2.2.3 Elettrodialisi***

L'elettrodialisi è un processo durante il quale gli ioni sono trasportati attraverso una membrana semipermeabile, sotto l'azione di un potenziale elettrico; le membrane sono

catione o anione selettive, ossia possono essere attraversate da ioni positivi o ioni negativi. Disponendo di più membrane in fila, che permettono alternativamente il passaggio di ioni caricati positivamente o negativamente, si possono rimuovere tali ioni dall'acqua reflua.

### 3.2.3 Precipitazione di struvite

Questa tecnologia è utilizzata per la separazione chimico-fisica di parte dell'azoto contenuto nei liquami zootecnici e/o nel digestato. La separazione viene ottenuta mediante l'aggiunta di magnesio che, quando raggiunge rapporti stechiometrici (1:1:1) con il fosforo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e con lo ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) presenti in soluzione, reagisce con essi. Il prodotto della reazione è la struvite, chimicamente definibile come magnesio ammonio fosfato (MAP) esaidrato:



La struvite è poco solubile in acqua, molto solubile in soluzione acide e altamente insolubile in soluzioni alcaline. Per tale motivo, la cristallizzazione e il recupero della struvite possono essere condotti in reattori, continui o discontinui, dove vengono realizzate le condizioni idonee per la sua precipitazione controllata, che avviene a valori di pH maggiori di 8. Tali valori si possono ottenere aggiungendo al liquame dei composti alcalini, quali calce, soda o idrato di magnesio, o strippando dal liquame stesso l'anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ), insufflando aria.

### 3.2.4 Scambio ionico

Lo scambio ionico è un processo nel quale alcune specie ioniche vengono sostituite in un materiale scambiatore insolubile con altre specie ioniche presenti in soluzione. Nel trattamento delle acque reflue, i processi di scambio ionico sono applicati per la rimozione dell'azoto, oltre che dei metalli pesanti e dei solidi disciolti e possono essere realizzati sia in batch che in continuo. I materiali scambiatori solitamente utilizzati sono le zeoliti e, nel caso di rimozione dell'azoto ammoniacale, è preferita in particolare la clinoptilolite, una zeolite naturale largamente diffusa, le cui forme calcica e sodica presentano una elevata selettività per l'ammonio.

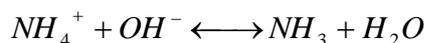
### 3.2.5 Separazione meccanica

Le macchine per la separazione meccanica disponibili sono molteplici: si hanno, per esempio, i vagli vibranti e rotanti, poco onerosi, e le centrifughe ad asse orizzontale, che consentono elevate efficienze di separazione, ma hanno per contro elevati costi di investimento e di esercizio. I vari dispositivi possono anche essere abbinati fra loro, così da ottenere linee di separazione con elevate efficienze di rimozione dell'azoto.

### 3.2.6 Stripping dell'ammoniaca

Lo stripping o degasazione dell'ammoniaca è un processo di tipo fisico attraverso il quale l'azoto ammoniacale viene rimosso dalle acque reflue. Il processo consiste nella rimozione dell'ammonio attraverso il trasferimento di tale composto dallo stato liquido allo stato gassoso.

L'equilibrio chimico tra ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ) e ione ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) dipende fortemente dal pH ed è espresso dalla relazione:



Per evitare la dissociazione dell'ammoniaca in ione ammonio e acqua viene aggiunto un agente carbonatante (calce) che consente di innalzare il pH.

In questo modo l'equilibrio chimico tende ad spostarsi verso l'ammoniaca nella forma libera che pertanto può essere strippata attraverso l'invio di una corrente di aria. L'efficienza di rimozione dipende dal valore del pH, che deve essere mantenuto intorno a 10,5÷11,5, dalla temperatura e dal flusso d'aria ascensionale.

In genere, poiché la corrente di aria è inquinata dall'ammoniaca passata in fase gassosa, essa viene assorbita in una soluzione di acido solforico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 30-35 %, ottenendo una soluzione di solfato d'ammonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , oppure viene distrutta termicamente.

Il refluo viene quindi immesso in una torre di aerazione riempita con un materiale di contatto; l'aria, o il vapore, insufflati dal basso viaggiano lungo la superficie del materiale di contatto, trascinando i gas volatili e l'ammoniaca.

Questa tecnica è spesso utilizzata dopo la digestione anaerobica dei fanghi; le efficienze di rimozione raggiungibili sono molto elevate (80÷90%), così come i costi, dovuti al dosaggio dei reagenti per la modulazione del pH, ai consumi energetici per il riscaldamento e l'aerazione, al trattamento e smaltimento dei residui.

### 3.3 I sistemi di trattamento biologici

La rimozione biologica dell'azoto dalle acque reflue è basata sui processi di nitrificazione e denitrificazione, i quali consentono l'ossidazione dell'azoto ammoniacale ( $\text{N-NH}_4^+$ ) e la successiva riduzione dei nitrati ( $\text{N-NO}_3^-$ ) così prodotti ad azoto gassoso. Di seguito verranno illustrati entrambi i processi, dando particolare importanza ai vari parametri da cui dipendono.

#### 3.3.1 Nitrificazione

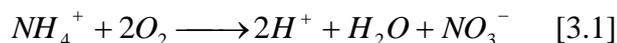
La nitrificazione è un processo biologico a due stadi, nel quale prima l'azoto ammoniacale viene ossidato a nitriti ( $\text{N-NO}_2^-$ ) e successivamente i nitriti sono ossidati a nitrati. I due stadi, nitrosazione e nitratazione, coinvolgono due differenti tipi di batteri. L'intero processo di nitrificazione è solitamente associato a batteri chemio-autotrofi, nonostante si sia appurato che esista anche la nitrificazione eterotrofa e possa avere un certo rilievo. La nitrificazione è dunque generalmente un processo chemio-autotrofo e pertanto i batteri coinvolti traggono l'energia necessaria dalle reazioni di ossidazione dell'ammonio e del nitrito, mentre utilizzano la  $\text{CO}_2$  e i bicarbonati come fonte di carbonio per la sintesi cellulare. I batteri responsabili del primo step di nitrosazione sono chemio-litotrofi (strettamente aerobi) e ricavano tutta l'energia necessaria alla crescita dall'ossidazione dell'ammonio a nitrito. In generale questi batteri sono chiamati ammonio-ossidanti (AOB, Ammonium Oxidizing Bacteria), ma, in particolare, alcune specie identificate appartengono ai generi *Nitrosomonas Europaea*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus* e *Nitrosorobrio*.

Lo stadio di nitratazione, ovvero l'ossidazione dei nitriti a nitrati, avviene ad opera di batteri chemio-litotrofi facoltativi, che possono quindi utilizzare, oltre ai nitriti, anche composti organici per generare l'energia necessaria al loro sviluppo. Tra i batteri nitrito ossidanti (NOB, Nitrite Oxidizing Bacteria) si trovano i *Nitrobacter*, *Nitrosospira*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* e *Nitroeystis*.

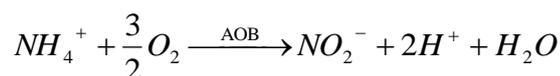
Negli impianti di trattamento a fanghi attivi, i batteri più comuni tra gli ammonio ossidanti risultano i *Nitrosomonas*, mentre i *Nitrobacter* sono i nitrito ossidanti prevalenti. Non è ancora chiaro quali possano essere le cause di questa selezione, se le diverse condizioni di crescita di cui i vari ceppi hanno bisogno oppure una significativa differenza nelle cinetiche di degradazione.

### 3.3.1.1 Stechiometria della nitrificazione

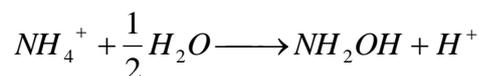
La reazione complessiva che descrive il processo di nitrificazione risulta:



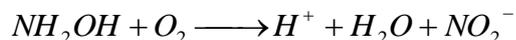
Come già descritto nel paragrafo 3.3.1, il processo è costituito da due fasi distinte. La fase di nitrosazione può essere schematizzata come segue:



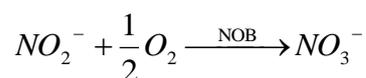
Essa avviene a sua volta attraverso due stadi intermedi; nel primo l'enzima *monossigenasi*, utilizzando l'ossigeno come ossidante, produce l'idrossilammina ( $NH_2OH$ ):



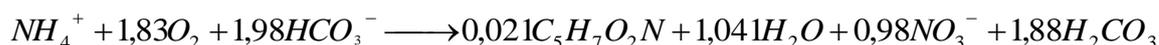
Nel secondo stadio, l'idrossilammina viene ossidata a nitrito dall'enzima *idrossilamminadeidrogenasi*:



La fase di nitratazione, catalizzata dall'enzima *nitritoossidasi*, completa il processo di nitrificazione:



Bisogna però considerare che una parte dell'azoto è utilizzato per la sintesi cellulare da entrambi i ceppi batterici, pertanto si può completare l'espressione [3.1] scrivendo:



dove la formula chimica  $C_5H_7O_2N$  viene utilizzata per rappresentare le cellule batteriche che vengono sintetizzate.

Inoltre, la quantità di ossigeno necessaria alla reazione può essere calcolata stechiometricamente e risulta alquanto elevata:

$$1,83 \cdot 2 \cdot 16 / 14 = 4,183 \text{ g di } O_2 \text{ per ogni g di } N-NH_4^+ \text{ ossidato}$$

dove:

16 g/mol = peso atomico dell'ossigeno;

14 g/mol = peso atomico dell'azoto.

In realtà la sintesi di organismi nitrificanti è piuttosto limitata, in rapporto ai quantitativi di azoto ammoniacale ossidati. I rapporti stechiometrici indicano una produzione così calcolata:

$0,021 \cdot 113 / 14 = 0,1695$  g di biomassa per ogni g di  $N-NH_4^+$  ossidato

Pertanto, si considera generalmente un consumo totale di ossigeno per la reazione completa di 4,57 mgO/mgN- $NH_4^+$ , trascurando l'azoto utilizzato per la crescita.

Si può inoltre notare che durante la reazione si verifica un consumo di alcalinità con produzione di acido carbonico  $H_2CO_3$ . Di conseguenza, qualora l'alcalinità iniziale dell'acqua da trattare non sia sufficiente a tamponare l'acidità prodotta durante la reazione, si avrà un abbassamento del pH della soluzione, che sarà necessario correggere dall'esterno, magari attraverso il dosaggio di  $CaCO_3$ , per garantire ai microrganismi una condizione di neutralità.

### 3.3.1.2 Cinetiche di crescita

Negli impianti di nitrificazione, operanti a temperature inferiori a 28°C, la velocità di ossidazione dell'ammoniaca a nitriti risulta inferiore rispetto alla velocità di ossidazione dei nitriti a nitrati. Per questo motivo è assai difficile che si abbia un accumulo di nitriti all'interno della vasca di nitrificazione. Considerando l'assenza di fattori limitanti, la velocità di nitrificazione può essere descritta attraverso la cinetica di Monod:

$$\mu_n' = \mu_{n,max} \frac{N - NH_4^+}{K_N + N - NH_4^+} - k_{dn}$$

dove  $\mu_n'$  = tasso netto di crescita dei batteri nitrificanti [ $d^{-1}$ ];

$\mu_{n,max}$  = tasso massimo di crescita dei batteri nitrificanti [ $d^{-1}$ ];

$N-NH_4^+$  = concentrazione di azoto ammoniacale [mg/l];

$K_N$  = costante di semisaturazione, cioè tale per cui  $\mu_n' = 0,5 \mu_{n,max}$  [mg/l];

$k_{dn}$  = costante di decadimento endogeno per i batteri nitrificanti [ $d^{-1}$ ].

In letteratura è possibile trovare diversi valori del tasso massimo di crescita per i batteri nitrificanti. I valori riscontrati da Pynaert (2003) sono:

$$\mu_{\max,AOB} = 0,3 \div 2,2 \text{ d}^{-1}$$

$$\mu_{\max,NOB} = 0,2 \div 2,5 \text{ d}^{-1}$$

Bisogna sottolineare che la velocità di crescita della biomassa nitrificante è sicuramente influenzata da vari parametri fondamentali, quali la temperatura, il pH, la concentrazione di ossigeno disciolto e la presenza nel refluo di sostanze inibenti, che quindi condizionano anche l'intero processo di nitrificazione.

### 3.3.1.3 Fattori limitanti

#### Ossigeno disciolto

La nitrificazione è un processo strettamente aerobico e in quanto tale necessita della presenza di ossigeno disciolto (OD). Tenendo conto dell'effetto della concentrazione di quest'ultimo, la relazione che esprime il tasso di crescita dei microrganismi nitrificanti diventa:

$$\mu_n' = \mu_{n \max} \left( \frac{N - NH_4^+}{K_N + N - NH_4^+} \right) \left( \frac{OD}{K_O + OD} \right) - K_{dn}$$

dove OD = concentrazione di ossigeno disciolto [mgO<sub>2</sub>/l];

K<sub>O</sub> = costante di semisaturazione dell'ossigeno disciolto [mgO<sub>2</sub>/l].

Tale modello risulta rappresentativo del processo di nitrificazione qualora il carico organico applicato sia relativamente basso o comunque limitato. In caso contrario, nei sistemi ad alto carico organico, tende a sovrastimare la cinetica di nitrificazione. L'influenza della concentrazione di ossigeno sul processo dipende anche dalle dimensioni e densità del fiocco di fango attivo e dalla domanda complessiva di ossigeno. Le dimensioni dei fiocchi di fango variano tra 100 e 400 µm e sono proporzionali ai microrganismi nitrificanti ed eterotrofi denitrificanti contenuti all'interno dei fiocchi stessi. Poiché l'ossigeno diffonde dalla massa liquida verso l'interno del fango, i batteri presenti nella parte più interna sono esposti a modeste quantità di ossigeno. Quando il carico organico è elevato, affinché la cinetica di nitrificazione si mantenga costante, sarà necessario fornire una maggiore quantità di ossigeno tale da consentire la diffusione fino agli strati più interni dei fiocchi.

Se la concentrazione di ossigeno risulta troppo bassa ( $< 0,5$  mg/l), il processo di nitrificazione può risultare inibito, con un effetto maggiore sui batteri nitrito ossidanti piuttosto che gli ammonio ossidanti (si veda a proposito il Cap.4, par 4.2.3). Il processo di nitrificazione comunque cessa per valori di ossigeno disciolto inferiori a  $0,2$  mg/l.

### Temperatura

Le condizioni di temperatura influenzano i valori delle costanti di equilibrio e del prodotto di solubilità, oltre le costanti di velocità delle reazioni chimiche. La dipendenza della velocità di nitrificazione dalla temperatura può essere espressa dalla legge di van't Hoff Arrhenius e, in particolare, per il tasso massimo di crescita dei batteri nitrificanti  $\mu_{\max,N}$  e della costante di semisaturazione  $K_N$  si ottiene:

$$\mu_{\max,N} = \mu_{\max,20} \cdot \mathcal{G}^{(T-20)}$$

$$K_N = K_{N,20} \cdot \mathcal{G}^{(T-20)}$$

dove  $\mathcal{G} = 1,123$ , fattore di temperatura ( $20^\circ\text{C}$ );

$\mu_{\max,20} = 0,47$  d<sup>-1</sup>, tasso massimo di crescita a  $20^\circ\text{C}$ ;

$K_{N,20} = 10$  mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l, costante di semisaturazione a  $20^\circ\text{C}$ .

La nitrificazione avviene in un campo di temperature comprese tra  $5$  e  $45^\circ\text{C}$ , con valori ottimali compresi tra  $20$  e  $32^\circ\text{C}$ . Si osserva di fatto un aumento della cinetica per temperature maggiori di  $20^\circ\text{C}$ . L'effetto della temperatura su  $\mu_{\max}$  è molto rilevante ai fini progettuali, infatti un calo di  $6^\circ\text{C}$  di temperatura porta ad un dimezzamento di  $\mu_{\max}$  con conseguente raddoppio dell'età del fango minima, e quindi aumento del volume minimo del reattore necessario al completamento della reazione. È da notare infine che la sensibilità di  $K_N$  alle variazioni di temperatura non incide sull'età minima del fango, ma solo sull'efficienza di nitrificazione.

### pH

La nitrificazione è profondamente influenzata dal valore del pH, ed in particolare le cinetiche si riducono drasticamente per valori di pH inferiori a  $6,8$ . Per pH prossimi a  $5,8-6,0$ , le velocità possono assumere un valore pari al  $10-20\%$  di quello assunto a  $\text{pH} = 7,0$ . A valori di

pH = 7,5÷8, le velocità di nitrificazione sono quelle ottimali. Per garantire elevate efficienze di nitrificazione solitamente si mantengono pH pari a 7-7,2 e, qualora il refluo abbia un basso contenuto di alcalinità, si incrementa il suo valore con opportuni agenti chimici al fine di mantenere il pH nell'intervallo ideale. La quantità di alcalinità da aggiungere in tal caso dipende dal valore iniziale dell'alcalinità stessa e dalla quantità di ammoniaca che deve essere ossidata (Metcalf & Eddy, 2006). La dipendenza del tasso massimo di nitrificazione dal pH è espressa dalla seguente espressione:

$$\mu_{\max,N} = \mu_{\max,7,2} [1 - 0,833(7,2 - pH)]$$

dove 7,2 = pH di riferimento;

$\mu_{\max,7,2}$  = tasso massimo di crescita a pH=7,2.

#### Ammoniaca libera e acido nitroso

La nitrificazione può essere inibita anche dalla presenza di ammoniaca libera (NH<sub>3</sub>) e acido nitroso (HNO<sub>2</sub>). Gli effetti dell'inibizione dipendono dalla concentrazione delle specie azotate presenti, dal pH e dalla temperatura. Per una trattazione più approfondita a riguardo, si rimanda al Cap.4, par. 4.2.4.

#### Sostanze inibenti

L'attività dei batteri nitrificanti può essere condizionata da un'ampia varietà di sostanze organiche e inorganiche, le quali possono esercitare un effetto negativo anche in concentrazioni molto inferiori a quelle che condizionano l'attività dei batteri aerobici eterotrofi. In alcuni casi, anche se le cinetiche di nitrificazione sono inibite, i batteri continuano a crescere e ad ossidare l'ammoniaca e i nitriti, in altri casi, invece, la tossicità è tale da determinare la morte della popolazione batterica nitrificante.

I batteri nitrificanti sono riconosciuti come buoni indicatori della presenza di sostanze organiche che risultano tossiche a modeste concentrazioni. Tra queste troviamo i solventi organici, le ammine, le proteine, i tannini, i composti fenolici, gli alcoli, i cianati, gli eteri, i carbammati e il benzene. Data l'ampia varietà di sostanze che possono inibire la nitrificazione, risulta spesso difficile definire con precisione il composto responsabile del

fenomeno inibitorio rilevato in un impianto di depurazione, e pertanto sono necessari numerosi campionamenti per individuarne la causa (Metcalf & Eddy, 2006).

### 3.3.2 Denitrificazione

La denitrificazione è più comunemente definita come il processo in cui i nitrati sono ridotti per via biologica, con i nitriti come prodotto intermedio, ad azoto molecolare gassoso  $N_2$  e piccole quantità di ossidi di azoto (NO e  $N_2O$ ). La rimozione biologica dei nitrati può, in realtà, avvenire secondo due modalità: la *riduzione assimilativa dei nitrati* e la *riduzione dissimilativa dei nitrati*. Nel primo caso la riduzione dei nitrati passa attraverso la conversione di questi in ammoniaca, la quale viene poi utilizzata per la sintesi batterica. Tale processo generalmente non avviene quando l'azoto è direttamente disponibile nella forma  $N-NH_4^+$ . Nella riduzione dissimilativa i nitrati sono impiegati come accettori di elettroni nelle reazioni di ossido-riduzione che coinvolgono un'ampia varietà di sostanze organiche o inorganiche che fungono da donatori di elettroni (Metcalf & Eddy, 2006).

#### 3.3.2.1 Aspetti microbiologici

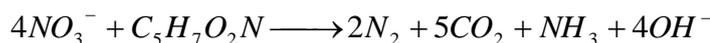
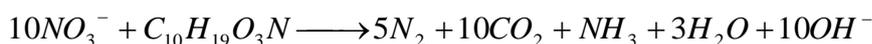
I batteri in grado di effettuare la denitrificazione sono sia di tipo autotrofo che eterotrofo, ma la maggior parte dei batteri denitrificanti è costituita da chemio-eterotrofi, che traggono energia dalle reazioni chimiche e utilizzano i composti organici come donatore di elettroni e come fonte di carbonio per la sintesi cellulare (Hauck, 1984). Tra questi si possono citare i seguenti generi: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Halobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Vibrio*, ecc. (Metcalf & Eddy, 2006). La specie *Pseudomonas* risulta la più comune e diffusa tra tutte le specie di batteri denitrificanti negli ambienti acquatici, ed è in grado di utilizzare un'ampia varietà di sostanze organiche in qualità di donatori di elettroni, come l'idrogeno, il metanolo, i carboidrati, gli acidi organici, gli alcoli, ecc. (Payne, 1981). La maggior parte di questi batteri sono aerobi facoltativi e possono pertanto operare sia in presenza che in assenza di ossigeno, utilizzando i nitriti o i nitrati come accettori di elettroni, nonché in condizioni fermentative, ossia in assenza di ossigeno e nitrati. Quando l'ossigeno disciolto viene a mancare o quando è presente ma in concentrazioni limitanti, i batteri producono l'enzima *nitratoriduttasi*, in grado di accelerare il trasferimento di elettroni dalla sostanza riducente a quella ossidante.

### 3.3.2.2 Stechiometria della denitrificazione

La serie di reazioni che comportano la riduzione del nitrato ad azoto gassoso può essere così schematizzata:



Nei processi di rimozione dell'azoto dalle acque reflue, la sostanza donatrice di elettroni necessaria durante la fase di denitrificazione può essere fornita da diverse fonti: il refluo stesso (solitamente in tal caso è indicata con la formula chimica  $C_{10}H_{19}O_3N$ ), il decadimento endogeno ( $C_5H_7O_2N$ ) o una fonte esterna, (generalmente metanolo,  $CH_3OH$ ). La stechiometria della denitrificazione sarà differente a seconda del substrato organico utilizzato:



Risulta evidente dalle reazioni che, in ogni caso, per ogni mole di  $N-NO_3^-$  ridotto viene prodotta una mole di alcalinità ( $OH^-$ ), che consente di recuperare parte dell'alcalinità consumata durante la fase di nitrificazione. Ragionando in termini di massa, durante la denitrificazione sono prodotti 3,57 g di alcalinità (come  $CaCO_3$ ) per ogni grammo di  $N-NO_3^-$  ridotto. Nella reazione di nitrificazione vengono invece utilizzati 7,14 g di alcalinità per ogni grammo di  $N-NH_4^+$  ossidato, per cui attraverso la fase di denitrificazione viene reintegrata circa la metà dell'alcalinità (Metcalf & Eddy, 2006).

### 3.3.2.3 Cinetiche di crescita

La velocità di denitrificazione può essere espressa utilizzando la cinetica di Monod in cui i due substrati svolgono il ruolo di fattori limitanti:

$$\frac{d(N-NO_3^-)}{dt} = -\frac{\mu_{max,D}}{Y_D} \cdot \frac{N-NO_3^-}{K_D + N-NO_3^-} \cdot \frac{C}{K_c + C} \cdot X$$

dove:  $\frac{d(N-NO_3^-)}{dt}$  = velocità di denitrificazione [mgN- $NO_3^-$ /l·d];

$\mu_{max,D}$  = tasso massimo di crescita dei batteri denitrificanti [ $d^{-1}$ ];

$Y_D$  = rendimento di crescita cellulare [mgSSV/mgN- NO<sub>3</sub><sup>-</sup>];

$K_D$  = costante di semisaturazione relativa all'azoto nitrico [mgN- NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l];

$C$  = concentrazione di substrato carbonioso [mgCOD/l];

$K_c$  = costante di semisaturazione relativa al substrato carbonioso [mgCOD/l];

$X$  = concentrazione batterica presente al tempo  $t$  [mgSSV/l].

La cinetica di denitrificazione in genere è considerata di ordine zero rispetto al substrato azotato, in quanto la costante di semisaturazione relativa all'azoto nitrico assume in genere valori molto bassi ( $K_D = 0,1$  mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l). Il valore della costante  $K_c$  dipende invece dal substrato carbonioso utilizzato; tuttavia, se la concentrazione di substrato organico è molto maggiore rispetto alla costante di semisaturazione  $K_c$ , è possibile considerare la cinetica di ordine zero anche rispetto alla concentrazione di substrato. Quindi quando il carbonio è presente in eccesso rispetto alla richiesta teorica per la rimozione del nitrato, il processo è indipendente sia dalla concentrazione di substrato che da quella di nitrato.

#### 3.3.2.4 Fattori limitanti

Come la nitrificazione, anche il processo di denitrificazione è influenzato inoltre da fattori ambientali quali concentrazione di ossigeno disciolto, temperatura, pH.

##### Ossigeno disciolto

I microrganismi eterotrofi traggono una maggiore energia utilizzando l'ossigeno come accettore di elettroni invece dei nitrati. Per questo motivo, al fine di evitare l'inibizione del processo di denitrificazione e garantire la rimozione completa dei nitrati, è necessario che la concentrazione di ossigeno disciolto sia prossima allo zero. Si tiene conto di tale fattore attraverso la seguente formula:

$$\mu_D = \mu_{\max,D} \frac{K_o}{K_o + DO}$$

dove  $\mu_D$  = tasso di crescita dei denitrificanti ad una data concentrazione di ossigeno [d<sup>-1</sup>];

$\mu_{\max,D}$  = tasso massimo di crescita dei batteri nitrificanti [d<sup>-1</sup>];

$DO$  = concentrazione di ossigeno disciolto [mgO<sub>2</sub>/l];

$K_o$  = costante di semisaturazione relativa all'ossigeno disciolto [mgO<sub>2</sub>/l].

Nei fiocchi di fango e nei biofilm, il processo di denitrificazione procede anche per concentrazioni modeste di ossigeno disciolto. L'inibizione dei batteri nitrificanti, in particolare i *Pseudomonas*, è stata riscontrata per concentrazioni di ossigeno disciolto pari a 0,2 mg/l, anche se altri studi hanno evidenziato un arresto della reazione al raggiungimento di 0,13 mgO<sub>2</sub>/l (Metcalf & Eddy, 2006).

### Temperatura

L'influenza della temperatura sulla cinetica di denitrificazione può essere, come per la nitrificazione, espressa con la relazione di Arrhenius del tipo:

$$\mu_{\max,D} = \mu_{\max,20} \cdot \mathcal{G}^{(T-20)}$$

dove:  $\mathcal{G} = 1,10$ , fattore di temperatura a 20°C;

$\mu_{\max,20}$  = tasso massimo di crescita dei batteri denitrificanti a 20°C.

Rispetto alla nitrificazione la costante  $\mathcal{G}$  ha un valore minore: questo evidenzia il fatto che i batteri denitrificanti risentono meno della temperatura in confronto ai batteri nitrificanti. La denitrificazione avviene anche a temperature inferiori a 5°C, ma procede a velocità molto basse e praticamente cessa a 3°C. L'intervallo in cui avviene la reazione è 5÷27°C, con valore ottimale a 20°C.

### pH

Come già visto nel paragrafo 3.3.2.2, il processo di denitrificazione comporta la produzione di alcalinità e, di conseguenza, un innalzamento del pH. I batteri denitrificanti risultano essere meno sensibili alle variazioni di pH rispetto ai nitrificanti. In particolare, per valori di pH compresi nel range 7,0-8,0, non si sono riscontrati effetti apprezzabili sulla velocità di denitrificazione, al contrario di quanto è risultato per pH compresi tra 7,0 e 6,0 (Metcalf & Eddy, 2006).

### 3.4 I sistemi di trattamento biologici alternativi

I sistemi biologici convenzionali non sono adatti al trattamento di reflui ad alto tenore di azoto, sia perché le alte concentrazioni di azoto risultano essere inibenti, talvolta addirittura tossiche, anche per i microrganismi in grado di rimuoverlo e sia perché richiederebbero comunque grandi quantità di sostanza organica per la fase di denitrificazione, comportando elevati costi di gestione visto che dovrebbe essere sicuramente integrata dall'esterno. Esistono però dei sistemi biologici alternativi, già operanti a scala reale ma che sono ancora oggetto di ricerca, che possono essere applicati a questa tipologia di reflui e risultano essere alquanto competitivi con i sistemi chimico-fisici solitamente utilizzati. Tra questi troviamo il sistema a doppio stadio SHARON-ANAMMOX, il sistema integrato SHARON-DENITRIFICAZIONE e il sistema a stadio singolo CANON. Questi processi innovativi sono oggetto della presente tesi, in particolare il processo combinato SHARON-ANAMMOX e in parte il processo CANON, pertanto saranno discussi più approfonditamente nei capitoli successivi. Per ora si vuole semplicemente illustrare il principio di funzionamento di tali sistemi al fine di poterli successivamente confrontare con i processi biologici convenzionali e con i processi chimico-fisici per valutarne l'effettiva convenienza.

#### 3.4.1 Il sistema a doppio stadio SHARON-ANAMMOX

Questo sistema integrato consente il trattamento di reflui, aventi concentrazioni di azoto ammoniacale oltre 1 g/L e un rapporto C/N influente pari circa a 1, attraverso l'utilizzo di due reattori nei quali avvengono distintamente i due processi. La particolarità è che il sistema risulta completamente autotrofo, con tutti i vantaggi che da esso derivano (vedi paragrafo 3.5).

Il processo SHARON (Single reactor for High activity Ammonium Removal Over Nitrite) è in pratica un processo di nitrosazione parziale, nel quale la nitrificazione è arrestata al primo stadio, e prevede pertanto la conversione del 50% dell'azoto ammoniacale influente a nitrito (nitrosazione parziale) al fine di produrre un effluente idoneo al successivo stadio del trattamento. I batteri ANAMMOX (ANAerobic AMMONia OXidation), appartenenti al gruppo dei *Planctomiceti*, sono in grado di ossidare l'aliquota residua di azoto ammoniacale ad azoto gassoso molecolare ( $N_2$ ) con una trascurabile produzione di nitrati, utilizzando i nitriti prodotti durante il processo SHARON come accettori di elettroni. Il refluo ottenuto a valle del

processo combinato SHARON-ANAMMOX risulta pertanto caratterizzato da un basso tenore di azoto. Il funzionamento del sistema è rappresentato nella Figura 3.2.

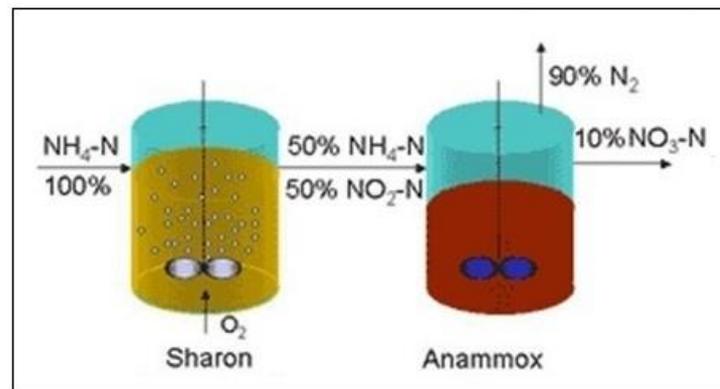


Figura 3.2: Sistema combinato SHARON-ANAMMOX.

Un'applicazione tipica di questo sistema è il trattamento delle acque provenienti dal processo di disidratazione dei fanghi (Mulder *et al.*, 2001; Kempen *et al.*, 2001): queste costituiscono circa l'1% del carico idraulico di un impianto di depurazione ma, una volta rimandate in testa alla linea acque, qualora non opportunamente trattate, contribuiscono al 10-30% del carico di azoto. Con questo sistema di trattamento, l'efficienza di rimozione complessiva dell'impianto può essere notevolmente incrementata.

Altre applicazioni sono il trattamento del percolato di discarica e delle acque reflue dalla digestione della frazione organica dei rifiuti (Notenboom *et al.*, 2002).

### 3.4.2 Il sistema a stadio singolo CANON

Nel sistema a stadio singolo CANON, i processi SHARON e ANAMMOX avvengono in un unico reattore. Questo implica la contemporanea presenza dei batteri ammonio-ossidanti aerobi e dei batteri ammonio-ossidanti anaerobi (ANAMMOX) e pertanto la necessità di creare, all'interno del reattore, le condizioni ideali per entrambi.

Questo è possibile utilizzando sistemi a biomassa adesa o fanghi granulari, in cui sono importanti i fenomeni di diffusione dell'ossigeno, e reattori che consentano elevati tempi di residenza cellulare come SBR (Sequencing Batch Reactors), gas-lift, biodischi e reattori a letto fluido. In questi sistemi la nitrificazione parziale avviene negli strati esterni del biofilm (o granuli), in cui l'ossigeno riesce a diffondere facilmente, per produrre una quantità adeguata di nitriti per la biomassa ANAMMOX, che si sviluppa e risulta attiva negli strati più interni (in cui l'ossigeno non riesce a diffondere).

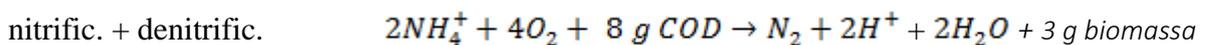
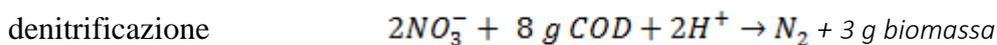
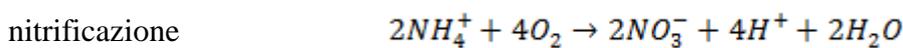
### 3.4.3 Il sistema SHARON-DENITRIFICAZIONE

Il processo SHARON può essere integrato, oltre che con il processo ANAMMOX, con il processo di denitrificazione eterotrofa convenzionale. In tal caso sarà necessaria l'ossidazione spinta dell'azoto ammoniacale a nitriti, intervenendo opportunamente sui parametri del processo SHARON, e la denitrificazione convenzionale avverrà a partire da questi, consentendo un notevole risparmio nei costi di gestione.

## 3.5 Confronto tra i sistemi di rimozione dell'azoto

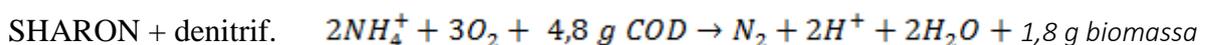
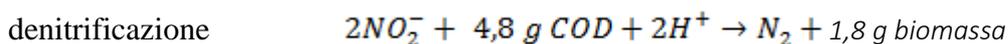
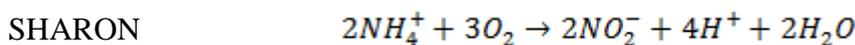
Come già ripetuto precedentemente, l'applicazione dei processi biologici innovativi rispetto a quelli convenzionali consente notevoli risparmi nei costi energetici e di gestione. Analizzando la stechiometria dei vari sistemi combinati è possibile determinare quantitativamente la loro convenienza (Van Loosdrecht, 2008).

Si osservino pertanto le reazioni del processo combinato nitrificazione-denitrificazione:



I principali costi dovuti all'applicazione di tale sistema sono legati all'insufflazione dell'ossigeno durante la fase di nitrificazione, alla necessità di sostanza organica per la fase di denitrificazione e alla produzione di fanghi di supero da trattare e smaltire.

Se si considera il sistema combinato SHARON-denitrificazione, si avranno le reazioni:



Risulta evidente come, in questo caso, il consumo di ossigeno risulta inferiore rispetto al processo di rimozione convenzionale visto che ci si ferma alla produzione dei nitriti.

Anche l'apporto di substrato organico per la fase di denitrificazione risulta inferiore rispetto al caso precedente: la riduzione dei nitrati ( $NO_3^-$ ) ad azoto gassoso è dovuta all'acquisizione di 5 elettroni da parte dell'azoto, mentre se la denitrificazione avviene a partire dai nitriti ( $NO_2^-$ ) l'azoto necessita di soli 3 elettroni.

Infine, i microrganismi crescono meno perché consumano meno sostanza organica, quindi si ha anche una minor produzione di biomassa e, di conseguenza, meno fanghi da smaltire.

Riassumendo i vantaggi di questo sistema combinato rispetto a quello convenzionale: i costi di aerazione sono ridotti del 25%, la richiesta di sostanza organica diminuisce del 40% così come la produzione di fanghi.

Nel caso del sistema combinato SHARON-ANAMMOX i risparmi aumentano. Si osservino le reazioni:



Con l'applicazione di questo sistema il risparmio nei costi di aerazione aumenta fino al 63% rispetto ai sistemi convenzionali e del 50% rispetto al sistema SHARON-denitrificazione visto che solo la metà di tutto l'azoto ammoniacale influente deve essere ossidata; inoltre si ha la totale eliminazione della fonte supplementare di sostanza organica in quanto il processo è completamente autotrofo. Anche la produzione di fanghi è notevolmente ridotta, per via del basso tasso di crescita dei microrganismi autotrofi, limitando le spese di trattamento e smaltimento.

Il processo CANON, infine, consente l'ulteriore vantaggio di richiedere minori spazi ed energia rispetto al sistema a doppio stadio. Infatti i processi monostadio hanno in genere un alto tasso volumetrico di rimozione dell'azoto e costi inferiori ai sistemi a due stadi, dal momento che l'intera rimozione dell'azoto può essere raggiunta in un reattore singolo con poca aerazione (Wyffels *et al.*, 2004). Tuttavia, Hao *et al.* (2001) e Nielsen *et al.* (2005), hanno riportato difficoltà nella regolazione dell'ossigeno disciolto e la rimozione dell'azoto è risultata incompleta.

Nel sistema a due stadi, nitrificazione parziale e processo ANAMMOX avvengono in due reattori separati, permettendo di ottenere prestazioni migliori e un processo complessivamente più stabile, dato che entrambi i processi possono essere controllati separatamente.

L'applicazione delle due unità sarebbe appropriata quando composti tossici o composti organici biodegradabili sono presenti nel refluo da trattare, in quanto questi composti possono essere degradati nella fase di nitrificazione evitando il loro ingresso nel reattore ANAMMOX (Vazquez *et al.*, 2009 e Lackner *et al.*, 2008).

Hao *et al.* (2001) e Nielsen *et al.* (2005), hanno osservato che per flussi ad alto carico di azoto i costi di investimento più alti per un sistema a due stadi (SHARON-ANAMMOX) possono essere compensati da minori costi operativi e da migliori prestazioni nella rimozione dell'azoto (Van Hulle *et al.*, 2010).

In generale, i costi dei trattamenti biologici convenzionali variano tra 2,3–4,5 € per kg di azoto rimosso, mentre l'applicazione del sistema SHARON-ANAMMOX comporta una spesa di 0,7–1,4 €/kg N. I sistemi chimico-fisici, come già detto, risultano molto più costosi: 4,5–11,3 € per kg di azoto rimosso (van Dongen *et al.*, 2001). Tra questi ultimi si vuole fare un accenno particolare al metodo di strippaggio con vapore, in quanto tale tipo di sistema è attualmente utilizzato per il trattamento del refluo reale impiegato durante l'intera sperimentazione. Il costo per la rimozione delle elevate concentrazioni di azoto è di circa 8 €/kg N, pertanto l'eventuale integrazione di tale trattamento col sistema integrato SHARON-ANAMMOX o SHARON-denitrificazione consentirebbe sicuramente un notevole abbattimento dei costi.

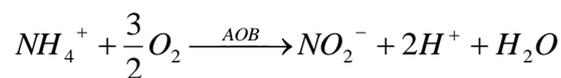
# CAPITOLO IV

## Il processo SHARON

### 4.1 Generalità e stechiometria

Il processo SHARON (Single reactor for High activity Ammonium Removal Over Nitrite) è stato sviluppato nei primi anni '90 presso la Delft University of Technology (Hellinga *et al.*, 1998; Hellinga *et al.*, 1999; Stowa, 1996).

Come già visto nel Cap. 3, par. 3.4.1, esso consiste in un processo di nitrificazione parziale, dove l'ossidazione dell'azoto ammoniacale è arrestata al primo stadio con la produzione di nitriti, secondo la reazione:



Questo risulta possibile in un sistema nel quale i batteri ammonio-ossidanti riescono a prevalere rispetto ai nitrito-ossidanti; pertanto diventa importante agire sui parametri di processo quali temperatura, HRT, SRT, pH, OD, etc., da cui essi dipendono.

Il sistema SHARON è costituito da un reattore aerato e completamente miscelato, che opera a temperatura elevata (30-40°C) senza ricircolo del fango e quindi con un tempo di ritenzione idraulica (HRT) coincidente con il tempo di ritenzione dei fanghi (SRT), pari a circa 1-2 giorni (chemostato). A tali temperature i batteri ammonio-ossidanti hanno un tasso di crescita maggiore di quello dei nitrito-ossidanti e con questi tempi di ritenzione questi ultimi sono eliminati dal sistema con il conseguente arresto dell'ossidazione dell'ammonio a nitrito (Piccinini *et al.*, 2007).

Nel paragrafo successivo si analizzerà l'influenza dei diversi parametri sul processo SHARON.

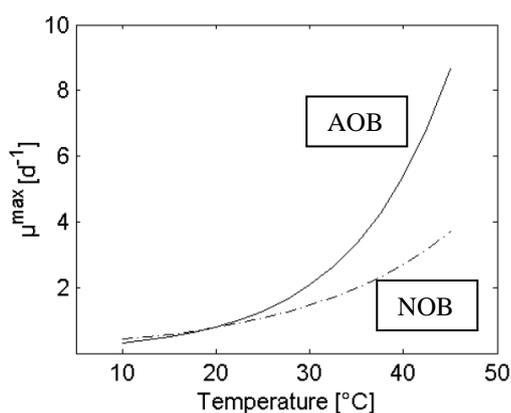
### 4.2 Parametri che influenzano il processo SHARON

Come per tutti i processi biologici, i parametri da cui dipende il processo SHARON sono diversi. Di seguito si cercherà di approfondire quelli che, influenzando la crescita dei batteri ammonio-ossidanti o l'inibizione dei nitrito-ossidanti, migliorano le prestazioni del processo

SHARON, anche in vista della sua integrazione col processo ANAMMOX o di denitrificazione.

### 4.2.1 Temperatura

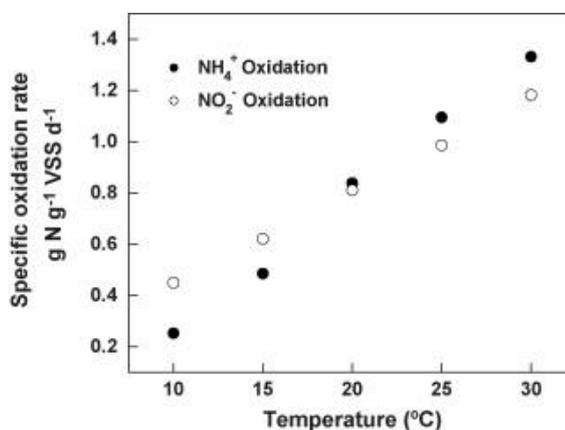
La differenza del tasso di crescita dei batteri ammonio- e nitrito-ossidanti è alla base del processo SHARON. A temperature elevate ( $> 25^{\circ}\text{C}$ ) i batteri ammonio-ossidanti crescono più velocemente i quelli nitrito-ossidanti, come si può osservare dalla Figura 4.1.



**Figura 4.1:** Influenza della temperatura sul tasso di crescita massimo dei batteri ammonio e nitrito ossidanti.

L'influenza esatta della temperatura risulta tuttavia difficile da determinare a causa della sua interazione con il trasferimento di massa, con gli equilibri chimici e con il tasso di crescita.

Kim *et al.* (2008) hanno studiato la variazione del tasso di ossidazione dell'ammonio e del nitrito in un range di temperatura compreso tra 10 e  $30^{\circ}\text{C}$ , usando ammonio e nitriti come fonte di azoto (Figura 4.2): è stato riscontrato un maggiore incremento del tasso di ossidazione dell'ammonio rispetto al nitrito all'aumentare della temperatura. Tale incremento è risultato essere indipendente dalla concentrazione iniziale di ammoniacca.



**Figura 4.2:** Tasso di ossidazione dell'ammonio (●) e dei nitriti (○) in funzione della temperatura.

L'aumento della temperatura comporta una maggiore attività dei microrganismi: secondo la legge di Arrhenius, la relazione tra la velocità di reazione e la temperatura risulta:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

dove: k = costante di velocità;  
 $E_a$  = energia di attivazione;  
 R = costante dei gas;  
 T = temperatura [K];  
 A = fattore pre-esponenziale;

In letteratura si trovano valori di energia di attivazione nel range 72-60 kJ/mol per i batteri ammonio-ossidanti e 43-47 kJ/mol per i nitrito-ossidanti, determinati in un intervallo di temperatura variabile tra 7 e 30°C. Questo indica che all'aumentare della temperatura l'attività degli ammonio-ossidanti aumenta più velocemente dell'attività dei nitriti-ossidanti.

Tale aumento di attività si osserva fino ad una certa temperatura critica, oltre la quale l'attività biologica si riduce di nuovo: l'esposizione prolungata a temperature superiori a 40°C porterebbe infatti alla disattivazione (blocco metabolico).

Secondo van Hulle *et al.* (2007), le temperature ottimali per i batteri ammonio-ossidanti, dunque per una nitrificazione parziale, risultano quelle comprese tra 35 e 45°C, anche se sono stati valutati solo gli effetti a breve termine.

Il processo SHARON è stato comunque applicato a temperature inferiori (15-30°C) e i risultati positivi ottenuti dimostrano che potrebbe essere in seguito applicato anche a reflui caratterizzati da temperature più basse. Bisogna comunque ricordare che le prestazioni del processo diminuiscono notevolmente al di sotto dei 15°C.

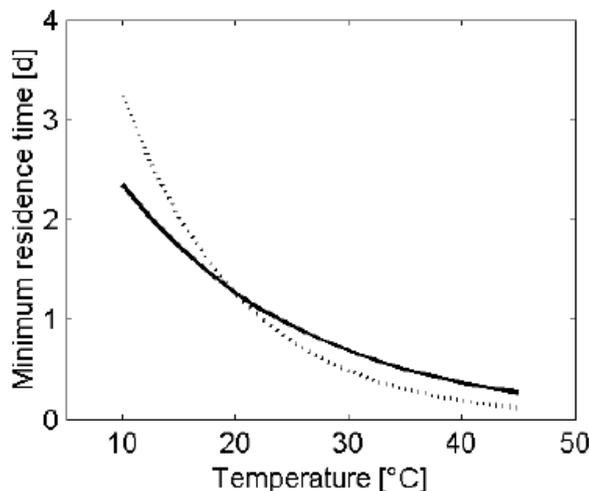
#### 4.2.2 Età del fango

L'espulsione dal sistema dei batteri nitrito-ossidanti può essere ottenuta grazie al diverso valore dell'età del fango minima necessaria alla crescita di questi rispetto agli ammonio-ossidanti. Il tempo minimo di residenza cellulare è legato al tasso massimo di crescita dei microrganismi secondo la relazione:

$$\theta_{c_{min}} = \frac{1}{\mu_{max} - k_d}$$

dove  $k_d$  è il tasso di decadimento dei microrganismi.

Pertanto anche  $\theta_{c_{min}}$  dipende dalla temperatura, come si può osservare dalla Figura 4.3, e, al di sopra dei 20-25 °C, è possibile eliminare dal sistema i nitrito-ossidanti e mantenere gli ammonio-ossidanti agendo opportunamente sul suo valore.



**Figura 4.3:** Effetto della temperatura sul tempo minimo di residenza cellulare dei batteri ammonio-ossidanti (linea tratteggiata) e nitrito-ossidanti (linea continua).

La strategia principale per inibire i batteri nitrito-ossidanti e favorire lo sviluppo degli ammonio-ossidanti, in modo tale da ottenere una nitrificazione parziale, è proprio quella di combinare questi due parametri.

A temperature di 25-35 °C in un reattore senza ricircolo di biomassa (chemostato), si può operare con una bassa età del fango (1-1,5 d), in modo da dilavare gli NOB e trattenere solo gli AOB (Malpei *et al.*, 2008).

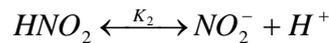
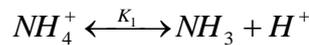
### 4.2.3 Ossigeno disciolto

L'ossigeno disciolto è un parametro fondamentale per il processo SHARON e può inoltre essere utilizzato per la selezione della biomassa ammonio-ossidante. La concentrazione di OD influenza sia gli AOB che gli NOB, anche se i batteri ammonio-ossidanti sembrano risentire meno di basse concentrazioni di OD e un accumulo di nitriti in tali condizioni potrebbe essere spiegato con i differenti valori della costante di semisaturazione per i due tipi di biomasse. Secondo quanto riportato da van Hulle (2010), per i *Nitrosomonas europaea*, per esempio, essa vale 0,16 mgO<sub>2</sub>/l, mentre nel caso dei *Nitrobacter agilis* risulta 0,54 mgO<sub>2</sub>/l, anche se in generale in letteratura questi valori variano rispettivamente tra 0,25-0,5 mgO<sub>2</sub>/l e 0,34-2,5 mgO<sub>2</sub>/l. Questa variabilità nei valori può essere dovuta ad una variazione del trasporto di

massa dell'ossigeno nei reattori. La costante di semisaturazione infatti dipende dalla densità della biomassa, dalla dimensione del fiocco, dall'intensità di miscelazione e dalla velocità di diffusione dell'ossigeno nel fiocco (Van Hulle *et al.*, 2010). E' comunque riscontrato che la velocità di reazione si riduce notevolmente se OD è inferiore a 1 mg/l e cessa per valori di OD minori di 0,2 mg/l.

#### 4.2.4 Ammoniaca libera e acido nitroso

Le concentrazioni di ammoniaca libera ( $NH_3$ ) e acido nitroso ( $HNO_2$ ) hanno un effetto determinante sul processo SHARON e proprio queste forme dell'azoto risultano essere l'effettivo substrato e inibitore per l'ossidazione di ammonio e nitriti. Le reazioni che esprimono l'equilibrio chimico per l'ammoniaca libera e l'acido nitroso risultano:



Considerando la concentrazione di azoto ammoniacale totale (TAN, Total Ammonium Nitrogen)  $TAN = NH_3 + NH_4^+$  e la costante di equilibrio  $K_1 = \frac{NH_3 \cdot H^+}{NH_4^+}$ , la concentrazione di ammoniaca libera può essere così calcolata:

$$C_{NH_3} = \frac{C_{TAN}}{1 + \frac{10^{-pH}}{K_1}}$$

Per quanto riguarda l'azoto nitroso, se si considera la concentrazione totale  $TNO_2 = NO_2^- + HNO_2$  e la costante di equilibrio  $K_2 = \frac{NH_2^- \cdot H^+}{HNO_2}$ , la concentrazione presente sotto forma di acido nitroso risulta:

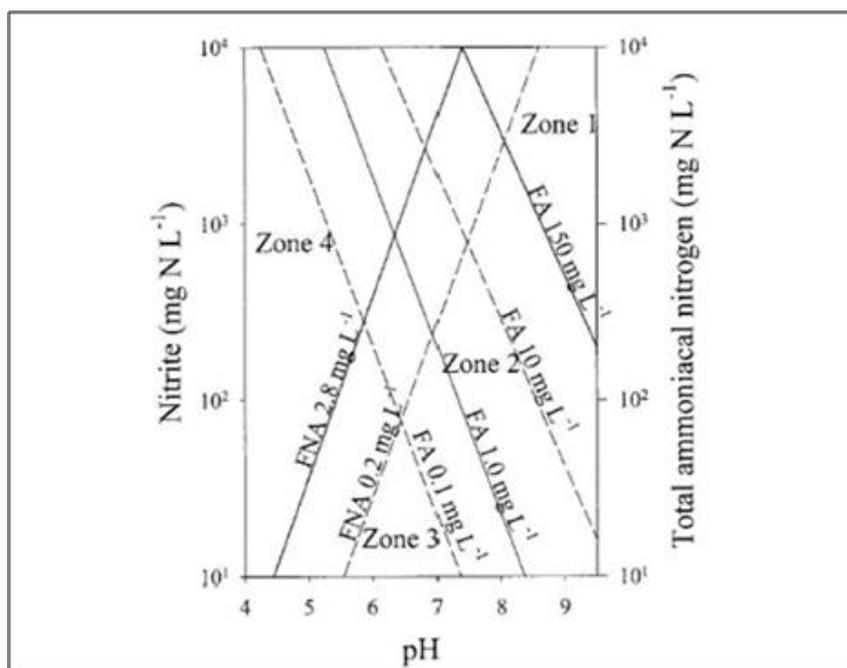
$$C_{HNO_2} = \frac{C_{TNO_2}}{1 + \frac{K_2}{10^{-pH}}}$$

I valori delle costanti di equilibrio possono essere determinati in funzione della temperatura, espressa in Kelvin (Anthonisen *et al.*, 1976).

$$K_1 = e^{\frac{-6344}{T+273}}$$

$$K_2 = e^{\frac{-2300}{T+273}}$$

La Figura 3.1 mostra la relazione tra le concentrazioni di ammoniaca libera e acido nitroso, espresse rispettivamente in funzione di TAN e TNO<sub>2</sub>, e il pH (Anthonisen *et al.*, 1976).



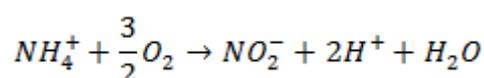
**Figura 3.1:** Rapporto tra le concentrazioni di ammoniaca libera (FA) e acido nitroso libero (FNA) e inibizione dei batteri nitrificanti in condizioni ambiente. Le linee tratteggiate segnano il limite inferiore e le linee continue segnano il limite superiore del range di condizioni al contorno delle zone di inibizione della nitrificazione (Anthonisen *et al.*, 1976).

Nel grafico si vengono a determinare delle zone che identificano le condizioni per le quali la nitrificazione risulta inibita. Nella Zona 1 ( $\text{NH}_3 > 10\text{--}150 \text{ mgN-NH}_3/\text{l}$ ) le elevate concentrazioni di ammoniaca libera inibiscono i batteri nitrificanti, mentre nella Zona 2 ( $0,1\text{--}1,0 \text{ mgN-NH}_3/\text{l} < \text{NH}_3 < 10\text{--}150 \text{ mgN-NH}_3/\text{l}$ ) l'ammoniaca presente risulta inibente solo per i nitrito-ossidanti. La zona 3 ( $\text{NH}_3 < 0,1\text{--}1,0 \text{ mgN-NH}_3/\text{l}$  and  $\text{HNO}_2 < 0,2\text{--}2,8 \text{ mgN-HNO}_2/\text{l}$ ) individua le condizioni ideali per una completa nitrificazione, mentre nella Zona 4 ( $\text{HNO}_2 > 0,2\text{--}2,8 \text{ mgN-HNO}_2/\text{l}$ ) i batteri nitrito-ossidanti sono inibiti dalle alte concentrazioni di  $\text{HNO}_2$ . Risulta evidente l'importanza del pH, vista la stretta correlazione tra questo e le concentrazioni di ammoniaca libera e acido nitroso. Per elevati valori di pH ( $>8$ ) l'azoto ammoniacale è principalmente sotto forma di ammoniaca libera mentre, per pH inferiori a 7,5, l'azoto nitroso è il principale inibitore.

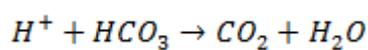
Secondo quanto riportato da van Hulle *et al.* (2007), nel processo SHARON l'ammoniaca è l'effettivo substrato per i batteri ammonio-ossidanti che risultano inibiti solo quando questa è presente in concentrazioni molto elevate. Il vero inibitore sembrerebbe essere invece l'acido nitroso, per cui è stato determinato un valore di inibizione pari a 2,04 mgN-HNO<sub>2</sub>/l, indipendente da pH e temperatura.

#### 4.2.5 Carbonio inorganico

Durante il processo SHARON, per ogni mole di azoto ammoniacale ossidata vengono prodotte due moli di acidità, secondo l'equazione:



Questa produzione di idrogeno porta ad una significativa diminuzione del pH e di conseguenza ad un arresto della nitrificazione, in particolare con i flussi altamente carichi di azoto che sono generalmente trattati con il reattore SHARON. Tuttavia, normalmente, tali reflui contengono anche bicarbonato, che viene strappato in forma di CO<sub>2</sub>:



Nel caso in cui l'influente al processo SHARON abbia un rapporto molare C/N di 1:1, i protoni prodotti durante l'ossidazione della metà dell'azoto ammoniacale totale sono pari a quelli consumati dallo stripping dell'anidride carbonica. Quindi, l'ossidazione dell'azoto ammoniacale si ferma al 50% a causa dell'eccessiva acidificazione, producendo un effluente particolarmente adatto al processo ANAMMOX. Pertanto, il rapporto C/N influente rappresenta un parametro fondamentale per controllare il rapporto N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nell'effluente in vista del trattamento successivo.

#### 4.2.6 pH

L'influenza del pH sul processo di nitrificazione è già stata discussa nel Cap.3, par.3.3.1.3. Per quanto riguarda i batteri ammonio-ossidanti e nitrito-ossidanti, il range di pH ottimale è lo stesso per entrambe le popolazioni e risulta compreso tra 7 e 8. Ciò è dovuto sicuramente al fatto che il pH influisce sugli equilibri NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> e HNO<sub>2</sub>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

La preferenza degli ammonio-ossidanti per ambienti leggermente alcalini è data probabilmente dal fatto che questi organismi usano l'ammoniaca come substrato (Suzuki *et*

*al.*, 1974), mentre a determinati valori di pH l'ammoniaca e l'acido nitroso risultano avere effetti inibenti.

Sono stati osservati anche degli effetti diretti del pH sulla crescita dei microrganismi. Hellinga *et al.* (1998), hanno osservato una riduzione del tasso di crescita dei nitrito-ossidanti per pH 7, rispetto a quello osservato a pH 8, mentre la variazione del tasso di crescita degli ammonio-ossidanti per questi valori di pH è trascurabile.

Per pH inferiori a 7, il tasso di nitrificazione tende a diminuire in conseguenza alla limitazione del carbonio per via dello strippaggio di CO<sub>2</sub>.

#### 4.2.7 Altri inibitori

Basse concentrazioni di fosfato (<0,2 mgP/l ) potrebbero inibire l'ossidazione dei nitriti. La costante di semisaturazione dei fosfati per gli NOB è infatti di circa un ordine di grandezza superiore a quello degli AOB (0,2 mgP/l per nitrito-ossidanti e 0,03 mgP/l per ammonio-ossidanti) e pertanto, i nitrito-ossidanti non sono in grado di ossidare il nitrito a nitrato in assenza di fosfati (Van Hulle *et al.*, 2010).

Tra i composti organici che contribuiscono a ridurre il tasso specifico di nitrificazione, e in particolare l'attività dei batteri ammonio-ossidanti, si trovano benzene, toluene e xilene (Zepeda *et al.*, 2006). I metalli pesanti come cromo, nichel, rame, zinco, piombo e cadmio, invece potrebbero inibire entrambi gli stadi del processo di nitrificazione, ma in maniera differente in funzione della concentrazione. L'attività dei nitrito-ossidanti risulta inoltre inibita dall'acido formico, acetico, propionico e n-butirrico (Eilersen *et al.*, 1994) e dal bromuro dei disinfettanti ed il clorito (Peng *et al.*, 2004). Tomlinson *et al.* (1966) hanno inoltre verificato che clorato, cianuro e idrazina sono maggiormente inibenti per i nitrito-ossidanti che per gli ammonio-ossidanti.

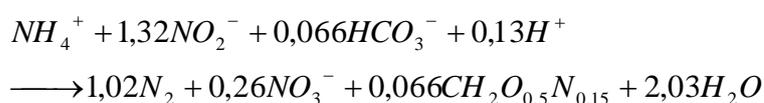
Molti reflui industriali ad alto tenore di azoto ammoniacale, potrebbero essere caratterizzati anche dalla presenza di sali in concentrazioni elevate. Diverse prove, eseguite sia in batch che in continuo, hanno mostrato che la biomassa SHARON risulta attiva anche a concentrazioni elevate di NaCl (rispettivamente 100mM e 427 mM). Le diverse concentrazioni sono probabilmente dovute ad un differente adattamento dei microrganismi agli ambienti salini (van Hulle, 2010).

# CAPITOLO V

## Il processo ANAMMOX

### 5.1 Generalità e stechiometria

Nel processo ANAMMOX (ANAerobic AMMonium OXidation) l'azoto ammoniacale è ossidato ad azoto gassoso in assenza di ossigeno molecolare, con il nitrito come accettore di elettroni. La scoperta di questo processo risale ai primi anni '90, quando Mulder *et al.* (1995) ne osservarono gli effetti in un impianto pilota di denitrificazione. In realtà, già vent'anni prima Broda (1977) ne aveva postulato l'esistenza sulla base di considerazioni termodinamiche. Nel 1995 Van de Graaf *et al.* dimostrarono attraverso una serie di prove di inibizione che l'ANAMMOX era effettivamente un processo biologico e non chimico e successivamente, attraverso bilanci di massa su diverse colture ANAMMOX, Strous *et al.* (1998) identificarono la stechiometria della reazione completa:



Dalla reazione risulta in effetti che il nitrito, oltre ad essere utilizzato come accettore di elettroni, è in parte ossidato a nitrato fornendo in tal modo gli elettroni necessari per la fissazione del carbonio.

Studi sul percorso metabolico del processo hanno proposto diverse vie per l'ossidazione dell'ammonio ad azoto gassoso con la produzione di alcuni importanti prodotti intermedi.

Una prima ipotesi prevede la riduzione parziale del nitrito con formazione di idrossilammina (NH<sub>2</sub>OH), la quale reagisce ulteriormente con l'ammonio per formare idrazina (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>). L'idrazina viene infine convertita in azoto gassoso (van de Graaf *et al.*, 1997). Kartal *et al.* (2011) hanno invece dimostrato che il nitrito è dapprima ridotto ad NO. Questo a sua volta reagisce con l'ammonio per produrre idrazina che è infine ossidata ad azoto gassoso.

Il processo risulta comunque essere completamente autotrofo e in quanto tale non richiede alcun apporto esterno di sostanza organica. La necessità di avere i nitriti disponibili per la reazione rende il processo ANAMMOX utilizzabile in due configurazioni impiantistiche differenti. I nitriti possono infatti essere prodotti in un reattore aerato separato e successivamente forniti al reattore anossico ANAMMOX (sistema a doppio stadio SHARON-

ANAMMOX) oppure prodotti in un sistema a stadio singolo in condizioni limitate di ossigeno (CANON).

Attualmente il processo di rimozione autotrofa dell'azoto è applicato a scala reale in circa 40 impianti per il trattamento di diversi reflui civili e industriali ricchi di azoto. Di questi solo quattro sono implementati con il sistema a doppio stadio (Hu *et al.*, 2013). L'applicazione industriale dipende notevolmente dal tipo di refluo e deve essere valutata attentamente in quanto molte caratteristiche quali concentrazione di nitriti e ammonio, metalli pesanti, COD, pH, salinità, temperatura, etc., potrebbero incidere negativamente sulla stabilità del processo.

## 5.2 Aspetti microbiologici

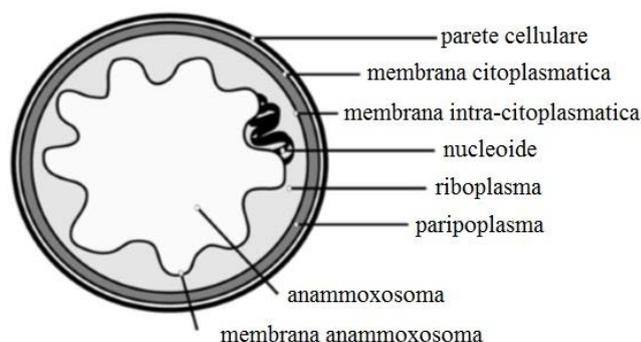
Il processo ANAMMOX avviene ad opera di una specie batterica appartenente alla famiglia dei *Planctomyceti* ed in particolare all'ordine monofiletico *Brocadiales*. Sono stati individuati cinque generi differenti: *Candidatus Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindua*, *Anammoxoglobus* e *Jettenia* (Jetten *et al.*, 2010), le cui varie specie sono ben identificabili attraverso analisi microscopiche FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) (Tabella 5.1).

**Tabella 3.1** Biodiversità delle specie batteriche ANAMMOX (Van Hulle, 2010)

Genere	Specie	Fonte
<i>Brocadia</i>	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i>	Acque reflue
	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	Acque reflue
<i>Kuenenia</i>	<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	Acque reflue
<i>Scalindua</i>	<i>Candidatus Scalindua brodae</i>	Acque reflue
	<i>Candidatus Scalindua wagneri</i>	Acque reflue
	<i>Candidatus Scalindua sorokinii</i>	Ambiente marino
	<i>Candidatus Scalindua arabica</i>	Ambiente marino
<i>Jettenia</i>	<i>Candidatus Jettenia asiatica</i>	Non riportata
<i>Anammoxoglobus</i>	<i>Candidatus Anammoxoglobus propionicus</i>	Acque reflue

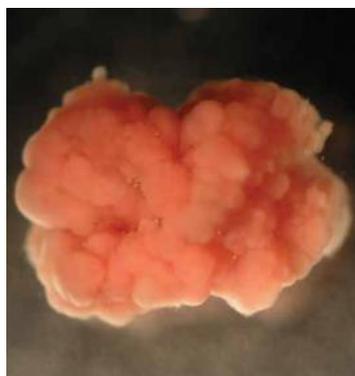
Secondo Schmid *et al.* (2003) raramente sono presenti diversi ceppi di batteri ANAMMOX all'interno dello stesso impianto di trattamento delle acque reflue; è più probabile che ognuna di tali specie si sviluppi individualmente, selezionata in base alle differenti condizioni ambientali. Tuttavia Furukawa *et al.* (2006) trovarono due diversi generi di batteri ANAMMOX in un impianto di laboratorio nel quale si svolgevano le reazioni di nitrificazione parziale e processo ANAMMOX.

I *Planctomyceti* si distinguono dagli altri batteri per la particolare struttura cellulare che risulta compartimentata dalla presenza di membrane intra-citoplasmatiche. In alcuni casi questa risulta più complessa, ma la presenza di una membrana intra-citoplasmatica definisce sempre un compartimento cellulare principale. La membrana intra-citoplasmatica divide la cellula in due compartimenti: il “pariplasma”, più esterno e compreso tra le membrane citoplasmatica e intra-citoplasmatica, e il “riboplasma” che contiene i ribosomi e il nucleotide. Nei batteri ANAMMOX, il riboplasma racchiude a sua volta un'altra membrana, detta “anammoxosoma”, la quale determina un altro compartimento cellulare che prende il nome dalla membrana stessa (Figura 5.1). La reazione ANAMMOX avviene proprio all'interno dell'anammoxosoma che occupa gran parte del volume cellulare (van Niftrik & Jetten, 2014).



**Figura 5.1:** Struttura cellulare dei batteri ANAMMOX.

Un'altra particolare caratteristica che contraddistingue i batteri ANAMMOX è il loro colorito bruno-rossastro, probabilmente dovuto all'elevato contenuto di citocromi (Figura 5.2).



**Figura 5.2:** Biomassa ANAMMOX in forma granulare.

Le colture arricchite hanno un contenuto di batteri ANAMMOX tra l'80% e il 95%, presenti come aggregati o come singole cellule e cresciuti in bioreattori in grado di garantire elevati tempi di ritenzione. Il loro tempo estremamente lungo di raddoppiamento è uno dei motivi per cui non possono essere coltivati con i metodi standard di coltivazione microbica: in condizioni ottimali esso risulta pari a 7 giorni per le singole cellule o 14 giorni nel caso di aggregati cellulari (van Niftrik & Jetten, 2014). In letteratura si trovano a proposito pareri discordanti: secondo alcuni ricercatori il tempo di raddoppiamento è invece di 30 giorni (Van de Graaf *et al.*, 1996); altri ritengono che questo sia di 11 giorni, con un corrispondente tasso massimo di crescita di  $0,0027 \text{ h}^{-1}$  (Strous *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 2003); mentre altri ancora affermano che tale tempo sia al massimo di  $5,5 \div 7,5$  giorni (van der Star, 2008). Isaka *et al.*, (2006) hanno affermato di aver ottimizzato le condizioni operative in modo tale da raggiungere tempi di raddoppiamento di 1,8 giorni. Per quanto riguarda il rendimento di crescita cellulare, Van Hulle *et al.* (2010), in accordo con Schmid *et al.* (2003), ritengono che esso sia di  $0,13 \text{ gSSV/gNH}_3\text{-N}$  ossidato (2010, 2003), mentre per Trigo *et al.* (2006) tale rendimento di crescita risulta essere di  $0,088 \text{ gSSV/gNH}_3\text{-N}$  ossidato, con un tasso massimo di crescita di  $0,072 \text{ d}^{-1}$ . Tale diversità di opinioni potrebbe dipendere dal metodo di misura del tasso di crescita: Isaka *et al.* (2006) si basano sulla conta batterica, mentre gli altri studi si affidano al calcolo del rendimento di crescita cellulare e del tasso di rimozione dell'azoto. Indipendentemente dalla discordanza di dati, il tasso di crescita della biomassa ANAMMOX è abbastanza basso da richiedere lunghi tempi di start-up (fino a un anno) se non è disponibile un inoculo sufficiente (Trigo *et al.*, 2006).

## 5.3 Fattori influenti sul processo

### 5.3.1 Concentrazione di nitriti e azoto ammoniacale

I batteri ANAMMOX potrebbero risentire di elevate concentrazioni di nitriti e azoto ammoniacale, nonostante questi siano i substrati da essi utilizzati. In particolare, la concentrazione di nitrito è un fondamentale parametro di controllo del processo, in quanto determinate concentrazioni di  $\text{NO}_2^-$  all'interno del reattore risultano avere effetti inibitori sull'attività della biomassa. Per quanto riguarda i valori che determinano l'inibizione, gli studi finora effettuati mostrano risultati differenti. Strous *et al.* (1999) sostengono che concentrazioni di  $100 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{l}$  sono in grado di inibire completamente il processo, ma questa inibizione risulta reversibile anche dopo un'esposizione prolungata e l'aggiunta di

elementi in tracce, quali idrazina e idrossilammina, ripristinerebbe più rapidamente l'attività batterica. Secondo Fux (2003) mantenere una concentrazione di 40 mg/l per alcuni giorni porta a un'inibizione irreversibile della biomassa ANAMMOX. Studi più recenti sugli effetti inibitori del nitrito sull'attività ANAMMOX, mostrano che concentrazioni di 350 mg/l comportano un'inibizione del 50% della biomassa e suggeriscono che questa inibizione sia dovuta anche al tempo di esposizione (Dapena-Mora *et al.*, 2007); mentre Ni *et al.* (2010) sostengono che concentrazioni superiori a 100 mg/l causano il completo blocco della reazione. Infine, Lotti *et al.* (2011) sostengono che anche dopo un'esposizione di 24 ore alla concentrazione di 1000 mg/l, l'attività della biomassa non risulta compromessa e l'inibizione è reversibile. Inoltre, la biomassa coltivata a basse concentrazioni di nitrito (<1 mgN/l, Wett 2007) risulta essere più sensibile agli accumuli transitori di nitrito rispetto a colture acclimatate ad elevate concentrazioni, la cui attività non risulta compromessa e consente operazioni stabili a lungo termine, anche a concentrazioni considerate tossiche (Lotti *et al.*, 2012).

Sembra inoltre che le diverse specie batteriche abbiano una diversa tolleranza al nitrito: Egli *et al.* (2001) condussero esperimenti sul *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* dimostrando che l'inibizione di tale specie si aveva per concentrazioni di nitrito superiori a 182 mg/l; Strous osservò l'inibizione sulla specie *Candidatus Brocardia anammoxidans*. Egli notò anche che l'aumento della concentrazione di nitrito all'interno del reattore causava una modifica nella stechiometria della reazione, incrementando il rapporto nitriti/ammonio dal valore di 1,3 (alla concentrazione di 140 mgN/l) a quasi 4 (alla concentrazione di 700 mgN/l), e concludendo che in tali condizioni i microrganismi non usavano solo l'ammonio come donatore di elettroni ma anche un donatore di elettroni interno generato per ridurre il nitrito. Dosta *et al.* (2008) osservarono una variazione della stechiometria al variare della temperatura: rilevarono un rapporto  $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$  pari a 1,38 alla temperatura di 30°C, mentre osservarono una diminuzione del rapporto a 1,05 a 18°C.

La concentrazione di azoto ammoniacale invece non ha effetti inibitori sul processo ANAMMOX come la concentrazione di nitrito: Strous *et al.* (1999) sostengono che lunghe esposizioni (oltre una settimana) alla concentrazione di 980 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l non abbiano effetti negativi sulla biomassa ANAMMOX. Invece esperimenti condotti da Fernandez *et al.* (2012) dimostrano che la biomassa ANAMMOX potrebbe essere inibita dalla presenza di ammoniaca libera anche a concentrazioni molto basse (20-25 mgN-NH<sub>3</sub>/l).

### 5.3.2 Fosfati e solfuri

Anche per quanto riguarda la concentrazione di fosfati, i batteri ANAMMOX mostrano una tolleranza variabile a seconda della specie. *Candidatus Brocardia anammoxidans*, che rallenta la sua attività per concentrazioni di fosfati superiori a 155 mg/l (van de Graaf *et al.*, 1996) risulta essere più sensibile della *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (Egli *et al.*, 2001), per la quale non si osservano effetti inibitori fino a concentrazioni pari a 620 mgP/l. Tuttavia alla stessa concentrazione, Dapena-Mora *et al.* (2007) hanno osservato un'inibizione dell'attività ANAMMOX del 50%. Anche Pynaert *et al.* (2003) hanno osservato, attraverso prove batch, l'inibizione della specie *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* a basse concentrazioni di fosfati: una diminuzione del 63% dell'attività alla concentrazione di 55 mg P/l, un'ulteriore decremento del 20% a 110 mg P/l, fino a una stabilizzazione a 285 mg P/l (80% di inibizione).

Anche i solfuri possono causare l'inibizione della biomassa ANAMMOX: i valori di concentrazione per cui questo si verifica sono tuttavia molto variabili in base alla letteratura: Dapena-Mora *et al.* (2007) sostengono che a concentrazioni molto basse (9,6 mgS/l) si ha un'inibizione del 50%, mentre van de Graaf *et al.* (1996), attraverso esperimenti effettuati sia in reattori batch che CSTR, hanno dimostrato una resistenza della biomassa anche per valori di concentrazione di solfuri pari a 64 mg/l. Questa differenza può essere tuttavia attribuita all'aggiunta di nitrato negli esperimenti di van de Graaf *et al.* (1996): la riduzione di questo a nitrito infatti è energeticamente più conveniente per i batteri che lo preferiscono al solfato come accettore di elettroni.

### 5.3.3 Ossigeno disciolto

I batteri ANAMMOX sono strettamente anaerobi, pertanto l'ossigeno disciolto (OD) risulta un importante parametro operativo da tenere sotto controllo per il processo. L'inibizione dovuta a basse concentrazioni di ossigeno risulta comunque reversibile. Egli *et al.* (2001) sostengono che l'ossigeno risulti inibente se presente in basse concentrazioni (0,25÷2 % del valore di saturazione), ma che tale inibizione diventa probabilmente irreversibile a elevati valori di OD (>18% del valore di saturazione). Tuttavia, Hu *et al.* (2010) ritengono che l'attività ANAMMOX possa essere recuperata anche dopo una prolungata esposizione a condizioni completamente aerobiche (OD > 8 mgO<sub>2</sub>/l).

Ad ogni modo, eccessive concentrazioni di ossigeno potrebbero consentire la crescita di batteri nitrito ossidanti che potrebbero competere con i batteri ANAMMOX per i nitriti e con i batteri ammonio ossidanti per l'ossigeno (nel processo CANON), facendo collassare l'intero sistema.

### 5.3.4 Carbonio organico

I reflui solitamente depurati mediante il processo ANAMMOX, come percolato da discarica e reflui provenienti da digestione anaerobica, sono caratterizzati oltre che da elevate concentrazioni di azoto anche da un alto contenuto di COD. Durante la digestione anaerobica il COD rapidamente biodegradabile è convertito a biogas, pertanto il COD presente in tali reflui sarà quello lentamente biodegradabile. I batteri ANAMMOX non necessitano di carbonio organico per la loro crescita, tuttavia il COD disponibile potrebbe consentire la crescita della biomassa eterotrofa denitrificante e comportare una competizione tra questa e la biomassa ANAMMOX per l'utilizzo dei nitriti come accettore di elettroni. E' stata infatti riscontrata la possibilità di una coesistenza delle due popolazioni batteriche (Ruscalleda *et al.*, 2008). Diversi studi effettuati affermano che la presenza di sostanza organica avrebbe effetti negativi sullo sviluppo della biomassa ANAMMOX: ad elevate concentrazioni di COD gli ANAMMOX non sono più in grado di competere con i batteri denitrificanti per i nitriti. Ciò è probabilmente dovuto al tasso di crescita che risulta maggiore per i denitrificanti in tali condizioni. Inoltre la reazione di denitrificazione è termodinamicamente più conveniente rispetto alla reazione ANAMMOX, oltre al fatto che, in caso di presenza simultanea di carbonio organico, ammonio e nitrito, i batteri eterotrofi denitrificanti crescerebbero più velocemente prevaricando la biomassa ANAMMOX. I dati riguardo il valore di concentrazione inibente per la biomassa ANAMMOX disponibili in letteratura sono tuttavia discordanti: Güven *et al.* (2005) sostengono che i batteri ANAMMOX non riescono più a competere con gli eterotrofi denitrificanti per valori del rapporto C/N superiori a 1, mentre secondo Chamchoi *et al.* (2008) tale rapporto risulta essere maggiore di 2 (o comunque la concentrazione di carbonio organico che risulterebbe inibente sarebbe pari a 300 mg COD/l); ancora Molinuevo *et al.* (2009) osservarono una completa inibizione del processo a concentrazioni superiori a 292 mgCOD/l; infine Tang *et al.* (2010) sostengono che i denitrificanti risultano dominanti con rapporto COD/NO<sub>2</sub> influente pari a 2,9.

La coesistenza della biomassa ANAMMOX e denitrificante potrebbe essere valutata al fine di ridurre la concentrazione di nitrato nell'effluente, dovuta alla reazione ANAMMOX: i batteri

denitrificanti opererebbero la riduzione del nitrato a nitrito, il quale sarebbe così disponibile per essere utilizzato dalla biomassa ANAMMOX per l'ossidazione dell'ammonio. Diventa però importante evidenziare l'effetto inibitorio del metanolo sull'attività della biomassa ANAMMOX, anche a basse concentrazioni (15 mg/l), in quanto questo composto viene solitamente utilizzato come substrato esterno per la biomassa denitrificante. Tale inibizione potrebbe essere probabilmente attribuita alla formazione di formaldeide durante il processo da parte dell'enzima *idrossilammia ossidoriduttasi* (Güven *et al.*, 2005; Paredes *et al.*, 2007).

Altri substrati organici tuttavia non risultano avere un effetto negativo sulla biomassa ANAMMOX: recenti studi hanno dimostrato che *Candidatus Brocadia fulgida* e *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* sono in grado di ossidare l'acetato e il propionato rispettivamente (Kartal *et al.*, 2007). Anche Güven *et al.* (2005) hanno mostrato come, utilizzando nitrato o nitrito come accettore di elettroni, la biomassa ANAMMOX sia in grado di ossidare contemporaneamente il propionato e l'ammonio. In queste condizioni la biomassa ANAMMOX si dimostra in grado di competere coi batteri denitrificanti per il propionato.

Van de Graaf *et al.* (1996), attraverso prove batch, hanno dimostrato che alcuni tipi di carbonio come acetato e glucosio hanno un effetto positivo sulla biomassa ANAMMOX; tuttavia gli esperimenti in continuo con acetato, glucosio e formiato hanno evidenziato un'inibizione dell'attività della biomassa. Dapena-mora *et al.* (2002) affermano invece che concentrazioni fino a 10 mM di acetato non risultano inibenti per il processo ANAMMOX, mentre una concentrazioni di 50mM ha comportato l'inibizione del 70%.

Altri tipi di carbonio organico su cui vertono gli studi sul processo ANAMMOX, vista la sua sensibilità e la fragilità degli omonimi batteri, riguardano i composti tossici: Toh e Osbolt (2002) e Toh *et al.* (2002) hanno osservato una certa acclimatazione della biomassa ANAMMOX nei confronti di un refluo sintetico contenente alte concentrazioni di COD (2000÷2500 mg/l), fenoli (concentrazione di 300÷800 mg/l), cianuri (10÷90 mg/l) e tiocianati (300÷500 mg/l), presenti, in un effluente sintetico contenente un'elevata concentrazione di sostanza organica (2000÷2500 mg COD/l).

### 5.3.5 Temperatura e pH

Numerosi autori hanno riscontrato che la temperatura ottimale per il processo ANAMMOX sia di 30÷40°C. Dosta *et al.* (2008) osservarono a una temperatura di 45°C un crollo irreversibile dell'attività dei batteri dovuto alla lisi cellulare. La temperatura ottimale sembra vari anche in funzione della specie osservata: La massima attività è stata raggiunta a 40°C

dalla *Candidatus Kueneia struttgartiensis* e a 37°C, al pH ottimale di 8, dalla *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Tuttavia Cema *et al.* (2007) e Isaka *et al.* (2006) dimostrarono che il processo ANAMMOX in un reattore a biodischi e in un biofiltro anaerobico (ABF, Anaerobic Biological Filtrated reactor) poteva essere condotto con successo ad una temperatura operativa di 20°C, sebbene fu osservato un forte decremento del tasso di conversione dell'ammonio. L'elevato tasso di conversione dell'ammonio (8,1 kg N/m<sup>3</sup>·d) fu raggiunto grazie alla riduzione del tempo di residenza idraulico e all'utilizzo di una concentrazione non-inibente di nitrito nell'influente.

Operare a temperature basse conseguendo elevati livelli di efficienza del processo è possibile adottando pertanto un'opportuna strategia di start-up del reattore: dopo aver acclimatato la biomassa in un apposito reattore operante a una temperatura prossima a quella ottimale, questa può essere gradualmente sottoposta a temperature inferiori nello stesso reattore, per passare infine al reattore che sarà utilizzato per lo studio del processo (Dosta *et al.*, 2008).

In natura sono state osservate anche temperature più basse, tuttavia il tasso di conversione dell'ammonio in questi casi si mantiene basso. Attualmente risultano comunque in corso di studio sperimentazioni per l'ottimizzazione del processo ANAMMOX (sia nel sistema a doppio stadio SHARON-ANAMMOX, che nel sistema a stadio singolo CANON) a temperature inferiori (fino a 10°C), al fine di valutare la possibile applicazione a reflui civili in Paesi aventi tali temperature durante il periodo invernale (es. Olanda).

Per quanto riguarda il pH, l'intervallo nel quale avviene il processo è 6,7÷8,3, con un valore ottimale di 8,0 (Strous *et al.*, 1999).

### 5.3.6 Concentrazione della biomassa

La concentrazione della biomassa è un parametro fondamentale per l'attività ANAMMOX. Numerosi studi hanno dimostrato che esiste un'attività batterica significativa solo per valori di concentrazione cellulare della biomassa pari a 10<sup>10</sup>÷10<sup>11</sup> cellule/ml, anche in colture pure (Strous *et al.*, 1999). Questo può essere spiegato con la necessità di comunicazione tra le cellule per lo sviluppo, o con la possibilità di mantenere un livello di idrazina comune tra le cellule tale da permettere la completa ossidazione dell'ammonio. Purtroppo la biomassa ANAMMOX è caratterizzata da un basso tasso di crescita che comporta di conseguenza lunghi tempi di start-up. L'utilizzo di reattori SBR (Sequencing Batch Reactors), reattori a biomassa adesa o a fanghi granulari (Ni *et al.*, 2010) può comunque accelerare tale operazione: nei reattori a biomassa adesa (in particolare reattori a biomassa adesa a letto

mobile (MBBR) o biodischi) grazie all'elevata età del fango che può essere mantenuta, la concentrazione di biomassa raggiungibile è maggiore rispetto ai reattori a biomassa sospesa, a parità di volume occupato. Anche i reattori a fanghi granulari consentono un efficace sviluppo della biomassa grazie alla formazione di aggregati compatti. L'associazione di diverse cellule batteriche porta infatti alla formazione dei caratteristici granuli le cui dimensioni possono raggiungere da 1,0 a 4,5 mm, con cavità interne porose che permettono la diffusione dei substrati e dell'azoto gassoso prodotto. La velocità di sedimentazione dei granuli ANAMMOX maturi è elevata e consente pertanto un aumento del tempo di ritenzione cellulare e la minimizzazione della biomassa in sospensione.

Un'alternativa ai reattori a biomassa adesa, utilizzata nell'ottica di migliorare la ritenzione di biomassa, è costituita dai bioreattori a membrana (MBR), nei quali la separazione della biomassa dal surnatante senza l'utilizzo di sedimentatori secondari consente un completo controllo della biomassa, nonché un notevole contenimento dei volumi (Trigo *et al.*, 2006).

Nei reattori SBR la sedimentazione del fango avviene in quiete all'interno del reattore stesso, senza quindi l'utilizzo di un sedimentatore secondario: questo permette una più efficace chiarificazione del liquame nonché un risparmio di volumi coinvolti. Inoltre, l'organizzazione del ciclo di funzionamento del reattore in fasi distinte permette, attraverso un'opportuna variazione dei tempi dedicati a ciascuna fase, di modificare facilmente la conformazione del ciclo, conferendo un'estrema flessibilità al processo.

### 5.3.7 Altri fattori

Un fattore che sembra influire sul processo ANAMMOX è la presenza di luce: van de Graaf *et al.* (1996) osservarono una diminuzione dell'attività batterica del 30÷50%. Per eliminare questo effetto è sufficiente coprire il reattore in modo da evitare il passaggio di luce all'interno.

Anche la velocità di agitazione del liquame nel reattore può essere motivo di stress per i batteri. Come precedentemente affermato, la biomassa ANAMMOX è particolarmente sensibile alla concentrazione dei nitriti (par 5.3.1), pertanto un mescolamento completo del liquame diventa fondamentale per evitare che si creino condizioni di concentrazione disomogenee tali da inibire la biomassa. Il mescolamento può essere effettuato attraverso agitazione meccanica o mediante insufflazione di azoto gassoso e, preferibilmente, utilizzando lo stesso azoto gassoso prodotto durante la reazione (Kwok *et al.*, 1998). L'agitazione inoltre favorisce l'aggregazione dei granuli, anche se il meccanismo per cui gli

sforzi idrodinamici prodotti influenzano la formazione, la struttura e il metabolismo della biomassa granulare non è ancora stato completamente compreso. Risulta chiaramente evidente la presenza di un valore limite di sforzi di taglio oltre il quale si verifica un calo dell'attività della biomassa e una diminuzione del diametro dei granuli (Chisti, 2000).

Arrojo *et al.* (2006) hanno valutato l'effetto degli sforzi di taglio applicati mediante agitazione meccanica sui fanghi granulari in un reattore SBR. Il processo è stato in grado di sopportare perfettamente lo stress meccanico per potenze specifiche tra 0,003 e 0,09 kW/m<sup>3</sup> (fino a 180 rpm). L'incremento della velocità di rotazione fino a 250 rpm (corrispondente alla potenza specifica di 0,23 kW/m<sup>3</sup>) ha causato la diminuzione dell'attività specifica della biomassa del 40%, contestualmente alla diminuzione del diametro dei granuli del 45% e all'accumulo di nitrito nel reattore.

I valori della velocità di agitazione meccanica riportati in letteratura sono piuttosto variabili ma, in genere, risultano compresi tra 70÷150 rpm (Strouss *et al.*, 1998; Dapena-Mora *et al.*, 2010; Fernandez *et al.*, 2010).

# CAPITOLO VI

## Materiali e metodi

### 6.1 Processo SHARON

#### 6.1.1 Apparato sperimentale

Per la sperimentazione si è utilizzato un reattore del tipo a flusso continuo completamente miscelato (CFSTR), senza ricircolo di biomassa (chemostato), con una capacità operativa di 2 litri.

Il reattore è dotato di una doppia parete per lo scambio di calore che ha consentito di mantenere la temperatura di esercizio ad un valore di  $35\pm 0,1$  °C. Per il riscaldamento si è utilizzato un bagno termostatico HAAKE (modello F3-K).

Il reattore è stato alimentato tramite una pompa peristaltica Watson Marlow (mod. 120 U/DV) la cui portata durante la sperimentazione ha determinato un tempo di residenza idraulica (HRT) compreso nell'intervallo 1-1,25 giorni, coincidente con il tempo di residenza dei fanghi (SRT), non essendoci ricircolo di biomassa.

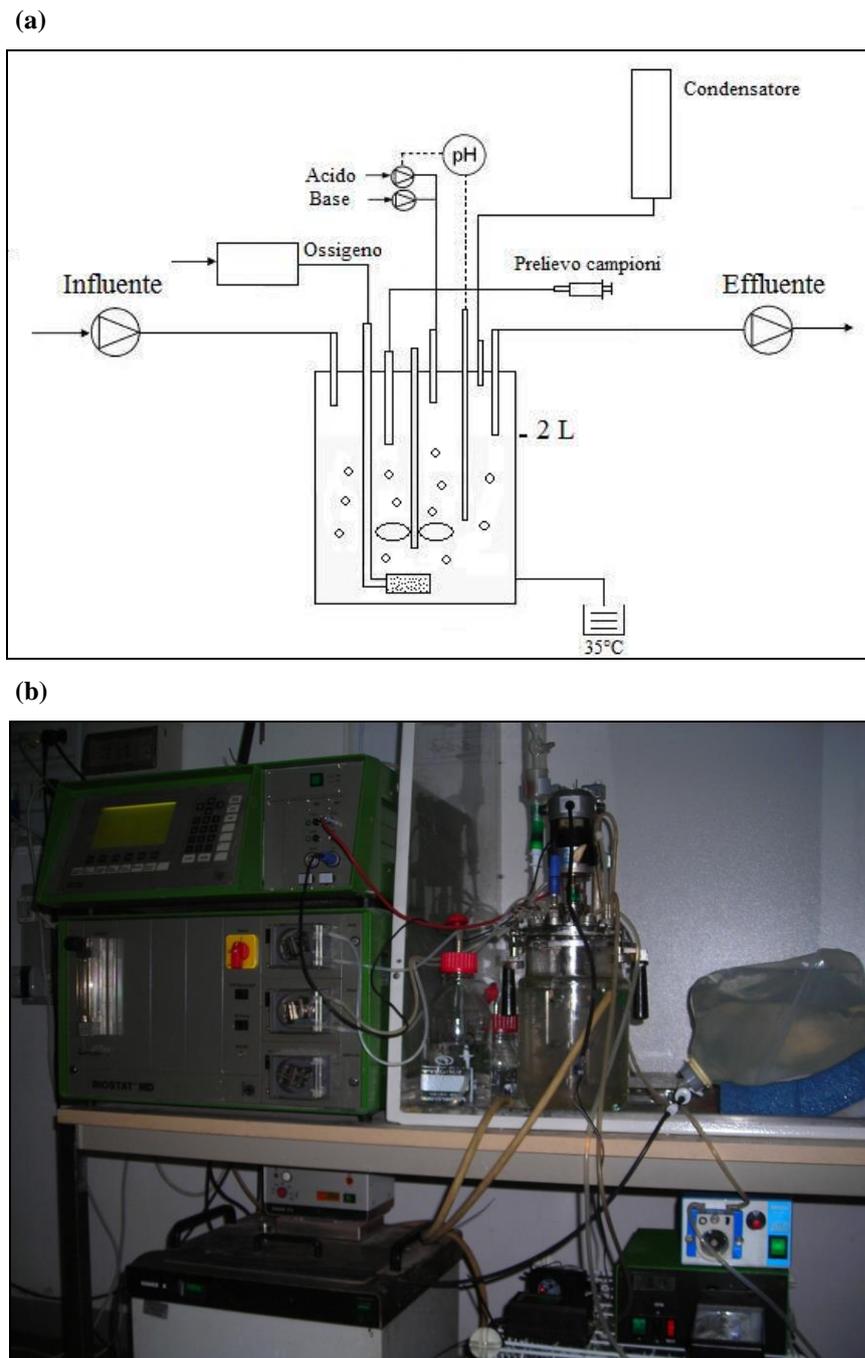
L'effluente è stato estratto continuamente dal reattore con una seconda pompa peristaltica (Velp Scientific, mod. SP 311), in modo tale che il livello della miscela all'interno del reattore rimanesse costante: lo scarico era posto ad un'altezza fissa in corrispondenza del volume operativo di 2 litri e la portata di scarico era leggermente superiore a quella di alimentazione.

L'aria è stata insufflata da un compressore attraverso un diffusore in pietra porosa, mentre la miscelazione è stata garantita da un sistema di agitazione meccanica.

Il pH, misurato tramite una sonda (AMEL, mod. 411/CGG/6) a elettrodo combinato, è stato mantenuto nel range prestabilito (6,5-7,5) con l'aggiunta di acido ( $H_2SO_4$  1M) o base (NaOH 1M), grazie al sistema di controllo Biostat MD.

Al reattore è stato collegato un condensatore per evitare l'evaporazione dell'acqua sotto forma di vapore, che può variare tra il 14% e il 37% del volume della miscela (Van Hulle, 2005).

La Figura 6.1 mostra una sua rappresentazione schematica (a) e la fotografia dell'intero sistema impiegato (b).



**Figura 6.1:** Schematizzazione del reattore (a) e fotografia dell'intero sistema impiegato nella sperimentazione (b).

### 6.1.2 Inoculo

L'inoculo utilizzato per l'avviamento del reattore SHARON è stato prelevato dall'impianto di trattamento delle acque reflue di Is Arenas (Cagliari). L'impianto effettua un trattamento di pre-denitrificazione e nitrificazione tradizionale e la concentrazione di azoto ammoniacale alla quale sono sottoposti i batteri normalmente non supera i  $25 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{l}$ . Dal momento che questi microrganismi non sono adattati ad alte concentrazioni di azoto, si è prestata

particolare attenzione durante la fase di avviamento, nella quale la concentrazione di azoto è stata incrementata fino a 2000 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l, e nelle successive fasi sperimentali, quando il reattore è stato alimentato con il refluo reale, contenente composti potenzialmente inibenti e tossici per i microrganismi.

### 6.1.3 Alimentazione del reattore SHARON

Al fine di acclimatare la biomassa alle elevate concentrazioni di azoto ammoniacale, inizialmente si è utilizzato un mezzo sintetico per alimentare il reattore. Successivamente la biomassa è stata esposta ad aliquote crescenti del refluo reale, proveniente dagli impianti della Saras S.p.A., fino alla completa sostituzione dell'influente sintetico. Di seguito verranno indicate le composizioni dei due reflui e le modifiche ad essi apportate durante le varie fasi sperimentali.

#### 6.1.3.1 Influyente sintetico

L'influente sintetico, utilizzato per la sperimentazione, è stato preparato in laboratorio diluendo in acqua distillata i reagenti indicati nella Tabella 6.1.

La concentrazione massima di azoto ammoniacale testata, pari a 2000 mg<sub>N</sub>/l, è stata raggiunta gradualmente utilizzando opportune quantità di ammonio bicarbonato (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), come indicato nel Capitolo 7, par. 7.1 e 7.2, che ha consentito di ottenere un rapporto C<sub>i</sub>/N influente pari a 1. Nel corso della sperimentazione, tale rapporto è stato modificato (Capitolo 7, par. 7.5) mediante l'aggiunta di sodio bicarbonato (NaHCO<sub>3</sub>) in quantità adeguate.

**Tabella 6.1:** Composizione del mezzo sintetico alimentato al reattore SHARON durante la sperimentazione.

Reagente	Concentrazione
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,56÷11,29 g/l (100÷2000 mg <sub>N</sub> /l)
NaHCO <sub>3</sub>	0÷12 g/l
Nutrienti:	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
Elementi in tracce	10 ml/l

Gli elementi in tracce sono stati preparati come indicato da Visniah e Santer (1957) e riportata in Tabella 6.2.

**Tabella 6.2:** Composizione degli elementi in tracce utilizzati per la preparazione dell'influente sintetico.

Reagente	Concentrazione (g/l)
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	1,5
ZnCl <sub>2</sub>	0,2
CuCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,6
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,9
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,34
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,48
CaCl <sub>2</sub>	0,5
EDTA	19,11

### 6.1.3.2 Refluo reale

Il refluo reale è stato prelevato mensilmente in uscita dallo stripper nello stabilimento SARAS SpA e conservato in cella frigorifera a 4 °C. La Tabella 6.3 riporta i valori, misurati nel corso della sperimentazione, dei principali parametri che lo caratterizzano.

Prima di essere alimentato il reflu è stato opportunamente integrato con NH<sub>4</sub>Cl, al fine di raggiungere la concentrazione desiderata di azoto ammoniacale. Inoltre, il rapporto C<sub>i</sub>/N del reflu è stato modificato nel corso della sperimentazione (Capitolo 7, par. 7.5) con l'aggiunta di NaHCO<sub>3</sub>, in modo tale da ottenere il rapporto voluto.

**Tabella 6.3:** Principali parametri caratterizzanti il reflu della SARAS SpA e rispettivi valori medi.

Parametro	Valore
pH	10,8±0,3
Alcalinità	1411±113 mgCaCO <sub>3</sub> /l
TOC	293±20 mg/l
Cianuri	fino a 9 mg/l
Fenoli	fino a 90 mg/l
Solfuri	fino a 31 mg/l

## 6.1.4 Test in batch di tossicità

### 6.1.4.1 Set-up del sistema

Le prove per determinare l'effetto di tossicità e inibizione acuta del refluo proveniente da raffinazione petrolifera sull'attività dei microrganismi autotrofi nitrificanti sono state eseguite con un reattore batch della capacità operativa di un litro, miscelato e aerato.

Il monitoraggio del sistema è avvenuto ad opera di un biosensore a titolazione ANITA (Ammonium NITrification Analyser) costituito da un sistema di titolazione (Jumo pH Stat01) collegato ad un apposito software in grado di seguire l'andamento della reazione di nitrificazione.

Il pH nel reattore è stato costantemente misurato tramite una sonda (Hamilton Polilyte Lab) collegata al sistema di titolazione (Jumo pH Stat01), in grado di fornire con precisione (dell'ordine delle decine di microlitri) dosaggi impulsivi di soluzione alcalina (NaOH, 0,05-0,5M) o acida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1M), per mantenere il pH intorno al suo valore di equilibrio ( $\pm 0,03$  unità pH) precedentemente determinato.

La miscelazione continua è stata garantita da un agitatore magnetico Velp (mod. AGE) con regolazione elettronica della velocità fino a 1200 giri/min e un volume di agitazione fino a 8 l. Un sistema di aerazione per colture aerobiche fornisce un flusso d'aria di almeno 100 l/h attraverso un diffusore in pietra porosa a bolle fini.

La temperatura di esercizio è stata mantenuta attraverso un bagno termostatico digitale ASAL (modello 720/D) dotato di motorino agitatore ad elica e spirale riscaldante da 800 W con termoregolatore elettronico e possibilità di regolazione della temperatura da ambiente a 80°C. La temperatura di esercizio è stata scelta in base al fango biologico utilizzato (sospensione di prova) e costantemente monitorata attraverso una sonda di temperatura. Per il fango SHARON si è adottata la temperatura di 30°C, pari a quella di esercizio del reattore, per i fanghi provenienti da impianti a scala reale la prova è stata eseguita a 25 °C.

Durante la prova il software registra la quantità di base usata per neutralizzare l'acidità prodotta durante il processo di nitrificazione.

In Figura 6.2 è mostrata la fotografia dell'intero sistema utilizzato per le prove.

### 6.1.4.2 Principio di funzionamento e modalità dei test

I test di tossicità sono stati eseguiti secondo le modalità indicate da Ficara e Rozzi (2001), opportunamente adattate alle specifiche condizioni operative. La valutazione della tossicità di

un refluo sull'attività dei microrganismi autotrofi nitrificanti e quindi la loro inibizione si basa sulla valutazione della diminuzione dell'attività dei batteri nitrosanti a seguito dell'aggiunzione di dosi crescenti di tale sostanza. Essendo tali batteri considerati i più sensibili tra quelli nitrificanti, la loro risposta tossicologica può essere considerata rappresentativa dell'intera popolazione nitrificante.

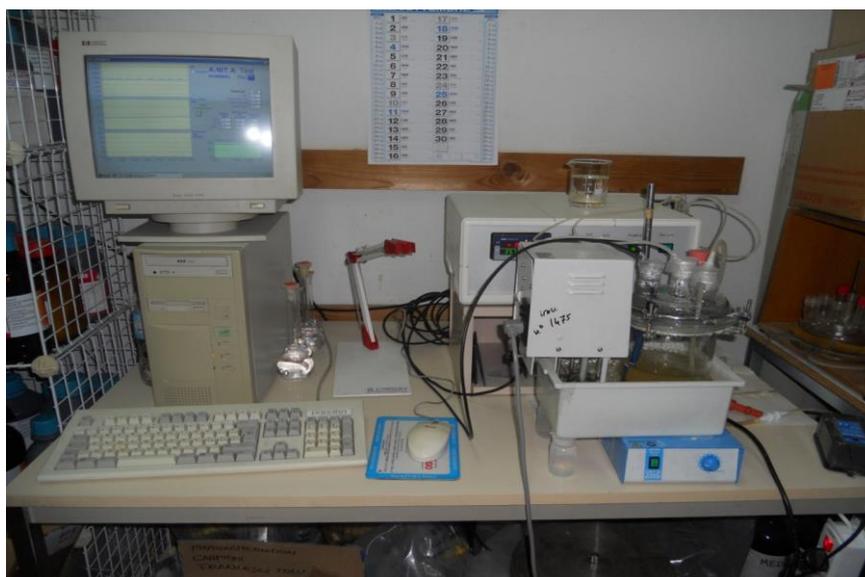
Il metodo prevede la misurazione iniziale dell'attività nitrificante di un campione di fango attivo in presenza di ione ammonio come substrato (prova in bianco).

Successivamente si sottopone tale fango a concentrazioni crescenti di sostanza di prova (5, 10, 15, 30, 50, 110 ml), attraverso aggiunte in sequenza effettuate ad intervalli regolari, sufficientemente ravvicinati, in modo da non permettere un adattamento della biomassa alla sostanza in esame.

L'inibizione viene calcolata come diminuzione dell'attività del fango dopo l'aggiunzione della sostanza di prova, rispetto all'attività misurata in presenza di solo ammonio (attività del bianco).

Per la corretta riuscita della prova è fondamentale che all'interno del reattore non ci siano interferenze ossia che non abbiano luogo altre reazioni, biologiche o chimico fisiche, che influiscano sul pH della sospensione di prova.

Per la valutazione di eventuali interferenze si aggiungono a fine prova 5 ml di allitiourea (ATU), un inibitore specifico della nitrificazione e si controlla che non si verifichi una richiesta di soluzione alcalina per mantenere il pH costante (prova di controllo).



**Figura 6.2:** Fotografia dell'intero sistema impiegato per le prove batch.

### 6.1.4.3 Elaborazione dei dati

La raccolta dei dati e la loro successiva elaborazione ha permesso la valutazione della velocità di reazione e della quantità di substrato consumato.

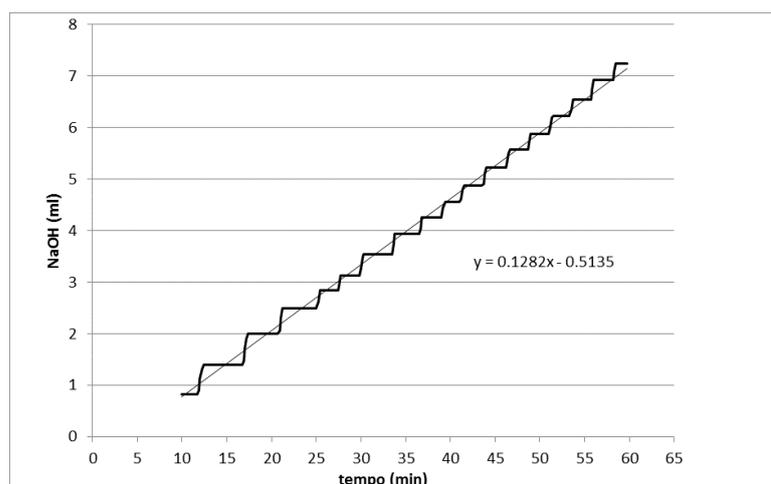
Per ciascun test si sono costruiti, relativamente a ciascun dosaggio, dei grafici in cui in ascissa è riportato il tempo (min) e in ordinata la soluzione titolante somministrata per compensare la produzione di acidità dovuta alla nitrificazione (ml).

La portata di titolante  $m(Ci)$  (ml NaOH/min) relativa ad una certa quantità di sostanza di prova è calcolata come regressione lineare dei dati di volume cumulato di soluzione titolante dosato nel tempo, nell'intervallo tra la  $i$ -esima addizione di sostanza di prova e quella successiva.

Sono stati trascurati i punti della curva di volume cumulato di titolante relativi ai primi 10 minuti nel primo intervallo di prova (l'attività del bianco) e i primi 5 minuti nei successivi perché, subito dopo l'addizione, possono essersi verificate variazioni di pH della sospensione di prova dovute a interferenze di natura chimico-fisica (idrolisi di sali, reazioni ossido riduttive, ecc.). Tuttavia, l'effetto di tali interferenze sulla portata di titolante si esaurisce nell'arco di pochi minuti.

La regressione lineare è stata calcolata usando un foglio di calcolo.

In Figura 6.3 è riportato un esempio di tale grafico, con relativa equazione della retta di regressione, il cui coefficiente angolare rappresenta la portata di titolante.



**Figura 6.3:** Retta di regressione il cui coefficiente angolare rappresenta la portata di titolante ( $ml_{NaOH}/min$ ).

Il valore dell'inibizione si ottiene rapportando la portata di titolante, in presenza di una certa quantità di sostanza di prova, con la portata di titolante durante il primo intervallo della prova (attività del bianco):

$$I_i\% = \frac{m(C_0) - m(C_i)}{m(C_0) - m(ATU)} * 100$$

dove:

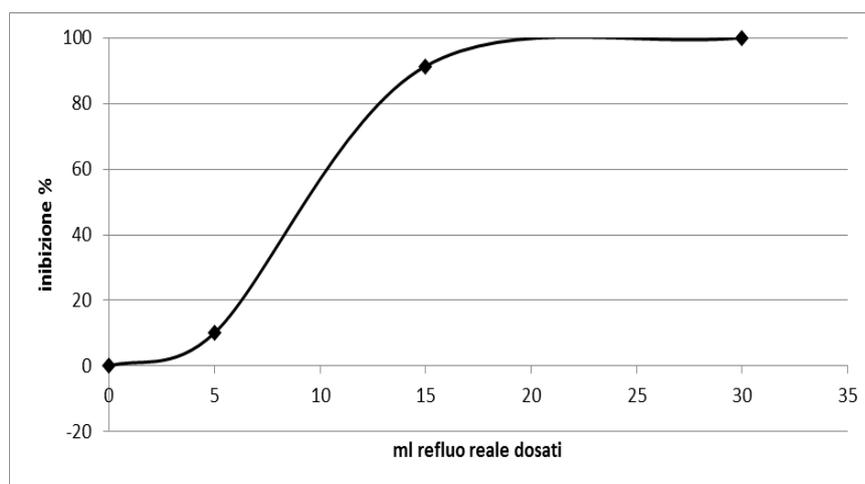
$I_i\%$  è il valore di inibizione, in percentuale, relativa alla quantità  $C_i$  di sostanza di prova;

$m(C_0)$  è la portata di titolante alcalino nel primo intervallo (attività del bianco);

$m(C_i)$  è la portata di titolante alcalino in presenza della quantità  $C_i$  di sostanza di prova;

$m(ATU)$  è la portata di titolante alcalino durante la prova di interferenza;

Il grafico dose-risposta (Figura 6.4), che presenta in ascissa il volume della sostanza di prova dosato e in ordinata la percentuale di inibizione, consente di visualizzare i risultati dei test di tossicità.



**Figura 6.4:** Grafico dose-risposta determinato nel test di tossicità.

L'inibizione durante il test di tossicità acuta segue l'andamento di una curva ad "s" (sigmoide), che prevede una crescita iniziale quasi esponenziale, un successivo rallentamento, diventando quasi lineare per raggiungere una posizione asintotica in cui non c'è più crescita.

Per poter interpolare i dati sperimentali si è utilizzato un apposito software, TableCurve®.

Una volta inserita l'equazione della curva:

$$Y = 1 - \frac{1}{1 + \frac{X^{A_0}}{A_1}} \%$$

il software ha consentito di determinare i parametri  $A_0$  e  $A_1$  che meglio approssimavano i dati sperimentali.

La discussione sui risultati ottenuti durante le prove di tossicità (Capitolo 7) sarà effettuata utilizzando le curve di inibizione così elaborate.

## 6.2 Processo ANAMMOX

### 6.2.1 Apparato sperimentale

La sperimentazione è stata condotta attraverso l'utilizzo di un reattore batch sequenziale (SBR) della capacità effettiva di 3 litri (Figura 6.5). La degradazione del substrato avviene in condizioni anossiche, pertanto il sistema è chiuso ermeticamente e la biomassa è mantenuta in sospensione grazie a un sistema meccanico di agitazione. Il tempo di ritenzione idraulica (HRT) è variato nel corso della sperimentazione, in funzione della portata alimentata, fino ad un massimo 1,67 giorni.

Il volume di lavoro era di 2 litri, mentre, a regime, il volume influente ad ogni ciclo è stato di 0,4 litri, con un rapporto di scambio di 0,2.

Il reattore ha compiuto giornalmente 3 cicli da 8 ore ciascuno, composti da 4 fasi:

- *alimentazione miscelata in modalità fed-batch* (6 ore e 40 minuti, a regime): la durata di tale fase è stata fatta variare nel corso della sperimentazione, in base alle diverse strategie di alimentazione adottate (Capitolo 8). La modalità fed-batch, basata sull'aggiunta continua di un substrato limitante la crescita, è tipicamente utilizzata per raggiungere un'elevata densità cellulare all'interno del reattore;
- *reazione* (70 minuti): la fase ha consentito alla biomassa di completare la degradazione del substrato alimentato;
- *sedimentazione* (5 minuti): ha permesso l'estrazione di un surnatante privo di solidi; è stato possibile impostare la durata di tale fase ad un tempo così ridotto grazie all'elevata velocità di sedimentazione dei fanghi granulari utilizzati;
- *scarico* (5 minuti): durante la fase è stato estratto dal reattore un volume di surnatante pari a quello alimentato durante la fase di alimentazione (a regime 0,4 litri).



**Figura 6.5:** Immagine dell'apparato sperimentale ANAMMOX.

L'intero sistema (Figura 6.6) è stato gestito attraverso un programma di controllo e memorizzazione appositamente realizzato, basato sul software LabVIEW (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench) della National Instruments. Il software ha consentito di controllare in tempo reale lo stato del sistema attraverso un pannello di controllo, dal quale è stato possibile compiere delle operazioni sul sistema, impostare o modificare le varie fasi, controllare il valore dei parametri di processo.

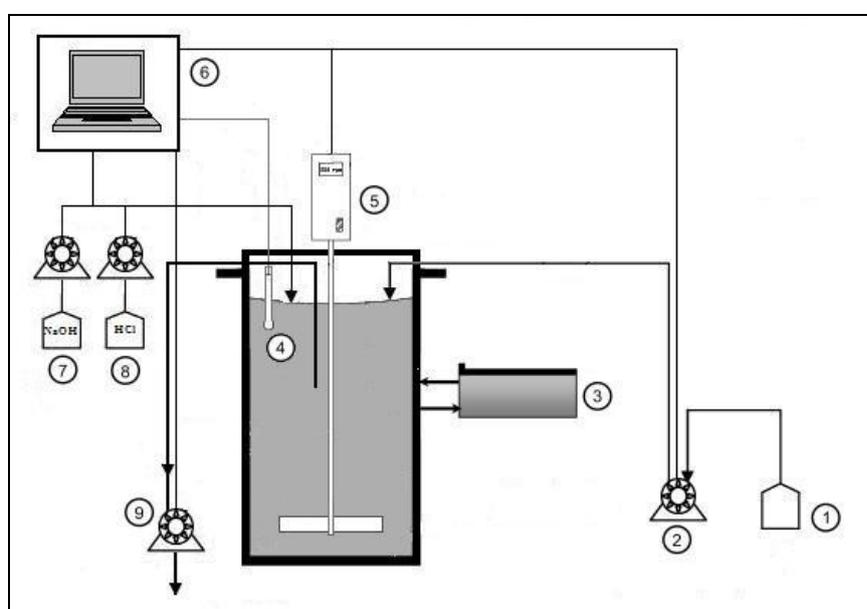
Il programma (6) gestisce le 4 pompe e l'agitatore. La pompa peristaltica (2) è una Watson Marlow (modello 503U) e ha garantito che l'influente (1) venisse inviato al reattore con una portata di 1 ml/min. L'effluente è stato prelevato dal reattore attraverso la pompa peristaltica Watson Marlow (modello 505S) (9); la sua estrazione è stata possibile grazie al posizionamento del tubo dello scarico a una quota di 12,2 cm dal fondo del reattore, alla quale corrispondeva un volume di liquame all'interno del reattore di 1,6 l.

La sonda digitale Mettler Toledo (4) (modello IN PRO 3253I) ad elettrodo combinato ha permesso la misura on-line di 3 parametri: pH, temperatura e potenziale di ossidoriduzione.

Il pH è stato mantenuto nel range  $7,7 \pm 0,3$  attraverso il dosaggio di acido (HCl 1M) (7) o di base (NaOH 1M) (8), effettuati mediante l'azionamento opportuno delle rispettive pompe Mysui (modello PS9) da parte del software.

Sono stati altresì monitorati temperatura e potenziale di ossidoriduzione. La temperatura è stata mantenuta costante ( $35 \pm 0,5$  °C) grazie alla doppia parete del reattore nella cui intercapedine circolava acqua riscaldata attraverso un bagno termostatico HAAKE (modello F3-K) (3).

La miscelazione è stata garantita da un agitatore meccanico IKA (modello RW16 basic) (5), ad asse verticale, con pala di forma elicoidale del diametro di 12 cm.



**Figura 6.6:** Schema di funzionamento del sistema.

## 6.2.2 Inoculo

L'inoculo di fango granulare utilizzato per l'avvio del reattore è stato prelevato dall'impianto di trattamento delle acque reflue urbane di Rotterdam (Olanda). Tale impianto è provvisto di una sezione, sviluppata in collaborazione con l'Università di Delft, dedicata al trattamento delle acque provenienti dal processo di digestione anaerobica dei fanghi mediante il sistema a doppio stadio SHARON-ANAMMOX, prima che queste siano rimandate in testa alla linea acque. Il refluo ha un elevato contenuto di azoto ammoniacale ( $1000 \div 1500$  mg<sub>N-NH4</sub>/l). Prima che nell'impianto di Rotterdam venisse introdotta la tecnologia ANAMMOX, lo schema

prevedeva un primo stadio di denitrificazione, e quindi un successivo reattore SHARON per la nitrosazione.

L'effluente SHARON viene introdotto nel reattore ANAMMOX dalla parte inferiore del reattore, miscelandolo col gas contenente azoto gassoso raccolto in sommità.

### 6.2.3 Alimentazione del reattore ANAMMOX

L'obiettivo della sperimentazione è stato quello di trattare con il reattore ANAMMOX l'effluente proveniente dal reattore SHARON, alimentato con il refluo reale industriale prodotto negli impianti di raffinazione petrolifera della SARAS SpA, contenente sostanze tossiche potenzialmente inibenti anche per la biomassa ANAMMOX.

Si è dovuto pertanto acclimatare gradualmente quest'ultima sia agli alti carichi di azoto, in conseguenza alle alte concentrazioni di azoto ammoniacale e nitroso che caratterizzano l'effluente SHARON, che alla presenza dei composti tossici nel refluo.

La composizione dell'alimentazione, è variata nel corso delle tre Fasi della sperimentazione, a seconda della strategia applicata.

Nella Fase I, le concentrazioni di ammonio e nitrito nell'influente sono state incrementate, seguendo la legge esponenziale indicata da Lopez *et al.* (2008), fino ai valori massimi di 526,9 mg<sub>N-NH4</sub>/l e 695,5 mg<sub>N-NO2</sub>/l.

Anche il rapporto molare tra azoto nitroso e ammoniacale nell'influente è stato gradualmente incrementato, a partire da un valore di 0,75, fino a raggiungere il valore ottimale, derivante dalla stechiometria della reazione, di 1,32.

Come fonte sintetica di azoto ammoniacale e azoto nitroso sono stati usati rispettivamente idrogeno carbonato d'ammonio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) e nitrito di sodio (NaNO<sub>2</sub>).

Inoltre, nella Fase I, è stata prevista l'aggiunta di nitrato di sodio (NaNO<sub>3</sub>) nell'alimentazione per garantire la presenza di nitrati all'interno del reattore, e di altri composti, necessari per la crescita della biomassa ANAMMOX.

La composizione dell'influente sintetico, relativa alla Fase I, è indicata nella Tabella 6.4.

In seguito, quando si è deciso di introdurre aliquote crescenti del refluo proveniente dallo stadio SHARON nell'influente sintetico, dopo aver determinato la concentrazione di nitriti e azoto ammoniacale nell'effluente SHARON, sono state calcolate le quantità dei composti sintetici da integrare per raggiungere il carico di azoto desiderato.

**Tabella 6.4:** Composizione dell'influente sintetico alimentato al reattore ANAMMOX nella Fase I.

Reagente	Concentrazione (g/l)
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,026÷2,973
NaNO <sub>2</sub>	0,148÷3,428
NaNO <sub>3</sub>	0,3 (50 mgN-NO <sub>3</sub> /l)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,00625
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,3
Elementi in tracce	10 ml/l

Nella Fase II, l'incremento del carico di azoto ha seguito la legge esponenziale della Fase I, ma l'influente sintetico è stato preparato mantenendo costanti le concentrazioni di nitriti e di azoto ammoniacale nell'influente ai valori di 1138 mg<sub>N</sub>-NO<sub>2</sub>/l e 862 mg<sub>N</sub>-NH<sub>4</sub>/l, con un rapporto N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub> di 1,32.

La presenza di nitrati nel mezzo sintetico non è stata ritenuta necessaria, pertanto si è provveduto ad eliminare il nitrato di sodio in alimentazione.

La composizione dell'influente sintetico utilizzato nel corso della Fase II è indicata in Tabella 6.5.

**Tabella 6.5:** Composizione dell'influente sintetico utilizzato nella Fase II.

Reagente	Concentrazione (g/l)
NaNO <sub>2</sub>	5,608 (1137,9 mgN-NO <sub>2</sub> /l)
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	4,86 (862 mgN-NH <sub>4</sub> /l)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,00625
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,3
Elementi in tracce	10 ml/l

Anche in questa Fase, quando si sono aggiunte le aliquote del refluo proveniente dal reattore SHARON nell'influente sintetico, si è tenuto conto delle concentrazioni di nitriti e azoto ammoniacale in esso presenti e sono state calcolate le quantità dei composti sintetici da integrare per raggiungere il carico di azoto desiderato.

Nella Fase III, il mezzo sintetico utilizzato per l'alimentazione aveva la stessa composizione di quello della precedente Fase II, mentre l'effluente SHARON, alimentato al reattore secondo la legge esponenziale indicata da Lopez *et al.* (2008), è stato semplicemente analizzato al fine di verificare le concentrazioni di azoto ammoniacale e nitroso ed opportunamente integrato, in quanto lo stoccaggio ha spesso comportato una loro eccessiva variazione, ed.

#### 6.2.4 Test in batch di tossicità

I test di tossicità sono stati eseguiti per determinare la massima Attività Specifica (SAA) della biomassa ANAMMOX presente nel reattore, in accordo con la metodologia riportata da Dapena-Mora *et al.* (2007). A tal fine, la biomassa è stata prelevata, lavata e risospesa in 150 ml di una soluzione buffer, contenente 0,143g  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{l}$  e 0,747g  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{l}$ . La quantità di biomassa utilizzata per la prova era tale da determinare una concentrazione di 1 g<sub>SSV</sub>/l (circa 20 ml). Le condizioni anaerobiche sono state raggiunte tramite l'insufflazione di azoto gassoso prima dell'integrazione del substrato (6 mg<sub>N-NO2</sub>/l e 6 mg<sub>N-NH4</sub>/l).

La massima SAA è stata calcolata dalla massima pendenza della retta descritta dalla produzione cumulata di azoto gassoso ( $\text{N}_2$ ) nel tempo (Figura 6.7), rispetto alla concentrazione della biomassa presente nella prova.

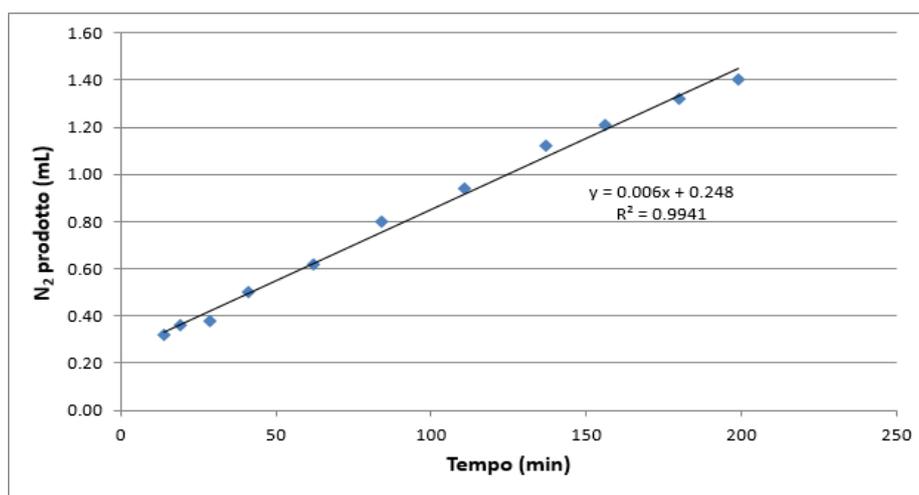


Figura 6.7: Produzione di  $\text{N}_2$  nel tempo e retta interpolante.

### 6.3 Metodi analitici

Nel corso della sperimentazione sono state eseguite diverse analisi al fine di valutare la capacità degradativa delle biomasse SHARON e ANAMMOX e l'andamento generale dei processi, regolando poi di conseguenza i vari parametri operativi. In particolare, le analisi effettuate hanno consentito di monitorare la concentrazione di azoto ammoniacale ( $\text{N-NH}_4^+$ ), azoto nitroso ( $\text{N-NO}_2^-$ ), azoto nitrico ( $\text{N-NO}_3^-$ ), carbonio organico disciolto (DOC), solidi sospesi totali (SST) e solidi sospesi volatili (SSV).

Tutti i campioni sono stati filtrati con filtri in acetato di cellulosa (ALBET  $\varnothing$  25 mm e  $\varnothing$  pori 0,45  $\mu\text{m}$ ) e opportunamente diluiti con acqua deionizzata prima delle analisi, effettuate sempre in triplo per ridurre al minimo il rischio di errore.

La concentrazione di azoto ammoniacale è stata determinata per via spettrofotometrica mediante reattivo di Nessler, secondo gli Standard Methods (APHA, 1998), utilizzando uno spettrofotometro ad assorbimento nel visibile (HITACHI modello U-2000), alla lunghezza d'onda di 420 nm.

La concentrazione di nitriti e nitrati è stata determinata tramite cromatografia ionica, utilizzando un cromatografo DIONEX ICS -90, dotato di una colonna IonPac<sup>®</sup> AS14A.

La concentrazione del DOC è stata misurata con un analizzatore SHIMADZU TOC-V CSN, per la determinazione del TOC (carbonio organico totale).

La misura dei SST e dei SSV è stata effettuata secondo gli Standard Methods (APHA, 2005, in particolare, la concentrazione di ammonio-ossidanti autotrofi nel reattore SHARON è stata calcolata come descritto da Van Hulle *et al.* (2005).

Sono inoltre state effettuate mensilmente le analisi per la caratterizzazione del refluo industriale, proveniente dall'attività di raffinazione petrolifera e fornito dalla SARAS SpA, in termini di cianuri, fenoli e alcalinità secondo gli Standard Methods (APHA, 2005). I solfuri sono stati determinati con lo spettrofotometro Hach Lange DR-2800, utilizzando il kit LCK-653.

## 6.4 Sperimentazione presso l'Università Tecnica di Delft

### 6.4.1 Processo ANAMMOX - Massima Attività Specifica

Un volume noto di granuli (circa 20 ml) sono stati prelevati dal reattore ANAMMOX R3, operante a 10°C nei laboratori dell'Università, e inserito in una bottiglia con l'aggiunta di 200 ml di acqua deionizzata; la bottiglia è stata poi chiusa con OxiTop®.

L'aria contenuta nella bottiglia è stata sostituita con azoto, mediante un'apposita apparecchiatura, lasciando una pressione finale interna di 1bar.

Dopo questa procedura, la bottiglia è stata inserita nell'agitatore alla velocità di 180 rpm e alla temperatura desiderata, fino ad osservare la stabilizzazione della pressione nello spazio testa. A quel punto la relativa pressione è stata ridotta a 0 bar e la soluzione di NH<sub>4</sub> e NO<sub>2</sub> (10 g/l di N-NH<sub>4</sub> e 10 g/l di N-NO<sub>2</sub>) è stata iniettata nella bottiglia, avviando la prova. I test sono sempre stati eseguiti in triplo e l'attività ANAMMOX è stata calcolata in base alla variazione della pressione nello spazio di testa con un apposito foglio di calcolo Excel.



**Figura 6.8:** Bottiglie OxiTop utilizzate per la determinazione della massima attività specifica ANAMMOX.

### 6.4.2 Processo CANON - Apparato sperimentale

Il reattore CANON, utilizzato per la sperimentazione, era del tipo SBR con un volume operativo di 2,7 l e un rapporto di scambio pari a 0,55 (Figura 6.9). Il tempo di ritenzione idraulica è stato fissato a 5,4 ore, relative a 3 ore/ciclo. Un bagno termostatico è stato installato per controllare che la temperatura fosse prossima a 15 °C. Per favorire il

trasferimento di ossigeno nel liquido e raggiungere una miscelazione adeguata, aria o N<sub>2</sub> sono stati insufflati attraverso un diffusore nella parte inferiore del reattore mediante una pompa ad aria. La concentrazione di ossigeno disciolto (OD) nella fase liquida è stata regolata variando il rapporto di aria o N<sub>2</sub> nel gas di ricircolo iniettato nel reattore. Il setpoint dell'OD può essere impostato tra 0 % e 100 % (della solubilità dell'aria in acqua a 15 °C e 1 atm). Un controllore di pH CRISON PH28 ha mantenuto il valore di pH compreso tra 7,0 e 7,5, attraverso il dosaggio di acido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) o base (NaHCO<sub>3</sub> 1M).

Il ciclo della durata di 3 ore, consisteva in:

- 60 minuti di fase aerobica di alimentazione (1,2 l di acqua + 0,15 l “N-source” e 0,15 l “C-source”, per un totale di 1,5 l);
- 60 minuti di fase di reazione aerobica;
- 45 minuti della fase di reazione anaerobica;
- 10 minuti di sedimentazione;
- 5 minuti della fase di scarico.



**Figura 6.9:** Reattore CANON utilizzato per la sperimentazione.

### 6.4.3 Processo CANON – Inoculo

L'inoculo di fango granulare utilizzato per l'avvio del reattore è stato prelevato dall'impianto di trattamento delle acque reflue urbane di Olburgen (Olanda), aggiornato nel 2006 per migliorare la qualità degli effluenti mediante l'attuazione di un trattamento separato e dedicato per le acque derivanti dalla digestione anaerobica dei fanghi e le acque provenienti da un'industria alimentare di lavorazione patate.

Le acque reflue industriali sono trattate prima in un reattore UASB per la produzione di biogas. L'effluente è miscelato con le acque provenienti dal processo di digestione anaerobica dei fanghi e successivamente trattato in un reattore per la rimozione di struvite, prima di essere inviato al reattore CANON. Il carico di azoto trattato dal reattore è di circa  $2\text{kg}_{\text{N-NH}_4}/(\text{m}^3 \cdot \text{giorno})$ .

### 6.4.4 Processo CANON – Alimentazione

Durante la fase di alimentazione di ogni ciclo è stato pompato nel reattore un volume di refluo sintetico, pari a 1,5 l e così costituito:

- 1,2 l di acqua,
- 0,150 l di "N-source"
- 0,150 l di "C-source".

La composizione della "N-source" e della "C-source" sono indicate in Tabella 6.6. La Tabella 6.7 contiene invece la composizione degli elementi in tracce e delle soluzioni di ferro e calcio.

**Tabella 6.6:** Composizione “N source” e della “C source” impiegate durante la sperimentazione.

Reagente	Concentrazione (g/l)
N source:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,89 (40 mg N-NH <sub>4</sub> /l)
NaNO <sub>3</sub>	3,03 (50 mg N-NO <sub>3</sub> /l)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,31
Elementi in tracce	12,5 ml/l
Soluzione Fe <sup>2+</sup>	25 ml/l
Soluzione Ca <sup>2+</sup>	6 ml/l
C source:	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2
KHCO <sub>3</sub>	10

**Tabella 6.7:** Composizione degli elementi in tracce, soluzione di ferro e soluzione di calcio.

Reagente	Concentrazione (g/l)
Elementi in tracce:	
EDTA	15
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,42
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,24
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,06
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,2
NaSeO <sub>4</sub>	0,102
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,014
NaWO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,05
KI	0,18
Soluzione Fe <sup>2+</sup> :	
EDTA	5
FeSO <sub>4</sub>	5
Soluzione Ca <sup>2+</sup> :	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8,82

### 6.4.5 Processo CANON – Metodi analitici

L'influyente al reattore e l'effluente, raccolto alla fine di un ciclo, sono stati analizzati al fine di determinare la concentrazione di  $N-NH_4^+$ ,  $N-NO_2^-$ ,  $N-NO_3^-$ . Le varie misure sono state effettuate con lo spettrofotometro Hach Lange DR-3900, utilizzando i rispettivi kit indicati in Tabella 6.8.

**Tabella 6.8:** Kit Hach Lange per la determinazione dell'azoto.

Codice Kit	Forma analizzata	Intervallo di misura
LCK303	$N-NH_4^+$	2÷47 mg <sub>N</sub> /l
LCK339	$N-NO_3^-$	0,23÷13,5 mg <sub>N</sub> /l
LCK340	$N-NO_3^-$	5÷15 mg <sub>N</sub> /l
LCK342	$N-NO_2^-$	0,6÷6 mg <sub>N</sub> /l

Le attività dei batteri ammonio-ossidanti (AOB), nitrito-ossidanti (NOB) e ANAMMOX, espresse in mg<sub>N</sub>/(1-giorno), sono state determinate con le seguenti formule:

$$\Delta N = N - NH_4^+_{inf} - (N - NH_4^+_{eff} + N - NO_2^-_{eff} + N - NO_3^-_{eff})$$

$$AOB = \frac{(N - NH_4^+_{inf} - N - NH_4^+_{eff}) - (\Delta N / 2,04)}{HRT}$$

$$NOB = \frac{N - NO_3^-_{eff} - (0,26\Delta N / 2,04)}{HRT}$$

$$ANM = \frac{\Delta N}{HRT}$$

Poiché l'influyente sintetico era costituito da solo carbonio inorganico, si è considerato che la rimozione anossica dell'azoto potesse avvenire solo in seguito alla reazione ANAMMOX e non per denitrificazione eterotrofa.

# CAPITOLO VII

## Processo SHARON: risultati e discussione

Lo studio effettuato durante il Dottorato di Ricerca, oggetto della presente Tesi, ha riguardato l'applicabilità del processo a doppio stadio "SHARON-ANAMMOX" ai reflui derivanti dall'attività di raffinazione petrolifera, in particolare quelli provenienti dal processo di desolforazione delle acque acide (sour water) degli impianti della SARAS SpA.

Tali acque sono attualmente trattate a scala reale mediante il trattamento di strippaggio a vapore con un'elevata efficienza di rimozione (il valore di soglia dell'azoto ammoniacale è fissato a 25 mg/l), ma anche elevati costi di gestione. L'innalzamento del valore di soglia dello stripper fino a 2000 mg<sub>N</sub>/l e l'integrazione del trattamento chimico-fisico con il sistema biologico combinato SHARON-ANAMMOX, consentirebbero una notevole riduzione del fabbisogno energetico e quindi dei costi operativi.

Data la composizione di tale refluo e nota la particolare sensibilità della biomassa ANAMMOX, si è inoltre valutata la possibilità di combinare il processo SHARON col processo di denitrificazione convenzionale.

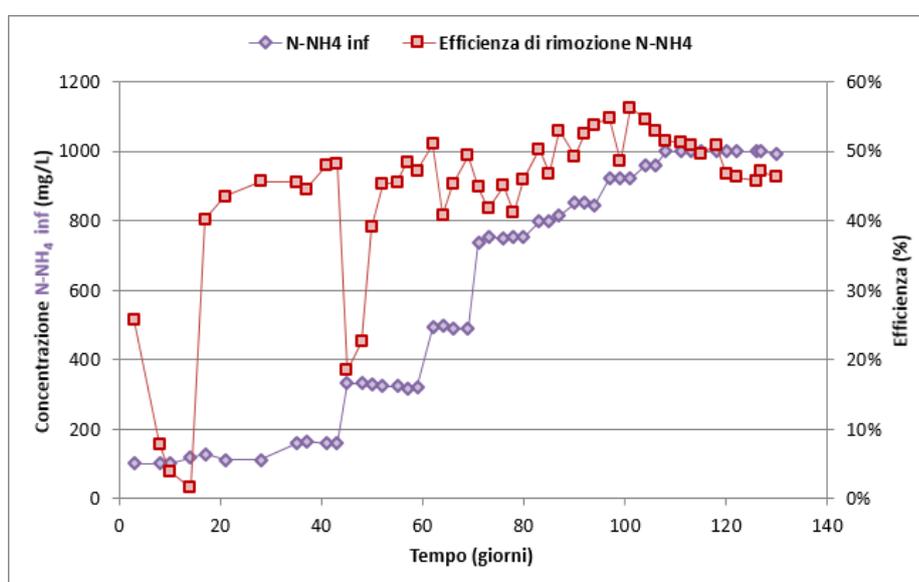
Nel presente Capitolo saranno discussi i risultati ottenuti per ciò che concerne il processo SHARON.

### 7.1 Start up e incremento della concentrazione di azoto ammoniacale

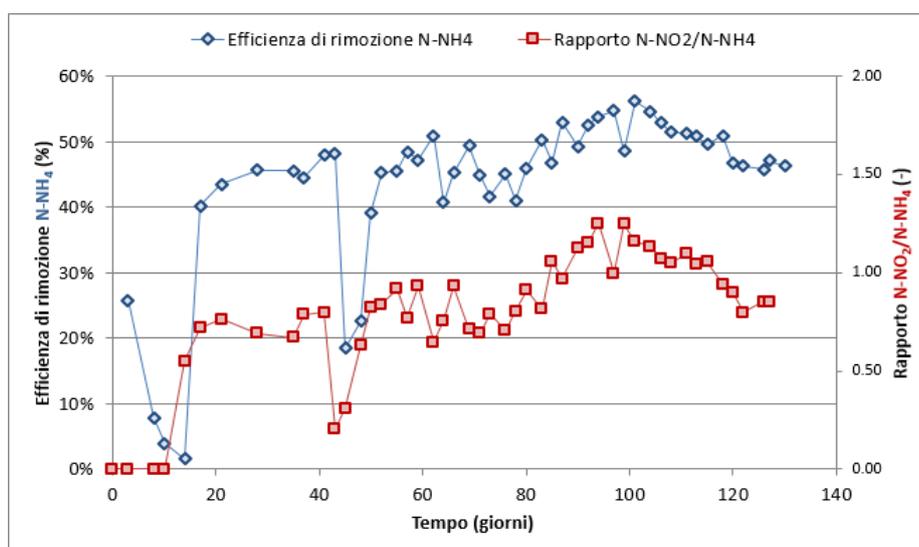
Il reattore è stato avviato e alimentato inizialmente con un refluo sintetico, le cui caratteristiche sono riportate nel Capitolo 6, par. 6.1.3.1, contenente azoto ammoniacale come unico substrato disponibile, dosato come ammonio bicarbonato (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), con concentrazioni crescenti fino a 1000 mg<sub>N</sub>/l ed una portata di 1,4 ml/min, corrispondente ad un HRT pari a 1 giorno. Il carico volumetrico di azoto applicato è stato incrementato da 0,1 a 1,0 kg<sub>N</sub>/(m<sup>3</sup>·giorno).

Il graduale incremento della concentrazione di N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e il basso valore di HRT e SRT applicati hanno consentito la selezione della biomassa ammonio-ossidante e la sua acclimatazione alle elevate concentrazioni di azoto ammoniacale, nonché una stabile nitrificazione parziale nel reattore SHARON al termine della fase.

Le Figure 7.1 e 7.2 mostrano rispettivamente l'andamento dell'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale e del rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  durante l'intera fase. Il rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  è un parametro fondamentale per l'integrazione del processo SHARON con il processo ANAMMOX. Secondo la stechiometria infatti, la biomassa ANAMMOX è in grado di ossidare l'azoto ammoniacale, utilizzando i nitriti come accettore di elettroni, con un rapporto di 1:1,32. Valori troppo bassi del rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  potrebbero non garantire la rimozione completa dell'ammonio. D'altra parte, valori eccessivi comporterebbero un accumulo di nitriti nel reattore ANAMMOX, determinando l'inibizione della biomassa per concentrazioni superiori a  $40\text{ mg}_{N\text{-NO}_2}/\text{l}$  (Fux, 2003).



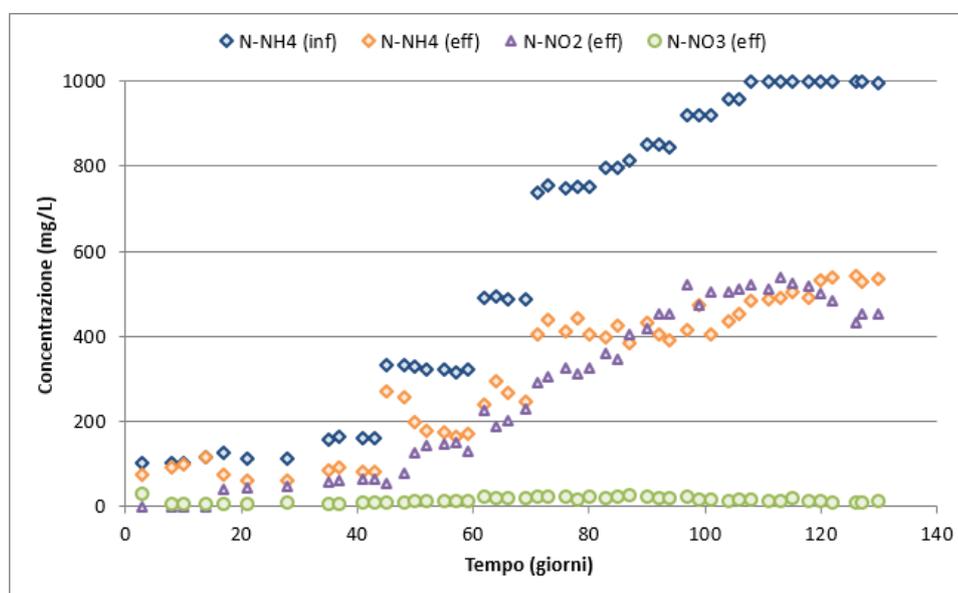
**Figura 7.1:** Andamento dell'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale durante la fase di avviamento.



**Figura 7.2:** Efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale e rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  nella fase di avviamento.

Dopo un primo adattamento iniziale della biomassa, probabilmente dovuto alla concentrazione di azoto ammoniacale di  $100 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{l}$ , più elevata rispetto a quella della vasca di nitrificazione da cui è stato prelevato l'inoculo (la concentrazione massima è circa  $30 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{l}$ ), l'efficienza media di rimozione osservata è stata del  $46,5 \pm 7 \%$ , con un corrispondente rapporto  $\text{N-NO}_2/\text{N-NH}_4$  di  $0,86 \pm 0,22$ . In particolare si è osservato un calo dell'efficienza, in corrispondenza degli incrementi della concentrazione influente di azoto ammoniacale (giorni 45, 64, 73, 85, 99), che ha evidenziato l'effetto acuto dell'aumento di concentrazione sulla biomassa ammonio-ossidante. Al termine della fase, quando la concentrazione influente era pari a  $1000 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{l}$ , il valore medio misurato è stato  $48,6 \pm 0,02 \%$  con un rapporto  $\text{N-NO}_2/\text{N-NH}_4$  di  $0,97 \pm 0,11$ .

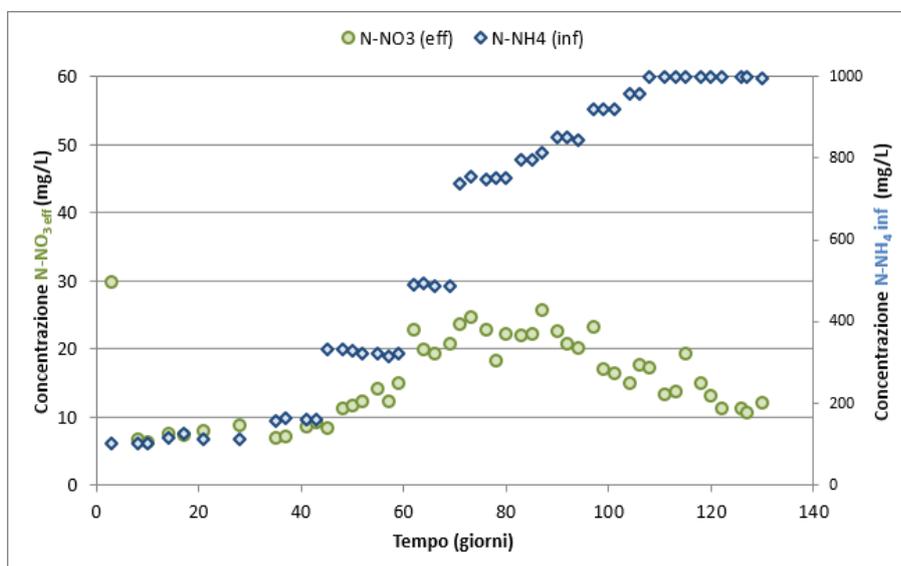
La concentrazione di nitriti nell'effluente è aumentata parallelamente alla concentrazione influente di azoto ammoniacale, indicando l'adattamento della biomassa ammonio-ossidante alle elevate concentrazioni di azoto e la sua selezione rispetto a quella nitrito-ossidante (Figura 7.3). Al termine della fase (giorni 120-130), in condizioni stazionarie, la concentrazione media osservata era pari a  $465 \pm 28 \text{ mg}_{\text{N-NO}_2}/\text{l}$ .



**Figura 7.3:** Concentrazioni nell'effluente di  $\text{N-NH}_4$ ,  $\text{N-NO}_2$  e  $\text{N-NO}_3$  all'aumentare della concentrazione influente di  $\text{N-NH}_4$ .

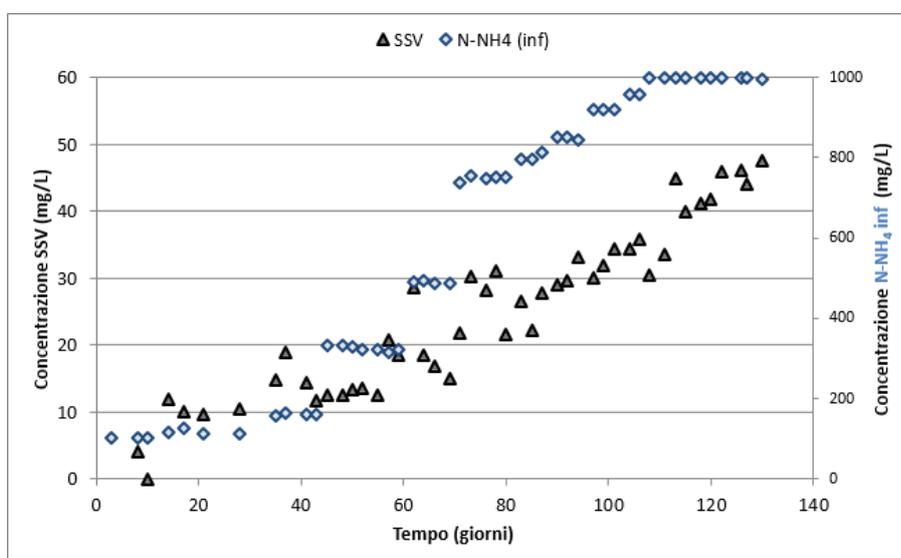
Il grafico nella Figura 7.4 mostra come la concentrazione di nitrati nell'effluente si sia sempre mantenuta inferiore a  $30 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3}/\text{l}$ , evidenziando una netta minoranza della biomassa nitrito-ossidante rispetto a quella ammonio-ossidante. La concentrazione media durante l'intera fase è stata pari a  $15,8 \pm 5,6 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3}/\text{l}$ . Inizialmente si è potuto osservare un incremento parallelo

alla concentrazione di azoto ammoniacale influente fino al giorno 73, dopo il quale la concentrazione di nitrati è diminuita gradualmente fino a valori prossimi a 10 mg<sub>N-NO<sub>3</sub></sub>/l, in conseguenza alla completa prevalenza della biomassa ammonio-ossidante nel sistema.



**Figura 7.4:** Concentrazione di N-NO<sub>3</sub> effluente e di N-NH<sub>4</sub> influente nella fase di avviamento.

Anche la concentrazione dei solidi sospesi volatili è stata monitorata durante l'intera fase per verificare lo sviluppo della biomassa all'interno del reattore. La concentrazione, inizialmente molto bassa in seguito alla perdita della maggior parte del fango di inoculo, è aumentata con il progressivo incremento della concentrazione di azoto ammoniacale nell'influente, raggiungendo valori medi finali di 45,1±2,3 mg<sub>SSV</sub>/l (Figura 7.5). La produzione di fango è risultata effettivamente molto ridotta, come previsto per la biomassa autotrofa che è caratterizzata da bassi tassi di crescita.



**Figura 7.5:** Andamento della concentrazione dei solidi sospesi volatili durante la fase di avviamento.

## 7.2 Integrazione del refluo reale di raffineria

Le caratterizzazioni del refluo reale, prelevato mensilmente a valle di una delle colonne di stripping degli impianti della SARAS SpA, hanno dimostrato la sua estrema variabilità in termini di concentrazioni delle sostanze tossiche e di altri parametri fondamentali quali pH, alcalinità, COD (come riportato nel Cap.6, par. 6.1.3.2). Per tener conto di eventuali effetti negativi sul processo, una volta raggiunta la concentrazione di 1000 mg<sub>N-NH4</sub>/l nell'influente sintetico, sono state eseguite delle prove in batch per verificare l'effetto tossico acuto del refluo reale sulla biomassa presente nel reattore. Queste hanno evidenziato la necessità di aggiungere gradualmente il refluo reale al mezzo sintetico: si è inizialmente applicato un rapporto refluo reale/refluo sintetico pari a 1:99 v/v, con una concentrazione di azoto ammoniacale pari a 1.000 mg<sub>N</sub>/l. Tale rapporto, insieme alla concentrazione di azoto ammoniacale nell'influente, sono stati progressivamente aumentati fino a raggiungere i valori target di 100:0 v/v e 2000 mg<sub>N</sub>/l, rispettivamente, da cui si ricavano i 3 STEP che saranno descritti nel dettaglio (Tabella 7.1).

**Tabella 7.1:** Suddivisione della fase in Step, sulla base delle concentrazioni di azoto ammoniacale nell'influente e/o del rapporto refluo reale/refluo sintetico applicati.

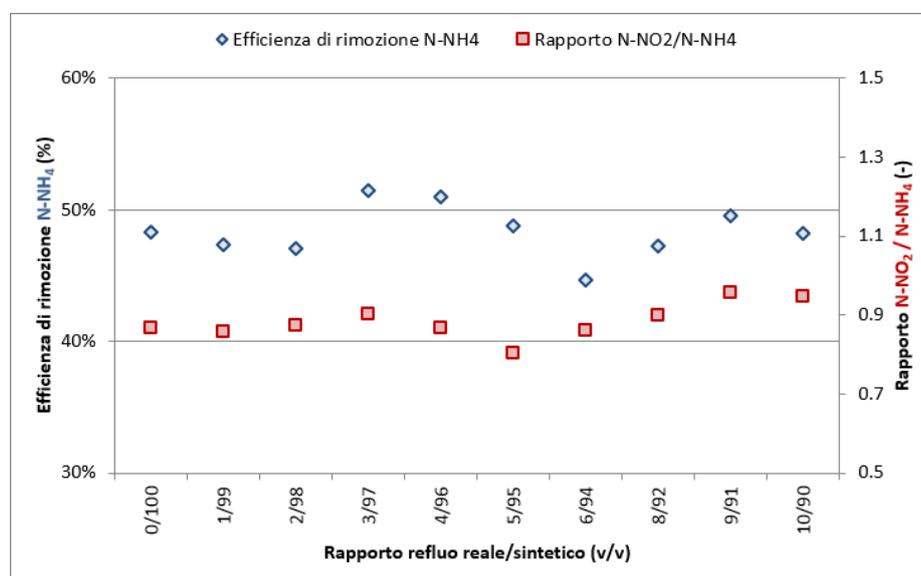
STEP	N-NH <sub>4</sub> (mg/l)	N-NH <sub>4</sub> (kg <sub>N</sub> /m <sup>3</sup> ·giorno)	refluo reale/refluo sintet. (v/v)	HRT (giorni)
I	1000-2000	1,0-2,0	0/100 - 10/90	1
II	2000	1,6-2,0	11/89 - 50/50	1-1,25
III	2000	1,6	65/35 - 100/0	1,25

### 7.2.1 STEP I

All'inizio dello Step I la concentrazione di azoto ammoniacale nell'influente e il rapporto volumetrico tra il refluo reale e sintetico erano rispettivamente 1000 mg/l e 0/100 v/v. L'efficienza media di rimozione dell'azoto ammoniacale osservata in condizioni stazionarie è stata di 48,3±2,9 % e l'effluente era caratterizzato da una concentrazione di nitrito pari a 452,4±1,1 mg<sub>N-NO2</sub>/l e un corrispondente rapporto N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub> di 0,87±0,03. La ridotta produzione di nitrato, con una concentrazione media di 11,4±1,0 mg<sub>N-NO3</sub>/l corrispondente al 2,35±0,40 % dell'azoto ammoniacale rimosso, ha indicato la quasi completa eliminazione dei batteri nitrito-ossidanti dal sistema. In tali condizioni, è stata aggiunta una quantità minima di refluo reale all'influente sintetico (1/99 v/v) che, come previsto, non ha comportato alcun effetto inibitorio sull'andamento del processo, grazie alla elevata diluizione. Infatti

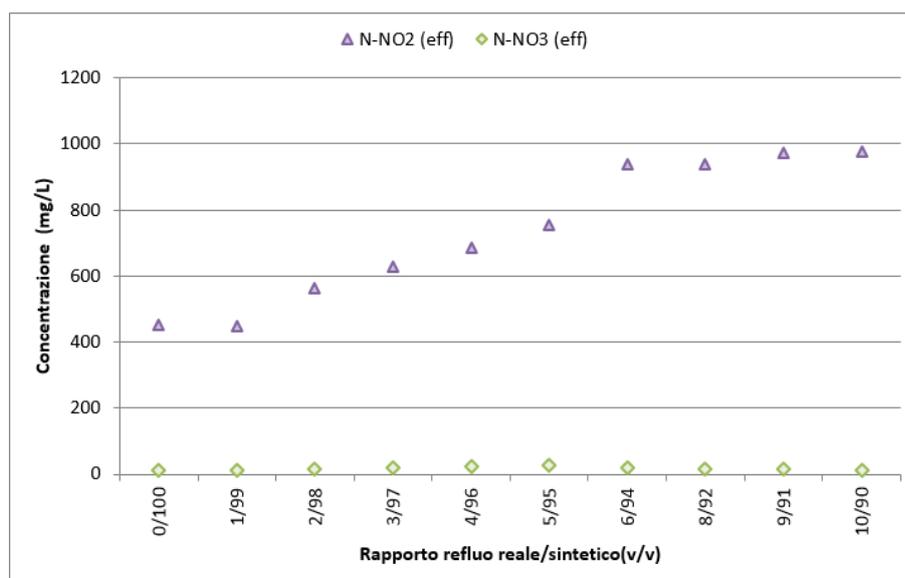
l'efficienza di rimozione media misurata è stata pari al  $47,4 \pm 1,0$  % e la concentrazione di nitrito nell'effluente era  $448,8 \pm 0,6$   $\text{mg}_{\text{N-NO}_2}/\text{L}$ , con un corrispondente rapporto  $\text{N-NO}_2/\text{N-NH}_4$  di  $0,86 \pm 0,02$ . Anche in questo caso, la produzione di nitrati rappresentava solo il  $2,10 \pm 0,05$ % dell'azoto ammoniacale rimosso e la concentrazione media era  $9,9 \pm 0,1$   $\text{mg}_{\text{N-NO}_3}/\text{l}$ .

La concentrazione di azoto ammoniacale e l'aliquota di refluo reale sono stati incrementati gradualmente nell'influyente fino al raggiungimento del valore target di  $2000$   $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{l}$  e del 10%. Nonostante l'aumento di tossicità dell'influyente il processo è risultato piuttosto stabile e, al termine dello Step I, l'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale e il rapporto  $\text{N-NO}_2/\text{N-NH}_4$  erano rispettivamente  $48,2 \pm 1,0$  % e  $0,95 \pm 0,01$ , come si può osservare nella Figura 7.6.

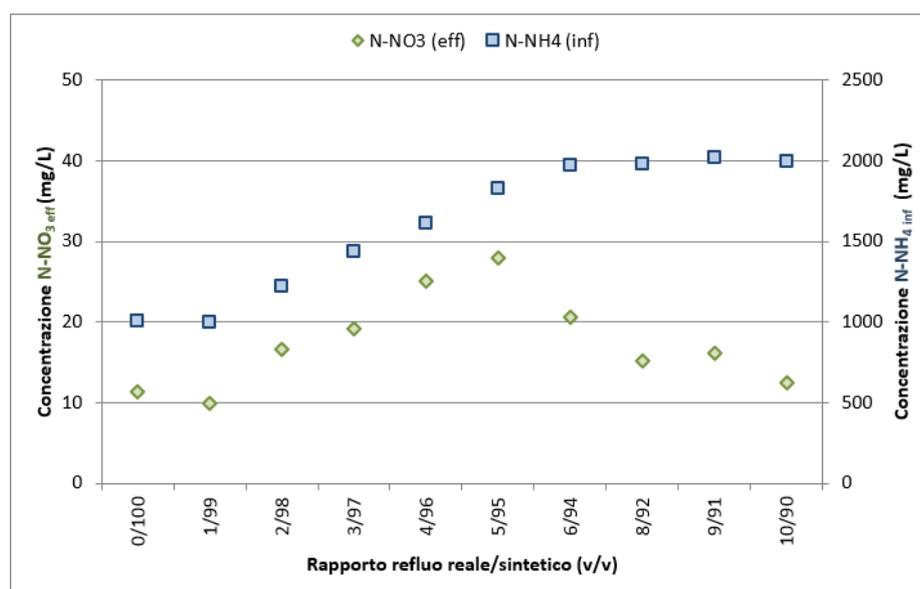


**Figura 7.6:** Efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale e rapporto  $\text{N-NO}_2/\text{N-NH}_4$  durante lo Step I.

La Figura 7.7 mostra l'andamento dei nitriti e dei nitrati nel corso dell'intero Step I. Risulta evidente la perfetta selezione della biomassa ammonio-ossidante che ha consentito la minima produzione di nitrati: la concentrazione nell'effluente è sempre stata inferiore a  $30$   $\text{mg}_{\text{N-NO}_3}/\text{l}$ . In effetti, osservando la Figura 7.8 dove la concentrazione di nitrati è riportata ad una scala minore, è possibile notare come si sia avuto un accumulo temporaneo di nitrati nel sistema in corrispondenza dell'incremento della concentrazione di azoto ammoniacale nell'influyente fino a  $2000$   $\text{mg}/\text{l}$ . Successivamente infatti, quando i livelli di  $\text{N-NH}_4$  in ingresso al reattore sono stati mantenuti costanti, la concentrazione di nitrati nell'effluente è diminuita fino ad un valore di  $5,8 \pm 0,2$   $\text{mg}_{\text{N-NO}_3}/\text{l}$  al termine dello Step I, indicando un'ulteriore selezione della biomassa ammonio ossidante.

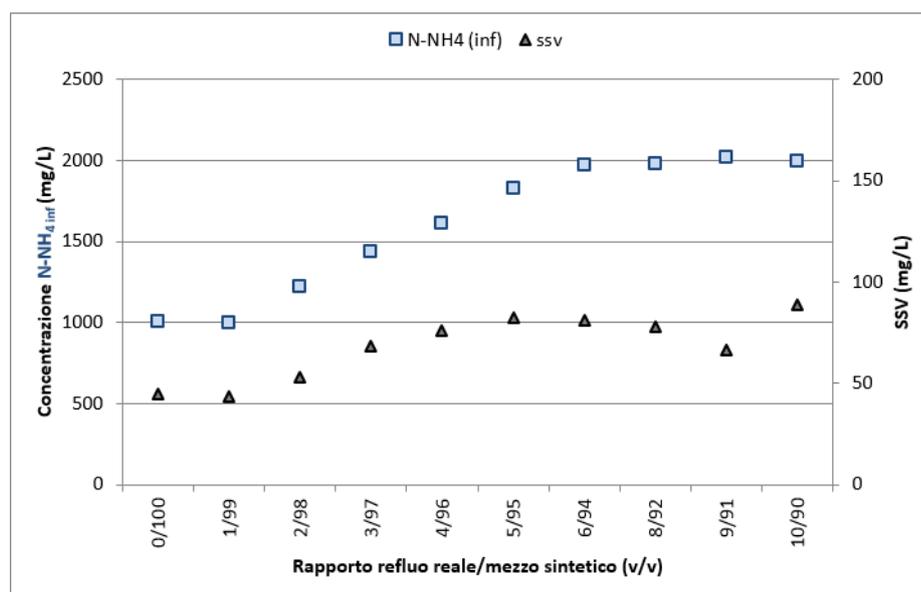


**Figura 7.7:** Concentrazione di nitriti e nitrati nel corso dello Step I.



**Figura 7.8:** Concentrazione di nitrati (effluente) e dell'azoto ammoniacale (influyente) durante lo Step I.

Contemporaneamente all'incremento della concentrazione di azoto ammoniacale e dell'aliquota di refluo reale nell'influente si è osservato l'aumento della concentrazione di solidi sospesi volatili, da un valore medio iniziale di  $45 \pm 4$  mg<sub>SSV</sub>/l fino al valore medio determinato alla fine dello Step I di  $93 \pm 5$  mg<sub>SSV</sub>/l (Figura 7.9). La determinazione dell'efficienza di rimozione del carbonio organico disciolto (DOC) non è stata considerata di particolare interesse in questo primo Step, dal momento che i tassi di diluizione erano ancora troppo alti per poter trarre considerazioni utili.



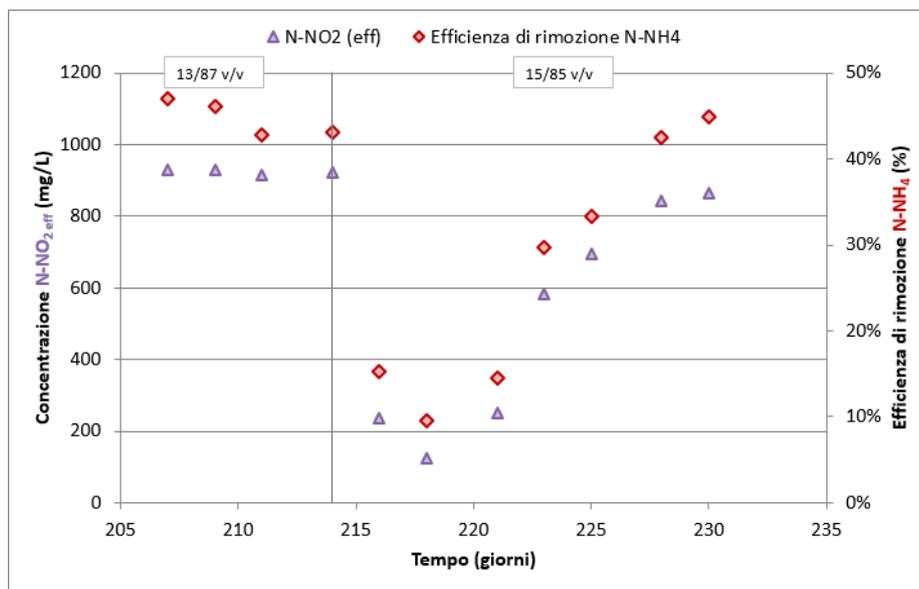
**Figura 7.9:** Andamento della concentrazione di solidi sospesi volatili e di N-NH<sub>4</sub> influente durante lo Step I.

## 7.2.2 STEP II

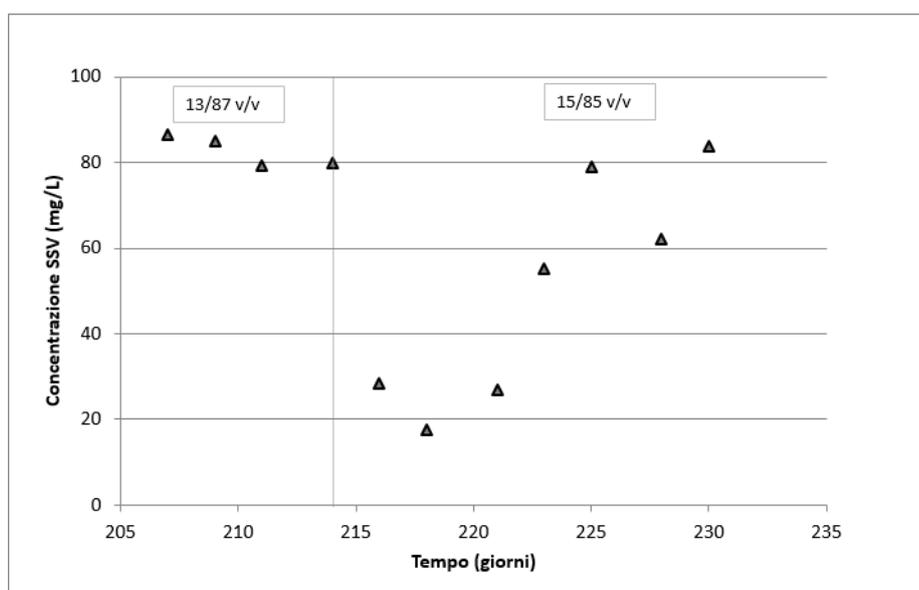
Durante lo Step II, la concentrazione di azoto ammoniacale nell'influente è stata mantenuta pari a 2000 mg<sub>N</sub>/l, mentre l'aliquota di refluo reale nell'influente è stata progressivamente aumentata fino al 50%.

In particolare, il passaggio dal 13% al 15% di refluo reale nell'influente (giorno 214) ha comportato un peggioramento delle prestazioni del sistema, probabilmente per la combinazione dell'aumento di tossicità dell'influente rispetto allo Step precedente e della non ancora completa acclimatazione della biomassa ai composti tossici presenti nel refluo reale (Figura 7.10). L'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale è calata repentinamente al 9,5%, così come la concentrazione di nitriti prodotti che dal valore di 922 mg/l (giorno 214) è diminuita a 124 mg/l (giorno 218).

Un'ulteriore dimostrazione dell'effetto tossico del refluo reale sulla biomassa è la notevole perdita di solidi dal sistema: la concentrazione di solidi sospesi volatili è infatti diminuita da un valore di 80 mg<sub>SSV</sub>/l (giorno 214) a 17,6 mg<sub>SSV</sub>/l (giorno 218), come si può osservare in Figura 7.11.



**Figura 7.10:** Concentrazione di N-NO<sub>2</sub> e efficienza di rimozione di N-NH<sub>4</sub> nel passaggio da 13/87 a 15/85 v/v.



**Figura 7.11:** Andamento della concentrazione di solidi sospesi volatili nel passaggio da 13/87 a 15/85 v/v.

Al fine di ripristinare il funzionamento ottimale del processo SHARON, la portata in alimentazione è stata ridotta da 1,4 a 1,1 ml/min, con un conseguente aumento del tempo di residenza idraulica (HRT) da 1 a 1,25 giorni ed una diminuzione del carico volumetrico di azoto applicato (da 2,0 a 1,6 kg<sub>N</sub>/m<sup>3</sup>·giorno). Una tale modifica delle condizioni operative ha consentito di ottenere in tempi rapidi un miglioramento delle prestazioni del processo, ed al termine dello Step II, in condizioni stazionarie, è stata osservata un'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale media pari a 44,7±1,5%, con una concentrazione di nitriti

nell'effluente pari a  $956 \pm 31,5$   $\text{mg}_{\text{N-NO}_2}/\text{l}$  ed un corrispondente rapporto  $\text{N-NO}_2/\text{N-NH}_4$  pari a  $0,84 \pm 0,04$ , come mostrato nelle Figure 7.12 e 7.13, che riportano l'andamento dei parametri in condizioni stazionarie al variare del rapporto refluo reale/sintetico. Il valore di HRT e SRT adottato è stato comunque tenuto nell'intervallo ottimale (Van Dongen *et al.*, 2001) tale da consentire una bassa ritenzione di biomassa nitrito-ossidante nel sistema: la concentrazione di azoto nitrico nell'effluente è leggermente aumentata nel corso dello Step II, rimanendo comunque sempre al di sotto di  $30 \text{ mg}_{\text{N-NO}_3}/\text{l}$  (Figura 7.13).

Durante lo Step II è stata inoltre misurata la concentrazione del carbonio organico disciolto per valutarne l'eventuale rimozione, dovuta allo sviluppo di una biomassa eterotrofa all'interno del reattore, e verificare che non vi fosse alcuna competizione tra le due popolazioni batteriche. In termini di degradazione del DOC, alla fine dello Step II, l'efficienza di rimozione media osservata era  $53,3 \pm 2,5$  %, confermando lo sviluppo della biomassa eterotrofa nel reattore SHARON (Figura 7.14).

### 7.2.3 STEP III

Nel corso dello Step III, il rapporto refluo reale/sintetico è stato rapidamente aumentato da 50/50 a 100/0 v/v, lasciando inalterata la concentrazione di azoto ammoniacale a  $2000 \text{ mg}_{\text{N}}/\text{l}$  e il carico volumetrico di azoto applicato a  $1,6 \text{ kg}_{\text{N}}/\text{m}^3 \cdot \text{giorno}$ . Le prestazioni del processo si sono mantenute stabili in termini di efficienza di rimozione dell'ammoniaca e del rapporto  $\text{N-NO}_2/\text{N-NH}_4$  nell'effluente. Al termine dello Step III, in condizioni stazionarie, i valori medi osservati dell'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale e del rapporto  $\text{N-NO}_2/\text{N-NH}_4$  nell'effluente sono stati rispettivamente pari a  $45,9 \pm 1,6\%$  e  $0,86 \pm 0,04$  (Figura 7.12). Rispetto al precedente Step II, sono stati inoltre osservati una riduzione della quantità di nitrati prodotti (dal  $2,87 \pm 0,7\%$  al  $2,11 \pm 1,0\%$  dell'azoto ammoniacale rimosso), come mostrato nella Figura 7.13, probabilmente a causa dell'aumento dell'aliquota di refluo reale nell'influyente e al conseguente minor tasso di diluizione dei composti tossici in esso contenuti, come cianuri e fenoli, che potrebbe aver comportato un maggior effetto inibente sui batteri nitrito-ossidanti. Essi infatti risultano più inibiti dalla presenza di cianuri rispetto ai batteri ammonio-ossidanti (Van Hulle *et al.*, 2010).

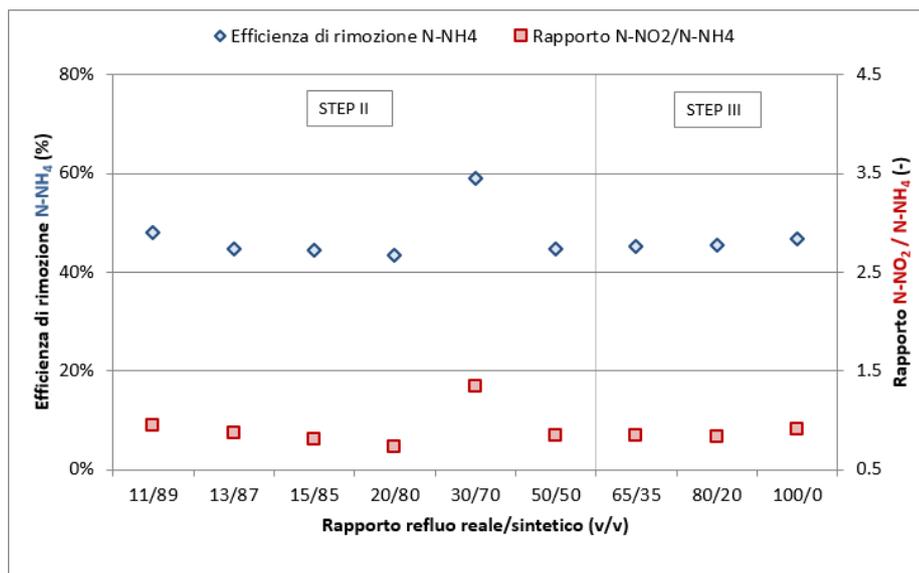


Figura 7.12: Rapporto N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub> e efficienza di rimozione di N-NH<sub>4</sub> durante gli Step II e III.

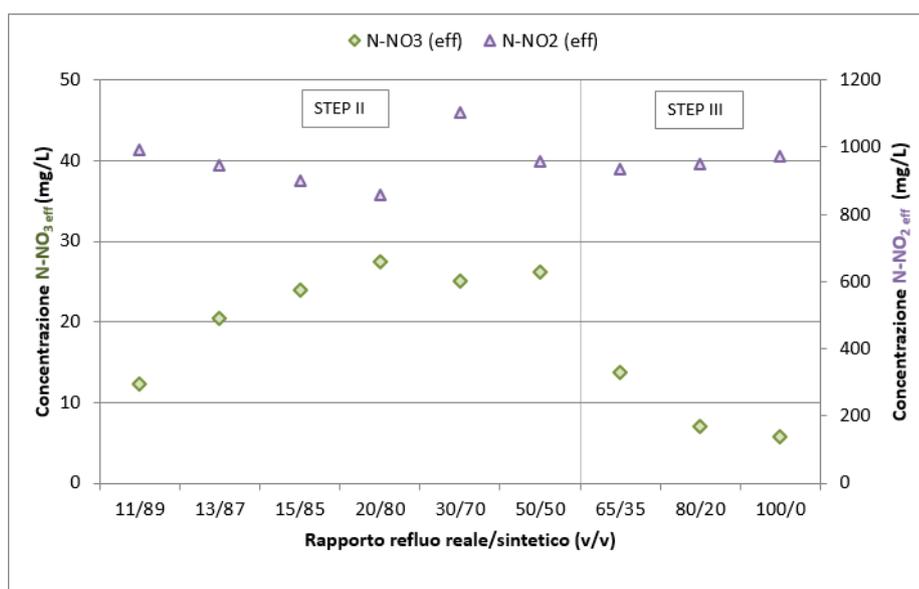


Figura 7.13: Andamento della concentrazione media di N-NO<sub>3</sub> e N-NO<sub>2</sub> nel corso degli Step II e III.

È stato inoltre osservato un aumento dell'efficienza di rimozione della sostanza organica (dal  $53,3 \pm 2,5\%$  al  $65,2 \pm 1,0\%$ ), ad indicare l'assenza di una qualunque competizione tra la biomassa eterotrofa e quella autotrofa nel sistema (Figura 7.14). Tali prestazioni sono attribuibili alla completa acclimatazione sia dei microrganismi eterotrofi, sia di quelli ammonio-ossidanti (autotrofi), al potenziale tossico crescente dell'influente. La concentrazione di solidi sospesi volatili è infatti aumentata gradualmente durante il corso di tutto lo Step III, raggiungendo il valore medio finale di  $93 \pm 5$  mg<sub>SSV</sub>/l, quando il reattore era alimentato con il solo refluo reale (Figura 7.15).

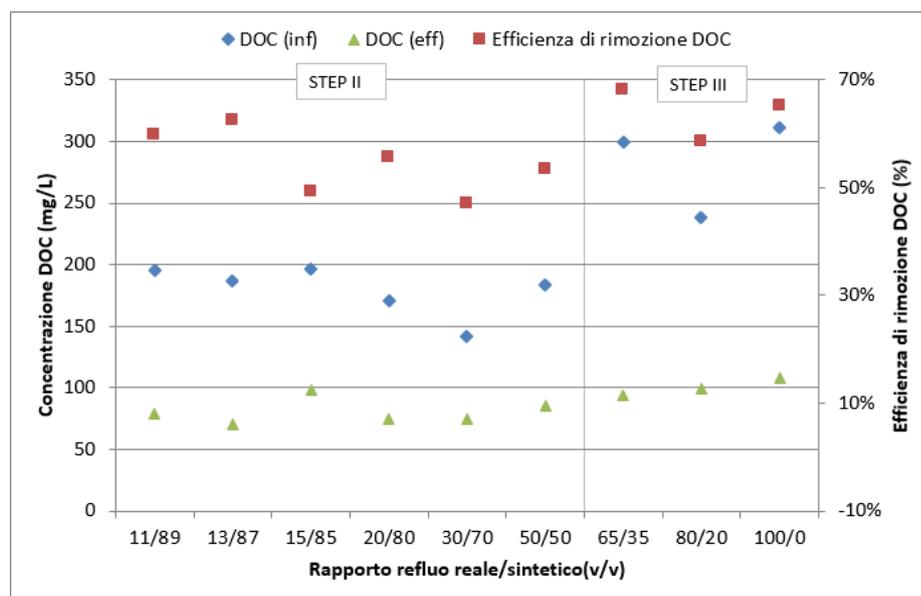


Figura 7.14: Concentrazione media del DOC influente ed effluente e sua efficienza di rimozione negli Step II e III.

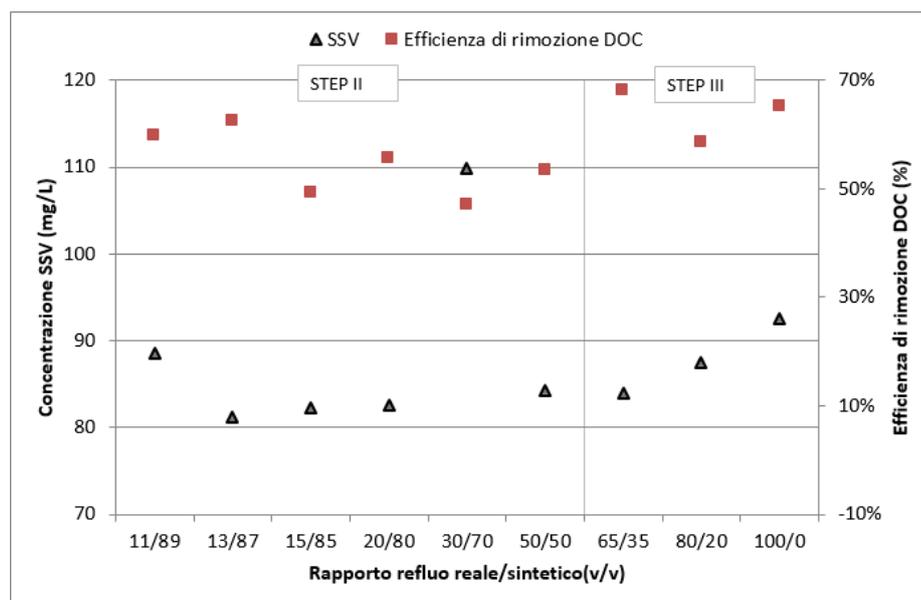


Figura 7.15: Efficienza di rimozione media del DOC e concentrazione di SSV durante gli Step II e III.

### 7.2.4 Test in batch di tossicità

Al fine di determinare gli effetti di inibizione del refluo reale sulla biomassa presente nel reattore SHARON, una volta ottenuta l'acclimatazione alle elevate concentrazioni di azoto ammoniacale presenti nel refluo sintetico, sono stati eseguiti dei test in batch mediante un biosensore titrimetrico (ANITA, Ammonium NITrification Analyzer) in grado di determinare

L'attività dei batteri ammonio-ossidanti basandosi sulla quantità di soluzione basica (NaOH, 1M) necessaria a mantenere il pH al valore di equilibrio. Tali test sono stati eseguiti sia sulla biomassa non acclimatata al refluo reale, sia immediatamente prima di ogni incremento della concentrazione di azoto ammoniacale o del rapporto refluo reale/refluo sintetico al fine di determinare la risposta del processo SHARON alla stessa quantità di refluo reale durante la sperimentazione in continuo: ad un litro di fango prelevato dal reattore SHARON sono stati aggiunti, ad intervalli regolari, volumi crescenti di refluo reale opportunamente integrato al fine di avere una concentrazione di azoto ammoniacale fino a 2000 mg<sub>N</sub>/l, misurando la progressiva riduzione dell'attività nitrificante.

In particolare il refluo reale (sostanza di prova) è stato integrato con la stessa concentrazione di azoto ammoniacale con cui veniva alimentato il reattore SHARON al momento del test di tossicità, in modo da testare la risposta della biomassa ammonio-ossidante al solo refluo reale. I dati sperimentali sono stati interpolati con una curva di tipo "ad esse" (sigmoide), caratteristica di questo tipo di applicazioni.

I punti della sigmoide rappresentano la percentuale di inibizione raggiunta durante la prova in funzione del volume cumulato di refluo reale dosato. Una maggiore pendenza della curva ad esse indica una minore inibizione della biomassa durante la prova.

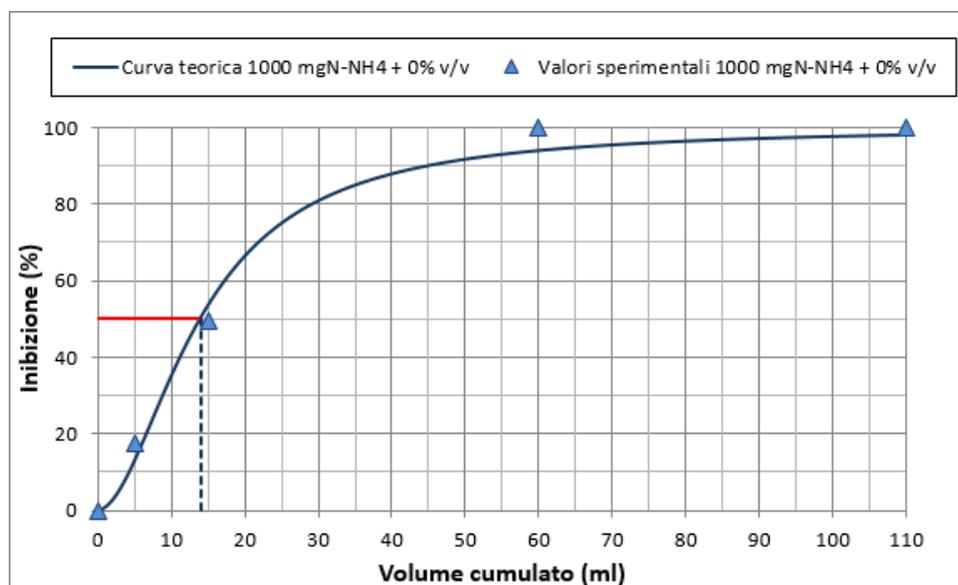
La prima prova in batch di tossicità acuta è stata eseguita prima di iniziare ad integrare il refluo reale al refluo sintetico, quando la concentrazione di azoto ammoniacale nel reattore SHARON era di 1000 mg/l e il rapporto refluo reale/refluo sintetico era di 0/100 v/v: la sostanza di prova era pertanto costituita dal refluo reale, integrato con una quantità di N-NH<sub>4</sub> tale da avere una concentrazione di 1000 mg<sub>N</sub>/l.

La curva sperimentale che rappresenta l'andamento di questa prova in batch è riportata in Figura 7.16: dal grafico dose-riposta si osserva un'inibizione del 97%, dovuta al solo refluo reale, corrispondente ad un dosaggio di sostanza di prova di 110 ml, mentre il 50% di inibizione viene raggiunto con un'aggiunta di circa 14 ml di refluo SARAS.

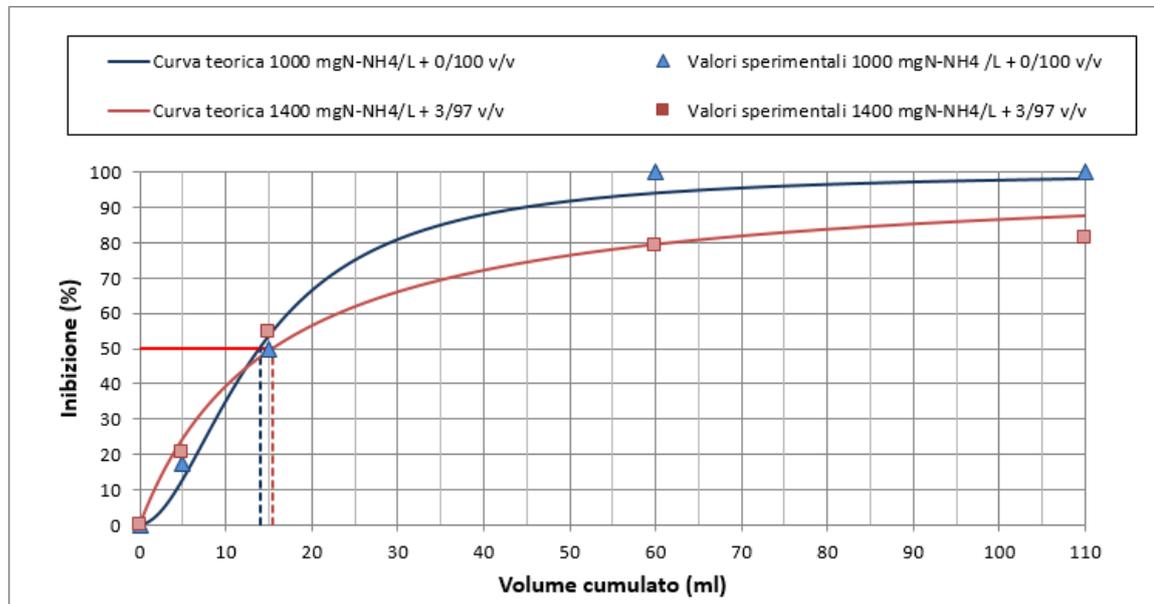
In Figura 7.17 è rappresentato l'andamento della prova in batch per condizioni operative del reattore SHARON di 1400 mg<sub>N</sub>-NH<sub>4</sub>/l e il 3% di refluo reale nell'influente: la biomassa utilizzata per questa prova era quindi già stata esposta a sostanze quali cianuri e fenoli, seppure in quantità e concentrazioni limitate per via della diluizione.

Per un'aggiunta di 110 ml di sostanza di prova l'inibizione raggiunta è dell'87% mentre l'inibizione del 50% è stata ottenuta per un volume di refluo SARAS di poco superiore ai 15 ml. Confrontando le due prove si osserva che, in entrambi i casi, l'aggiunta di circa 15 ml di

refluo reale ha comportato l'inibizione del 50%, mentre per aggiunte della sostanza di prova superiori a 15 ml la biomassa non acclimatata risulta maggiormente inibita.



**Figura 7.16:** Curva di tossicità acuta determinata dal refluo reale sulla biomassa prelevata dal reattore SHARON alimentata con 1000 mg<sub>N-NH4</sub>/l e solo refluo sintetico.

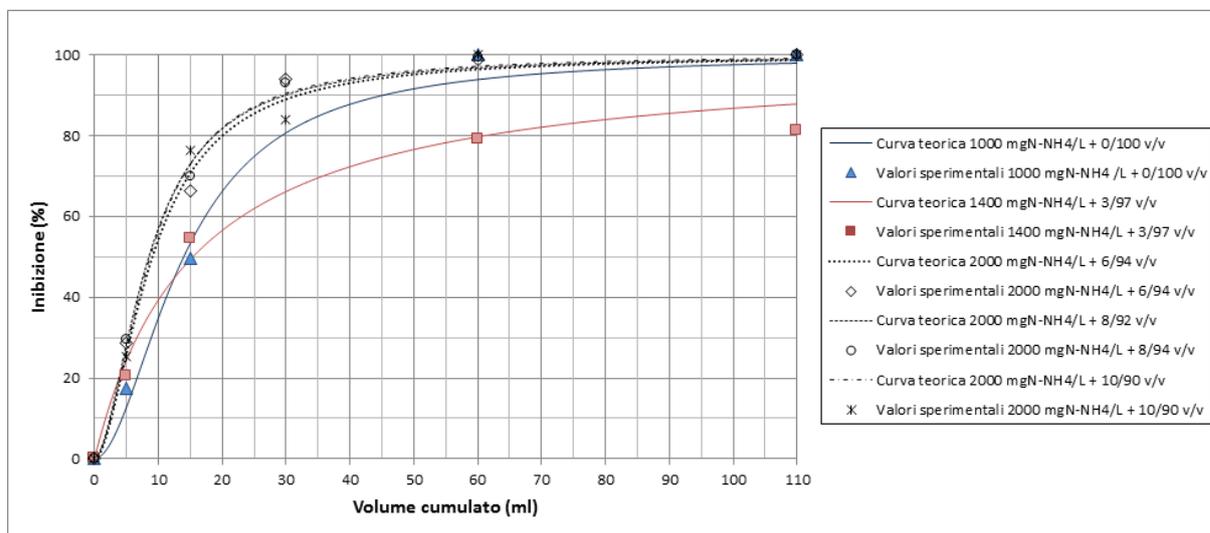


**Figura 7.17:** Curva di tossicità acuta determinata dal refluo reale sulla biomassa prelevata dal reattore SHARON alimentata con 1400 mg<sub>N-NH4</sub>/l e 3% di refluo reale, confrontata con quella a 1000 mg<sub>N-NH4</sub>/l e 0% di refluo reale.

I successivi test di tossicità sono stati eseguiti in seguito al raggiungimento della concentrazione target di azoto ammoniacale di 2000 mg<sub>N-NH4</sub>/l nell'influente del reattore SHARON.

Data la crescente inibizione registrata durante le prove in batch, gli incrementi di refluo reale nell'alimentazione del reattore SHARON sono stati inizialmente piccoli e frequenti.

Le curve di inibizione riportate nella Figura 7.18 sono relative alle prove in batch eseguite sulla biomassa ammonio-ossidante durante lo Step I della sperimentazione.



**Figura 7.18:** Curve di tossicità acuta relative alle prove batch eseguite sulla biomassa prelevata dal reattore SHARON durante lo Step I.

Si può osservare come la pendenza delle curve di inibizione sia gradualmente aumentata rispetto alle curve determinate in precedenza, indicando una maggiore inibizione della biomassa ammonio-ossidante, dovuta all'incremento dell'aliquota di refluo reale nell'influente, nonostante si sia riscontrato anche un andamento crescente della concentrazione dei solidi ( $45 \pm 4$  mg/l a 0/100 v/v,  $93 \pm 5$  mg/l a 10/90 v/v).

In particolare, mentre inizialmente l'inibizione acuta del 50% dell'attività batterica era determinata dal dosaggio di circa 15 ml di refluo reale, nelle prove successive sono stati sufficienti 8,6 ml per causare lo stesso grado di inibizione.

Ciò ha fatto ipotizzare un effetto tossico cronico e la conseguente maggiore sensibilità del sistema alle sostanze tossiche nel refluo reale, confermato dalle prestazioni del reattore durante l'intero Step II. Subito dopo ogni incremento della concentrazione di N-NH<sub>4</sub> nell'influente e del rapporto refluo reale/sintetico si è osservata una diminuzione dell'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale, anche se le buone prestazioni del sistema sono state ripristinate rapidamente.

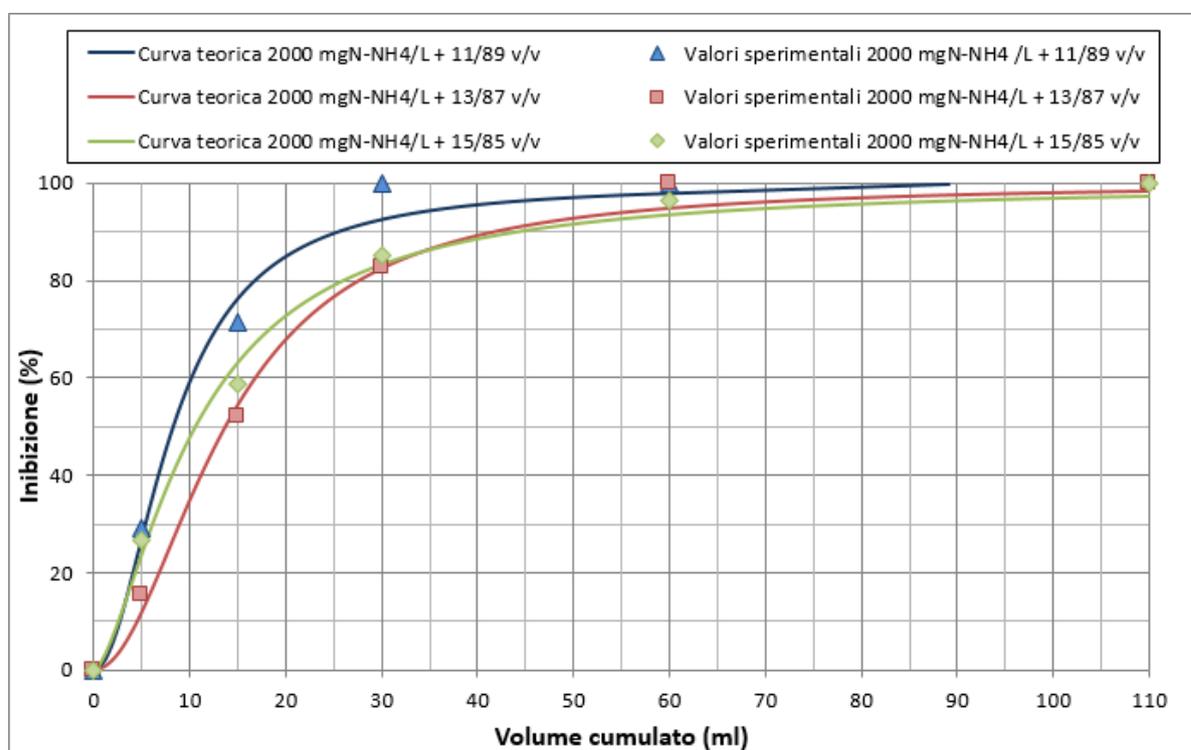
La massima inibizione della biomassa presente nel reattore SHARON si è misurata nella prova relativa alle condizioni operative del reattore SHARON di 2000 mg<sub>N-NH4</sub>/l influenti e un rapporto refluo reale/sintetico pari a 11/89 v/v, come conferma la pendenza della curva di

inibizione che risulta essere la massima tra tutte quelle determinate. In Figura 7.19 si mettono a confronto le curve di inibizione delle prove realizzate nello Step II, quando il rapporto volume reale/sintetico era 11/89, 13/87 e 15/85 v/v.

Si osserva un'inversione di tendenza dopo la prova realizzata quando l'aliquota di refluo reale nel reattore SHARON era dell'11%: la minore pendenza della curva al 13% rispetto a quella all'11% dimostra una minore inibizione della biomassa che potrebbe indicare una graduale acclimatazione al refluo reale e il superamento della tossicità cronica.

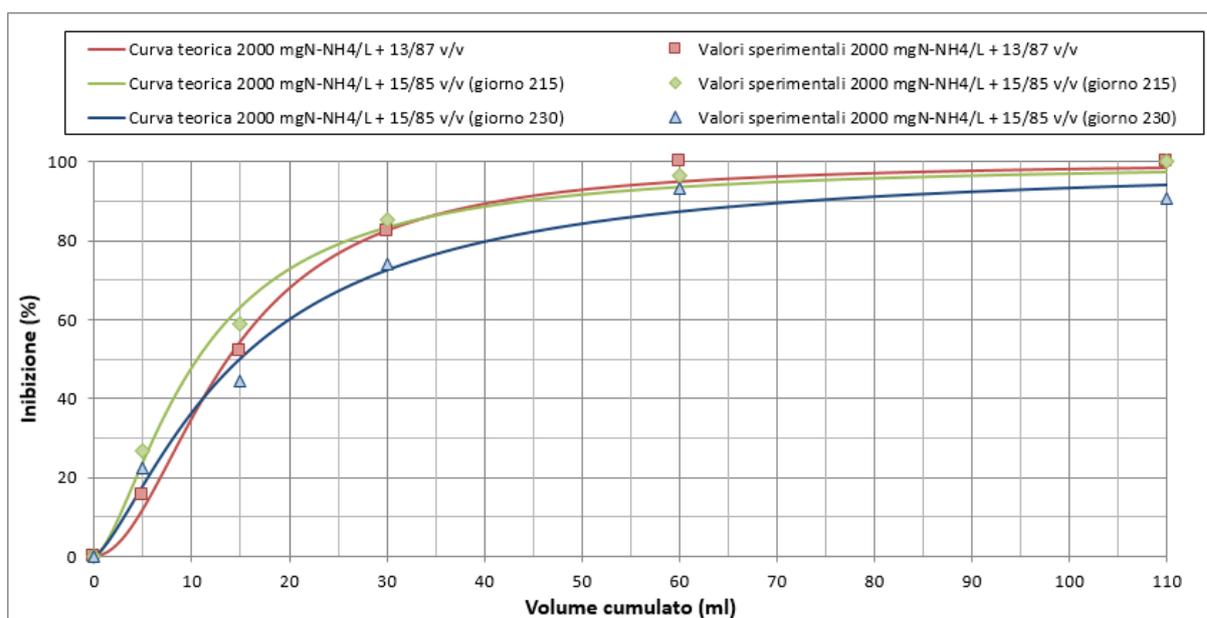
Le prestazioni del processo sono strettamente correlate alla concentrazione di biomassa autotrofa presente nel reattore SHARON, per cui a bruschi cali della concentrazione di biomassa nel sistema sono corrisposti analoghi cali nei rendimenti di rimozione dell'azoto ammoniacale.

Uno dei cali nella concentrazione di biomassa è quello avvenuto in seguito all'incremento del rapporto refluo reale/sintetico nell'alimentazione del reattore SHARON da 13/87 a 15/85 v/v (giorno 214), che ha comportato un peggioramento delle prestazioni del sistema. L'effetto inibente dovuto a tale incremento è stato evidenziato dalla prova batch eseguita il giorno 215, dove la pendenza della curva di inibizione risulta maggiore di quella determinata nella prova relativa al rapporto refluo reale/sintetico di 13/87 v/v.



**Figura 7.19:** Curve di tossicità acuta relative alle prove batch eseguite sulla biomassa prelevata dal reattore SHARON durante lo Step II, con un rapporto refluo/reale sintetico di 11/89, 13/87 e 15/85 v/v.

L'aumento del tempo di residenza idraulico (da 1 giorno a 1,25 giorni), in modo da trattenere maggiormente la biomassa all'interno del reattore, ha consentito il rapido ripristino del sistema e si è deciso pertanto di ripetere il test di tossicità acuta (giorno 230). L'inibizione della biomassa ammonio-ossidante è risultata inferiore confermando il miglioramento delle prestazioni del processo. Inoltre, l'inibizione della biomassa ammonio-ossidante era anche minore di quella ottenuta nella prova in batch eseguita quando l'influente del reattore SHARON aveva un rapporto refluo reale/sintetico di 13/87 v/v (Figura 7.20).



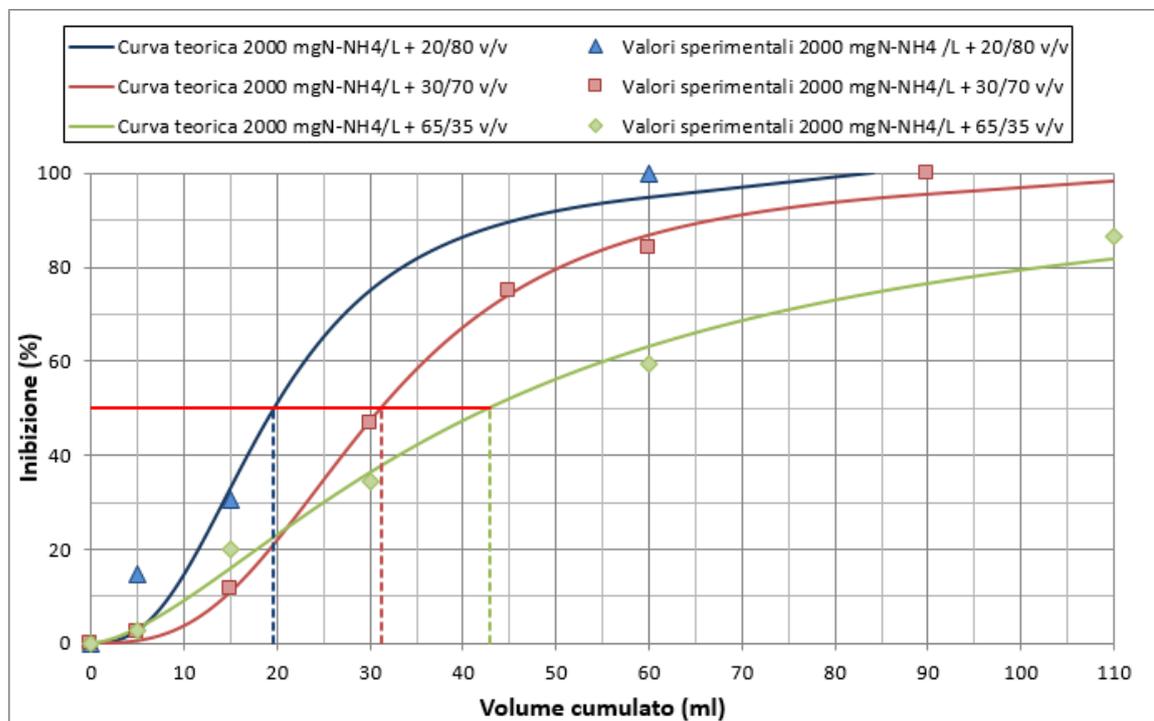
**Figura 7.20:** Confronto tra le curve di tossicità acuta relative al rapporto refluo reale/sintetico di 13/87 v/v e 15/85 v/v prima e dopo il ripristino del processo.

In seguito a quanto osservato durante le prove in batch si è deciso di modificare la strategia operativa e procedere con successivi incrementi dell'aliquota di refluo reale nell'alimentazione del reattore SHARON sempre frequenti ma più ampi rispetto a quelli precedentemente applicati.

Dall'osservazione della Figura 7.21, risulta evidente la progressiva acclimatazione della biomassa ai composti tossici presenti nel refluo reale: i ml di sostanza di prova necessari al raggiungimento del 50% di inibizione aumentano con i diversi rapporti refluo reale/sintetico applicati, passando da 19,7 ml (20/80 v/v) a 31,2 ml (30/70 v/v) e infine a 42,8 ml (65/35 v/v).

L'abbassamento delle curve, riscontrato nel grafico in seguito a variazioni delle condizioni dell'alimentazione sempre più ampie, suggerisce la scomparsa degli effetti dovuti alla

tossicità cronica e, a seguito della ormai quasi completa acclimatazione della biomassa al refluo reale, la riduzione degli effetti dovuti alla tossicità acuta.



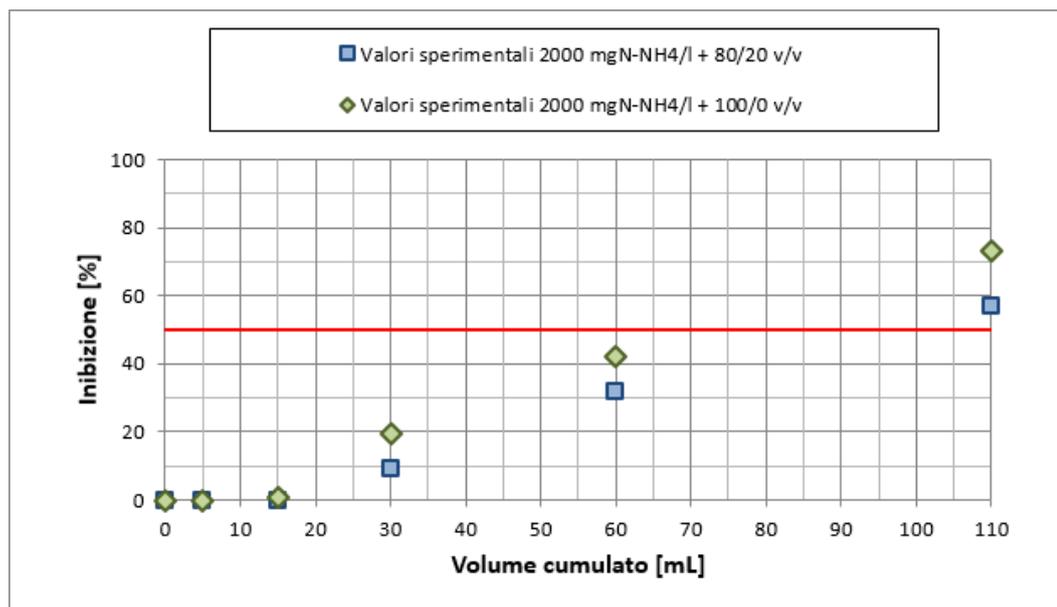
**Figura 7.21:** Curve di tossicità acuta relative alle prove batch eseguite sulla biomassa prelevata dal reattore SHARON con un rapporto refluo reale/sintetico di 20/80, 30/70 e 65/35 v/v.

La tolleranza crescente del processo SHARON verso i componenti tossici del refluo reale è stata confermata nell'ultima parte dello Step III.

Non è stato possibile interpolare i valori sperimentali delle prove di tossicità, eseguite quando nell'influente del reattore SHARON il rapporto refluo reale/sintetico era 80/20 e 100/0 v/v, e rappresentare l'inibizione con la "curva ad esse", probabilmente perché la parte iniziale della sigmoide prevede una crescita di tipo quasi esponenziale che non si riscontra nelle ultime due prove in batch.

Nel grafico in Figura 7.22 sono riportati pertanto solo i valori sperimentali di inibizione relativi a queste ultime due prove di tossicità.

L'acclimatazione ormai completa della biomassa ammonio-ossidante ai composti tossici contenuti nel refluo reale in questo caso non può vedersi dalla pendenza della curva ma può ugualmente essere valutata considerando la dose di refluo reale che comporta un'inibizione del 50%: dal grafico si vede che questa è superiore a 70 ml in entrambe le prove.



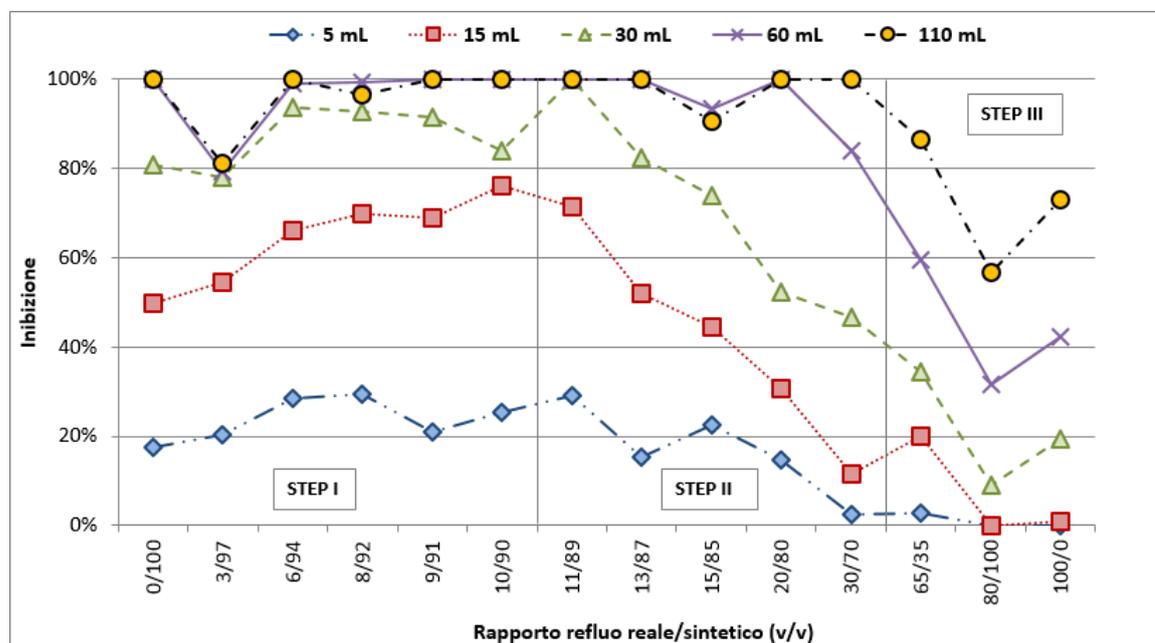
**Figura 7.22:** Valori sperimentali delle prove relative al rapporto refluo reale/refluo sintetico nell'influente del reattore SHARON di 80/20 e 100/0 v/v.

Il grafico in Figura 7.23 riassume l'inibizione ottenuta in tutte le prove di tossicità effettuate durante l'intera fase sperimentale, in funzione dei vari dosaggi della sostanza di prova.

Dal grafico si osserva come si è evoluta l'acclimatazione della biomassa ammonio-ossidante. Nello Step I il refluo reale è stato integrato al refluo sintetico con aggiunte piccole e ravvicinate, che hanno determinato sulla biomassa ammonio-ossidante non acclimatata un effetto di tossicità cronica. Tale effetto è risultato nelle prove di tossicità acuta effettuate inizialmente, durante le quali una stessa quantità di sostanza di prova ha determinato un'inibizione crescente all'aumentare dell'aliquota di refluo reale nell'influente al reattore SHARON.

La diminuzione degli effetti dovuti alla tossicità cronica si osservano nel grafico seguendo l'inibizione determinata da 15 ml di sostanza di prova che raggiunge il massimo nella prova in cui il rapporto refluo reale/refluo sintetico è di 10/90 v/v. Se si considerano 30 ml di sostanza di prova, l'inibizione diminuisce già dalle condizioni 13/87 v/v e, quando il rapporto refluo reale/refluo sintetico è di 80/20 o 100/0 v/v, non determinano neanche un'inibizione del 20%. Superati gli effetti dovuti alla tossicità cronica, come dimostrato dai risultati ottenuti durante i test di inibizione, il refluo reale nell'influente del reattore SHARON durante lo Step II è stato incrementato più rapidamente e con volumi maggiori, comunque ben tollerati dalla biomassa ormai acclimatata al refluo SARAS.

Nella prova eseguita quando il rapporto refluo reale/sintetico applicato era del 100/0 v/v, la dose maggiore di refluo reale testata (110 ml) ha inibito la biomassa del reattore SHARON del 70 % (100 % nello Step II).



**Figura 7.23:** Inibizione percentuale determinata dai diversi volumi di sostanza di prova dosati durante le prove batch effettuate nel corso della sperimentazione (Step I, II e III).

### 7.2.5 Conclusioni al termine della fase sperimentale

Durante tutta l'attività sperimentale, il processo SHARON si è dimostrato affidabile e in grado di tollerare l'aumento nell'influenza della concentrazione di azoto ammoniacale e dell'aliquota di refluo reale: la nitrosazione parziale è rimasta stabile, fornendo un effluente adatto per il successivo trattamento mediante il processo ANAMMOX. Anche le prove batch di tossicità hanno dimostrato la progressiva acclimatazione della biomassa ai composti tossici presenti nel refluo reale: la tossicità cronica osservata inizialmente è diminuita progressivamente, così come la tossicità acuta determinata durante le prove.

Nonostante il controllo del pH fosse attivo e impostato nell'intervallo 6,5-7,5, non si è osservato alcun dosaggio di acido o base durante gli Step II e III, in quanto il pH all'interno del reattore si è naturalmente assestato sul valore di  $6,8 \pm 0,2$ , indicando il raggiunto equilibrio tra l'elevato pH del refluo reale ( $9,4 \pm 0,8$ ) e la riduzione dell'alcalinità dovuta al processo di nitrosazione. Questo aspetto risulta molto importante perché l'autoregolazione del pH consentirebbe un risparmio economico dovuto ai minori costi operativi per il controllo del processo.

Il reattore ha mostrato prestazioni stabili anche in termini di rimozione del DOC da parte della biomassa eterotrofa: l'ossidazione del carbonio organico negli Step II e III non ha interferito in alcun modo sulla nitrosazione parziale, così come osservato da Mosquera-Corral *et al.* (2005), secondo i quali l'ossidazione dell'azoto ammoniacale nel processo SHARON è favorita dall'aggiunta di acetato come fonte di carbonio in un rapporto di 0,2 gC/gN, mentre è stato osservato un effetto inibitorio del 10 % sull'attività dei batteri ammonio-ossidanti quando l'acetato è stato dosato in un rapporto di 0,3 gC/gN. Il rapporto gC/gN nel refluo reale durante gli Step II e III è stato di circa 0,2-0,3 e, poiché non tutto il carbonio organico era rapidamente biodegradabile, l'effetto sul processo di nitrosazione è stato ulteriormente ridotto. Inoltre, la concentrazione dell'ossigeno disciolto è stata sempre mantenuta al di sopra 2 mg/l, tale da non comportare alcuna competizione tra la biomassa autotrofa ed eterotrofa. Infine, i calcoli effettuati sui bilanci di massa hanno mostrato una perdita trascurabile di azoto (< 5%), dovuta alla produzione ridotta di gas azotati (NO e N<sub>2</sub>O) in linea con i risultati descritti da Kampschreur *et al.* (2008) per il trattamento delle acque derivanti dal processo di disidratazione dei fanghi in un reattore SHARON-ANAMMOX a scala reale, dove le emissioni di NO e N<sub>2</sub>O dal reattore SHARON erano rispettivamente solo 0,2% e 1,7% del carico di azoto.

I risultati ottenuti in questa fase sperimentale sono stati presentati in forma orale in un convegno Internazionale organizzato dall'International Water Association (IWA) e pubblicati come articolo nei relativi atti:

S. Milia, G. Cappai, M. Perra, A. Carucci, (2011). *Biological Treatment of Nitrogen Rich Refinery Wastewater by Partial Nitritation (SHARON) Process*. The 8<sup>th</sup> International IWA Symposium On Waste Management Problems In Agro-Industries, 22-24 Giugno 2011, Izmir, TURCHIA.

Successivamente l'articolo, in forma leggermente modificata, è stato pubblicato sulla rivista scientifica "Environmental Technology", Vol. 33(13), pp.1477-1483. DOI: 10.1080/09593330.2012.660651 (Allegato 1 alla presente Tesi).

## 7.3 Ottimizzazione del processo SHARON in vista del trattamento successivo

Gli studi effettuati durante la precedente fase sperimentale hanno dimostrato che il processo SHARON è risultato robusto ed affidabile, riuscendo a garantire un effluente idoneo al successivo stadio del trattamento mediante il processo ANAMMOX, anche alla massima concentrazione di azoto ammoniacale testata (2000 mg/l), sia con un influente sintetico che con un influente costituito esclusivamente dal refluo reale proveniente dall'attività di raffinazione petrolifera e fornito dalla SARAS SpA.

La successiva sperimentazione ha voluto valutare la sua fattibilità come trattamento preliminare, oltre che nel sistema a doppio stadio SHARON-ANAMMOX, anche nel sistema combinato SHARON-denitrificazione eterotrofa convenzionale, qualora il processo ANAMMOX risultasse non applicabile a causa dell'estrema tossicità dei composti tossici presenti nel refluo reale.

Per questo è stato necessario ottenere la conversione spinta dell'azoto ammoniacale a nitrito. Il parametro che regola l'ossidazione dell'azoto ammoniacale a nitrito è il rapporto  $C_i/N-NH_4$  ( $C_i$ , carbonio inorganico nella forma  $HCO_3$ ): incrementare il suo valore da quello ottimale per l'integrazione del processo SHARON con il processo ANAMMOX, pari a 1, fino a 2 consente di ottenere un'efficienza di rimozione prossima al 100%.

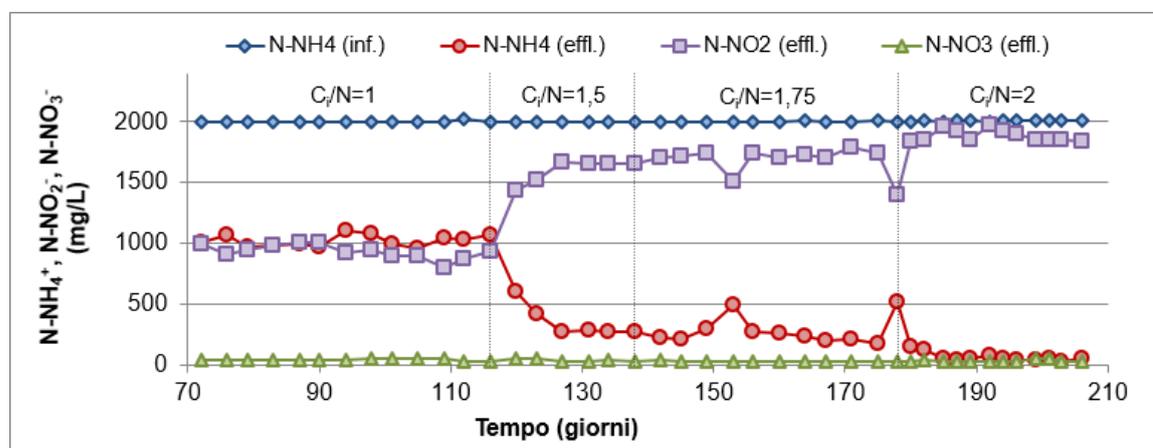
Si è valutato pertanto l'effetto dell'incremento graduale nell'influente di tale rapporto, dal valore di 1 a 2, sulle prestazioni del processo SHARON per il trattamento sia di un refluo sintetico (Run I), che del refluo reale proveniente dagli impianti di raffinazione petrolifera della SARAS (Run II), aventi entrambi concentrazione di azoto ammoniacale pari a 2000 mg<sub>N</sub>/l.

### 7.3.1 Run I

All'inizio del Run I il reattore è stato alimentato con un influente sintetico caratterizzato dal rapporto molare  $C_i/N$  pari a 1,0. L'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale osservata e la concentrazione di nitriti nell'effluente erano rispettivamente  $48,9 \pm 2,4$  % e  $932,9 \pm 59,4$  mg/l, con un corrispondente rapporto  $N-NO_2^-/N-NH_4^+$  nell'effluente di  $0,91 \pm 0,08$ . La produzione di nitrati è stata trascurabile e la concentrazione media nell'effluente era  $42,5 \pm 7,6$  mg/l, indicando la quasi totale eliminazione dei batteri nitrito-ossidanti dal sistema grazie agli effetti combinati della temperatura elevata e del basso valore del tempo di residenza idraulico

adottati (pari a 35 °C e 1,25 giorni, rispettivamente). L'effluente prodotto dal reattore SHARON è risultato idoneo per il successivo processo ANAMMOX, date le caratteristiche simili ad altri effluenti riportati in letteratura e sottoposti allo stesso trattamento (Van Dongen *et al.*, 2001; Ganigué *et al.*, 2007; Van Hulle *et al.*, 2010).

Il rapporto molare influente  $C_i/N$  è stato incrementato progressivamente e, data la maggiore disponibilità di carbonio inorganico, si è osservato un crescente aumento dell'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale. Anche la concentrazione di nitriti nell'effluente ha seguito lo stesso andamento ed è aumentata gradualmente raggiungendo il valore medio di  $1886 \pm 48$  mg/l quando il rapporto  $C_i/N$  è stato impostato a 2, così come il rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  nell'effluente che è passato dal valore medio di  $0,91 \pm 0,08$ , ottimale per il successivo trattamento ANAMMOX, a  $36,3 \pm 13,5$ , indicando l'elevata conversione dell'azoto ammoniacale a nitriti. La produzione di nitrati invece è sempre rimasta molto bassa, diminuendo leggermente al termine del Run I, con una concentrazione media nell'effluente pari a  $32,4 \pm 9,2$  mg/l, confermando la prevalenza dei batteri ammonio-ossidanti nel sistema rispetto ai nitrito-ossidanti. La Figura 7.24 riporta l'andamento generale del processo SHARON durante l'intero Run I.



**Figura 7.24:** Concentrazione di azoto ammoniacale (influyente ed effluente), nitriti (effluente) e nitrati (effluente) nel corso del Run I (refluo sintetico).

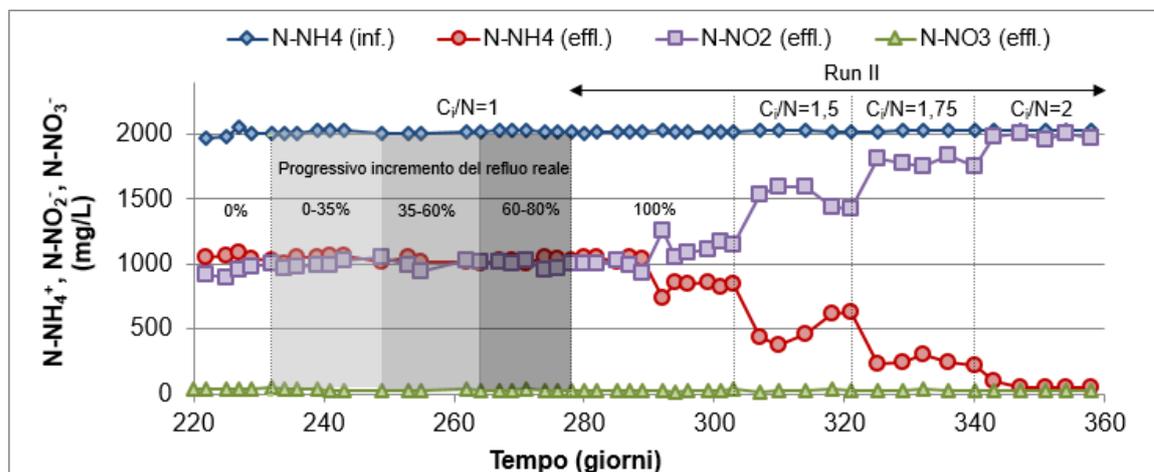
Al termine del Run I, quando il rapporto  $C_i/N$  era pari a 2, l'effluente del reattore SHARON era adatto per il successivo trattamento con il processo di denitrificazione eterotrofa che potrebbe essere attuato a scala reale senza alcun costo di investimento in quanto l'impianto di trattamento delle acque reflue presente nella sede della SARAS SpA risulta già dotato di una fase di denitrificazione. La sostanza organica necessaria per la fase di denitrificazione

potrebbe essere eventualmente integrata utilizzando il metanolo, disponibile come prodotto di scarto.

Per tutti i rapporti  $C_i/N$  testati, il pH si è automaticamente stabilizzato nell'intervallo ottimale, senza alcun dosaggio di acido o base, in tutto il Run I. Inoltre, i bilanci di massa hanno indicato una perdita trascurabile di azoto (sempre inferiore al 5% dell'azoto ammoniacale influente), dovuto probabilmente allo strippaggio dell'ammoniaca e alla produzione di  $N_2O$  e di NO.

### 7.3.2 Run II

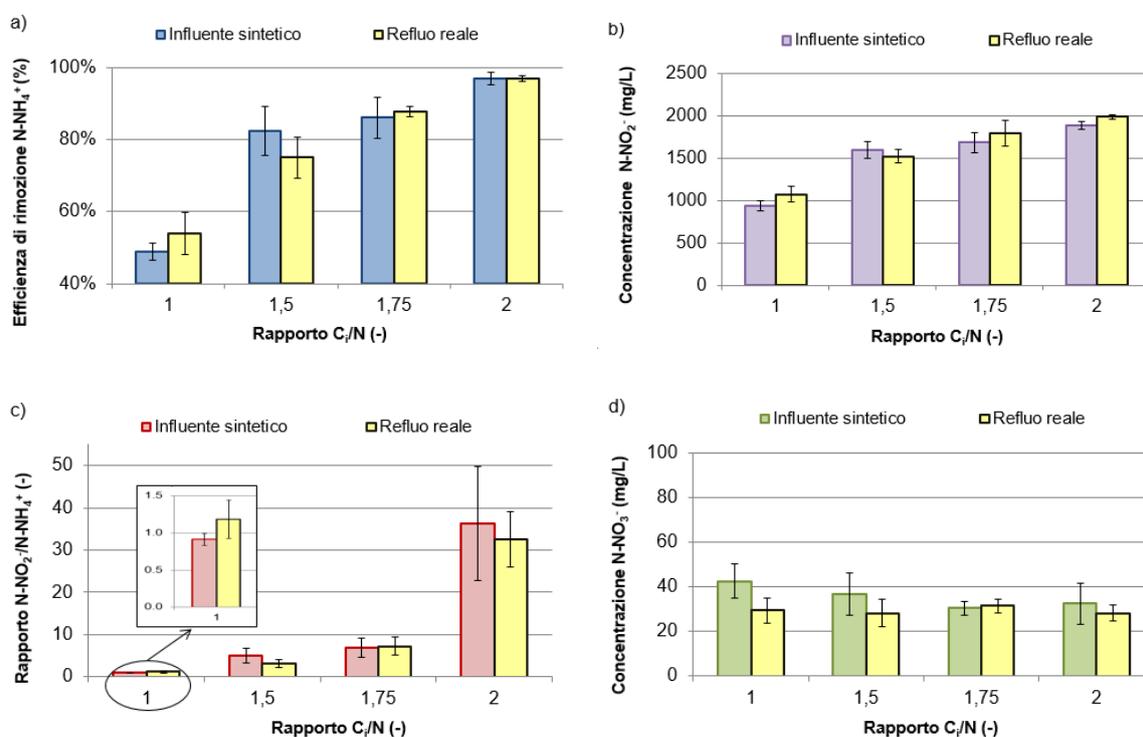
Per testare la fattibilità del processo SHARON come trattamento preliminare del refluo reale in vista del suo accoppiamento con il processo ANAMMOX, il rapporto molare  $C_i/N$  influente è stato impostato a 1 e aliquote crescenti del refluo sono state progressivamente alimentate al reattore SHARON, finché l'influente sintetico è stato completamente sostituito. La Figura 7.25 riporta i dati raccolti nella fase di integrazione del refluo reale e nel successivo Run II e mostra come, nonostante la tossicità acuta del refluo, la sua aggiunta graduale non ha comportato alcun peggioramento significativo delle prestazioni del processo, come già sperimentato nello studio precedente, dimostrandone la robustezza e l'affidabilità.



**Figura 7.25:** Andamento delle concentrazioni di azoto ammoniacale (influyente ed effluente), nitriti (effluente) e nitriti (effluente) durante la fase di integrazione del refluo reale e nel Run II.

Durante il Run II, il reattore è stato alimentato con il solo refluo reale e una concentrazione influente di 2000 mg/l. Quando il rapporto  $C_i/N$  era pari a 1, il reattore SHARON ha prodotto un effluente idoneo per il successivo trattamento ANAMMOX. L'efficienza di rimozione

media dell'azoto ammoniacale calcolata in condizioni stazionarie era  $54,0 \pm 5,8$  %, indicando l'ossidazione di poco più della metà dell'ammonio influente, confermata dalla concentrazione di nitriti pari a  $1073 \pm 94$  mg/l e dal corrispondente rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  di  $1,19 \pm 0,26$ . Come osservato nel corso del Run I, la produzione di nitrati è stata sempre molto bassa. Per valutare la possibilità di integrare il processo SHARON con la denitrificazione eterotrofa anche con il refluo reale, il rapporto molare influente  $C_i/N$  è stato incrementato progressivamente da 1,0 a 2,0. Gli stessi risultati positivi riscontrati durante il Run I sono stati ottenuti nel corso del Run II: anche in questo caso, l'aumento del rapporto molare  $C_i/N$  è stato accompagnato dall'aumento dell'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale (da  $54,0 \pm 5,8$  % ( $C_i/N = 1$ ) a  $96,9 \pm 0,9$  % ( $C_i/N = 2$ )). La Figura 7.26 mostra il confronto diretto delle prestazioni del processo nel trattamento dell'influente sintetico e del refluo reale, da cui si vede che lo stesso andamento è stato osservato per la concentrazione di nitriti che è aumentata da  $1073 \pm 94$  mg/l ( $C_i/N = 1$ ) fino a  $1983 \pm 21$  mg/l ( $C_i/N = 2$ ), mentre la concentrazione di nitrati nell'effluente è stata sempre inferiore a 35 mg/l durante tutto il Run II, confermando un'attività trascurabile dei batteri nitrito-ossidanti. L'accumulo dei nitriti nell'effluente ha determinato un incremento del rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  dal valore  $1,19 \pm 0,26$ , misurato quando il rapporto  $C_i/N$  influente era pari a 1, a  $32,6 \pm 6,5$ , in corrispondenza del rapporto  $C_i/N$  di 2.

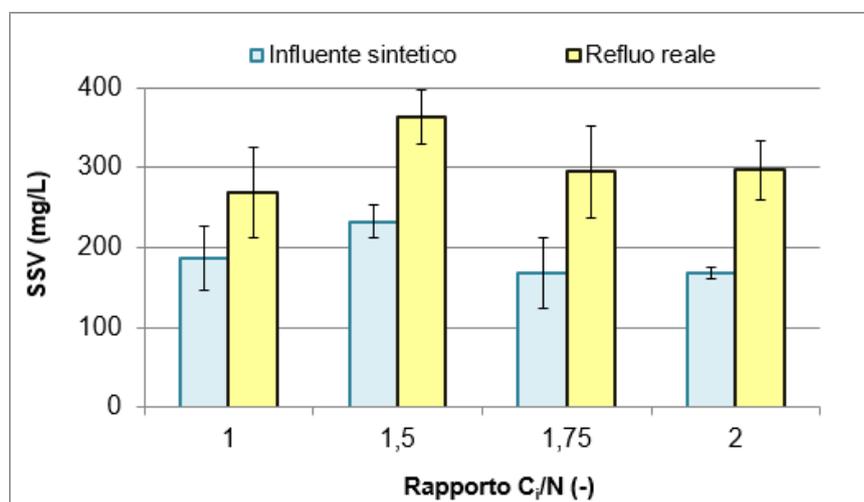


**Figura 7.26:** Effetto dell'incremento del rapporto  $C_i/N$  nell'influente sintetico e nel refluo reale sull'efficienza di rimozione (a), concentrazione di nitriti (b), rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  (c) e produzione di nitrati (d).

Al termine del Run II, l'effluente SHARON era adatto per il successivo trattamento mediante denitrificazione eterotrofa. Risultati simili sono stati riportati da Torà *et al.* (2014), che hanno raggiunto il 95 % di conversione dell'azoto ammoniacale influente in nitrito con l'applicazione del controllo automatico ad una vasca a fanghi attivi per la nitrificazione nel trattamento a scala reale delle acque derivanti dal processo di disidratazione dei fanghi, e da Kulikowska e Bernat (2013), che sono riusciti ad ottenere la quasi totale ossidazione (fino al 99%) dell'ammonio a nitriti, con una produzione trascurabile di nitrati, in un reattore SBR per il trattamento del percolato di discarica.

In generale, i risultati ottenuti hanno dimostrato che la presenza di sostanze tossiche nel refluo reale fornito dalla SARAS SpA non ha influito negativamente sulle prestazioni complessive del processo e attestano l'effettiva fattibilità del processo SHARON come trattamento preliminare nel sistema a doppio stadio SHARON-ANAMMOX o SHARON-denitrificazione eterotrofa.

A differenza degli altri parametri di processo, il rapporto molare  $C_i/N$  non sembra correlato con la concentrazione di solidi sospesi volatili nel reattore, che ha mostrato lo stesso andamento sia nel Run I che nel Run II (Figura 7.27).



**Figura 7.27:** Effetto dell'incremento del rapporto  $C_i/N$  nell'influente sintetico e nel refluo reale sulla concentrazione dei solidi sospesi volatili.

Osservando il grafico si nota come, a parità di rapporto  $C_i/N$  applicato, la concentrazione media dei SSV sia risultata maggiore durante il Run II, quando il reattore SHARON era alimentato con il refluo reale. Ciò è stato probabilmente determinato dallo sviluppo della biomassa eterotrofa nel reattore SHARON, in conseguenza alla disponibilità di substrato organico presente nel refluo reale influente, la cui presenza è stata confermata dall'elevata

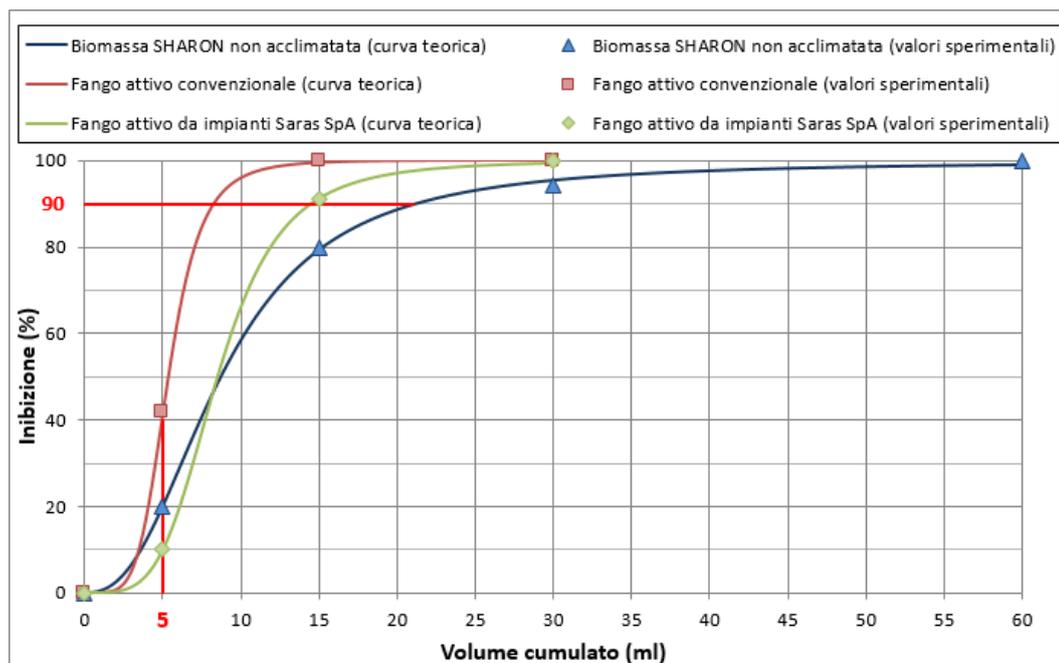
rimozione del DOC misurata che è aumentata dal  $64,3 \pm 2,3$  % ( $C_i/N = 1$ ) all' $84 \pm 0,5$  % ( $C_i/N = 2$ ).

Ancora una volta, il pH si è stabilizzato all'interno dell'intervallo ottimale senza alcun bisogno di controllo durante tutto il Run II e la perdita di azoto per strippaggio di ammoniaca e la produzione di  $N_2O$  o  $NO$  è stata trascurabile (inferiore al 5% dell'azoto influente), come confermato dai bilanci di massa e in accordo con studi precedenti (Kampschreur *et al.*, 2008).

### 7.3.2.1 Test in batch di tossicità

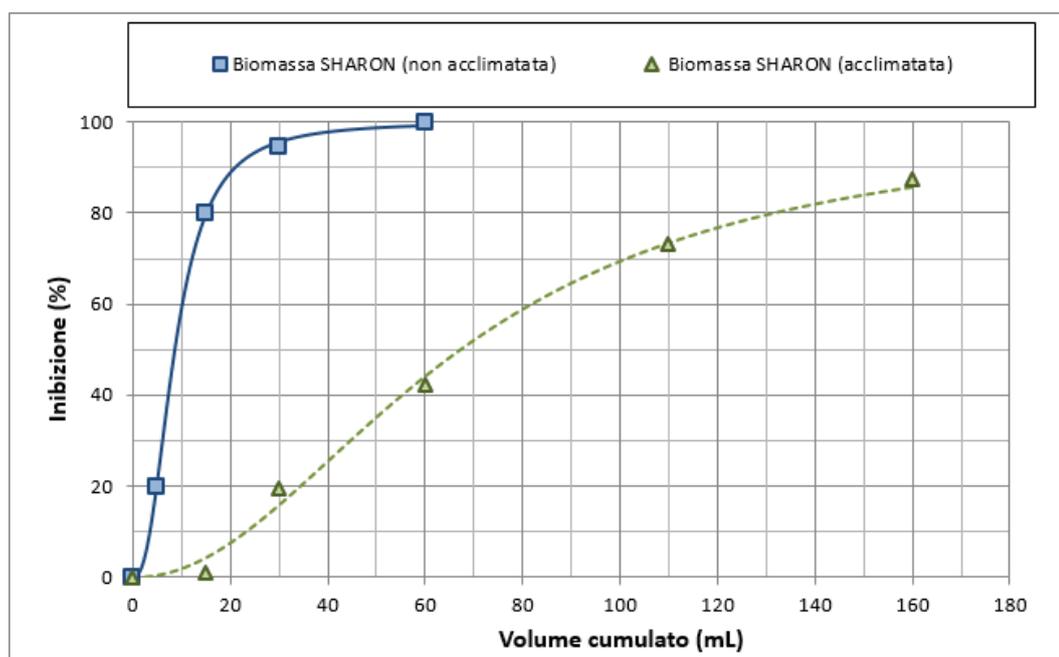
Prima di integrare il refluo reale nell'influente sintetico, dato il potenziale tossico del refluo reale, già attestato nello studio precedente, che potrebbe inibire l'attività dei microrganismi e compromettere le prestazioni del reattore irreversibilmente, si sono effettuati dei test in batch per valutare nuovamente l'inibizione della biomassa SHARON non acclimatata alle sostanze tossiche del refluo reale (giorno 110). Le prove sono state effettuate anche sui fanghi attivi prelevati dall'impianto di trattamento delle acque reflue urbane di Cagliari e su quelli provenienti dall'impianto di trattamento delle acque reflue industriali della SARAS SpA, per valutare l'effetto del refluo reale anche su biomasse differenti.

Le curve di inibizione ricavate durante le prove sono riportate nella Figura 7.28. Per bassi dosaggi della sostanza di prova, la biomassa che ha risentito meno della presenza dei composti tossici è stata quella prelevata dagli impianti della SARAS SpA, probabilmente perché già esposta a tali composti, seppure in concentrazioni molto ridotte (le acque reflue industriali che arrivano al trattamento sono prima raccolte in grandi vasche di equalizzazione che riducono notevolmente le concentrazioni delle sostanze tossiche). Se si considerano 5 ml della sostanza di prova, si osserva che l'aggiunta di tale volume ha comportato un'inibizione del 10% sulla biomassa proveniente dall'impianto SARAS, del 20% sulla biomassa SHARON non acclimatata al refluo reale e di ben il 40% sulla biomassa prelevata nell'impianto di Cagliari. Quest'ultima ha risentito probabilmente anche dell'effetto delle elevate concentrazioni di azoto ammoniacale ( $2000 \text{ mg}_N/l$ ), alle quali invece la biomassa del reattore SHARON era già acclimatata. Per dosaggi superiori ai 10 ml, invece, la biomassa SHARON è risultata la più resistente: l'inibizione del 90% è infatti stata raggiunta in seguito all'aggiunta di circa 20 ml, mentre per i fanghi attivi dall'impianto delle acque reflue urbane di Cagliari sono stati sufficienti appena 8 ml per ottenere la stessa inibizione (15 ml per i fanghi dell'impianto SARAS).



**Figura 7.28:** Curve di inibizione relative alla biomassa SHARON non acclimatata al refluo reale e ai fanghi attivi prelevati dall'impianto di trattamento delle acque reflue urbane di Cagliari e dell'impianto delle acque reflue industriali della SARAS SpA.

Un'altra prova di inibizione è stata eseguita sulla biomassa prelevata dal reattore SHARON in seguito alla completa sostituzione dell'influente sintetico con il refluo reale, una volta raggiunte le condizioni stazionarie il giorno 295 (Run II). L'acclimatazione della biomassa ai composti tossici del refluo reale, già verificata dalle prestazioni del reattore SHARON, è stata confermata anche dai risultati ottenuti durante la prova (Figura 7.29).



**Figura 7.29:** Curve di inibizione relative alla biomassa SHARON non acclimatata e acclimatata al refluo reale.

Dal grafico si osserva che, dopo l'effettiva acclimatazione della biomassa, il volume di refluo reale necessario per il raggiungimento dell'inibizione del 10% è risultato 23,3 ml invece dei 3,6 iniziali, mentre il dosaggio di 67,3 ml ha causato l'inibizione del 50% che prima era raggiunta con soli 8,7 ml di refluo reale. Si osservi inoltre come il massimo dosaggio effettuato (160 ml) non comporti neppure il 90% di inibizione della biomassa, per il raggiungimento della quale era sufficiente un dosaggio di appena 20 ml.

### 7.3.3 Conclusioni al termine della fase sperimentale

In questo studio è stata valutata l'eventuale applicazione del processo SHARON per il trattamento delle acque reflue industriali di raffineria, fornite dalla SARAS SpA e caratterizzate da elevate concentrazioni di azoto ammoniacale (2000 mg/l) e la presenza di sostanze tossiche come cianuri, fenoli e solfuri, in vista del successivo trattamento mediante il processo ANAMMOX o di denitrificazione convenzionale (nel caso in cui la biomassa ANAMMOX risultasse troppo sensibile ai composti tossici).

I risultati hanno dimostrato che il rapporto molare influente  $C_i/N$  gioca un ruolo chiave nella regolazione delle prestazioni del processo SHARON: a seconda del rapporto applicato  $C_i/N$ , il reattore SHARON ha prodotto un effluente adatto per il successivo trattamento ANAMMOX ( $C_i/N = 1$ ) o di denitrificazione ( $C_i/N = 2$ ). Inoltre, la temperatura di esercizio prescelta (35 °C) non richiederebbe alcun costo aggiuntivo nel trattamento a scala reale, poiché il refluo reale utilizzato per la sperimentazione ha una temperatura superiore a 60 °C che potrebbe anche consentire il recupero di calore in eccesso.

Tali risultati positivi sono stati ottenuti alimentando il reattore SHARON inizialmente con un influente sintetico e successivamente con il refluo reale, dopo averlo gradualmente sostituito al precedente, e le prove di tossicità acuta, effettuate sulla biomassa prelevata dal reattore SHARON, hanno dimostrato l'effettiva acclimatazione alle sostanze tossiche del refluo.

Inoltre, è stato dimostrato che lo sviluppo della biomassa eterotrofa, a causa della disponibilità del substrato organico nel refluo reale, non ha causato alcun effetto negativo sull'attività della biomassa SHARON, anche perché l'ossigeno non è mai stato un fattore limitante ( $OD > 2$  mg/l). La concentrazione di nitrati nell'effluente è risultata essere molto bassa ( $< 45$  mg<sub>N</sub>/l), dimostrando la perfetta selezione della biomassa ammonio-ossidante, così come la perdita di azoto a causa di emissioni gassose di NO e N<sub>2</sub>O, che è stata sempre inferiore al 5% dell'azoto influente.

Infine, l'autoregolazione del pH nell'intervallo ottimale, senza alcun dosaggio di acido o base e per tutti i rapporti C<sub>i</sub>/N testati, fa ipotizzare un ulteriore risparmio nei costi di gestione per il trattamento del refluo SARAS a scala reale.

A dimostrazione della qualità del lavoro svolto, i presenti risultati sono stati presentati in forma orale e pubblicati in forma di articolo negli atti del convegno internazionale organizzato dal Global NEST (Network of Environmental Science and Technology) (Allegato 2 alla presente Tesi):

S. Milia, M. Perra, A. Muntoni and A. Carucci, (2013). *Partial nitrification of nitrogen rich refinery wastewater (sour water) with different IC/N molar ratios*. The 13<sup>th</sup> International Conference on Environmental Science and Technology, 5-7 Settembre 2013, Atene, Grecia.

Inoltre, l'articolo è stato accettato per la pubblicazione in forma leggermente modificata sulla rivista internazionale *Desalination and Water Treatment*.

# CAPITOLO VIII

## Processo ANAMMOX: risultati e discussione

Un altro importante studio effettuato nel corso del Dottorato di Ricerca ha riguardato il secondo stadio del sistema combinato SHARON-ANAMMOX per il trattamento dei reflui industriali da raffinazione petrolifera, provenienti dal processo di desolforazione delle acque acide (sour water) degli impianti della SARAS SpA. I risultati ottenuti a riguardo saranno illustrati nel presente Capitolo.

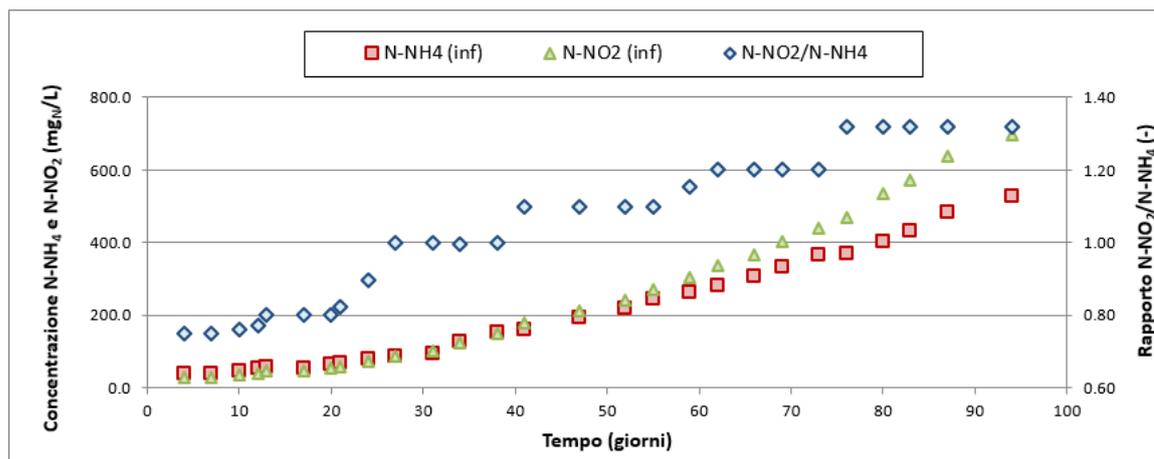
Il lavoro svolto è stato suddiviso in tre Fasi, in funzione delle strategie operative adottate in conseguenza alle difficoltà riscontrate dalla biomassa ANAMMOX ad adattarsi agli elevati carichi di azoto e all'effluente del reattore SHARON, alimentato con il refluo reale proveniente dagli impianti della SARAS SpA e contenente pertanto i composti tossici che lo caratterizzano.

### 8.1 Fase I

Durante la Fase I, il reattore ANAMMOX, dopo essere stato avviato utilizzando l'inoculo della biomassa proveniente dall'impianto di Rotterdam, è stato alimentato con un mezzo sintetico, avente la composizione indicata nel Capitolo 6.2.3, al fine di acclimatare gradualmente la biomassa alle alte concentrazioni di azoto ammoniacale e nitroso e agli elevati carichi corrispondenti. Il carico volumetrico di azoto totale in ingresso al reattore, indicato con l'acronimo NLR (Nitrogen Loading Rate), è stato pertanto incrementato secondo una legge esponenziale (Lopez *et al.*, 2008), applicata alla concentrazione di ammonio e nitrito nell'influente.

Durante questa fase, il rapporto molare  $N\text{-NO}_2/N\text{-NH}_4$  è stato inizialmente mantenuto al valore di 0,75, al fine di facilitare l'avviamento e evitare accumuli di nitrito all'interno del reattore ANAMMOX che avrebbero potuto inibire la biomassa. Successivamente tale valore è stato gradualmente incrementato fino a raggiungere il valore ottimale di 1,32, derivante dalla stechiometria della reazione.

L'andamento delle concentrazioni di ammonio e nitriti e del rapporto  $N\text{-NO}_2/N\text{-NH}_4$  durante la Fase I è rappresentato in Figura 8.1.



**Figura 8.1:** Concentrazione di azoto ammoniacale e nitriti e del rapporto N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub> nel corso della Fase I.

Dal grafico si osserva come l'andamento delle concentrazioni segua una legge esponenziale; i valori massimi raggiunti in questa prima Fase sono di 695,5 mg<sub>N</sub>/l e 526,9 mg<sub>N</sub>/l, rispettivamente per il nitrito e l'ammonio. Inizialmente, quando il rapporto N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub> adottato era pari a 0,75, la maggiore concentrazione di azoto ammoniacale ha consentito la rimozione del substrato senza che all'interno del reattore vi fosse alcun accumulo di nitrito. Con l'incremento del rapporto N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub>, la concentrazione di azoto nitroso è aumentata nell'effluente fino a raggiungere quella dell'azoto ammoniacale, in corrispondenza del rapporto pari a 1, senza però che la biomassa ANAMMOX risentisse dell'effetto di tale incremento. Il rapporto è stato pertanto incrementato ulteriormente e gradualmente fino al raggiungimento del valore stechiometrico di 1,32.

Per valutare l'andamento del processo, sono stati determinati nel corso della Fase i valori relativi al carico di azoto (ammoniacale e nitroso) rimosso NRR (Nitrogen Removal Rate) e al carico di nitriti in uscita dal reattore NitDR (Nitrite Discharge Rate), espressi in kg<sub>N</sub>/(m<sup>3</sup>·giorno).

Secondo Lopez *et al.* (2008), quando il processo si svolge in condizioni ottimali, la curva del NLR tende a coincidere con quella del NRR e vale la relazione:

$$NLR \cong NRR = Ae^{\mu t}$$

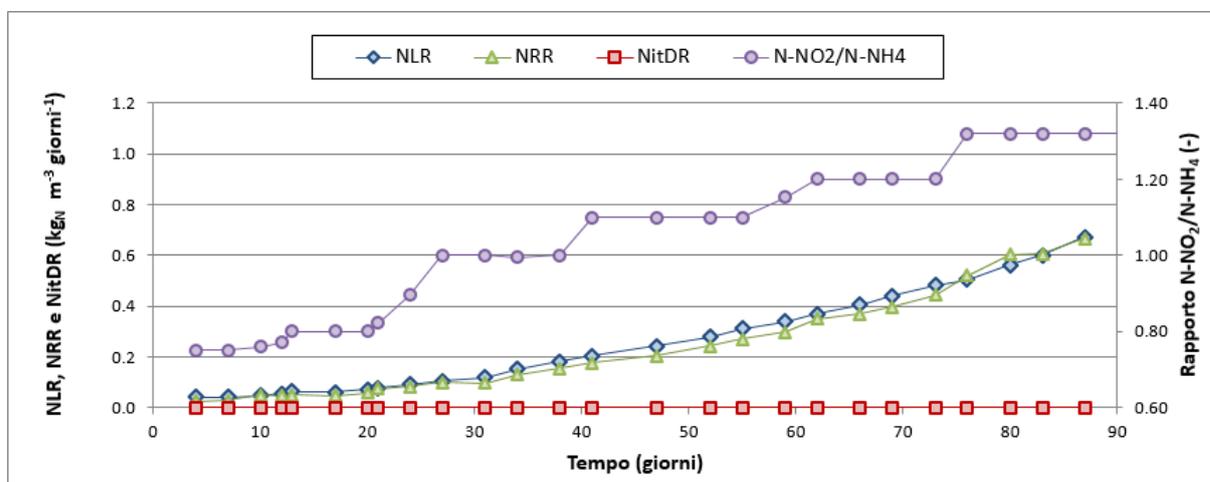
con:

A = fattore pre-esponenziale, pari al carico di azoto alimentato al tempo t=0 [kg/(m<sup>3</sup> giorno)];

t = tempo [giorni]

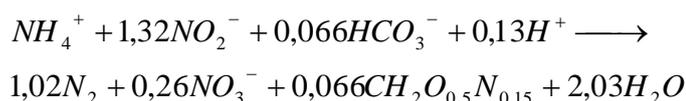
μ = 0,022 [giorni<sup>-1</sup>], tasso di crescita dei microrganismi ANAMMOX, considerato più basso del tasso massimo (μ<sub>teorico</sub>=0,065 [giorni<sup>-1</sup>]);

In Figura 8.2 è riportato l'andamento di tali parametri nel corso della Fase I, in relazione con il rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  applicato.



**Figura 8.2:** Andamento di NLR, NRR e NitDR al variare del rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  nel corso della Fase I.

All'inizio della Fase si può notare che il NLR e il NRR seguono un incremento quasi parallelo, sebbene la curva del NRR si mantenga sempre leggermente al di sotto di quella del NLR: tale scostamento è dovuto al basso rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  applicato. Le due curve infatti si sovrappongono nel momento in cui viene raggiunto il valore stechiometrico di 1,32 (giorno 76), che permette la conversione completa dell'azoto ammoniacale e nitroso, come indicato dalla reazione:



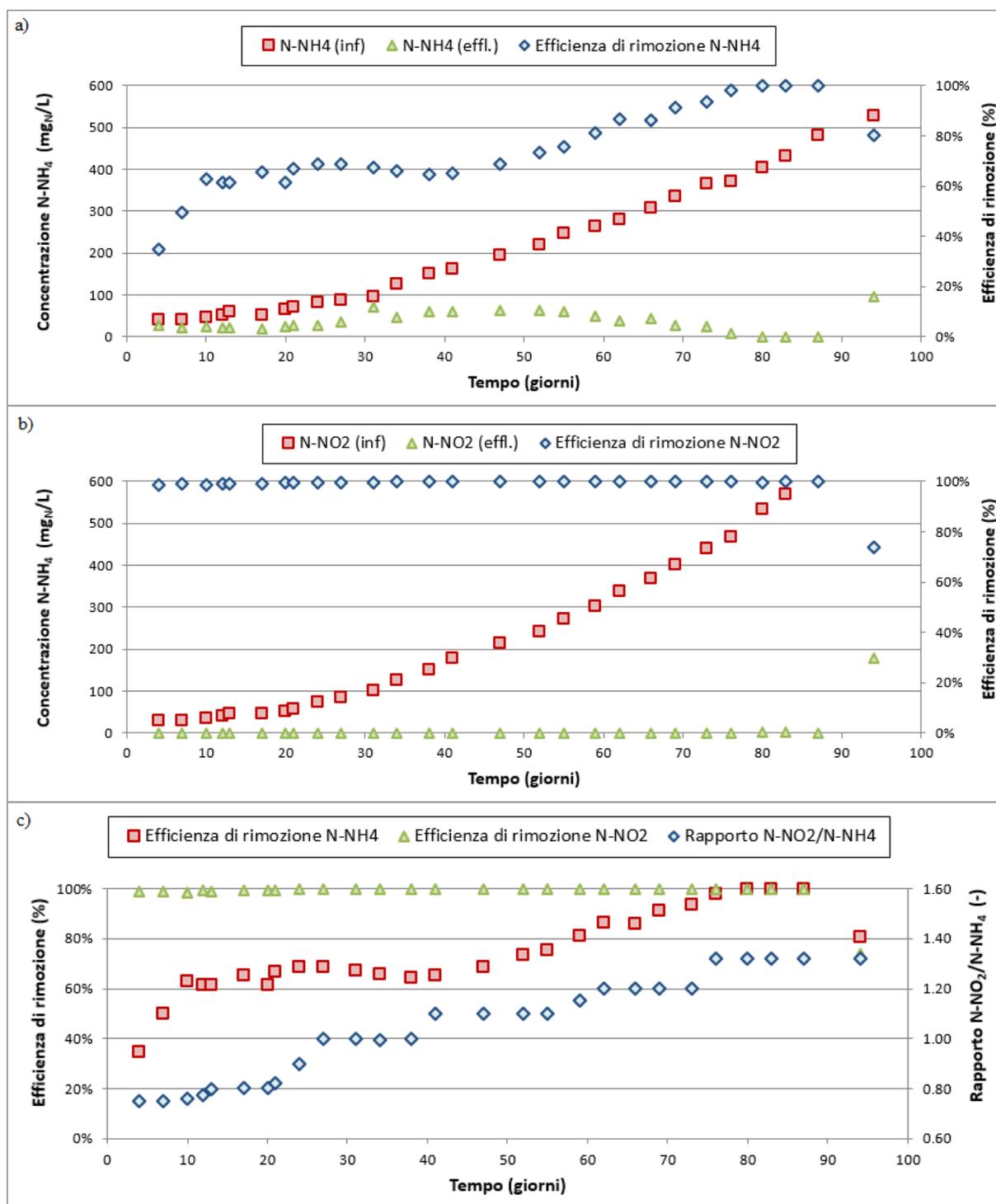
Un rapporto inferiore non consente la rimozione completa dell'azoto ammoniacale in ingresso, come mostrato nella Figura 8.3(a): si può notare che l'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale risulta inferiore all'80% fino al giorno 55, in cui si è raggiunto un valore del rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  pari a 1,10.

Una volta raggiunto il rapporto di 1,32, l'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale si stabilizza intorno al 100%, ma, in seguito all'inibizione causata dall'introduzione dell'effluente SHARON, si osserva un crollo improvviso. Tale fenomeno verrà analizzato dettagliatamente in seguito.

Per quanto riguarda la rimozione dei nitriti, l'efficienza è sin dall'inizio sempre elevata e al di sopra del 98% (Figura 8.3(b)), mentre diminuisce in corrispondenza dell'inibizione della

biomassa al termine della Fase, a causa dell'aumento della concentrazione di nitriti nell'effluente, che invece era sempre stata nulla, o comunque trascurabile, fino al giorno 94.

In Figura 8.3(c) è possibile osservare le efficienze di rimozione dell'azoto ammoniacale e dei nitriti al variare del rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$ .

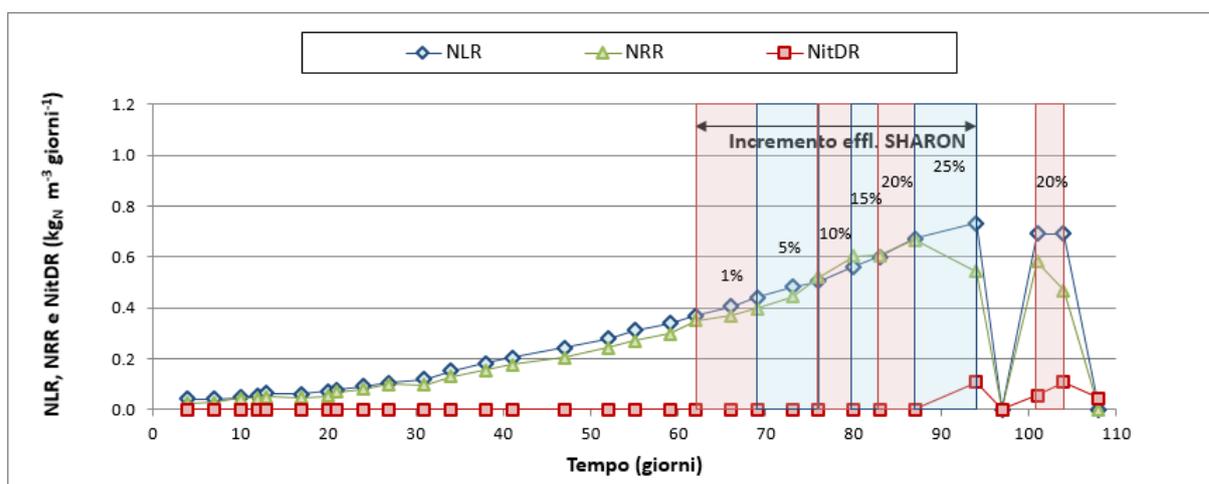


**Figura 8.3:** Concentrazione influente ed effluente di azoto ammoniacale (a) e nitriti (b) e rispettive efficienze di rimozione e variazione delle efficienze di rimozione di azoto ammoniacale e nitriti in relazione all'incremento del rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  (c) nel corso della Fase I.

Il giorno 62 si è introdotta nell'influente sintetico una piccola aliquota di effluente proveniente dal reattore SHARON, alimentato con il refluo SARAS.

Il grafico in Figura 8.4 mostra come il refluo reale sia stato integrato nel mezzo sintetico, dall'1% sul volume totale fino al 20%, in un periodo di 25 giorni.

L'incremento al 25%, effettuato il giorno 87, ha però causato un'inibizione della biomassa: probabilmente la rapidità con la quale si è agito nell'incrementare la quota parte dell'effluente SHARON contemporaneamente all'aumento della concentrazione di azoto ammoniacale e nitroso (da 636,9  $\text{mg}_{\text{N-NO}_2}/\text{l}$  e 482,5  $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{l}$  a 695,5  $\text{mg}_{\text{N-NO}_2}/\text{l}$  e 526,9  $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{l}$ ) non ha consentito alla biomassa di acclimatarsi al nuovo refluo, causando perciò la presenza di nitriti nell'effluente. In seguito a tale evento è stato opportunamente diminuito il NLR, mantenendo però nell'influente un'aliquota del 20% di refluo SHARON, la quale è stata in seguito completamente rimossa a causa della continua inibizione della biomassa nonostante le nuove condizioni. Infatti, alla fine della Fase, è stato necessario ridurre notevolmente il carico in ingresso per consentire una totale ristabilizzazione dell'attività batterica, prima dell'inizio della Fase II.

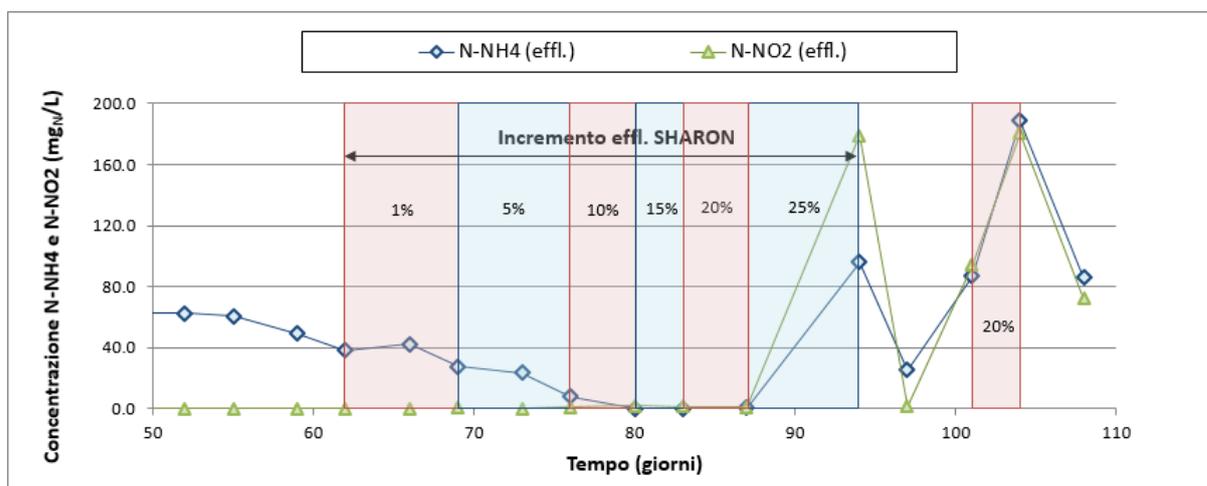


**Figura 8.4:** Incremento dell'aliquota dell'effluente dal reattore SHARON nell'influente sintetico.

Dal grafico è possibile notare come, in corrispondenza del giorno 94, in seguito all'incremento al 25% dell'aliquota di effluente SHARON, si sia riscontrata una decrescita della curva relativa al NRR e, ovviamente, un aumento di quella del NitDR, causate dall'inibizione della biomassa sottoposta in poco tempo a consistenti variazioni della composizione del refluo. A causa di tale inibizione il carico in ingresso è stato sensibilmente ridotto. Per consentire la ripresa regolare dell'attività batterica, l'alimentazione è stata arrestata per qualche giorno; inoltre il volume del reattore è stato diluito con acqua di rete per

abbassare la concentrazione di nitriti all'interno del sistema, la quale, a causa del rallentamento del processo ANAMMOX, aveva raggiunto valori superiori a quelli tollerati dalla biomassa.

Si può evidentemente notare nel grafico in Figura 8.5 che il giorno 94, in seguito all'aumento al 25% della quota parte di refluo SHARON e delle concentrazioni di ammonio e nitrito nell'influente, il processo subisce un immediato arresto: si riscontra la presenza di una concentrazione di 179 mg<sub>N-NO2</sub>/l e di 96 mg<sub>N-NH4</sub>/l nell'effluente del reattore.

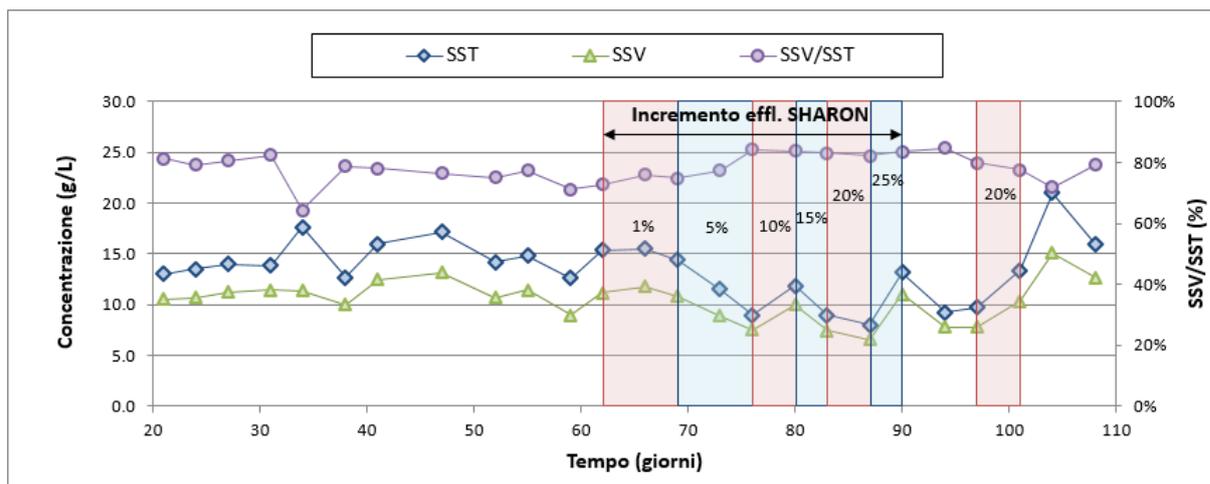


**Figura 8.5:** Concentrazioni di azoto nitroso e ammoniacale durante il periodo di integrazione dell'effluente SHARON in alimentazione.

Il processo non ha mostrato miglioramenti neanche in seguito agli interventi eseguiti: diluizione del volume del reattore con acqua di rete, riduzione del carico di azoto totale, riportato al valore precedente al verificarsi dell'inibizione, e riduzione della percentuale di refluo SHARON nell'influente. Il giorno 101, dopo aver ridotto il carico di azoto in ingresso, sono stati riscontrati nitriti nell'effluente, in concentrazione pari a 94 mg/l. Si è proceduto pertanto con l'eliminazione del refluo SHARON dall'alimentazione e con un'ulteriore riduzione del carico di azoto in ingresso.

Dopo il blocco del processo, è stata riscontrata inoltre una diminuzione dei solidi, in particolare del rapporto SSV/SST. Si è osservata, inoltre, una diminuzione della biomassa granulare: ad occhio nudo i solidi si presentavano fioccosi, con molto materiale in sospensione e maleodoranti. Per cercare di ripristinare la normale attività batterica si è provveduto ad integrare la biomassa con altra biomassa ANAMMOX conservata in cella frigo, immettendo nel reattore circa 100 ml di solidi.

La Figura 8.6 mostra il trend relativo alla concentrazione dei solidi nel corso della Fase.

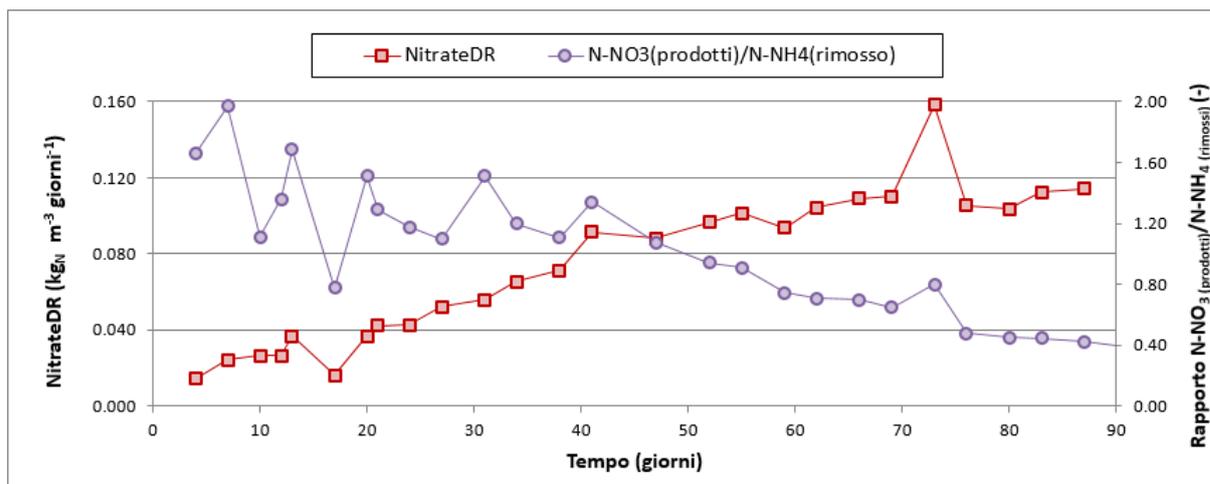


**Figura 8.6:** Concentrazione di SST, SSV e rapporto SSV/SST nella Fase I.

Osservando il grafico si nota un andamento relativamente costante fino al giorno 69: le concentrazioni medie risultano infatti di  $14,6 \pm 1,6$  g<sub>SST</sub>/l e  $11,1 \pm 1,0$  g<sub>SSV</sub>/l. La biomassa ANAMMOX è, infatti, caratterizzata da bassi tassi di crescita, pertanto è possibile osservare un consistente aumento della concentrazione di solidi solo nel lungo periodo. Successivamente le concentrazioni di SST e SSV diminuiscono visibilmente, probabilmente in seguito all'integrazione dell'effluente SHARON e all'effetto inibitorio delle sostanze tossiche in esso contenute. I valori medi delle concentrazioni, dal giorno 73 al giorno 101, sono infatti pari a  $10,2 \pm 1,8$  g<sub>SST</sub>/l e  $8,4 \pm 1,5$  g<sub>SSV</sub>/l.

Il picco che si osserva a fine fase, in corrispondenza del giorno 104, è invece dovuto all'aggiunta di solidi nel reattore, in seguito alla loro diminuzione a causa del suddetto blocco. Un altro importante parametro di cui si è tenuto conto per valutare le prestazioni del processo durante l'intera Fase I è la produzione di nitrati. Com'è noto dalla stechiometria infatti, l'ossidazione dell'azoto ammoniacale ad azoto gassoso da parte della biomassa ANAMMOX produce una piccola quantità di nitrati, pari a circa il 10% dell'azoto totale in ingresso, quando la reazione si svolge in condizioni ottimali, ossia quando il rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  è pari a 1,32.

In Figura 8.7 è possibile osservare la produzione di nitrati, in termini di Nitrate Discharge Rate, che rappresenta il carico volumetrico di nitrati prodotti. Tale parametro è messo a confronto col rapporto  $N\text{-NO}_3\text{prodotti}/N\text{-NH}_4\text{rimosso}$ , il quale dovrebbe essere teoricamente pari a 0,26.



**Figura 8.7:** Andamento del NitrateDR e del rapporto  $N\text{-NO}_3(\text{prodotti})/N\text{-NH}_4(\text{rimosso})$  nella prima Fase.

La produzione di nitrati misurata riguarda i soli nitrati prodotti durante la reazione, in quanto la formula utilizzata per il calcolo esclude quelli introdotti nel reattore con l'alimentazione. Infatti, in questa prima Fase, la presenza di nitrati nell'influente è stata necessaria per evitare l'eventuale riduzione dei solfati a solfuri che risultano essere tossici per i batteri ANAMMOX.

È inoltre possibile affermare che non si ha produzione di nitrati dovuta a nitrificazione: l'ossigeno nell'influente è stato rimosso con l'insufflazione di azoto gassoso che consente lo strippaggio dell'eventuale ossigeno presente.

Si può osservare come la produzione di nitrati cresca nella prima fase della sperimentazione, in conseguenza all'aumento del carico di azoto alimentato al reattore, fino a qualche giorno prima del raggiungimento del rapporto  $N\text{-NO}_2^-/N\text{-NH}_4^+$  ottimale di 1,32, (giorno 76). Si può osservare infatti che in questo periodo il NitrateDR si assesta intorno al valore di  $0,109 \pm 0,004$   $\text{kg}_{N\text{-NO}_3}/(\text{m}^3 \cdot \text{giorno})$ , escludendo il picco del giorno 76, ma si ha in seguito un crollo dovuto all'inibizione della biomassa di cui discusso precedentemente. Il rapporto  $N\text{-NO}_3\text{prodotti}/N\text{-NH}_4\text{rimosso}$  risulta all'inizio inspiegabilmente molto elevato rispetto a quello stechiometrico. L'andamento è poi in netta decrescita, fino alla fine della Fase dove purtroppo, a causa dell'inibizione riscontrata, non è possibile verificare se il trend negativo viene mantenuto o meno. Si può tuttavia notare, nonostante i pochi dati disponibili, che il rapporto  $N\text{-NO}_3\text{prodotti}/N\text{-NH}_4\text{rimosso}$  risulta superiore al valore stechiometrico di 0,26, rimanendo a fine Fase leggermente al di sopra di 0,4. Tale fenomeno è stato osservato in letteratura da numerosi ricercatori, sebbene non esaustivamente argomentato (Tabella 8.1).

**Tabella 8.1:** Rapporto N-NH<sub>4</sub>rimosso/N-NO<sub>2</sub>rimossi/N-NO<sub>3</sub>prodotti in letteratura (Van Hulle, 2010).

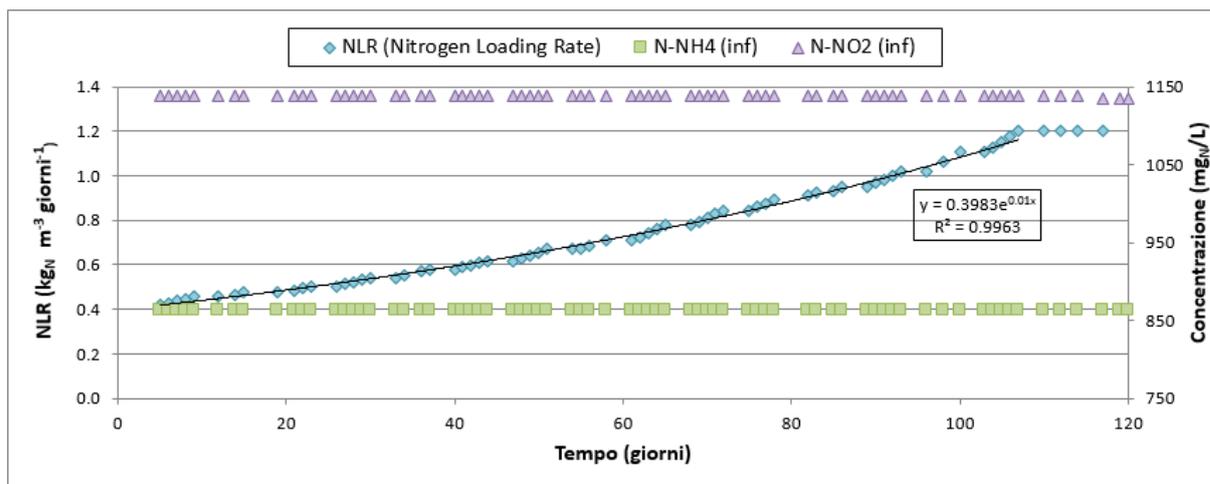
Reattore	Influente	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> :NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> :NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Referenze
SBR	Digestione anaerobica	1:1,38:0,32	Fux <i>et al.</i> , 2002
Reattore a letto fisso	Sintetico	1:1,2:0,33	Tsushima <i>et al.</i> , 2007
MBR	Refluo zootecnico	1:1,67:0,53	Yamamoto <i>et al.</i> , 2008
MBR	Sintetico	1:1,26:0,33	Yamamoto <i>et al.</i> , 2008

## 8.2 Fase II

Sulla base dei risultati ottenuti durante la Fase precedente, la ricerca è proseguita dando una particolare attenzione al processo ANAMMOX, al fine di chiarire se fosse effettivamente possibile il trattamento del refluo industriale della SARAS SpA col sistema combinato SHARON-ANAMMOX. Nella Fase I, il carico di azoto alimentato al reattore è stato incrementato aumentando le concentrazioni di azoto ammoniacale e nitroso nell'influente seguendo una legge di tipo esponenziale, mentre il rapporto N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub> è stato gradualmente aumentato fino al valore ottimale di 1,32. Nonostante ciò, a causa dell'inibizione seguita all'integrazione con l'effluente proveniente dal processo SHARON, il massimo carico di azoto trattato è stato di 0,670 kg<sub>N</sub>/(m<sup>3</sup> giorno) e, dopo le modifiche apportate al termine la Fase I, il valore del carico di azoto, all'inizio della Fase II, è stato ridotto al valore di 0,4 kg<sub>N</sub>/(m<sup>3</sup> giorno).

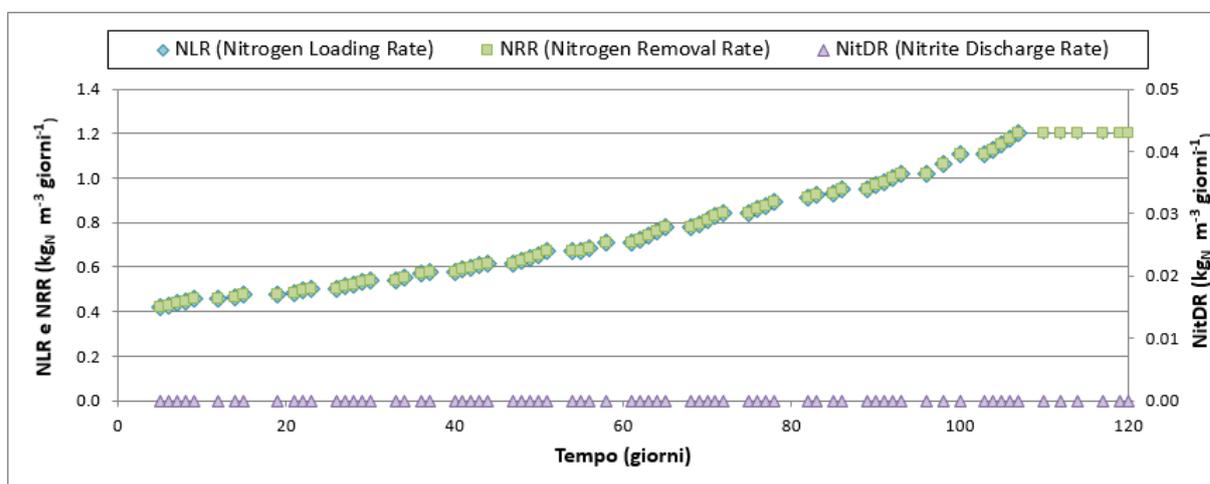
Si è deciso pertanto di adottare una diversa strategia di alimentazione: l'incremento del carico di azoto è avvenuto sempre secondo una legge esponenziale, ma le concentrazioni di nitriti e azoto ammoniacale nell'influente sono state fissate ai valori massimi di 1138 mg<sub>N-NO<sub>2</sub></sub>/l e 862 mg<sub>N-NH<sub>4</sub></sub>/l (Figura 8.8), in vista delle caratteristiche dell'effluente del processo SHARON (alimentato con il refluo reale alla concentrazione di 2000 mg<sub>N-NH<sub>4</sub></sub>/l), con un rapporto N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub> pari a quello stechiometrico di 1,32. Il carico è stato incrementato modificando giornalmente la durata della fase di alimentazione e quindi la portata influente, evitando che la biomassa venisse esposta a brusche variazioni di concentrazioni. Il carico di azoto iniziale è stato applicato al reattore impostando una durata della fase di alimentazione di 120 minuti, la quale è stata incrementata fino al valore previsto a regime di 400 minuti, consentendo una portata influente giornaliera di 1,2 l/giorno.

In questo modo si è riusciti a trattare il massimo carico di azoto previsto, pari a 1,2 kg<sub>N</sub>/(m<sup>3</sup> giorno), senza osservare alcuna inibizione della biomassa.



**Figura 8.8:** Incremento del carico di azoto (NLR) alimentato al reattore secondo legge esponenziale e concentrazione influente dell'azoto nitroso e ammoniacale durante la Fase II.

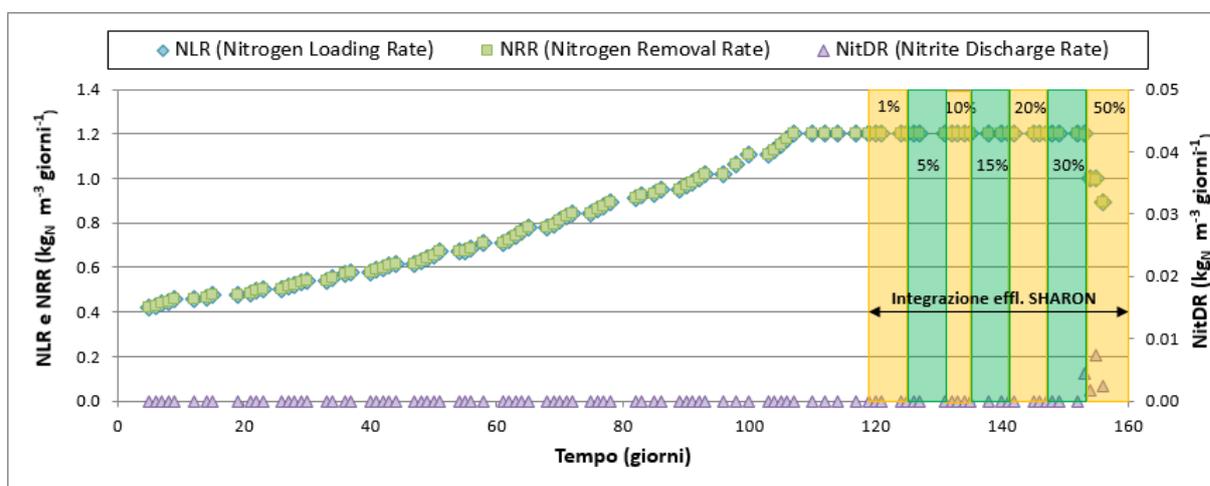
L'andamento dei principali parametri rappresentativi delle prestazioni del processo ANAMMOX è mostrato in Figura 8.9: in particolare, si osserva come praticamente tutto l'azoto in ingresso al reattore venisse rimosso (le curve del carico di azoto in ingresso NLR, e del carico di azoto -ammoniacale e nitroso- rimosso NRR, coincidono), e come il carico di nitriti nell'effluente (NitDR) sia stato sempre trascurabile.



**Figura 8.9:** Andamento del carico di azoto in ingresso al reattore (NLR) e di azoto rimosso (NRR) e di nitriti (NitDR) nell'effluente.

In presenza del solo refluo sintetico, il processo ANAMMOX ha garantito la totale rimozione dell'azoto ammoniacale e di quello nitroso. In particolare, si è osservata una positiva correlazione tra il rapporto  $N\text{-NO}_2/N\text{-NH}_4$  nell'influente e le efficienze di rimozione, in accordo con la stechiometria del processo.

Una volta raggiunto il valore del carico massimo di azoto previsto e verificato il corretto funzionamento del processo, il giorno 117 si è deciso di cominciare a sostituire gradualmente il mezzo sintetico con l'effluente proveniente dal reattore dedicato al processo SHARON, a sua volta alimentato con il refluo reale. La scelta di integrare il refluo sintetico con aliquote crescenti dell'effluente dal processo SHARON in modo graduale è stata nuovamente dettata dalla volontà di favorire l'acclimatazione della biomassa ai composti tossici presenti nel refluo reale, considerando la sensibilità di tali microrganismi e soprattutto la loro lenta velocità di crescita (Figura 8.10).



**Figura 8.10:** Andamento del carico di azoto in ingresso al reattore (NLR), di azoto rimosso (NRR) e di nitriti (NitDR) nell'effluente durante la Fase II, compresa la fase di integrazione dell'influenza sintetica con l'effluente del processo SHARON.

Le prestazioni del processo ANAMMOX, nonostante l'introduzione dell'effluente proveniente dal processo SHARON nell'alimentazione, non hanno subito variazioni in termini di carichi di azoto rimossi (NRR), né in termini di carichi di azoto nitroso scaricati nell'effluente (NitDR), fino ad una percentuale di refluo reale del 30% (Tabella 8.2).

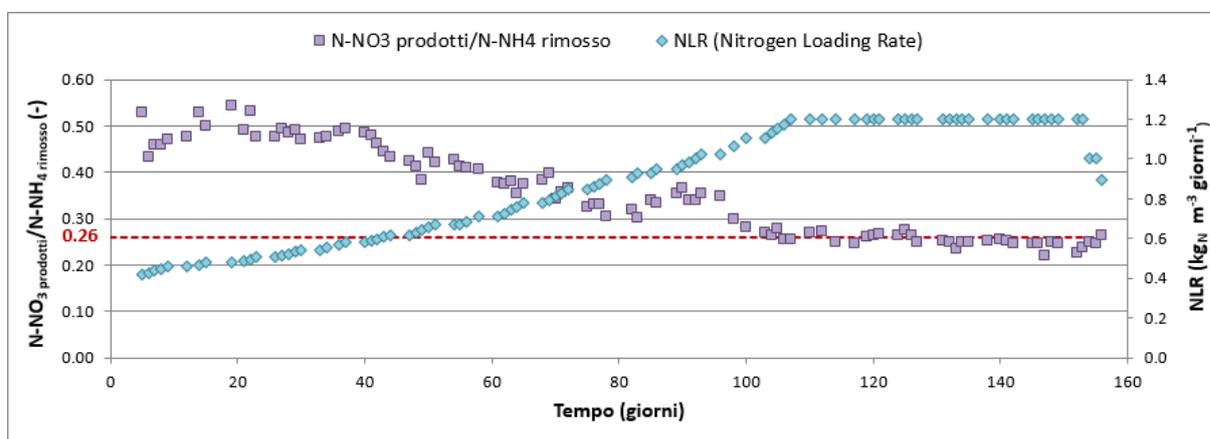
**Tabella 8.2:** Durata degli intervalli di integrazione dell'effluente SHARON nel mezzo sintetico.

Aliquota refluo proveniente dallo SHARON	Giorni operativi	Durata (giorni)
1%	119-124	5
5%	125-131	6
10%	132-135	3
15%	136-140	4
20%	141-146	5
30%	147-152	5

L'incremento dal 30% al 50% dell'aliquota di refluo SHARON nell'influente ha però causato un pressoché immediato peggioramento delle prestazioni del processo ANAMMOX, con un rapido sfaldamento degli aggregati granulari, una drastica riduzione delle efficienze di rimozione dell'ammoniaca e dei nitriti ed un conseguente accumulo di questi ultimi nel reattore, con valori al di sopra della soglia di tossicità per i microrganismi ANAMMOX.

Al fine di ripristinare il corretto funzionamento del processo, è stato necessario alimentare il reattore con il solo refluo sintetico e diminuire notevolmente il carico di azoto in ingresso, modificando la durata della fase di alimentazione, fino al valore di  $0,36 \text{ kg}_N/(\text{m}^3 \text{ giorno})$ , constatando la necessità di una ulteriore e nuova strategia di alimentazione per garantire realmente l'acclimatazione graduale della biomassa alle concentrazioni delle sostanze tossiche del refluo SARAS.

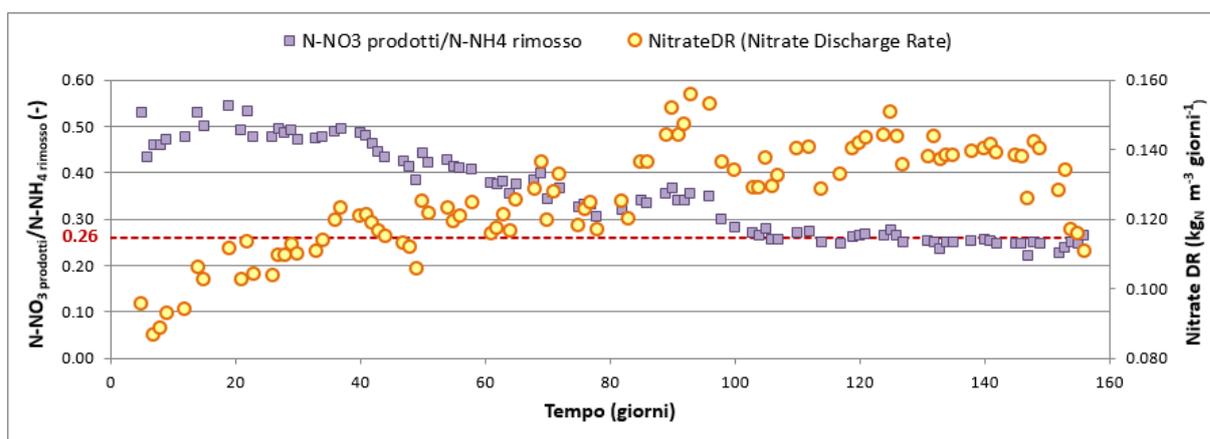
Durante l'intera Fase II, è stata comunque monitorata la produzione di nitrati, a conferma del buon funzionamento del processo, il cui andamento è riportato in Figura 8.11. A differenza della Fase I, non vi è stata alcuna necessità di introdurre nitrati nell'alimentazione in quanto la concentrazione nel reattore è stata, da subito, tale da evitare l'eventuale riduzione dei solfati a solfuri, tossici per i batteri ANAMMOX ( $373,2 \text{ mg}_{N-NO_3}/\text{l}$  all'inizio della Fase II).



**Figura 8.11:** Produzione di nitrati osservata durante la Fase II.

Dal grafico risulta evidente che inizialmente la produzione è risultata superiore a quella stechiometrica, caratterizzata da un rapporto  $N-NO_3\text{prodotti}/N-NH_4\text{rimosso}$  pari a 0,26. L'andamento di tale rapporto è stato comunque decrescente per tutto il graduale incremento del carico di azoto in ingresso al reattore e denota un chiara stabilizzazione sul valore teorico al raggiungimento del valore massimo del carico, indicando un perfetto funzionamento del sistema.

Considerando il carico giornaliero di nitrati prodotti durante il processo (Figura 8.12), si può constatare un incremento nella prima parte della Fase, dovuto all'incremento del carico di azoto nel reattore, e un successivo assestamento intorno al valore medio di  $0,138 \pm 0,005 \text{ kg}_{\text{N-NO}_3}/(\text{m}^3 \text{ giorno})$ , in seguito al raggiungimento del massimo carico di azoto alimentato e in corrispondenza del rapporto  $\text{N-NO}_3\text{prodotti}/\text{N-NH}_4\text{rimosso}$  di 0,26. Si noti inoltre che tale valore medio conferma una produzione di nitrati pari a circa il 10% del carico di azoto totale, come previsto dalla stechiometria.



**Figura 8.12:** Andamento del NitrateDR e del rapporto  $\text{N-NO}_3\text{prodotti}/\text{N-NH}_4\text{rimosso}$  durante la Fase II.

La concentrazione dei solidi, durante l'intera Fase II, non è variata particolarmente (Figura 8.13). I valori medi delle concentrazioni medie dei SST e SSV risultano infatti di  $11,0 \pm 2,1 \text{ g}_{\text{SST}}/\text{l}$  e  $8,3 \pm 2,3 \text{ g}_{\text{SSV}}/\text{l}$ . Rispetto alla fase precedente, tali valori risultano inferiori (nella Fase I  $14,6 \pm 1,6 \text{ g}_{\text{SST}}/\text{l}$  e  $11,1 \pm 1,0 \text{ g}_{\text{SSV}}/\text{l}$ ), nonostante questo non abbia avuto alcun effetto sulle prestazioni del processo. La maggiore concentrazione di solidi nella parte iniziale della Fase II è probabilmente la conseguenza dell'incremento di biomassa, effettuato al termine della Fase I, al fine di accelerare il ripristino del sistema dopo l'inibizione osservata. Non sembra vi sia stata alcuna particolare correlazione tra la concentrazione di solidi e l'incremento di effluente SHARON nel mezzo sintetico, anche se si nota chiaramente una diminuzione di questi in seguito all'accumulo di nitriti, avvenuto il giorno 153, probabilmente a causa dello sfaldamento dei granuli osservato.

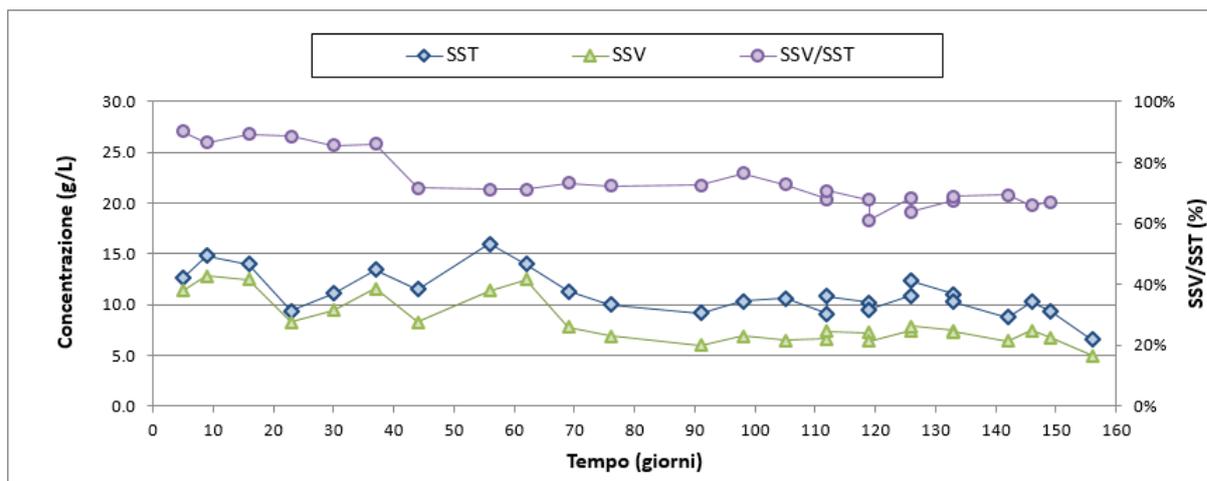


Figura 8.13: Concentrazione di SST e SSV e rapporto SSV/SST nella Fase II.

### 8.2.1 Test in batch di tossicità

Prima di incrementare il rapporto effluente SHARON/refluo sintetico, al fine di determinare la massima Attività Specifica della biomassa ANAMMOX presente nel reattore (SAA) e valutare l'effetto dei composti tossici presenti nel refluo reale su di essa, sono stati eseguiti dei test in batch. La biomassa prelevata dal reattore è stata lavata e risospesa in una soluzione buffer, tale da garantire per tutta la durata della prova un pH pari a 7,8, ottimale per i microrganismi ANAMMOX e compreso nel range del reattore. Le condizioni anaerobiche sono state raggiunte tramite l'insufflazione di azoto gassoso prima dell'integrazione del substrato (ammonio e nitrito). La massima SAA è stata calcolata dalla massima pendenza della retta descritta dalla produzione cumulata di azoto gassoso ( $N_2$ ) nel tempo, rispetto alla concentrazione della biomassa.

La prima prova è stata eseguita quando il reattore era alimentato con il solo influente sintetico, risospendendo la biomassa in due soluzioni buffer differenti: la prima senza alcuna aggiunta di refluo reale (bianco di riferimento), la seconda con una minima quantità di refluo reale (1% del volume totale), senza alcuna ulteriore integrazione di azoto ammoniacale, in modo da valutare solo l'effetto inibente delle sostanze tossiche in esso contenute. L'esito della prova ha rivelato una diminuzione della massima attività specifica della biomassa esposta al refluo reale, con una inibizione, rispetto all'attività di riferimento, del 15,5%.

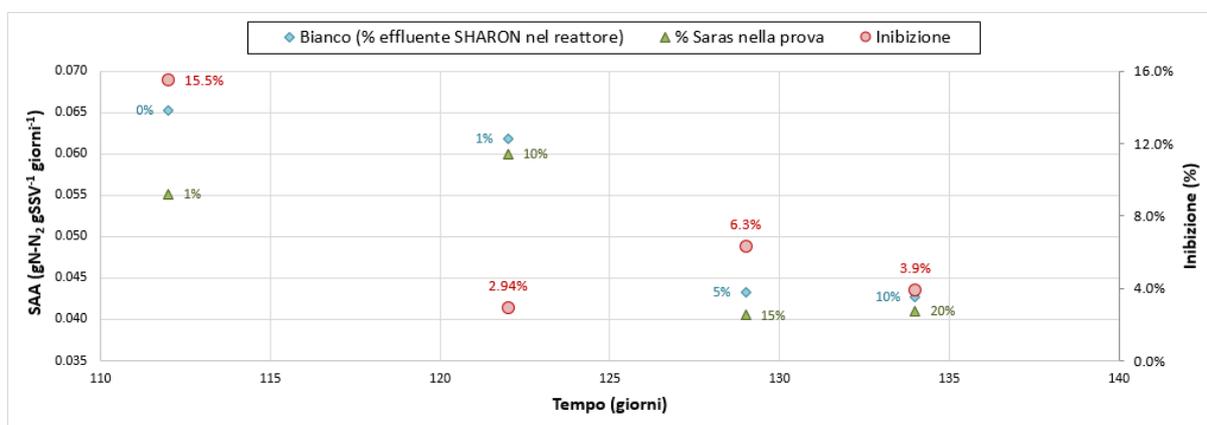
La prova successiva è stata realizzata quando la biomassa del reattore ANAMMOX era già stata esposta all'1% di effluente SHARON e, pertanto, tale condizione è stata riportata nella prova del bianco di riferimento. La percentuale di refluo reale di cui si è voluta testare la

tossicità è stata in questo caso del 10%. L'inibizione osservata, pari al 2,94%, ha fatto sperare in una parziale tolleranza della biomassa ai composti tossici presenti nel refluo reale, ma, visti comunque i risultati della prova precedente, si è provveduto ad incrementare l'influente sintetico con il solo 5% dell'effluente SHARON.

Il giorno 129 è stata effettuata un'ulteriore prova sulla biomassa acclimatata al 5% di effluente SHARON nell'influente. L'esposizione di questa al 15% di refluo reale ha determinato un'inibizione dell'attività del 6,3%, maggiore di quella precedente ma sempre molto bassa.

L'ultima prova è quella relativa alle condizioni operative del reattore alimentato con un influente contenente il 10% di effluente SHARON; i risultati hanno evidenziato un'inibizione del 3,9% della biomassa, in seguito all'incremento del 20% di refluo reale.

Nel modificare le condizioni operative del reattore si è data più importanza all'inibizione determinata in ciascuna situazione, piuttosto che ai valori della massima SAA riscontrati sulla biomassa acclimatata nelle stesse condizioni del reattore. In realtà, osservando il grafico in Figura 8.14, si vede come solo apparentemente la biomassa ANAMMOX non ha risentito della presenza del refluo reale: i valori della massima SAA misurati nelle due diverse condizioni durante la stessa prova non si discostano molto l'uno dall'altro (escludendo il primo test) e il valore dell'inibizione osservata è sempre molto basso, indicando una bassa tossicità acuta, ma si nota chiaramente come la massima SAA diminuisca nel tempo, evidenziando una probabile tossicità cronica. I risultati dei test di tossicità hanno confermato il successivo blocco del sistema: gli incrementi dell'aliquota di effluente SHARON effettuati sono stati sicuramente troppo repentini e massicci e non hanno dato modo alla biomassa di acclimatarsi completamente ai composti tossici del refluo reale.



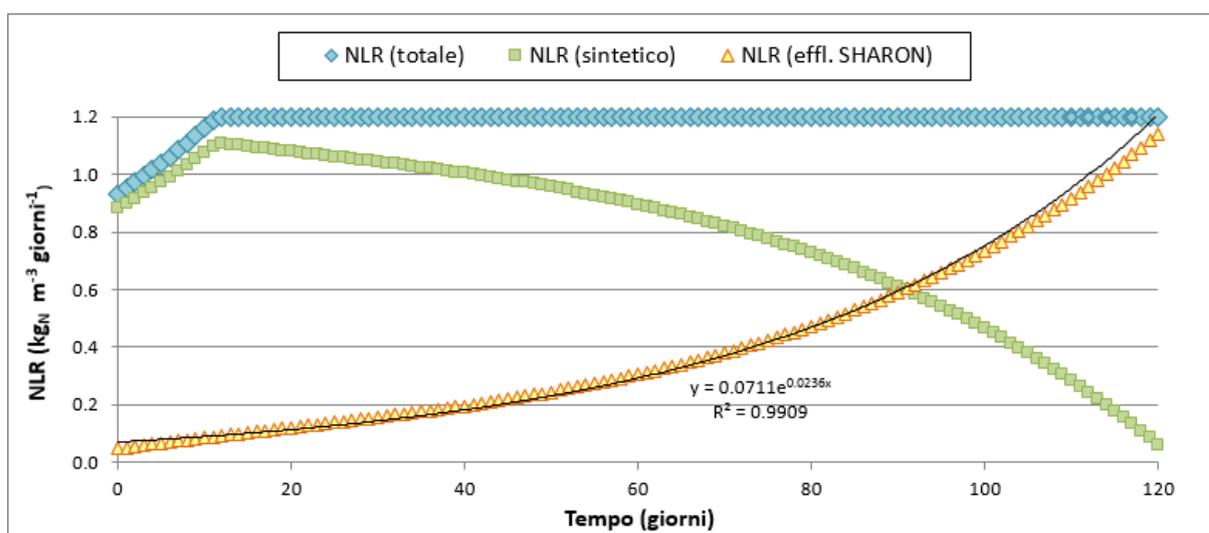
**Figura 8.14:** Massima Attività Specifica della biomassa ANAMMOX (SAA) misurata durante i test in batch.

### 8.3 Fase III

La Fase III ha inizio quando la biomassa del reattore ANAMMOX ha ripreso la sua attività, dopo la quasi totale inibizione al termine della Fase II, e, in seguito al graduale incremento di carico del solo mezzo sintetico, è stata in grado di trattare un carico di azoto influente pari a  $0,9 \text{ kg}_N/(\text{m}^3 \cdot \text{giorno})$ . Si è allora deciso di tentare un'ultima strategia di alimentazione che consentisse la graduale acclimatazione della biomassa alle sostanze tossiche del refluo reale, presenti anche nell'effluente SHARON.

Tale strategia ha previsto l'utilizzo di due diversi influenti: uno sintetico, identico a quello utilizzato nella precedente Fase II e caratterizzato dalle massime concentrazioni di azoto ammoniacale e nitroso previste, l'altro rappresentato dall'effluente SHARON, opportunamente integrato al fine di avere un rapporto  $\text{N-NO}_2^-/\text{N-NH}_4^+$  pari al valore stechiometrico di 1,32.

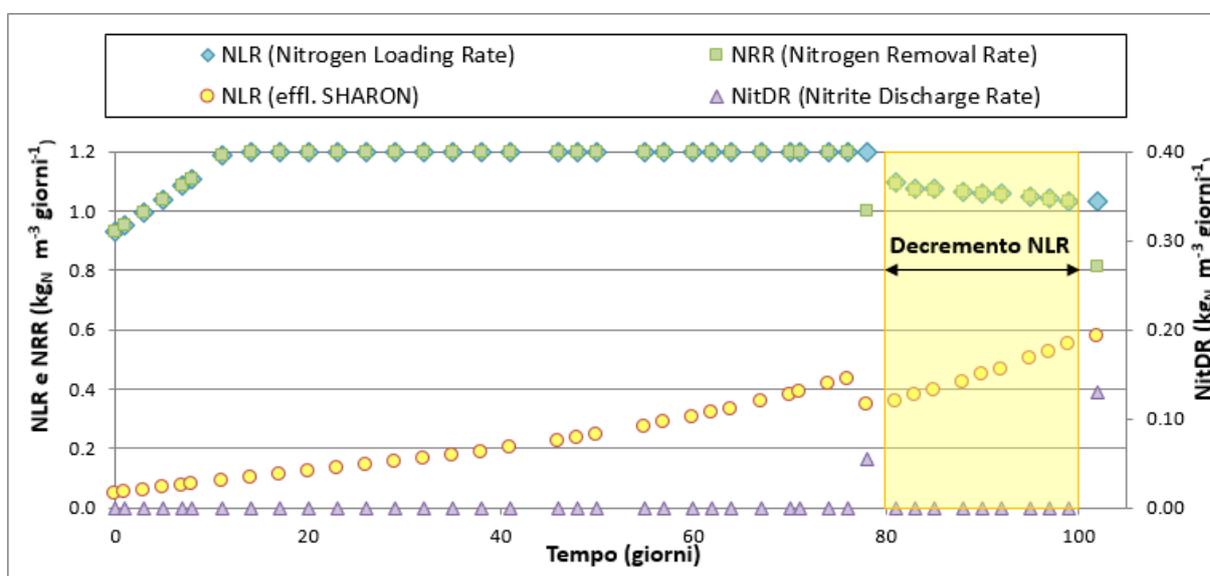
Il carico di azoto in ingresso al reattore NLR è stato sempre incrementato secondo la legge esponenziale suggerita da Lopez *et al.* (2008), ma come combinazione dei due influenti e in modo tale che entrambi, a loro volta, fossero incrementati seguendo la stessa legge, fino al raggiungimento del carico target di  $1,2 \text{ kg}_N/(\text{m}^3 \cdot \text{giorno})$ , e successivamente il mezzo sintetico venisse gradualmente ridotto e sostituito con l'effluente SHARON, senza che vi fossero brusche variazioni di concentrazione dei composti tossici presenti nel refluo reale all'interno del reattore. La Figura 8.15 rappresenta la strategia di alimentazione adottata durante la Fase III della sperimentazione.



**Figura 8.15:** Incremento del carico di azoto influente (NLR) nella Fase III secondo legge esponenziale e con l'utilizzo di due influenti differenti.

Osservando il grafico si può notare come 120 giorni teorici consentano il raggiungimento dell'obiettivo.

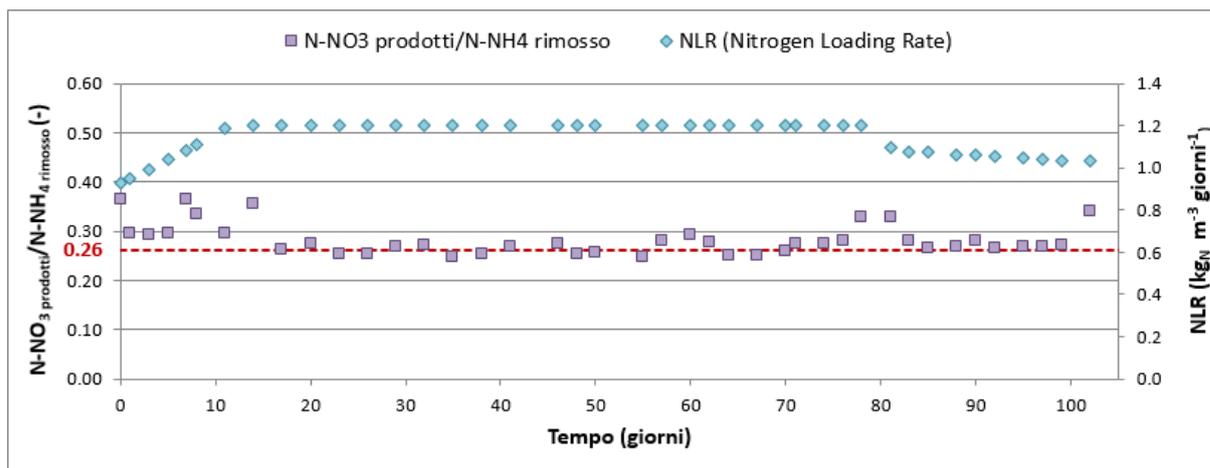
La Fase III è proseguita senza alcuna interruzione e perfettamente fino al giorno 78, quando si è riscontrata la presenza di nitriti e di azoto ammoniacale nell'effluente con una concentrazione pari rispettivamente a 98,9  $\text{mg}_{\text{N-NO}_2}/\text{l}$  e 78,0  $\text{mg}_{\text{N-NH}_4}/\text{l}$ , indicando un incomprensibile problema al sistema e in seguito alla quale si è deciso di interrompere l'alimentazione al reattore per verificare se tali concentrazioni avevano inibito irreversibilmente la biomassa. Come confermato dai risultati ottenuti da Dapena-Mora *et al.* (2007), che sostengono che l'inibizione dovuta alle elevate concentrazioni di nitrito (350  $\text{mg}_{\text{N-NO}_2}/\text{l}$ ) dipenda anche dal tempo di esposizione, e come affermano Lotti *et al.* (2012), secondo i quali l'inibizione dovuta alla concentrazione di 1000  $\text{mg}/\text{l}$  è reversibile anche dopo un'esposizione di 24 ore, l'attività della biomassa non è risultata compromessa ed è stata osservata l'effettiva rimozione dell'azoto nel reattore. Ciononostante si è deciso di ridurre leggermente il carico di azoto influente al reattore, per evitare di sovraccaricare il sistema parzialmente compromesso (Figura 8.16).



**Figura 8.16:** Andamento del NLR, NRR, NitDR nel corso della FASE III. Il grafico mostra anche l'incremento esponenziale del carico dovuto all'incremento nell'alimentazione dell'effluente SHARON.

In seguito a tale modifica si è osservato un perfetto funzionamento del processo, caratterizzato da elevate efficienze di rimozione e confermato dal valore minimo del NitDR, fino al giorno 102.

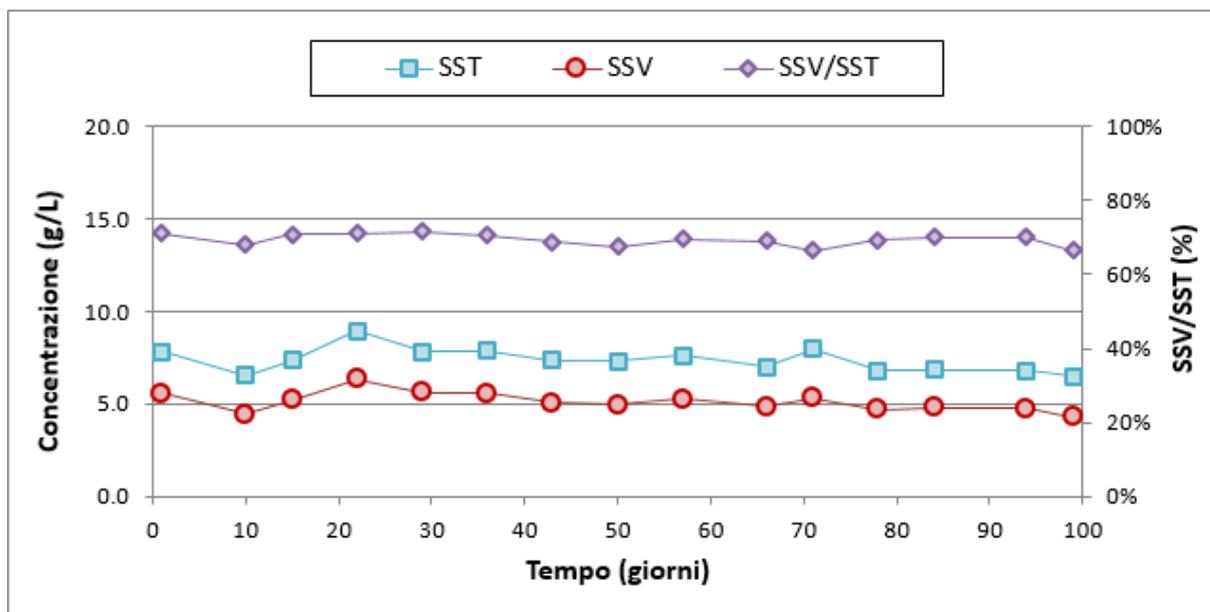
Anche la produzione di nitrati, valutata nel corso della Fase III, ha evidenziato un andamento in linea con i valori stechiometrici attesi, come osservabile in Figura 8.17.



**Figura 8.17:** Produzione di nitrati nella Fase III, espressa dal rapporto  $\text{N-NO}_3^- \text{prodotti}/\text{N-NH}_4^+ \text{rimosso}$ .

In seguito al raggiungimento del massimo carico di azoto in ingresso al reattore, il rapporto  $\text{N-NO}_3^- \text{prodotti}/\text{N-NH}_4^+ \text{rimosso}$  si è assestato intorno al valore teorico di 0,26, come già precedentemente osservato nel corso della Fase II.

Inoltre, la concentrazione di solidi misurata nell'intera Fase III è risultata piuttosto stabile (Figura 8.18), con una concentrazione media di  $7,4 \pm 0,7 \text{ g}_{\text{SST}}/\text{l}$  e  $5,1 \pm 0,5 \text{ g}_{\text{SSV}}/\text{l}$ . Tali valori risultano decisamente inferiori alle precedenti Fasi, indicando un aumento dell'attività specifica della biomassa a parità di NLR applicato.



**Figura 8.18:** Concentrazione di SST, SSV e rapporto SSV/SST nella Fase III.

Nel giorno 78, in corrispondenza della elevata concentrazione di nitriti riscontrata nell'effluente, si osserva un leggero calo di concentrazione (da 5,3 a 4,7 g<sub>SSV</sub>/l) che rimane poi costante fino al giorno 102, in cui il valore misurato è stato di 4,3 g<sub>SSV</sub>/l.

Probabilmente una maggiore concentrazione di biomassa avrebbe sicuramente facilitato l'incremento dell'effluente SHARON nell'alimentazione del reattore ANAMMOX, attutendo l'effetto tossico dei composti presenti nel refluo reale.

Il giorno 102, in cui il carico di azoto applicato con l'effluente SHARON era pari a 0,58 kg<sub>N</sub>/(m<sup>3</sup>·giorno) e corrispondente a circa il 56% del volume totale dell'alimentazione, è stato infatti caratterizzato da un elevato valore del carico di nitriti in uscita, a causa di una concentrazione effluente pari a 253,14 mg<sub>N-NO<sub>2</sub></sub>/l.

Anche la concentrazione di azoto ammoniacale è risultata essere elevata (174,34 mg<sub>N-NH<sub>4</sub></sub>/l) e, nonostante i vari tentativi attuati (blocco dell'alimentazione, diluizione del volume nel reattore con acqua di rete per ridurre la concentrazione di azoto ammoniacale e nitroso all'interno del sistema) non si è riusciti a ripristinare rapidamente le buone condizioni del processo e proseguire la sperimentazione.

Il motivo di tale arresto dell'attività della biomassa, e di conseguenza del processo, è probabilmente da ricercare nella composizione del refluo reale, fornito periodicamente dalla Saras SpA e alimentato al reattore SHARON, che nell'ultima fornitura conteneva probabilmente uno o più composti organici di cui non si era a conoscenza e che potrebbe essere risultato tossico per la biomassa ANAMMOX. I reflui industriali da raffinazione petrolifera sono infatti caratterizzati da un'estrema variabilità e questa caratteristica potrebbe risultare una difficoltà in più di cui tener conto nella valutazione dell'applicazione a scala reale di tale sistema, risultato particolarmente sensibile ai composti tossici in essi presenti.

## 8.4 Conclusioni al termine della sperimentazione

Lo studio svolto durante il Dottorato di Ricerca, riguardo il secondo stadio del sistema combinato SHARON-ANAMMOX per il trattamento del refluo industriale prodotto dall'attività di raffinazione petrolifera e proveniente dal processo di desolfurazione delle acque acide (sour water) degli impianti della SARAS SpA, ha prodotto i seguenti risultati.

Il reattore ANAMMOX è stato avviato con la biomassa proveniente dall'impianto a scala reale di Rotterdam ed alimentato inizialmente con un refluo sintetico nel quale le concentrazioni di azoto ammoniacale e nitroso sono state incrementate secondo una legge

esponenziale, al fine di consentire l'acclimatazione graduale della biomassa agli elevati carichi di azoto (Fase I). Successivamente il mezzo sintetico è stato incrementato con aliquote crescenti dell'effluente proveniente dallo stadio precedente SHARON, a sua volta alimentato con il refluo reale di raffineria, fino al raggiungimento del 20% del volume totale, constatando la totale rimozione del carico in ingresso di azoto, pari a  $0,670 \text{ kg}_N/(\text{m}^3 \text{ giorno})$  e relativo alle concentrazioni di  $636,9 \text{ mg}_{N\text{-NO}_2}/\text{l}$  e  $482,5 \text{ mg}_{N\text{-NH}_4}/\text{l}$ . Tuttavia, gli eccessivi incrementi della concentrazione di azoto ammoniacale e nitroso, contemporaneamente all'aumento delle aliquote dell'effluente SHARON, hanno comportato un peggioramento immediato delle prestazioni del sistema: l'attività della biomassa è risultata troppo compromessa e si è dovuto diminuire il carico di azoto in ingresso (fino al valore di  $0,4 \text{ kg}_N/(\text{m}^3 \text{ giorno})$ ) ed eliminare completamente il refluo SHARON dall'influente.

La sperimentazione è proseguita con una nuova strategia di alimentazione, che ha previsto l'utilizzo di un influente sintetico, caratterizzato da concentrazioni costanti di azoto ammoniacale e nitroso, pari ai valori massimi previsti di  $1138 \text{ mg}_{N\text{-NO}_2}/\text{l}$  e  $862 \text{ mg}_{N\text{-NH}_4}/\text{l}$  (Fase II). Il carico di azoto in ingresso al reattore è stato incrementato secondo una legge esponenziale facendo variare la durata della fase di alimentazione, consentendo di applicare il massimo carico previsto di  $1,2 \text{ kg}_N/(\text{m}^3 \text{ giorno})$ , senza riscontrare alcuna difficoltà. Di nuovo, l'effluente proveniente dal reattore SHARON è stato incrementato gradualmente nel mezzo sintetico, fino al 30% del volume totale, osservando una risposta positiva da parte del processo. Purtroppo, l'incremento dell'aliquota di effluente SHARON dal 30 al 50% ha nuovamente causato un'inibizione della biomassa, costringendo all'eliminazione di questo dal mezzo sintetico. Tali risultati erano, in realtà, già stati preannunciati dall'esito delle prove di tossicità eseguite sulla biomassa ANAMMOX, man mano che l'effluente SHARON veniva incrementato nel mezzo sintetico: i test non hanno evidenziato tanto un'inibizione acuta a tali incrementi, quanto una crescente tossicità cronica.

L'ultima strategia di alimentazione adottata è stata sviluppata nel tentativo di acclimatare la biomassa ANAMMOX alla presenza dei composti tossici in maniera ancora più graduale (Fase III). Sono stati pertanto utilizzati due influenti diversi, uno sintetico e uno rappresentato dall'effluente SHARON: quest'ultimo è stato incrementato secondo una legge esponenziale e sostituito al sintetico, mantenendo il carico di azoto in ingresso costante, una volta raggiunto il suo valore massimo di  $1,2 \text{ kg}_N/(\text{m}^3 \text{ giorno})$ . A causa però di qualche variazione nella composizione del refluo reale, trattato con il processo SHARON e contenuto nell'influente al reattore ANAMMOX, il processo ha subito un'ulteriore arresto e la biomassa è risultata fortemente inibita.

Il trattamento dell'effluente proveniente dal reattore SHARON, alimentato con il refluo reale da raffinazione petrolifera, fornito dalla SARAS SpA, mediante il processo ANAMMOX è risultato particolarmente difficile a causa della particolare sensibilità della biomassa ai composti tossici presenti nel refluo reale. Infatti, il massimo carico di azoto pari a  $1,2 \text{ kg}_N/(\text{m}^3 \text{ giorno})$ , applicato con un influente sintetico, è stato completamente rimosso senza osservare alcuna inibizione della biomassa. L'incremento graduale del carico delle sostanze tossiche mediante legge esponenziale sembrerebbe la soluzione migliore per consentire la completa acclimatazione della biomassa, anche se l'estrema variabilità del refluo reale potrebbe costituire il problema maggiore. Rimane comunque l'ulteriore alternativa, per il trattamento del suddetto refluo, del sistema combinato SHARON-Denitrificazione eterotrofa, dato che la biomassa SHARON sembra essere più robusta ed in grado di trattare il refluo reale, che potrebbe essere il tema di una futura ricerca.

# CAPITOLO IX

## Effetto della temperatura sui processi biologici innovativi

Il periodo di Dottorato all'estero è stato svolto presso l'Università Tecnica di Delft (TU Delft, Olanda), dove il processo SHARON e ANAMMOX sono stati scoperti, studiati e applicati per la prima volta a scala reale.

Nel presente capitolo si discuteranno i risultati ottenuti in tale periodo, durante il quale si è approfondito lo studio sul processo ANAMMOX, in particolare sull'influenza della temperatura sull'attività dei batteri ANAMMOX, e sul processo a stadio singolo CANON, tramite l'avviamento di un reattore CANON a bassa temperatura e l'applicazione dell'analisi FISH su fette di granuli, appositamente prelevati dal reattore, per la visualizzazione della disposizione spaziale della biomassa ammonio e nitrito-ossidante (AOB e NOB) e ANAMMOX.

### 9.1 Influenza della temperatura sul processo ANAMMOX

Lo studio dell'influenza della temperatura sul processo ANAMMOX, risulta particolarmente interessante in vista della possibile applicazione del sistema a doppio stadio SHARON-ANAMMOX o del sistema a stadio singolo CANON al trattamento dei reflui urbani, soprattutto nei Paesi caratterizzati da basse temperature, o nel periodo invernale. Il sistema a doppio stadio è infatti utilizzato per il trattamento delle acque derivanti dalla digestione anaerobica dei fanghi e di liquami con un'elevata concentrazione di azoto ammoniacale (almeno  $1 \text{ g}_{\text{N-NH}_4^+}/\text{l}$ ) e ad alte temperature ( $30\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Se fosse possibile applicare tale tecnologia anche ai liquami urbani, ciò porterebbe innumerevoli vantaggi a livello di sostenibilità del trattamento, soprattutto riguardo ai consumi di energia. Tuttavia questa applicazione non è di facile realizzazione, in quanto tali reflui sono caratterizzati da più basse concentrazioni di azoto ammoniacale ( $25\text{-}100 \text{ mg}_{\text{N-NH}_4^+}/\text{l}$ ) e basse temperature, specialmente nel periodo invernale ( $10\text{-}15 \text{ }^\circ\text{C}$ ). In queste condizioni, infatti, le attività e le velocità di crescita dei batteri coinvolti (AOB e ANAMMOX) dovrebbero tendere in linea teorica a decrescere. Al riguardo sono già stati effettuati diversi studi, dai quali risulterebbe che i processi SHARON e ANAMMOX possano funzionare anche a basse concentrazioni di azoto

e a basse temperature, adottando appropriate strategie (Dosta *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2013; Hendrickx *et al.*, 2014).

### 9.1.1 Determinazione della massima attività specifica ANAMMOX

Lo studio dell'influenza della temperature sul processo ANAMMOX è stato effettuato attraverso dei test in batch, mediante l'utilizzo di bottiglie OxiTop®, sulla biomassa prelevata dal reattore ANAMMOX R3, del tipo SBAR (Sequencing Batch Air-lift Reactor), operante a 10 °C nei laboratori dell'Università Tecnica di Delft, che hanno consentito la determinazione della massima attività specifica della biomassa (SAA) a differenti temperature.

I test sono stati eseguiti sempre in triplo e a temperature crescenti, da 10 a 30 °C, e per ogni temperatura la prova è stata ripetuta due volte: i risultati ottenuti sono riportati in Tabella 9.1, insieme alle caratteristiche di ciascuna prova, e in Figura 9.1.

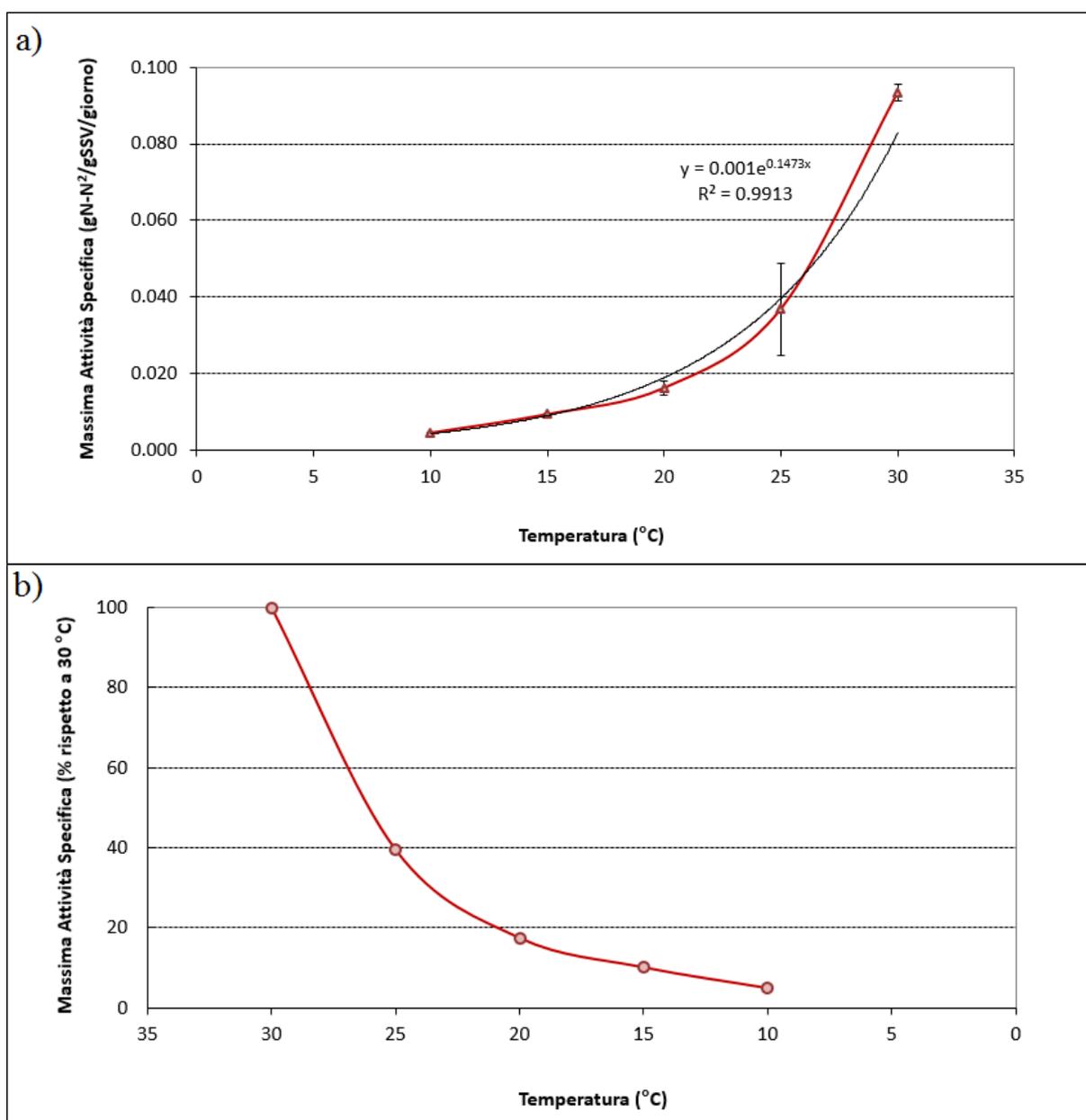
Inoltre, per la prova eseguita a 10 °C, sono stati effettuati dei prelievi subito prima dell'esperimento e al termine, per determinare la concentrazione di N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub>, N-NO<sub>3</sub> e confrontare i rapporti N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante il test con quelli stechiometrici di letteratura. I risultati ottenuti sono molto prossimi ai valori teorici (Tabella 9.2); chiaramente i volumi dei campioni prelevati per le analisi, seppur minimamente, hanno interferito con la corretta determinazione dei rapporti e i valori reali potrebbero essere ancora più simili a quelli stechiometrici riportati in letteratura.

**Tabella 9.1:** Riepilogo dei test in batch per la determinazione della massima attività specifica (SAA), in funzione della temperatura.

T (°C)	Durata (h)	Substrato (mgN-NO <sub>2</sub> /l)	Substrato (mgN-NH <sub>4</sub> /l)	SAA (mgN-N <sub>2</sub> /gSSV/g)	SAA (mgN-N <sub>2</sub> /gSST/g)
10	16	20	20	0.00469±0.00030	0.00415±0.00027
	16	25	25	0.00457±0.00006	0.00405±0.00005
15	16	20	20	0.00924±0.00043	0.00819±0.00038
	20	15	15	0.00969±0.00025	0.00859±0.00022
20	16	20	20	0.0180±0.00033	0.0160±0.00030
	20	20	20	0.0146±0.00015	0.0130±0.00013
25	20	20	20	0.0244±0.00028	0.0220±0.00025
	17	20	20	0.0489±0.00450	0.0434±0.00399
30	17	30	30	0.0942±0.0025	0.0835±0.0022
	48	20	20	0.0923±0.0018	0.0818±0.0016

**Tabella 9.2:** Rapporti  $N-NO_2^-/N-NH_4^+$  e  $N-NO_3^-/N-NH_4^+$  misurati durante il primo test effettuato a 10°C e confrontati con i valori stechiometrici noti in letteratura.

Valore	$N-NO_2^-/N-NH_4^+$ (-)	$N-NO_3^-/N-NH_4^+$ (-)
Stechiometrico	1,32	0,26
Misurato	$1,13 \pm 0,27$	$0,19 \pm 0,05$



**Figura 9.1:** Andamento della massima attività specifica in funzione della temperatura (9.1-a) e variazione percentuale della massima attività specifica rispetto a quella misurata a 30 °C (9.1-b).

L'influenza della temperatura sull'attività ANAMMOX è evidente osservando la Figura 9.1. In particolare, il grafico in Figura 9.1-a mostra come la massima attività specifica aumenti esponenzialmente all'aumentare della temperatura, passando da un valore di  $0,0046 \pm 0,0002$   $\text{mg}_{\text{N-N}_2}/(\text{g}_{\text{SSV}} \cdot \text{giorno})$ , relativo alla temperatura di  $10^\circ\text{C}$ , al valore di  $0,0933 \pm 0,0022$   $\text{mg}_{\text{N-N}_2}/(\text{g}_{\text{SSV}} \cdot \text{giorno})$ , misurato alla temperatura di  $30^\circ\text{C}$ . Inoltre, la variazione di temperatura da  $30$  a  $25^\circ\text{C}$  comporta una diminuzione del 60% dell'attività specifica e, a  $10^\circ\text{C}$ , l'attività misurata risulta appena il 5% di quella osservata a  $30^\circ\text{C}$  (Figura 9.1-b).

### 9.1.2 Determinazione dell'energia di attivazione

I dati raccolti attraverso i test in batch sono stati elaborati al fine di determinare i valori dell'energia di attivazione della biomassa ANAMMOX, prelevata dal reattore di laboratorio R3 e pertanto acclimatata alla temperatura di esercizio di  $10^\circ\text{C}$ .

L'effetto della temperatura sulla velocità di una reazione biologica può essere espresso dalla legge di Arrhenius; nel caso della biomassa ANAMMOX e considerando un intervallo di temperatura, la legge può essere riscritta nella seguente forma (Hao *et al.*, 2002):

$$SSA_{T_1} = SSA_{T_2} e^{\frac{E_a}{R(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1})}}$$

dove: SSA = massima attività specifica ANAMMOX alle temperature  $T_1$  e  $T_2$ ;

$E_a$  = energia di attivazione, espressa in J/mol;

R = costante dei gas pari a  $8,32$  J/(mol K);

T = temperatura [K].

Il valore dell'energia di attivazione, relativo all'intervallo di temperatura considerato, può essere quindi determinato a partire dalle massime attività specifiche misurate.

La Tabella 9.3 riporta i risultati ottenuti in seguito alla determinazione dei valori della massima attività specifica nelle prove batch e all'elaborazione dei dati.

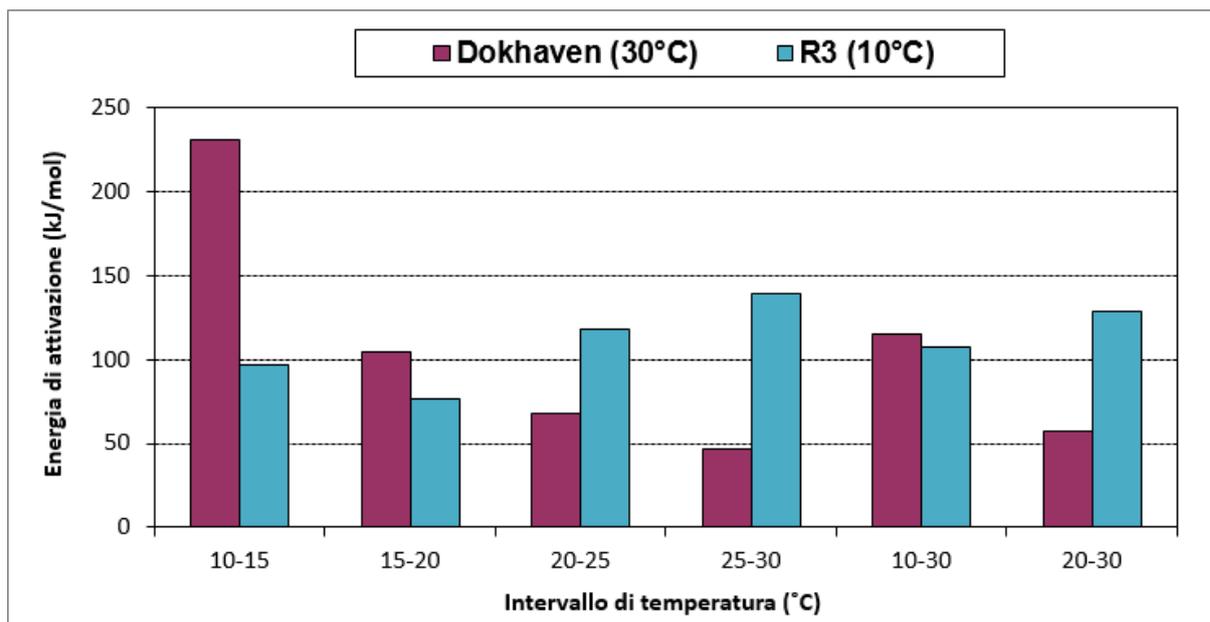
**Tabella 9.3:** Valori dell'energia di attivazione determinati per la biomassa ANAMMOX, acclimatata a 10 °C.

<b>Intervallo di temperatura (°C)</b>	<b>E<sub>a</sub> (kJ/mol)</b>
10÷15	97,1
15÷20	76,5
20÷25	118,4
25÷30	139,4
10÷20	87,0
20÷30	128,8
10÷30	107,2

Osservando i valori dell'energia di attivazione nei vari intervalli di temperatura, si nota come questi siano decisamente più alti in corrispondenza delle temperature maggiori (20÷25 °C e 25÷30 °C), indicando una forte dipendenza dell'attività ANAMMOX dalla temperatura negli intervalli corrispondenti, mentre il minor valore dell'energia di attivazione a temperature inferiori (10÷15 °C e 15÷20 °C) evidenzia il minor effetto della temperatura sul processo. Ciò è sicuramente dovuto al fatto che la biomassa, all'interno del reattore, era solitamente esposta alla temperatura di 10°C, pertanto risente maggiormente della temperatura quando questa assume valori molto elevati.

Infatti, le energie di attivazione determinate risultano nettamente superiori a quelle riportate in letteratura, soprattutto quelle relative alle alte temperature. Strous *et al.* (1999) hanno osservato, attraverso test in batch eseguiti in un intervallo di temperatura 20÷45 °C, un'energia di attivazione del processo ANAMMOX di 70 kJ/mol. Lo stesso risultato è stato ottenuto da Hao *et al.* (2002), in un intervallo di temperatura compreso però tra 20÷30 °C, mentre Dosta *et al.* (2008) hanno determinato l'energia di attivazione per una biomassa ANAMMOX granulare e operante a 35-40 °C, pari a 63 kJ/mol.

Il grafico riportato in Figura 9.2, mostra l'effetto della temperatura sull'attività della biomassa proveniente dal reattore a scala reale di Dokhaven-Rotterdam (dati non determinati nella presente sperimentazione), la cui temperatura di esercizio è di 30 °C. Rispetto alla biomassa acclimatata a 10 °C, la biomassa del reattore di Dokhaven evidenzia un comportamento in funzione della temperatura totalmente contrastante: la variazione dell'attività è maggiore alle basse temperature, mentre, per valori prossimi alla temperatura di esercizio, tale variazione diminuisce notevolmente.



**Figura 9.2:** Confronto tra le energie di attivazione, relative ai diversi intervalli di temperatura, determinate per la biomassa ANAMMOX del reattore R3 a scala di laboratorio e il reattore a scala reale dell’impianto di Dokhaven-Rotterdam.

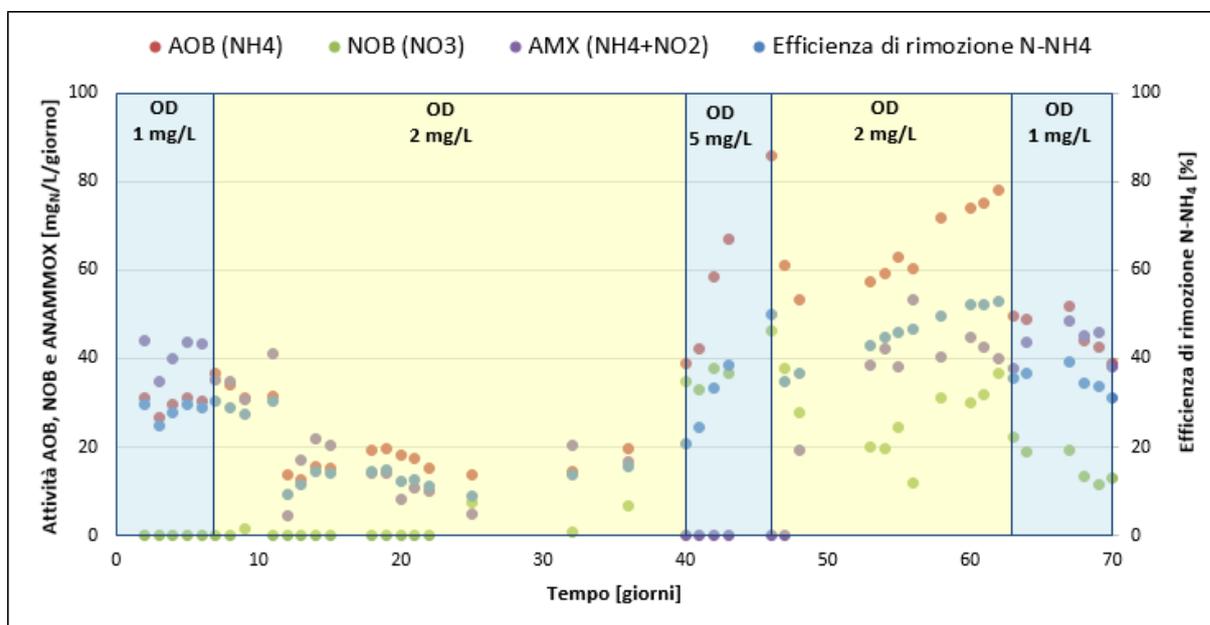
## 9.2 Avviamento di un reattore CANON a 15 °C

Un altro studio effettuato presso l’Università di Delft ha riguardato l’avviamento di un reattore CANON alla temperatura di esercizio di 15°C, per il trattamento di un mezzo sintetico, avente composizione simile a quella di un refluo civile (Cap.6, par. 6.4.4). La scelta della temperatura è stata dettata dalla necessità di capire quanto tempo occorra, in condizioni di basse temperature, al pieno funzionamento del sistema.

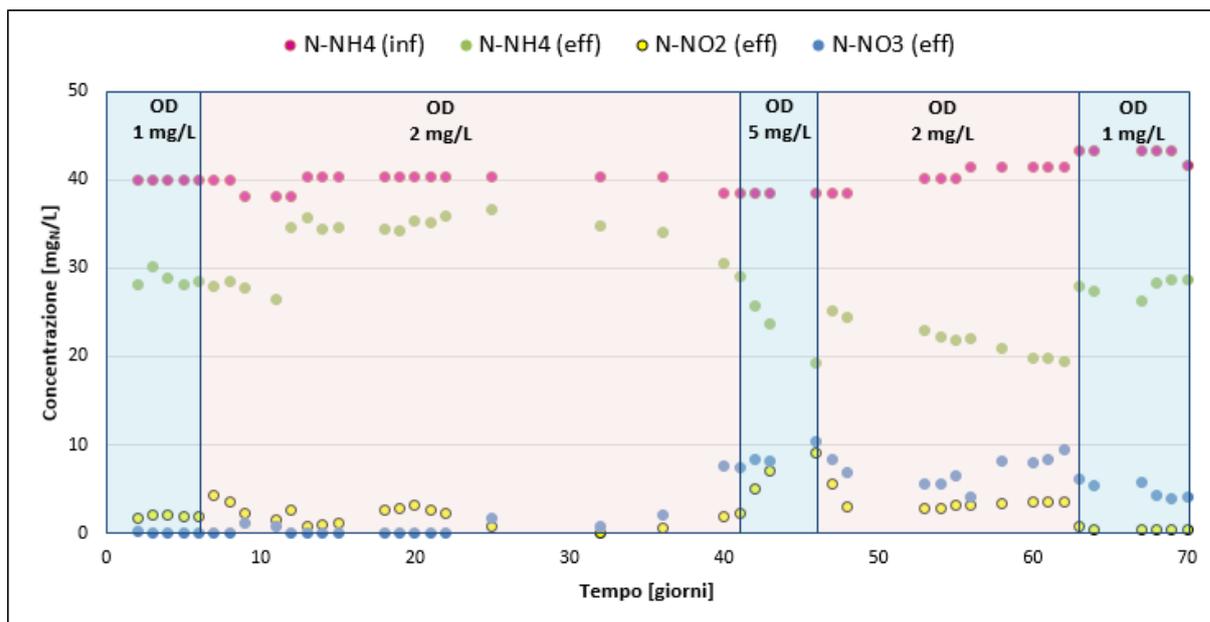
Per facilitare la fase di avviamento si è utilizzato un inoculo proveniente dal reattore CANON dell’impianto a scala reale di Olburgen (Cap 6, par. 6.4.3). Il primo problema riscontrato nella sperimentazione è stata la perdita di gran parte della biomassa ammonio-ossidante (AOB), in quanto questa era contenuta prevalentemente nella sospensione acquosa dell’inoculo più che adesa ai granuli. Dal grafico in Figura 9.3 si nota infatti che l’efficienza di rimozione dell’azoto ammoniacale nei primi giorni dell’avviamento è di circa il 12% e, nonostante la concentrazione di ossigeno disciolto sia stata incrementata a 2 mg/l, il giorno 7 si osserva una diminuzione dell’attività AOB e dell’efficienza di rimozione. Per accelerare la crescita della biomassa ammonio-ossidante sulla superficie dei granuli si è pensato di inoculare a giorni alterni piccole quantità di fango nitrificante (100 ml), prelevato dalla vasca di nitrificazione dell’impianto delle acque reflue di Rotterdam. Questo però ha comportato l’introduzione nel

sistema di nuova biomassa nitrito-ossidante (NOB) che già il giorno 25 ha mostrato una certa attività e ha trovato le condizioni ideali quando la concentrazione di ossigeno disciolto è stata incrementata da 2 a 5 mg/l. La maggiore concentrazione di ossigeno disciolto ha inoltre consentito l'incremento dell'attività AOB e quindi della produzione di nitriti, anche se è risultata eccessiva per la biomassa ANAMMOX, che ha risentito particolarmente dell'effetto inibente di tale concentrazione, come conferma l'attività nulla riscontrata. Pertanto, si è provveduto a ripristinare la concentrazione di OD a 2 mg/l: l'attività ANAMMOX è aumentata contemporaneamente alla diminuzione dell'attività NOB, mentre l'efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale è incrementata fino ad assestarsi intorno al 50%. Per cercare di inibire la biomassa nitrito-ossidante si è allora ridotta ulteriormente la concentrazione di ossigeno disciolto nel reattore fino a 1 mg/l, ottenendo l'effetto desiderato ma osservando anche un calo notevole nell'ossidazione dell'azoto ammoniacale, come dimostrano i bassi valori dell'attività AOB determinati.

La Figura 9.4 mostra l'andamento della concentrazione di N-NH<sub>4</sub> nell'influente e delle concentrazioni di N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>2</sub> e N-NO<sub>3</sub> nell'effluente misurate durante la sperimentazione.



**Figura 9.3:** Attività AOB, NOB, ANAMMOX ed efficienza di rimozione dell'azoto ammoniacale nel corso della sperimentazione.



**Figura 9.4:** Concentrazioni di N-NH<sub>4</sub> (influyente ed effluente), N-NO<sub>2</sub> (effluente) e N-NO<sub>3</sub> (effluente) nell'intera sperimentazione.

### 9.2.1 Analisi FISH

Un altro obiettivo del presente studio è stato l'identificazione delle diverse specie batteriche (AOB, NOB, ANAMMOX) presenti nel reattore CANON, e la visualizzazione della loro distribuzione spaziale nei granuli mediante analisi FISH.

L'analisi è stata effettuata anche su campioni prelevati regolarmente dal reattore CANON e sulla biomassa proveniente dall'impianto full scale di Olbulgern, utilizzata come inoculo.

In particolare, i granuli, fissati con una soluzione di paraformaldeide al 4%, sono stati tagliati in fettine da 20  $\mu\text{m}$  con un criomicrotomo (-20 °C), attaccate alle slide con una procedura particolare, appositamente studiata.

Le sonde utilizzate per l'analisi identificative dei diversi gruppi batterici (Tabella 9.4), sono state applicate in tre cocktail differenti, indicati in Tabella 9.5.

**Tabella 9.4:** Sonde utilizzate nell'analisi FISH.

Gruppo	Sonda	Specie
AOB	NEU653+NSO190+NSE1472	<i>Nitrosomonas europaea</i> , <i>N. halophila</i> , <i>N. eutropha</i>
NOB	NIT1035+Ntspa712	<i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrospira</i>
ANAMMOX	AMX820	<i>Candidatus Brocadia</i> e <i>Candidatus Kuenenia</i>
Batteri generici	EUB338I+EUB338II+ EUB338III	-

**Tabella 9.5:** Combinazioni differenti delle sonde applicate durante l'analisi FISH.

Cocktail	Rosso	Verde	Blu
1	AOB <sub>mix</sub> + NOB <sub>mix</sub>	AMX820	EUB338 <sub>mix</sub>
2	AOB <sub>mix</sub>	NOB <sub>mix</sub>	EUB338 <sub>mix</sub>
3	NOB <sub>mix</sub>	AOB <sub>mix</sub>	EUB338 <sub>mix</sub>

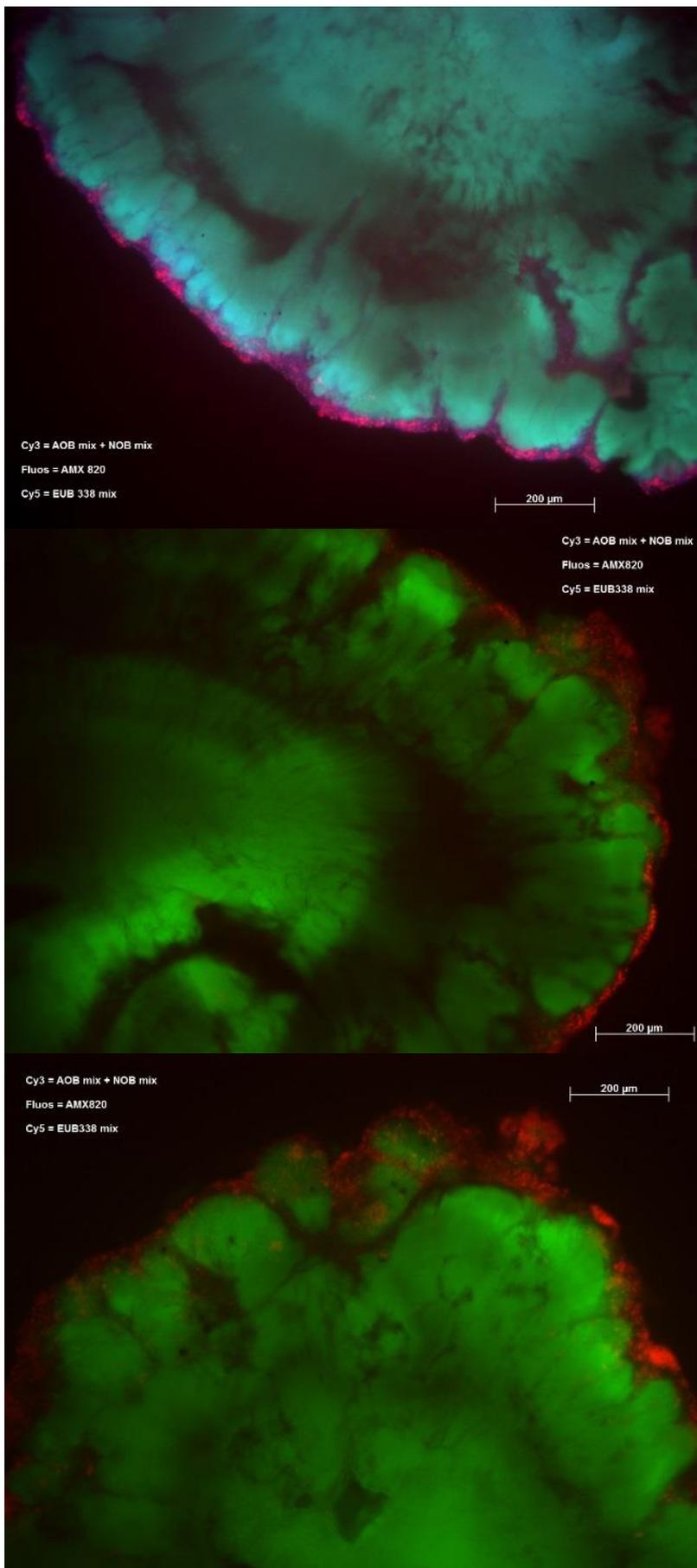
I risultati riportati nella Figura 9.5 sono relativi al cocktail 1.

Dall'immagine riguardante l'inoculo, si può notare come lo strato più esterno del granulo sia costituito da batteri aerobici. La parte più interna è invece formata da batteri ANAMMOX, appartenenti alle specie *Brocadia* e *Kuenenia*. Lo spessore dello strato aerobico risulta decisamente ridotto, anche perché la biomassa aerobica risultava presente soprattutto in forma non adesa ai granuli. Anche nel campione relativo al giorno 8 della sperimentazione, lo strato aerobico risulta molto sottile e giustifica le basse efficienze di rimozione riscontrate soprattutto nella parte iniziale della sperimentazione. Il giorno 62, lo strato appare più corposo e ispessito e conferma le maggiori attività AOB e NOB rilevate.

Le immagini riportate in Figura 9.6 evidenziano come si sia evoluta la composizione dello strato aerobico durante la sperimentazione. Inizialmente questo era costituito quasi esclusivamente da batteri ammonio-ossidanti: l'attività dei nitrito ossidanti nel reattore era infatti nulla. In seguito all'aggiunta del fango nitrificante e alle maggiori concentrazioni di ossigeno disciolto nel reattore, la biomassa nitrito ossidante si è sviluppata nel sistema, come confermato dall'immagine relativa al giorno 55.

Infine, la Figura 9.7 mostra la disposizione nello strato aerobico dei batteri ammonio e nitrito-ossidanti nell'ultima parte della sperimentazione. Una volta trovate le condizioni ottimali, la biomassa nitrito-ossidante si è sviluppata sui granuli crescendo, inizialmente, sulla loro superficie. La minore concentrazione di ossigeno disciolto ha in seguito favorito la biomassa ammonio-ossidante che ha continuato a crescere sullo strato esterno dei granuli, ricoprendo, in parte, la biomassa nitrito ossidante.

Tutte queste osservazioni potrebbero avere un maggiore peso se fatte nel lungo periodo, tuttavia, anche in soli 70 giorni è stato possibile osservare una netta variazione nella composizione dei granuli, confermata anche delle prestazioni del processo CANON.

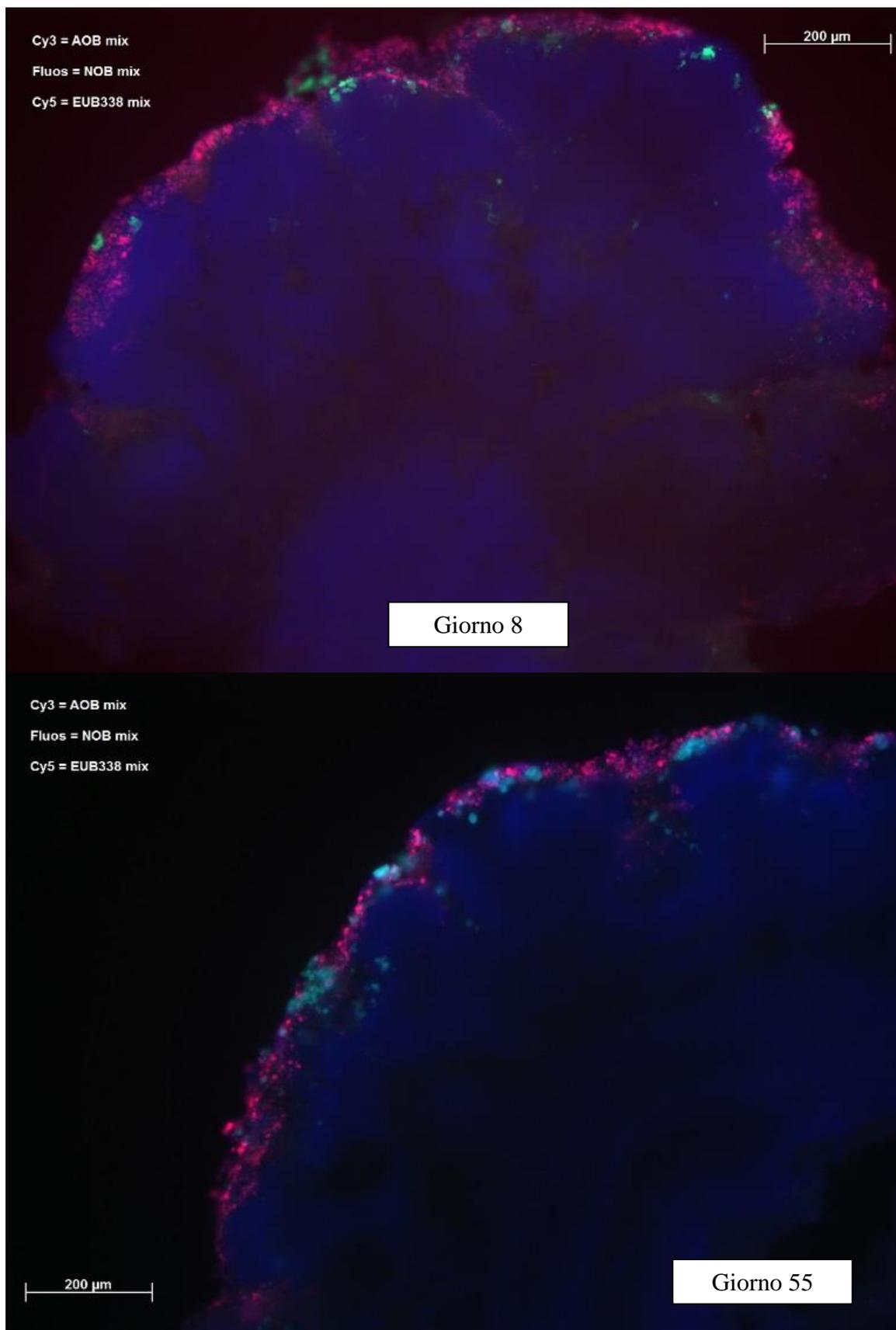


Inoculo

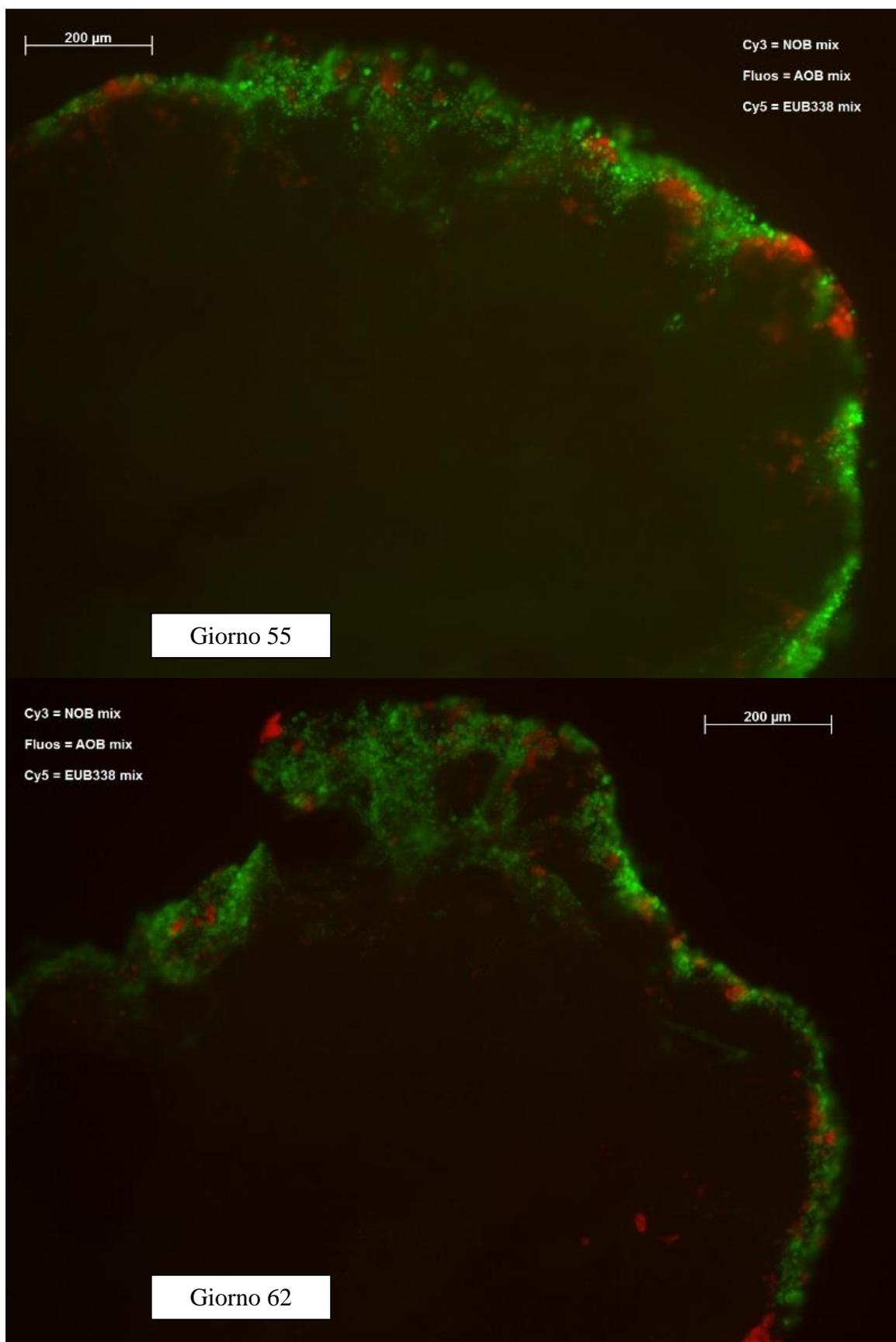
Giorno 8

Giorno 62

**Figura 9.5:** Variazione dello strato aerobico (AOB+NOB in rosso) dei granuli durante la sperimentazione. In verde è evidenziata la biomassa ANAMMOX, all'interno del granulo.



**Figura 9.6:** Variazione della composizione dello strato aerobico dei granuli durante la sperimentazione. In rosso sono rappresentati i batteri ammonio-ossidanti, in verde i nitrito-ossidanti, in blu i batteri ANAMMOX.



**Figura 9.7:** Disposizione dei batteri ammonio (in verde) e nitrito-ossidanti (in rosso) nello strato aerobico dei granuli durante la sperimentazione.

### 9.3 Conclusioni

Durante il periodo di Dottorato all'estero, è stata valutata l'influenza della temperatura sul processo ANAMMOX, attraverso la determinazione della massima attività specifica della biomassa di un reattore ANAMMOX a scala di laboratorio e operante a 10°C e delle energie di attivazione, in funzione delle attività misurate.

La biomassa acclimatata a 10 °C sembra risentire particolarmente delle basse temperature: l'attività specifica aumenta in maniera esponenziale all'aumentare della temperatura e, a 10°C, risulta appena il 5% della massima attività osservata a 30 °C.

Per l'applicazione a scala reale del sistema combinato SHARON-ANAMMOX ai reflui civili, numerosi studi risultano ancora in corso.

A tal proposito, un reattore a stadio singolo CANON è stato avviato a 15 °C per valutare il tempo necessario all'acclimatazione della biomassa a tale temperatura. I risultati ottenuti hanno evidenziato una certa difficoltà nell'avviamento, soprattutto a causa del basso tasso di crescita della biomassa ammonio-ossidante a tale temperatura. L'importanza della formazione di uno strato aerobico efficiente che garantisca l'ossidazione dell'azoto ammoniacale in ingresso non è da sottovalutare: la biomassa ANAMMOX è risultata attiva e in grado di rimuovere i nitriti prodotti, ma limitata dalla bassa produzione di questi. Inoltre la regolazione dell'ossigeno disciolto è un parametro che condiziona fortemente la buona riuscita del processo: l'ossigeno deve essere presente in concentrazioni tali da garantire la conversione dell'ammonio a nitriti da parte della biomassa ammonio-ossidante, ma non favorire lo sviluppo dei nitrito-ossidanti e inibire la biomassa ANAMMOX. In particolare la concentrazione di 5 mg/l è risultata eccessiva, comportando la crescita degli NOB e la produzione di nitrati nel reattore, oltre a causare l'inibizione della biomassa ANAMMOX, la cui attività è risultata nulla.

I risultati ottenuti indicano che potrebbe essere più efficace effettuare l'avviamento a temperature elevate (30 °C), caratterizzate da maggiori tassi di crescita e maggiori attività specifiche delle biomasse e, solo una volta raggiunte le condizioni ottimali, diminuire gradualmente la temperatura di esercizio in modo da acclimatare i batteri coinvolti alle temperature più basse.

## Conclusioni generali

Lo studio svolto durante il Dottorato di Ricerca ha riguardato la trattabilità, mediante il processo biologico combinato SHARON-ANAMMOX, dei reflui derivanti dall'attività di raffinazione petrolifera, in particolare quelli provenienti dal processo di desolfurazione delle acque acide (sour water) degli impianti della SARAS SpA, caratterizzati da un elevato contenuto di azoto ammoniacale e dalla contemporanea presenza di composti altamente tossici quali cianuri, fenoli, solfuri, nonché di sostanza organica. È stata valutata la possibile integrazione del processo chimico-fisico di stripping con vapore (attualmente applicato in raffineria) con il processo biologico combinato SHARON-ANAMMOX, con l'obiettivo di innalzare fino a 2000 mg<sub>N</sub>/l il valore di soglia previsto in uscita dalla colonna di stripping (attualmente fissato a 25 mg<sub>N</sub>/l) e di trattare il refluo a valle della colonna stessa mediante il sistema biologico, determinando un notevole risparmio in termini di costi operativi.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il processo SHARON risulta affidabile e in grado di tollerare le elevate concentrazioni di azoto ammoniacale testate (2000 mg<sub>N</sub>/l). Il refluo reale è stato integrato gradualmente, per favorire l'acclimatazione della biomassa ai composti tossici in esso contenuti, fino ad ottenere il suo completo trattamento garantendo una nitrosazione parziale stabile e fornendo un effluente adatto per il successivo trattamento mediante il processo ANAMMOX. Anche le prove batch di tossicità hanno infatti dimostrato la progressiva acclimatazione della biomassa ai composti tossici presenti nel refluo reale.

Inoltre, il rapporto molare influente  $C_i/N$  gioca un ruolo chiave nella regolazione delle prestazioni del processo SHARON: sulla base del rapporto applicato  $C_i/N$ , il reattore SHARON ha prodotto un effluente adatto per il successivo trattamento ANAMMOX ( $C_i/N = 1$ ) o di denitrificazione eterotrofa convenzionale ( $C_i/N = 2$ ), sia con un influente sintetico che con il refluo reale.

La temperatura di esercizio prescelta (35 °C) non richiederebbe alcun costo aggiuntivo nel trattamento a scala reale, poiché il refluo reale utilizzato per la sperimentazione ha una temperatura superiore a 60 °C che potrebbe anche consentire il recupero del calore in eccesso. L'elevata rimozione del DOC influente osservata ha dimostrato lo sviluppo di una biomassa eterotrofa nel reattore che non ha interferito in alcun modo sulla nitrosazione parziale, anche grazie alla concentrazione dell'ossigeno disciolto, sempre mantenuta al di sopra di 2 mg/l in modo da non comportare alcuna competizione tra la biomassa autotrofa ed eterotrofa.

È stata inoltre osservata l'autoregolazione del pH, intorno al valore  $6,8 \pm 0,2$ , indice del raggiunto equilibrio tra l'elevato pH del refluo reale ( $9,4 \pm 0,8$ ) e la riduzione dell'alcalinità

dovuta al processo di nitrosazione, che consentirebbe un risparmio economico dovuto ai minori costi operativi per il controllo del processo.

Infine, i calcoli effettuati sui bilanci di massa hanno mostrato una perdita trascurabile di azoto (< 5%), dovuta alla produzione ridotta di gas azotati quali NO e N<sub>2</sub>O, pericolosi gas serra.

Lo studio effettuato sul secondo stadio del sistema combinato SHARON-ANAMMOX, per il trattamento del refluo industriale da raffineria, ha dimostrato che il reattore ANAMMOX, avviato con la biomassa proveniente dall'impianto a scala reale di Rotterdam, è stato in grado di rimuovere il carico di azoto massimo previsto, pari a 1,2 kg<sub>N</sub>/m<sup>3</sup>/giorno. Questo è stato possibile alimentando il reattore con un influente sintetico e incrementando il carico secondo una legge esponenziale. Tuttavia, la sostituzione graduale del mezzo sintetico con aliquote crescenti dell'effluente proveniente dal reattore SHARON, alimentato con il refluo reale, è stata possibile solo fino al 30% del volume totale: il passaggio al nuovo influente, costituito per il 50% dall'effluente SHARON, ha però comportato un immediato peggioramento delle prestazioni del sistema.

Neanche l'incremento graduale, secondo legge esponenziale, ha consentito il completo trattamento dell'effluente SHARON, probabilmente a causa dell'ultima fornitura di refluo reale, che presentava caratteristiche diverse dal precedente; gli inquinanti non previsti, presenti nel nuovo refluo, potrebbero essere risultati tossici per la biomassa ANAMMOX.

L'estrema variabilità dei reflui industriali da raffinazione petrolifera e l'elevata sensibilità della biomassa ANAMMOX ai composti tossici in essi contenuti, potrebbero effettivamente comportare la difficile applicazione a scala reale del sistema combinato SHARON-ANAMMOX per il trattamento di tali reflui.

Rimane comunque l'ulteriore alternativa del sistema combinato SHARON-Denitrificazione eterotrofa, dato che la biomassa SHARON si è dimostrata più robusta e perfettamente in grado di trattare il refluo reale.

Infine, durante il periodo di Dottorato all'estero, svolto presso l'Università Tecnica di Delft (Olanda), è stata studiata l'influenza della temperatura sul processo ANAMMOX e sul processo a stadio singolo CANON, al fine dell'applicazione di tali tecnologie anche ai liquami urbani, caratterizzati da più basse concentrazioni di azoto ammoniacale (25-100 mg<sub>N-NH4</sub>/l), e a basse temperature, specialmente nel periodo invernale (10÷15 °C).

I risultati ottenuti hanno dimostrato la notevole dipendenza del processo ANAMMOX dalla temperatura, riscontrabile nelle attività specifiche misurate a basse temperature (10÷15°C), di molto inferiori rispetto a quelle relative a temperature elevate (30 °C). La difficoltà rilevata nell'avviamento del sistema CANON alla temperatura di 15°C, per via dei minori tassi di

crescita e attività specifiche delle biomasse coinvolte nel processo, ha dimostrato l'esigenza di un avviamento a temperature elevate (30 °C), prima di poter diminuire gradualmente la temperatura di esercizio fino al valore desiderato, in modo da acclimatare i batteri coinvolti alle temperature più basse.

## Bibliografia

- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S. & Srinath, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 48, 835-852.
- APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., American Public Health Association/American Water Works Association/WEF, Washington DC, USA (2005).
- 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.
- E. Broda, *Two kinds of lithotrophs missing in nature*, *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* 17 (1977) 491–493.
- Cema G., Wiszniowski J., Zabczynski S., Zablocka-Godlewska E., Raszka A., Surmacz-Górska J., *Biological nitrogen removal from landfill leachate by deammonification assisted by heterotrophic denitrification in a rotating biological contactor (RBC)*, *Water Science & Technology* 55 (8–9) (2007) 35–41.
- Chamchoi N., Nitisravut S., Schmidt J.E., *Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) and denitrification*, *Bioresource Technology* 99 (2008) 3331–3336.
- Chisti, Y., *Animal-cell damage in sparged bioreactors*. *Trends in Biotechnology* 18 (2000) 421–431.
- Dapena-Mora A., Van Hulle S.W.H., Campos J.L., Mendez R., Vanrolleghem P.A., Jetten M.S.M., *Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 79 (2004) 1421–1428
- 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.

- Dapena-Mora A., J.R. Vázquez-Padín, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral, M.S.M. Jetten, R. Méndez, *Monitoring the stability of an Anammox reactor under high salinity conditions*. *Biochemical Engineering Journal* 51 (2010) 167–171.
- Dosta J., Fernández I., Vázquez-Padín J.R., Mosquera-Corral A., Campos J.L., Mata-Álvarez J., Méndez R., *Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process*, *Journal of Hazardous Materials* 154 (2008) 688–693.
- Egli K., Fanger U., Alvarez P.J.J., Siegrist H., Van Der Meer J.R., Zehnder A.J.B., *Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate*, *Archive of Microbiology* 175 (2001) 198–207.
- Eilersen A.M., M. Henze, L. Kloft, *Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge*, *Water Research* 28 (1994) 1329–1336.
- Fernández I., Dosta J., Fajardo C., Campos J.L., Mosquera-Corral A., Méndez R., *Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the Anammox process*, *Journal of Environmental Management* xxx (2010) 1-5.
- Fernández I., Dosta J., Fajardo C., Campos J.L., Mosquera-Corral A., Méndez R. *Short- and long-term effects of ammonium and nitrite on the Anammox process* *Journal of Environmental Management* (2012) 95:S1704-S174.
- Furukawa K., P.K. Lieu, H. Tokitoh, T. Fujii, *Development of single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitrification (SNAP) and its treatment performances*, *Water Science & Technology* 53 (6) (2006) 83–90.
- Fux C., *Biological nitrogen elimination of ammonium-rich sludge digester liquids*, PhD Thesis, ETH-Zürich, Switzerland, 2003.
- R. Ganigué, H. Lopez, M.D. Balaguer and J. Colprim, *Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban land fill leachates*. *Water Res.*, 41 (2007) 3317–3326.
- Gerardi, M. H. (2002). *Nitrification and denitrification in the activated sludge process*. New York: John Wiley and Sons Inc., 193 p.
- Güven D., Dapena A., Kartal 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.,

- Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria*, Applied & Environmental Microbiology 71 (2005) 1066–1071.
- Hao X., Heijnen J.J., van Loosdrecht M.C.M., *Sensitivity analysis of a biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process*, Biotechnology and Bioengineering 77 (3) (2001) 266–277.
- Hao, X., Heijnen, J.J. and Loosdrecht, M.C.M., (2002) *Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification-ANAMMOX biofilm process*. Water Research 36, pp 4839-4849.
- Hellinga C., Schellen A., Mulder J.W., van Loosdrecht M.C.M., J.J. Heijnen, *The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater*, Water Science & Technology 37 (1998) 135–142.
- Hellinga C, van Loosdrecht, M.C.M. & Heijnen, J.J. (1999). Model based design of a novel process for nitrogen removal from concentrated flows. *Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems*, 5, 351-371.
- Hendrickx Tim L.G., Yang Wang, Christel Kampman, Grietje Zeeman, Hardy Temmink, Cees J.N. Buisman. *Autotrophic nitrogen removal from low strength waste water at low temperature*. Water Research 46 (2012) 2187-2193.
- Hu B.L., Zheng P., Tang C.J., Chen J.W., Van der Biezen E., Zhana L., Ni B.J., Jetten M.S.M, Yan J., Yu H.Q., Kartal B., *Identification and quantification of anammox bacteria in eight nitrogen removal reactors*. Water Research, 44 (2010) 5014-5020.
- Hu Z., Lotti T, van Loosdrecht M., Kartal B., *Nitrogen removal with the anaerobic ammonium oxidation process*. Biotechnology Letters, 35 (2013) 1145-1154.
- Isaka K., Date Y., Sumino T., Yoshie S., Tsuneda S., *Growth characteristic of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in an anaerobic filtrated reactor*, Applied Microbiology & Biotechnology 70 (2006) 47–52.
- M.J. Kampschreur, W.R.L. van der Star, H.A. Wielders, J.W. Mulder, M.S.M. Jetten and M.C.M. van Loosdrecht, *Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during full-scale reject water treatment*, Water Res. 42 (2008) 812–826.
- Kartal B., Rattray J., van Niftrik L.A., van de Vossenberg J., Schmid M.C., Webb R.I., Schouten S., Fuerst J.A., Damsté J.S., Jetten M.S.M., Strous M., *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus" a new propionate oxidizing species of anaerobic*

- ammonium oxidizing bacteria*, Systematic and Applied Microbiology 30 (1) (2007) 39–49.
- Kartal B., Maalcke W.J., de Almeida N.M., Cirpus I., Gloerich J., Geerts W., Op den Camp H.J., Harhangi H.R., Janssen-Megens E.M., Francoijs K.J., Stunnenberg H.G., Keltjens J.T., Jetten M.S., Strous M. *Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation*. (2011) Nature: 479: 127-130.
- Kim J.H., Guo X., Park H.S., (2008). Comparison study of effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation. *Process Biochemistry*, 43, 154-160S. Lackner, A. Terada, B.F. Smets, *Heterotrophic activity compromises autotrophic nitrogen removal in membrane-aerated biofilms: results of a modelling study*, Water Research 42 (2008) 1102–1112.
- Kulikowska D. and K. Bernat, *Nitrification–denitrification in landfill leachate with glycerine as a carbon source*. Bioresource Technol., 142 (2013) 297–303.
- Kwok W.K., Picioreanu C., Ong S.L., van Loosdrecht M.C.M., Ng W.J., Heijnen J.J., *Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor*. Biotechnology & Bioengineering 58 (1998) 400–407.
- Lopez H., Puig S., Ganigue R., Rusalleda M., Balaguer M.D., Colprim J., *Start-up and enrichment of a granular Anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 83 (2008) 233–241.
- Lotti, T, Star, WRL van der, Kleerebezem, R, Lubello, C & van Loosdrecht, MCM. *The effect of nitrite inhibition on the anammox process*. (2012) Water Research, 46(8), 2559-2569.
- Metcalf & Eddy, (2006). *Ingegneria delle acque reflue – Trattamento e riuso* (IV edizione). McGraw-Hill Ed., 60-62, 584-597, 896-901, 968-973.
- Molinuevo B., Garcia M.C., Karakashev D., Angelidaki I., *Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: effect of organic matter content on process performance*, Bioresource Technology 100 (2009) 2171–2175.
- A. Mosquera-Corral, F. González, J.L. Campos, and R.Méndez, *Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds*, Process Biochem. 40 (2005), pp. 3109–3118.

- Mulder A., van de Graaf A.A., Robertson L.A., Kuenen J.G., *Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor*, *FEMS Microbiology Ecology* 16 (1995) 177–184.
- Mulder J.W., M.C.M. van Loosdrecht, C. Hellinga, R. van Kempen, *Full-scale application of the Sharon process for the treatment of rejection water of digested sludge dewatering*, *Water Science & Technology* 43 (11) (2001) 27–134.
- Ni S.Q., Fessehaie A., Lee P.H., Gao, B.Y., Xu X., Sung S., *Interaction of anammox bacteria and inactive methanogenic granules under high nitrogen selective pressure*, *Bioresource Technology* 101 (2010) 6910–6915.
- Nielsen M., Bollmann A., Sliemers O., Jetten M., Schmid M., Strous M., Schmidt I., Larsen L.H., Nielsen L.P., Revsbech N.P., (2005). Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of the mixture and organism in a CANON reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 51 (2), 247-256.
- Notenboom, G.J., Jacobs, J.C., van Kempen, R., and van Loosdrecht, M.C.M. (2002). *High rate treatment with SHARON process of waste water from solid waste digestion*. 3<sup>rd</sup> International IWA-Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes, Munich/Garching, Germany, September 18–20.
- Payne W. J. (ed.) (1981) *Denitrification*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Paredes D., Kusch P., Mbwette T.S.A., Stange F., Müller R.A., Köser H., *New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment-a review*, *Engineering Life Sciences* 7 (1) (2007) 13–25.
- Y. Peng, Y. Chen, S. Wang, C. Peng, M. Liu, X. Song, Y. Cui, *Nitrite accumulation by aeration controlled in sequencing batch reactors treating domestic wastewater*, *Water Science & Technology* 50 (10) (2004) 35–43.
- Pynaert K., Smets B.F., Wyffels S., Beheydt D., Siciliano, Verstraete W., *Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm S.D. from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor*, *Applied & Environmental Microbiology* 69 (2003) 3626–3635.
- Piccinini S., Fabbri C., Sassi D. (2007), *Azoto nei liquami, i metodi per rimuoverlo*, *Suinicoltura* 11 (Supplemento), 24-32.

- Ruscalleda M., López H., Ganigué R., Ouig S., Balaguer M., Colprim J., *Heterotrophic denitrification on granular anammox SBR treating urban landfill leachate*, Water Science & Technology 58 (9) (2008) 1749–1755.
- 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.
- Stowa, *Treatment of nitrogen-rich return flows of sewage treatment plants. Single reactor system for removal of ammonium over nitrite*. (1996) STOWA report 96-01.
- Strous M., Heijnen J.J., Kuenen J.G., Jetten M.S.M., *The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium oxidizing microorganisms*, Applied Microbiology & Biotechnology 50 (1998) 589–596.
- Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., *Key physiological parameters of anaerobic ammonium oxidation*, Applied Microbiology & Biotechnology 65 (1999) 3248–3250.
- I. Suzuki, U. Dular, S.C. Kwok, *Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by Nitrosomonas europaea cells and extracts*, Journal of Bacteriology 120 (1974) 556–558.
- Tang C., Zheng P., Wang C., Mahmood Q., *Suppression of anaerobic ammonium oxidizers under high organic content in high-rate Anammox UASB reactor*, Bioresource Technology 101 (2010) 1762–1768.
- Tartowski, S. L. e R. W. Howarth. 2013. *Nitrogen, Nitrogen Cycle*. In: Levin, S. A. (ed) Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition). Elsevier: pp 537–546.
- Toh S.K., Ashbolt N.J., *Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater*, Applied Microbiology and Biotechnology 59 (2–3) (2002) 344–352.
- Toh S.K., Webb R.I., Ashbolt N.J., *Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters*, Microbial Ecology 43 (2002) 154–167.
- Tomlinson T.G., A.G. Boon, C.N.A. Trotman, *Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal*, Journal of Applied Bacteriology 29 (1966) 266–291.

- J.A. Torà, J. Lafuente, C. Garcia-Belinchón, L. Bouchy, J. Carrera, J.A. Baeza, *High-throughput nitrification of reject water with a novel ammonium control loop: Stable effluent generation for anammox or heterotrophic denitrification*. Chem. Eng. J, 243 (2014) 265–271.
- Trigo C., Campos J.M., Garrido J.M., Mendez R., *Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor*, Journal of Biotechnology 126 (2006) 475–487.
- Van de Graaf A.A., Mulder A., De Bruijn P., Jetten M.S.M., Robertson L.A., Kuenen J.G., *Anaerobic oxidation of ammonia is a biologically mediated process*, Applied & Environmental Microbiology 61 (1995) 1246–1251.
- Van de Graaf A.A., De Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G., *Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor*, Microbiology 142 (1996) 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 der Star W.R.L. (2008). Growth and metabolism of anammox bacteria. Delft University of Technology Department of Biotechnology Environmental Biotechnology Group.
- Van Dongen U., Jetten M.S.M., Van Loosdrecht M.C.M., *The Combined Sharon/Anammox Process: A Sustainable Method for N-Removal from Sludge Water*, IWA Publishing (2001), 64 p.
- Van Hulle, (2005). *Modelling, simulation and optimization of autotrophic nitrogen removal processes*, PhD thesis.
- S.W.H. Van Hulle, E.I.P. Volcke, J. López Teruel, B. Donckels, M.C.M. van Loosdrecht, P.A. Vanrolleghem, *Influence of temperature and pH on the kinetics of the SHARON nitrification process*, Journal of Chemical Technology & Biotechnology 82 (2007) 471–480.
- Van Hulle S.W.H., Vandeweyer H.J.P., Meesschaert B.D., Vanrolleghem P.A., Dejans P., Dumoulin A., *Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams*, Chemical Engineering Journal 162 (2010) 1–20.

- Van Kempen R., J.W. Mulder, M.C.M. van Loosdrecht, *Overview: full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering*, *Water Science & Technology* 44 (2001) 145–152.
- Van Loosdrecht, (2008). *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*, 6, 139- 151.
- Van Niftrick L. e Jetten M.S.M. *Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria: Unique Microorganisms with Exceptional Properties*. *Microbiology and molecular biology reviews* (2012) vol. 76 n. 3: 585-596.
- Vázquez-Padín J.R., Figueroa I., Mosquera-Corral A., Campos J.L., Méndez R., *Post-treatment of effluents from anaerobic digesters by the Anammox process*, *Water Science & Technology* 60 (2009) 1135–1143.
- Visniac, C. & Santer, S. (1957). The Thiobacilli. *Bacteriology Reviews*, 21, 195-213.
- Wett B., *Development and implementation of a robust deammonification process*, *Water Science & Technology* 56 (7) (2007) 81–88.
- Wyffels S., Van Hulle S.W.H., Boeckx P., Volcke E.I.P., Van Cleemput O., Vanrolleghem P.A., Verstraete W., *Modelling and simulation of oxygen-limited partial nitrification in a membrane-assisted bioreactor (MBR)*, *Biotechnology & Bioengineering* 86 (2004) 531–542.
- Zepeda A., A.-C. Texiera, E. Razo-Flores, J. Gomeza, *Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and m-xylene in nitrifying batch cultures*, *Water Research* 40 (2006) 1643–1649.

**SITI WEB:**

- [www.treccani.it](http://www.treccani.it)
- <http://www.amministrazioneincammino.luiss.it/wp-content/uploads/2010/10/La-normativa-comunitaria-in-materia-di-acque1.pdf>
- <http://www.oecd.org>
- <http://www.eea.europa.eu/publications/water-resources-across-europe>
- <http://www.eea.europa.eu/it/pressroom/newsreleases/siccita-e-consumo-eccessivo-di-acqua-in-europa>
- <http://eur-lex.europa.eu>
- <http://ec.europa.eu/environment/pubs/pdf/factsheets/nitrates/it.pdf>
- <http://www.minambiente.it/sites/default/files/archivio/allegati/desertificazione/Sardegna.pdf>

# Ringraziamenti

Un ringraziamento speciale alla Prof. Alessandra Carucci per la fiducia che ha sempre mostrato nelle mie capacità e per i continui incoraggiamenti in questi anni e, soprattutto in questi ultimi mesi, quando tutto sembrava impossibile.

Grazie all'Ing. Stefano Milia, prezioso collega e grande maestro in questa meravigliosa avventura

La presente Tesi è stata prodotta con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.