



UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio

*Indagini a scala pilota del processo di nitrificazione e
caratterizzazione cinetica della biomassa ammonio ossidante*

*Pilot-scale investigations of nitrification process and kinetic
characterization of ammonium oxidizing biomass*

RELATORI:

Prof. Alessio Ceccarini

Dott. Gualtiero Mori

Ing. Alberto Mannucci

CONTRORELATRICE:

Prof.ssa Stefania Giannarelli

CANDIDATO:

Gabriele Donzelli

Anno accademico 2011/2012

INDICE

Premessa.....	4
Capitolo 1 – Introduzione.....	6
1.1 Inquadramento normativo.....	6
1.1.1 Decreto legislativo 3 aprile 2006.....	6
1.1.2 Parte terza- Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque e di gestione delle riserve idriche.....	6
1.1.3 La disciplina degli scarichi.....	7
1.1.4 Le aree sensibili.....	12
1.2 Progetto BACON.....	14
1.2.1 Bioarricchimento del fango attivo con batteri nitrificanti.....	15
1.2.2 Nitrosazione/Anammox.....	16
1.2.3 Cicli alternati e sistemi ibridi a biomasse sospese adese.....	18
1.3 Rimozione biologica dell'azoto.....	20
1.3.1 Nitrificazione.....	21
1.3.2 Denitrificazione.....	24

1.3.3	Tipologie di processo per la rimozione dell'azoto.....	26
1.4	Cinetiche dei microrganismi.....	27
1.4.1	Crescita microbica.....	28
1.4.2	Parametri ambientali che condizionano la crescita.....	31
1.4.3	Selezione dei microrganismi.....	34
1.5	Bioarricchimento.....	36
1.5.1	Effetto del gradiente di temperatura tra le biomasse prodotte nel side-stream e nel main-stream sul processo di bioarricchimento.....	37
1.5.2	Effetto dell'età del fango (SRT) sul processo di bioarricchimento.....	40
Capitolo 2 – Materiali e metodi.....		44
2.1	Impianti pilota.....	44
2.2	Linea main-stream.....	45
2.3	Linea side-stream.....	51
2.4	Metodologie di analisi.....	55
2.4.1	Analisi chimiche.....	55
2.4.2	Solidi sospesi totali.....	57
2.5	Prove batch.....	58

Capitolo 3 – Risultati e conclusioni	61
3.1 Gestione degli impianti.....	61
3.1.1 Gestione impianti linea main-stream.....	61
3.1.2 Gestione impianti linea side-stream.....	65
3.2 Rimozione dell’azoto ammoniacale in presenza di bioarricchimento.....	68
3.3 Effetto delle condizioni operative sulle cinetiche di crescita degli AOB.....	73
3.4 Conclusioni.....	78
Bibliografia.....	79
Ringraziamenti.....	82

PREMESSA

Il trattamento delle acque reflue, sia industriali che civili, è di fondamentale importanza per il rispetto dell'ambiente e in particolare per la salvaguardia degli ecosistemi acquatici presenti nei corpi idrici recettori. Una problematica ambientale legata agli scarichi provenienti dagli impianti di trattamento dei reflui è l'eccessivo contenuto di nutrienti (azoto e fosforo) presenti negli effluenti che possono causare fenomeni di eutrofizzazione. Il D.lgs 152/06 è la normativa vigente che si occupa di fissare le concentrazioni massime che devono essere contenute negli scarichi ed individua inoltre delle aree sensibili in cui sono fissati dei limiti più stringenti.

Negli impianti di trattamento tradizionali, per quanto riguarda la rimozione dell'azoto, sono presenti dei limiti legati al fatto che all'interno dello stesso reattore dove avviene la degradazione della sostanza organica, ad opera di microrganismi eterotrofi aerobi, sono presenti anche i microrganismi autotrofi che provvedono al processo di nitrificazione. Essendo questi ultimi caratterizzati da cinetiche estremamente lente rispetto ai primi sono necessari volumi dei reattori elevati e la sostanza organica viene trattenuta per un tempo superiore a quello che sarebbe necessario con un eccessivo consumo di ossigeno e un minor rendimento nella produzione di biogas in fase di digestione anaerobica.

Il progetto BACON (Biotecnologie Ambientali per il Controllo dei Nutrienti), si propone di implementare tecnologie innovative per il trattamento dei reflui ed in particolare per il controllo dei nutrienti. Una possibile applicazione che potrebbe essere applicata ad impianti reali per superare il problema della rimozione dell'azoto è quella di operare un bioarricchimento con batteri autotrofi all'interno del principale reattore biologico dell'impianto facendo crescere la biomassa in un'impianto laterale alimentato con il surnatante prodotto dalla fase di digestione anaerobica.

Studiare a scala pilota il processo di bioarricchimento per verificare l'applicabilità della biotecnologia ad un impianto reale è stato l'argomento della presente tesi. Sono stati utilizzati a tale scopo tre impianti pilota due dei quali (impianti main-stream) sono stati alimentati con refluo civile proveniente all'impianto Cuoidepur s.p.a. e simulavano il trattamento secondario di un impianto di depurazione; il terzo impianto pilota (side-stream) è stato invece alimentato con un flusso ad alto carico di azoto per avere caratteristiche simili al surnatante prodotto nella fase di digestione anaerobica. Gli impianti della linea main-stream hanno lavorato alle medesime condizioni operative ed erano diversi solo per il metodo di separazione solido-liquido; due membrane a fibra cava

operanti in ultrafiltrazione (porosità di 0,4 μm) per un'impianto e una vasca di sedimentazione per l'altro.

Il monitoraggio degli impianti e la campagna di campionamenti ha permesso la raccolta di dati che ci hanno permesso di valutare la rimozione percentuale di ammonio sia in presenza che in assenza di bioarricchimento. Inoltre sono stati effettuati dei test cinetici allo scopo di verificare se le diverse condizioni operative presenti nell'impianto alimentato con il surnatante abbiano contribuito a selezionare una biomassa con differenti caratteristiche cinetiche.

Capitolo 1 – Introduzione

1.1 Inquadramento normativo

1.1.1 Decreto legislativo 3 aprile 2006

La normativa in vigore che si occupa della tutela delle acque è contenuta nel Testo unico dell'ambiente - emanato il 3 Aprile 2006 in attuazione della legge 15 dicembre 2004, n.308 recante delega al Governo per il riordino, il coordinamento e l'integrazione della legislazione in materia ambientale e misure di diretta applicazione – il quale si pone come obiettivo primario la promozione dei livelli della qualità della vita umana, da realizzare attraverso la salvaguardia e il miglioramento delle condizioni dell'ambiente e l'utilizzazione accorta e razionale delle risorse naturali.

Essa recepisce le direttive europee in ordine alla tutela ambientale e disciplina le seguenti materie:

- nella Parte seconda, le procedure per la Valutazione ambientale strategica (VAS), per la Valutazione di impatto ambientale (VIA) e per l'Autorizzazione ambientale integrata (IPPC);
- nella Parte terza la difesa del suolo e lotta alla desertificazione, la tutela delle acque dall'inquinamento e la gestione delle risorse idriche;
- nella Parte quarta, la gestione dei rifiuti e la bonifica dei siti contaminati;
- nella Parte quinta, la tutela dell'aria e la riduzione delle emissioni in atmosfera;
- nella Parte sesta, la tutela risarcitoria contro i danni all'ambiente

1.1.2 Parte terza- Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque e di gestione delle riserve idriche

La parte terza del decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152 rinnova la normativa circa la tutela delle acque dall'inquinamento e la gestione delle riserve idriche; rinnova e introduce norme in materia di difesa del suolo e di lotta alla desertificazione, ponendosi l'obiettivo di fondere in un unico testo le numerose disposizioni normative previgenti.

Essa è suddivisa in quattro sezioni:

- Sezione I: Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione (artt. da 53 a 72)
- Sezione II: Tutela delle acque dall'inquinamento (artt. da 73 a 140)
- Sezione III: Gestione delle risorse idriche (artt. da 141 a 169)
- Sezione IV: Disposizioni transitorie e finali (artt. da 170 a 176)

Questa parte del testo unico ha di fatto abrogato le seguenti normative relative alla tutela delle acque:

- la legge n.36/1994 (Risorse idriche)
- il D.Lgs n.152/1999 (Tutela delle acque)
- il D.M. n.367/2003 (Limiti di sostanze pericolose nelle acque)

1.1.3 La disciplina degli scarichi

La disciplina degli scarichi di acque reflue industriali e urbane viene in particolare normata al Titolo III, Capo III.

Le definizioni riportate dal decreto che sono direttamente collegate alla disciplina degli scarichi sono le seguenti:

- abitante equivalente: il carico organico biodegradabile avente una richiesta biochimica di ossigeno a 5 giorni (BOD_5) pari a 60 grammi di ossigeno al giorno;
- acque reflue domestiche: acque reflue provenienti da insediamenti di tipo residenziale e da servizi derivanti prevalentemente dal metabolismo umano;
- acque reflue industriali: qualsiasi tipo di acque reflue scaricate da edifici od impianti in cui si svolgono attività commerciali o di produzione di beni, diverse dalle acque reflue domestiche e dalle acque meteoriche di dilavamento;
- acque reflue urbane: acque reflue domestiche o il miscuglio di acque reflue domestiche, di acque reflue industriali, ovvero meteoriche di dilavamento convogliate in reti fognarie, anche separate e provenienti da agglomerati;
- agglomerato: l'area in cui la popolazione, ovvero le attività produttive, sono concentrate in misura tale da rendere ammissibile sia tecnicamente che economicamente in rapporto anche ai benefici ambientali conseguibili, la raccolta e il convogliamento in una fognatura dinamica delle acque reflue urbane verso un sistema di trattamento o verso un punto di recapito finale;
- composto azotato: qualsiasi sostanza contenente azoto, escluso quello allo stato molecolare gassoso;
- eutrofizzazione: arricchimento delle acque di nutrienti, in particolar modo di composti dell'azoto e/o del fosforo, che provoca una abnorme proliferazione di alghe e/o di forme superiori di vita vegetale, producendo la perturbazione dell'equilibrio degli organismi presenti nelle acque e della qualità delle acque interessate;
- scarico: qualsiasi immissione effettuata esclusivamente tramite un sistema stabile di collettamento che collega senza soluzione di continuità il ciclo di produzione del refluo con il corpo ricettore

acque superficiali, sul suolo, nel sottosuolo e in rete fognaria, indipendentemente dalla loro natura inquinante, anche sottoposte a preventivo trattamento di depurazione;

- acque di scarico: tutte le acque reflue provenienti da uno scarico;

- valore limite di emissione: limite di accettabilità di una sostanza inquinante contenuta in uno scarico, misurata in concentrazione, oppure in massa per unità di prodotto o di materia prima lavorata, o in massa per unità di tempo. I valori limite di emissione possono essere fissati anche per determinati gruppi, famiglie o categorie di sostanze. I valori limite di emissione delle sostanze si applicano di norma nel punto di fuoriuscita delle emissioni dall'impianto, senza tener conto dell'eventuale diluizione;

- corpo idrico superficiale: un elemento distinto e significativo di acque superficiali, quale un lago, il bacino artificiale di un torrente, fiume o canale, acque di transizione o un tratto di acque costiere. La disciplina in vigore pone il divieto di scarico sul suolo, nel sottosuolo e nelle acque sotterranee, salvo alcune eccezioni. Pertanto gli scarichi di acque reflue (urbane e industriali) devono essere generalmente recapitati in corpi idrici superficiali.

Nell'allegato V sono riportate le tabelle che stabiliscono i valori limite di BOD5, COD e solidi sospesi. Le Regioni possono apportare variazione a questi limiti solo in senso restrittivo.

Gli scarichi provenienti da impianti di trattamento delle acque reflue urbane recapitanti in acque superficiali devono rispettare i limiti di emissione riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Limiti di immissione per gli impianti di acque reflue urbane.

Potenzialità impianto in A.E. (abitanti equivalenti)	2.000 – 10.000		>10.000	
	Concentrazione	% di riduzione	Concentrazione	% di riduzione
BOD5 (senza nitrificazione) mg/L	≤ 25	70-90 (5)	≤ 25	80
COD mg/L	≤ 125	75	≤ 125	75
Solidi Sospesi mg/L	≤ 35 (5)	90 (5)	≤ 35	90

Nel caso in cui il recapito dello scarico sia un area sensibile, lo scarico deve rispettare anche quanto prescritto dalla Tabella 2 per quanto riguarda i parametri azoto e fosforo.

Tabella 2. Limiti di immissione per gli impianti di acque reflue urbane recapitanti in aree sensibili.

Parametri (media annua)	Potenzialità impianto in A.E.			
	10.000 – 100.000		>100.000	
	Concentrazione	% di riduzione	Concentrazione	% di riduzione
Fosforo totale (P mg/L)	□ 2	80	□ 1	80
Azoto totale (N mg/L)	□ 15	70-80	□ 10	70-80

Nel caso di fognature miste, che raccolgono anche scarichi provenienti da insediamenti industriali devono essere rispettati anche i valori-limite della Tabella 3.

Tabella 3. Valori limiti di immissione in acque superficiali e in fognatura.

Numero parametro	SOSTANZE	unità di misura	Scarico in acque superficiali	Scarico in rete fognatura (*)
1	Ph		5,5-9,5	5,5-9,5
2	Temperatura	°C	(1)	(1)
3	Colore		non percettibile con diluizione 1:20	non percettibile con diluizione 1:40
4	Odore		non deve essere causa di molestie	non deve essere causa di molestie
5	materiali grossolani		assenti	assenti
6	Solidi sospesi totali	mg/L	≤ 80	≤ 200
7	BOD ₅ (come O ₂)	mg/L	≤ 40	≤ 250
8	COD (come O ₂)	mg/L	≤ 160	≤ 500
9	Alluminio	mg/L	≤ 1	≤ 2,0

10	Arsenico	mg/L	≤ 0,5	≤ 0,5
11	Bario	mg/L	≤ 20	-
12	Boro	mg/L	≤ 2	≤ 4
13	Cadmio	mg/L	≤ 0,02	≤ 0,02
14	Cromo totale	mg/L	≤ 2	≤ 4
15	Cromo VI	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,20
16	Ferro	mg/L	≤ 2	≤ 4
17	Manganese	mg/L	≤ 2	≤ 4
18	Mercurio	mg/L	≤ 0,005	≤ 0,005
19	Nichel	mg/L	≤ 2	≤ 4
20	Piombo	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,3
21	Rame	mg/L	≤ 0,1	≤ 0,4
22	Selenio	mg/L	≤ 0,03	≤ 0,03
23	Stagno	mg/L	≤ 10	
24	Zinco	mg/L	≤ 0,5	≤ 1,0
25	Cianuri totali (come CN)	mg/L	≤ 0,5	≤ 1,0
26	Cloro attivo libero	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,3
27	Solfuri (come H ₂ S)	mg/L	≤ 1	≤ 2
28	Solfiti (come SO ₃)	mg/L	≤ 1	≤ 2
29	Solfati (come SO ₄) (3)	mg/L	≤ 1000	≤ 1000

30	Cloruri (3)	mg/L	≤ 1200	≤ 1200
31	Fluoruri	mg/L	≤ 6	≤ 12
32	Fosforo totale (come P) (2)	mg/L	≤ 10	≤ 10
33	Azoto ammoniacale (come NH ₄) (2)	mg /L	≤ 15	≤ 30
34	Azoto nitroso (come N) (2)	mg/L	≤ 0,6	≤ 0,6
35	Azoto nitrico (come N) (2)	mg /L	≤ 20	≤ 30
36	Grassi e olii animali/vegetali	mg/L	≤ 20	≤ 40
37	Idrocarburi totali	mg/L	≤ 5	≤ 10
38	Fenoli	mg/L	≤ 0,5	≤ 1
39	Aldeidi	mg/L	≤ 1	≤ 2
40	Solventi organici aromatici	mg/L	≤ 0,2	≤ 0,4
41	Solventi organici azotati	mg/L	≤ 0,1	□ 0,2
42	Tensioattivi totali	mg/L	≤ 2	≤ 4
43	Pesticidi fosforati	mg/L	≤ 0,10	≤ 0,10
44	Pesticidi totali (esclusi i fosforati)	mg/L	≤ 0,05	≤ 0,05
	tra cui:			

45	- aldrin	mg/L	≤ 0,01	≤ 0,01
46	- dieldrin	mg/L	≤ 0,01	≤ 0,01
47	- endrin	mg/L	≤ 0,002	≤ 0,002
48	- isodrin	mg/L	≤ 0,002	≤ 0,002
49	Solventi clorurati	mg/L	≤ 1	≤ 2
50	<i>Escherichia coli</i>	UFC/100mL	Nota	
51	Saggio di tossicità acuta		Il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 50% del totale	il campione non è accettabile quando dopo 24 ore il numero degli organismi immobili è uguale o maggiore del 80% del totale

1.1.4 Le aree sensibili

Il Testo Unico prevede disposizioni particolari per aree che a causa del loro stato d'inquinamento, del fragile equilibrio ambientale nonché della loro particolare destinazione d'uso richiedono specifiche norme di tutela, tra le quali sono ricomprese le aree sensibili.

Le aree sensibili possono essere definite come “corpi idrici soggetti a fenomeni di eutrofizzazione o che potrebbero diventarlo qualora non si intervenisse in maniera adeguata”.

Per eutrofizzazione si intende un fenomeno dovuto all'eccessiva presenza di sostanze nutrienti nei corpi idrici a causa dell'inquinamento provocato dalle molteplici attività antropiche. Il livello elevato di tali sostanze può provocare un'esagerata proliferazione algale a discapito delle comunità vegetali e animali naturali. La domanda di ossigeno, determinata dalla biomassa delle alghe o provocata dalla loro decomposizione, può rompere l'equilibrio naturale dell'ecosistema acquatico. In casi estremi può provocare un'elevata mortalità degli organismi acquatici. L'eutrofizzazione può anche contribuire alla fioritura di alghe tossiche. I nutrienti, responsabili del fenomeno, possono

provenire da varie fonti, sia puntuali che diffuse, ivi comprese quelle agricole, le acque reflue urbane e le precipitazioni atmosferiche.

Gli scarichi di acque reflue urbane provenienti dagli agglomerati con un numero di abitanti equivalenti maggiore di 10.000 che scaricano in aree sensibili oltre al rispetto dei valori della Tabella 1 e 3, devono anche conformarsi a quanto prescritto dalla Tabella 2. Essa è riferita a due soli parametri ossia l'azoto totale e il fosforo totale. La Tabella deve essere rispettata per uno o entrambi i parametri a seconda della situazione locale ossia che la degenerazione dell'equilibrio dell'ecosistema acquatico sia dovuta all'eccessiva presenza di entrambi i nutrienti o solo ad uno di essi.

Tabella 2. Limiti di emissione per gli impianti di acque reflue urbane recapitanti in aree sensibili.

Parametri (media annua)	Potenzialità impianto in A.E.			
	10.000 – 100.000		>100.000	
	Concentrazione	% di riduzione	Concentrazione	% di riduzione
Fosforo totale (P mg/L)	□ 2	80	□ 1	80
Azoto totale (N mg/L)	□ 15	70-80	□ 10	70-80

La Tabella riporta norme di emissione riferite alla concentrazione e alla percentuale di riduzione, quest'ultima calcolata sulla base del carico presente nel reflu in entrata al depuratore e nell'acqua di scarico. Lo scarico è conforme se rispetta uno dei due limiti. I valori sono riferiti a medie annuali. I limiti di emissione sono stabiliti in base alla potenzialità dell'impianto di depurazione e quindi al numero degli abitanti equivalenti dell'agglomerato, dando valori diversi per due classi di agglomerati e più precisamente con un numero di abitanti equivalenti compreso tra 10.000 e 100.000 e con più di 100.000 abitanti equivalenti. Da quanto emerge dalla Tabella, l'obbligo del rispetto dei valori tabellari è rivolta agli agglomerati con un numero di abitanti equivalenti maggiore di 10.000, salvo che diversa disciplina regionale preveda limiti più restrittivi o l'applicazione di tali norme anche a scarichi di acque reflue provenienti da agglomerati di dimensioni minori.

1.2 Progetto BACON

Il progetto BACON (Biotecnologie Ambientali per il Controllo dei Nutrienti) è un progetto di ricerca riguarda la tematica del controllo e della tutela dell'ambiente e si pone come obiettivo principale lo sviluppo di innovazioni tecnologiche e strumenti decisionali per il controllo dei nutrienti nel trattamento delle acque reflue.

Il progetto Bacon ha un budget di 1.096.000 € ed è stato co-finanziato dalla Regione Toscana con 350.000 € a valere sul Fondo Sociale Europeo tramite bando pubblico per la partecipazione di giovani ricercatori ad attività di ricerca congiunta a valere sul POR. CREO FSE 2007-2013 Competitività regionale e occupazione.

Il contesto specifico a cui i prodotti della ricerca sono volti è quello del bacino dell'Arno, in cui entro il 2012 dovranno essere rispettati i limiti allo scarico per i nutrienti in aree sensibili. Attualmente la rimozione dell'azoto e del fosforo non raggiunge la percentuale richiesta a scala di bacino, per cui nell'ambito dell'attività del progetto BACON sono state individuate e sperimentate a scala pilota soluzioni tecnologiche innovative al fine di aumentare l'efficienza di rimozione dei nutrienti per il raggiungimento dei limiti di legge.

I limiti nel contesto tradizionale del trattamento dei reflui urbani e industriali consistono nel fatto che la rimozione della sostanza carboniosa e la nitrificazione dell'ammonio avvengono nei processi a fanghi attivi all'interno dello stesso reattore di aerazione nel quale si vengono dunque a trovare sia i microrganismi eterotrofi (caratterizzati da cinetiche veloci) sia i batteri autotrofi nitrificanti (caratterizzati da cinetiche estremamente lente). La conseguenza negativa nei sistemi convenzionali a fanghi attivi è quindi quella che è necessario trattenere la biomassa nitrificante all'interno del reattore per un periodo di tempo superiore rispetto a quello di cui avrebbe bisogno; questo per permettere alla biomassa nitrificante di garantire una rimozione soddisfacente di ammonio. Gli svantaggi che si presentano in queste condizioni sono la richiesta di volumi di reazione molto consistenti e un'ossidazione della maggior parte dei composti carboniosi in condizioni aerobiche. Se invece l'ossidazione della frazione carboniosa avvenisse principalmente in condizioni anaerobiche avremmo un beneficio in termini di minor produzione di fanghi biologici, risparmio di energia per il trasferimento dell'ossigeno e produzione di biogas ricco di metano ed utilizzabile per la produzione di elettricità.

Le soluzioni tecnologiche innovative sperimentate nel progetto BACON per la rimozione dell'azoto sono:

- 1) Bioarricchimento del fango attivo con batteri nitrificanti (bioaugmentation)
- 2) Nitrosazione – Annamox
- 3) Cicli alternati a sistemi ibridi a biomasse sospese adese

1.2.1 Bioarricchimento del fango attivo con batteri nitrificanti (bioaugmentation)

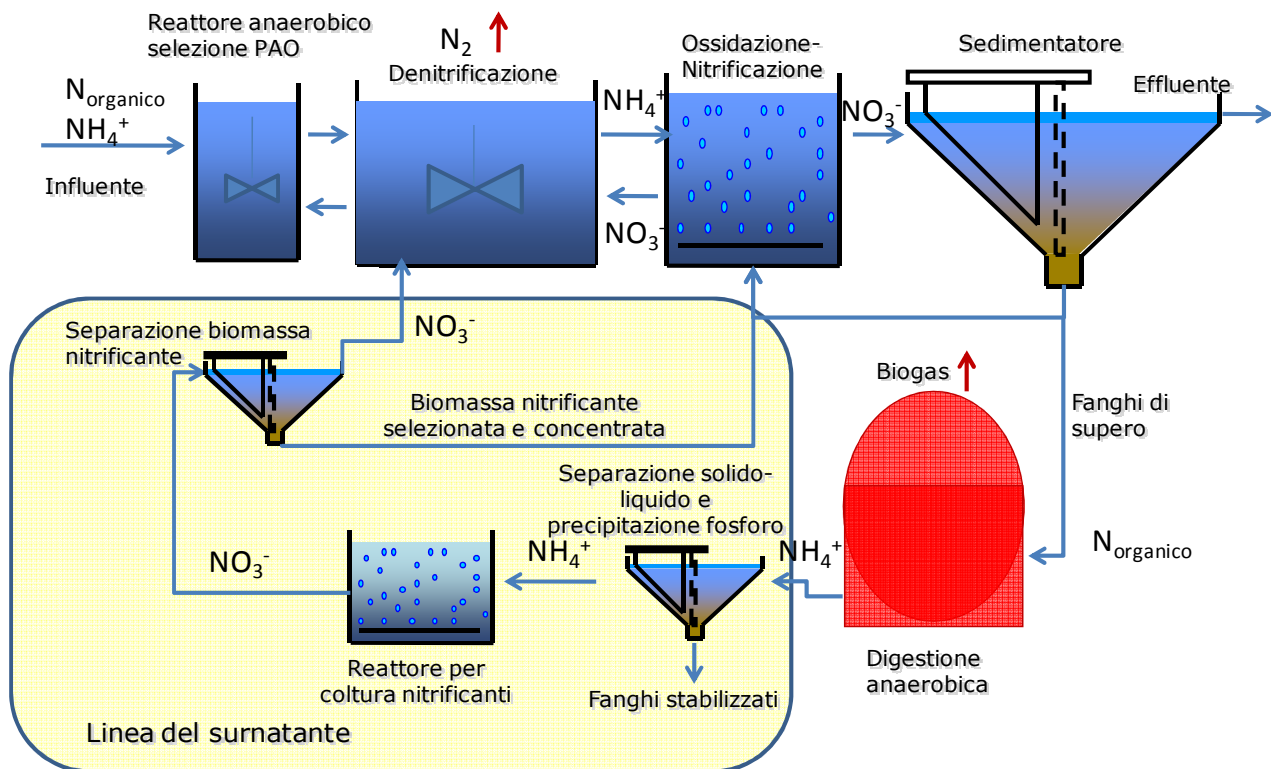
L'applicabilità della bioaugmentation nella filiera di trattamento verrà testata a scala pilota presso il laboratorio congiunto (CER2CO).

Questa soluzione tecnologica può essere realizzata attraverso l'utilizzo di due strategie:

- la separazione del tempo di residenza cellulare della biomassa nitrificante e quella eterotrofa, ad esempio attraverso la bioaugmentation;
- la selezione di microrganismi nitrificanti dotati di cinetiche di crescita il più possibile elevate.

Nel primo caso è possibile diminuire il tempo di residenza facendo crescere una biomassa nitrificante su flussi ridotti con elevata concentrazione di ioni ammonio e bassa concentrazione di COD biodegradabile, inoculandola poi in continuo nel reattore biologico aerato principale dell'impianto. Il flusso ridotto viene creato artificialmente nella nostra sperimentazione ma applicando la tecnologia ad un impianto reale il surnatante del digestore anaerobico ha caratteristiche simili e può quindi essere utilizzato per il nostro scopo.

Nel secondo caso, per selezionare biomassa con cinetica di rimozione più elevata, è necessario agire sui fattori che determinano una potenziale pressione selettiva sui nitrificanti quali il tempo di ritenzione cellulare, la reattoristica, la concentrazione di ossigeno e l'alternanza di condizioni aerobiche e anossiche e i gradienti di concentrazione (nel tempo e nello spazio).



Schema esemplificativo di una filiera di trattamento comprendente le tecnologie della bioaugmentazione e della rimozione biologica del fosforo- In figura sono riportati i flussi delle principali forme dell'azoto.

1.2.2 Nitrosazione/Anammox

Anammox è l'acronimo di Anaerobic AMMonium Oxidation ed è un processo mediato da un particolare tipo di microrganismi i quali introducono una via più breve e alternativa nel ciclo dell'azoto. In pratica in condizioni strettamente anaerobiche questi microrganismi convertono l'ammonio ad azoto gassoso N_2 sfruttando il nitrito come accettore di elettroni. Dal momento che i microrganismi responsabili della conversione sono autotrofi, il processo avviene utilizzando la CO_2 come principale fonte di carbonio, senza bisogno di substrati organici.

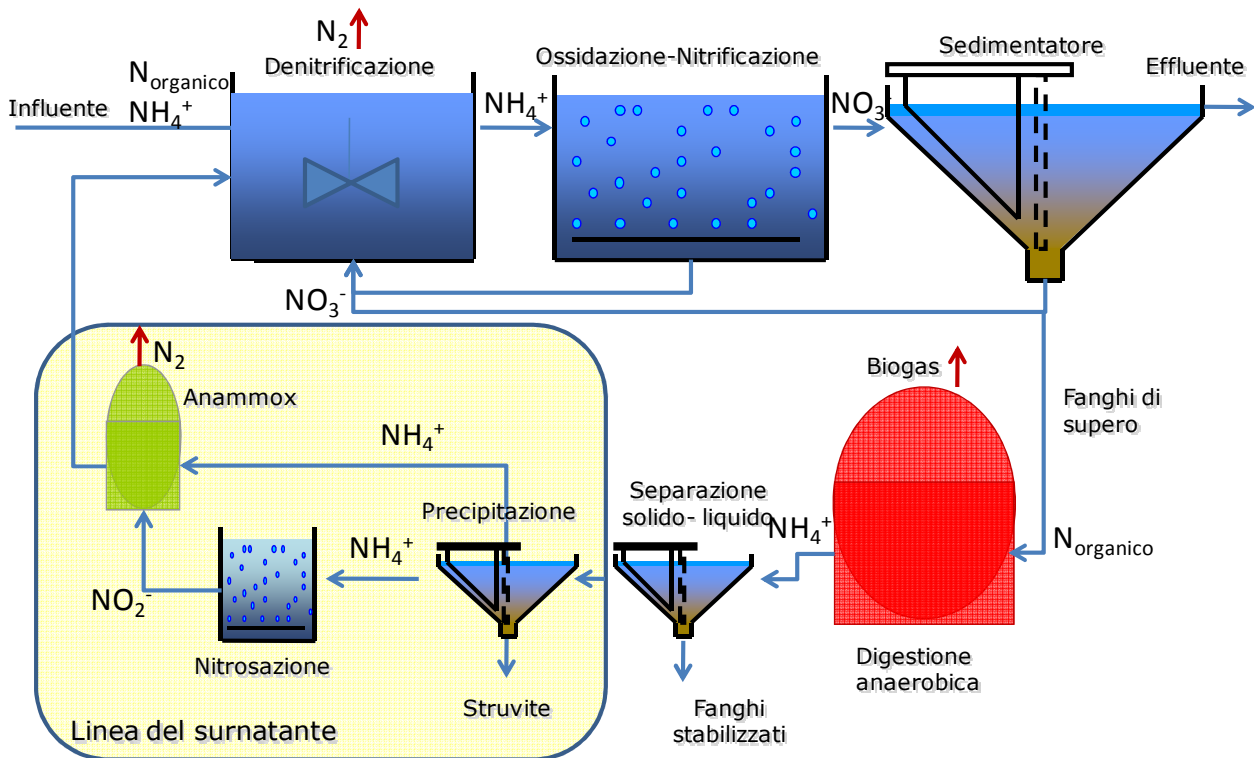
I potenziali vantaggi dell'applicazione di questa biotecnologia emergono se si prendono in considerazione le differenze rispetto ai processi convenzionali. L'approccio tradizionale alla rimozione dell'azoto presenta numerose varianti, ma tutte si basano sulla conversione dell'ammonio (numero di ossidazione, -3) a nitrato (numero di ossidazione, $+5$) che deve poi essere convertito per denitrificazione a N_2 (numero di ossidazione, 0). Dal punto di vista energetico, dunque, il processo non è ottimale in quanto si raggiunge il massimo grado di ossidazione (NO_3^-) dell'azoto a partire da

quello minimo (NH_4^+) con consumo di ossigeno e si torna indietro ad azoto molecolare con consumo di carbonio (COD). Sia la nitrificazione che la denitrificazione sono in effetti processi a due fasi. La prima fase che conduce all'ossidazione dell'ammonio a nitrato è l'ossidazione a nitrito (nitrosazione) e la seconda è l'ossidazione del nitrito a nitrato (nitratazione); viceversa il primo step della denitrificazione è la riduzione del nitrato sempre a nitrito, ed il secondo è la riduzione del nitrito a N_2 . Se ne deduce quindi che un processo energeticamente più conveniente è quello di accoppiare la nitrosazione alla denitrificazione da nitrito (Anammox).

Condizione necessaria per l'utilizzo di una biomassa Anammox nella rimozione dell'azoto dalle acque reflue è quindi una fase di pretrattamento che consenta la nitrificazione parziale del refluo (nitrosazione o nitritazione). La combinazione di un processo aerobico per la conversione dell'ammoniaca a nitrito e di un processo anaerobico, Anammox, per la conversione del nitrito e del restante ammonio ad N_2 consente di ottenere una completa rimozione dell'azoto con un processo completamente autotrofo.

Tale soluzione, rispetto al convenzionale processo di nitrificazione-denitrificazione, presenta una serie di vantaggi, in particolare:

- riduzione della spesa energetica: 57% dell'ossigeno in meno da fornire al sistema;
- riduzione del 100% della richiesta di COD rapidamente biodegradabile da aggiungere in fase di denitrificazione;
- riduzione del 85% dei fanghi prodotti (da circa 1.4 kgCOD/kgN a 0.2 kgCOD/kgN).



Schema esemplificativo di una filiera di trattamento comprendente tecnologia nitrosazione-anammox e la precipitazione di struvite- In figura sono riportati i flussi delle principali forme dell'azoto.

1.2.3 Cicli alternati e sistemi ibridi a biomasse sospese adese

Nei piccoli e medi impianti, nella fascia di potenzialità 2000-10000 AE, la mancanza delle volumetrie necessarie per la rimozione dell'azoto, vasche di denitrificazione, può essere compensata convertendo il processo a fanghi attivi convenzionale in vasca unica in un processo sequenziale a flusso continuo con la gestione a "cicli alternati" anossici-aerobici. Il processo discontinuo consente di sfruttare come accettori di elettroni i nitrati prodotti dalla nitrificazione senza modificare le strutture impiantistiche, ma installando efficienti sistemi di automazione a basso costo degli impianti di depurazione biologica, basati sull'utilizzo di hardware industriale affidabile e software opportunamente sviluppato. Tali sistemi di automazione consentono di massimizzare il risparmio energetico passando "alternativamente" dall'aerazione+miscelazione (turbine, aerazione a bolle fini, aeratori sommersi ecc.) alla miscelazione meccanica semplice a basso consumo (5-10 W/mc).

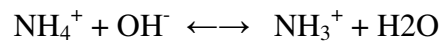
Una tecnologia alternativa consiste nell'ottimizzare i volumi attraverso l'adozione di sistemi ibridi a biomasse sospese adese, dette anche reattori a letto mobile ibrido. In questi sistemi la biomassa è presente sia sotto forma di fango attivo sospeso, sia sotto forma di biofilm adeso a supporti mantenuti in movimento all'interno del liquame da trattare. Con i reattori a letto mobile ibrido è possibile realizzare impianti multistadio per eseguire tutte le fasi della depurazione biologica con biomasse specializzate in ogni vasca. Tali sistemi hanno notevole flessibilità: in fase di gestione si può agire sia sul rapporto di ricircolo del fango, sia sulla quantità di supporti (tasso di riempimento) presenti in ciascuna vasca. Il continuo movimento dei supporti, inoltre, favorisce il ricambio del biofilm e diminuisce notevolmente i rischi di intasamento.

Nel caso di piccoli impianti sottodimensionati la conversione a sistemi ibridi consente di aumentare la potenzialità dell'impianto senza ricorrere ad aumenti di volumetria dei reattori biologici o di superficie dei sedimentatori finali. La crescita dei batteri nitrificanti sui supporti mobili è indipendente dall'età del fango della biomassa sospesa con i vantaggi gestionali che ne conseguono.

1.3 Rimozione biologica dell'azoto

I problemi che lo ione ammonio può causare in un corpo idrico sono di vario genere:

- eutrofizzazione;
- abbassamento del tenore di ossigeno dovuto all'ossidazione batterica dell'azoto ammoniacale ad azoto nitroso (NO_2^-) e nitrico (NO_3^-);
- limitazioni agli usi idropotabili per i rischi connessi alla presenza di nitrati che riducendosi a nitriti nell'apparato digerente e combinandosi all'emoglobina del sangue vi bloccano il meccanismo di trasporto dell'ossigeno (cianosi infantile). Per tale motivo le norme dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stabiliscono una concentrazione massima di 11 mg/l di $\text{NO}_3\text{-N}$ nelle acque potabili;
- diretta tossicità dell'azoto ammoniacale per la fauna ittica, quando esso sia presente in forma di ammoniaca disciolta (NH_3). Poiché l'equilibrio con gli ioni ammonio (NH_4^+) è regolato dal pH in base alla relazione



un aumento di pH determina un incremento della presenza di NH_3 e quindi della tossicità per molte specie ittiche, già considerevole per concentrazioni di 0,01 mg/l di $\text{NH}_3\text{-N}$.

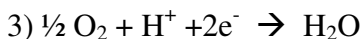
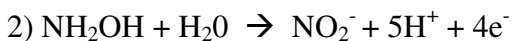
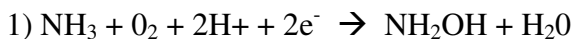
La soluzione al momento più matura su scala reale, soprattutto in campo urbano, per ottenere una rimozione dell'azoto che sia sufficiente a non creare danni all'ambiente, è quella biologica, attraverso una fase ossidativa di nitrificazione, con formazione di nitriti e quindi nitrati, seguita da una fase riduttiva di denitrificazione, con produzione di azoto molecolare (N_2) non più utilizzabile nei cicli biologici e come tale ceduto all'atmosfera.

1.3.1 Nitrificazione

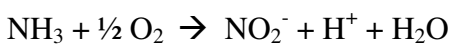
La nitrificazione è un processo a due stadi in cui lo ione ammonio NH_4^+ o l'ammoniaca (NH_3) vengono trasformati in un primo momento a nitriti da batteri ossidanti ammonio (AOB), spesso della specie *Nitrosomonas*, e in un secondo momento a nitrati da batteri ossidanti i nitriti, spesso della specie *Nitrobacter*.

I due processi della nitrificazione, sono chiamati rispettivamente nitrosazione, la quale contribuisce all'ossidazione dello ione ammonio per formare ione nitrito (NO_2^-), e nitratazione, che invece a partire dallo ione nitrito porta alla formazione dello ione nitrato (NO_3^-). Entrambi i gruppi di microrganismi che sono responsabili quindi del processo di nitrificazione sono da considerarsi inclusi nella classe degli organismi chemio-lito-autrofi, ovvero traggono l'energia necessaria alle loro funzioni vitali dall'ossidazione dell'ammoniaca, cioè un composto inorganico, piuttosto che dalla sostanza organica ed inoltre utilizzano come fonte di carbonio la anidride carbonica invece della sostanza organica inerte.

Il primo dei due processi, che abbiamo detto essere la nitrosazione, può essere ulteriormente suddiviso in tre sottoprocessi:



La reazione totale è dunque:



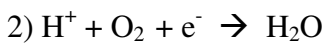
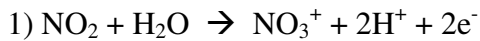
$$\Delta G^\circ (\text{W}) = - 270 \text{ kJ/mol NH}_4^+ \text{-N}$$

In questo primo processo viene quindi generata dell'acidità nell'ambiente.

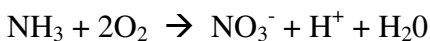
La seconda parte del processo, detta nitratazione ed operata dagli NOB, viene condotta utilizzando l'enzima nitriti ossido-riduttasi (NOR) e può essere scomposta in due sottoprocessi.

- 1) I nitriti sono ossidati a nitrati tramite l'utilizzo da parte dei batteri dell'enzima (NOR)
- 2) Idrogeno libero, ossigeno e gli elettroni formano acqua

Utilizzando le reazioni chimiche:



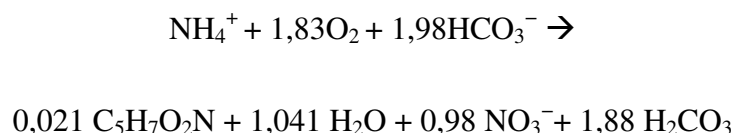
Addizionando i due processi di nitrosazione e nitratazione possiamo descrivere in un'unica reazione ciò che invece avviene come abbiamo visto in più processi e ad opera di due gruppi di microrganismi (AOB e NOB) per avere una reazione complessiva del processo di nitrificazione.



$$\Delta G^\circ (\text{W}) = - 80 \text{ kJ/mol NO}_2^- \text{-N}$$

Il processo di nitrificazione produce alcalinità che può portare a notevoli decrementi del pH fino a inibire il processo biologico, e che è pertanto necessario neutralizzare qualora lo scarico non contenga abbastanza alcalinità. Sono necessari circa 7 mg/L di alcalinità espressa come CaCO₃ per mg di azoto ossidato.

C'è inoltre da considerare che parte dell'azoto è anche richiesto per la sintesi batterica sia dei batteri ossidanti l'ammonio (AOB) che di quelli che ossidano i nitriti (NOB) per cui in totale si può scrivere la seguente espressione stechiometrica che tiene conto sia dell'ossidazione dell'ammoniaca, sia della sintesi batterica (su basi teoriche e sperimentali):



La velocità di ossidazione dell'ammoniaca, dovuta principalmente ai Nitrosomonas, in assenza di fattori limitanti, è assai minore rispetto a quella dei Nitrobacter nell'ossidazione da nitriti a nitrati. Nelle condizioni di reale funzionamento, pertanto, l'ossidazione a nitriti limita di fatto la velocità dell'intero processo; proprio per questo motivo non si verificano accumuli di nitriti.

Il processo di nitrificazione viene svolto dai microrganismi che trovano solo in certi tipi di ambiente le condizioni adatte alla loro crescita. Le variazioni quindi di questo ambiente ideale hanno un effetto inibitorio sul tasso di crescita che oltre certe condizioni limite può anche arrestarsi totalmente. I principali fattori che influenzano il tasso di crescita dei microrganismi e quindi in un impianto di trattamento vanno sempre tenuti sotto controllo sono i seguenti:

- concentrazione di ammoniaca libera (NH₃) FA
- concentrazione di acido nitroso libero (HNO₂) FNA
- pH
- temperatura
- concentrazione di ossigeno disciolto
- concentrazione di ammonio

Per quanto riguarda l'effetto inibitorio dell'ammoniaca libera (FA) e dell'acido nitroso libero (FNA) esso è stato chiaramente dimostrato (Anthonisen et al. 1976). Le concentrazioni di FA che risultano inibenti per i batteri AOB risultano 10-150 mg/L mentre per i batteri NOB abbiamo 0,1-1 mg/L. Le concentrazioni di FNA al quale abbiamo l'inibizione sono comprese tra 0,22 e 2,8 mg/L. Effetti inibenti sono stati trovati (Alenka Princip et al. 1998) anche al variare della concentrazione di ammonio, del pH e dell'ossigeno disciolto. E' stato infatti rilevato che al variare di queste condizioni sono stati osservati diversi tassi di crescita e quindi sono state selezionate diverse comunità di microrganismi.

La temperatura ha anch'essa un effetto sui tassi di crescita dei microrganismi ed è stato osservato (Neufeld R. et al. 1986) che valori ottimali si ottengono con temperature intorno ai 30°C. Al discostarsi da questo valori in entrambe le direzioni abbiamo una progressiva diminuzione della crescita. Come limite superiore la crescita è totalmente inibita a 45°C.

Il tasso di crescita netto dei microrganismi viene espresso tramite l'equazione di Monod:

$$\mu' = \mu_{nm} \cdot \frac{N}{K_n \cdot N} - k_{dn}$$

dove:

- μ'_n è il tasso netto di crescita dei batteri nitrificanti [T⁻¹];

- μ_{nm} è il tasso massimo di crescita dei batteri nitrificanti [T^{-1}];
- N è la concentrazione di azoto ammoniacale [$mg L^{-3}$];
- K_n è la costante di semisaturazione, ovvero la concentrazione di azoto ammoniacale in corrispondenza della quale il tasso netto di crescita assume un valore pari alla metà del valore massimo [$mg L^{-3}$];
- k_{dn} è la costante di decadimento endogeno per i batteri nitrificanti [T^{-1}]

1.3.2 Denitrificazione

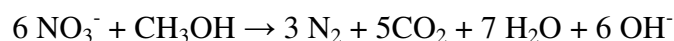
Il processo di denitrificazione mira alla rimozione della sostanza azotata, presente in fase acquosa sotto forma di NO_3 e in parte di NO_2 ad opera di batteri eterotrofi facoltativi denitrificanti (*Pseudomonas*, *Thauera*, *Azoarcus*, *Xantomonas*, *Thiobacillus*) che sono in grado di trasformare NO_3 quasi interamente in N_2 gassoso che si libera quindi nell'atmosfera.

Poiché negli impianti di depurazione per liquami domestici o simili, l'azoto è presente principalmente in forma ammoniacale, 60%, (originata dall'urea) e in forma organica, 40%, i sistemi di denitrificazione devono essere, in genere, accoppiati a sistemi di nitrificazione che siano in grado di trasformare la maggior parte dell'azoto totale presente in azoto nitrico perché possa essere in seguito sottoposto a nitrificazione.

Come già detto i microrganismi che operano la denitrificazione sono eterotrofi facoltativi, in genere abbondantemente presenti nelle normali fasi biologiche ossidative (fanghi attivi, ecc.) che posti però in condizioni cosiddette di anossia (cioè assenza di ossigeno atmosferico) possono utilizzare i nitrati invece dell' O_2 come accettori finali di elettroni per attuare il completamento della catena enzimatica - catabolica che fornisce l'energia ai batteri e produrre N_2 come catabolita gassoso di rifiuto invece di H_2O e CO_2 , mentre una fonte organica di carbonio è sempre necessaria per la sintesi cellulare.

Si parla di anossia e non di anaerobiosi poiché le vie biochimiche del trasporto di elettroni dei batteri denitrificanti sembrano essere le stesse che per l' O_2 tranne per un solo enzima, cosicché si spiega come spesso tali batteri possano utilizzare indifferentemente O_2 e NO_3 come accettore finale di elettroni a seconda dell'ambiente in cui si trovano con una preferenza per l' O_2 dovuta a una maggiore resa energetica.

Il processo di denitrificazione per il quale, al contrario di quello di nitrificazione, occorre del carbonio organico, può essere schematizzato come segue quando si usa metanolo come substrato organico:



L'utilizzo di metanolo come fonte di carbonio organico per i batteri eterotrofi si rende necessario negli impianti che prevedono un reattore di denitrificazione posto dopo quello di nitrificazione; infatti in questi casi il carbonio organico presente nel liquame è stato ossidato nella vasca aerata e quindi non è più disponibile per il metabolismo dei microrganismi.

Appare evidente dunque il vantaggio di denitrificare secondo uno schema integrato (denitrificazione in testa alla sezione biologica con ricircolo dei nitrati dalla sezione aerobica) in quanto si utilizza come fonte carboniosa la frazione presente nello scarico stesso e si recupera anche parte dell'alcalinità consumata nel processo di nitrificazione.

La stechiometria della reazione qualora venga utilizzato il carbonio organico presente nel liquame è la seguente:



Tale processo produce alcalinità (circa 3,5 g di alcalinità espressa come CaCO_3 per mg di azoto nitrico ridotto). Considerato che nel processo di nitrificazione per ogni grammo di azoto ammoniacale ossidato vengono consumati 7,14 g di alcalinità ne deriva che grazie al processo di denitrificazione riusciamo a reintegrare di circa la metà l'alcalinità consumata.

1.3.3 Tipologie di processo per la rimozione dell'azoto

Gli schemi di impianti che realizzano il trattamento specifico per la rimozione biologica dell'azoto si possono dividere in due categorie: sistemi separati e sistemi integrati.

Nei sistemi separati lo stadio aerobico precede quello anossico e i batteri nitrificanti sono tenuti completamente separati dalla biomassa denitrificante. I sistemi separati vengono classificati in sistemi a due stadi e sistemi a tre stadi.

Nei sistemi a 2 stadi l'influenza proveniente dal sedimentatore primario viene immessa nel primo reattore dove avvengono sia la rimozione aerobica del carbonio organico che la nitrificazione. La denitrificazione avviene in un secondo reattore, separato, mantenuto in condizioni anossiche, in cui viene aggiunta una fonte carboniosa (per esempio metanolo). La miscela uscente dal secondo reattore deve essere nuovamente sottoposta ad aerazione che, oltre a consentire la rimozione del BOD₅ residuo, dovuto all'eccesso di metanolo, provoca lo stripping dell'azoto gassoso limitando così il pericolo di risalita dei fanghi nel sedimentatore.

Il sistema a 3 stadi è caratterizzato dall'uso di tre reattori separati per i tre processi fondamentali (nitrificazione, ossidazione della sostanza organica, denitrificazione).

Nei sistemi integrati la stessa biomassa è utilizzata sia per la nitrificazione che per la denitrificazione. Le principali tipologie di sistemi integrati sono le seguenti:

- sistemi a ricircolo,
- sistemi con simultanea nitrificazione – denitrificazione,
- sistemi a flussi alternati

Nei sistemi a ricircolo l'influenza viene immessa nel primo reattore, mantenuto in condizioni anossiche, in cui avviene la denitrificazione utilizzando il carbonio interno come fonte di energia. Il secondo reattore è aerato e in esso avviene la nitrificazione; la corrente di fondo del sedimentatore è ricircolata nel reattore anossico; una ulteriore fonte di nitrati per il reattore anossico è fornita da una seconda corrente di riciclo proveniente dal reattore aerobico. Questi processi rappresentano un significativo miglioramento rispetto ai sistemi a schemi separati in quanto non usano una fonte di carbonio esterna; tuttavia il processo non consente una rimozione completa dei nitrati in quanto una parte del flusso totale di nitrati proveniente dal reattore aerobico non viene ricircolato nel reattore

anossico e si ritrova nell'effluente finale. Al fine di eliminare l'inconveniente della denitrificazione incompleta è possibile l'utilizzo di un terzo reattore anossico, posto dopo la vasca di aerazione, nel quale viene utilizzato il carbonio endogeno per la rimozione dei nitrati residui. Talvolta si rende necessaria l'aggiunta di metanolo, sia pure in quantità modeste, in relazione a particolari condizioni di esercizio che possono portare a denitrificazione incompleta.

Nei sistemi con simultanea nitrificazione-denitrificazione, un accurato controllo della concentrazione di ossigeno disciolto consente di ottenere, nell'ambiente di reazione, una successione di zone ben areate, dove avviene la nitrificazione, e di zone poco areate dove avviene la denitrificazione. Il sistema usato è caratterizzato da reattori di forma ellittica percorsi dalla miscela liquame-fanghi.

I sistemi a flussi alternati si basano sul principio di variare l'entità dell'aerazione al fine di creare condizioni alternativamente aerobiche ed anossiche in ogni elemento di volume del reattore. I sistemi a flussi alternati sono basati in definitiva su configurazioni impiantistiche time-oriented in cui i singoli processi connessi alla rimozione del carbonio organico biodegradabile e dell'azoto avvengono sequenzialmente nello stesso reattore.

Confronto tra sistemi separati e sistemi integrati

I sistemi sopra descritti consentono di ottenere rimozioni di azoto tali da soddisfare le esigenze imposte dalla normativa vigente.

I vantaggi dei sistemi integrati rispetto a quelli separati sono:

- minore richiesta di ossigeno: una parte delle sostanze organiche viene rimossa nel processo di denitrificazione;
- risparmio economico dovuto al non utilizzo, per la denitrificazione, di una fonte carboniosa di pregio;
- minor produzione di acidità;

1.4 Cinetiche dei microrganismi

1.4.1 Crescita microbica

In microbiologia si usa il termine crescita per indicare un aumento del numero delle cellule o della massa di una popolazione microbica. La crescita microbica è quindi la crescita di una popolazione; in un organismo unicellulari le variazioni di dimensioni di un individuo sono infatti irrilevanti.

Come tutti gli organismi viventi, i microrganismi si moltiplicano grazie ad attività anaboliche e cataboliche, che permettono loro di produrre nuove componenti cellulari, necessarie a sostituire quelle danneggiate o esaurite (turnover), e nuove cellule (crescita) e di mantenere l'omeostasi cellulare. A tal fine essi devono avere accesso a sostanze nutrienti che normalmente trovano disponibili nei diversi habitat come substrati grezzi.

La nutrizione è un processo attraverso il quale sostanze chimiche, chiamate nutrienti, vengono assorbite dalle cellula sottraendole all'ambiente e usate per il metabolismo e la crescita cellulare.

Nel loro insieme i microrganismi mostrano una sorprendente versatilità nelle capacità di approvvigionamento; essi possono utilizzare praticamente ogni composto organico o inorganico come unica fonte di carbonio o di energia o potere riducente. Queste diversificate capacità contribuiscono a definire le nicchie ecologiche dei diversi microrganismi e, nel loro insieme, a mettere in moto il ricircolo degli elementi chimici (ciclo dei nutrienti) sulla Terra.

Il carbonio che la cellula assorbe nell'ambiente per soddisfare le sue esigenze nutrizionali può essere sia in forma organica che inorganica (CO₂). Un microrganismo che può approvvigionarsi di carbonio solo se questo è disponibile in forma organica viene detto eterotrofo. I batteri che invece sono in grado di utilizzare CO₂ come unica o principale fonte di carbonio sono detti autotrofi, e non dipendono da altri organismi per la loro nutrizione.

Per quanto riguarda l'approvvigionamento di energia i batteri possono essere divisi in due grandi categorie: fototrofi e chemiotrofi. I fototrofi ricavano energia dalla luce solare attraverso il processo della fotosintesi, mentre i chemiotrofi ricavano energia ossidando composti chimici di diversa natura. Un fototrofo o un chemiotrofo possono essere sia autotrofi che eterotrofi, determinando una possibile ulteriore suddivisione dei fototrofi in fotoeterotrofi e fotoautotrofi e dei chemioautotrofi e chemioeterotrofi.

La produzione di energia all'interno di una cellula è sempre accompagnata da reazioni di ossidazione che mobilitano elettroni e ioni idrogeno. La fonte da cui i microrganismi ricavano gli equivalenti riducenti (elettroni e H⁺), per la produzione di energia, differenzia tra loro ulteriormente i microrganismi: i litotrofi usano sostanze inorganiche ridotte mentre gli organotrofi usano composti

organici. Se l'accettore finale degli elettroni è l'ossigeno, i microrganismi sono detti aerobici, altrimenti vengono chiamati anaerobici. Il termine anossico viene usato per distinguere i nitriti e i nitrati come accettori finali di elettroni.

	Reazione	Fonte di carbonio	Donatore di elettroni (substrato ossidato)	Accettore elettroni	Prodotti
Eterotrofi aerobi	Ossidazione aerobica	Composti organici	Composti organici	O	CO ₂ , H ₂ O
Autotrofi aerobi	Nitrificazione	CO ₂	NH ₃ , NO ₂ ⁻	O	NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻
	Ossidazione ferro	CO ₂	Fe(II)	O	Fe(III)
	Ossidazione zolfo	CO ₂	H ₂ S, S ₀ , S ₂ O ₃ ⁻	O	SO ₄ ²⁻
Eterotrofi facoltativi	Denitrificazione anossica	Composti organici	Composti organici	NO ₂ ⁻ , NO ₃	N ₂ , CO ₂ , H ₂ O
Eterotrofi anaerobi	Fermentazione acida	Composti organici	Composti organici	Composti organici	VAF
	Riduzione ferro	Composti organici	Composti organici	Fe(III)	Fe(II), CO ₂ , H ₂ O
	Riduzione solfati	Composti organici	Composti organici	SO ₄ ²⁻	H ₂ O
	Metanogenesi	Composti organici	Acidi grassi volatili (VFA)	CO ₂	H ₂ S, CO ₂ , H ₂ O metano

Classificazione di alcuni microrganismi attraverso donatori e accettore di elettroni, fonte di carbonio e prodotti finali.

Al fine della produzione di nuovo materiale cellulare è fondamentale la presenza di elementi inorganici (nutrienti): azoto e fosforo sono quelli di maggior importanza per i microrganismi che metabolizzano la sostanza organica. Nei reflui di origine domestica i nutrienti sono generalmente presenti in quantità sufficiente, mentre nei reflui industriali spesso questa condizione non è verificata ed è quindi necessario aggiungerli dall'esterno.

Le cinetiche di crescita microbiologica regolano l'utilizzo del substrato e la produzione della biomassa, che si accumula all'interno del reattore. La relazione di dipendenza esistente tra il tasso di crescita della biomassa e la concentrazione del substrato solubile generalmente usata è quella ricavata da Monod.

Egli, sulla base dei risultati che Michaelis e Menten avevano trovato per le reazioni enzimatiche, ipotizza che l'accrescimento batterico avvenga grazie all'azione degli enzimi. Ipotizzando inoltre che la produzione di enzima da parte della biomassa fosse proporzionale alla sua concentrazione e

che la sintesi batterica fosse inversamente proporzionale al consumo di substrato, arriva a formulare la seguente relazione:

$$u(S) = u_{\max} \cdot [S/(K_s+S)] \cdot X$$

dove:

$u(S)$ = tasso di crescita della biomassa eterotrofa in funzione del substrato solubile [d^{-1}];

u_{\max} = velocità massima di crescita della biomassa eterotrofa, [d^{-1}];

S = concentrazione del substrato solubile [$mg_{\text{substrato}}/l$]

K_s = costante di semisaturazione [$mg_{\text{substrato}}/l$]

X = concentrazione di biomassa, espressa in equivalenti di ossigeno [$mgC.O.D._{\text{biomassa}}/l$].

La costante u_{\max} rappresenta la dipendenza dall'enzima ed è infatti direttamente proporzionale al rateo di crescita, mentre K_s è detta anche costante di mezza saturazione perché quando $S=K_s$ la velocità della reazione è la metà di quella massima ed è quindi indice della dipendenza della cinetica dalla disponibilità di substrato.

Per arrivare alla relazione che esprime la velocità di rimozione del substrato da parte della biomassa, si deve introdurre il coefficiente di resa Y_H , definito come il rapporto tra la quantità di biomassa prodotta in un determinato intervallo di tempo e la relativa quantità di substrato consumato:

$$Y = \text{biomassa prodotta [gr]} / \text{substrato rimosso [gr]}$$

Y rende conto della ripartizione del substrato tra processi anabolici e processi catabolici. Il tasso di utilizzo del substrato solubile dS/dt è quindi espresso in letteratura come:

$$dS/dt = (u_{\max}/Y) \cdot X \cdot (S/(K_s+S))$$

L'andamento della biomassa nel tempo dipende da due contributi: uno positivo, legato alla crescita, e uno negativo, dovuto al metabolismo endogeno; considerando quest'ultimo proporzionale alla concentrazione dei microrganismi si ottiene:

$$dX/dt = u_{\max} \cdot X \cdot (S/(K_s+S)) - k_d \cdot X$$

dove:

k_d = coefficiente di decadimento endogeno [d^{-1}].

1.4.2 Parametri ambientali che condizionano la crescita

Le cellule dei microrganismi sono a diretto contatto con l'ambiente, esposte a condizioni che possono variare grandemente nello spazio e nel tempo sottoponendo il microrganismo a stress che rendono critica la sua crescita e sopravvivenza. Sono molteplici i fattori fisici e chimici che influenzano la velocità di crescita e la resa in biomassa dei microrganismi. La legge di Shelford afferma il concetto che esistono valori limite nei fattori ambientali sotto e sopra i quali non c'è crescita microbica e il microrganismo non sopravvive, definendo così un intervallo che rappresenta il limite di tolleranza. Per un qualsiasi parametro ambientale, la determinazione dei limiti di tolleranza viene effettuata in test di laboratorio e i risultati sono utili per capire e predire la distribuzione dei microrganismi nei vari ambienti in natura.

Di seguito sono riportati alcuni tra i principali parametri che influenzano la crescita microbica.

1) Influenza della temperatura: ogni microrganismo è caratterizzato da un valore ottimale di temperatura per la crescita, da un valore minimo e un valore massimo, quando si trova in condizioni ideali di sviluppo relativamente agli altri fattori. Al di sotto della temperatura minima le cellule, pur vitali, non sono in grado di moltiplicarsi. La velocità con la quale si moltiplicano aumenta quando aumenta la temperatura, fino a raggiungere al massimo possibile la temperatura ottimale, oltre la quale torna rapidamente a diminuire. Superata la temperatura massima, le cellule muoiono per denaturazione termica delle macromolecole fondamentali.

La temperatura ottimale per la crescita della maggior parte dei microrganismi varia da 14 a 40°C, benché alcuni generi riescano a svilupparsi sotto 0°C e altri a temperature uguali o superiori a 100°C.

I microrganismi, in base all'intervallo di valori minimi e massimi di temperatura che sono compatibili con la crescita vengono suddivisi in: *psicrofili* (da -5°C a 20°C, optimum <15°C), molto diffusi negli ambienti oceanici di Artide e Antartide; *psicrofili facoltativi* (0-35°C, optimum >20°C), tra loro molti microrganismi responsabili del deterioramento di cibi refrigerati; *mesofili*

(10-50°C, optimum 20-40°C) a cui appartengono la maggior parte dei microrganismi tra cui i patogeni umani; *termofili* (45-80°C), batteri che vivono in suoli o in acque associati ad attività vulcaniche oppure esposti direttamente al sole; *ipertermofili* (80-115°C), batteri che crescono nelle strette vicinanze di fumarole delle profondità oceaniche da cui fuoriescono acque ricche di zolfo a temperature di centinaia di gradi centigradi.

2) Influenza del pH: gli effetti del pH si manifestano direttamente sul metabolismo e sulla crescita dei microrganismi alterando la stabilità delle proteine e di altre componenti cellulari, oppure indirettamente modificando la dissociazione e la solubilità di molti nutrienti presenti nell'ambiente. Come per la temperatura esistono dei valori minimi, massimi e ottimali di pH entro i quali la crescita è possibile.

In base alla loro tolleranza nei confronti del pH, possiamo suddividere i microrganismi in *acidofili*, tra cui molti funghi, acidofili estremi come il *Bacillus acidocaldarius* si trovano in habitat particolari come le sorgenti calde con pH intorno a 1; *neutrofili*, la maggior parte dei batteri, che crescono in habitat con valori di pH compresi tra 6 e 8; *basofili*, che crescono a valori superiori a 8.

3) Influenza dell'ossigeno disciolto: l'O₂ è essenzialmente utilizzato come accettore finale di elettroni nella respirazione aerobica ma, a differenza degli organismi superiori, non tutti i microrganismi necessitano di ossigeno per crescere. Riguardo alle esigenze di O₂, i microrganismi possono essere divisi in: *aerobi obbligati*, che dipendono dall'ossigeno per la crescita; *microaerofili*, che richiedono basse concentrazioni di O₂ (2-10%); *anaerobi facoltativi*, che crescono sia in presenza che in assenza di O₂ modificando il metabolismo da respiratorio a fermentante; *anaerobi aerotolleranti*, che hanno un metabolismo energetico esclusivamente di tipo anaerobico e mostrano una crescita limitata o scarsa se esposti a livelli atmosferici di O₂ pari al 2-10% ma crescono bene in ambiente anaerobico; *anaerobi stretti e obbligati*, per i quali anche una breve esposizione a basse concentrazioni di ossigeno risulta (>0,5%) tossica.

4) Pressione idrostatica: alti valori di pressione idrostatica, superiori a 400 atm (corrispondenti ad una colonna di acqua di almeno 4000 metri di altezza) possono avere un effetto inibitorio. I microrganismi si dividono in: barotolleranti, crescono in maniera ottimale alla pressione atmosferica ma tollerano senza conseguenze alte pressioni; barofili, richiedono alte pressioni per la crescita e son inibiti alla pressione atmosferica; barofili estremi, incapaci di crescere a pressioni inferiori alle 300 atm e con un optimum di circa 700 atm.

5) Concentrazione di substrato: la velocità di crescita è influenzata dal substrato solo quando questa scende al di sotto di una certa soglia, detta concentrazione limitante. Finché la concentrazione di substrato è sufficientemente alta la velocità si mantiene costante (fase esponenziale di crescita); la crescita si interrompe prima che il substrato sia completamente esaurito, perché a concentrazioni troppo basse i sistemi di uptake non funzionano più.

L'equazione di Monod descrive l'intera curva di crescita di una coltura batterica in funzione della concentrazione di substrato:

$$dN/dt = u_{\max} * S * N / (K_s + S)$$

dove:

dN/dt = velocità specifica di crescita (variazione del numero di cellule o della massa cellulare nel tempo);

u_{\max} = massima velocità specifica di crescita (tempo^{-1})

N = numero di cellule o massa cellulare

K_s = concentrazione di substrato alla quale la velocità di crescita è pari a metà di quella massima.

Sia u_{\max} che K_s riflettono le proprietà fisiologiche intrinseche di un particolare tipo microbico e variano da substrato a substrato e in dipendenza della temperatura.

Ad alta concentrazione di substrato ($S \gg K_s$) sarà $dN/dt = u_{\max} * N$, la crescita avviene alla velocità massima consentita. Queste condizioni si riscontrano raramente in natura, nel suolo o nelle acque, dove di solito i nutrienti sono limitanti. A basse concentrazioni di substrato ($S \ll K_s$) sarà $dN/dt = u_{\max} * N * S / K_s$, la crescita è direttamente proporzionale alla concentrazione di substrato. Queste condizioni sono quelle che più comunemente si trovano in natura dove i nutrienti scarseggiano.

6) Densità di popolazione: la densità di popolazione di una particolare specie microbica influenza la crescita in modo simile a quanto avviene per gli stress ambientali e la disponibilità di nutrienti. Gli effetti della densità di popolazione si manifestano sia come interazioni positive (cooperazione) che negative (competizione). A basse densità le cellule sono maggiormente esposte ad avverse condizioni ambientali (presenza di inibitori, radiazione ultravioletta, temperatura ecc.) per cui l'aumento del numero di individui ha un effetto protettivo. Inoltre la cooperazione delle cellule

all'interno di una popolazione rende più efficace l'utilizzazione delle risorse nutrizionali minimizzando la loro dispersione nell'ambiente.

Quando la densità di popolazione aumenta oltre un certo valore, in accordo con una risposta numerica tipo quorum sensing, vengono ad attivarsi meccanismi di competizione e si manifestano effetti negativi causati dalla diminuita disponibilità di nutrienti (conseguenza di un aumentato consumo da parte di un maggior numero di individui) oppure a causa di una diminuzione della fecondità e sopravvivenza.

1.4.3 Selezione dei microrganismi

Le popolazioni che si instaurano in un fango biologico sono funzione essenzialmente del tipo di scarico e dei parametri operativi adottati nell'impianto di trattamento.

I microrganismi hanno sviluppato particolari strategie per sfruttare le risorse nutrizionali. Possiamo differenziare e classificare i microrganismi presenti in un determinato habitat in base alle caratteristiche di crescita e di affinità per substrati carboniosi.

La classificazione dei microrganismi, in base alle loro caratteristiche di crescita, parte dall'equazione che descrive la crescita di una popolazione in dipendenza della capacità dell'ambiente e quindi indirettamente della disponibilità o concentrazione di substrato:

$$(dN/dt)/N = r - rN/K$$

dove:

dN/dt = velocità specifica di incremento della popolazione;

N = densità di popolazione (numero di cellule o biomassa per unità di volume);

r = velocità di aumento pro capite, che esprime la capacità che ciascun individuo nella popolazione si riproduca nell'intervallo di tempo al netto delle morti.

La costante r è indipendente dalle dimensioni della popolazione, per cui può essere usata per confrontare popolazioni di differenti popolazioni. Una popolazione con un piccolo valore di r aumenta con una velocità pro capite minore di quella di una popolazione con un valore di r più grande. La capacità dell'ambiente (K) è una misura del valore limite di popolazione che può essere

sostenuta dall'ecosistema; quando la popolazione è molto sotto il limite massimo di densità consentita da K in quel dato ambiente, la sua crescita è di tipo esponenziale, ma quando la popolazione si avvicina a K , incomincia a incontrare una resistenza ambientale sempre maggiore.

La classificazione proposta introduce il concetto di selezione basato sui parametri r e K dell'equazione sopra riportata. A seconda delle caratteristiche di crescita possiamo disporre i microrganismi lungo un gradiente r - K .

I microrganismi che adottano una strategia più marcatamente di tipo r (r -strateghi) approfittano di situazioni di ridotto affollamento e di abbondanza di risorse realizzando rapidi aumenti della popolazione. Gli r -strateghi, investendo gran parte delle loro energie nella riproduzione, hanno tempi di generazione ridotti ed elevata capacità di diffusione nell'ambiente.

A differenza degli r -strateghi, quelli più marcatamente K -strateghi possono utilizzare con efficienza basse concentrazioni di nutrienti, grazie all'affinità per questi, e quindi competono con successo per risorse limitate; la vita media delle loro cellule è più lunga e più lunghi sono i tempi di generazione. Essi sono caratterizzati da un basso valore della costante di semisaturazione (K_s), che come abbiamo visto nel paragrafo precedente, indica la concentrazione di substrato alla quale la velocità di crescita è pari a metà di quella massima.

Le pressioni selettive sulle popolazioni microbiche indirizzano l'evoluzione verso una di queste due strategie.

r-strateghi	K-strateghi
Alto tasso di riproduzione	Basso tasso di riproduzione
Bassa efficienza nell'utilizzazione delle risorse	Alta efficienza nell'utilizzazione delle risorse
Alta tendenza migrazione	Bassa tendenza alla migrazione
Frequenti variazioni della dimensione della popolazione	Dimensione della popolazione costante

Alcune delle differenze tra i microrganismi r -strateghi e k -strateghi

I batteri ammonio ossidanti (AOB) sono stati divisi in due gruppi a seconda del loro tasso di crescita cellulare: crescita lenta e crescita veloce. I batteri a crescita lenta appartengono al gruppo dei k -strateghi, hanno alta affinità per il substrato e sono dominanti in ambienti con basse concentrazioni di substrato, mentre i batteri a crescita veloce, appartenenti agli r -strateghi, hanno bassa affinità per il substrato e si riproducono in ambienti con alta concentrazione di substrato. Poiché le concentrazioni di ammonio sono normalmente sotto i 5 mg/l negli impianti di depurazione

delle acque, che hanno l'obiettivo di rispettare i limiti imposti dalla normativa, i batteri che sono dominanti sono quelli appartenenti ai k-strateghi. I batteri r-strateghi possono predominare in processi di nitrificazione parziale con alte concentrazioni di ammonio (> 50 mg/l).

1.5 Bioarricchimento

Con il termine di bioarricchimento o bioaugmentation s'intende l'introduzione di un gruppo di microrganismi all'interno di un sito contaminato o di un bioreattore per ottenere una più rapida rimozione dei composti nocivi. Le tipologie di microrganismi che possono essere utilizzate a tal fine possono distinguersi in autoctone, ovvero già contenute nell'ambiente in cui si vogliono immettere, alloctone, provenienti invece da ambienti diversi e infine possono essere anche utilizzati microrganismi geneticamente modificati.

La tecnica del bioarricchimento potrebbe rivelarsi molto utile per quanto riguarda la nitrificazione negli impianti di depurazione che soprattutto durante i mesi invernali, quando le temperature scendono sotto i 15°C , è fortemente inibita. In fase di progettazione per garantire un abbattimento dell'ammonio conforme ai limiti di legge sono quindi necessari grandi volumi del reattore di aerazione, dove avviene anche la degradazione della sostanza organica, che comportano un aumento dei costi, sia in fase di costruzione che di gestione e soprattutto per quanto riguarda l'aerazione. Inoltre considerato che all'interno dello stesso reattore avviene anche la degradazione della sostanza organica e che i microrganismi eterotrofi responsabili di questo processo hanno delle cinetiche di crescita decisamente più elevate i rendimenti di produzione del biogas nella fase di digestione anaerobica risultano meno produttivi in quanto hanno a disposizione meno carbonio organico. Andare quindi a trattare il surnatante prodotto dalla fase di digestione anaerobica, oltre che ad eliminare il 30% del carico di ammonio in ingresso all'impianto, ci permette di far crescere una biomassa autotrofa nitrificante altamente concentrata che può essere quindi inoculata all'interno del reattore principale dell'impianto con il risultato di diminuire l'età del fango e di conseguenza i volumi necessari. Inoltre il bioarricchimento può produrre come effetto positivo una maggior produzione di gas metano in quanto i fanghi provenienti al digestore anaerobico hanno un contenuto più elevato di carbonio organico sempre grazie alla riduzione dell'età del fango.

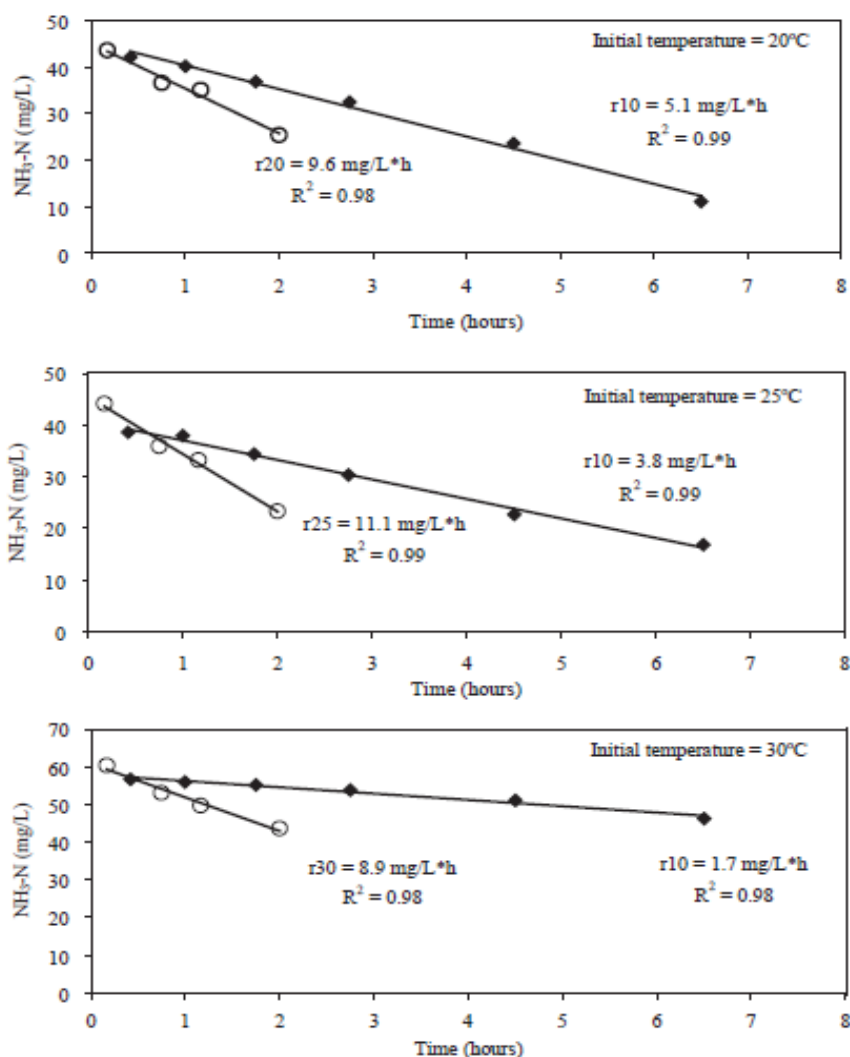
1.5.1 Effetto del gradiente di temperatura tra le biomassa prodotte nel side-stream e nel main-stream sul processo di bioarricchimento.

Utilizzare una biomassa fatta crescere in un impianto diverso da quello principale, denominato nella nostra trattazione come side-stream, con condizioni operative diverse, può dar luogo a delle problematiche che sono state esaminate in diverse ricerche scientifiche. Una condizione ambientale che può influire negativamente sul processo di bioarricchimento è il rapido abbassamento di temperatura che la biomassa nitrificante, cresciuta all'interno del reattore side-stream, alimentato con il surnatante proveniente dalla digestione anaerobica che ha una temperatura circa di 38°C, va incontro quando viene inoculata nel reattore aerobico principale di un impianto. In una ricerca (Head et al. 2004) è stato valutato se un rapido abbassamento della temperatura consente il mantenimento dell'attività nitrificante della biomassa utilizzata per il bioarricchimento, ed eventualmente di quanto venga inibito il processo. Sono stati utilizzati a tale scopo 3 reattori SBR da 2,4 L ciascuno alimentati con del surnatante (a 30°C) proveniente dal digestore anaerobico con una concentrazione media di $N_{NH_4^+}$ compresa nell'intervallo di 600-700 mg/L. Per i tre reattori SBR il tempo di ritenzione dei solidi coincide con il tempo di ritenzione idraulica che nel caso specifico è di 5 giorni. Il contenuto dei reattori è stato aerato in continuo ed il pH è controllato costantemente e mantenuto al valore di 7,2; l'unica condizione operativa che differenzia i tre reattori è la temperatura che è di 20°C, 25°C e 30°C. Il fango rimosso dal reattore nitrificante è rapidamente raffreddato fino a 10°C per aggiungervi 35 ml di surnatante in condizioni di aerazione continua. A questo punto i ratei di rimozione vengono calcolati campionando per un periodo di 6,5 hr il reattore raffreddato e di 2 hr il reattore riscaldato.

La formula utilizzata per valutare la diminuzione del rateo di rimozione è la seguente:

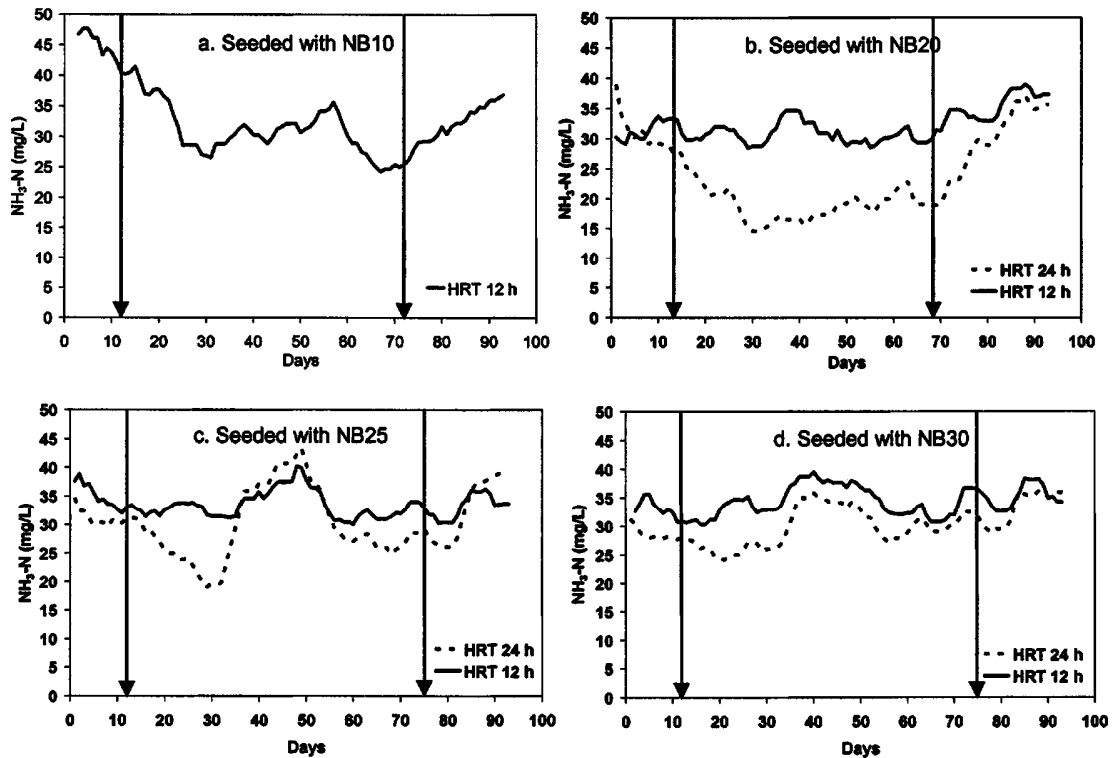
$$[(\Delta N/\Delta t_T - \Delta N/\Delta t_{10^\circ C}) / (\Delta N/\Delta t_T)] * 100 = (u_T - u_{10^\circ C}) / u_T * 100$$

I risultati presentati da Head et al. ci indicano che i ratei di rimozione dei fanghi diminuiscono all'abbassare della temperatura e che la diminuzione è più elevata all'aumentare del gradiente termico (ΔT). La rimozione media dei ratei di nitrificazione in seguito a improvvisi abbassamenti di temperatura è risultata del $58 \pm 8.2\%$ per la biomassa operante a 20°C, del $71 \pm 4.7\%$ per quella a 25°C e del $82 \pm 1.4\%$ a 30°C.



Ratei di nitrificazione per biomasse operanti a 20°C, 25°C e 30°C prima e dopo l'abbassamento di temperatura a 10°C (Head, et al., 2004).

Il proseguimento della ricerca precedente (Head et al. 2005) ha avuto come obiettivo quello di valutare l'effetto della temperatura alla quale viene prodotta la biomassa nitrificante da utilizzare per il bioarricchimento. A tale scopo sono stati utilizzati 4 reattori alimentati con surnatante con una temperatura rispettivamente di 10 (NB10), 20 (NB20), 25 (NB25) e 30°C (NB30). La biomassa è stata successivamente inoculata in 7 reattori alimentati con refluo sintetico ed operanti ad una temperatura di 10°C ed una SRT di circa 4 giorni, più bassa di quella necessaria per il processo di nitrificazione. Quattro dei sette reattori operavano con una HRT = 12 hr e sono stati bioarricchiti rispettivamente con 100 ml di NB10, NB20, NB25 e NB30. I restanti 3, con una HRT = 12 hr sono stati bioarricchiti con 100 ml di NB20, NB25 e NB30.



Andamento della concentrazione di $[\text{N}_{\text{NH}_3}]$ nell'effluente dei SBR MAIN-STREAM alimentati con biomassa nitrificante acclimatata a diverse temperature (Head, et al., 2005).

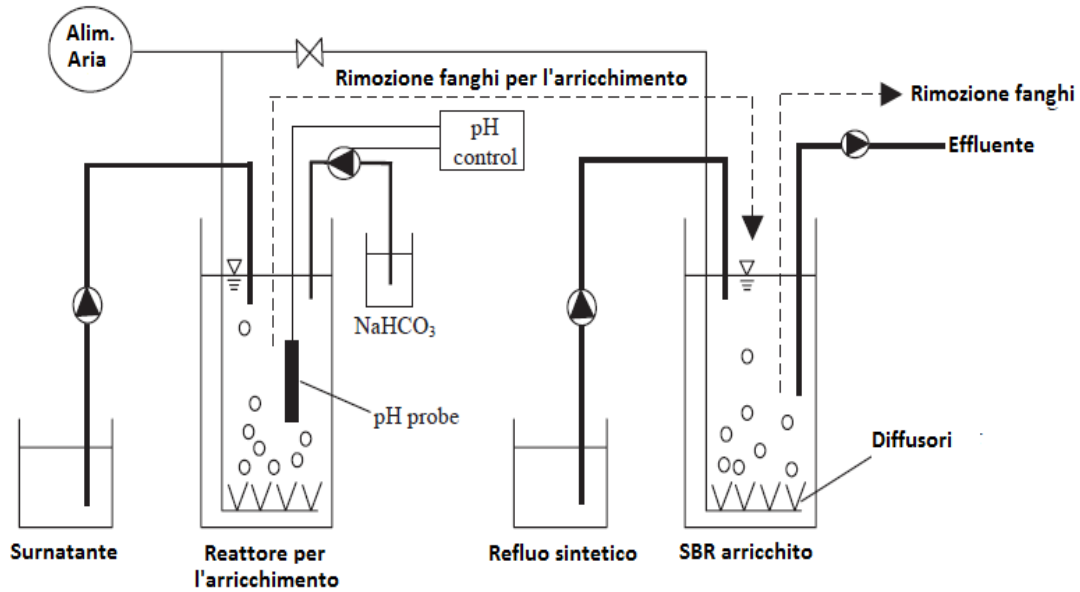
Grazie ai dati ottenuti, rappresentati nei grafici, una prima osservazione è quella che nei reattori con un $\text{HRT} = 24 \text{ hr}$ la rimozione di azoto è stata superiore rispetto ai reattori con una $\text{HRT} = 12 \text{ hr}$. Nei reattori con $\text{HRT} = 24 \text{ hr}$ la rimozione dell'azoto (N_{NH_3}) è stata maggiore con inoculo di biomassa dal reattore NB20 ed è diminuita all'aumentare del gradiente termico. Nei reattori invece con $\text{HRT} = 12 \text{ hr}$ l'unico a mostrare una maggiore rimozione grazie al bioarricchimento è stato quello alimentato con NB10.

1.5.2 Effetto dell'età del fango sul processo di bioarricchimento

Sempre nella stessa ricerca trattata per valutare l'effetto della temperatura (Head et al. 2004) si è voluto verificare l'effetto del bioarricchimento in reattori SBR alimentati da un refluo sintetico con SRT insufficienti a garantire il processo di nitrificazione. Il refluo sintetico utilizzato per alimentare i reattori SBR è descritto dalla sottostante tabella:

Componenti	Concentrazione (mg/L)
Estratto di carne di manzo	150
Lievito	150
MgSO₄·7H₂O	50
MnSO₄·7H₂O	5.0
FeSO₄·7H₂O	2.2
KCl	7.0
NH₄Cl	150
K₂HPO₄	196
NaHCO₃	556
CaCl₂	3.8
N_NH₃	25
COD	250

I reattori SBR utilizzati per la sperimentazione, del volume di 2 L ciascuno, sono quattro e ognuno di essi è stato fatto lavorare alla temperatura di 10°C e HRT rispettivamente di 43.6, 53.3, 68.6 e 96 hr. Dopo 8 giorni dall'inizio della prova viene avviato il bioarricchimento dei 4 reattori con biomassa nitrificante (100 ml/giorno) cresciuta all'interno di un altro reattore alimentato con surnatante alla temperatura di 20°C. la configurazione dello schema del bioarricchimento è rappresentata nella figura sottostante:



Le caratteristiche allo stato stazionario dei 4 reattori SBR arricchiti con la biomassa nitrificante proveniente dal reattore alimentato con surnatante vengono riassunte nella sottostante tabella:

Condizioni operative	HRT (hr)			
	43.6	53.3	68.6	96
Θ (d)	1.817	2.221	2.858	4
Q^w (l/d)	0.5	0.5	0.5	0.5
Q^e (l/d)	0.6	0.4	0.2	0
Q^i (l/d)	1.0	0.8	0.6	0.4
Q^s (l/d)	0.1	0.1	0.1	0.1
X_r (mg VVS/l)	149	140	116	96.2
S_o (mg N_NH3/l)	41.9	39.6	35.5	33.8
S (mg N_NH3/l)	1.32	1.2	1.06	1.06
X_e (mg VVS/l)	20	20	20	0
Y (mg VSS/mg N_NH3)	0.24	0.24	0.24	0.24
K_d a 10°C (d-1)	0.043	0.043	0.043	0.043
X°_a (mg VSS/l)	8.65	10.6	13.6	19.0
Parametri calcolati				
Θ_x (d)	7.5	9.4	13.5	23.5
X°_a (mg VSS/l)	30.4	27.7	24.7	23
P	0.204	0.198	0.213	0.239
$u = 1/\Theta_x$ (d)	0.13	0.11	0.074	0.043

Dopo l'ottavo giorno dall'inizio della sperimentazione viene avviato il bioarricchimento all'interno dei quattro SBR con diversa HRT; come conseguenza l'età del fango all'interno dei reattori aumenta e la concentrazione di azoto scende dopo 26-32 giorni sotto i 5 mg/L.

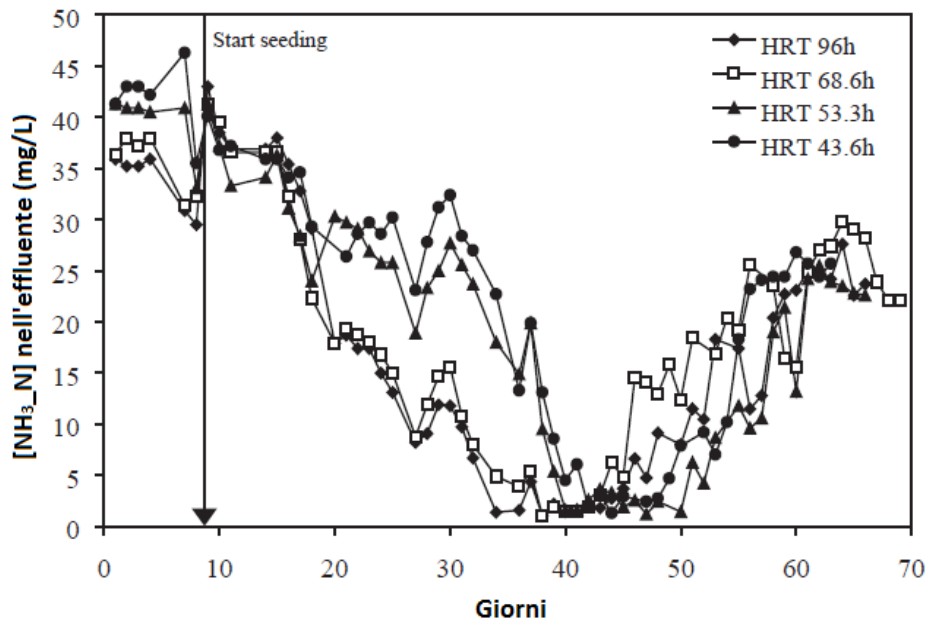
L'età del fango all'interno dei reattori viene calcolata con la seguente formula:

$$\Theta_x (d) = (X_a * V_r) / (Q^w X_a + Q^e X_{e,a} - Q^i X_{a}^o)$$

Dove:

- X_a = concentrazione dei batteri nitrificanti nel reattore [mg SSV/L];
- X_{a}^o = biomassa nitrificante proveniente dal reattore side-stream [mg SSV/L];
- $X_{e,a}$ = concentrazione dei batteri nitrificanti nell'effluente [mg SSV/L];
- V_r = volume del reattore [L];
- Q^w = portata dello spurgo [L/d];
- Q^e = portata dell'effluente [L/d];
- Q^i = portata in arrivo dal reattore alimentato con il surnatante [L/d].

Al cessare dell'alimentazione con la biomassa autotrofa proveniente dal reattore alimentato con il surnatante osserviamo rapidamente un aumento della concentrazione nell'effluente che indica che la biomassa presente viene dilavata e il processo di nitrificazione non è più possibile. Il grafico prodotto nella sperimentazione ci permette di vedere l'effetto del bioarricchimento in maniera chiara:



$[N_{NH_3}]$ nell'effluente dei SBR arricchiti per diversi valori di HRT. La bio-augmentation è stata avviata per tutti i reattori il giorno 9 ed è stata interrotta nei giorni 47, 50, 47 e 45 rispettivamente per i reattori a HRT(h) 43.6, 53.3, 68.6 e 96 (Head, et al., 2004).

Capitolo 2 – Materiali e metodi

2.1 Impianti pilota

Per la nostra sperimentazione, sono stati realizzati tre impianti pilota di cui due appartenenti alla linea main-stream e uno alla linea side-stream.

I due impianti pilota della linea main-stream sono alimentati dal refluo urbano in arrivo all'impianto Cuoio-depur s.p.a. : essi sono composti da un reattore di pre-denitrificazione e un reattore di ossidazione/nitrificazione e si differenziano nello stadio finale per la modalità di separazione solido-liquido posta dopo la vasca di nitrificazione; in uno di essi (impianto CAS, *Conventional Activated Sludge*) è presente una vasca di sedimentazione, mentre nell'altro (impianto MBR, *Membrane BioReactor*) la separazione è ottenuta mediante ultrafiltrazione con membrane.

L'impianto pilota appartenente alla linea side-stream (impianto BAG (*BioAuGmentation*)) viene alimentato da refluo urbano dell'impianto Cuoio-depur s.p.a. appositamente arricchito con cloruro di ammonio per avere una concentrazione di 650 mg/L; questo per avere nell'impianto un refluo da trattare con caratteristiche simili al surnatante prodotto nella fase di digestione anaerobica dei fanghi allo scopo di rendere applicabile la biotecnologia in impianti reali in caso di successo della sperimentazione. Infatti negli impianti in cui è presente la digestione anaerobica dei fanghi il surnatante prodotto viene ricircolato a monte dell'impianto con un aumento del carico di azoto ammoniacale in ingresso di circa il 30%.

2.2 Linea main-stream

Gli impianti pilota della linea main-stream sono alimentati dal refluo urbano proveniente dall'impianto Cuio-depur s.p.a. e su di essi è stata valutato l'effetto del bioarricchimento con biomassa nitrificante misurando il rendimento di rimozione dell'azoto ammoniacale sia in assenza che in presenza di inoculo dei fanghi provenienti dall'impianto BAG.

Gli impianti sono stati progettati (Volumi dei reattori di pre-denitrificazione e nitrificazione) e gestiti allo scopo di lavorare in parallelo prevedendo per entrambi le solite condizioni operative (Q_{in} , SRT, SST, Ossigeno disciolto) e quindi valutare anche se l'effetto del bioarricchimento possa essere condizionato dalla modalità di separazione solido-liquido presente nell'impianto.

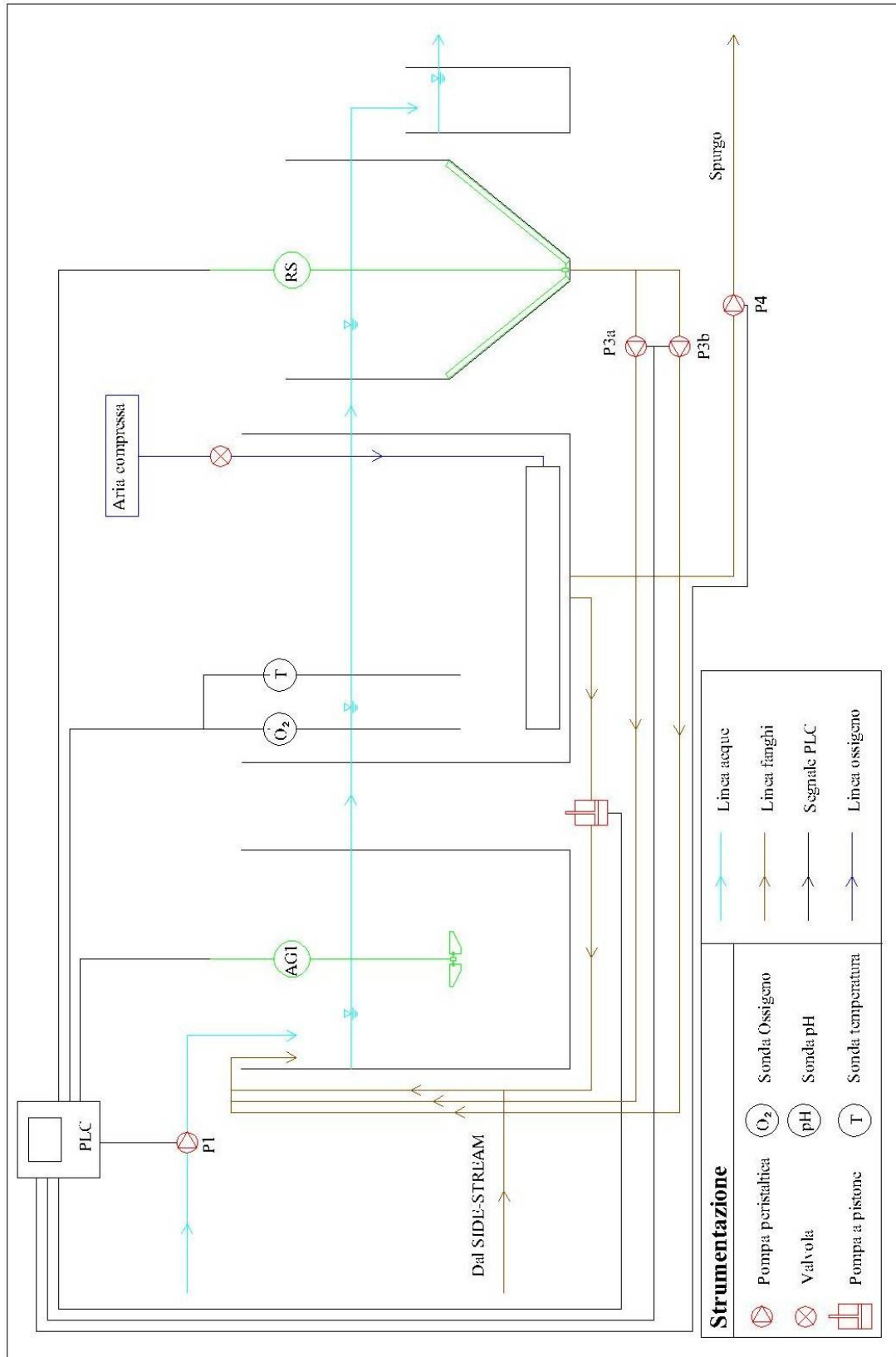
Impianto CAS (*Conventional Activated Sludge*)



L'impianto CAS della linea main-stream viene alimentato da refluo urbano in arrivo all'impianto Cuio-depur s.p.a. e la sua gestione è affidata a un PLC (*Programmable Logic Controller*). I componenti che costituiscono l'impianto sono:

- vasca di pre-denitrificazione: ha un volume di 134 L ed è dotata di un agitatore per evitare fenomeni di sedimentazione;
- vasca di ossidazione/nitrificazione: ha un volume di 311 L. In questo reattore l'aerazione è mantenuta in continuo ad opera di aeratori a candela posti sul fondo della vasca alimentati con aria compressa;
- vasca di sedimentazione: ha un volume di 135 L e una superficie di 0,39 m². E' dotata di un raschiatore di fondo (RF) per evitare fenomeni di rising, ovvero di risalita dei fanghi causata da massiccia denitrificazione che avviene in fondo al sedimentatore secondario. In questi casi i nitriti e nitrati contenuti nei fanghi sono convertiti in azoto gassoso il quale risale in superficie sotto forma di bollicine; se queste sono numerose, aderendo alla superficie dei fanghi, lo fanno risalire in superficie.

Nell'impianto sono presenti varie pompe che sono utilizzate allo scopo di garantire un corretto funzionamento del processo di trattamento dei reflui. L'alimentazione è effettuata da una pompa peristaltica (P1) operante in continuo. Una pompa a pistone (P2) è utilizzata per ricircolare i fanghi dalla vasca di nitrificazione/ossidazione a quella di denitrificazione. Altre due pompe di tipo peristaltico (P3_a e P3_b) sono necessarie per effettuare il ricircolo dalla vasca di sedimentazione a quella di denitrificazione. Infine per effettuare lo spurgo è utilizzata un'altra pompa (P4) di tipo peristaltico.



tecnico dell'impianto CA

Disegno

Impianto MBR (*Membrane BioReactor*)



L'impianto MBR, anch'esso appartenente alla linea main-stream, è alimentato dal refluo urbano in arrivo a Cuoio-depur. La sua gestione è affidata a un altro PLC (*Programmable Logic Controller*). Si differenzia dall'impianto CAS solo per la modalità di separazione solido-liquidi che in questo caso è ottenuta mediante ultrafiltrazione con due membrane. I comparti che costituiscono l'impianto sono:

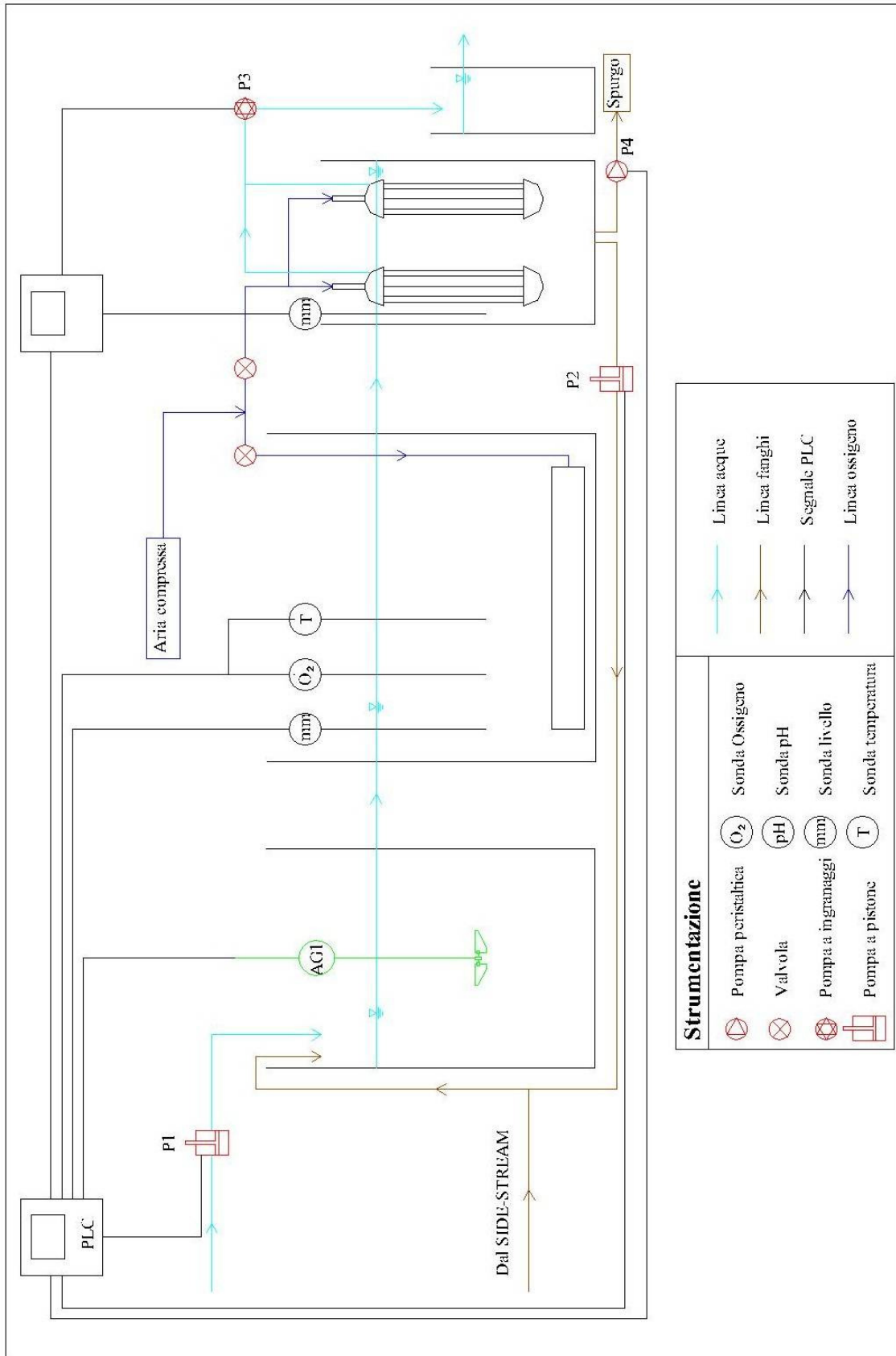
- vasca di pre-denitrificazione: ha un volume di 134 L ed è presente un agitatore per evitare fenomeni di sedimentazione;
- vasca di ossidazione/nitrificazione: ha un volume di 279 L. Il volume è più piccolo rispetto all'impianto CAS poiché anche la vasca delle membrane essendo aerata può essere considerata responsabile dei fenomeni di ossidazione nitrificazione. L'aerazione è mantenuta in continuo ad opera di aeratori a candela posti sul fondo della vasca alimentati con aria compressa;
- vasca delle membrane: ha un volume di 32 L che sommati ai 279 L della vasca di aerazione/nitrificazione permettono di raggiungere i 311 L dell'impianto CAS. Le membrane presenti sono del tipo a fibra cava ed operano nel campo dell'ultrafiltrazione avendo una porosità di $0.04 \mu\text{m}$. Il sistema di aerazione delle membrane, che ci porta a considerare la vasca che le contiene

come un reattore nel quale avvengono i processi di ossidazione/nitrificazione, garantisce lo scuotimento delle fibre e permette quindi di rimuovere una parte della sostanza depositata su di esse.

L'alimentazione dell'impianto è effettuata mediante una pompa a pistone (P1) che viene attivata dal PLC ogni volta che il livello della vasca di nitrificazione scende sotto una soglia limite fissata in fase di progettazione. La sonda che permette di rilevare i livelli è collegata al PLC ed è posta all'interno della vasca di nitrificazione/ossidazione; essa viene disattivata al raggiungimento di un valore massimo anch'esso prefissato in fase di progettazione. La pompa necessaria per la filtrazione (P3) è del tipo a ingranaggi a trascinamento magnetico bidirezionale ed è gestita attraverso il PLC che permette di gestire il processo attraverso l'impostazione di 3 fasi operative della durata totale di 10 minuti:

- filtrazione: processo durante il quale viene effettuata l'estrazione del permeato;
- controlavaggio: inversione della direzione di filtrazione che preleva il permeato che è stato raccolto in un'apposita vasca. Questo processo permette di rimuovere una parte del materiale depositatosi sulle membrane e permette quindi di ritardare il momento della pulizia per perdita di efficienza;
- relaxation: in questa fase la pompa viene disattivata mentre l'aerazione è ancora attiva e permette di rimuovere in maniera più efficace, mediante scuotimento delle fibre cave, parte della sostanza depositata.

Il ricircolo dei fanghi dalla vasca delle membrane è reso possibile grazie a una pompa a pistone (P2) mentre lo spurgo per garantire la quantità di solidi prevista in fase di progettazione è effettuato mediante una pompa di tipo peristaltico (P4).



Strumentazione	
	Pompa peristaltica
	Valvola
	Pompa a ingranaggi
	Pompa a pistone
	Sonda Ossigeno
	Sonda pH
	Sonda livello
	Sonda temperatura
	Linea acque
	Linea fanghi
	Segnale PLC
	Linea ossigeno

Disegno tecnico dell'impianto MBR

2.3 Linea side-stream

Nella linea side-stream è presente l'impianto BAG che viene utilizzato per creare la biomassa autotrofa nitrificante che verrà inoculata all'interno dei reattori di pre-denitrificazione degli impianti CAS e MBR per verificare l'effetto del bioarricchimento sulla rimozione dell'azoto ammoniacale.

Come già detto nella linea main-stream sono presenti due impianti gemelli che si differenziano solo per la modalità di separazione solido-liquidi per verificare se il bioarricchimento possa variare in base alla soluzione impiantistica scelta.



Impianto BAG

L'alimentazione deve avere caratteristiche simili al surnatante prodotto dalla digestione anaerobica dei fanghi, ovvero alti rapporti tra azoto ammoniacale e carbonio organico per consentire una maggior crescita di biomassa autotrofa rispetto a quella eterotrofa. L'alimentazione viene preparata all'interno di un contenitore del volume di 1000 L aggiungendo al refluo urbano sia cloruro di ammonio, per portare la concentrazione di azoto ammoniacale al valore di 650 mg/L, che bicarbonato di sodio, in modo da non avere eccessiva richiesta di alcalinità all'interno del reattore biologico. All'interno del contenitore è presente un agitatore (AG1) che viene attivato mediante un timer e consente tramite l'agitazione di mantenere omogenea la soluzione. Dal fondo del contenitore parte un tubo collegato alla pompa di alimentazione (P1) che veicola il refluo nella vasca di pre-denitrificazione.



Contenitore utilizzato per l'alimentazione dell'impianto BAG

I comparti che costituiscono l'impianto pilota BAG, il quale come gli impianti della linea main-stream è gestito da un PLC, sono:

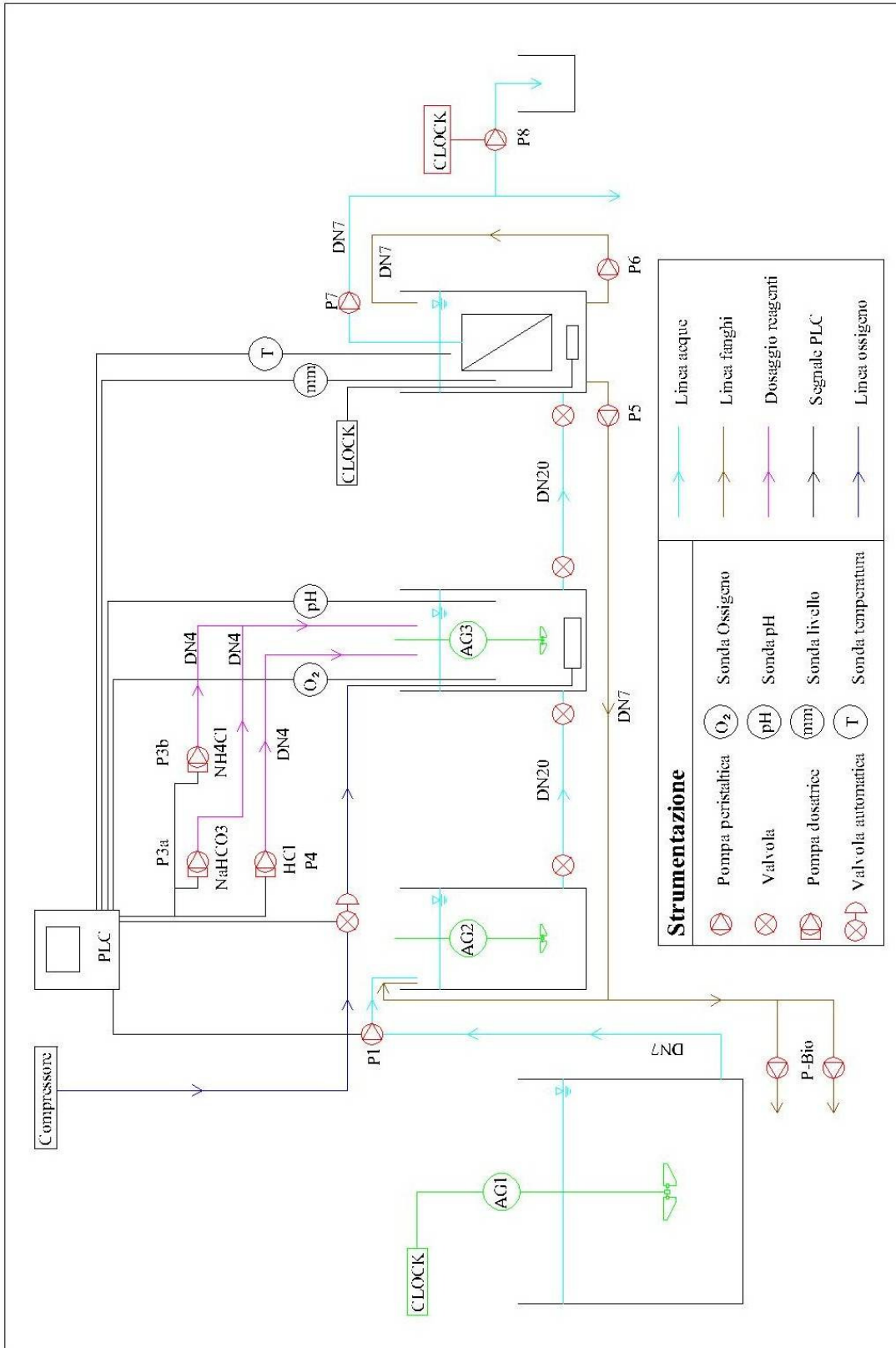
- vasca di pre-denitrificazione: ha un volume di 40 L e forma cilindrica. E' presente un agitatore (AG2) per evitare fenomeni di sedimentazione;

- vasca di nitrificazione/ossidazione: ha anch'essa un volume di 40 L e forma cilindrica. Al suo interno è presente un aeratore a bolle fini che funziona in continuo per garantire una concentrazione di ossigeno disciolto superiore ai 4 mg/L. Per garantire una miscelazione completa è presente un agitatore (AG3). Sono presenti anche due sonde; una per misurare il pH e l'altra per la misura dell'ossigeno disciolto. La prima è collegata a due pompe dosatrici che si attivano quando il valore del pH sale o scende rispetto ad un valore prefissato che nel nostro caso è 7,9. Per la correzione del pH a seconda della necessità viene utilizzata una soluzione di bicarbonato di sodio o una soluzione di acido cloridrico.

- vasca delle membrane: ha un volume di 10 L e una forma di parallelepipedo a base rettangolare. Al suo interno sono presenti tre membrane piane per effettuare la filtrazione. Inoltre è presente una sonda di livello che attiva la pompa di alimentazione quando il livello scende fino a raggiungere un valore limite prefissato; la pompa viene in seguito disattivata appena raggiunto il valore massimo del livello.

Le pompe presenti per il corretto funzionamento dell'impianto sono:

- pompa peristaltica alimentazione (P1): permette di alimentare l'impianto andando a prelevare la soluzione preparata dentro il contenitore di 1000 L ed è attivata e disattivata dal PLC che la gestisce attraverso la sonda di livello posizionata dentro la vasca delle membrane;
- pompe dosatrici (P3 e P4): sono attivate e disattivate tramite la sonda di pH presente nella vasca di nitrificazione che è collegata al PLC. Quando il pH sale o scende rispetto al valore di set-point (7,9) le soluzioni di acido cloridrico o bicarbonato di sodio sono inoculate all'interno del reattore per ripristinare il giusto valore di pH.
- pompa peristaltica filtrazione (P7): la rimozione del permeato, attraverso le tre membrane piane, viene realizzata per mezzo della pompa di filtrazione che lo invia in una vasca di raccolta che viene in seguito scaricata;
- pompa ricircolo (P5): dalla vasca delle membrane permette il ricircolo dei fanghi alla vasca di pre-denitrificazione;
- pompa ricircolo interno (P6): per evitare fenomeni di stratificazione all'interno della vasca delle membrane;
- pompa per la raccolta di un campione medio (P8): è collegata all'uscita del permeato e permette, attivandosi a intervalli di tempo regolare, di raccogliere un campione medio rappresentativo per le analisi;
- pompe peristaltiche utilizzate per il bioarricchimento (P-bio): sono due pompe che dal ricircolo delle membrane permettono di inoculare i fanghi prodotti nell'impianto BAG all'interno delle vasche di pre-denitrificazione degli impianti MBR e CAS.



tecnico impianto BAG

Disegno

2.4 Metodologie di analisi

2.4.1. Analisi chimiche

Le analisi chimiche necessarie per valutare l'azione dei fanghi con e senza bioarricchimento sono state effettuate tre volte alla settimana per tutti gli impianti. Il prelievo dei campioni è stato effettuato, mediante l'utilizzo di contenitori in plastica dal volume di 250 ml, in punti specifici degli impianti. Nelle alimentazioni si è provveduto a determinare il contenuto di azoto ammoniacale, in quanto le altre forme di azoto risultano trascurabili, e il COD per risalire al valore del rapporto azoto ammoniacale/carbonio organico. Nelle uscite, invece, oltre che a misurare il contenuto di azoto ammoniacale, che permette di valutare l'efficienza degli AOB, le analisi hanno anche riguardato il contenuto di nitriti e nitrati per verificare eventuali accumuli e malfunzionamento degli impianti e dei processi biologici. Il COD è stato misurato anche nell'effluente per controllare l'attività dei batteri eterotrofi.

ANALISI CAS, BAG, MBR

	Alim.refluo urbano	Aliment. BAG	Reattore denitrific. CAS	Uscita CAS	Uscita MBR	Uscita BAG
C.O.D.	√	√	×	√	√	√
NH ₄ ⁺	√	√	×	√	√	√
NO ₂ ⁻	×	×	×	√	√	√
NO ₃ ⁻	×	×	√	√	√	√

Nota: con i simboli verdi viene indicata la presenza delle analisi. Viceversa la croce rossa indica l'assenza di analisi.



Tutte le analisi chimiche sono state effettuate utilizzando Test in cuvetta e fotometri prodotti da HACH LANGE. Lo spettrofotometro utilizzato nel laboratorio è il modello XION 500 a doppio raggio operante nell'intervallo di lunghezze d'onda 340-900 nm.



Le analisi chimiche ci permettono di calcolare importanti parametri di processo che ci danno informazioni sul funzionamento degli impianti:

- ALR (Ammonia Loading Rate): indica il carico di ammonio applicato giornalmente alla vasca di nitrificazione degli impianti:

$$ALR \text{ (mg/L*d)} = (N_{\text{NH}_4^+ \text{ in}} \text{ [mg/L]} * Q \text{ [L/d]}) / V_{\text{aerobico}} \text{ [L]}$$

- Rimozione giornaliera dell'azoto ammoniacale: indica la quantità di ammonio rimosso giornalmente dalla biomassa autotrofa (AOB) presente nel reattore di nitrificazione:

$$N_{\text{NH}_4^+} [\text{g/d}] = (N_{\text{NH}_4^+ \text{in}} [\text{g/L}] - N_{\text{NH}_4^+ \text{out}} [\text{g/L}]) * Q [\text{L/d}]$$

- Percentuale rimossa di azoto ammoniacale: permette di valutare l'efficienza di rimozione degli impianti:

$$((N_{\text{NH}_4^+ \text{in}} [\text{mg/L}] - N_{\text{NH}_4^+ \text{out}} [\text{mg/L}]) / N_{\text{NH}_4^+ \text{in}} [\text{mg/L}]) * 100$$

2.4.2 Solidi sospesi totali

La determinazione dei solidi sospesi totali (SST) è stata effettuata negli stessi giorni in cui sono state eseguite le analisi chimiche. I campioni sono stati prelevati dalle vasche di nitrificazione dei tre impianti e si è provveduto anche a misurare i solidi in uscita presenti nel CAS in quanto la vasca di sedimentazione non permette di avere un effluente totalmente privo di questi ultimi.

La procedura eseguita per la misurazione dei SST è stata la seguente:

- pesare crogioli filtranti con filtro in acetato di cellulosa 0.45 µm;
- filtrare sotto vuoto un volume noto di campione;
- seccare il filtro in stufa per 2 h a 104°C;
- raffreddare in essiccatore;
- pesare; la differenza tra le due pesate permette di calcolare la quantità dei solidi di presenti nel volume di campione filtrato (mg/L).



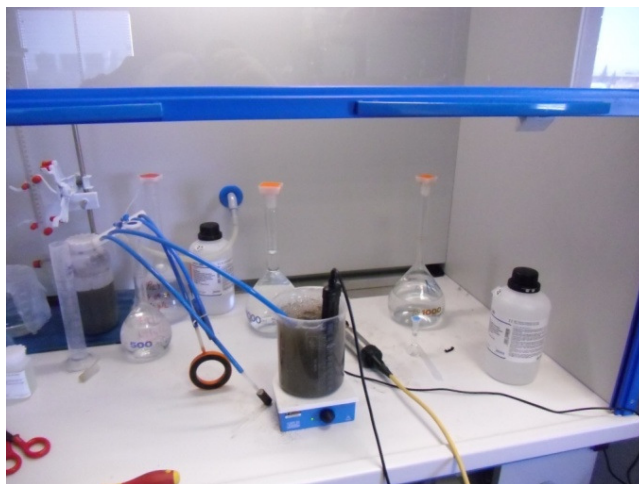
Crogiolini prima della seconda pesatura

La determinazione dei solidi sospesi totali (SST) è stata di fondamentale importanza per determinare l'età del fango (SRT, Sludge Retention Time) degli impianti che è stata fissata a 2,5 giorni per la linea main-stream e di 20 giorni per l'impianto BAG della linea side-stream.

2.5 Prove batch

Per verificare se nella linea side-stream sono stati selezionati microrganismi autotrofi nitrificanti con diverse cinetiche di crescita, sono state ricavate tramite prove batch la costante di semisaturazione e il rateo massimo di rimozione dell'azoto ammoniacale sia dei batteri nitrificanti della linea main-stream nell'impianto MBR sia nell'impianto BAG.

Per costante di semisaturazione (o di mezza velocità) si intende il valore della concentrazione in corrispondenza del quale la velocità di reazione è pari a metà del suo valore massimo.



Reattore batch utilizzato per la determinazione delle costanti cinetiche

Il reattore che abbiamo utilizzato per le prove batch, dal volume di 1 litro, è stato alimentato con i batteri degli impianti BAG e MBR, e prima dell'inizio della prova abbiamo portato la concentrazione dello ione ammonio ad un valore stabilito tramite l'aggiunta di cloruro di ammonio. Svoltata questa operazione è stata avviata l'ossigenazione e a periodi di tempo regolari è stata

prelevata un aliquota di campione per determinare la quantità di ammonio presente fino ad arrivare a concentrazioni prossime allo zero.

All'interno del reattore, mantenuto in agitazione mediante un'ancoretta magnetica, sono state mantenute per tutta la durata delle singole prove condizioni non limitanti la crescita batterica. In particolare il monitoraggio dell'ossigeno disciolto, del pH e della temperatura sono stati effettuati mediante una sonda portatile. Il valore dell'ossigeno è stato sempre tenuto superiore a 4 mg/L mentre il pH è stato mantenuto nell'intervallo di 7,7 – 8,0 tramite l'aggiunta di una soluzione di idrossido di sodio 0,1M o di acido cloridrico 0,1M secondo necessità.

Una prima elaborazione dei dati raccolti ha permesso di mettere in relazione la concentrazione dello ione ammonio con il tempo. Da questa correlazione è stato possibile calcolare la velocità di abbattimento dello ione ammonio e metterla in relazione con la concentrazione dello ione ammonio stesso.

Per ricavare la costante di semisaturazione (K_N) abbiamo fatto ricorso alle conoscenze della modellizzazione dei processi biologici e quindi dei valori teorici che avremmo dovuto aspettarci dalla seguente formula:

$$dN/dt = (u_{max} / Y) * [N / (K_N + N)] * X_{AOB}$$

K_N = costante di semisaturazione

Y = fattore di resa

u_{max} = tasso massimo di crescita

X_{AOB} = biomassa autotrofa ammonio ossidante

Il valore di concentrazione di biomassa autotrofa nitrificante viene ricavato dall'espressione seguente:

$$X_{AOB} = (SRT/HRT) * (Y(N_{NH_4^+_{in}} - NH_4^+_{out})) * (1 / (1 + (K_d * SRT)))$$

K_d = costante di decadimento della biomassa

SRT = tempo di ritenzione del fango (età del fango)

HRT = tempo di ritenzione idraulica

I valori delle costanti cinetiche utilizzate per il trattamento dei dati sono state ricavate in precedenti sperimentazioni mediante prove respirometriche prelevando gli stessi fanghi utilizzati per le prove batch.

	Biomassa da impianto MBR	Biomassa da impianto BIO
u_{\max}	0,85	0,95
Y	0,17	0,17
K_d	0,15	0,15

Costanti trovate mediante prove respirometriche alla temperatura di 20°C. I valori sono stati calcolati operando su i dati sperimentali una regressione lineare con metodo dei minimi quadrati.

Capitolo 3 – Risultati e conclusioni

3.1 Gestione degli impianti

3.1.1 Gestione impianti linea main-stream

La gestione degli impianti della linea main-stream ha riguardato in particolare tutte le operazioni necessarie per fare in modo che gli impianti CAS e MBR lavorassero alle stesse condizioni operative. Avvicinarsi il più possibile a questo obiettivo è di fondamentale importanza per valutare dai risultati se il metodo di separazione liquido-solido possa avere delle influenze sul processo del bioarricchimento.

Le condizioni operative degli impianti vengono riassunte nella tabella sottostante:

	Impianto CAS	Impianto MBR
Ossigeno disciolto [mg/l]	> 4	> 4
Qin [L/d]	670	670
Qout [L/d]	525	525
Qricirc. Fanghi [L/d]	1800	1800
Qricirc. nitro/denitro	1300	-
Qspurgo [L/d]	145	145
HRTaerobico [d]	0,46	0,46
HRTanossico [d]	0,20	0,20
SRT [d]	2,5	2,5

Per mantenere la stessa alimentazione per i due impianti, considerato che nel CAS l'alimentazione è continua, è stato necessario effettuare frequentemente la pulizia delle membrane dell'impianto MBR, mediante bagni o controlavaggi con ipoclorito di sodio, per la rimozione della sostanza organica, e lavaggi in soluzione acida a pH 3 per rimuovere le incrostazioni calcaree. Come detto precedentemente le membrane sono state fatte lavorare impostando tramite PLC dei cicli della durata di 10 minuti durante i quali venivano effettuati i processi di filtrazione, controlavaggio con permeato accumulato appositamente in una vasca di raccolta e relaxation. Ogni volta che le membrane mostravano una diminuzione di portata è stato aumentato il tempo di filtrazione e di conseguenza abbassati i tempi delle altre due fasi per garantire una portata uguale all'impianto

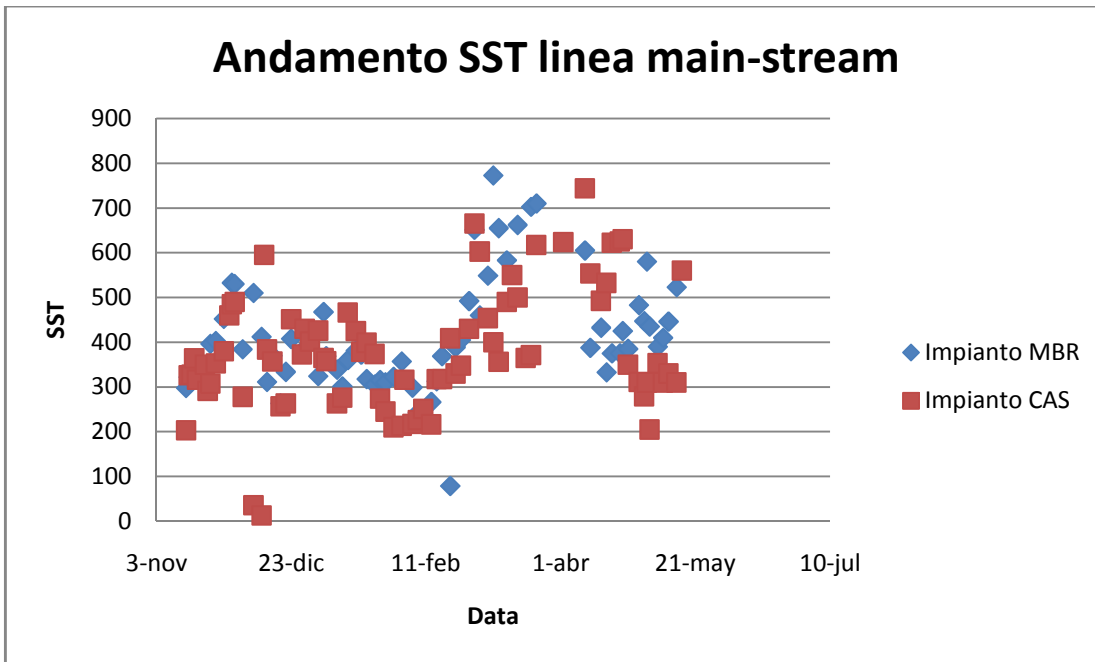
CAS. Il lavaggio è stato effettuato solo quando lo sporco delle membrane era tale che anche a tempi elevati di filtrazione non veniva garantita una portata sufficiente.



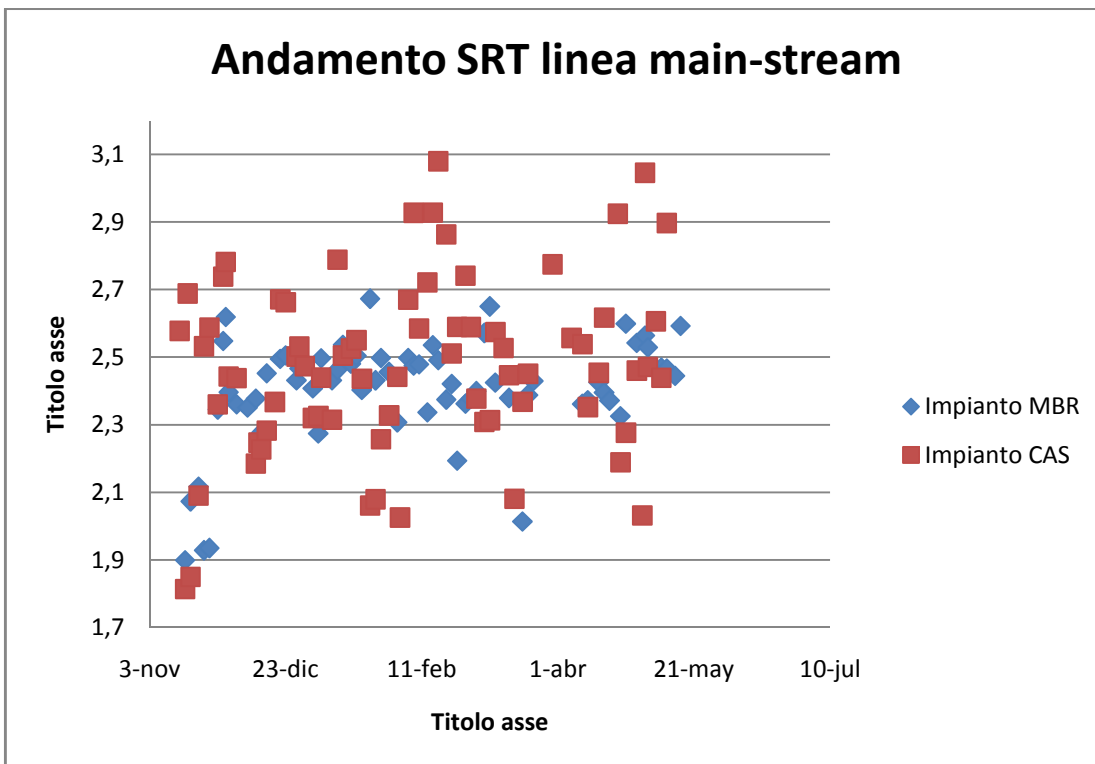
Membrane prime dell'operazioni di pulizia

Un altro problema che si è presentato è stato quello della perdita di fanghi con l'effluente dal sedimentatore che facendo variare l'età del fango rischiava di far avere nei due impianti un diverso contenuto di solidi sospesi totali (SST). La perdita dei fanghi dalla vasca di sedimentazione è dovuta al fenomeno di rising, fenomeno fisico che provoca la risalita dei fanghi a causa di una massiccia denitrificazione che porta alla formazione di bollicine di azoto gassoso (N_2) che se presenti in quantità elevate aderendo alla superficie dei fanghi ne provocano la risalita in superficie. Per la risoluzione di questa problematica, oltre alla misurazione dei solidi sospesi nei due impianti, è stato necessario determinare i solidi sospesi totali in uscita con l'effluente per calcolare la reale età del fango e se inferiore a quella prevista intervenire sulla portata di spurgo dell'impianto CAS.

I solidi sospesi totali hanno mostrato una maggiore variabilità durante il periodo di monitoraggio nell'impianto CAS rispetto all'impianto MBR a causa del minor controllo che abbiamo sulla fuoriuscita dei solidi dall'impianto che avviene appunto nella vasca di sedimentazione.



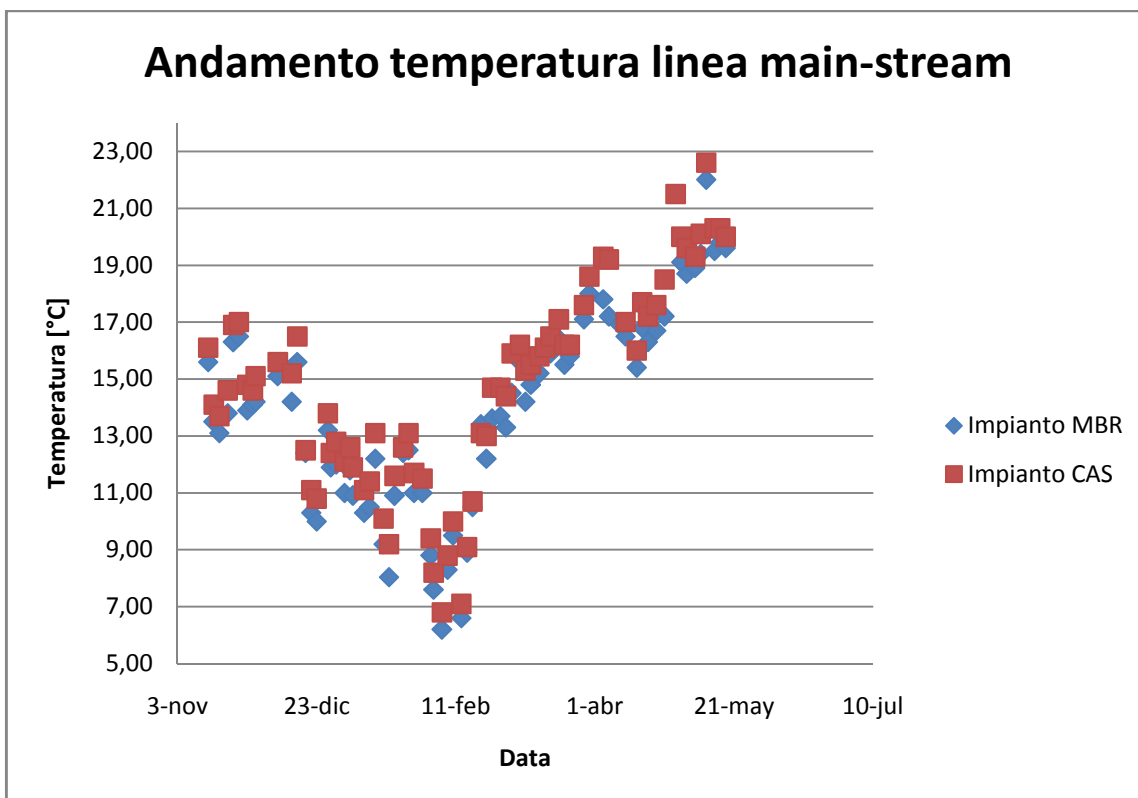
Come conseguenza, come si può vedere dal grafico sottostante anche l'età del fango è maggiormente variabile nell'impianto CAS rispetto all'MBR

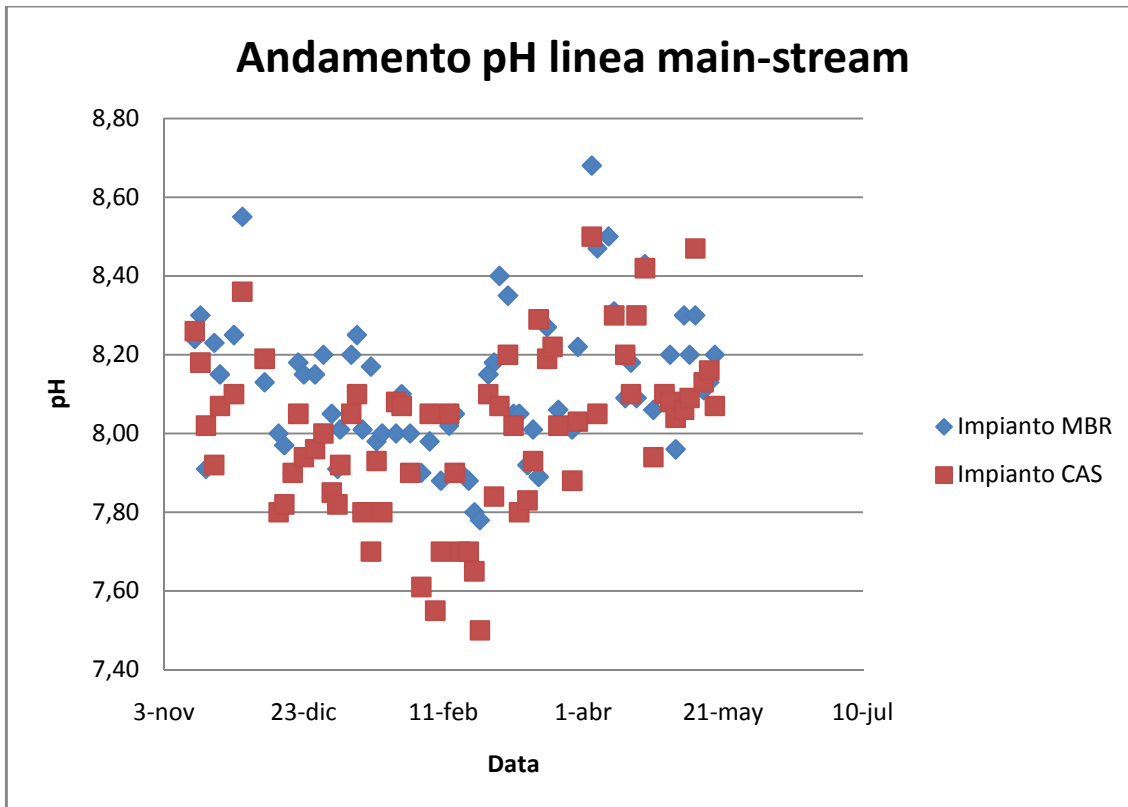




Vasca di sedimentazione dell'impianto CAS

Durante il periodo della sperimentazione si è provveduto a misurare pH e temperatura nei due impianti per verificare la presenza di differenze che in fase di valutazione dei dati devono essere prese in considerazione per una corretta interpretazione dell'effetto del bioarricchimento. Infatti sia il pH che la temperatura influiscono sulle cinetiche di crescita. Le temperature degli impianti variano in base all'andamento stagionale e non differiscono molto tra loro mentre per il pH si notano delle variazioni più marcate tra gli impianti.





3.1.2 Gestione impianti linea side-stream

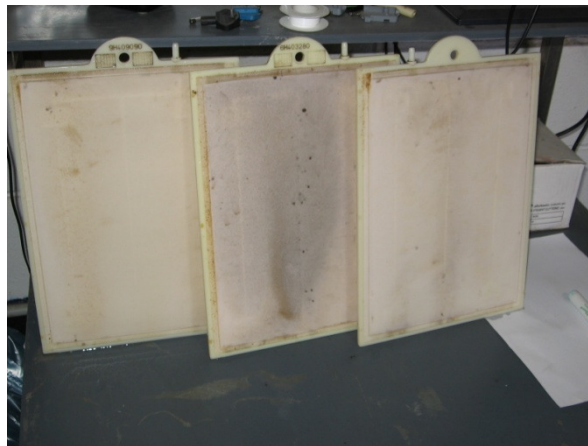
Anche per la gestione dell'impianto BAG della linea side-stream è stato necessario compiere una serie di operazioni per far lavorare l'impianto alle condizioni operative che sono state fissate in fase di progettazione per consentire una buona crescita della biomassa autotrofa da utilizzare per effettuare il bioarricchimento negli impianti della linea main-stream.

Le condizioni operative vengono mostrate nella sottostante tabella:

N_{NH4+} [mg/L] alimentazione	650
SRT [d]	20
HRT [d]	1
Ossigeno disciolto [mg/L]	> 4
pH	7,9
Q_{in} [L/d]	60

L'alimentazione come descritto in precedenza è stata preparata, in un contenitore dal volume di 1000 L, aggiungendo al refluo urbano cloruro di ammonio per raggiungere la concentrazione desiderata di 650 mg/l di azoto ammoniacale e bicarbonato di sodio per diminuire la richiesta di alcalinità nella vasca di nitrificazione/ossidazione.

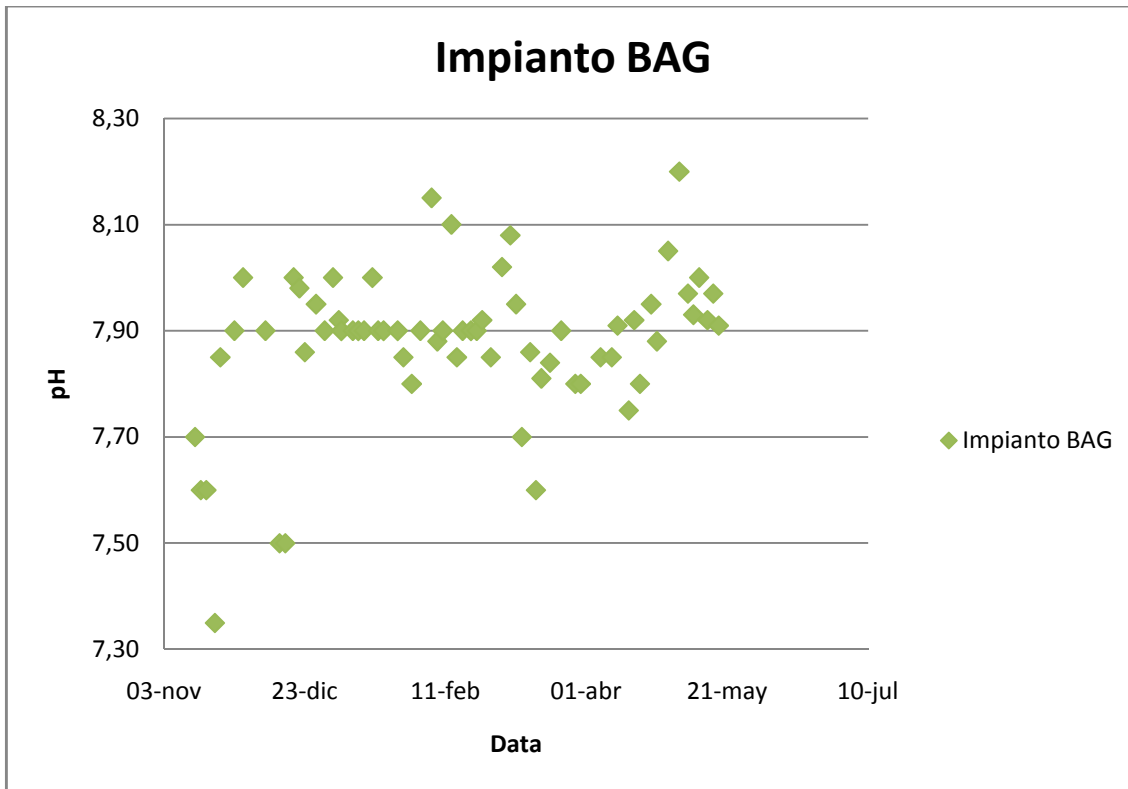
Per garantire invece una portata dell'alimentazione corretta è stato necessario controllare frequentemente la portata di filtrazione delle tre membrane piane e modificare la potenza della pompa peristaltica ogni volta che lo sporcamiento era tale da non permettere una giusta portata in ingresso. Ogni volta che la perdita di efficienza delle membrane ha raggiunto uno sporcamiento tale, che anche la modifica della potenza della pompa non era più sufficiente, si è provveduto ad una pulizia accurata delle membrane sotto acqua corrente.



Membrane piane dell'impianto BAG

Periodicamente abbiamo anche dovuto provvedere alla preparazione di una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio ottenuta aggiungendo 4,18g di NaHCO_3 ad ogni 10 litri di acqua. La soluzione è stata prelevata da una pompa dosatrice (P3) ogni volta che la sonda del pH all'interno del reattore di nitrificazione rilevava valori più bassi del valore prefissato nel progetto di 7,9. La soluzione è stata posta all'interno di un contenitore del volume di 44,5 litri collocato vicino all'impianto ed è stata continuamente agitata mediante agitatore elettrico.

Dal grafico sottostante si vede che durante il periodo della sperimentazione il pH grazie al controllo effettuato dalla sonda collegata al PLC è stato tenuto entro i valori desiderati per non inibire la biomassa.



Durante la sperimentazione, per garantire il corretto funzionamento dell'impianto, frequentemente abbiamo provveduto alla pulizia di tutte le tubazioni presenti per evitare fenomeni di intasamento delle stesse. Inoltre anche la pulizia e la taratura delle sonde è stata necessaria per evitare che al PLC arrivassero rilevazioni non corrette alterando quindi le condizioni operative.

3.2 Efficienza del processo di bioarricchimento

Per valutare l'efficienza del processo di bioarricchimento su entrambi gli impianti della linea main-stream è stato necessario valutare la rimozione percentuale di azoto ammoniacale sia in presenza che in assenza di inoculo di biomassa autotrofa dall'impianto side-stream, che come abbiamo detto simula il trattamento di un surnatante prodotto nella fase di digestione anaerobica dei fanghi.

I parametri principali utilizzati per indagare sul processo di nitrificazione negli impianti sono il carico di azoto ammoniacale in ingresso e il rendimento di rimozione che è stato raggiunto. Il primo parametro viene rappresentato tramite l'ALR, che indica il carico di ammonio applicato giornalmente al volume della vasca aerobica e si calcola con la seguente equazione:

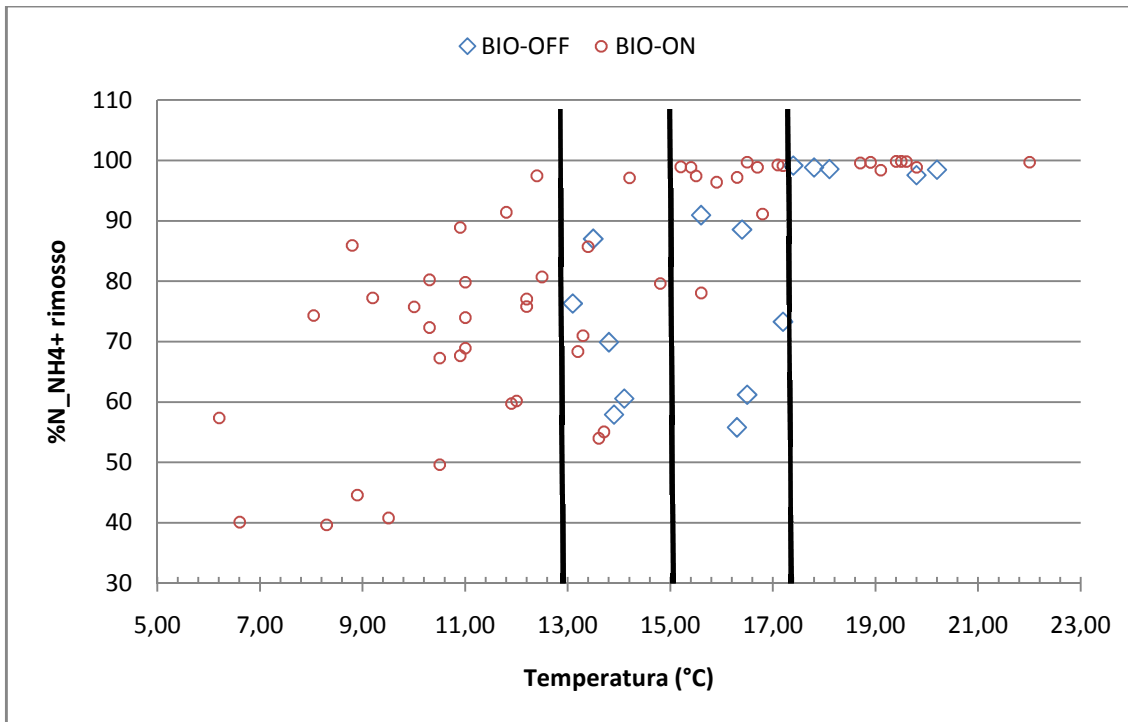
$$\text{ALR [mg/l*d]} = (N_{\text{NH}_4^+} \text{ [mg/l]} * Q \text{ [l/d]}) / V_{\text{aerobico}} \text{ [l]}$$

Il secondo parametro relativo alla rimozione percentuale di azoto ammoniacale viene invece calcolato dalla formula sottostante:

$$\%N_{\text{NH}_4^+} \text{ rimosso} = \{ [(N_{\text{NH}_4^+} \text{ in} - N_{\text{NH}_4^+} \text{ out}) / N_{\text{NH}_4^+} \text{ in}] * 100 \}$$

Mentre il carico di ammonio in ingresso ha avuto dei valori costanti influenzati solo dalle precipitazioni che si sono verificate durante il periodo della sperimentazione, la rimozione percentuale di azoto ammoniacale, ha mostrato un andamento decrescente in concomitanza con la diminuzione delle temperature, in particolare sotto i 15°C il processo di nitrificazione è entrato in crisi.

Nel grafico sottostante verrà preso in esame la rimozione percentuale di azoto ammoniacale sia in assenza che in presenza di bioarricchimento, prendendo in considerazione anche le temperature che sono di fatto il principale fattore in grado di inibire l'attività dei batteri ammonio ossidanti (AOB).



Per il trattamento dei dati il grafico è stato suddiviso in intervalli di temperatura nei quali andiamo a valutare la rimozione percentuale media di azoto sia in presenza che in assenza di temperatura. Oltre i 17,2°C i rendimenti di rimozione sono prossimi al 100% in entrambi i casi. Nella fascia di temperatura dai 15,2 ai 17,2°C graficamente è possibile notare che con il bioarricchimento attivo i rendimenti sono sempre molto elevati mentre senza bioarricchimento entra in crisi il processo di nitrificazione. La differenza media tra i rendimenti con bioarricchimento attivo e disattivo è del 21,9%. Nell'intervallo in cui le temperature sono comprese tra i 13,2 e i 14,8°C l'apporto positivo dato dall'aggiunta di biomassa è molto ridotto essendo del 2,7%. Purtroppo sotto i 13,2°C non è possibile fare dei confronti in quanto abbiamo a disposizione solo i dati riguardanti la presenza di bioarricchimento.

Nelle tabelle sottostanti vengono riportati nel dettaglio i risultati delle elaborazioni sopra riassunte:

Parametro	Media	Dev.stand	BIO
T(°C)	16,4	0,51	OFF
% rimoz.	73,9	14,1	OFF
T(°C)	16,2	0,68	ON

% rimo.	95,9	6,1	ON
----------------	------	-----	----

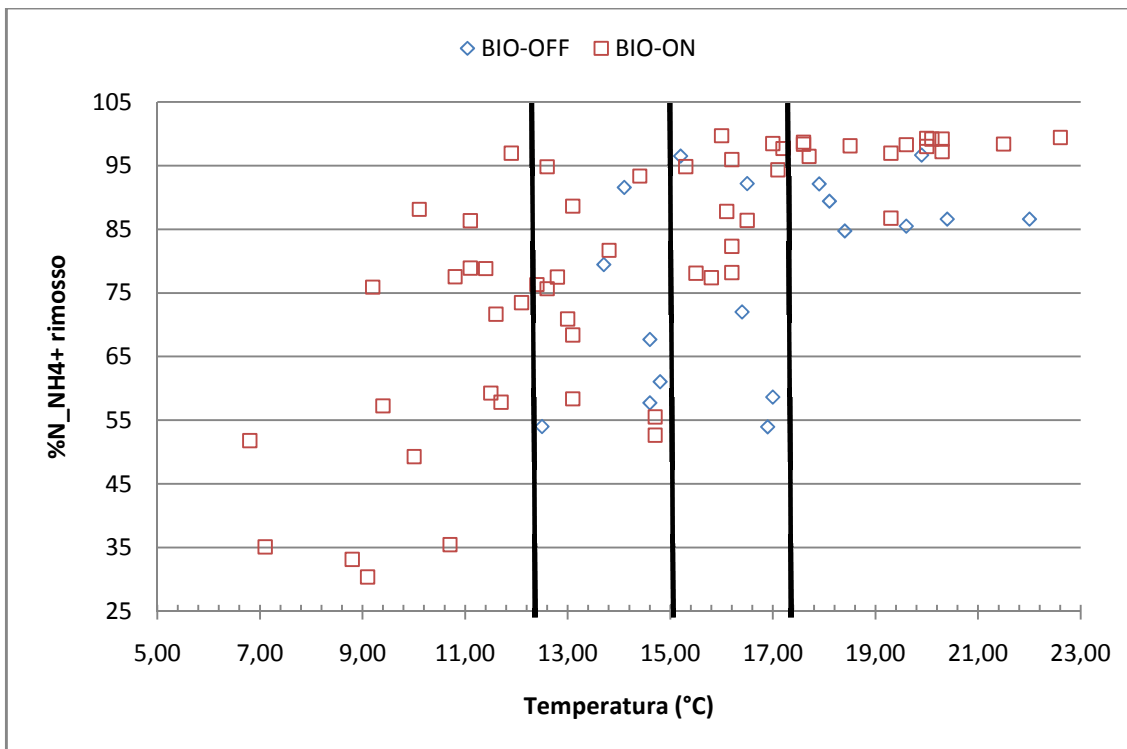
Rendimenti medi nell'intervallo di temperature 15,2°C-17,2°C

Parametro	Media	Dev.stand	BIO
T(°C)	13,68	0,35	OFF
% rimo.	70,3	10,6	OFF
T(°C)	13,9	0,69	ON
% rimo.	73	16,1	ON

Rendimenti medi nell'intervallo di temperature 13,2°C-14,8°C

Dai dati raccolti emerge che all'aumentare del gradiente di temperatura esistente tra i batteri dell'impianto BIO (20°C) e quelli dell'impianto MBR diminuisce l'efficienza del processo di bioarricchimento.

Il solito criterio con il quale sono stati trattati i dati riguardanti l'impianto MBR può essere utilizzato per andare ad analizzare l'efficienza del bioarricchimento nell'impianto CAS. Pertanto sotto viene riportato un grafico che mette in relazione le temperature con i rendimenti percentuali di rimozione sia in assenza che in presenza di bioarricchimento.



Al contrario di quanto avviene per l'impianto MBR anche al di sopra dei 17°C è possibile notare una differenza apprezzabile tra le rimozioni percentuali in assenza e in presenza di aggiunta di biomassa nitrificante. In particolare la differenza media di rimozione è del 10,6%. Nell'intervallo di temperature dai 15,2°C ai 17°C la rimozione media calcolata è del 13,2%, inferiore rispetto all'impianto MBR. Nell'ultimo intervallo in cui andiamo ad analizzare l'efficienza del bioarricchimento, essendo le temperature comprese nell'intervallo tra i 12,4°C e 14,8°C, come per l'impianto MBR, il contributo dato per la rimozione dal bioarricchimento è notevolmente inferiore rispetto all'intervallo superiore. Sotto i 12,4°C non possiamo trattare i dati in quanto abbiamo solo rendimenti in presenza di bioarricchimento.

Le tabelle riportanti i dati nel dettaglio vengono riportate sotto:

Parametro	Media	Dev.stand	BIO
T(°C)	18,9	1,66	OFF
% rimos.	86,7	7,13	OFF
T(°C)	19,1	1,58	ON
% rimos.	97,3	2,92	ON

Rendimenti medi nell'intervallo di temperature 17,1°C-22,0°C

Parametro	Media	Dev.stand	BIO
T(°C)	16,4	0,64	OFF
% rimoz.	74,7	17,2	OFF
T(°C)	16,1	0,46	ON
% rimoz.	87,9	8,3	ON

Rendimenti medi nell'intervallo di temperature 15,2°C-17,0°C

Parametro	Media	Dev.stand	BIO
T(°C)	14,0	0,78	OFF
% rimoz.	68,6	13,1	OFF
T(°C)	13,3	0,79	ON
% rimoz.	74,5	13,3	ON

Rendimenti medi nell'intervallo di temperature 12,4°C-14,8°C

Anche per l'impianto CAS viene quindi confermato dai dati, come per l'impianto MBR, che il bioarricchimento porta a maggiori rimozioni fino ai 15°C, mentre al di sotto questa temperatura il contributo apportato è decisamente minore.

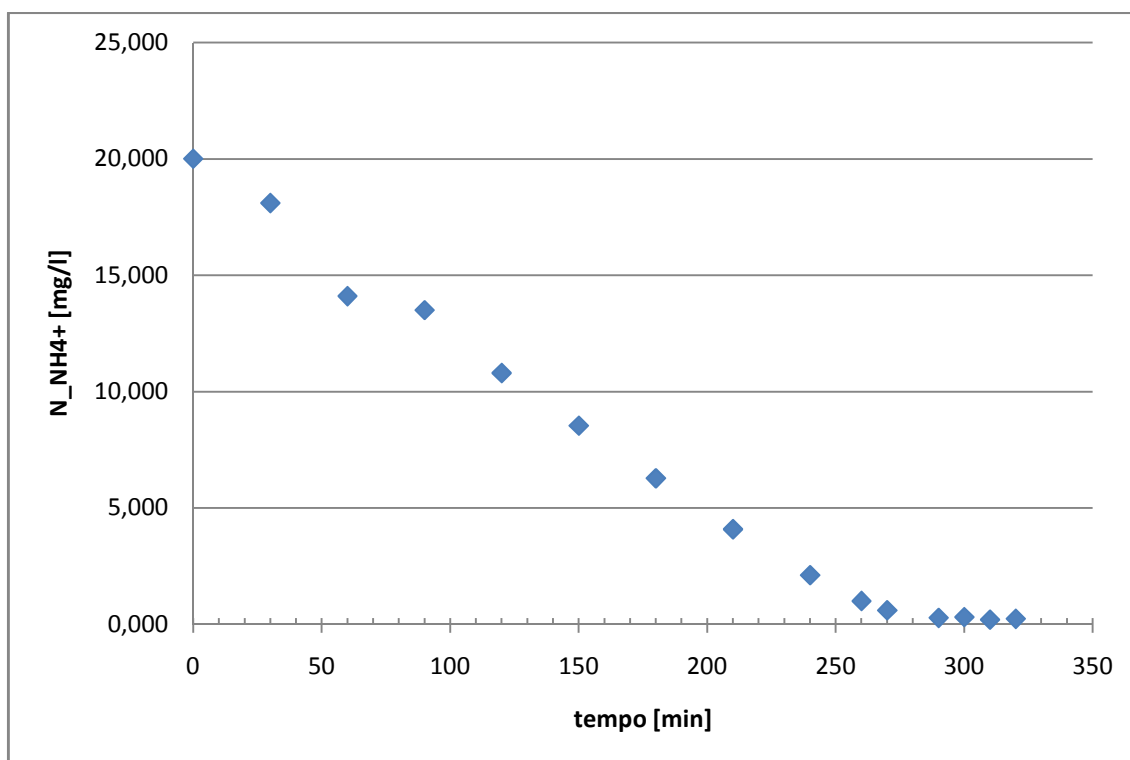
Inoltre per l'impianto CAS notiamo rimozioni minori anche sotto i 17°C e comunque diverse dall'impianto MBR; questo può essere giustificato dal fatto che mentre con le membrane abbiamo un effluente totalmente privo di solidi e quindi anche di biomassa, nell'effluente dell'impianto con il sedimentatore perdiamo solidi in misura variabile e quindi non possiamo avere un controllo sull'età del fango e sui solidi sospesi totali preciso.

3.3 Effetto delle condizioni operative sulle cinetiche di crescita degli AOB

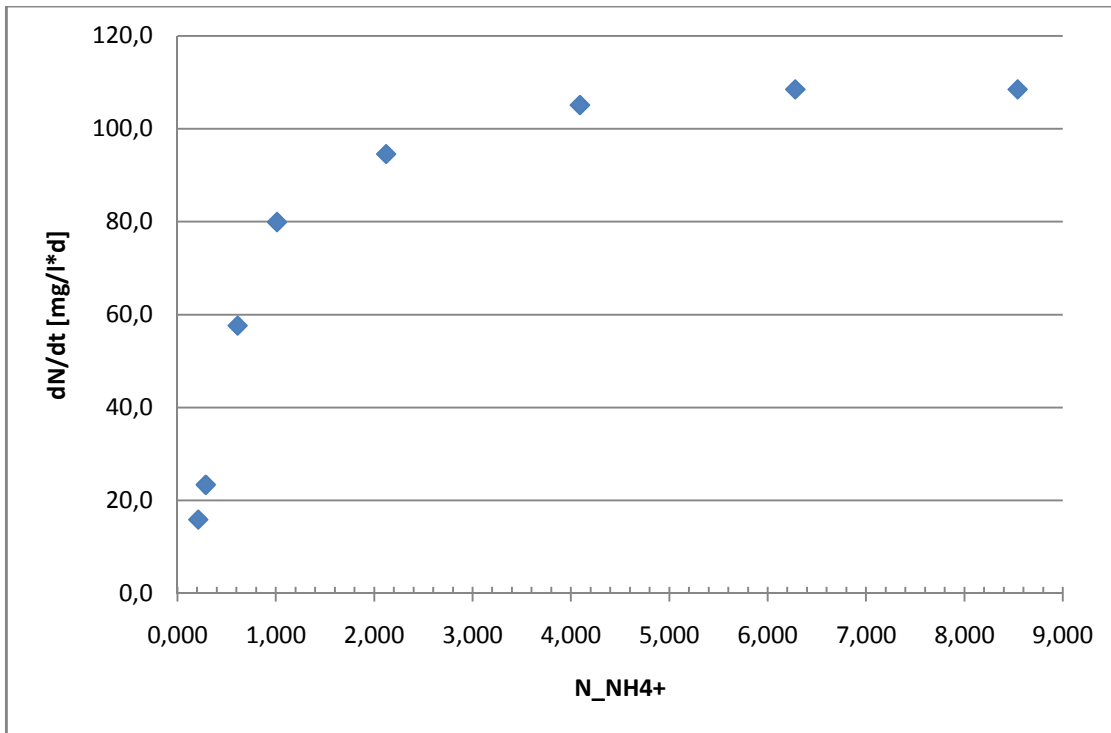
Le prove batch, come già descritto nel capitolo 2, sono state eseguite dentro un becker del volume di 1 L, ed il pH e la concentrazione di ossigeno sono stati rispettivamente tenuti nei valori 7,8/8 e 4 mg/l.

Sono state eseguite tre prove sia per la biomassa autotrofa nitrificante contenuta nell'impianto MBR che per quella dell'impianto BAG.

La prima prova batch realizzata utilizzando la biomassa del reattore MBR è iniziata con una concentrazione di $N_{NH_4^+}$ di 20 mg/l. La concentrazione di ammonio è stata misurata nel corso della prova per costruire un primo grafico che la mette in relazione con il tempo espresso in minuti.



Dai dati ottenuti da questo primo grafico è possibile ricavare la velocità di rimozione dell'azoto ammoniacale in funzione della concentrazione di substrato, il quale risulta essere limitante per la crescita batterica.



Come si vede dal grafico la velocità di rimozione dell'azoto ammoniacale risulta essere dipendente dal substrato disponibile; ad alti valori di substrato la rimozione è massima mentre al diminuire della sua concentrazione la crescita inizia ad essere limitata.

I dati confermano il modello teorico sulla crescita batterica espresso dall'equazione di Monod:

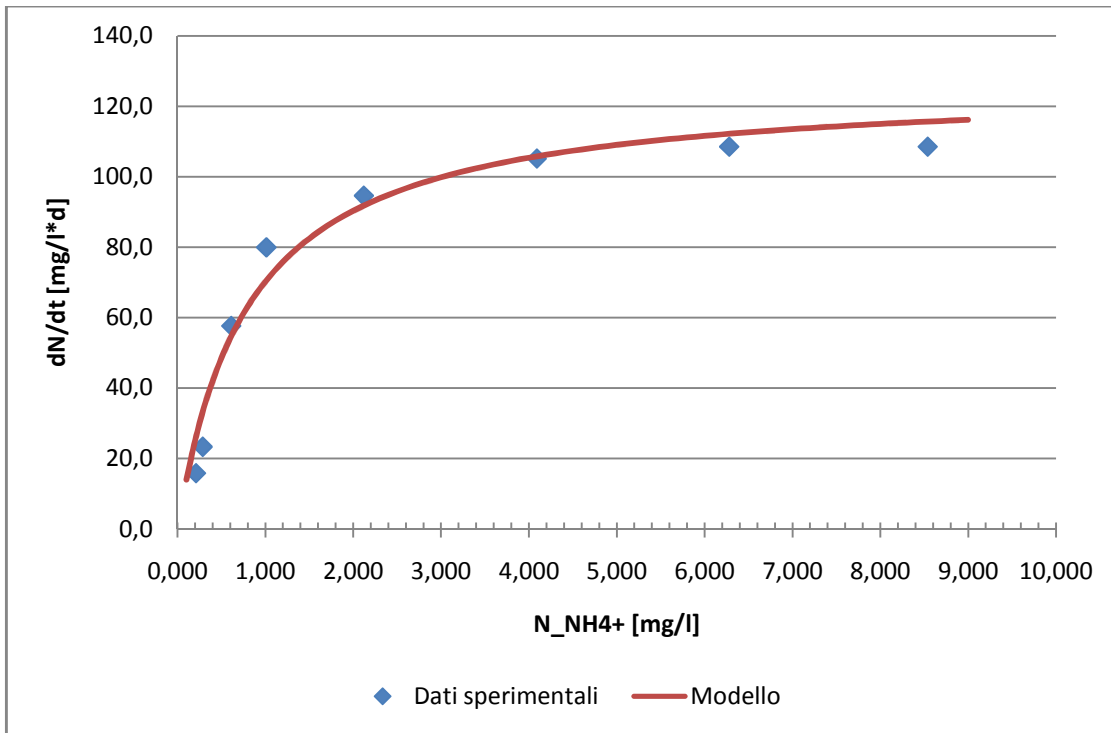
$$dN/dt = u_{\max}/Y * X_{AOB} * N/(K_N + N)$$

Per risalire ai valori della costante di semisaturazione (K_N) e del rateo massimo di rimozione specifico dell'azoto $[(dN/dt)/X_{AOB}]$, abbiamo ricavato il modello che meglio approssima la curva ottenuta con i dati sperimentali. I valori delle costanti che sono state utilizzate (u_{\max} , Y) sono state ottenute mediante precedenti prove respirometriche effettuate sulla stessa biomassa.

I valori ottenuti nella prova sono:

$$K_N = 0,8 \text{ mg/l } N_{NH_4^+};$$

$$dN/dt)/X_{AOB} = 2,73 \text{ [mg } N_{NH_4^+}/(\text{mg } AOB * \text{d})].$$



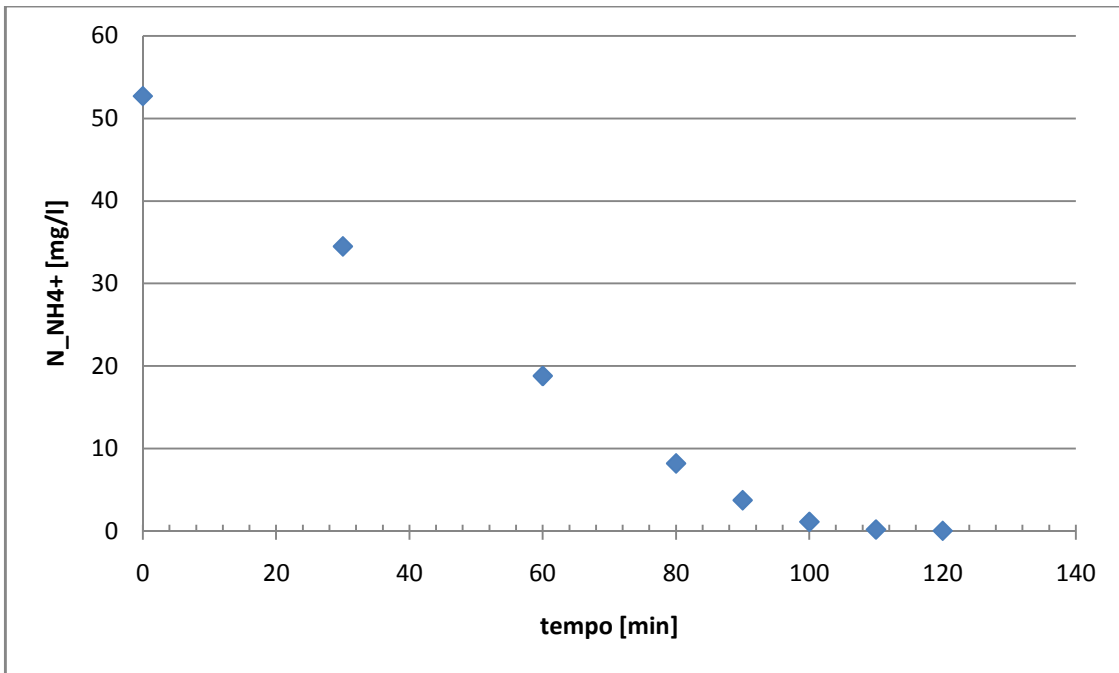
I valori medi dei parametri ricercati che sono stati ottenuti nelle tre prove riguardanti la biomassa autotrofa ammonio ossidante e che quindi ci danno indicazioni sulle caratteristiche cinetiche sono:

$$K_N = 0,6 \text{ mg/l N_NH}_4^+;$$

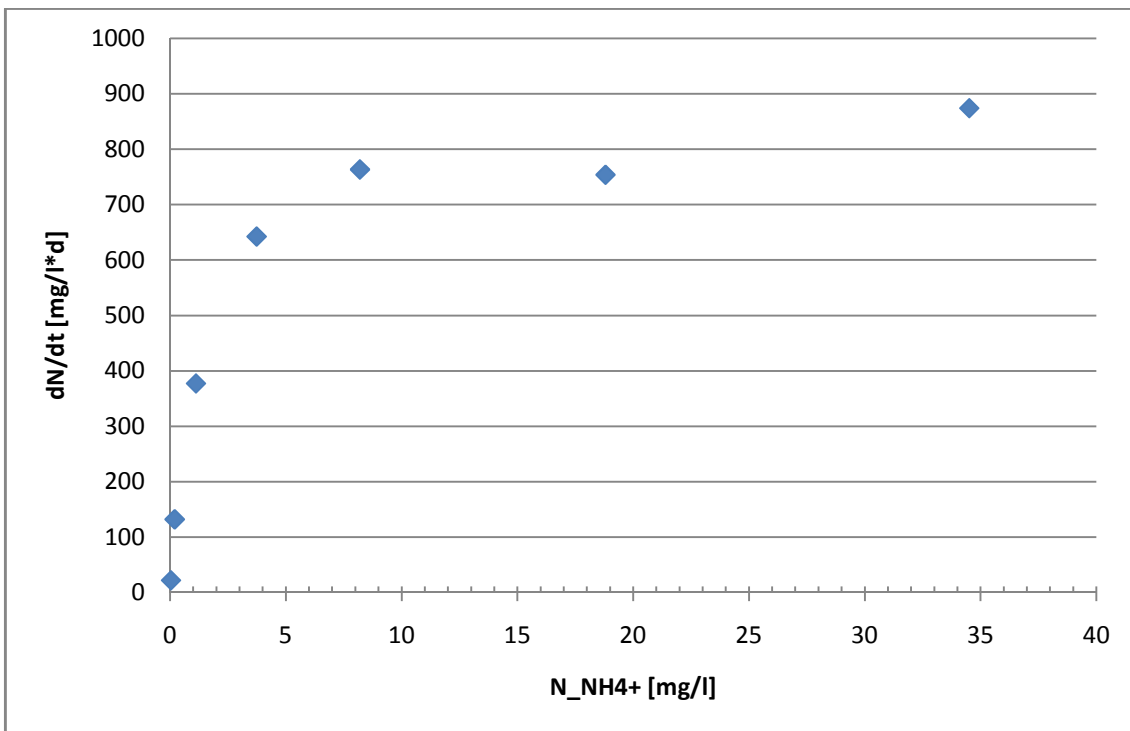
$$(dN/dt)_{MAX}/X_{AOB} = 2,92 \text{ [mg N_NH}_4^+ / (\text{mg AOB} * \text{d})].$$

I dati raccolti nelle tre prove batch per le determinazioni delle costanti cinetiche dei batteri ammonio ossidanti dell'impianto BAG sono stati trattati con lo stesso criterio utilizzato per le prove riguardanti l'impianto MBR.

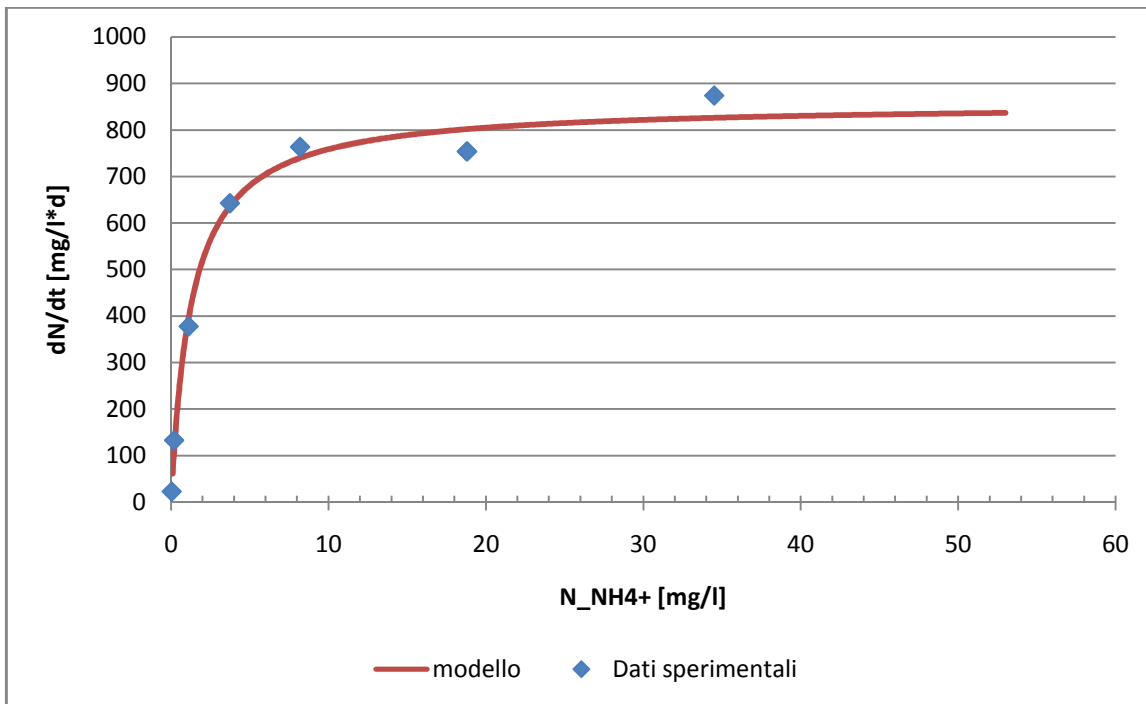
Il primo grafico costruito anche per queste prove mette in relazione la concentrazione di azoto ammoniacale con il tempo espresso in minuti. La concentrazione iniziale in una delle tre prove è pari a 52,7 [mg/l].



Come secondo passo ricaviamo la velocità di rimozione dell'azoto ammoniacale in funzione della concentrazione di substrato.



L'ultimo passaggio richiede l'utilizzazione del modello descritto dall'equazione di Monod, e in particolare trovare la curva alla quale corrisponde la minimizzazione della somma delle differenze elevate al quadrato risultante dai dati sperimentali e quelli teorici.



I valori ottenuti dalla prova di cui sono mostrati i grafici sopra sono:

$$K_N = 1,3 \text{ mg/l N_NH}_4^+;$$

$$dN/dt)/X_{AOB} = 3,64 \text{ [mg N_NH}_4^+ / (\text{mg}_{AOB} * \text{d})].$$

I valori medi dei parametri ricercati ottenuti nelle tre prove riguardanti i batteri ammonio ossidanti dell'impianto BAG sono:

$$K_N = 0,9 \text{ mg/l N_NH}_4^+;$$

$$(dN/dt)_{MAX}/X_{AOB} = 3,67 \text{ [mg N_NH}_4^+ / (\text{mg}_{AOB} * \text{d})].$$

3.4 Conclusioni

Gli esperimenti descritti in questo lavoro di tesi hanno permesso di valutare l'effetto del bioarricchimento sul processo di nitrificazione attuato dai microrganismi ammonio ossidanti (AOB). I risultati hanno evidenziato che generalmente sopra i 17°C i rendimenti sono elevati sia in presenza che in assenza di aggiunta di biomassa dall'impianto BIO. Nella fascia inferiore di temperatura, ovvero dai 15°C ai 17°C l'effetto del bioarricchimento è rilevante sia per l'impianto MBR, che mostra un aumento della rimozione percentuale media del 21,9%, che per l'impianto CAS con un aumento del 13,2%. All'abbassarsi delle temperature, ovvero nell'intervallo dai 12,5°C ai 15°C, pur notando sempre un aumento della rimozione percentuale in presenza di bioarricchimento, abbiamo rilevato che il contributo dovuto all'aggiunta di biomassa è notevolmente inferiore; 2,7% per l'MBR e 5,92% per il CAS. Come evidenziato anche da altre ricerche all'aumentare del gradiente di temperatura esistente nell'ambiente in cui crescono i microrganismi utilizzati per il bioarricchimento (20°C) e la linea principale dove verranno inoculati, diminuisce l'efficienza del bioarricchimento.

Considerato però che temperature sotto i 13°C si raggiungono solo per un periodo limitato durante l'anno sono senz'altro da considerarsi positivi i risultati ottenuti.

Obiettivo delle prove batch è stato quello di verificare se nell'impianto BIO sia avvenuta una selezione di microrganismi, dotati di cinetiche di crescita più elevata, in conseguenza delle diverse condizioni operative a cui è stato fatto svolgere il processo; in particolare un'età del fango di 20 giorni contro 2,5 d della linea main-stream e un'alimentazione con un elevato rapporto tra azoto e C.O.D. biodegradabile.

I risultati ottenuti confermano la selezione di una biomassa nitrificante con caratteristiche cinetiche differenti per l'impianto BIO rispetto all'impianto MBR.

I parametri ottenuti rispettivamente per i batteri del BIO e dell'MBR sono i seguenti: rateo massimo di rimozione dell'azoto ammoniacale 3,67 [mg N_{NH4+} / mg AOB * d] e 2,92 mg N_{NH4+} / mg AOB * d, costante di semisaturazione [0,9 mg N_{NH4+} / l] e 0,6 [0,9 mg N_{NH4+} / l]. La selezione di una biomassa con cinetica più elevata permette al processo di bioarricchimento di dare un contributo alla rimozione dell'azoto non solo dal punto di vista quantitativo ma anche da quello qualitativo.

BIBLIOGRAFIA

Renato Vismara, Depurazione biologica. Teoria e processi. Terza edizione [Libro]. Biblioteca scientifica Hoepli.

Luigi Masotti, Depurazione delle acque. Tecniche ed impianti per il trattamento delle acque reflue [Libro]. Calderini

Metcalf e Eddy, Ingegneria delle acque reflue. Trattamento e riuso. Quarta edizione [Libro]. McGraw Hill.

Paolo Berbenni, Giovanni Bianucci, I trattamenti delle acque di scarico [Libro]. Etas Compass.

Manuale Ambiente 2011, Manuali professionali. Ipsoa

Paola Barbieri, Giuseppina Bestetti, Enrica Galli, Davide Zannoni, Microbiologia ambientale ed elementi di ecologia microbica [Libro]. Casa Editrice Ambrosiana.

Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S., Srinath E.G., Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. Water Pollution Control Federation 48, 835-852, 1976.

Alenka Princic, Ivan Mahne, France Megusar, Eldor A. Paul and James M. Tiedje, Effects of pH and Oxygen and Ammonium Concentrations on the Community Structure of Nitrifying Bacteria from Wastewater. Applied and Environmental Microbiology 64, 3584-3590, 1998.

Giulio Munz, Claudio Lubello, Jan A. Oleszkiewicz, Factor affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria. Chemosphere 83, 720-725, 2011.

R. Neufeld, J. Greenfield, B. Rieder, Temperature, cyanide and phenolic nitrification inhibition. Water Research 20, 633-642, 1986.

Ricotti Andrea, Start up di un impianto pilota ad alto carico di azoto per la coltivazione di microrganismi autotrofi nitrificanti. [Tesi di Laurea], 2011.

S. Salem, D.H.J.G. Berends, J.J. Heijnen, M.C.M. Van Loosdrecht, Bio-augmentation by nitrification with return sludge. *Water Research* 37, 1794-1804, 2003.

R. C. Smith, P. E. Saikaly, K. Zhang, S. Thomatos and D. B. Oerther, Ecological engineering of bioaugmentation from side-stream nitrification. *Water Science & Technology* 57.12, 1927-1933, 2008.

Dilrika H. Abeysinghe, D.G. Viraj De Silva, David A. Stahl, and Bruce E. Rittmann, The Effectiveness of Bioaugmentation in Nitrifying Systems Stressed by a Washout Condition and Cold Temperature. *Water Environment Research* 74.2, 187-199, 2002.

H. Van Limbergen, E.M. Top, W.Verstraete, Bioaugmentation in activated sludge: current features and future prospective. *Appl Microbiol Biotechnol* 50, 16-23, 1998.

T. Bouchez, D. Patureau, P. Dabert, M. Wagner, J.P. Delgenès, R. Moletta, Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization. *Water Science and Technology* 41.12, 61-68, 2000.

Josep A. Torà, Javier Lafuente, Juan A. Baeza, Julián Carrera, Combined effect of inorganic carbon limitation and inhibition by free ammonia and free nitrous acid on ammonia oxidizing bacteria. *Bioresource Technology* 101, 6051-6058, 2010.

Carrera J., Vicent T. e Lafuente J., Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochemistry* 39, 2035–2041, 2004.

Manser R., Gujer W e Siegrist H., Decay processes of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment systems. *Water Research* 40, 2416–2426, 2006.

Manser R., Gujer W. e Siegrist H., Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers. *Water Research* 39, 4632-4642, 2005.

Ricotti Andrea. Start up di un impianto pilota ad alto carico di azoto per la coltivazione di microrganismi autotrofi nitrificanti. [Tesi di Laurea]. – 2012.

Petrucci Debora. Ottimizzazione e validazione di tecniche respirometriche per la caratterizzazione di biomassa nitrificante [Tesi di Laurea]. – 2012.

Alessandro Bitossi. Indagini a scala pilota del processo di bio-arricchimento di biomassa nitrificante applicato al trattamento di acque reflue civili. [Tesi di laurea]. – 2012.

Ringraziamenti.

Ringrazio i miei genitori e mia nonna che mi hanno permesso di realizzare questo obiettivo supportandomi sia economicamente che psicologicamente. Devo innanzitutto a loro il raggiungimento di questo traguardo.

Ringrazio il prof. Alessio Ceccarini che si è dimostrato una persona molto disponibile e una guida indispensabile per ultimare il mio lavoro di tesi.

Ringrazio il dott. Gualtiero Mori che mi ha dato la possibilità di svolgere l'attività di tesi all'interno del laboratorio di ricerca CER²CO e l'ing. Alberto Mannucci che mi ha aiutato durante il periodo di tirocinio.

Ringrazio i miei compagni di tesi Alessandro Bitossi, Debora Petrucci, Alessandro Cosimi e Riccardo Maculan per la compagnia e il supporto durante il periodo di tesi.

Ringrazio i miei amici e compagni universitari di questi anni: Antonio Chierchiello, Maria Cristina Nanni, Stefania Ginechi, Elena Matteucci, Alessandro Chiavistelli, Angiolino Chiavistelli, Valentina Nisticò, Valentina Moretti, Letizia de Fabritis, Arianna Tani, Sara Bertonati, Giovanni Larghi, Simone Franchi, Alberto Mazzaccherini, Alessandro Cosimi, Lara Gallo, Iaria Malvaso, Alice Giaccone, Giulia Muti, Francesco Rijo Gaspar, Alvaro Lopez Rivera, Danilo Antonio Stefàno, Ruben Valverde Alba, Federica Fantozzi, Francesca Miozzi, Francesca Duino, Francesca Cuozzo, Gloria Sbrana, Stefano Monti, Maria Pala, Francesco Elter, Silvia Brandi, Maurizio Privitera, Lamberto Piovanelli, Gabriele Ogliara, Cristiano Bianchi, Paolo Palazzari.

Ringrazio la mia fidanzata che mi ha aiutato in questo periodo.