

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

Il processo ANAMMOX: una tecnica innovativa per  
la rimozione biologica dell'azoto

Relatore: Prof. Giuseppe Concheri

Correlatore: Prof. Andrea Squartini

Laureando

**Giacomo Barutta**

Matricola n. 1012958

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

# Sommario

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 L'azoto e il suo ruolo ambientale</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Il problema dei nitrati</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 La direttiva nitrati</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4 Il ciclo dell'azoto</b> .....	<b>11</b>
1.4.1 Nitrificazione.....	12
1.4.2 Denitrificazione.....	16
1.4.3 Anaerobic AMMonium OXidation (ANAMMOX).....	17
<b>1.5 I batteri ANAMMOX</b> .....	<b>18</b>
1.5.1. La struttura cellulare .....	21
1.5.2. L'Anammoxosoma.....	23
1.5.3. Il metabolismo Anammox.....	25
1.5.4. Fattori cinetici e inibenti .....	26
Temperatura e pH.....	26
Ossigeno disciolto .....	28
Concentrazione di biomassa .....	29
Substrati e prodotti .....	30
<b>1.6. Tecnologie per l'abbattimento dell'azoto</b> .....	<b>31</b>
1.6.1. Processo NITRO-DENITRO .....	32
1.6.2. La Deamminificazione (ANAMMOX).....	35
1.6.2.1. Sistemi a singolo reattore .....	38
CANON (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite).....	39
DEMON ( DEamMONification).....	40
SNAD (Simultaneous partial Nitrification ANAMMOX Denitrification).....	42
1.6.2.2. Sistemi a due stadi .....	43
SHARON-ANAMMOX: (Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite).....	43

OLAND ( Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification ).....	45
DEAMOX (DENitrifying AMmonium OXidation ).....	46
1.6.2.3. Tipologie di Alimento Utilizzabili .....	46
1.6.2.4. Valutazioni Tecniche per la Deammonificazione.....	48
Aspetti Gestionali.....	48
Aspetti Economici.....	49
Problematiche Attese .....	50
<b>2. SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>52</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. SOLUZIONI IMPIANTISTICHE PER LA DEAMMONIFICAZIONE....</b>	<b>53</b>
3.1.1 L'IMPIANTO A SINGOLO STADIO: SBR – DEMON .....	54
3.1.1.1 Struttura .....	54
3.1.1.2. Funzionamento .....	55
3.1.1.3 Bilancio di massa.....	59
3.1.2 L'IMPIANTO PILOTA a DUE STADI: SHARON – ANAMMOX .....	61
3.1.2.1 Struttura .....	61
3.1.2.2. Funzionamento .....	63
3.1.2.3. Bilancio di massa.....	64
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>68</b>
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>77</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>78</b>
<b>Allegato A .....</b>	<b>86</b>
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>91</b>

## **RIASSUNTO**

Con l'arrivo della direttiva nitrati e di norme sempre più severe in materia di inquinamento, tutto il settore agricolo e industriale è stato costretto a rivoluzionare la gestione dei prodotti di scarto progettando nuovi impianti per la gestione e la trasformazione di tali substrati che non possono più essere reimmessi direttamente nell'ambiente.

Recenti studi hanno portato alla scoperta di nuovi processi all'interno del ciclo dell'azoto che possono essere utilizzati dall'uomo per la gestione delle sostanze azotate che vengono prodotte durante le varie lavorazioni.

Oltre ai già noti processi di nitrificazione e denitrificazione, nella presente tesi si affronta un nuovo processo che ha attirato l'attenzione di molti ricercatori per l'ottima capacità di abbattere l'azoto in maniera sostenibile: l'ossidazione anaerobica dell'ammonio, o ANAMMOX.

Questo innovativo processo è ancora in fase di studio e quindi necessita di un continuo monitoraggio e ricerca per nuove possibili applicazioni.

Lo studio è stato effettuato presso l'azienda AIA di Villaganzerla dove sono stati costruiti, dalla ditta Eurotec WTT di Padova, due diverse tipologie di impianto: il primo costituito da due reattori nei quali avvengono separatamente il processo SHARON (Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite) e il processo ANAMMOX, e il secondo costituito da un'unica grande vasca con tecnologia SBR (Sequencing Batch Reactor) nella quale si alternano condizioni aerobiche e anaerobiche secondo il processo DEMON (DE-amMONification).

Il fatto di poter utilizzare lo stesso alimento in entrambi i sistemi ha permesso di fare un confronto approfondito sulle prestazioni, testare nuove configurazioni sui parametri chimico - fisici e valutare di conseguenza le possibili alternative.

## **ABSTRACT**

With the arrival of the Nitrates Directive and the increasingly stringent rules on pollution, all the agricultural and industrial sectors has been forced to change the management of waste products designing new systems for the management and processing of such substrates that can no longer may be released directly into the environment.

Recent studies have led to the discovery of new processes within the nitrogen cycle that can be used for the management of nitrogenous substances that are produced during the various processes.

In addition to the already known processes of nitrification and denitrification, in this thesis is approached a new process that has attracted the attention of many researchers for its excellent ability to break down nitrogen in a sustainable way: the anaerobic oxidation of ammonium, or ANAMMOX.

This innovative process is still under study and therefore requires a continuous monitoring and research for new possible applications.

The study was carried out at the company AIA of Villaganzerla where they were built, by the company Eurotec WTT of Padova, two different types of systems: the first consists of two reactors in which the process takes place separately SHARON (Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite) and the process ANAMMOX, and the second consists of a single large bath with SBR (Sequencing Batch Reactor) in which aerobic and anaerobic conditions alternate according to the DEMON (DE-amMONification) process.

Being able to use the same food in both systems has allowed us to make a thorough comparison on performance, test new configurations on the physico – chemical parameters and evaluate possible alternatives accordingly.

# 1. INTRODUZIONE

## *1.1 L'azoto e il suo ruolo ambientale*

L'**azoto** è un elemento chimico presente nell'aria per il 78,1% in volume dove è costituito da una molecola biatomica. Il legame covalente dell'azoto è un triplo legame. È l'elemento più elettronegativo del V gruppo (è un tipico non metallo che genera ossidi acidi) e forma solo composti covalenti con tre legami o quattro; a differenza degli altri elementi del gruppo V non può, per motivi energetici, presentare la penta-covalenza. L'azoto gassoso è incolore, inodore e poco solubile in acqua. A temperature e pressioni ordinarie è chimicamente inerte con la maggior parte delle sostanze; È un macro-elemento importante per la crescita delle piante e per l'attività degli organismi. È presente nelle proteine, negli acidi nucleici e sotto forma di numerosi altri composti organici in tutti gli organismi animali e vegetali, mentre si trova sotto forma di sali inorganici (soprattutto nitrati, nitriti e sali di ammonio) nel terreno. Sulla superficie terrestre si può trovare in diverse forme, ossidate e ridotte, che si inter-scambiano tra di loro attraverso una serie di reazioni e creano il cosiddetto “ ciclo dell'azoto”. L'uomo può inserirsi all'interno di questo ciclo, modificando l'equilibrio delle reazioni, in modo tale da favorire uno o più reagenti e prodotti. La necessità di intervenire e sfruttare i processi naturali si sta facendo sempre più stringente a causa dell'elevata produzione di sostanze azotate di scarto, come i reflui animali e i digestati da fermentazione anaerobica, e delle modifiche intervenute nella legislazione comunitaria che ha definito un limite massimo di azoto da immettere nel territorio degli stati membri. Questo limite, fissato a 50 mg/L per le acque superficiali e sotterranee, permette di evitare un sovraccarico di sostanze azotate le quali possono portare all'eutrofizzazione e alla formazione di eventuali intermedi tossici come nitrito e ossido di diazoto. Lo studio del ciclo dell'azoto e dei processi che avvengono costantemente al suo interno promuovono

lo sviluppo di nuove tecnologie in grado di accorpare questi processi e renderli fondamentali per la sostenibilità ambientale.

## ***1.2 Il problema dei nitrati***

Nell'agricoltura tradizionale era fortemente consolidata un'integrazione tra l'attività di allevamento e di coltivazione dei suoli dove il valore degli effluenti era riconosciuto proprio per le sue proprietà ammendanti e fertilizzanti esercitate sui terreni. Negli ultimi cinquant'anni la tendenza verso una crescente intensificazione e produttività è stata accompagnata da un forte aumento dell'uso di fertilizzanti di sintesi e soprattutto di azoto inorganico. Quest'ultimo ha raggiunto il massimo tasso di consumo a metà degli anni '80 con 11 milioni tonnellate [1]. Nello stesso periodo si è assistito ad un aumento, non solo delle produzioni agricole, ma anche del numero di capi allevati all'interno degli allevamenti, soprattutto in riferimento al comparto suinicolo ed avicolo, generando un ulteriore aumento del carico di azoto. I cambiamenti della politica agricola (quote latte nel 1984 e premi per vacche/pecore nutrici nel 1992) hanno da allora stabilizzato o contribuito a ridurre il numero di capi bovini e ovini, ma suini e pollame hanno continuato ad aumentare. La forte specializzazione produttiva che ha caratterizzato il settore zootecnico, ha portato le aziende a concentrarsi su un numero ridotto di attività in certi casi scollegate tra loro. La conseguenza è stata una inevitabile separazione dell'attività zootecnica da quella agricola, dove sempre più spesso sono impiegati fertilizzanti inorganici per sostenere le produzioni delle colture praticate [2]. Oggi le aziende zootecniche acquistano principalmente gli alimenti per il bestiame dal mercato piuttosto che produrli in loco. Attraverso le deiezioni prodotte dagli animali vengono forniti al terreno elementi quali azoto, fosforo e potassio. All'uso dei fertilizzanti naturali si aggiunge poi l'uso di quelli sintetici. Ne conseguono apporti di elementi nutritivi in eccesso rispetto a quelli asportati dalle colture praticate sui terreni aziendali. Minori asportazioni sono dovute non solo a una minor quantità di alimenti

autoprodotti in azienda ma anche alla concentrazione di bestiame su distese di entità minore. Si verifica quindi un eccesso di nutrienti nel terreno che si traduce in un maggior rischio di perdita di questi elementi dal terreno e un rischio di inquinamento per le acque. Negli ultimi 50 anni si è assistito inoltre a una forte riduzione dei prati permanenti e delle zone tampone: siepi, fossati e zone umide. Questo ha favorito fenomeni di erosione e di scorrimento accelerando il drenaggio dei nutrienti negli ecosistemi acquatici e nelle acque sotterranee [1]. L'azoto apportato al suolo mediante gli effluenti di allevamento e i fertilizzanti minerali subisce numerose trasformazioni ad opera di microrganismi. In particolare l'ossidazione dell'azoto ammoniacale porta alla formazione di nitrati. A causa della carica negativa di questo ione e dell'elevata solubilità in acqua, i nitrati vengono lisciviati dal terreno raggiungendo le falde e i corpi idrici. La conversione da ammonio a nitrato è influenzata da numerosi fattori tra cui la temperatura e il tipo di suolo. Il fenomeno infatti è più rilevante nei terreni sabbiosi o ricchi di scheletro, per la maggiore presenza di ossigeno, e meno nei suoli argillosi i cui pori più piccoli, sono occupati prevalentemente da acqua per capillarità [2]. Il rilascio di azoto ma anche di fosforo nelle acque determina fenomeni di eutrofizzazione, ovvero un arricchimento di sali nutritivi. Questo ha come conseguenze una proliferazione di alghe e di piante acquatiche, l'impoverimento delle risorse ittiche, la generale degradazione della qualità dell'acqua che ne riduce o preclude l'uso [2]. I nitrati risultano inoltre composti pericolosi per la salute. Nello stomaco vi sono le condizioni perché il nitrato venga ridotto a nitrito. Quest'ultimo può reagire con alcune ammine introdotte con l'alimento per dare N-nitrosammine: sostanze epatotossiche e cancerogene. Negli ultimi decenni sono cresciute le preoccupazioni per lo stato dell'ambiente ed è aumentata di conseguenza la propensione alla riduzione dell'inquinamento di origine antropica. Il ruolo dell'agricoltura è tutt'altro che trascurabile. Pur non essendo l'unico comparto coinvolto, il settore agricolo è quello maggiormente imputato proprio nel rilascio di azoto verso le acque sia superficiali che sotterranee. L'agenzia Europea per l'Ambiente (EEA) stima che l'agricoltura italiana incida per oltre il 60% sui rilasci di azoto verso le acque superficiali ed evidenzia una stretta correlazione tra la concentrazione dei nitrati nelle acque e l'intensità delle

pratiche agricole sul territorio [3]. Queste considerazioni hanno portato all'emanazione a livello comunitario della "Direttiva Nitrati" (91/676/CEE) proprio per tutelare i corpi idrici dall'inquinamento provocato dai nitrati di origine agricola. In realtà il settore agricolo contribuisce anche all'inquinamento dell'aria. L'agricoltura concorre in maniera rilevante all'emissione di ammoniaca in quanto l'urea presente negli effluenti zootecnici se non debitamente trattata in fase di stabulazione, stoccaggio e/o distribuzione si trasforma rapidamente in ammoniaca. Quest'ultima risulta essere un acidificante dove per acidificazione si intende il processo mediante il quale sostanze gassose di origine antropica o naturale, una volta emesse in atmosfera, si trasformano in acidi e alterano le caratteristiche chimiche degli ecosistemi sia acquatici che terrestri. Altri acidificanti possono essere il biossido di zolfo e gli ossidi di azoto. Questi ultimi, ed in particolare il protossido di azoto, sono considerati gas-serra. L'agricoltura contribuisce all'emissione di queste sostanze attraverso la denitrificazione che si verifica nelle risaie sommerse e nelle vasche di stoccaggio degli effluenti zootecnici. Il metabolismo animale e le fermentazioni dei reflui contribuiscono invece al rilascio in atmosfera di metano, anch'esso gas serra.

### ***1.3 La direttiva nitrati***

Le crescenti preoccupazioni per lo stato dell'ambiente hanno portato all'emanazione, a livello comunitario, della direttiva 676/91 meglio nota come "Direttiva Nitrati". L'obiettivo che tale direttiva si prefissa è di ridurre l'inquinamento delle acque causato direttamente o indirettamente dai nitrati di origine agricola oltre a prevenire qualsiasi ulteriore inquinamento di questo tipo. Gli stati membri devono a tal fine provvedere a [2]:

- designare delle "Zone Vulnerabili da Nitrati" di origine agricola (ZVN) nelle quali è consentita la distribuzione degli effluenti di allevamenti e delle piccole aziende agroalimentari fino a un limite massimo di 170 kg di azoto per ettaro.

- Fissare uno o più codici di buona pratica agricola applicabili a discrezione degli agricoltori.
- Fissare dei programmi d'azione che stabiliscono le modalità con cui gli effluenti possono essere applicati al terreno nelle zone vulnerabili. Tali programmi sono volti a ridurre le possibilità di utilizzare gli effluenti con lo scopo di tutelare maggiormente l'ambiente.
- Controllare la concentrazione di nitrati nelle acque dolci: il contenuto massimo ammissibile è pari a 50 mg/L.

La direttiva 676/91 ha avuto il suo pieno recepimento a livello nazionale solo con il D.Lgs 152 del 3 aprile 2006 e il DM del 7 aprile 2006 [2]. Quest'ultimo ha ripreso e modificato i vincoli della LR 37/93. Uno dei limiti più significativi della direttiva riguarda i quantitativi massimi utilizzabili di azoto da effluenti di allevamento pari a 170 kg per le zone vulnerabili. Parallelamente il decreto nazionale regola l'utilizzo dell'azoto anche nelle zone non vulnerabili fissando un tetto di 340 kg per ettaro all'anno. Vengono poste limitazioni anche per l'utilizzo di concimi azotati; questi infatti devono essere distribuiti in relazione alle esigenze delle colture e in vicinanza della fase vegetativa di maggior asportazione da parte delle piante [2]. I valori dell'efficienza dell'azoto da effluenti di allevamento deve raggiungere almeno valori medi e i quantitativi da apportare devono essere calcolati secondo il metodo del bilancio dei nutrienti. Le aziende zootecniche presentano notevoli difficoltà a rispondere ai nuovi vincoli, specialmente a quello dei 170 kg di azoto per ettaro. Le quantità di azoto zootecnico che producono risultano infatti in esubero rispetto al limite previsto. Questo vale soprattutto per aziende con un'elevata densità zootecnica presenti in zone vulnerabili. Il percorso verso la riduzione dei rilasci di azoto dal settore agricolo verso l'ambiente, trova quindi elementi di criticità nel territorio lombardo caratterizzato da un comparto zootecnico che rappresenta il 40% della produzione nazionale di latte e circa la metà dei suini allevati in Italia [3]. E' necessario che vengano dunque individuate delle soluzioni che consentano di affrontare l'adeguamento alle normative mantenendo la sostenibilità economica delle aziende. Si tratta quindi di valutare possibili interventi

modulandoli nelle diverse aree e condizioni aziendali sulla base degli esuberanti di azoto [3]. Nel capitolo successivo verranno illustrate alcune soluzioni che consentono di trattare gli effluenti di allevamento al fine di rimuovere le eccedenze azotate. Alcune risultano essere soluzioni già adottate dagli allevatori mentre viene introdotto un metodo innovativo quale il processo Anammox. I batteri che compiono questa reazione sono oggetto di studi volti ad analizzare le capacità di rimozione dell'azoto da acque reflue e la possibilità di applicare il processo al trattamento di effluenti di allevamento.

#### 1.4 Il ciclo dell'azoto

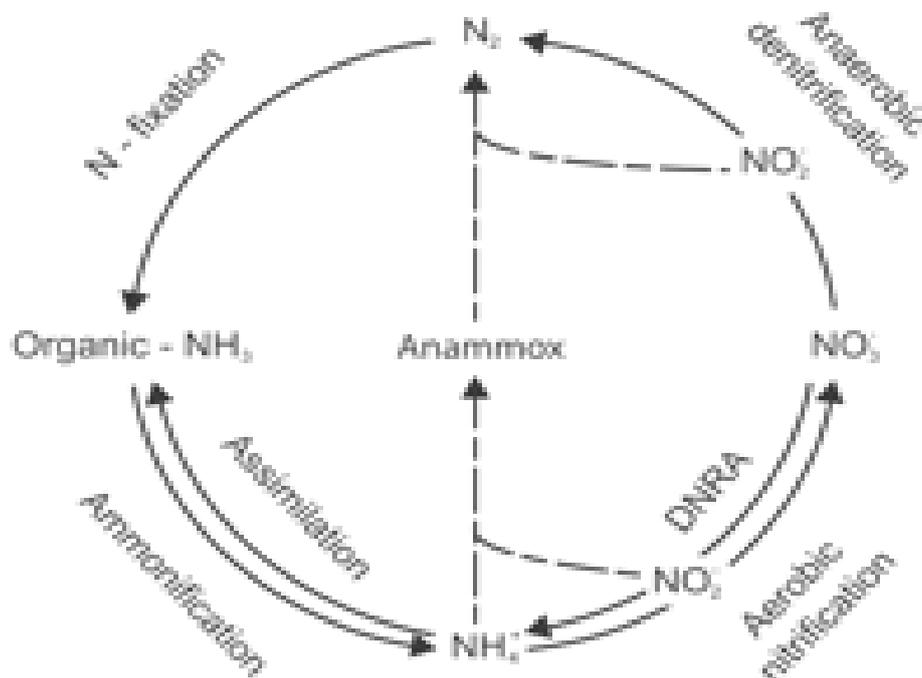


Figura 1. Rappresentazione schematica del ciclo dell'azoto  
<http://aem.asm.org/content/69/11/6447.full>

L'atomo di azoto in natura può esistere in diversi stati di ossidazione, ognuno dei quali possiede delle caratteristiche chimico-fisiche differenti che possono avere numerosi impatti sull'ambiente. Il passaggio da uno stato all'altro può avvenire attraverso l'attività dei microrganismi, i quali operano in condizioni di estrema variabilità. Il ciclo dell'azoto è definito dall'insieme delle trasformazioni a cui vanno incontro le varie specie dell'azoto e comprende diverse reazioni metaboliche: *nitrificazione*, *denitrificazione*, *ammonificazione*, *assimilazione*, *dissimilazione* e *fissazione*. La recente scoperta di nuove specie microbiche (principalmente batteriche) ha suggerito la presenza di nuove vie di trasformazione dei composti azotati: si è osservato come i batteri ammonio ossidanti aerobici possono catalizzare altre reazioni in condizioni di limitata presenza di ossigeno, impiegando il nitrito per dare nuove forme azotate, e contribuendo globalmente all'abbattimento dell'ammonio. La scoperta di un nuovo gruppo di microrganismi, gli ammonio ossidanti anaerobici (ANAMMOX), ha contribuito a chiarire alcuni passaggi del ciclo dell'azoto che erano stati fino a quel momento solamente teorizzati: l'ammonio può essere ossidato ad azoto molecolare usando il nitrito come elettrone accettore in condizioni anaerobiche. Questo processo dà un contributo essenziale all'abbattimento dell'azoto nei sistemi naturali, in particolare nei sistemi marini, dove le condizioni di anaerobiosi sono estremamente diffuse. I passaggi più importanti dal punto di vista ambientale sono nitrificazione, denitrificazione e ANAMMOX che permettono di rimuovere composti chimici potenzialmente dannosi come i nitrati e l'ammoniaca.

#### ***1.4.1 Nitrificazione***

La nitrificazione è un processo biologico che consiste nella trasformazione dell'ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) in nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e successivamente in nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Il primo step prende il nome di *nitrazione* o *nitrosazione* e viene effettuato da microrganismi ammonio ossidanti (AOB) appartenenti al genere *Nitrosomonas* :

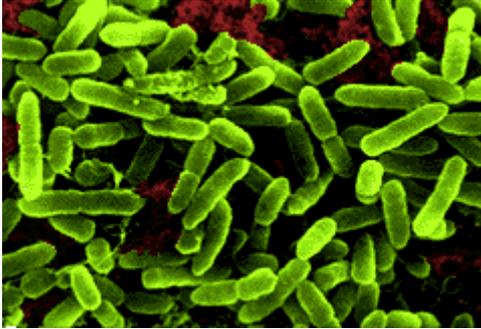


Figura 2. Batteri *Nitrosomonas*.

Durante la reazione, l'ammonio è inizialmente ossidato a idrossilammina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) grazie all'enzima *ammonio monossigenasi* (AMO), a cui segue la deidrogenazione dell'idrossilammina a nitrito attraverso l'*idrossilammina ossidoriduttasi* (HAO). Lo ione idrogeno viene rilasciato durante il processo causando un abbassamento del pH, e conseguente diminuzione dell'alcalinità. Il secondo step consiste nella trasformazione del nitrito in nitrato e viene definito *nitratazione*. I batteri responsabili di questo passaggio vengono definiti nitrito ossidanti (NOB) e appartengono al genere *Nitrobacter* :

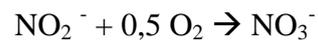


Figura 3. Batteri *Nitrobacter*.

Entrambi i processi richiedono ossigeno e devono quindi necessariamente avvenire in condizioni aerobiche; la concentrazione di ossigeno disciolto deve essere intorno a 1,0 mg/L e mai inferiore a 0,5 mg/L [4]. La massa batterica nitrificante è stimabile nel 10 % dell'azoto ossidato, ossia un consumo di 100 Kg di azoto identifica la presenza di 10 Kg di massa batterica [5]. Sia *Nitrosomonas* che *Nitrobacter* sono batteri chemio-autotrofi che utilizzano carbonato di calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e di potassio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) come fonte di carbonio e richiedono un ambiente neutro o parzialmente alcalino per portare a termine le reazioni.

A causa dell'abbassamento del pH, è necessario rifornire il sistema biologico di alcalinità: circa 1.98 moli di  $\text{HCO}_3^-$  sono consumati per mole di azoto ammoniacale, che è equivalente a 7.07 g di  $\text{CaCO}_3$  per grammo di  $\text{NH}_4^+$  [4]. Fornendo del bicarbonato si può riportare il pH a livelli compresi tra 7 e 8, consentendo ai batteri di mantenere un optimum di attività (figura sotto); come si può notare in figura, i batteri NOB sono più sensibili a pH alcalini rispetto agli AOB.

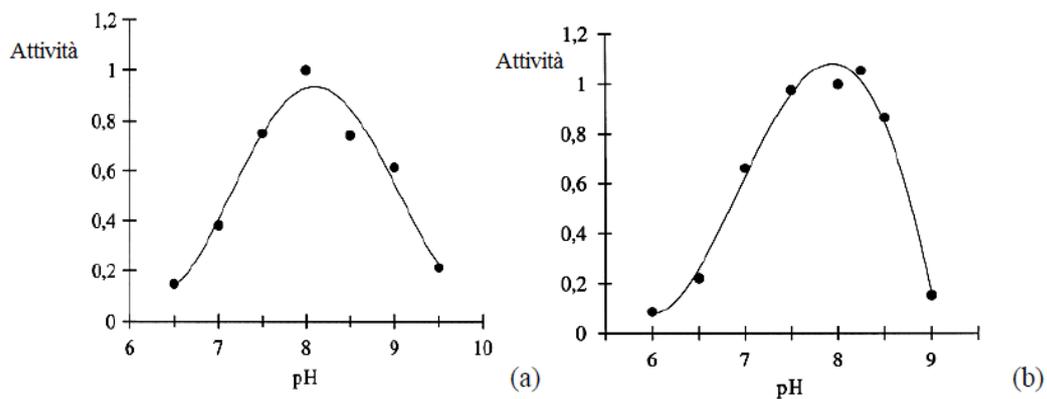


Figura 4: Influenza del pH sull'attività dei batteri *Nitrosomonas* (a) e *Nitrobacter* (b) (Grundhiz e Dalhmar, 2001).

La nitrificazione raggiunge un valore ottimale a temperature comprese tra 30° C e 35 ° C [6]; al di sopra o sotto di tali valori il processo risulta essere compromesso e il tasso di crescita dei microrganismi è estremamente ridotto. L'effetto della temperatura può essere osservato attraverso l'equazione di Arrhenius:

$$\mu_{m,A}(T) = \mu_{m,A}(20^\circ) \theta^{(T-20^\circ)}$$

dove  $\mu_{m,A}$  corrisponde al massimo tasso di crescita dei batteri a una determinata temperatura,  $\mu_{m,A}(20^\circ)$  è il tasso massimo di crescita a 20 °C e  $\theta$  è il coefficiente di temperatura. Sulla base di tale equazione risulta immediato definire a che temperatura i microrganismi possono raggiungere il picco di attività.

Il massimo dell'attività è a 35° C per *Nitrosomonas* e a 38° C per *Nitrobacter*.

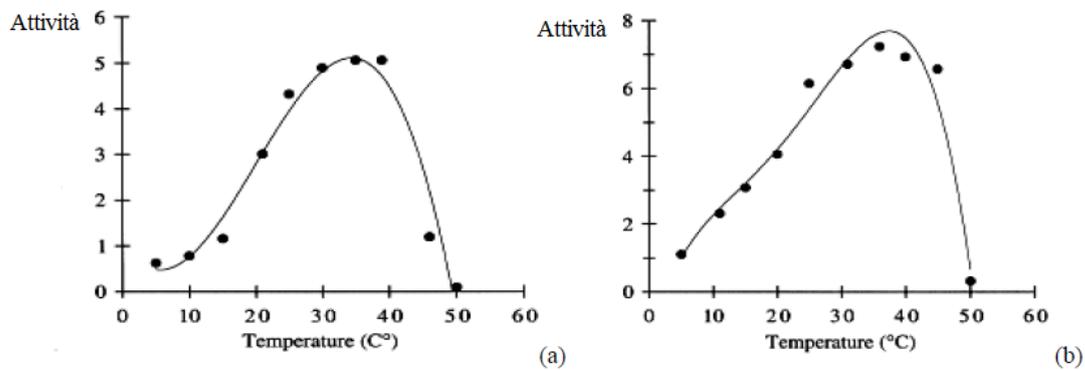


Figura 5: Influenza della temperatura sull'attività dei batteri *Nitrosomonas* (a) e *Nitrobacter* (b) (Grundhiz e Dalhmar, 2001).

### 1.4.2 Denitrificazione

La denitrificazione è il processo biologico di riduzione del nitrito e del nitrato ad azoto molecolare (N<sub>2</sub>) ad opera di batteri eterotrofi, principalmente gram-negativi alfa e beta appartenenti al phylum dei Proteobatteri, come *Bacillum*, *Pseudomonas* e *Spirillum*. Questo processo si svolge in condizioni anaerobiche, cioè in assenza di ossigeno libero, in modo tale che nitriti e nitrati possono sostituire l'ossigeno stesso come elettroni-accettori; la concentrazione di ossigeno deve rimanere al di sotto di 0,5 mg/L, idealmente sotto a 0,2 mg/L [6]. I batteri impiegano le sostanze organiche come fonte di carbonio, le quali provengono da attività umane o devono essere aggiunte in caso di impianti di trattamento ad alta potenzialità. La denitrificazione generalmente procede attraverso la combinazione di forme intermedie:



Il processo completo di denitrificazione può essere espresso come una reazione di ossidoriduzione:



Nella reazione entrano in gioco numerosi enzimi, comuni tra le diverse specie batteriche (figura sotto): la *nitrato reduttasi* (NaR) è collegata alla presenza di nitrato e alla sua concentrazione; la *nitrito reduttasi* (NiR) è coinvolta nel secondo step e si distingue in due tipologie, una include centri multipli contenenti rame e l'altra una emoproteina, il citocromo *cd1*; l'accumulo di ossido nitrico nei batteri è limitato perché particolarmente tossico, per cui non è confermata la formazione dell'ossido nitrico come intermedio di reazione. L'ultimo step di reazione è catalizzato dall'enzima *ossido di azoto reduttasi* (NoR), che è particolarmente sensibile alla presenza di ossigeno nel sistema, e dalla *protossido di azoto reduttasi* (NoS).

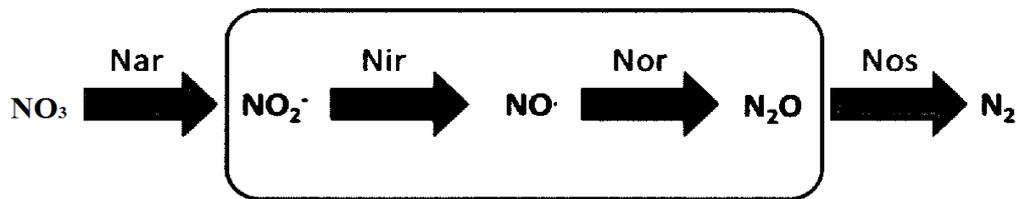


Figura 6. Enzimi coinvolti nel processo di denitrificazione.

La reazione di denitrificazione causa un aumento del pH il cui valore ottimale è compreso tra 7,0 e 8,5 [6]. La temperatura influisce sul tasso di crescita dei batteri denitrificanti, in particolare si hanno maggiori incrementi di biomassa batterica ad alte temperature. La correlazione tra i due fattori può essere descritta con l'equazione di Arrhenius. La denitrificazione può avvenire in un range di temperatura compresa tra i 5° C e i 30° C in funzione della tipologia di sostanza organica [7]. La massa batterica denitrificante è stimabile nel 50 % dell'azoto molecolare prodotto, ossia una produzione di 100 Kg di azoto identifica la presenza di 50 Kg di massa batterica [5].

#### ***1.4.3 Anaerobic AMMonium OXidation (ANAMMOX)***

L'importanza dei batteri Anammox è legata ai crescenti fenomeni di inquinamento delle acque causati da azoto e fosforo provenienti da attività sia industriali che agricole-zootecniche, come potenziale alternativa alla tradizionale combinazione nitro-denitro per la rimozione dell'azoto dai reflui [7]. Quest'ultima infatti risulta essere energeticamente ed economicamente dispendiosa da un lato per il fabbisogno di ossigeno dei batteri nitrificanti e, dall'altra per il fabbisogno di carbonio esogeno per i denitrificanti. Al contrario i batteri Anammox, essendo autotrofi, utilizzando come fonte di carbonio l'anidride carbonica [8], mentre il fabbisogno di ossigeno risulta essere estremamente più contenuto rispetto a quello dei nitrificanti, in quanto necessario per la parziale ossidazione dell'ammonio a nitrito dato che il restante ammonio viene

combinata con l'NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a dare azoto gassoso. Il processo Anammox, inoltre, comporta una bassa resa in biomassa e di conseguenza una minore produzione di fanghi rispetto ai convenzionali sistemi di denitrificazione [9]. Questo costituisce il terzo fattore di riduzione dei costi ed, insieme agli altri due, rende il processo Anammox estremamente vantaggioso dal punto di vista economico. A questi si aggiungono anche benefici per l'ambiente. Infatti i batteri Anammox consentono una riduzione delle emissioni di anidride carbonica rispetto ai convenzionali processi di nitrificazione-denitrificazione. Grazie al metabolismo autotrofo, la riduzione di questo importante gas serra si stima intorno al 90% [10]. La reazione ANAMMOX è stata scoperta negli anni '70 tramite degli studi termodinamici che ipotizzavano l'esistenza di una reazione anaerobica di ossidazione dell'ammonio, ma solo alla fine del ventesimo secolo alcune prove sperimentali, effettuate per mettere a punto nuove tecnologie di trattamento delle acque reflue, hanno permesso l'identificazione di nuove specie batteriche in grado di svolgere selettivamente questa reazione. Le prove successive hanno dimostrato come i batteri ANAMMOX sono responsabili nella rimozione del 24 – 67 % dell'azoto nei sedimenti marini, e almeno dal 20 al 40 % di azoto negli oceani [11]. Gli ammonio ossidanti anaerobici sono stati documentati oltre che in sedimenti marini, costieri e negli estuari, anche in basalti anossici, in zone a basso contenuto d'ossigeno, nei ghiacciai marini e nei laghi d'acqua dolce, a conferma della grande ubiquità e della possibilità di colonizzazione di qualsiasi ambiente anaerobico contenente azoto.

### ***1.5 I batteri ANAMMOX***

Il processo riguardante l'ossidazione dell'ammonio in condizioni anaerobiche fu ipotizzata per la prima volta da Broda nel 1977. Egli, infatti, sulla base di osservazioni termodinamiche, aveva proposto nuove vie attraverso cui i microrganismi riescono a vivere nell'ambiente. Dieci anni dopo nell'impianto pilota di denitrificazione della Gist Brocades Fermentation Company di Delf (Olanda), venne osservata la scomparsa dell'ammonio a spese del nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) seguita da un aumento di produzione di azoto

gassoso (N<sub>2</sub>). A questo processo venne dato il nome “Anammox” sulla base del metabolismo coinvolto: l’ossidazione anaerobica dell’ammonio [12]. Grazie ad approcci molecolari, solo nel 1995 fu possibile identificare il microrganismo responsabile di questa reazione. Il batterio, non coltivato in coltura pura ed appartenente all’ordine dei *Planctomycetales*, venne nominato “*Candidatus Brocadia anammoxidans*”. Negli anni successivi a questa scoperta numerosi studi vennero effettuati su campioni provenienti sia da impianti di trattamento di acque reflue sia da ambienti marini [13]. La presenza e l’attività di questi batteri è stata individuata in più di trenta ecosistemi acquatici diversi, marini e di acqua dolce, tra cui le coste della Namibia, in corrispondenza della zona di minima concentrazione di ossigeno (OMZ) [14], e del Golfo Dulce nell’Oceano Pacifico [15]. L’attività Anammox è stata inoltre rilevata in laghi [16], nei sedimenti delle regioni polari [17; 18], in corrispondenza di estuari ed in prossimità del Gullmarsfjorden, in Svezia [19].

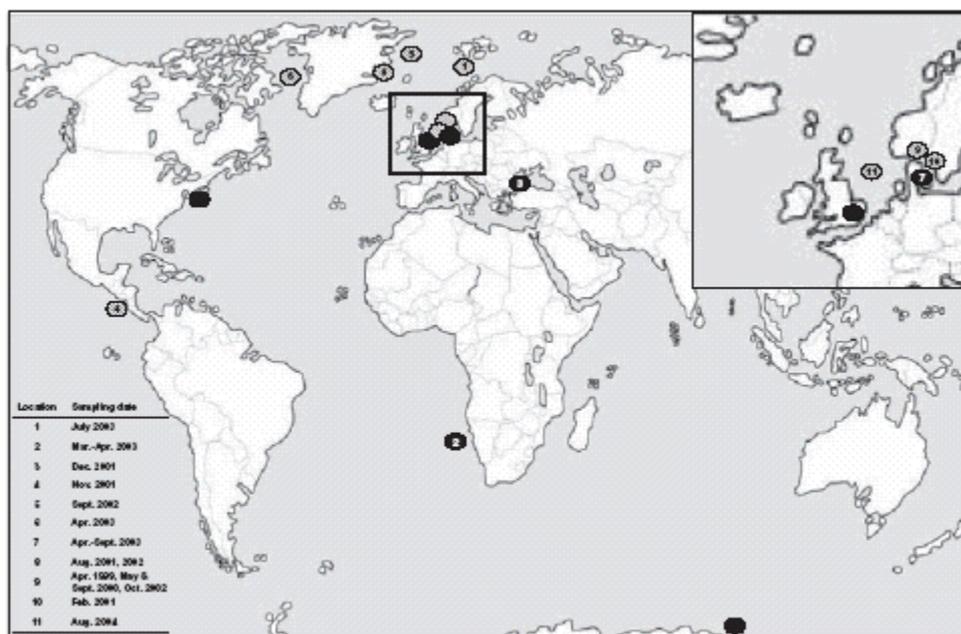


Figura 7: Mappa delle località marine dove sono stati individuati i batteri Anammox.

Prima della conferma dell’esistenza della reazione Anammox, si pensava che la rimozione dell’azoto dagli ambienti marini fosse causata principalmente dal processo di

denitrificazione. Oggi gli studi effettuati hanno rivisto questa teoria evidenziando il ruolo fondamentale assolto dagli Anammox nel ciclo dell'azoto a livello globale. Esempio è il caso del Mar Nero, il più grande bacino anossico del pianeta dove questi microrganismi contribuiscono fino al 50% della produzione totale di N<sub>2</sub> marino [19]. Per indagare la presenza dei batteri Anammox negli ambienti naturali, i metodi impiegati si basano sulla combinazione di tecniche microbiologiche e biogeochimiche: colture di arricchimento, profili dei nutrienti, misure di attività attraverso l'incubazione con <sup>15</sup>N, analisi dei lipidi ladderani e analisi delle sequenze del gene 16S rRNA con FISH e PCR mediante l'uso di primer specifici [13]. Per quanto riguarda l'aiuto che possono portare all'uomo i microrganismi in grado di svolgere una reazione di ossidazione dell'ammonio si dividono in due categorie: la prima, rappresentata dalla specie *Nitrosomonas eutropha*, ossida l'ammonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) via nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), il quale viene impiegato come accettore di elettroni in condizioni anossiche; la seconda categoria è rappresentata dai cosiddetti batteri ANAMMOX, facenti parte del phylum dei Planctomiceti e suddivisi in diversi generi e specie, scoperte sia in impianti di depurazione che in sistemi naturali.

Genere	Specie	Fonte
Brocadia	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i>	Impianti di depurazione
	<i>Candidatus Brocadia fulgida</i>	Impianti di depurazione
Kuenenia	<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	Impianti di depurazione
Scalindua	<i>Candidatus Scalindua brodae</i>	Impianti di depurazione
	<i>Candidatus Scalindua wagneri</i>	Impianti di depurazione
	<i>Candidatus Scalindua sorokinii</i>	Acqua di mare
	<i>Candidatus Scalindua arabica</i>	/
	<i>Candidatus Scalindua zhenghei I</i>	/
	<i>Candidatus Scalindua zhenghei II</i>	/
	<i>Candidatus Scalindua zhenghei III</i>	/
Altri	<i>Candidatus Jettenia asiatica</i>	/
	<i>Candidatus Anammoxoglobus propionicus</i>	Bioreattore pilota

Tabella 1. Generi e specie conosciuti dei batteri ANAMMOX

I batteri ANAMMOX sono batteri coccoidei con diametro inferiore a 1 µm, fisiologicamente distinti dagli altri Planctomiceti poiché sono anaerobici

chemiolitotrofi, e caratterizzati da un tasso di crescita molto lento (si stima che il tempo di raddoppiamento sia all'incirca di due settimane), dalla bassa produzione di biomassa e da una affinità relativamente alta per i substrati [20]. I primi batteri ANAMMOX sono stati isolati attraverso un processo di centrifugazione ad alto gradiente di densità che ha permesso di individuare una struttura fenotipica altamente caratteristica: il colore rosso, la presenza di crateri sulla superficie cellulare, una compartimentazione interna molto definita che comprende un organulo, l'“anammoxosoma”, la cui membrana citoplasmatica è costituita da lipidi denominati ladderani [21].

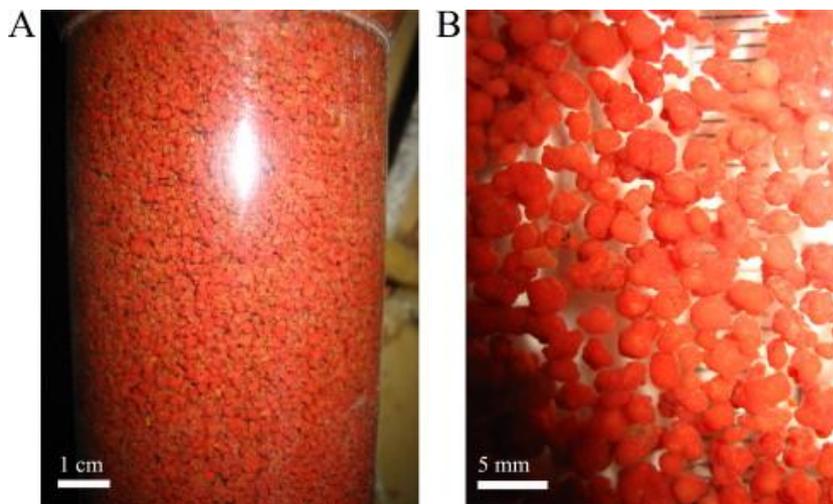


Figura 8. Batteri ANAMMOX

### ***1.5.1. La struttura cellulare***

La maggior parte dei Planctomiceti sono microrganismi aerobi chemio-eterotrofi. In molti casi la loro compartimentazione è complessa ma include sempre una membrana intra citoplasmatica che definisce un grande compartimento interno. A differenza di altri batteri gram-negativi la loro cellula non è sostenuta da una membrana esterna e una

interna rispetto alla parete cellulare, ma da due membrane interne che prendono il nome di citoplasmatica e intra citoplasmatica (figura sotto); quest'ultima presenta diverse caratteristiche a seconda del tipo di batterio: nei batteri ANAMMOX si presenta come doppia membrana e suddivide il citoplasma in pariploasma e riboplasma che contiene il nucleotide. Un'ulteriore membrana interna definisce l'anammoxosoma, dove avviene la reazione ANAMMOX.

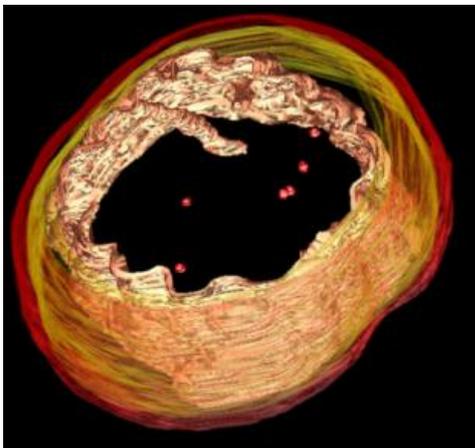
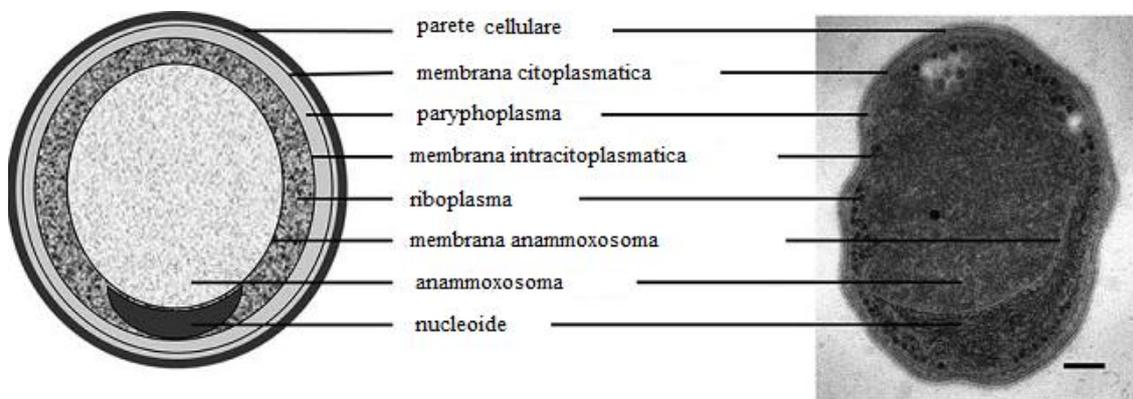


Figura 9. Struttura cellulare del batterio Anammox.

I batteri ANAMMOX possiedono un'abbondante varietà di membrane lipidiche, costituite da acidi grassi con esteri (tipici di batteri ed eucarioti) ed eteri (tipici degli Archea), e strutture anellari del tipo X e Y. Il primo è composto da tre frazioni di ciclo butano e una di cicloesano sostituita con una catena a otto carboni, dove l'ultimo è legato alla unità di glicerolo. Il secondo invece comprende cinque anelli di ciclo butano sostituiti da una catena a sette carboni che contiene un metil-estere come ultimo legame. Tutti gli anelli nei sistemi X e Y sono fusi in conformazione *cis*, assumendo le caratteristiche strutture a scala che prendono il nome di *ladderani* [21]. Queste sono presenti in natura solamente nei lipidi di membrana dei batteri ANAMMOX, a conferma dell'importanza funzionale di tali strutture, le quali permettono di isolare eventuali intermedi tossici.

### ***1.5.2. L'Anammoxosoma***

La reazione Anammox si svolge all'interno dell'anammoxosoma, un compartimento separato dal resto della cellula attraverso una membrana lipidica, con proprietà strutturali e funzionali uniche. Rispetto alle normali membrane, quella che avvolge l'anammoxosoma risulta essere molto più densa e meno permeabile, consentendo da un lato di mantenere un gradiente di concentrazione protonico durante il lento metabolismo e dall'altro di contenere gli intermedi tossici della reazione. In particolare limitare la diffusione di idrazina risulta essere fondamentale per i batteri Anammox poiché la perdita di una sola molecola determina una dispersione di energia pari a dieci cicli catabolici [22]. Le caratteristiche tipiche della membrana dell'anammoxosoma sono determinate dalla presenza dei ladderani. Questo particolare tipo di lipidi può contenere un numero variabile da tre a cinque anelli di ciclobutano concatenati tra loro mediante legami di tipo *cis*, con una sistemazione spaziale simile ad una scala [22]. Questi lipidi sono presenti in forme diverse come acidi grassi o come alcoli grassi uniti alla molecola di glicerolo mediante legami estere o etere. La presenza

di legami etere nella struttura lipidica risulta tipica degli archea, ed è stata rilevata solo in pochi gruppi batterici, tra i quali gli Anammox.

L'anammoxosoma possiede un ruolo di primaria importanza all'interno della cellula e svolge tre diverse funzioni: è un sito importante per il metabolismo cellulare, in particolare per il catabolismo, produce energia per la sintesi di ATP tramite il movimento dei protoni attraverso la membrana e protegge il batterio dalla diffusione dei protoni e dei composti tossici. Sulla superficie della membrana sono situati i due enzimi chiave per la reazione ANAMMOX: l'idrazina ossidasi e l'idrazina idrolasi; la tossica idrazina ( $N_2H_4$ ) è prodotta e contenuta all'interno dell'anammoxosoma mentre l'ammonio ( $NH_4^+$ ), l'idrossilammina ( $NH_2OH$ ) e il nitrito ( $NO_2^-$ ) vengono conservati nel riboplasma.

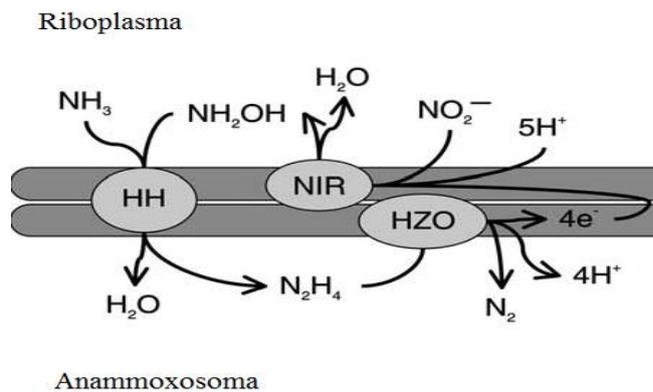


Figura 10. Biochimica della reazione ANAMMOX (HH: idrazina idrolasi; HZO: idrazina ossidasi; NIR: nitrito riduttasi) [23].

I protoni sono concentrati nell'organulo, in modo da creare un gradiente elettrochimico tra l'organulo stesso e il riboplasma; il gradiente viene sfruttato da una ATPasi/sintasi che può generare ATP per il metabolismo cellulare. Altro enzima di primaria

importanza è la *nitrito riduttasi*, che impiega elettroni e protoni per ridurre l' $\text{NO}_2^-$ . L'anammoxosoma è sempre attaccato al nucleoide e partecipa attivamente alla segregazione dei cromosomi durante la replicazione cellulare. Recentemente si è osservato la presenza di strutture tubulari che compattano l'organulo in una massa densa e ne permettono la dinamicità [24]. L'insieme di queste caratteristiche rende l'anammoxosoma un organulo multifunzionale in grado di dare molte risposte sull'evoluzione dell'organizzazione cellulare.

### 1.5.3. Il metabolismo Anammox

Nel processo ANAMMOX, l'ammonio è convertito in azoto molecolare ( $\text{N}_2$ ) attraverso la reazione con nitrito in rapporto stechiometrico 1:1,32:

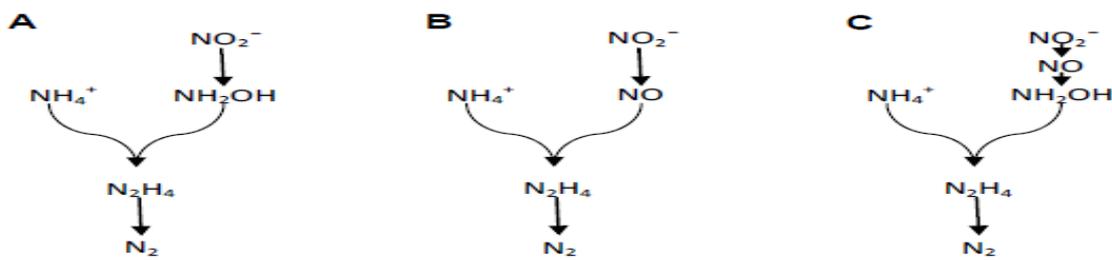
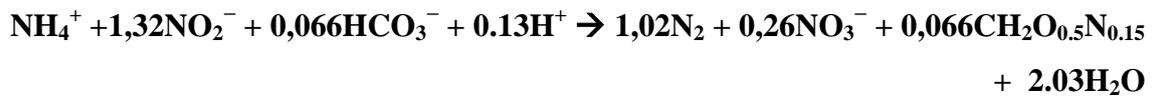


Figura 11. Tre diverse vie metaboliche della reazione ANAMMOX

Il prodotto principale della reazione è l'azoto molecolare, e non meno del 10 % dell'azoto ammoniacale viene convertito in  $N_2$ , mentre il nitrito funge da elettrone-accettore. Durante il processo intervengono alcuni intermedi di reazione variabili a seconda della specie batterica, come l'idrossilammina ( $NH_2OH$ ) oppure l'ossido nitrico ( $NO$ ), anche se il punto in comune resta la formazione di un intermedio azotato, l'idrazina ( $N_2H_4$ ). Essa si forma dall'ossidazione dell'ammonio con l'aiuto della *idrazina idrolasi*, enzima che insieme alla *idrazina ossidasi* permette la formazione del  $N_2$ . Si è recentemente scoperto che i batteri ANAMMOX sono in grado di ridurre il nitrato ( $NO_3^-$ ) ad ammonio attraverso l'impiego di acidi organici come elettrone-donatori [24]; in questo caso i microrganismi possono produrre il loro ammonio e nitrito per svolgere la reazione standard di ossidazione.

#### ***1.5.4. Fattori cinetici e inibenti***

Ci sono alcuni fattori che svolgono un ruolo fondamentale nel metabolismo dei batteri ANAMMOX e altri che possono avere effetti inibitori o addirittura tossici.

#### **Temperatura e pH**

Il processo ANAMMOX avviene per la maggior parte nelle profondità marine dove le temperature sono estremamente variabili [11]. Originariamente il processo è stato scoperto in condizioni di temperatura compresa tra i  $20^\circ C$  e i  $43^\circ C$ , ma si è recentemente osservato che l'attività dei microrganismi è possibile a temperature sia maggiori che minori: nei freddi sedimenti marini si sono scoperti batteri ANAMMOX in grado di sopravvivere a temperature vicine agli  $0^\circ C$ , con un optimum di attività vicina ai  $12^\circ C$  [25].

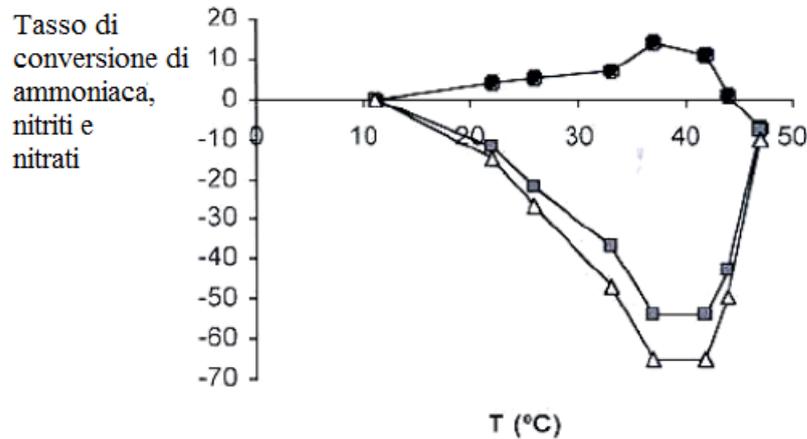


Figura 12. Influenza della temperatura nella produzione di nitrati (●) e rimozione di ammonio (■) e nitriti (▲) da parte dei batteri ANAMMOX [11].

Dalla figura 12 si può osservare come la conversione di ammonio e nitriti e la produzione di nitrati alle nostre latitudini raggiunga un picco intorno ai 37° - 40° C [11]. L'energia di attivazione del processo è un parametro importante che viene influenzato costantemente dalla temperatura; essa può essere stimata attraverso l'equazione di Arrhenius modificata è [26]:

$$SSA_T = SSA_{293} * e^{\frac{E_{act} * (293 - T)}{R * 293 * T}}$$

dove  $SSA_T$  è l'attività specifica ANAMMOX alla temperatura T,  $SSA_{293}$  è l'attività specifica ANAMMOX alla temperatura di 293° K,  $E_{act}$  è l'energia di attivazione del processo e R è la costante dei gas ideali. L'energia di attivazione, calcolata sulla temperatura media di 37° C, è di 70 kJ / mole.

Il pH può variare nell'intervallo di 6,7 – 8,5 con un valore ottimale di 8 [11]; da sottolineare che l'adattamento di questi batteri a condizioni differenti di pH è particolarmente veloce ed efficace. Dal grafico seguente (figura sotto) si può notare

come il picco nel tasso di conversione di ammonio e nitriti e la produzione di nitrati sia intorno a pH 8, a conferma della preferenza di tali batteri per gli ambienti parzialmente alcalini.

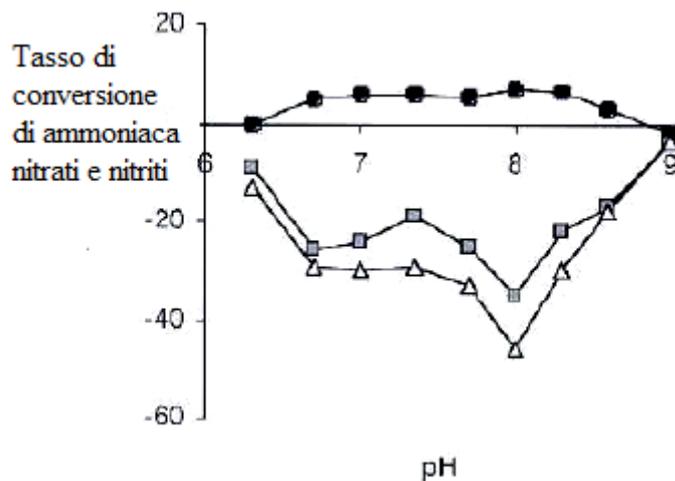


Figura 13. Influenza del pH nella produzione di nitrati (●) e rimozione di ammonio (■) e nitriti (▲) da parte dei batteri ANAMMOX [11].

### Ossigeno disciolto

L'attività ANAMMOX avviene in condizioni di anaerobiosi, di conseguenza la presenza di ossigeno può essere uno dei fattori di maggiore inibizione: il superamento di concentrazioni minime (0.01 mg/L), può portare rapidamente al decremento dell'attività [20]. Nonostante ciò è particolarmente interessante la capacità dei batteri di sostenere una pressione parziale di ossigeno inferiore di solo lo 0,5 % rispetto a quella dell'aria. Tuttavia, la reazione biologica di ossidazione dell'ammonio è irreversibilmente inibita da un'elevata quantità di ossigeno disciolto (> 18 % della saturazione dell'ossigeno).

## **Concentrazione di biomassa**

La concentrazione di biomassa svolge un ruolo fondamentale per l'attività ANAMMOX: i batteri sono attivi solamente quando la concentrazione delle cellule è maggiore di  $10^{10}$  ,  $10^{11}$  per ml, anche in colture purificate [27]. Questo può essere spiegato con la necessità di comunicazione tra le cellule per lo sviluppo, o con la possibilità di mantenere un livello di idrazina comune tra le cellule tale da permettere la completa ossidazione dell'ammonio. L'associazione di diverse cellule batteriche porta alla formazione dei caratteristici granuli: le dimensioni possono raggiungere da 1.0 a 4.5 mm, con cavità interne porose che permettono la diffusione dei substrati e dell'azoto gassoso prodotto. La velocità di sedimentazione dei granuli ANAMMOX maturi è elevata, a conferma della proprietà di creare strutture dense e compatte che facilitano l'accumulo di biomassa all'interno dei reattori. Particolarmente interessante è la stretta correlazione tra ammonio ossidanti e batteri ANAMMOX: la produzione e l'accumulo di idrossilammina e idrazina da parte degli ammonio ossidanti permette di riattivare il metabolismo dei batteri anaerobici in caso di perturbazione del sistema, garantendo all'intera comunità batterica di auto sostenersi e stabilizzarsi in caso di interferenze esterne.

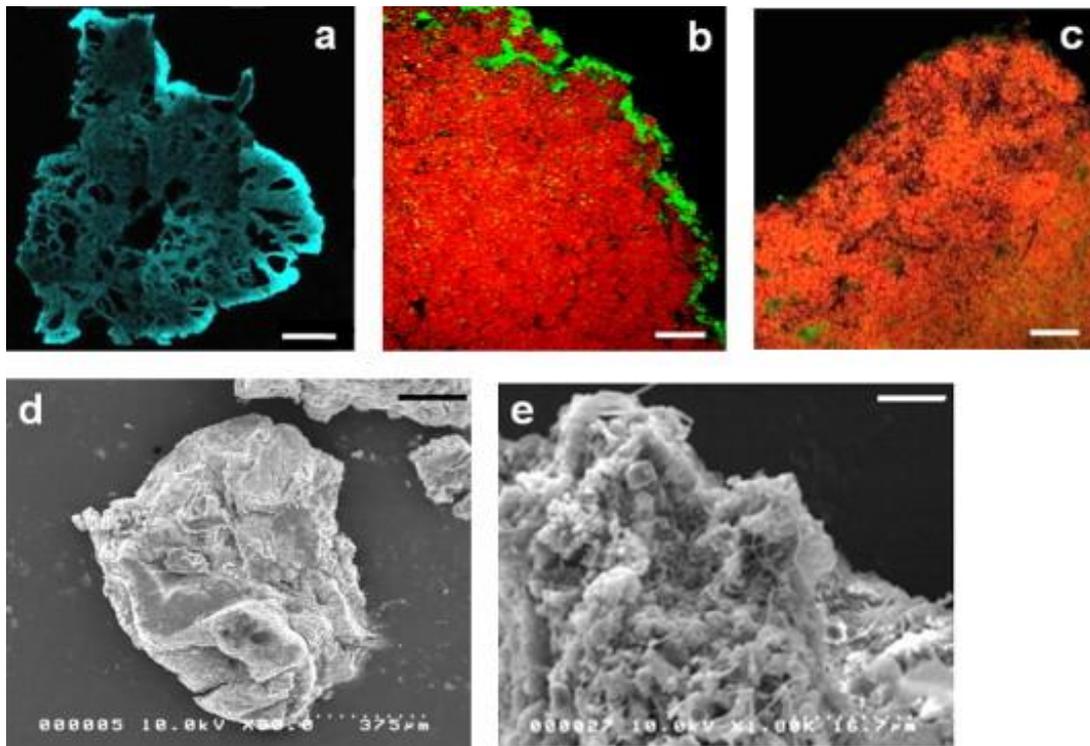


Figura 14. Scansione di fotografie al microscopio elettronico di un granello Anammox.

### **Substrati e prodotti**

Bisogna prestare particolare attenzione alla concentrazione di alcuni composti che si possono rivelare tossici o inibenti a concentrazioni relativamente basse; fanno parte di questi gli stessi substrati utilizzati nella reazione ANAMMOX: l'ammoniaca e il nitrito. Si distingue una concentrazione che determina il dimezzamento dell'attività e una concentrazione che porta al blocco totale dell'attività batterica. Bisogna prestare particolare attenzione al nitrito, il quale, se supera il valore soglia di 40 mg/L può portare a una decrescita dell'attività fino alla completa inibizione nel giro di pochi giorni [28]. Il ritorno a regime è possibile grazie all'aggiunta degli intermedi idrossilammina e idrazina che permettono lo smaltimento dei nitriti in eccesso. Il metanolo porta all'inibizione dell'attività a causa della probabile formazione di

formaldeide da parte dell'enzima *idrossilammina ossidoriduttasi*, presente all'interno dell'anammoxosoma.

Substrati e prodotti	Inibizione del 50 % dell'attività batterica (mg/L)	Inibizione totale dell'attività batterica (mg/L)
Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	> 50	> 100
Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	> 630	/
<b>Altri composti</b>		
Fosfati	> 55	/
Solfati	> 9.6	/
Ossigeno (O <sub>2</sub> )	/	> 0.4
Metanolo (CH <sub>3</sub> OH)	/	> 15

Tabella 2. Substrati e altri prodotti che possono causare l'abbattimento dell'attività batterica

### ***1.6. Tecnologie per l'abbattimento dell'azoto***

Con l'arrivo della Direttiva Nitrarti 91/676 si è messo in evidenza quali sono le grosse problematiche ambientali che possono portare ad un forte inquinamento dato dalle sostanze azotate; esistono oggi più sistemi per eliminare o abbassare la concentrazione di queste sostanze, aventi un principio di funzionamento differente a seconda del quantitativo di azoto da abbattere e della tipologia di refluo da trattare; si possono dividere in processi fisici, chimici o biologici.

- Processi fisici:
- filtrazione a membrane;
  - grigliatura, dissabbiatura, flottazione, sedimentazione;
  - separazione solido-liquido;
- processi fisico-termici:
- strippaggio dell'ammoniaca;
  - disidratazione, essiccazione;
- processi biologici:
- nitrificazione-denitrificazione convenzionale;
  - deammonificazione (**ANAMMOX**);
  - fitodepurazione

### ***1.6.1. Processo NITRO-DENITRO***

Nel caso in cui le eccedenze azotate delle aziende agricole siano rilevanti è possibile applicare trattamenti spinti basati sulla rimozione biologica dell'azoto. Questo risultato viene ottenuto mediante una serie di reazioni che conducono dapprima all'ossidazione dell'ammoniaca a nitrato e, in un secondo tempo, alla riduzione di questo ad azoto molecolare, gas inerte che costituisce circa l'80% dell'atmosfera terrestre. Questa modalità risulta fortemente affermata nel settore civile per il trattamento sia degli scarichi urbani che industriali dove gli impianti moderni rimuovono, oltre all'azoto, anche carbonio e fosforo in tre fasi principali: 1) trattamenti primari per la separazione fisica del materiale grossolano sospeso attraverso operazioni quali grigliatura, triturazione, disabbigliamento, disoleatura e sedimentazione primaria; 2) trattamenti secondari per l'ossidazione del carbonio, la rimozione di azoto e fosforo; 3) trattamenti terziari per l'eliminazione, per via chimico-fisica, dei solidi sospesi generatisi nella fase precedente. Nel settore agro-zootecnico la possibilità di adottare la rimozione biologica dell'azoto, per la gestione delle eccedenze, risulta idonea per le aziende che non trovano altre soluzioni. In particolare il processo si suddivide in due fasi: una aerobica ed una anaerobica. Nella prima, quella aerobica, si svolge la nitrificazione ovvero l'ossidazione biologica dei composti inorganici ridotti dell'azoto (ammonio,  $\text{NH}_4^+$ , e nitrito,  $\text{NO}_2^-$ ) che porta alla formazione di nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ). La nitrificazione avviene ad opera di batteri autotrofi chemiolitotrofi per i quali la fonte di carbonio è costituita da carbonio inorganico  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  e l'energia per la crescita viene tratta dall'ossidazione dell' $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$  e del  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ . La nitrificazione si svolge quindi in due steps descritti nelle seguenti equazioni [29]:

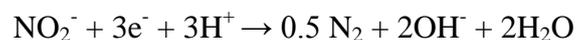


I batteri ammonio-ossidanti appartengono ai generi *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* e *Nitrosolobus* mentre i nitrito-ossidanti sono classificati nei generi *Nitrobacter*, *Nitrospina* e *Nitrococcus* [30]. *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* risultano i più importanti per gli impianti di trattamento mentre gli altri sono tipici microrganismi del suolo. I batteri *Nitrosomonas* hanno dei tempi di generazione pari a 8-36 ore con un numero di cellule prodotte per  $\mu\text{g}$  di azoto ossidato di  $3-12 \cdot 10^4$ . Questi inoltre si caratterizzano per avere oltre ad un' aerobiosi stretta, un' autotrofia obbligata. I *Nitrobacter* invece impiegano dalle 15 alle 58 ore per duplicarsi con un numero di cellule prodotte per  $\mu\text{g}$  di azoto ossidato pari a  $1-4 \cdot 10^4$ . Anch'essi risultano aerobi stretti ed autotrofi obbligati anche se alcuni ceppi sono facoltativi.

Nella fase anaerobica si verifica invece il processo di denitrificazione che permette la rimozione dell'azoto presente in soluzione sotto forma di  $\text{NO}_3^-$  (e in parte di  $\text{NO}_2^-$ ) ad opera di batteri eterotrofi facoltativi denitrificanti che sono in grado di convertire queste sostanze ad azoto gassoso, che si libera in atmosfera. Durante questo processo è necessaria la presenza di un substrato carbonioso organico che funge da donatore di elettroni. L'azoto dell' $\text{NO}_3^-$  è in grado infatti di accettare due elettroni dal substrato organico che li cede con il risultato di produrre  $\text{NO}_2^-$  secondo il seguente schema stechiometrico:



Sempre attingendo dalla medesima fonte di carbonio, i nitriti a loro volta vengono ridotti a dare azoto molecolare attraverso la seguente equazione [29].



Il processo sopra descritto risulta essere una riduzione dissimilativa che va distinta da quella assimilativa dove l'azoto nitrico viene dapprima ridotto ad ammoniacale e successivamente organicato per la sintesi di nuova biomassa. L'attività dei batteri denitrificanti è quindi fortemente influenzata dalla sostanza organica che funge da

donatore di elettroni per la riduzione dei nitrati. Questa può essere costituita sia dal liquame stesso sia da composti organici quali il saccarosio, glucosio o metanolo. [30]. Quest'ultimo, a causa del basso costo, risulta largamente utilizzato negli impianti di denitrificazione. Rispetto ai batteri nitrificanti che sono rappresentati principalmente da due soli ceppi batterici, i denitrificanti sono *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Archromobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes* [30] che sono in grado di attuare una conversione completa dei nitrati a N<sub>2</sub>. Altri batteri, invece, quali *Aerobacter*, *Proteus*, *Flavobacterium*, compiono solo il primo stadio della denitrificazione convertendo NO<sub>3</sub>- a NO<sub>2</sub>- (equazione 4). Per quanto riguarda gli impianti esistono due soluzioni possibili. La prima, la più semplificata, è costituita da reattori SBR (Sequencing Batch Reactors) dove in un'unica vasca, grazie ad un'alternanza di ossigenazione e di anaerobiosi, vengono effettuate le due fasi del processo [3]. La soluzione più articolata prevede un separatore di solidi grossolani in testa all'impianto ed una fase di sedimentazione dell'effluente in modo da consentire un ricircolo dei fanghi con il conseguente aumento della loro concentrazione nella vasche di trattamento. La separazione delle due fasi, nitrificazione e denitrificazione, in due vasche differenti consente di ottenere efficienze di rimozione più elevate a fronte di una maggiore complessità sia dell'impianto che della gestione operativa [2]. Mediante l'attività biologica è possibile raggiungere rendimenti di rimozione dell'azoto pari al 70-80% e grazie alla degradazione della sostanza organica si verifica inoltre una forte riduzione di odori [2]. Nonostante questa tecnologia consenta di ridurre l'azoto senza doverlo ulteriormente gestire, i costi d'investimento e di gestione rendono questi impianti molto onerosi. I consumi energetici risultano elevati e collegati soprattutto alla necessità di aereazione nella vasca di nitrificazione (richiesta di ossigeno: 0.9 kg O<sub>2</sub>/kg di BOD rimosso e 4.6 kg O<sub>2</sub>/kg N ammoniacale ossidato). La scelta di questa tecnologia deve essere quindi valutata in modo accurato e con un supporto tecnico qualificato.

Nei sistemi separati l'ossidazione della sostanza organica, la nitrificazione e la denitrificazione, vengono condotte in stadi distinti (eventualmente i processi aerobici di ossidazione della sostanza organica e di nitrificazione possono avvenire in un unico

reattore), ciascuno dotato di una unità biologica e di un sedimentatore con relativo sistema di ricircolo del fango. La biomassa che opera la denitrificazione si trova quindi sempre nelle stesse condizioni ambientali.

Nei sistemi combinati, invece, la biomassa si trova esposta alternativamente a condizioni aerobiche e anossiche, durante le quali si svolgono sequenzialmente le varie fasi di ossidazione della sostanza organica, di nitrificazione e di denitrificazione. Il dimensionamento è pertanto relativamente semplice in quanto ogni stadio opera in modo sostanzialmente indipendente. A livello impiantistico, i sistemi combinati costituiscono una sola unità biologica, conformata e parzializzata a seconda delle diverse necessità e seguita da un'unità di sedimentazione finale.

Fra i due sistemi, separato e combinato, il secondo è sicuramente più economico sia per i costi di costruzione che per i costi di gestione.

### ***1.6.2. La Deamminificazione (ANAMMOX)***

L'importanza dei batteri Anammox è legata ai crescenti fenomeni di inquinamento delle acque causati da azoto e fosforo provenienti da attività sia industriali che agricole-zootecniche, come potenziale alternativa alla tradizionale combinazione nitro-denitro per la rimozione dell'azoto dai reflui [31]. Quest'ultima infatti risulta essere energeticamente ed economicamente dispendiosa da un lato per il fabbisogno di ossigeno dei batteri nitrificanti e, dall'altra per il fabbisogno di carbonio esogeno per i denitrificanti. Al contrario i batteri Anammox, essendo autotrofi, utilizzando come fonte di carbonio l'anidride carbonica [32], mentre il fabbisogno di ossigeno risulta essere estremamente più contenuto rispetto a quello dei nitrificanti, in quanto necessario per la parziale ossidazione dell'ammonio a nitrito dato che il restante ammonio viene combinata con l' $\text{NO}_2^-$  a dare azoto gassoso.

Il processo Anammox, inoltre, comporta una bassa resa in biomassa e di conseguenza una minore produzione di fanghi rispetto ai convenzionali sistemi di denitrificazione [9]. Questo costituisce il terzo fattore di riduzione dei costi ed, insieme agli altri due, rende il processo Anammox estremamente vantaggioso dal punto di vista economico. A questi si aggiungono anche benefici per l'ambiente. Infatti i batteri Anammox consentono una riduzione delle emissioni di anidride carbonica rispetto ai convenzionali processi di nitrificazione-denitrificazione. Grazie al metabolismo autotrofo, la riduzione di questo importante gas serra si stima intorno al 90% [10]. Il processo Anammox non è però privo di svantaggi. I lunghi tempi di duplicazione dei batteri intorno agli 11 giorni, e la bassa resa in biomassa determinano un allungamento dei tempi di start-up degli impianti. A questo si aggiunge l'instabilità dei bioreattori Anammox causati dagli effetti inibenti di alcuni substrati [33]. Acetilene, fosfati ed ossigeno risultano essere forti inibitori della reazione [34]. I batteri Anammox possono tollerare concentrazioni di fosfati pari a 1mM mentre per valori al di sopra di questa soglia si assiste ad una perdita di attività [34]. Ossigeno e nitrito sono altrettanto inibenti. Concentrazioni di O<sub>2</sub> pari a 2μM e di nitrito tra 5 e 10 mM inibiscono i batteri Anammox ma in maniera reversibile [35]. Metanolo ed etanolo, invece, determinano una drastica perdita di attività per concentrazioni inferiori a 1 mM [36, 37]. Probabilmente elevate concentrazioni di ammoniaca possono anch'esse influenzare negativamente i batteri Anammox [38]. Glucosio, formiato, alanine ed acetato, invece, non hanno effetti sulla reazione, a differenza del propionato [39, 40]. Quest'ultimo viene utilizzato come fonte di energia per la riduzione del nitrato a nitrito [36; 37; 40].

Nome Processo	Numero di reattori	Fonte di Nitrito	Nome alternativo del processo
Due reattori Nitrosazione - ANAMMOX	2	Ammonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) Nitrosazione	SHARON - ANAMMOX
			OLAND a due stadi
			Deammonificazione a due stadi
Due reattori Denitrificazione - ANAMMOX	2	Nitrati (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) Denitrificazione	DEAMMOX
			Denammox
Un reattore Nitrosazione - ANAMMOX	1	Ammonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) Nitrosazione	Deammonificazione aerobica
			OLAND
			CANON
			Deammonificazione anaerobica
			SNAP
			DEMON
			DIB
Un reattore Nitrosazione - ANAMMOX - Denitrificazione	1	Ammonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) Nitrosazione	SNAD

Tabella 3. Tipologie di processi ANAMMOX

E' stata osservata, infatti, la capacità dei batteri Anammox di compiere questa reazione anche se il meccanismo rimane non del tutto chiaro. E' noto però che l'ossidazione del propionato avviene contemporaneamente a quella dell'ammonio [40]. Per quanto riguarda le altre caratteristiche fisiologiche, quali i fabbisogni termici, i batteri Anammox sono attivi ad una temperatura compresa tra i 10 e i 40°C [41] anche se le migliori performance sono state osservate tra i 35-40°C [42]. Il pH ottimale, invece, per l'ossidazione anaerobica dell'ammonio è circa 8. In realtà i valori ottimali di pH possono variare tra le diverse specie Anammox: "*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*", infatti, possiede il proprio optimum a pH 9 [3].

### 1.6.2.1. Sistemi a singolo reattore

In questa tipologia impiantistica viene sfruttata l'abilità dei batteri Nitrosomonas e ANAMMOX di crescere all'interno dello stesso biofilm, i primi all'esterno della membrana, i secondi all'interno; in questo modo l'ossigeno, che inibisce l'attività di ossidazione anaerobica, rimane all'esterno del biofilm e può essere impiegato dai batteri aerobi.

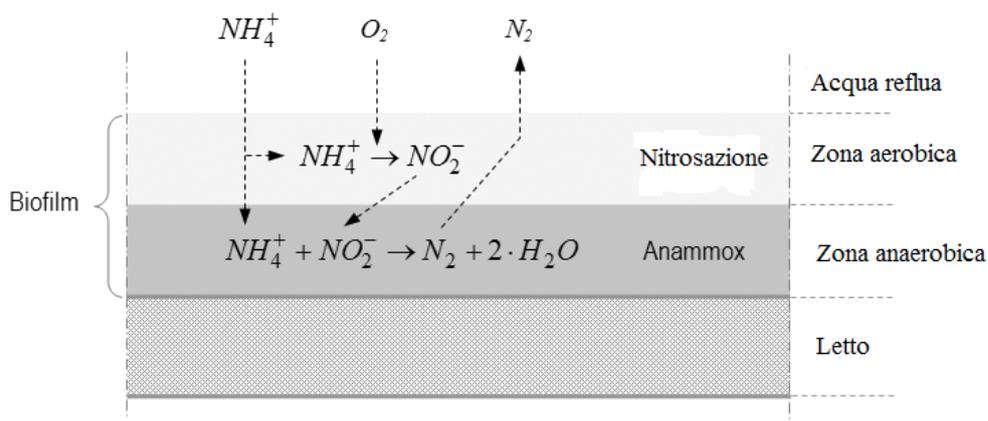


Figura 15. Schema di sistema a singolo reattore [11].



Figura 16. Impianto a singolo reattore (SBR).

Lo scambio dei prodotti e dei substrati avviene tramite diffusione nella membrana tra i due strati, e talvolta può essere limitante per lo sviluppo dei microrganismi: finché la concentrazione dell'ammonio all'esterno del biofilm è più alta della concentrazione dell'ossigeno e del nitrito, il processo non è limitato, ma un eventuale cambiamento dell'equilibrio comporta uno scoppio dell'intero sistema. La simultanea convivenza di nitrosazione e processo ANAMMOX permette la quasi completa rimozione dell'azoto in un singolo reattore.

#### CANON (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite)

Una quantità appropriata di ammonio e ossigeno disciolto permettono l'attivazione sia di batteri aerobici (AOB : aerobic ammonia-oxidizing bacteria) che anaerobici, i quali possono raggiungere un equilibrio tramite il consumo di ossigeno e l'uso del nitrito come elettrone-accettore. Le caratteristiche del processo CANON permettono il suo impiego in sistemi SBR (Sequencing **B**atch **R**eactor) e gas-lift [33].

### DEMON (DEamMONification)

Il processo combina la parziale nitrificazione e la deammonificazione in un unico reattore, dove si alternano condizioni aerobiche e anaerobiche in modo tale da nitrificare parzialmente l'ammonio durante la prima fase, e successivamente ossidarlo completamente ad azoto molecolare nella seconda fase attraverso la reazione ANAMMOX:

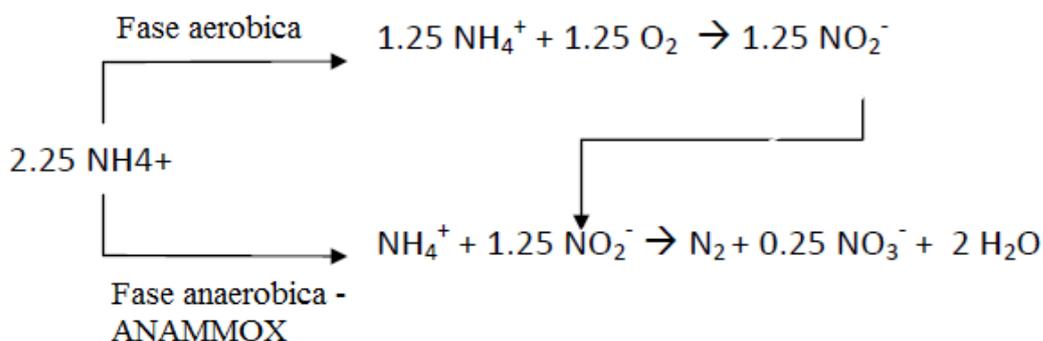


Figura 17. Reazioni coinvolte nel processo DEMON

Teoricamente la presenza di ossigeno, richiesto per la parziale nitrificazione, inibisce la crescita dei batteri ANAMMOX, ma come visto in precedenza si viene a creare una situazione tale per cui i batteri nitrificanti si trovano separati dagli ammonio ossidanti anaerobici, creando una zona aerobica e una anaerobica. L'immissione alternata di ossigeno nel sistema favorisce la crescita sia di una che dell'altra comunità microbiologica.



Figura 18. Le reazioni coinvolte nel processo DEMON.



Figura 19. L'impianto DEMON di Strass (Austria)

Nella maggior parte dei casi il processo DEMON viene attivato in una vasca SBR, *sequencing batch reactor*, sistema di trattamento a flusso discontinuo in grado di incorporare le diverse fasi di trattamento in un unico bacino; questo impianto non si sviluppa nello spazio come i sistemi a fanghi attivi tradizionali, in cui il flusso da trattare passa da una vasca alla successiva, ma è orientato nel tempo permettendo variazioni del flusso in ingresso e in uscita, e del volume della vasca a seconda delle diverse strategie operative. La grande flessibilità di questi reattore consente di soddisfare numerose esigenze: è infatti in grado di operare a regime intensivo, con elevati carichi in ingresso di COD, *chemical oxygen demand*, e BOD, *biological oxygen demand*, o a regime minimo presentando una notevole resistenza agli shock dovuti agli improvvisi innalzamenti del carico organico durante la fase di alimentazione. L'applicazione di tale tecnologia impiantistica alla reazione ANAMMOX è particolarmente efficiente grazie alla semplicità di gestione, l'omogeneità della miscela nel reattore, la stabilità e l'affidabilità per un lungo periodo, la possibilità di gestire periodicamente carichi di biomassa elevati e l'elevata efficienza di conversione dell'azoto. Le condizioni all'interno della vasca devono essere tali da consentire la convivenza di batteri aerobici ammonio ossidanti e batteri anaerobici attraverso il controllo costante di numerosi parametri chimico – fisici. Questo tipo di tecnologia è particolarmente adatta all'applicazione su scala globale, come confermano i nove impianti europei in funzione: a Strass (Austria), vengono trattati i reflui di 200 mila persone equivalenti con un impianto SBR da 500 m<sup>3</sup>; a Zurigo (Svizzera) un reattore da 1400 m<sup>3</sup> è in grado di trattare fino a 0,5 Kg di azoto per m<sup>3</sup> al giorno con un abbattimento del 90 % dell'azoto ammoniacale.

#### SNAD (Simultaneous partial Nitrification ANAMMOX Denitrification)

L'adozione simultanea di nitrificazione, ANAMMOX e denitrificazione in un singolo reattore viene definita SNAD (Simultaneous partial Nitrification ANAMMOX Denitrification) e risponde alla necessità di abbattere l'elevata quantità di materiale

organico (espresso sottoforma di COD) presente in alcuni reflui animali [43]. La nitrosazione permette l'ossidazione dell'ammonio a nitrito, il quale viene impiegato nella reazione ANAMMOX, mentre la denitrificazione impiega il carbonio organico come elettrone-donatore per ridurre il nitrato ad azoto molecolare trasformandolo in anidride carbonica. Tale sistema si basa sulla convivenza di batteri nitrificanti, ammonio ossidanti anaerobici e denitrificanti anaerobici.

#### **1.6.2.2. Sistemi a due stadi**

La caratteristica principale dei sistemi a due reattori è che l'ammonio è parzialmente ossidato a nitrito nel primo stadio, e successivamente il nitrito reagisce con l'ammonio rimanente nello stadio ANAMMOX. La ripartizione dei due composti al termine del primo stadio è del 50%, ma può essere variata modificando alcuni fattori come la temperatura, il pH e l'ossigeno disciolto. Fa parte di questa tipologia impiantistica uno dei due sistemi trattati in questo lavoro.

#### SHARON-ANAMMOX: (Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite)

Questo processo identifica una soluzione impiantistica che si distingue da altre tipologie di trattamento biologico per la totale assenza di ritenzione dei fanghi. Le alte temperature, tra i 30 e i 40° C, e i tempi di ritenzione idraulici (HRT), estremamente limitati favoriscono lo sviluppo dei batteri nitrosanti (AOB) come *Nitrosomonas*, a scapito dei batteri nitratanti (NOB), come *Nitrobacter*, che vengono lavati via (*wash out*), e permettono di ossidare circa metà dell'ammonio in ingresso attraverso una reazione di parziale nitrificazione, la nitrosazione. L'eventuale discesa della temperatura al di sotto dei 24 °C causa una diminuzione del tasso di crescita dei batteri AOB, favorendo i nitrito ossidanti, e la conseguente trasformazione dell'intero ammonio a

nitrito [44]. Un altro fattore importante per il bilanciamento delle reazioni è il bicarbonato contenuto nel fango di alimentazione: esso funge da sistema tampone, ossia annulla l'influenza degli ioni  $H^+$  prodotti dall'ossidazione dell'ammonio, i quali fanno decrescere il pH e limitano la reazione di nitrosazione. Variando il tempo di ritenzione idraulico (HRT) è possibile favorire o meno l'ossidazione dell'ammonio da parte dei batteri nitrosanti e la permanenza del nitrito in soluzione, attraverso l'eliminazione dei batteri nitratanti: i primi hanno un tempo di duplicazione minimo di 7 – 8 ore mentre i secondi possono raggiungere dalle 10 alle 13 ore [45]; il controllo contemporaneo di questo fattore, del pH, della temperatura e dell'ossigeno insufflato permette di creare un rapporto vicino a 1:1 tra ammonio e nitrito, fondamentale per far avvenire la successiva ossidazione anaerobica dell'ammonio.

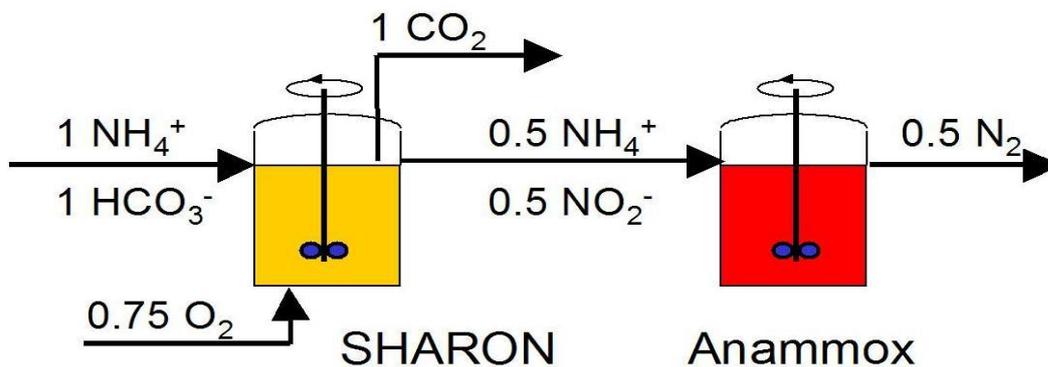


Figura 20. Funzionamento di un processo SHARON-ANAMMOX

La seconda parte del processo consiste nella vera e propria reazione ANAMMOX, dove l'ammonio viene completamente ossidato ad azoto molecolare e una piccola frazione di nitrito, in condizioni anaerobiche e sfruttando il nitrito come elettrone-accettore.

### OLAND ( Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification )

Il processo si basa sulla interazione tra batteri nitrificanti autotrofi e batteri denitrificanti eterotrofi: l'elevata produzione di nitrato a fine processo, pari al 11 % dei prodotti, può essere abbattuta dall'impiego di microrganismi NOB in grado di abbattere l'azoto nitrico grazie all'impiego di un quantitativo limitato di sostanza organica [46]. Il trattamento di grandi volumi richiede l'impiego di tecnologie quali CSTR (reattore completamente miscelato) e MBR (membrane bioreactors), dove il volume del bioreattore è minore grazie alla maggiore concentrazione della biomassa. Questa soluzione è particolarmente diffusa per il trattamento del digestato da processi anaerobici: è tutt'ora in funzione l'impianto di Sluisjesdijk (Olanda) che raccoglie i fanghi provenienti dalle città di Rotterdam e Utrecht.



Figura 21. Impianto SHARON –ANAMMOX di Sluisjedijk (Rotterdam, NL)



Figura 22. Impianto SHARON-ANAMMOX di Villaganzerla (VI)

#### DEAMOX (DENitrifying AMmonium OXidation )

Nuovo processo che fa avvenire l'ossidazione anaerobica dell'ammonio in condizioni denitrificanti, con lo zolfo che viene impiegato come elettrone-donatore per la trasformazione del nitrato a nitrito. L'inizio avviene in un reattore anaerobico e permette di mineralizzare l'azoto organico, il quale viene successivamente inviato a un altro reattore dove avviene il mescolamento con nitrato e zolfo, in modo tale da produrre nitrito e far avvenire la reazione ANAMMOX [47].

#### **1.6.2.3. Tipologie di Alimento Utilizzabili**

La versatilità del processo ANAMMOX consente di impiegare diverse tipologie di alimento, aventi caratteristiche differenti e carichi azotati variabili. Le acque reflue sono state le prime candidate all'applicazione di questa tecnologia: la bassa concentrazione di sostanza organica e un rapporto equilibrato tra azoto ammoniacale e alcalinità permettono l'impiego nel processo a due stadi SHARON – ANAMMOX e in altri trattamenti a grande scala, i quali coinvolgono le acque reflue di numerosi distretti

cittadini e industriali. L'applicazione più interessante però riguarda i fanghi liquidi provenienti dall'attività di digestione anaerobica degli scarti e reflui zootecnici [48]: questa tipologia di alimento è caratterizzata da un elevato carico di azoto ( 500 – 2000 mg/L  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ) dovuta alla precedente degradazione delle proteine, e da un carico organico importante (800 – 1600 mg/L COD), solitamente non biodegradabile, che favorisce lo sviluppo degli ammonio ossidanti anaerobici a scapito dei denitrificanti. Ne consegue che l'utilizzo diretto dei reflui zootecnici può essere possibile solo in situazioni particolari nelle quali il carico organico non sia eccessivo: l'eventuale surplus favorisce lo sviluppo dei batteri denitrificanti a scapito degli ANAMMOX.



Figura 23. Fango digerito utilizzato e studiato in questo lavoro.

Altre soluzioni interessanti riguardano il trattamento di acque reflue ricche di sostanze chimiche tossiche, come fenoli, cianuro e tiocianati, e acque provenienti dalla produzione di additivi come il glutammato monosodico: l'estremizzazione dei parametri ( COD: 1500 – 60000 mg/L,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  : 2000 – 15000 mg/L) consente di mettere a dura

prova il metabolismo dei batteri ANAMMOX. Il trattamento di tali reflui riguarda solamente processi secondari nei quali la concentrazione delle sostanze chimiche è stata parzialmente abbattuta attraverso filtri e resine.

#### 1.6.2.4. Valutazioni Tecniche per la Deammonificazione

##### Aspetti Gestionali

Le tecnologie di deammonificazione permettono un abbattimento considerevole dell'azoto ammoniacale in ingresso e una riduzione altrettanto importante dell'ossigeno e della sostanza organica necessaria alla reazione, rispetto ai tradizionali processi di nitrificazione – denitrificazione. In tabella 1.4 vengono confrontati richieste di ossigeno e sostanza organica con potenziale di abbattimento di azoto per le diverse tecnologie:

Processo	Ossigeno necessario	Sostanza organica (COD) necessaria	Potenziale Abbattimento di Azoto %
Nitrificazione	4.57 gO <sub>2</sub> / gN	-	-
Denitrificazione	-	4.0 gCOD / gN	-
Nitrificazione + Denitrificazione	4.57 gO <sub>2</sub> / gN	4.0 gCOD / gN	50 - 80
Nitrosazione	3.43 gO <sub>2</sub> / gN	-	-
ANAMMOX	-	-	80 - 90
Nitrosazione (SHARON) + ANAMMOX	1.72 gO <sub>2</sub> / gN	-	83 - 90
CANON	1.94 gO <sub>2</sub> / gN	-	36 - 92

Tabella 4. Richieste di ossigeno, sostanza organica e potenziale abbattimento dell'azoto per varie tipologie di processi

L'accoppiamento della sola reazione di nitrosazione con la reazione ANAMMOX consente di utilizzare l'ossigeno solo nella prima fase, che si traduce in un risparmio economico notevole: si stima che la riduzione di ossigeno necessario possa raggiungere

il 60 % in meno rispetto ai tradizionali processi di abbattimento dell'azoto [49]. Inoltre la presenza di soli batteri autotrofi permette di evitare l'aggiunta di fonti esterne di carbonio che causerebbero un incremento delle emissioni di anidride carbonica e un volume da trattare estremamente maggiore; in queste tipologie di impianti la CO<sub>2</sub> emessa è ben minore di un normale processo di nitrificazione – denitrificazione dove i batteri eterotrofi denitrificanti richiedono un continuo apporto di sostanza organica. Da non trascurare è il confronto dei volumi di fango in gioco: in un comune processo nitro – denitro lo sviluppo della flora batterica comporta la produzione di una grande quantità di fanghi di supero che devono essere successivamente smaltiti; una comunità ANAMMOX è caratterizzata da una crescita limitata ma estremamente efficace, che limita il volume di flora batterica da eliminare alla fine del ciclo di lavoro. Il potenziale abbattimento di azoto è variabile tra i diversi sistemi in base ad alcune caratteristiche: la tipologia di inoculo, il substrato utilizzato, la concentrazione di ammonio, la configurazione del reattore e ovviamente la tipologia di processo.

### Aspetti Economici

Diversi elementi partecipano alla riduzione dei costi di gestione e di funzionamento di un sistema di depurazione: l'eventuale fonte di carbonio esterna e lo smaltimento dei fanghi sono le voci più importanti nel bilancio economico. La tabella seguente 1.5 mette a confronto i principali costi tra i convenzionali processi di trattamento biologico e gli innovativi processi basati sulla reazione ANAMMOX.

Tecnologia	Elettricità		Fonte di Carbonio (ipotesi uso di metanolo)		Fango		Costo Totale
	<i>kWh</i>	€	<i>Kg MeOH</i>	€	<i>Kg</i>	€	
Nitrificazione – Denitrificazione senza uso di C esterno	4.3	0.39	-	-	1.0	0.27	0.66
Nitrificazione –	4.3	0.39	2.5	0.75	1.0	0.27	1.36

Denitrificazione con uso di C esterno							
Nitrosazione - ANAMMOX	2.0	0.18	-	-	0.15	0.04	0.22

Tabella 5. Costi di trattamento per kg di  $\text{NH}_4^+$ -N rimosso [49].

Il risparmio economico con l'impiego dei nuovi processi di deammonificazione è notevole, circa l'80 % in meno, in particolare per quanto riguarda l'utilizzo di fonte carboniose esterne e lo smaltimento finale dei fanghi [49].

#### Problematiche Attese

I punti di criticità riscontrabili sono innanzitutto il tempo di duplicazione dei batteri, stimabile in una decina di giorni, che comporta un allungamento dei tempi di avvio dell'impianto, il quale raggiunge il massimo regime di lavoro entro un paio di mesi se le condizioni rimangono costanti nel tempo.

Un fattore da non sottovalutare consiste nella coesistenza tra batteri ANAMMOX e batteri denitrificanti, i quali, in presenza di elevata quantità di materiale organico facilmente biodegradabile, possono compromettere l'attività degli ammonio ossidanti anaerobici utilizzando il nitrito disponibile.. Infatti il tasso di crescita dei denitrificanti è più elevato dei batteri ANAMMOX, e la reazione di denitrificazione è termodinamicamente favorita rispetto all'ossidazione anaerobica dell'ammonio: i primi possiedono una energia di Gibbs pari a  $-427$  kJ/mole mentre i secondi si limitano a  $355$  kJ/mole [50]. Tali condizioni favoriscono i denitrificanti, che possono utilizzare tutto il nitrito disponibile a scapito degli ANAMMOX. Per ovviare a questo, la maggior quantità di sostanza organica deve essere degradata nella fase di nitrosazione, in modo che la disponibilità di materiale organico sarà talmente limitato da non permettere ai denitrificanti di competere con i batteri ANAMMOX, e le condizioni chimico – fisiche devono essere tali da limitare il più possibile la crescita dei nitrito ossidanti. Alcune

fonti organiche, come il propionato e l'acetato, possono essere ossidate dai batteri ammonio ossidanti anaerobici utilizzando il nitrato o il nitrito come elettrone-accettore; la quantità di batteri ANAMMOX e denitrificanti non varia nel tempo, a conferma di come i primi sono in grado di competere per alcune fonti organiche [51].

Un altro fattore importante nell'applicazione di tali tecnologie è il potenziale abbattimento dell'azoto: nella sola reazione ANAMMOX il tasso di rimozione dell'N non può essere superiore al 90 %, nemmeno in un reattore ideale nel quale l'attività dei batteri è estremamente elevata; questo è correlato alla stechiometria della reazione, dove una mole di ammonio e 1.32 moli di nitrito producono irreversibilmente 0.26 moli di nitrato. Ne consegue che, in particolari situazioni nelle quali la concentrazione dell'azoto totale deve essere estremamente limitata, l'impiego di altre tecnologie per l'abbattimento dell'azoto è obbligatorio. Infine l'attività ANAMMOX è particolarmente sensibile alla luce visibile: una decrescita dal 30 al 50 % è possibile con una esposizione uguale o maggiore a 8 ore [11]. E' quindi auspicabile attivare il processo in una situazione di parziale o controllata illuminazione.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo della presente tesi è l'analisi delle complesse problematiche legate all'abbattimento dell'azoto nei fanghi digestati e la valutazione dell'utilizzo di bioreattori Anammox con uno o due stadi. Lo studio è stato effettuato nell'azienda AIA di Villaganzerla dove sono costruiti e gestiti dalla ditta Eurotec WTT le due diverse tipologie di impianto: il primo costituito da due reattori nei quali avvengono separatamente il processo SHARON (Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite) e il processo ANAMMOX, e il secondo costituito da un'unica grande vasca con tecnologia SBR (Sequencing Batch Reactor) nella quale si alternano condizioni aerobiche e anaerobiche secondo il processo DEMON (DE-amMONification). Il fatto di poter utilizzare lo stesso alimento in entrambi i sistemi può consentire un confronto approfondito e diretto sulle prestazioni e una valutazione di nuove configurazioni sui parametri chimico - fisici.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### ***3.1. SOLUZIONI IMPIANTISTICHE PER LA DEAMMONIFICAZIONE***

Gli impianti di deammonificazione monitorati in questo lavoro sono stati progettati, costruiti e installati dalla ditta Eurotec WTT, operante nel settore della depurazione di acque reflue e scarti zootecnici. Gli impianti sono di due tipologie differenti, caratterizzate da un diverso numero di reattori, che permettono una gestione simultanea o separata dei processi al loro interno:

- **Impianto a singolo stadio SBR – DEMON:** il processo ANAMMOX viene innescato in un'unica grande vasca dove si alternano condizioni aerobiche e anaerobiche e convivono batteri nitrificanti e batteri ammonio ossidanti anaerobici; l'abbattimento di azoto nel sistema può raggiungere valori intorno di  $1 \text{ kg/ m}^3$ ;
- **Impianto a due stadi SHARON – ANAMMOX:** il processo ANAMMOX è preceduto da una fase di nitrosazione nella quale si creano le necessarie condizioni chimiche per favorire lo sviluppo dei batteri ammonio ossidanti anaerobici; le fasi avvengono in due reattori separati e l'abbattimento di azoto può superare valori di  $10 \text{ kg / m}^3$ .

Entrambi gli impianti sono situati all'interno dell'azienda AIA di Villaganzerla, in provincia di Vicenza, che opera nel settore delle carni fresche di pollo, suino, tacchino e coniglio. I sottoprodotti della lavorazione, come il siero del sangue, devono essere smaltiti in modo sostenibile per ridurre i possibili impatti sull'ambiente. I sistemi progettati da Eurotec WTT hanno lo scopo di eliminare definitivamente il problema dell'azoto, in particolare dopo la completa entrata a regime dei processi biologici che

richiede un tempo particolarmente lungo a causa dei tempi di duplicazione dei batteri ANAMMOX.

### ***3.1.1 L'IMPIANTO A SINGOLO STADIO: SBR – DEMON***

#### **3.1.1.1 Struttura**

L'azienda ha sfruttato una vasca di cemento preesistente di dimensioni notevoli, 500 m<sup>3</sup>, riempibile con 500 mila litri di fanghi potenzialmente trattabili nel processo DEMON. L'elevata dimensione è stata scelta per favorire un maggior inoculo di batteri e quindi un potenziale sviluppo molto più rapido della comunità microbologica. Sul fondo sono presenti degli insufflatori di ossigeno che hanno il compito di immettere nel sistema la quantità necessaria di gas per far avvenire la fase di ossidazione (figura 3.1).



Figura 24. Piattelli insufflatori di ossigeno.

Due pale meccaniche permettono di muovere continuamente il fango in modo tale da avere una distribuzione uniforme, ed evitare la decantazione del materiale più pesante che può creare uno strato anaerobico sul fondo della vasca (figura 3.2). E' necessaria la presenza di uno scambiatore di calore che mantiene la temperatura costante tra i 30° C e i 35° C per favorire lo sviluppo e l'attività della comunità microbica. I parametri

chimico – fisici sono costantemente monitorati attraverso una serie di strumenti immersi nel fango, collegati con una centralina posta al di sopra dell'impianto e in comunicazione remota con la ditta Eurotec WTT che può provvedere alla modifica dei parametri attraverso un programma di supervisione.



Figura 25. Scambiatore di calore e pale meccaniche

### 3.1.1.2. Funzionamento

La vasca viene alternativamente alimentata con il digestato liquido proveniente dall'impianto di digestione anaerobica (figura 26), con un carico d'azoto pari a circa 1800 mg/L, e acqua che permette di diluire l'elevata concentrazione e portare il livello d'azoto a 300 mg/L (in rapporto 1:5 e variabile nel tempo) , più adatto allo sviluppo microbico. La sostanza organica immessa nel sistema ha un COD di 1600 mg/L ed è caratterizzata da un elevata percentuale di materiale non degradabile, come gli acidi umici. Tale condizione limita lo sviluppo di batteri eterotrofi denitrificanti all'interno della vasca, per cui l'eventuale azoto liberato proviene quasi esclusivamente dalla attività ANAMMOX. L'alimentazione con digestato viene fatta automaticamente tre volte al giorno, a una distanza di 8 ore l'una dall'altra e con una portata di 5 mc/ora (figura 26).



Figura 26. Tubo di alimentazione

Tutti questi parametri possono essere modificati a distanza attraverso la supervisione, che permette di variare la portata, la diluizione e la tempistica delle fasi in base alla condizione della vasca. Il funzionamento dell'impianto SBR consiste in quattro fasi:

- *Nitrificazione*: gli insufflatori immettono ossigeno nel sistema → permette l'ossidazione dell'ammonio e ha una durata di circa 10 minuti, fino a un livello massimo di 0,25 mg/L di ossigeno;
- *Denitrificazione*: non c'è immissione di ossigeno e si creano condizioni anaerobiche → viene liberato azoto molecolare e ha una durata di circa 15 minuti, fino a un livello minimo di 0,01 mg/L di ossigeno oltre il quale inizia l'insufflazione del gas;
- *Decantazione e chiarificazione*: al raggiungimento dell'altezza massima di impostata si blocca il movimento delle pale e l'insufflazione di gas per una durata di circa 30 minuti, permettendo la deposizione dei fanghi sul fondo della vasca;

- *Eliminazione surnatante*: si attiva una pompa ad alta efficienza che attraverso un tubo sommerso rimuove gradualmente il surnatante, fino ad abbassare il livello di circa 50 centimetri in modo da impedire richiami di fango; il liquido viene inviato a una vasca di accumulo per il successivo trattamento.



Figura 27. Fasi dell'SBR (nitrificazione, denitrificazione e chiarificazione).

Il livello della vasca può raggiungere un limite inferiore stabilito a priori, oltre il quale si attiva l'alimentazione e la diluizione per riportare il volume a regime.

I parametri chimico-fisici costantemente monitorati attraverso una o due sonde sono:

- Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ );
- pH, due sonde ;
- Ossigeno disciolto, due sonde (mg/L);
- Potenziale redox (ORP) ,due sonde (mV);
- Frequenza (Hz);
- Ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (mg/L);
- Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), due sonde (mg/L);
- Potassio ( $\text{K}^+$ ) (mg/L);
- Cloro ( $\text{Cl}^-$ ) (mg/L);

Il monitoraggio di temperatura e pH è dovuto all'importanza che svolgono questi due parametri nelle reazioni in attivo nel sistema SBR; l'ossigeno disciolto dà un'indicazione dell'alternanza di condizioni aerobiche e anaerobiche; il potenziale redox permette di osservare l'andamento delle reazioni di ossidazione e riduzione: se il valore è positivo sono in atto reazioni di ossidazione (con prevalenza di elettroni accettori), se negativo reazioni di riduzione (con prevalenza di elettroni donatori); l'ammonio è il substrato principale della reazione ANAMMOX per cui deve rimanere costantemente sotto osservazione per evitare una mancanza di alimento per i batteri; i nitrati sono i prodotti della reazione, e danno un'informazione sul lavoro e sullo stato di salute dei microrganismi; il potassio e il cloro sono due parametri secondari ma non per questo di minore importanza: permettono di tarare costantemente il sistema. Il programma di supervisione crea un file Excel giornaliero (figura 28) nel quale inserisce i valori dei diversi parametri a un intervallo di tempo variabile.

DATA	ORA	INFILO ANAMMOX Li27 (m)	PORATA ARIA ALIM. Fr 27 (Nm3/h)	PORATA ALIM. Q27A (m3/h)	SSSIFMO ANAMMOX Q27A (mg/l)	RFNOX OX R27A	pH OX pH27A	NITRATI ANAMMOX N NO327A (mg/l)	SSSIFMO ANAMMOX Q27B (mg/l)	RFNOX OX R27B	pH ANAMMOX OX pH27B	TEMPERAT URA ANAMMOX TR27A (°C)	OSSIGENO MEDIO O2MED	REDOX MEDIO R27MED (mV)	pH MEDIO pH27MED (Ph)	FREQUENZ A P27A (Hz)	AMMONIA CA ANAMMOX N-NH427A (mg/l)	CLORURI R27A K r27	POTASSI ANAMMOX R27A (mg/l)
02/05/2012	01:46:48	3,72000003	86,73	5,530000021	0,08	110,65	6,61	260,004988	0,75	156,16	6,89	31,1299992	0,08	133,41	6,78	47,2000008	119,410004	749,570007	104,1999
02/05/2012	00:51:52	3,72000003	0	6,280000021	0,03	116,44	6,61	260,00012	0,22	160,65	6,89	31,1299992	0,03	138,54	6,78	0	119,550003	749,719971	103,
02/05/2012	00:56:57	3,72000003	0	5,98000002	0	104,75	6,69	260,369995	0	146,66	6,9	31,1200008	0	125,75	6,79	49,9000015	119,448997	739,780029	103,8799
02/05/2012	01:02:01	3,73000002	0	6,280000021	0	93,5	6,67	260,170013	0	133,72	6,9	31,1200008	0	113,61	6,79	0	119,860001	739,390015	103,8799
02/05/2012	01:07:06	3,73000002	81,6	5,98999977	0,11	94,25	6,68	259,679993	0,64999998	137,79	6,9	31,1200008	0	116,02	6,8	50	120,330002	742,090027	104,3799
02/05/2012	01:12:10	3,73000002	90,86	6,28999996	0,09	109,37	6,68	260,23999	0,61000001	157,4	6,92	31,1100006	0,11	116,02	6,8	0	120,220001	752,5	104,
02/05/2012	01:17:15	3,74000001	0	6,23000002	0,05	114,58	6,67	260,90999	0,15000001	158,23	6,9	31,1000004	0,09	133,39	6,79	0	120,220001	752,5	104,
02/05/2012	01:22:19	3,74000001	0	5,78999998	0	102,41	6,67	260,570007	0	145,48	6,94	31,1000004	0,05	136,39	6,81	0	120,419998	747,190002	103,
02/05/2012	01:27:24	3,75	0	6,28999998	0	91,28	6,68	260,299988	0	131,48	6,9	31,0900002	0	123,93	6,79	0	120,339996	738,140015	104,0999
02/05/2012	01:32:29	3,75	0	0	0	84,58	6,68	259,799988	0,05	128,35	6,91	31,0900002	0	111,37	6,8	0	120,620003	738,869995	104,0999
02/05/2012	01:37:33	3,75	0	0	0	77,9	6,69	259,179993	0	110,90	6,91	31,0799999	0	105,47	6,8	0	120,279999	734,700012	103,9400
02/05/2012	01:42:30	3,75	0	0	0	72,01	6,69	250,910004	0	112,31	6,91	31,0799999	0	98,44	6,8	0	120,25	724,419983	103,8600
02/05/2012	01:47:42	3,75	0	0	0	65,92	6,69	258,049900	0	106,79	6,91	31,0799999	0	92,16	6,8	0	120,32	721,02002	103,9599
02/05/2012	01:52:47	3,75	0	0	0	60,33	6,69	250,709909	0	100,00	6,91	31,0799999	0	86,35	6,8	0	120,32	719,630005	104,0199
02/05/2012	01:57:51	3,75	0	0	0	55,40	6,69	257,720001	0	95,54	6,91	31,0799999	0	80,6	6,8	0	120,360001	718,299988	104,0199
02/05/2012	02:02:56	3,73000002	0	0	0,01	51,48	6,69	257,920003	0	90,68	6,92	31,0799999	0	80,6	6,8	0	120,360001	718,299988	104,0199
02/05/2012	02:08:00	3,61999998	0	0	0	48,65	6,69	257,640015	0	89,17	6,92	31,0799999	0	80,6	6,8	0	120,360001	718,299988	104,0199

Figura 28. Esempio di file excel per la supervisione dei parametri chimico – fisici.

### 3.1.1.3 Bilancio di massa

La schematizzazione dell'impianto permette una comprensione immediata dei volumi e delle concentrazioni in gioco, in modo da calcolare i parametri fondamentali per la definizione dell'efficienza:

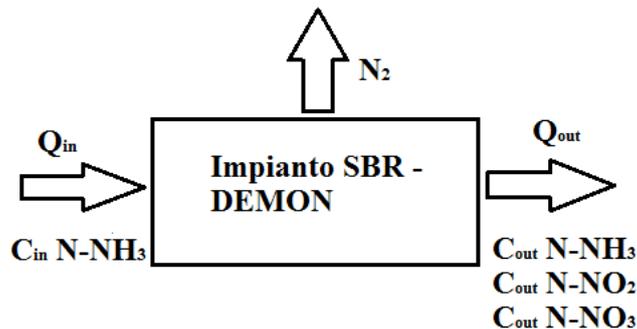


Figura 29

Nella figura 29 si individua  $Q_{in}$  come la portata in ingresso,  $C_{in} N-NH_3$  come la concentrazione di azoto ammoniacale nell'influente,  $Q_{out}$  come la portata in uscita,  $C_{out} N-NH_3$ ,  $C_{out} N-NO_2$  e  $C_{out} N-NO_3$  come la concentrazione di azoto ammoniacale, nitroso e nitrico nell'effluente e  $N_2$  come l'azoto gassoso prodotto dalla reazione ANAMMOX o azoto abbattuto.

La portata  $Q_{in}$  è data dalla somma del refluo in ingresso in  $m^3/giorno$  e dell'acqua utilizzata per la diluizione sempre in  $m^3/giorno$ , successivamente moltiplicata per mille per ottenere i litri:

$$Q_{in} = (Q_{refluo} + Q_{H_2O}) * 1000$$

Mentre la portata in uscita  $Q_{out}$  è data dal lavoro della sola pompa di rimozione del surnatante, la quale opera ogni 8 ore ed esporta un quantitativo di refluo tale da mantenere costante il volume di fango nella vasca.

L'azoto totale in ingresso si ottiene moltiplicando la portata in ingresso  $Q_{in}$  in L/giorno per la concentrazione di azoto ammoniacale in mg/L tenendo conto della portata d'acqua di diluizione:

$$N_{TotIn} = \left\{ \frac{Q_{refluo} * C_{in}(N - NH_3)}{Q_{H_2O}} \right\} * Q_{in}$$

L'azoto totale in uscita è dato dal prodotto della portata in uscita  $Q_{out}$  in L/giorno per la somma delle concentrazioni in uscita di azoto ammoniacale ( $C_{out} N-NH_3$ ), nitroso ( $C_{out} N-NO_2$ ) e nitrico ( $C_{out} N-NO_3$ ) in mg/L:

$$N_{TotOut} = Q_{out} * (C_{out}(N - NH_3) + C_{out}(N - NO_2) + C_{out}(N - NO_3))$$

A questo punto è possibile calcolare l'azoto molecolare prodotto, o in altri termini l'azoto abbattuto, utile al fine di stabilire l'efficienza dell'impianto:

$$N_{abbattuto} = N_{TotIn} - N_{TotOut}$$

La percentuale di abbattimento consente di fare un confronto tra i diversi impianti, e viene definita dal rapporto tra l'azoto molecolare prodotto  $N_2$  e l'azoto totale in ingresso  $N_{TotIn}$ :

$$\text{Percentuale di abbattimento} = \frac{N_2}{N_{TotIn}} * 100$$

Alla percentuale di abbattimento si associa solitamente l'abbattimento volumetrico, parametro che tiene conto del volume del reattore, in questo caso  $500 \text{ m}^3$ , e viene riferito a un giorno:

$$\text{Abbattimento volumetrico} = \frac{N_2(\text{giorno})}{V_{reattore}}$$

### 3.1.2 L'IMPIANTO PILOTA a DUE STADI: SHARON – ANAMMOX

#### 3.1.2.1 Struttura

L'impianto pilota è composta da un primo reattore di 1000 litri di volume dove avviene la nitrosazione (figura 30), e da un secondo reattore di 180 litri nel quale agiscono i batteri ANAMMOX (figura 31).



Figura 30. Il reattore di nitrosazione



Figura 31. Visione dall'alto del reattore ANAMMOX.

Il reattore di nitrosazione è di tipo completamente miscelato (CSTR, *Completely Stirred Tank Reactor*) caratterizzato da un flusso continuo di materiale da trattare in entrata, e un flusso pure continuo di materiale trattato in uscita. Tra i due stadi sono presenti un chiarificatore da 300 litri, che permette la decantazione dei fanghi, e una vasca di accumulo del nitrosato da 400 litri, necessaria per non sovraccaricare il successivo

reattore ANAMMOX. Quest'ultimo è caratterizzato da un tempo di ritenzione della biomassa molto elevato, che permette al fango di compattarsi e ai batteri di riprodursi e creare i caratteristici fiocchi e granuli. Il monitoraggio dei parametri chimico – fisici avviene tramite cinque sonde nella vasca di nitrosazione ( pH, temperatura in °C, ossigeno in mg/L, potenziale redox in mV e concentrazione di ammoniaca in mg/L) e quattro sonde nel ricircolo (pH, temperatura in °C, potenziale redox in mV e concentrazione di ammoniaca in mg/L). Il controllo contemporaneo dell'ammoniaca in entrambi i reattori permette di intervenire immediatamente in caso di modifiche repentine nell'attività dei microrganismi. Tutte le sonde sono collegate a una centralina che raccoglie i dati in tempo reale e li invia a un programma di supervisione, il quale permette di modificare le portate e i tempi di lavoro delle diverse pompe di alimentazione, ricircolo e ossigenazione. La centralina è collegata in remoto e può essere controllata da qualsiasi computer dotato di accesso alla rete. Il programma di supervisione crea un file Excel giornaliero nel quale raccoglie i valori dei diversi parametri a intervalli di tempo variabile:

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
DATA	ORA	OSSIGENO NITROSAZIONE O2It1 mg/l	pH NITROSAZIONE pHit1 Ph	REDOX NITROSAZIONE Rxit1 Mv	AMMONIACA NITROSAZIONE NH3It1 Mg/l	pH ANAMMOX pHit2 Ph	REDOX ANAMMOX Rxit2 Mv	AMMONIACA ANAMMOX NH3It2 Mg/l	TEMPERATURA NITROSAZIONE Tit1 °C	TEMPERATURA ANAMMOX Tit2 °C
19/06/2012	00:00:21	5,67	8,18	61,90	1436,49	7,19	22,78	27,21	30,61	31,89
19/06/2012	00:00:52	4,16	8,18	86,80	1436,48	7,19	22,75	27,18	30,61	31,88
19/06/2012	00:01:23	5,06	8,18	93,26	1436,68	7,19	22,75	27,09	30,61	31,88
19/06/2012	00:01:54	5,57	8,18	64,65	1436,46	7,19	22,79	27,02	30,61	31,89
19/06/2012	00:02:25	4,72	8,18	86,73	1436,47	7,19	22,81	27,00	30,61	31,89
19/06/2012	00:02:55	5,38	8,18	91,48	1436,82	7,19	22,83	26,93	30,61	31,89
19/06/2012	00:03:26	5,69	8,18	67,84	1436,46	7,19	22,87	26,88	30,61	31,89
19/06/2012	00:03:57	3,73	8,18	90,24	1436,44	7,19	22,88	26,82	30,61	31,89
19/06/2012	00:04:27	5,06	8,18	92,77	1437,24	7,19	22,92	26,77	30,61	31,90
19/06/2012	00:04:58	5,05	8,18	69,81	1435,71	7,19	22,95	26,70	30,61	31,91
19/06/2012	00:05:29	3,47	8,18	92,73	1436,60	7,19	22,99	26,70	30,61	31,91
19/06/2012	00:06:00	5,15	8,18	90,53	1436,07	7,19	23,02	26,64	30,61	31,92
19/06/2012	00:06:30	5,19	8,18	76,03	1435,43	7,19	23,00	26,59	30,61	31,92
19/06/2012	00:07:01	4,20	8,19	92,92	1435,93	7,19	23,00	26,54	30,61	31,92
19/06/2012	00:07:32	5,70	8,18	86,02	1435,96	7,19	22,98	26,50	30,61	31,92
19/06/2012	00:08:02	4,99	8,18	61,82	1436,15	7,19	22,99	26,46	30,60	31,92
19/06/2012	00:08:33	3,81	8,19	90,93	1435,74	7,19	23,03	26,44	30,60	31,93
19/06/2012	00:09:04	5,48	8,19	88,51	1435,25	7,19	23,02	26,46	30,60	31,94
19/06/2012	00:09:35	4,81	8,18	69,32	1435,27	7,19	23,04	26,38	30,60	31,94
19/06/2012	00:10:05	3,94	8,19	94,55	1435,91	7,19	23,08	26,36	30,60	31,95
19/06/2012	00:10:36	5,64	8,18	82,29	1435,00	7,19	23,09	26,28	30,60	31,96
19/06/2012	00:11:07	5,18	8,18	70,86	1434,27	7,19	23,12	26,21	30,60	31,97

Figura 32. Esempio di file excel per la supervisione dei parametri chimico – fisici.

### 3.1.2.2. Funzionamento

L'alimentazione dell'impianto avviene con lo stesso digestato liquido proveniente dalla fermentazione anaerobica, impiegato nell'impianto SBR. Attraverso una pompa si può regolare la portata in ingresso nella vasca di nitrosazione, dove un flusso d'aria intermittente permette la parziale ossidazione dell'ammoniaca a nitrito. Generalmente il carico ammoniacale nel digestato liquido raggiunge i 2000 mg/L a fronte di un sistema in grado di accogliere fino a 2 Kg/m<sup>3</sup>/giorno di azoto. All'apice del reattore di nitrosazione è presente un collettore a sfioro che permette al fango nitrosato di raggiungere il chiarificatore per troppopieno, con una portata di 30 litri/ora. Questo consente ai fanghi di nitrosazione, ricchi di flora batterica, di depositarsi sul fondo e di essere rimossi e scaricati a intervalli regolari, in modo da evitare un sovraccarico di massa batterica all'interno dei reattori, causando un decremento delle prestazioni. L'acqua chiarificata raggiunge per sfioro il serbatoio di accumulo del nitrosato con una portata media di 30 litri/ora. Attraverso una pompa l'acqua viene immessa all'interno del reattore ANAMMOX, in grado di accogliere un carico di azoto fino a 0,1 Kg/m<sup>3</sup>/giorno. Lo sviluppo della comunità ANAMMOX avviene sul fondo del reattore dove il fango si accumula e compatta creando i caratteristici granuli e fiocchi. Sulla sommità del reattore è presente un cilindro di separazione dotato di due collettori che consentono di raccogliere l'azoto, che viene successivamente liberato in atmosfera, e l'acqua prodotta dalla reazione che, rientrando nei limiti massimi per il contenuto di azoto nitrico e nitroso, può essere scaricata nelle acque superficiali. A intervalli regolari viene attivato un ricircolo che preleva parte del fango del reattore ANAMMOX da tre punti differenti e lo invia in uno scambiatore di calore dotato di resistenza dove la temperatura viene mantenuta costantemente intorno ai 32 – 34 ° C. Il fango prelevato viene successivamente pompato alla base del reattore per completare la fase di ricircolo. Nella fase di avviamento si impiegano i fanghi provenienti dall'impianto SBR, poveri di ammoniaca e nitriti e ricchi di nitrati. Il reattore di nitrosazione, di tipo completamente miscelato, richiede qualche giorno per entrare a regime, durante i quali il digestato liquido carico di ammoniaca sostituisce i fanghi di innesco. Inoltre nelle fasi iniziali è

necessario diluire regolarmente il fango nel reattore ANAMMOX in modo tale da non sovraccaricare la flora batterica.

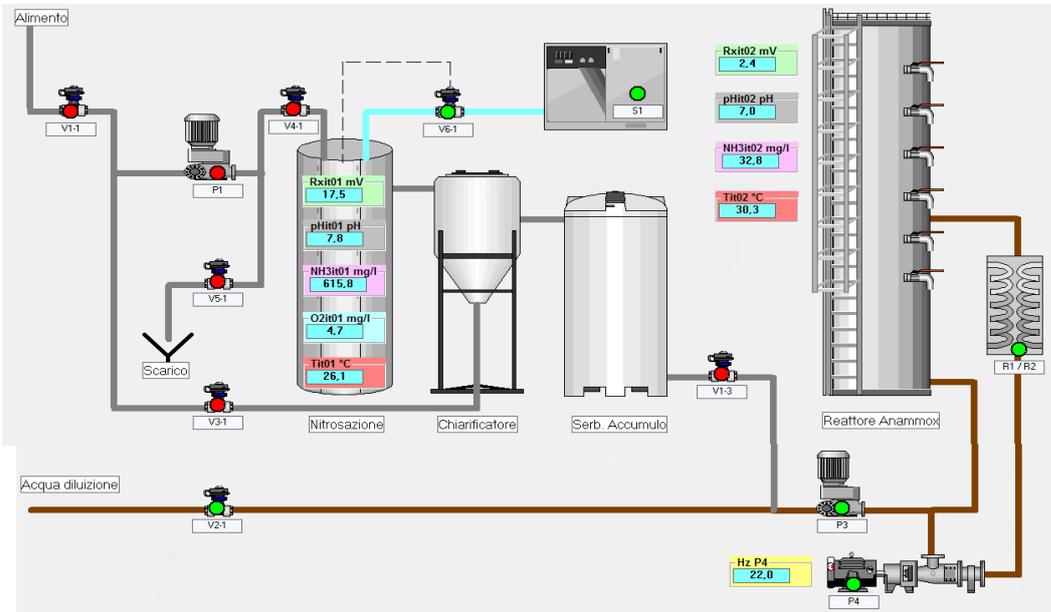
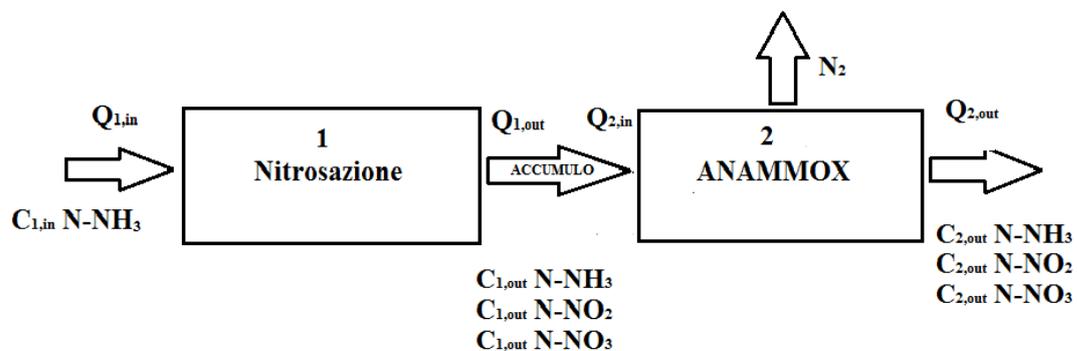


Figura 33. Il pannello di controllo dell'impianto Sharon – ANAMMOX.

### 3.1.2.3. Bilancio di massa

Anche in questo caso la schematizzazione dell'impianto permette una comprensione immediata delle portate e delle concentrazioni in gioco, in particolare per la presenza di un doppio stadio di reazione:



Nello schema si individua  $Q_{1,in}$  come la portata in ingresso nel reattore di nitrosazione,  $C_{1,in} N-NH_3$  come la concentrazione di azoto ammoniacale nell'influente,  $Q_{1,out}$  come la portata in uscita dal reattore di nitrosazione e in ingresso nel reattore ANAMMOX e  $C_{1,out} N-NH_3$ ,  $C_{1,out} N-NO_2$  e  $C_{1,out} N-NO_3$  come le concentrazioni di azoto ammoniacale, nitroso e nitrico dell'effluente del reattore di nitrosazione in ingresso nell'ANAMMOX. Infine  $Q_{2,out}$  è la portata in uscita dal reattore ANAMMOX e  $C_{2,out} N-NH_3$ ,  $C_{2,out} N-NO_2$  e  $C_{2,out} N-NO_3$  come le concentrazioni di azoto ammoniacale, nitroso e nitrico dell'effluente del reattore ANAMMOX.

La presenza di due reattori necessita la suddivisione dell'approccio in modo tale da calcolare l'abbattimento dell'azoto prima nella nitrosazione, teoricamente molto bassa, poi nell'ANAMMOX e infine sommare i due abbattimenti.

La portata  $Q_{1,in}$  è data dal solo ciclo pausa – lavoro della pompa, quindi l'azoto totale in ingresso nel reattore di nitrosazione e in tutto il sistema è facilmente quantificabile moltiplicando la portata in L/ora (tenendo conto delle pause) per la concentrazione dell'azoto ammoniacale in mg/L:

$$N_{TotIn,1} = Q_{1,in} * C_{1,in} (N - NH_3)$$

La portata  $Q_{1,out}$  è uguale a  $Q_{1,in}$  dato che il fango esce dal reattore per troppopieno; si ricava così l'azoto totale in uscita dalla nitrosazione attraverso il prodotto di  $Q_{1,out}$  con la somma delle concentrazioni di azoto ammoniacale, nitroso e nitrico ( $C_{1,out} N-NH_3$ ,  $C_{1,out} N-NO_2$  e  $C_{1,out} N-NO_3$ ):

$$N_{TotOut,1} = Q_{1,out} * (C_{1,out} (N - NH_3) + C_{1,out} (N - NO_2) + C_{1,out} (N - NO_3))$$

L'abbattimento di azoto nel reattore di nitrosazione sarà così espresso:

$$N_{abbattuta1} = N_{TotIn,1} - N_{TotOut,1}$$

L'azoto totale in uscita dal reattore di nitrosazione entra nel reattore ANAMMOX, dove viene diluito con acqua in modo da ridurre le concentrazioni  $C_{1,out} N-NH_3$ ,  $C_{1,out} N-NO_2$  e  $C_{1,out} N-NO_3$ . Tenendo conto dei cicli di pausa – lavoro della valvola di alimentazione e di diluizione, e fissando la portata  $Q_{2,in}$  a 30 L/h, si può determinare le portate del fango e dell' acqua di diluizione:

$$Q_{2,in} = Q_{2,grezza} + Q_{2,H_2O}$$

L'azoto totale in ingresso nel reattore ANAMMOX sarà così calcolato:

$$N_{TotIn,2} = ((C_{1,out}(N - NH_3) + C_{1,out}(N - NO_2) + C_{1,out}(N - NO_3)) * Q_{2,grezza}) / Q_{2,H_2O} * Q_{2,in}$$

L'azoto totale nell'effluente del secondo reattore utilizza la portata  $Q_{2,out}$  uguale a  $Q_{1,out}$ , dato che il fango esce per troppopieno, e le concentrazioni  $C_{2,out} N-NH_3$ ,  $C_{2,out} N-NO_2$  e  $C_{2,out} N-NO_3$ :

$$N_{TotOut,2} = Q_{2,out} * (C_{2,out}(N - NH_3) + C_{2,out}(N - NO_2) + C_{2,out}(N - NO_3))$$

L'abbattimento di azoto nel reattore ANAMMOX sarà così espresso:

$$N_{abbattuta2} = N_{TotIn,2} - N_{TotOut,2}$$

L'abbattimento totale di azoto del sistema è dato dalla somma dei due abbattimenti:

$$N_{abbattuto, Tot} = N_{abbattuta1} + N_{abbattuta2}$$

Anche in questo sistema è possibile calcolare la:

$$\text{Percentuale di abbattimento} = \frac{N_2}{N_{TotIn}} * 100$$

Alla percentuale di abbattimento si associa solitamente l'abbattimento volumetrico, parametro che tiene conto del volume del reattore ANAMMOX di 180 m<sup>3</sup>, e viene riferito a un giorno:

$$\textit{Abbattimento volumetrico} = \frac{N_2(\textit{giorno})}{V_{\textit{reattore}}}$$

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il carico di azoto ammoniacale in ingresso è stato preventivamente definito in modo da non sovraccaricare la flora batterica in entrambi i reattori: i valori di  $N-NH_4^+$  oscillavano da 800 a 1100 mg/l. Il digestato liquido che alimentava i due impianti Anammox proveniva da due digestori anaerobi da 3000 e 1000 metri cubi presenti nell'azienda AIA.

Nell'impianto a doppio stadio la nitrosazione veniva gestita singolarmente nel primo reattore e tale processo partecipava alla rimozione dell'azoto perché esso veniva utilizzato, seppur in minima parte, per la normale crescita della biomassa nitrosante.

E' importante sottolineare che lo scopo del primo reattore era la preparazione dell'alimento adatto alla popolazione Anammox con un rapporto ammonio / nitrito adeguato al suo sviluppo: in particolare, come già riportato nell'introduzione, tale rapporto doveva avvicinarsi a 1:1,25. Purtroppo la composizione del digestato liquido a valle della digestione anaerobica ha sempre manifestato un'elevata variabilità e ciò ha reso la gestione dell'alimento molto problematica. Notevoli inconvenienti sono sorti a seguito della presenza, in alcuni momenti, di elevate quantità di acidi grassi volatili (COD degradabile) che hanno sbilanciato il fango Anammox a favore della popolazione denitrificante. Il successivo recupero di condizioni normali (basso COD degradabile) purtroppo coincideva con un ristagno di concentrazioni di nitriti tossiche per la popolazione Anammox che ha tempi di risposta e di attivazione molto più lenti dei denitrificanti. Per ovviare a tale inconveniente, è stato deciso di posizionare un serbatoio aggiuntivo del volume di 1 m<sup>3</sup>, denominato BIG-Alimento, nel quale veniva preparato l'alimento per il secondo reattore alla concentrazione voluta. Una volta alla settimana si allestiva la soluzione dosando il liquido nitrosato proveniente dal primo reattore con acqua. Fondamentale è stato il monitoraggio quotidiano della concentrazione di nitriti in

uscita dall'impianto per la valutazione funzionale del bioreattore. La determinazione aveva luogo in un piccolo laboratorio presente in azienda mediante un kit (Merck).



Figura 34. Kit della Merck per la determinazione dei nitriti e spettrofotometro portatile per la lettura del dato.

Il risultato analitico della concentrazione di nitriti in uscita permetteva la corretta gestione dell'impianto nel breve periodo: se il dato era basso (1-15 ppm) si poteva incrementare la quantità di alimento o in termini di volume (il range poteva variare da 1 a 5 l/h) o di concentrazione all'interno del BIG-alimento (da 80 ppm siamo arrivati ai 300 ppm di N-NO2- al giorno); al contrario, se il valore risultava alto era necessario ridurre l'alimentazione del secondo reattore o, nei casi più gravi, bloccare la pompa di alimentazione. E' stato approntato un foglio di Excel per il calcolo della quantità di liquido nitrosato e di quanta acqua da aggiungere per preparare il nuovo alimento e portarlo al volume voluto (Figura 35).

Valore di N-NO2- desiderato ppm 320	=	(N-NO2- nel big ppm 285	x	volume big L 550	/vol totale big L 1000	+	(volume ricarica big L 450	x	X )	/vol totale big L 1000
verifica 320	=				156,8	+				163,3
Diluizione 2,14	=	N-NO2- serbatoio ppm 778	/	X 362,8	=	2,14				
Vol da prelevare L 209,8	=	volume ricarica big L 450	/	Diluizione 2,14	=	209,8				
Valore di N-NO2- desiderato ppm 320	=	(N-NO2- nel big ppm 285	x	volume big L 550	/vol totale big L 1000	+	(N-NO2- serbatoio L 209,8	x	N-NO2- serbatoio) ppm 778,0	/vol totale big L 1000
verifica 320,0	=				156,8	+				163,3

Figura 35. Foglio Excel per il dosaggio di liquido nitrosato e acqua nel BIG-alimento.

La parte principale del lavoro di tesi è stata contraddistinta dalle operazioni di prelievo e monitoraggio dell'impianto. Tale attività ha messo in evidenza diverse criticità del sistema tra le quali la più importante era l'aumento della quantità di nitriti che regolarmente accompagnava ogni incremento dell'azoto in ingresso.

Nel tentativo di trovare una soluzione a tali problemi nel mese di aprile sono stati aggiunti degli elementi nutritivi per vedere se ai batteri ANAMMOX mancasse qualche fattore di crescita necessario al loro sviluppo; all'interno di questa soluzioni erano presenti macro e micro elementi responsabili della normale crescita batterica e di seguito si riporta la loro composizione per integrare 1 m<sup>3</sup> di alimento:

Soluzione nutritiva	2 litri x 1 m <sup>3</sup> di alimento
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	800 mg
MgO	600 mg
CaCl <sub>2</sub>	4,14 g
NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>	40,6 g
NaNO <sub>2</sub>	39,3 g
TMS 1:	1 litro
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	8891 mg
EDTA	5 g
TMS 2	1 litro
EDTA	10 g
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	329 mg
CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	249 mg
MnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	849 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	272 mg
(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	186 mg
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	212 mg
Se (sciolto in HNO <sub>3</sub> )	48 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	17 mg

Tabella 5. Composizione della soluzione nutritiva per alimento Anammox (per 1000 litri di alimento).

I risultati ottenuti dopo la somministrazione della soluzione nutritiva per 3 settimane non sono stati soddisfacenti e quindi sono state tentate altre soluzioni.

Si è deciso di provare dei nuovi sistemi di mescolamento e omogeneizzazione dei fanghi all'interno del reattore Anammox nell'ipotesi che alla base del reattore si fossero formati dei canali preferenziali di passaggio dell'alimento che causavano una significativa diminuzione del tempo di ritenzione (tempo di contatto tra alimento e popolazione batterica) causando i bassi risultati di abbattimento. Per ovviare a questo inconveniente sono state apportate delle modifiche impiantistiche fatte dalla ditta

Eurotec wtt che prevedevano l'utilizzo di pale in acciaio e di getti d'aria compressa, disposti sul fondo del secondo reattore, che venivano saltuariamente attivati per pochi secondi. I risultati ottenuti sono stati confortanti ma non sufficienti a risolvere completamente la problematica sopra evidenziata.

Non vedendo grossi miglioramenti si è deciso di concentrare l'attenzione sulla popolazione batterica. Inizialmente si è provveduto a re-inoculare il reattore della nitrificazione che aveva subito una intossicazione (6 giugno). Il 14 maggio e il 4 giugno si è invece provveduto a re-inoculare con 300 litri e 250 litri di fango prelevato dalla vasca SBR. Per migliorare la concentrazione del fango attivo è stata fatta in seguito (25 giugno) una terza aggiunta, utilizzando un concentrato di batteri ANAMMOX prelevato dalla vasca SBR con un setaccio da 500 micron e alcuni contenitori. Il concentrato è stato introdotto nel reattore togliendo la sonda che misura il pH (figura 36).

I risultati di questa operazione sembrano ad oggi avere prodotto un sensibile miglioramento nell'attività di abbattimento dell'azoto.

Nuovi studi seguiranno alla presente sperimentazione per verificare le attività e le soluzioni messe in atto.

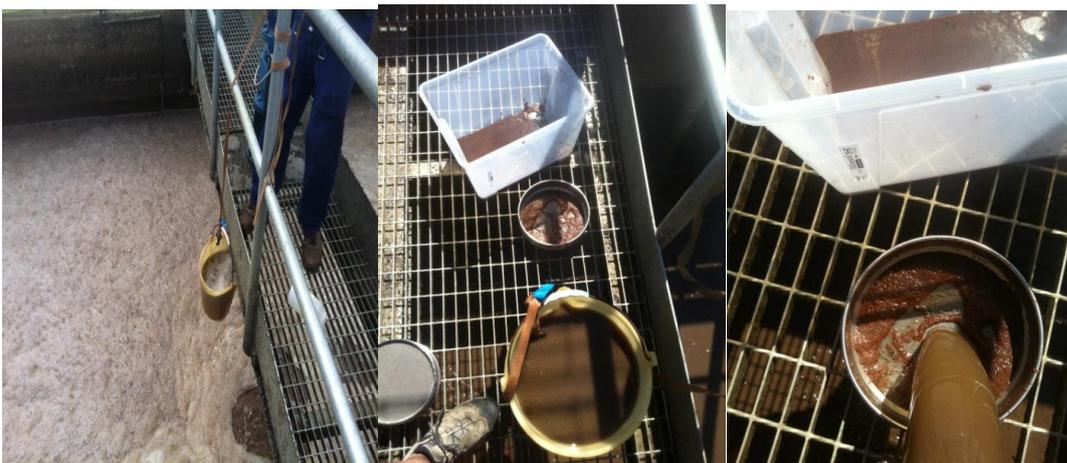




Figura 36. Fotografie relative all'inoculo di fanghi Anammox concentrati.

I dati riportati in figura 37 sono stati raccolti nel periodo gennaio-giugno 2013 e sono relativi all'efficienza di funzionamento (abbattimento di azoto totale) nell'impianto a doppio stadio.

L'andamento dell'impianto durante il periodo in esame è stato caratterizzato da un trend molto altalenante: in particolare, si è potuto osservare come in corrispondenza di un aumento di nitriti in uscita si sia sempre verificata una perdita di efficienza di abbattimento dell'azoto totale. E' interessante notare come nell'ultimo periodo i parametri di abbattimento siano decisamente in fase di miglioramento.

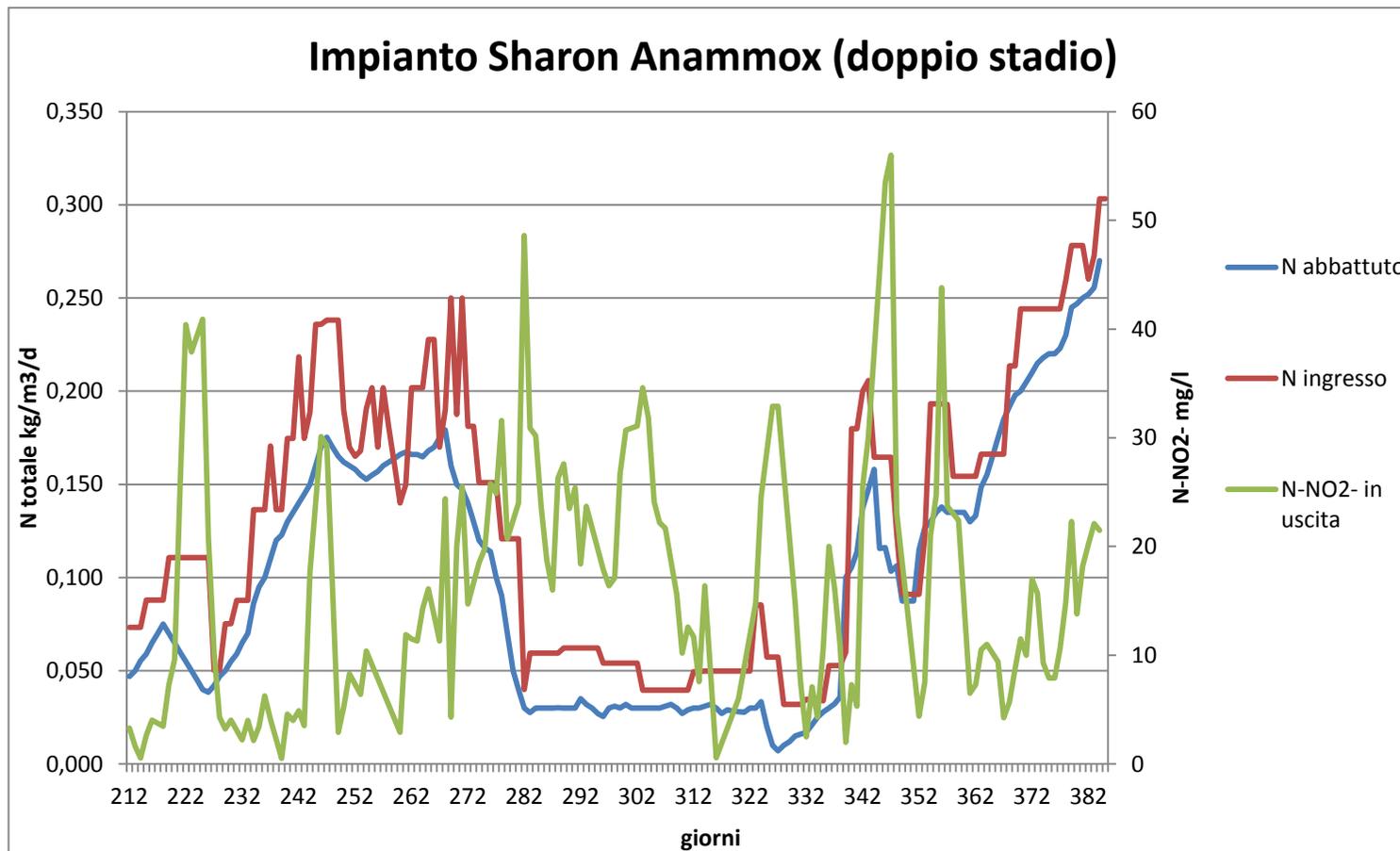


Figura 37. Trend di abbattimento dell'azoto totale (kg/m<sup>3</sup>/die) rispetto all'azoto in ingresso e all'azoto nitroso in uscita nel bioreattore Anammox a doppio stadio nel periodo gennaio-giugno 2013.

Una parte del lavoro di tesi è stata dedicata anche alle operazioni di prelievo e monitoraggio dell'impianto SBR. In tale impianto l'attività prevalente è stata la registrazione dei parametri di abbattimento che hanno manifestato un trend positivo molto interessante fino alla fine di maggio (figura 38) raggiungendo un valore di 0,49 kg di azoto abbattuto per metro cubo di fango. Anche il sistema SBR risulta molto sensibile alle variazioni di alimento già registrate e commentate per l'impianto a doppio stadio.

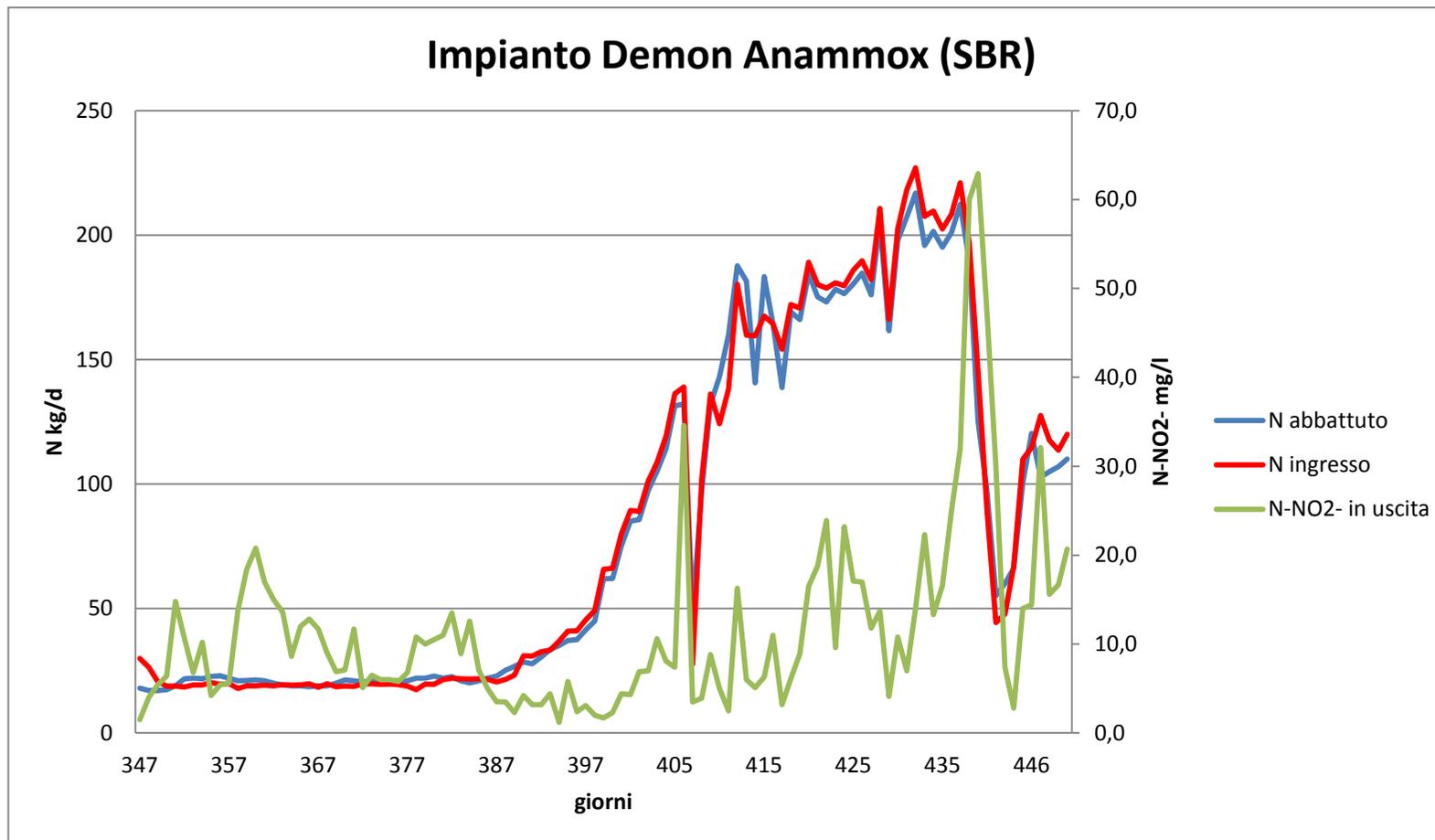


Figura 38. Trend di abbattimento dell'azoto totale (kg/m<sup>3</sup>/die) rispetto all'azoto in ingresso e all'azoto nitroso in uscita nel bioreattore Anammox a singolo stadio (SBR) nel periodo gennaio-giugno 2013.

## 5. CONCLUSIONI

Il lavoro di tesi ha comportato attività di prelievo e di monitoraggio di due impianti ANAMMOX ubicati presso lo stabilimento di rendering AIA di Villaganzerla (VI). I dati raccolti hanno permesso di determinare quali siano le reali efficienze di abbattimento dell'azoto nei reflui presi in esame e come il sistema a doppio reattore possieda, in funzione del volume, un'efficienza maggiore rispetto all'altro sistema a singolo stadio, nonostante abbia lavorato in condizioni particolarmente blande. Lo studio ha evidenziato che esistono numerose variabili in grado di influire sulla comunità batterica all'interno dei reattori che necessitano uno studio e un monitoraggio continuo.

Nell'impianto SHARON-ANAMMOX la presenza simultanea di due reattori ha permesso di gestire separatamente la nitrosazione e l'attività Anammox, ma ha aumentato i problemi di gestione. In particolare si potuto osservare che il punto di debolezza più significativo sia legato all'eccessiva variabilità della quantità di azoto in ingresso che causava un aumento di nitriti. La conseguenza inevitabile era l'intossicazione dei fanghi Anammox, caratterizzati da un lunghissimo tempo di moltiplicazione (12 giorni per raddoppiare la biomassa) che li rende incapaci di adattarsi velocemente a tali fluttuazioni. Tra i vari tentativi messi in campo per ovviare a questo problema solo l'aumento forzato della concentrazione di biomassa attiva sembra avere dato i frutti sperati.

Nuovi studi dovranno necessariamente seguire alla presente sperimentazione per verificare le attività e le soluzioni messe in atto.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] “Attuazione della direttiva 91/676/CEE del Consiglio relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole”, Sintesi delle relazioni trasmesse dagli Stati membri per il 2000, Commissione europea. [www.europa.eu](http://www.europa.eu)
- [2] Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Ingegneria Agraria, Provincia di Lodi, Settore Agricoltura e Ambiente rurale: “Modelli gestionali per l'uso sostenibile degli effluenti di allevamento GEA”. Quaderni della ricerca n. 104-settembre 2009. [www.regione.lombardia.it](http://www.regione.lombardia.it)
- [3] Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Ingegneria Agraria, ERSAF, Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste: “Gestione e riduzione dell'azoto di origine zootecnica. Soluzioni tecnologiche ed impiantistiche”. Quaderni della ricerca n.93-settembre 2008.
- [4] Pollice A., Tandoi V., Lestingi C. 2002. Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate, *Wat. Res.* 36(10): 2541-2546.
- [5] Henze M., Gujer W., Mino T., Matsuo T., Marais G.v.R. 1995. Activated Sludge Model N.2, IAWQ Scientific and Technical Report n. 3, pp. 520 – 528.
- [6] Orhon D., Artan N., 1994, Modelling of Activated Sludge Systems, Technomic Publ. Co..
- [7] Henze M., Gujer W., Mino T., Matsuo T., Marais G.v.R., 2000;
- [8] Van de Graaf A.A., de Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G. 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidizing microorganism in a fluidized bed reactor, *Microbiology* 143(7): 2415-2421.
- [9] Strous M., van Gerven E., Zheng P., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process in different reactor configurations. *Water Research* 31(8): 1955-1962.

- [10] Sito internet: [www.paques.nl](http://www.paques.nl)
- [11] Strous M, Fuerst JA, Kramer EH, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MS, 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400: 446–449.
- [12] Kuenen J.G. 2008. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Rev Microbiol.* 6(4): 320-326.
- [13] Schmid MC., Maas B, Dapena A, van de Pas-Schoonen K, van de Vossenberg J, Kartal B, van Niftrik L, Schmidt I, Cirpus I, Kuenen JG, Wagner M, Sinninghe Damsté JS, Kuypers M, Revsbech NP, Mendez R, Jetten MSM, Strous M. 2005. Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 1677-1684.
- [14] Kuypers M.M.M., Lavik G., Wöbken D., Schmid M., Fuchs B.M., Amann R. 2005. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 6478-6483.
- [15] Dalsgaard T., Canfield D.E., Petersen J., Thamdrup B., Acuna-Gonzalez 2003. N<sub>2</sub> production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* 422: 606-608.
- [16] Schubert C.J., Edith Durisch-Kaiser, Bernhard Wehrli, Bo Thamdrup, Phyllis Lam, Kuypers M.M.M. 2006. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environmental Microbiology* 8(10):1857-63.
- [17] Rysgaard S., Glud R.N. 2004. Anaerobic N<sub>2</sub> production in Arctic sea ice. *Limnol Oceanogr* 49: 86-94.
- [18] Rysgaard S., Glud R.N., Risgaard-Petersen N. and Dalsgaard T. 2004. Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments. *Limnol Oceanogr* 49: 1493-1502.
- [19] Schmid Markus C., Maas Bart, Dapena Ana, van de Pas-Schoonen Katinka, van de Vossenberg Jack, Kartal Boran, van Niftrik Laura, Schmidt Ingo, Cirpus

- Irina, Kuenen J. Gijs, Wagner Michael, Sinninghe Damsté Jaap S., Kuypers Marcel, Revsbech Niels Peter, Mendez Ramon, Jetten Mike S. M. and Strous Marc. 2005. Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 1677-1684.
- [20] Van de Graaf A.A. , de Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G. 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor, *Microbiology* 142(8): 2187-2196.
  - [21] Damsté JM., Strous M., Wijnstra L., Jetten K., 2002, Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane, *Nature* 419: 708–712.
  - [22] Sinninghe Damsté J.S., Strous M., Rijnstra W.I.C., Hopmans E.C., Genevasen J.A.J., van Duin A.C.T., van Niftrik L., Jetten M.S.M. 2002. Linearly concatenated cyclobutane lipids from dense bacterial membrane. *Nature* 419: 708-712.
  - [23] Van Niftrik L.A., Fuerst J.A., Sinninghe Damsté J.S., Kuenen J.G., Jetten M.S., Strous M. 2004. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 233(1): 7-13.
  - [24] Yang M., Zhou S., Sun Y., 2009, Start-up of simultaneous removal of ammonium and sulfate in an anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in an anaerobic upflow bio-reactor, *Journal of Hazardous Materials* 169: 113–118.
  - [25] Grzegorz Crema, 2008. Comparative study in different Anammox systems. PHD Thesis, KTH Land and Water Resources Engineering, pp. 14-30.
  - [26] Hao X., Heijnen J.J. and Loosdrecht M.C.M. 2002. Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification-ANAMMOX biofilm process, *Water Research* 36(19): 4839-4849.
  - [27] Kartal B, Kuypers MM, Lavik G, Schalk J, Op den Camp HJ, Jetten MS, Strous M., 2007, Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium, *Environ Microbiol.* 9(3): 635–642.

- [28] Kuenen JG, 2008. Anammox bacteria: from discovery to application, *Nat Rev Microbiol.* 6(4): 320–326.
- [29] Khin T., Annachhatre A.P. 2004. Novel microbial nitrogen removal process. *Biotechnology Advances* 22(7): 519-532.
- [30] Ahn Y.H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry* 41: 1709–1721.
- [31] Konrad Egli, Urs Fanger, Pedro J. J. Alvarez, Hansruedi Siegrist, Jan R., van der Meer, Alexander J. B., Zehnder 2001. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology* 175: 198-207.
- [32] Beatriz Molinuevo, Maria Cruz Garcia, Dimitar Karakashev, Irini Angelidaki 2009. Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: Effects of organic matter content on process performance. *Bioresource Technology* 100(7): 2171-2175.
- [33] Third K.A., Paxman J., Schmid M., Strous M., Jetten M.S.M., Cord-Ruwisch R. 2005. Treatment of nitrogen-rich wastewater using partial nitrification and Anammox in the CANON process, *Water Science and Technology* 52(4): 47-54.
- [34] van de Graaf AA, de Bruijn P., Robertson LA, Jetten Mike S. M., Kuenen J. G. 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium oxidizing microorganisms in fluidized bed reactor. *Microbiology* 142: 2187-2196.
- [35] Jetten Mike S. M., Wagner M., Fuerst J., van Loosdrecht M., Kuenen J. G., Strous M. 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process. *Curr Opin Biotechnol.* 12: 283-288.
- [36] Güven D., Dapena A., Kartal B., Schmid M. C., Maas B., van de Pas-Schoonen K. T., Sozen S., Mendez R., Op den Camp H., Jetten Mike S. M., Strous M., Schmidt I. 2005. Propionate oxidation and methanol inhibition of the anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 71(2): 1066-1071.

- [37] Güven D., van de Pas-Schoonen K. T., Schmid M. C., Strous M., Jetten Mike S. M., Sozen S., Orhon D., Schmidt I. 2004. Implementation of Anammox process for improved nitrogen removal. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 39(7): 1729-38.
- [38] Miyoko Waki, Takaaki Tokutomi, Hiroshi Yokoyama, Yasuo Tanaka 2007. Nitrogen removal from animal waste treatment water by anammox enrichment. *Bioresource Technology* 98(14): 2775-2780.
- [39] Kartal B., Rattray J., van Niftrik L., van de Vossenberg J., Schmid M. C., Webb R. I., Schouten S., Fuerst J. A., Damste J. S., Jetten Mike S. M., Strous M. 2007. *Candidatus Anammoxoglobus propionicus* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 30(1): 39-49.
- [40] Op den Camp H., Kartal B., Guven D., van Niftrik L., Haaijer S. C. M., van der Star W. R. L., van de Pas-Schoonen K. T., Cabezas A., Ying Z., Schmid M. C., Kuypers M. M. M., van de Vossenberg J., Harhangi H. R., Picioreanu C., van Loosdrecht M., Kuenen J. G., Strous M. e Jetten Mike S. M. 2006. Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. The 11th Nitrogen Cycle Meeting 2005, *Biochemical Society Transactions* 34(1): 174-178.
- [41] Kumar Mathava, Lin Jih-Gaw, 2010. Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal- Strategies and issues. *Journal of Hazardous Materials* 178(1-3): 1-9.
- [42] Dosta J., Fernandez I., Vazquez-Padin J. R., Mosquera-Corral A., Campos J. L., Mata-Alvarez J., Mendez R. 2008. Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *Journal of Hazardous Materials* 154: 688-693.
- [43] Chih-Cheng Wang, Mathava Kumar, Chien-Ju Lan, Jih-Gaw Lin, 2011. Landfill-leachate treatment by simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process. *Desalination and Water Treatment* 32: 4–9.

- [44] Van Dongen L. G.J.M., Jetten M.S.M., van Loosdrecht M.C.M. 2001. The Sharon-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology* 44(1): 153-160.
- [45] Van Dongen L. G.J.M., Jetten M.S.M., van Loosdrecht, M.C.M. 2001. The combined Sharon/Anammox Process, A sustainable method for N-removal from sludge water, STOWA Report, IWA Publishing, London, UK, pp. 452-480.
- [46] Windey, Kim, De Bo, Inge and Verstraete, W. 2005. Oxygen-limited autotrophic nitrification–denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater, *Water research* 39: 4512-4520.
- [47] Stijn W.H. Van Hulle, Helge J.P. Vandeweyer, Boudewijn D. Meesschaert,
- Peter A. Vanrolleghem, 2010, Engineering aspects and practical application of autotrophic nitrogen removal from nitrogen rich streams, *Chemical Engineering Journal* 162: 1–20.
- [48] Innerebner G., Insam H., Franke-Whittle I.H., Wett B. 2007. Identification of anammox bacteria in a full-scale deammonification plant making use of anaerobic ammonia oxidation. *Systematic and Applied Microbiology* 30(5): 408–412.
- [49] Ahn Y.H. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry* 41: 1709–1721.
- [50] Ruiz G., Jeison D., Chamy R. 2003. Nitrification with nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Wat. Res.* 37(6): 1371-1377.
- [51] Bing-Jie Ni, Bao-Lan Hu, Fang Fang, Wen-Ming Xie, Boran Kartal, Xian-Wei Liu, Guo-Ping Sheng, Mike Jetten, Ping Zheng and Han-Qing Yu 2010. Microbial and Physicochemical Characteristics of Compact Anaerobic Ammonium-Oxidizing Granules in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor, *Applied And Environmental Microbiology* 76(8): 2652–2656.

**PER LE IMMAGINI ED ALTRE INFORMAZIONI SONO STATI UTILIZZATI ANCHE I SEGUENTI SITI/ARTICOLI:**

- Sito internet <http://it.wikipedia.org/wiki/Azoto>
- Sito internet <http://aem.asm.org/content/69/11/6447.full>
- Sito internet (foto granuli ANAMMOX):  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565350901457X>
- Sito internet <https://www.google.it/>
- Fuerst J.A. 2005. Intracellular Compartmentation in Planctomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 299-328.
- Fux C., Bohlerem M., Huber P., 2002, Biological treatment of ammonium rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation, *Journal of biotechnology* 99: 295-306;
- Gil K., Choi E., Yun Z., Lee J., Ha J., Park J. 2002. The nomographic design approach to recycled water treatment by the nitritation process *Water Sci Technol.* 46(11-12): 85-92.
- Grunditz C., Dalhammar G. 2001. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Water Research* 35(2): 433-440.
- Helmer C., Tromm C., Hippen A., Rosenwinkel K-H., Seyfried C.F., Kuns SW. 2001. Single stage biological nitrogen removal by nitritation and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems. *Water Sci Technol.* 43(1): 311-20.
- Hu B.L., Zheng P., Mahmood Q., Qian H.F., Wu D.L. 2006. Cultivation, granulation and characteristics of anaerobic ammonium-oxidizing sludge in sequencing batch reactor. *Water Science & Technology: Water Supply* 6(6): 71–79.
- Imajo U, Tokutomi T, Furukawa K. 2004. Granulation of Anammox microorganisms in up-flow reactors. *Water Sci Technol.* 49(5-6): 155-63.

- Li M., Gu J.D. 2011. Advances in methods for detection of anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria, *Appl Microbiol Biotechnol.* 90(4): 1241-1252.
- Lindsay M., Webb R., Strous M. 2001. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell, *Arch Microbiol* 175: 413–429.
- Quan Z.X., Rhee S.K., Zuo J.E., Yang Y., Bae J.W., Park J.R., Lee S.T., Park Y.H. 2008. Diversity of ammonium-oxidizing bacteria in a granular sludge anaerobic ammoniumoxidizing (anammox) reactor. *Environmental Microbiology* 10: 3130–3139.
- Szatkowska B., Płaza E., Trela J., Bąkowska A. 2004. Influence Of Dissolved Oxygen Concentration On Deammonification Process Performance. In: Integration and optimisation of urban sanitation systems: Proceedings of a Polish-Swedish seminar. Polish-Swedish seminar, Wisla October 25-28, 2003, pp. 121-131.
- Van de Graaf A.A., Mulder A., de Bruijn P., Jetten M.S., Robertson L.A., Kuenen J.G. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process, *Appl Environ Microbiol.* 61(4): 1246– 1251.
- Van Hulle S.W.H., Van den Broeck J., Maertens J., 2005. Costruction, start up and operation of a continuously aerated laboratory scale SHARON reactor in view of coupling with anammox, *Water Science and Technology* 120: 256–270.
- Wang T., Zhang H., Yang F., Liu S., 2009. Start-up of the Anammox process from the conventional activated sludge in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology* 100: 2501–2506.
- Wett B. 2009. Key parameters for control of DEMON deammonification process. *Proc. WEFTEC*, pp. 225-246.
- Zhang P., Zheng P., Tang C. 2008. Anaerobic ammonium oxidation for treatment of ammonium-rich wastewaters. *J Zhejiang Univ Sci B* 9(5): 416-426.

## Allegato A

### CALCOLO DELLA QUANTITA' DI OSSIGENO NEI VARI SISTEMI PER L'ABBATTIMENTO DELL'AZOTO

Uno degli elementi necessari all'abbattimento dell'azoto in un fango digestato è l'ossigeno: il suo compito all'interno di queste reazioni è quello di accettore o donatore di elettroni. Il suo calcolo può essere diverso per ogni tipologia di reazione, di impianto e di fango trattato. Il calcolo che segue si basa sul metodo Eckenfelder O'Connor che ci permette di calcolare l'AOR (actual oxigen rate – giornaliera).

Nel caso di un impianto di **NITRO-DENITRO** classico (con un liquame suino dopo separazione solido/liquido, dopo decantazione o flottazione) per la trasformazione dell'azoto ammoniacale in azoto gassoso la formula proposta per il calcolo è la seguente:

**AOR ( kg O<sub>2</sub>/giorno) =**

$$a^* x (S_0 - S) x Q + b x X x V + K'(NH_{4,0} - NH_4) x Q - 2,8 (NH_{4,0} - N_D)$$

$a^*$  = frequenza respiratoria del substrato

$S_0$  = BOD<sub>5</sub> dell'alimento prima dell'aerazione (kg/m<sup>3</sup>)

$S$  = BOD<sub>5</sub> dell'effluente dopo l'aerazione (kg/m<sup>3</sup>)

$\Delta S$  = riduzione substrato (kg BOD<sub>5</sub>/m<sup>3</sup>)

$b$  = tasso di respirazione endogena =

= 0,1 ( 0,10-0,15 ) trattamento biologico

= 0,066, trattamento chimico-biologico

$N_D$  = azoto totale nell'effluente (kg/m<sup>3</sup>)

$X$  = concentrazione del fango (kgMLVSS/m<sup>3</sup>)

$Q$  = flusso influente (m<sup>3</sup>/giorno)

$V$  = volume del bacino di aerazione (m<sup>3</sup>)

$K'$  = coefficiente di ossigenazione dell'ammonio = 4,6

$NH_{4,0}$  = concentrazione dell'azoto ammoniacale nell'influente (kg/m<sup>3</sup>)

$NH_4$  = concentrazione dell'azoto ammoniacale nell'effluente (kg/m<sup>3</sup>)

$$\Delta \text{NH}_4 = (\text{NH}_4\text{-N}) \text{ riduzione (kg/m}^3\text{)}$$

La formula si divide in 4 parti:

1) la prima rappresenta il **consumo di ossigeno per la sintesi batterica**  $a^* \cdot (S^0 - S)$ . **Q** che dipende dal COD (stimabile a partire dal BOD5). Facendo un esempio di calcolo con un liquame suino dopo separazione solido/liquido (dopo decantazione o flottazione) con un COD di 6000 ppm e un 1000 ppm di N-NH<sub>4</sub> per un carico giornaliero di 100 kg N-NH<sub>4</sub> (= 100 m<sup>3</sup>/d) abbiamo =  $a^*$  (= substrate respiration rate, con un valore medio pari a 0,45) x 6 (kg/m<sup>3</sup> COD, per semplicità consideriamo che tutto il COD sia degradabile; considero solo S<sup>0</sup> e un S pari a 0) x 100 m<sup>3</sup>/d = **+270 kg** ossigeno richiesto per sintesi batterica;

2) la seconda quantifica il **consumo di ossigeno per autossidazione** (processi di autorespirazione che consumano il fango) cioè  $b \cdot X \cdot V$  dove  $b$  (= endogenous respiration rate = 0.1 può andare bene, dipende da temperatura, 20°C nel nostro esempio, e dall'età del fango: vedi VISMARA a pg 140;  $b$  andrebbe moltiplicato per un fattore  $f = 1,014 \cdot e^{(-0,017 \cdot \text{età fango in gg})}$ , dove età fango = quantità totale fango nel digestore / quantità di fango che esce dallo spurgo al giorno; ad esempio per un'età fango di 10-15 gg abbiamo un  $f = 0,80$ ),  $X$  (= sludge concentration = kg/m<sup>3</sup> di solidi volatili in vasca, cioè sono i batteri stessi; considerando 4 kg/m<sup>3</sup> di solidi totali di cui 80% volatili abbiamo 3,2 kgMLVSS/m<sup>3</sup>) e  $V$  (aeration basin volume = per il nostro liquame (20°C) considerando un carico volumetrico di N globale di 0,2 kg/m<sup>3</sup> abbiamo bisogno, tra nitro e denigro, di ca 500 m<sup>3</sup> di vasche) quindi  $0,1 \cdot 3,2 \cdot 500 =$  **+160 kg** ossigeno richiesto per autorespirazione;

3) la terza ci dà il **consumo di ossigeno per l'ossidazione dell'ammonio a nitrato**  $k'$ . **(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-NH<sub>4</sub>)** dove  $k'$  (=ammonium oxygenation coefficient = 4,6 = NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + 2O<sub>2</sub> --> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O + 2H<sup>+</sup> cioè 4 atomi di ossigeno per uno di azoto =  $4 \times 16/14 = 4,57$ ) x i 100 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = **+460 kg** ossigeno richiesto per l'ossidazione dell'ammonio;

4) la quarta ci permette di considerare **l'ossigeno recuperato nella fase di denitrificazione -2,8 .(NH<sub>4</sub><sup>o</sup>-ND)** = (2,8 sono i kg di ossigeno recuperati per la riduzione di 1 kg di NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ad azoto-gas, = ogni atomo di N+5 (nitrato) richiede 5 elettroni per passare a N<sup>o</sup> (gassoso) e l'ossigeno 2- ne cede 2 per passare a O<sup>o</sup> gassoso, quindi per ogni N+5 (servono 5 elettroni) si libera 2,5 O (libera 5 elettroni) = 2,5 x 16 = 40/14 = 2,85) = 2,8 x 100 = **-280 kg** ossigeno restituiti al sistema dalla fase denitro.

→ Quindi riassumendo AOR = +270 +160 +460 -280 = **610 kg O<sub>2</sub>/giorno**

Il prossimo passo è la conversione dell'AOR (kg O<sub>2</sub>/d) a SOTR (standard oxygen transfer rate kg O<sub>2</sub>/h) dove :

$$SOTR = (1/\alpha) \times (C^*_{\infty 20} / (\beta \times C^*_{\infty} - C_L)) \times \theta^{20-T} \times AOR \times (1/24) \times K_1$$

$\alpha$  = coefficiente di trasferimenti dell'ossigeno e dipende dal sistema di aerazione (= 0,8 per turbine superficiali o = **0,6 per diffusori a bolle fini, piattelli**);

$\beta$  = coefficiente legato alla salinità (= **0,98**);

$C^*_{\infty 20}$  = solubilità dell'ossigeno in acqua a 20°C (= 9,08 mg O<sub>2</sub>/l)

$C^*_{\infty}$  = solubilità dell'ossigeno in acqua alla temperatura di esercizio, nel nostro caso ipotetico è 20°C (= 9,08 mg O<sub>2</sub>/l) e **CL** (actual oxygen concentration in aeration tank = 2,0, pari alla saturazione del 20 %, circa 10 mgO<sub>2</sub>/L al 20% = 2,0).

$$(C^*_{\infty 20} / (\beta \times C^*_{\infty} - C_L)) = 9.08 / (0,98 \cdot 9,08) - 2,0 = \mathbf{1,316};$$

$\theta$  = 1,024 elevato a 20-T (=20°C) quindi 1,024 elevato alla 0 = **1**;

**k'** = flou rate correction coefficient è ca. = **1** (per un t >> 24; abbiamo un bacino di aerazione di 500 m<sup>3</sup> / 4,16 m<sup>3</sup>/h (pari a 100 m<sup>3</sup> al giorno) = 120 h = t).

t	24	12	8	4	2
K <sub>1</sub>	1,10	1,25	1,35	1,40	1,50

Con  $t = V / Q_{dim}$   $V =$  volume bacino di aerazione  $m^3$   
 $Q_{dim} =$  dimensionamento flusso dell'acqua  $m^3/h$

Calcolando abbiamo

$$SOTR = 1,666 \times 1,316 \times 1 \times 610 \times 1/24 \times 1 = 55,7 \text{ kg O}_2/h$$

$$= 2,2 \times 610 = \underline{1342 \text{ kg O}_2/d \text{ pari a } 13,4 \text{ kg O}_2 \times \text{kg N-NH}_4^+}$$

ove 2,2 è il valore che si ottiene moltiplicando tutti i parametri utili per la conversione (escluso AOR, ovviamente).

Nel caso di un impianto **ANAMMOX** alimentato con lo stesso liquame dopo digestione anaerobica con 500 ppm COD digeribile = 0,5 kg COD/m<sup>3</sup> avremo:

1) consumo di ossigeno per sintesi batterica (abbiamo 1/12° di COD, pari a 500/6000, quindi 1/12 di 270 kg di ossigeno richiesto = + **22,5 kg** ossigeno richiesto per sintesi batterica;

2) l'età fango è altissima, quindi f tende a 0; possiamo ritenere ragionevole un valore pari a 1/10 di quello precedentemente proposto = +**20 kg** ossigeno richiesto per autorespirazione;

3) consumo di ossigeno per il processo anammox:  $1 \text{ NH}_4^+ + 1,25 \text{ NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 0,25 \text{ NO}_3^-$ , dobbiamo ossidare  $100/2,25 \times 1,25 = 55,5 \text{ kg}$  di N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a nitrito anziché a nitrato e per fare questo ci servono 6 elettroni (da N-3 (ammonio) a N+3 (nitrito)) pari a  $3 \text{ O} = 3 \times 16 = 48/14 = 3,428 \text{ kg}$  ossigeno per ossidare a nitrito 1 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, quindi  $55,5 \times 3,428 = 190,25 \text{ kg}$  ossigeno. A questi dobbiamo aggiungere l'ossigeno richiesto per la formazione di 0.25 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (servono 2 elettroni pari a 1 O = 16/14 = 1,14 kg ossigeno per ossidare a nitrato 1 kg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; ora dei 100 kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> quanti diventano

nitrate?  $100/2,25 \times 0,25 = 11,1$  kg di N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> che si trasformano in N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durante il processo anammox, quindi  $11,1 \times 1,14 = 12,65$  Kg ossigeno richiesti. In totale abbiamo  $190,25 + 12,65 = \mathbf{202,9}$  kg ossigeno per ossidare l'ammonio a azoto gassoso + nitrate nel processo anammox (AOR).

Quindi riassumendo AOR =  $+22,5 + 20 + 202,9 = \mathbf{245,4}$  kg O<sub>2</sub>/die

SOTR =  $2,2 \times 245,4 = \underline{\underline{539,88 \text{ kg O}_2/\text{d pari a } 5,4 \text{ kg O}_2 \times \text{kg N-NH}_4^{\pm}}}$

Quindi confrontando i 2 processi abbiamo un consumo di energia elettrica per l'aerazione pari a  $13,4/3$  (con insufflazione d'aria a bolle fini utilizziamo circa 1 kWh x insufflare 3 kg di ossigeno) = **4,47 kWh/kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> per la NITRO-DENITRO** vs  $5,4/3 = \mathbf{1,8}$  kWh/kg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> per l'ANAMMOX con un risparmio di energia elettrica del 60%.

A questo bisogna aggiungere l'energia prodotta dalla cogenerazione con la digestione anaerobica a monte del processo ANAMMOX.

Nel liquame suino dopo decantazione abbiamo 6000 ppm COD che diventano 1000 ppm (500 ppm degradabili e 500 non degradabili) dopo digestione anaerobica. Quindi abbiamo  $6000 - 1000 = 5000$  ppm COD utilizzati nel processo anaerobico.

Pertanto  $5 \text{ kg COD}/\text{m}^3 \times 100 \text{ m}^3 = 500 \text{ kg COD}$  che moltiplicati per 0,35 (= fattore di conversione di COD in metano) =  $175 \text{ m}^3$  di metano. Ora  $175 \times 3,9$  (fattore di conversione  $\text{m}^3 \text{ CH}_4$  in kWh elettrico) =  $682,5 \text{ kWh elettrico} \times 0,208$  (incentivo GSE) = 142 €.

Considerando che il metano produce non solo un 38-40% di energia elettrica (682,5 kWh) ma anche un 45% di energia termica, abbiamo ulteriori circa 770 kWh termici a disposizione.

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringrazia per l'enorme disponibilità e la collaborazione lo staff della ditta Eurotec WTT, in particolare il Dott. Maurizio Tiarca e il Dott. Matteo Cipani. Un forte ringraziamento al prof Giuseppe Concheri e al prof. Andrea Squartini dell'Università di Padova per l'aiuto e per la pazienza di questi mesi di tesi. Ringrazio la Mia famiglia che mi ha sostenuto per tutti questi anni, tutti gli amici che non ne potevano più di vedermi fare la bella vita universitaria e tutti coloro che in questi anni mi hanno a vari livelli aiutato.