



Università degli Studi di Firenze

DOTTORATO DI RICERCA IN
"Ingegneria Civile ed Ambientale"

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Francesca La Torre

*"Le potenzialità e i limiti del bio-arricchimento nel controllo
del processo di nitrificazione"*

Settore Scientifico Disciplinare ICAR/03

Dottorando

Dott. Mannucci Alberto

Tutore

Prof. Lubello Claudio

(firma)

(firma)

Indice

<i>Introduzione</i>	5
<i>1 Capitolo Introduttivo</i>	8
1.1 L'azoto	8
1.1.1 Problematiche connesse all'azoto	11
1.2 La Nitrificazione	12
1.3 Bio-arricchimento	16
1.3.1 Bio-arricchimento di biomassa nitrificante	19
1.3.2 Bio-arricchimento esterno	21
1.3.3 Bio-arricchimento in situ	25
1.3.4 Basi teoriche del bio-arricchimento	28
1.4 L'evoluzione del controllo del processo di nitrificazione.....	51
1.5 Fenomeni di inibizione.....	66
<i>2 Materiali e Metodi</i>	72
2.1 Gli impianti	72
2.1.1 L'impianto Cuoidepur S.p.a.....	72
2.1.2 Gli impianti pilota della filiera Main-Stream.....	76
2.1.3 L'impianto pilota della filiera Side-Stream	87
2.2 Il refluo trattato	91
2.3 Avvio e gestione degli impianti pilota	92
2.3.1 Impianto Side-Stream	92
2.3.2 Impianti Main-Stream	93
2.4 Metodologia di analisi dei parametri di processo	94
2.4.1 Campionamento	94
2.4.2 Metodi analitici	96

2.4.3	Parametri di interesse per il monitoraggio degli impianti pilota.....	98
2.5	Modellistica di processo.....	100
2.5.1	Il modello ASM1	100
2.5.2	Modello ASMN.....	106
2.6	Test cinetici sulla biomassa nitrificante	111
2.6.1	Test batch	112
2.6.2	Test titrimetrici in continuo.....	113
2.7	Analisi microbiologiche	123
2.7.1	Campionamento	123
2.7.2	PCR	123
2.7.3	Elettroforesi.....	125
2.7.4	T-RFLP (Terminal – Restriction Fragment Length Polymorphism)	125
2.7.5	Elettroforesi capillare	126
2.7.6	Analisi dei dati	127
3	<i>Risultati e Discussioni</i>	128
3.1	Start-up dell'impianto pilota della filiera Side-Stream	128
3.2	Funzionamento dell'impianto Side-Stream allo stato stazionario	132
3.3	Funzionamento degli impianti Main-Stream allo stato stazionario	134
3.4	Effetto del bioarricchimento sull'efficienza del processo di nitrificazione	140
3.5	Test cinetici batch	144
3.6	Test Microbiologici.....	147
3.6.1	Determinazione del numero di Unità Tassonomiche Operazionali (OTU)	147
3.6.2	Definizione del grado di diversità microbica.....	150
3.6.3	Determinazione qualitativa della comunità batterica.....	155
3.6.4	Analisi multivariata dei dati.....	162
3.7	Analisi modellistica.....	172
3.7.1	Filiera Side-Stream	172

3.7.2	Filiera Main-Stream: Impianto MBR.....	175
3.8	Test titrimetrici.....	184
3.9	Valutazione dell'effetto di rapide variazioni di temperatura sul massimo rateo di nitrificazione.....	189
	Conclusioni.....	192
	Riferimenti Bibliografici.....	196

Introduzione

La presente tesi di dottorato ha riguardato lo studio, a scala pilota, del processo di bio-arricchimento di biomassa nitrificante.

Con il termine bio-arricchimento, o bio-augmentation, si intende una procedura che consiste nell'immettere organismi all'interno di bioreattori allo scopo di incrementare l'efficienza di un determinato processo. Le prime applicazioni del processo di bio-augmentation nel campo dell'ingegneria ambientale hanno riguardato la decontaminazione di suoli ed erano basate sull'inoculo di biomassa caratterizzata da elevate cinetiche di crescita all'interno di siti contaminati allo scopo di aumentare la capacità depurativa del sistema. Nonostante la semplicità della teoria originale, la frequenza dei fallimenti è rimasta elevata e costante nel tempo almeno fino alla fine degli anni '90. A partire dai primi anni del 2000, la diffusione di tecniche avanzate di biologia molecolare ha permesso di individuare nel processo di selezione della biomassa da inoculare un fattore chiave per la buona riuscita del processo di bio-augmentation e per la riduzione della frequenza dei fallimenti.

L'applicazione della bio-augmentation all'interno di impianti di trattamento delle acque reflue, in linea di principio, costituisce un'interessante soluzione per il raggiungimento di efficienze di rimozione superiori a quelle normalmente raggiungibili all'interno del comparto biologico. Ad oggi, tuttavia, gran parte delle applicazioni riguardano il trattamento di reflui particolari e comportano, di conseguenza, l'adozione di soluzioni ad hoc per la rimozione di inquinanti specifici, diverse a seconda del refluo. Nonostante la sempre maggiore diffusione del processo, molti aspetti della bio-augmentation necessitano di un approfondimento da un punto di vista scientifico allo scopo di poterne estendere il campo di applicazione e limitarne i fallimenti.

Il processo di nitrificazione che ha luogo in sistemi a fanghi attivi per il trattamento di acque reflue costituisce da questo punto di vista il contesto ottimale per lo studio del processo di bio-augmentation. Si tratta infatti di un processo semplice, che prevede, per entrambi gli step che lo compongono, la presenza di un solo substrato (ammonio o nitrito) e di un solo prodotto (nitrito o nitrato), l'azione di organismi in gran parte noti alla comunità scientifica, così come è nota la stechiometria delle reazioni di ossidoriduzione alla base della nitrificazione. Queste caratteristiche rendono la nitrificazione un processo ideale per lo studio sistematico dei fenomeni di rilievo per la comprensione e l'ottimizzazione della bio-augmentation.

Ad oggi, l'applicazione della bioaugmentation al processo di nitrificazione è stata studiata quasi sempre a scala di laboratorio utilizzando reattori sequenziali (SBR) o CSTR. Nei casi in cui

l'aspetto modellistico del processo è stato abbondantemente approfondito i risultati non vengono adeguatamente validati da dati sperimentali e, viceversa, l'applicazione del processo a scala reale manca spesso di un'adeguata calibrazione dei parametri dei modelli.

L'obiettivo della sperimentazione oggetto della presente tesi di dottorato è quello di studiare a scala pilota il processo di bioaugmentation mediante l'utilizzo di un impianto MBR (Side-Stream) alimentato con reflui con un'elevata concentrazione di ammonio e dove possa essere selezionata, ad elevate concentrazioni, biomassa nitrificante caratterizzata da elevate cinetiche di crescita. Tale biomassa potrà quindi essere inoculata all'interno di due impianti gemellici con i quali viene simulato il processo di nitrificazione in un impianto di depurazione di reflui civili (filiera Main-Stream). I due impianti differiscono unicamente per il sistema di separazione finale solido/liquido: un MBR e un impianto convenzionale dotato di sedimentatore (CAS). La scelta di studiare il processo su due impianti diversi è stata fatta allo scopo di valutare se, e come, il sistema di separazione della biomassa influenzi l'efficacia dell'inoculo ed è dettata dal fatto che in un impianto MBR è possibile garantire un controllo più efficace delle diverse condizioni operative, tra cui l'età del fango. Questo permette di studiare il processo nella condizione migliore per il controllo dei parametri, quella cioè che prevede l'utilizzo di reattori MBR sia per la filiera Side-Stream che per quella Main-Stream, soluzione questa mai studiata relativamente all'applicazione della bio-augmentation al processo di nitrificazione.

L'efficacia del processo di bioaugmentation è stata valutata mediante il monitoraggio dei parametri di processo dei tre impianti pilota, l'esecuzione di test cinetici per la caratterizzazione della biomassa, l'applicazione di strumenti modellistici e l'esecuzione di analisi filogenetiche sulla biomassa selezionata all'interno degli impianti.

Nel corso della sperimentazione è stata messa a punto un prototipo di strumentazione per l'esecuzione di test titrimetrici on-line per la determinazione in continuo del rateo massimo di nitrificazione della biomassa presente all'interno dell'impianto MBR con l'obiettivo di validare una tecnica innovativa di controllo del processo di ossidazione dell'azoto ammoniacale.

L'intera sperimentazione è stata eseguita presso i locali del Laboratorio CER²CO (Laboratorio congiunto tra il Dipartimento di Ingegneria Civile ed Ambientale dell'Università di Firenze ed il Consorzio CuoidepurSpA) situati all'interno dell'impianto di depurazione gestito dal consorzio Cuoidepur Spa (San Romano – San Miniato, Pisa) ed ha visto il coinvolgimento del Dipartimento di Biologia dell'Università Pisa all'interno del quale sono state eseguite le analisi di biologia molecolare.

La presente tesi in cui si riassume l'attività svolta nel corso del triennio 2010-2102 è strutturata in tre parti distinte:

Capitolo introduttivo. All'interno del Capitolo, dopo aver inquadrato il problema relativo alla presenza dei composti azotati nei corpi idrici (*Sezione 1.1*) e descritto il processo di rimozione dell'azoto ammoniacale dalle acque reflue negli impianti di depurazione (*Sezione 1.2*) viene fornita una descrizione dettagliata del processo di bio-arricchimento, ed approfondita la sua applicazione al processo di nitrificazione. All'interno del *paragrafo 1.3.4* il processo di bio-arricchimento è affrontato dal punto di vista teorico concentrando l'attenzione sugli effetti della relativa implementazione sui parametri del processo biologico, e sull'effetto della temperatura e dell'età del fango sul processo stesso. Sono inoltre riportati risultati di diversi studi in cui è stata valutata l'influenza del sistema di separazione solido-liquido e delle condizioni operative sul processo di selezione batterica e analizzate le problematiche e gli insuccessi legati all'applicazione della bio-augmentation.

Nella *Sezione 1.4* è descritta in dettaglio l'evoluzione delle diverse tecniche di monitoraggio e di controllo del processo di nitrificazione allo scopo di introdurre la tecnica titrimetrica innovativa testata e validata nel corso della sperimentazione.

Nella sezione finale (*Sezione 1.5*) vengono descritti i fenomeni di inibizione del processo di nitrificazione che saranno poi implementati all'interno del modello matematico utilizzato per la rappresentazione dei dati sperimentali ottenuti nel corso del monitoraggio degli impianti pilota e dell'esecuzione dei test cinetici.

Materiali e metodi. All'interno del capitolo viene inizialmente descritto l'impianto di depurazione CuoiodepurSpA ponendo l'attenzione sulle prospettive per il trattamento dei reflui all'interno del distretto toscano del cuoio e sulle modifiche che l'impianto stesso potrebbe subire in futuro. All'interno delle *Sezioni 2.2, 2.3 e 2.4* sono riportate le caratteristiche del refluo trattato, sono descritti in dettaglio gli impianti pilota utilizzati per la sperimentazione e le tecniche di monitoraggio del processo di nitrificazione. Gli strumenti modellistici utilizzati nel corso dello studio sono descritti all'interno della *Sezione 2.5*. I test batch e i test titrimetrici in continuo eseguiti allo scopo di fornire la caratterizzazione cinetica della biomassa e valutare gli effetti sulla stessa del processo di bio-augmentation sono descritti nella *Sezione 1.6*. Nella *Sezione 1.7* sono infine descritte le tecniche di indagine molecolare mediante le quali è stato valutato l'effetto del bio-arricchimento sulla selezione batterica.

Risultati e discussione. Il Capitolo finale della tesi è dedicato alla presentazione dei risultati ottenuti nel corso della sperimentazione e alla discussione degli stessi.

1 Capitolo Introduttivo

1.1 L'azoto

L'azoto (simbolo chimico N) è un elemento presente in natura in abbondanti quantità all'interno dell'atmosfera, della quale costituisce circa il 79%. Allo stato puro è un gas inodore, incolore e leggermente meno denso dell'aria, costituito da molecole biatomiche rese estremamente stabili dalla presenza di un triplo legame. Questa caratteristica lo rende particolarmente adatto all'utilizzo nell'industria alimentare e metallurgica al posto dell'ossigeno per evitare l'innescare di reazioni di ossidazione. L'azoto trova ampio impiego nella preparazione dell'ammoniaca, dell'acido nitrico, dell'urea e della calciocianammide (CaNCN, fertilizzante azotato e insetticida) (Passannanti, et al., 2000). E' inoltre un nutriente essenziale per molti organismi sottoforma di specie reattive (legato a idrogeno, ossigeno o carbonio) tra cui, le più comuni sono i composti organici azotati, ossidi di azoto (NO_x), nitrati (NO₃⁻), ione ammonio (NH₄⁺) e ammoniaca (NH₃).

Il ciclo dell'azoto è un ciclo biogeochimico attraverso il quale l'elemento si muove tra l'atmosfera (che costituisce circa il 90% della riserva globale di azoto), l'acqua, il terreno (che costituisce circa il 10% della riserva globale) e gli esseri viventi (Figura 1-1).

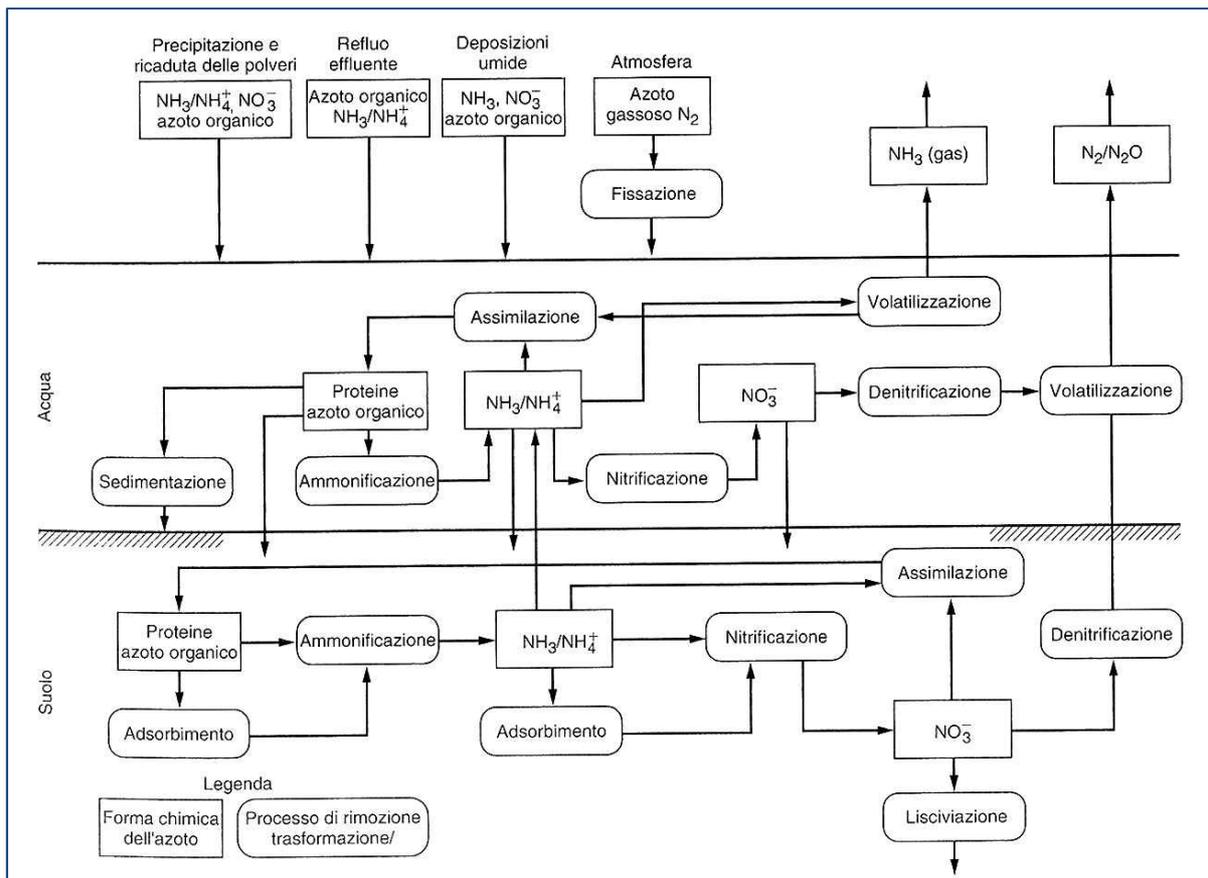


Figura 1-1 - Serbatoi globali di azoto (kg N/anno) e flussi (unità x 10^9 kg N/anno).

Il ciclo dell'azoto (Figura 1-2) è influenzato da processi sia biologici che fisici, i quali a loro volta dipendono da diversi fattori ambientali, come la radiazione solare, le precipitazioni, la temperatura, le caratteristiche del terreno, la presenza di altri nutrienti e la concentrazione di anidride carbonica. Questi fattori controllano i flussi di azoto in ingresso e in uscita dal terreno e dalla vegetazione, influenzando quindi la massa della sostanza azotata in tali compartimenti, e di conseguenza la sua disponibilità.

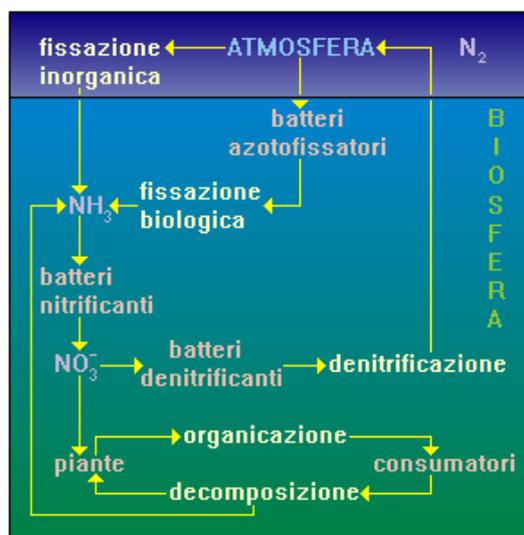


Figura 1-2 - Ciclo biogeochimico dell'azoto

Per far sì che possa essere disponibile ai primi utilizzatori, cioè le piante, l'azoto deve essere convertito in forme inorganiche: ammoniacca (NH_3), ammonio (NH_4^+), nitriti (NO_2^-) e nitrati (NO_3^-). Nel ciclo terrestre dell'azoto il processo dominante è quello che si svolge all'interno del suolo, dove gli ingressi più significativi sono costituiti, ad oggi, dall'applicazione di fertilizzanti e concimi. Alcuni microorganismi frammentano la sostanza organica e rendono l'azoto in essa contenuto disponibile nel suolo. Solo successivamente sono possibili la mineralizzazione, la nitrificazione, la lisciviazione dei nitrati, la denitrificazione e l'assimilazione da parte delle piante.

L'attività umana ha influenzato fortemente il ciclo biogeochimico dell'azoto, soprattutto a partire dal ventesimo secolo, successivamente al progressivo cambiamento nell'uso del suolo (come nel caso delle agricolture intensive), eccessivo utilizzo di fertilizzanti, deforestazione, utilizzo di combustibili fossili ecc.

1.1.1 Problematiche connesse all'azoto

La fissazione dell'azoto, cioè la sua conversione dalla forma inerte ad ammoniacale, ammonio, nitrati o ossidi di azoto, è un processo che si verifica in natura, ma che può essere ottenuto anche tramite processi artificiali. Il processo di fissazione naturale dell'azoto può verificarsi per mezzo dell'attività di microorganismi diazotrofi, che vivono in simbiosi con l'apparato radicale di piante leguminose, oppure tramite l'azione di radiazioni ad elevata energia, che convertono l'azoto inerte in ossidi dello stesso. Sono però le attività umane a dare il maggiore contributo complessivo nella fissazione dell'azoto: sintesi di fertilizzanti, combustione di carburanti, fissazione industriale.

Tali attività hanno portato in cento anni a decuplicare l'ingresso nell'ecosistema di NO_x e NH_x da attività umane. Dei circa 140 Tg N/anno introdotti nel ciclo dall'uomo, la maggior parte (61%) proviene dalla produzione di fertilizzanti, attraverso la conversione chimica di N_2 in NH_3 (processo *Haber-Bosch*). Poiché la conversione delle forme reattive dell'azoto alla sua forma stabile (N_2), attraverso il processo di denitrificazione, risulta inferiore al processo di fissazione, si verifica un accumulo dell'azoto, che ne disturba il ciclo negli ecosistemi terrestri, acquatici e nell'atmosfera.

L'immissione di azoto all'interno dell'atmosfera avviene quasi esclusivamente sotto forma di NO_x . Gli effetti di maggiore interesse dal punto di vista ambientale sono legati alla formazione di sostanze organiche azotate, che reagiscono con composti organici volatili per produrre ozono. Si possono inoltre formare acido nitroso (HNO_2) e acido nitrico (HNO_3), che possono avere effetti tossici quando raggiungono ambienti acquatici o terrestri.

L'ingresso dell'azoto nell'ecosistema terrestre è dovuto quasi totalmente alla deposizione atmosferica, oltre che all'utilizzo di fertilizzanti. La deposizione può essere secca, in forma di NO_2 e NH_3 , o umida, per mezzo delle precipitazioni. Le forme ridotte NH_x presentano un effetto di diretta tossicità sulla vegetazione, che quindi può risentire di un rallentamento della crescita. Inoltre la deposizione umida può portare al fenomeno di acidificazione del suolo con conseguenti gravi problemi alle specie di piante più sensibili.

Nell'ecosistema acquatico, ove si trova generalmente sotto forma di NH_4^+ , NH_3 , NO_2^- e NO_3^- , l'ingresso dell'azoto avviene attraverso corsi superficiali e sotterranei, deposizione atmosferica, fissazione da parte di procarioti, dissoluzione di materiali ricchi in azoto e decomposizione. L'ammoniaca è la forma più tossica ma, analogamente allo ione ammonio, è velocemente ossidata a nitrati, che risultano la forma più comune in ambiente acquatico. Anche quest'ultimi però, insieme ai nitriti, se presenti in concentrazioni troppo elevate (10 mg/L) comportano una elevata mortalità nelle popolazioni anfibe e ittiche.

L'incremento di disponibilità di azoto in acqua può anche stimolare la crescita e la proliferazione dei produttori primari (fitoplancton, alghe e altri organismi). In corsi fluviali e zone costiere in cui la concentrazione di azoto risulta un fattore limitante alla crescita, il rapido ed intenso sviluppo di specie fortemente competitive porta ad una riduzione della penetrazione della luce, e di conseguenza al decadimento o alla completa sparizione delle specie più sensibili. Il fenomeno di crescita eccezionale di alcuni produttori primari all'interno di ambienti acquatici è noto come eutrofizzazione. Ulteriori rischi connessi all'eutrofizzazione sono il rilascio di sostanze tossiche da parte di alcune specie algali durante la loro fioritura e il consumo anomalo di ossigeno dovuto alla decomposizione della sostanza organica formata. A causa delle elevate dimensioni che caratterizzano le fioriture algali si possono instaurare condizioni anossiche, note con il nome di ipossia. L'ipossia è una delle maggiori cause di morte per la popolazione ittica delle acque soggette a eutrofizzazione, oltre a essere la causa della formazione di composti ridotti tossici (come l'idrogeno solforato H₂S) (Van den Berg, et al., 2008).

1.2 La Nitrificazione

Gli impianti biologici di trattamento delle acque reflue costituiscono una componente fondamentale per la riduzione dell'inquinamento dei corpi idrici e devono essere progettati in modo da poter essere gestiti in maniera flessibile, in funzione delle caratteristiche dei reflui o delle condizioni ambientali. La variabilità delle caratteristiche dei reflui può generare problemi gestionali che vanno dall'eccessivo consumo di energia al calo di attività depurativa, come ad esempio un insufficiente abbattimento del carico organico o di nutrienti e tali sconvolgimenti nel processo depurativo sono spesso interpretabili come la naturale risposta delle biocenosi che compongono il fango attivo al cambiamento delle condizioni dell'ambiente in cui vivono. I molteplici processi che avvengono all'interno di una vasca di ossidazione biologica di un impianto di trattamento di acque reflue possono essere suddivisi in due gruppi, quello responsabile dei processi di ossidazione dei substrati carboniosi (compresa la denitrificazione) e quello responsabile dei processi di ossidazione dei composti azotati. Questi ultimi, comunemente conosciuti con il nome generico di processi nitrificanti, risultano essere cruciali per il buon funzionamento di un impianto di depurazione in quanto dal punto di vista biologico più delicati rispetto a quelli di ossidazione della sostanza organica, data la minore capacità della biomassa nitrificante di adattarsi ai cambiamenti dell'ambiente in cui è immersa e date le criticità degli effetti che eventuali crisi nelle vie di rimozione dell'azoto ammoniacale possono avere sui macro ecosistemi.

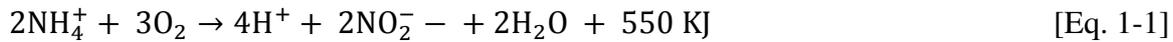
Dal punto di vista gestionale, governare l'andamento delle reazioni di nitrificazione in un impianto in opera può risultare complesso e non sempre gli sforzi condotti risultano efficaci. Tra tutti i processi di degradazione che un fango attivo è capace di portare avanti, la nitrificazione viene di norma considerata come il più fragile a causa di una forte dipendenza da una serie di processi spesso tra loro interconnessi: cinetiche di crescita della biomassa nitrificante lente rispetto a quelle della biomassa eterotrofa, effetti inibenti legati ad elevate concentrazioni di substrato (Ammoniaca e Acido Nitroso), effetti inibenti di composti che possono trovarsi occasionalmente (o sistematicamente) nei reflui in arrivo all'impianto di depurazione.

Affluenti che abbiano una forte variazione temporale nella concentrazione di nutrienti, nel tenore del COD, o nella concentrazione di composti inibenti possono causare sia l'arresto che un'improvvisa accelerazione del processo nitrificante. Considerare costante la velocità di nitrificazione di un fango è, quindi, un'approssimazione che può ridurre l'efficacia depurativa complessiva dell'impianto. Una sottostima di questi processi può causare uno spreco notevole di energia e di risorse usate per spingere al massimo i processi biologici; viceversa una loro sovrastima può portare ad un accumulo di intermedi nocivi nell'effluente, come l'ammoniaca e l'acido nitroso. Quando elevate concentrazioni di nutrienti (azoto e fosforo) si accumulano nel corpo idrico recettore possono verificarsi le condizioni alla base del fenomeno dell'eutrofizzazione, calo della concentrazione di ossigeno disciolto, casi di avvelenamento nella popolazione e morie improvvise di organismi acquatici. Di conseguenza è fondamentale che la gestione di un impianto di depurazione possa assicurare le condizioni necessarie affinché la biomassa responsabile del trattamento biologico sia in grado di mantenere un'adeguata attività nitrificante.

La rimozione dell'ammonio dalle acque reflue avviene in due fasi distinte: una di ossidazione dell'azoto ammoniacale con produzione di nitrati (nitrificazione) operata da microrganismi autotrofi in condizioni aerobiche e una di riduzione dei nitrati ad azoto gassoso (denitrificazione) in condizioni anossiche, generalmente per azione di microrganismi eterotrofi facoltativi.

La nitrificazione, in particolare, è un processo di ossidazione biologica caratterizzato dalla presenza di due step: l'ossidazione dell'ammonio a ione nitrito (nitrosazione) e l'ossidazione del nitrito a nitrato (nitratazione). I due processi avvengono in condizioni aerobiche per l'azione di due popolazioni batteriche distinte che utilizzano l'anidride carbonica come fonte di carbonio e l'ossigeno come accettore finale di elettroni: quelle appartenenti al gruppo dei batteri ammonio ossidanti (AOB, Ammonia Oxidizing Bacteria) e quelle appartenenti al gruppo dei batteri nitrito ossidanti (Nitrite Oxidizing Bacteria).

Le reazioni cataboliche dei processi di nitrosazione e nitratazione sono riportate in Eq. 1-1 e Eq. 1-2.



Dalle precedenti reazioni è possibile ricavare il valore della richiesta di ossigeno per l'ossidazione completa dell'ammoniaca a nitrati, che risulta pari a 4.57 g O₂/g N-NH₄⁺, somma di 3.43 g O₂/g N-NH₄⁺ (per l'ossidazione dell'ammoniaca a nitriti) e di 1.14 g O₂/g N-NO₂⁻ (per l'ossidazione dei nitriti a nitrati).

Il processo di nitrosazione è caratterizzato dalla produzione di ioni H⁺ che causano il consumo di 7.14 g di alcalinità come CaCO₃ per ogni grammo di azoto ammoniacale ossidato a nitrato:



All'ossidazione dell'ammonio, si accompagna il processo anabolico di crescita della biomassa che comporta l'assimilazione in nuovo tessuto cellulare di una parte dell'azoto ammoniacale:



Con la formula chimica C₅H₇NO₂ si indicano le cellule batteriche che vengono sintetizzate. Dalla Eq. 1-4 risulta che durante il processo di sintesi batterica viene prodotta una piccola quantità di ossigeno, che va a ridurre la richiesta delle fasi di ossidazione. In particolare, tenendo in considerazione questo apporto, risulteranno necessari 3.22 g O₂/g N-NH₄⁺ per l'ossidazione dell'ammoniaca a nitriti e 1.11 g O₂/g N-NO₂⁻ per l'ossidazione degli stessi a nitrati, da cui deriva una richiesta di ossigeno totale uguale a 4.33 g O₂/g N-NH₄⁺.

Dal punto di vista cinetico, la crescita di biomassa autotrofa è descritta dall'equazione di Monod (Eq. 1-5).

$$\mu' = \mu_{nm} \cdot \frac{N}{K_n + N} - k_{dn} \quad [\text{Eq. 1-5}]$$

Dove:

- μ'_n è il tasso netto di crescita dei batteri nitrificanti [T⁻¹];
- μ_{nm} è il tasso massimo di crescita dei batteri nitrificanti [T⁻¹];
- N è la concentrazione di azoto ammoniacale [mg L⁻³];

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

In letteratura è possibile trovare diversi valori del tasso massimo di crescita dei batteri nitrificanti, espressi in funzione della temperatura. In particolare, alla temperatura di 20°C μ_{nm} può variare tra 0.2 e 0.9 d^{-1} , variando al variare della temperatura secondo le Equazioni di Arrhenius, che però possono essere utilizzate in campi di temperatura abbastanza ristretti:

$$\text{Parametro (T)} = \text{Parametro (20}^\circ\text{C)} \theta^{(T-20)} \quad [\text{Eq. 1-6}]$$

$$\text{Parametro (T)} = \text{Parametro (20}^\circ\text{C)} e^{k(T-20)} \quad [\text{Eq. 1-7}]$$

In ogni caso, i valori di μ_{nm} sono sempre inferiori a quelli dei batteri eterotrofi, responsabili dell'abbattimento della sostanza organica, ed è quindi necessario imporre agli impianti biologici che devono operare la nitrificazione contemporaneamente alla ossidazione biologica della sostanza organica un tempo di residenza cellulare (SRT, Sludge Retention Time) superiore a quello necessario per garantire una completa rimozione del bCOD (Biodegradable Chemical Oxygen Demand).

Per tener conto della limitazione da ossigeno disciolto, la Eq. [1-5] viene modificata introducendo il termine relativo all'OD (Ossigeno Disciolto):

$$\mu' = \mu_{nm} \cdot \frac{N}{K_n \cdot N} \cdot \frac{OD}{K_o + OD} - k_{dn} \quad [\text{Eq. 1-8}]$$

Dove K_o rappresenta la costante di semisaturazione dell'ossigeno disciolto in mg L^{-1} .

Se l'ossigeno disciolto è presente in concentrazioni limitate si può verificare un'inibizione del processo di nitrificazione, particolarmente pronunciato per gli NOB, caratterizzati da valori maggiori di K_o rispetto agli AOB. Questo porta a una nitrificazione incompleta e all'aumento progressivo dei nitriti nell'effluente.

Oltre che dalla concentrazione di substrato e da quella dell'accettore di elettroni, l'efficienza del processo di nitrificazione è fortemente dipendente da numerosi fattori ambientali:

- *pH*: le cinetiche di nitrificazione subiscono una drastica riduzione per valori di pH inferiori a 6.8 e superiori a 8.5; per valori tra 5.8 e 6.0 le velocità possono assumere un valore pari a circa il 10-20% del valore assunto a pH=7. Le velocità ottimali di nitrificazione si conseguono per pH=7.5-8.0.

- *presenza di composti tossici*: l'attività dei batteri nitrificanti può essere condizionata da diverse sostanze organiche e inorganiche, che possono esercitare un effetto negativo anche in concentrazioni molto inferiori a quelle che condizionano l'attività dei batteri aerobici eterotrofi. Per questo i batteri nitrificanti sono da ritenersi ottimi indicatori della presenza di sostanze organiche per i quali risultano tossiche anche a modeste concentrazioni, tra cui i solventi organici, le ammine, le proteine, i tannini, i composti fenolici, gli alcoli, i cianati, gli eteri, gli uretani, ed il benzene.
- *metalli*: la presenza di metalli, in particolar modo nichel, cromo e rame, può rappresentare una potenziale causa di inibizione del processo di nitrificazione.
- *FA e FNA*: la nitrificazione è inibita anche dall'ammoniaca libera (FA) e dall'acido nitroso libero (FNA). Gli effetti di inibizione legati alla presenza di FA e FNA sono trattati in maniera più approfondita nel paragrafo 1.3.2.

1.3 Bio-arricchimento

In generale, per bio-arricchimento o bio-augmentation si intende una procedura che consiste nell'immettere organismi all'interno di siti contaminati, o di bioreattori, per ottenere una più rapida rimozione di composti nocivi. In riferimento all'origine degli organismi aumentati i processi di bio-augmentation sono suddivisibili in tre tipologie:

- *Bio-augmentation autoctona (BA)*, in cui i microrganismi aumentati vengono isolati direttamente dal mezzo che si vuole trattare (suolo, acqua) e re-inoculati all'interno dell'ambiente d'origine successivamente ad una fase di arricchimento (Madueno et al., 2011; Tale et al., 2011). BA e bio-stimulation differiscono nel fatto che mentre con la bio-stimulation si favorisce la crescita di tutta la biomassa autoctona, con la BA si va ad aumentare la concentrazione della sola frazione di biomassa autoctona in possesso di determinate caratteristiche metaboliche favorite nelle condizioni operative della fase di accrescimento.
- *Bio-augmentation alloctona (Allo-BA)*, in cui la biomassa viene isolata da un mezzo diverso da quello in cui verrà inoculata (Alvarez et al., 2011). La mancanza di adattamento della biomassa inoculata alle nuove condizioni ambientali (pH, Temperatura, salinità) comporta una minore probabilità di successo della Allo-BA rispetto alla BA. Inoltre, molto spesso, sono le condizioni biotiche, come la competizione per i nutrienti con le comunità autoctone e/o la presenza di "predation" da parte dei protozoi a compromettere la sopravvivenza

dell'inoculo anche in presenza di soluzioni ingegneristiche innovative come, ad esempio, l'immobilizzazione di biomassa alloctona in sistemi a fanghi attivi per il trattamento di acque reflue (Ma et al., 2011; Quan et al., 2011).

- Bio-augmentation genetica (Gen-BA), in cui si prevede l'inoculo di microrganismi geneticamente modificati (GEM, Genetically Engineered Microorganism). Applicazioni efficaci di Allo-BA hanno evidenziato che, nonostante si possa verificare la scomparsa nel tempo della biomassa inoculata, spesso si assiste ad un cambiamento della popolazione autoctona spiegabile dalla presenza di "elementi mobili di DNA", in particolare di plasmidi che possono essere trasferiti tra batteri via coniugazione. Tale evidenza è stata alla base del crescente interesse dedicato da parte della comunità scientifica alla selezione di "superbugs" (Singer et al., 2005) in possesso di caratteristiche in grado di permetterne la sopravvivenza in ambienti anche profondamente diversi tra loro. Nonostante i processi di Bio-augmentation siano stati rivoluzionati dall'utilizzo dei GEM (Mrozik et al., 2011), le stringenti regolamentazioni locali che impediscono di rilasciare in natura organismi geneticamente modificati e l'avversa posizione dell'opinione pubblica, limita ad oggi molti di questi alla scala di laboratorio (Paul et al., 2005; Alcalde et al., 2006; Singh et al., 2012).

Fino dai primi anni 2000 l'attività di ricerca si è concentrata principalmente sull'applicazione del bio-arricchimento all'interno di siti contaminati con una crescente attenzione ed un crescente numero di casi di studio relativi all'applicazione della bio-augmentation per il trattamento di suoli contaminati da petrolio e derivati, idrocarburi policiclici aromatici ed erbicidi (Semrany et al., 2012).

In generale, in riferimento ai siti contaminati, la bio-augmentation costituisce uno dei processi più controversi al punto da essere considerata da alcuni studiosi, nonostante diversi studi dimostrino il contrario, *"una soluzione costosa ed inefficace al pari della medicina voodoo"* (Thompson et al., 2005). Nonostante la semplicità della teoria originale alla base dell'applicazione dei processi di bio-arricchimento per la decontaminazione di ambienti inquinati (basata sull'incremento quantitativo di biomassa con elevati rendimenti catabolici) la frequenza dei fallimenti è rimasta elevata e costante nel tempo almeno fino ai primi anni 2000 (Bouchez et al., 2000; Vogel and Walter, 2001; Wagner-Dobler, 2003).

Benchè gli effetti della bio-augmentation siano funzione di un'enorme quantità di fattori, è con la diffusione di tecniche di biologia molecolare, caratterizzate da elevate affidabilità e costi contenuti, che nella comunità scientifica si fa strada l'idea che il processo di selezione della biomassa possa stare alla base della buona riuscita del processo secondo il concetto *"better selection, better*

performances” (Thompson et al., 2005). Nel 2001 Vogel and Walter (2001) dimostrano, inoltre, come il fenotipo dei ceppi batterici bioaugmentati, così come la procedura con cui l’ambiente viene bioaugmentato, ricoprono un ruolo fondamentale nel determinarne l’attività, la persistenza e le performance nell’ambiente ricevente. La crescente attenzione rivolta al processo di selezione batterica ha permesso una riduzione dei fallimenti dei processi di bio-augmentation stravolgendo il concetto di base, fino a quel momento basato sul semplice fatto di ottenere vantaggio dall’inoculo di biomasse caratterizzate da elevati ratei di crescita senza porre attenzione sulla storia pregressa della biomassa e su come le condizioni operative dell’ambiente inoculato potessero influenzarne il metabolismo. Un altro aspetto alla base dell’incremento dei successi ottenuti dall’applicazione della bio-augmentation nel campo della bio-remediation è la selezione e l’accrescimento di biomasse che originariamente si trovano in ambienti simili per condizioni ambientali (presenza/assenza di nutrienti, concentrazione di inquinante) a quello in cui dovranno essere inoculate (Belotte et al., 2003). Tuttavia, diversi ceppi batterici, anche geneticamente molto simili, mantengono caratteristiche diverse, in termini di capacità di sopravvivenza, quando introdotti come inoculo in ambienti diversi da quello di origine (Goddard et al., 2001) ed è di primaria importanza, allo scopo di limitare al minimo le inefficienze legate ad una cattiva selezione dell’inoculo, prevedere veri e propri programmi di selezione ed accrescimento batterico da seguire a monte della bio-augmentation. Tali procedure devono prevedere prima di tutto l’individuazione delle caratteristiche di degradazione richieste, l’individuazione dei ceppi batterici che le posseggano e il relativo accrescimento. In processi di questo tipo la fase di accrescimento risulta fondamentale in quanto dovrà portare alla produzione di elevati quantitativi di biomassa con caratteristiche ben definite ed è necessario che avvenga in condizioni controllate allo scopo di far sviluppare una popolazione batterica anziché un’altra (Van der Gast et al., 2003; 2004).

L’utilizzo del sistema di bio-arricchimento all’interno di impianti di trattamento delle acque reflue, in linea di principio, costituisce una soluzione interessante per il raggiungimento di efficienze di rimozione superiori a quelle attualmente raggiungibili all’interno del comparto biologico e sono presenti in letteratura diverse applicazioni del processo di bio-augmentation a reflui particolari, ad esempio, contenenti elevate concentrazioni di composti clorinati (Santharam et al., 2011), coloranti (Fan, 2011), composti farmaceutici (De Gussemme et al., 2011).

In generale, è evidente come la bio-augmentation sia una tecnica sempre più utilizzata per il trattamento e la depurazione di svariate matrici e come, a seconda del contesto, la sua diffusione sia favorita dalla facilità di applicazione e dagli elevati rendimenti che ne scaturiscono. Tuttavia, molti

degli aspetti empirici della bio-augmentation necessitano di essere spiegati da un punto di vista scientifico allo scopo di poterne estendere il campo di applicazione e limitare i fallimenti.

Il processo di nitrificazione che ha luogo in sistemi a fanghi attivi per il trattamento di acque reflue costituisce da questo punto di vista il contesto ottimale per lo studio del processo di bio-augmentation. Si tratta infatti di un processo semplice, che prevede per entrambi gli step che lo compongono la presenza di un solo substrato (Ammonio o nitrito) e di un solo prodotto (nitrito o nitrato), l'azione di organismi in gran parte noti alla comunità scientifica, così come è nota la stechiometria delle reazioni di ossidoriduzione alla base della nitrificazione. Studiare un processo con ancora diversi lati oscuri, come la bio-augmentation, applicato ad uno, invece, caratterizzato dalla presenza di un numero limitato di gradi di libertà rende lo studio, almeno da un punto di vista teorico, più semplice.

La sperimentazione su piccola scala del processo di bio-arricchimento di sistemi a fanghi attivi a biomassa sospesa, ha mostrato risultati interessanti, anche considerando lo scarso impatto economico previsto dalle soluzioni adottate qualora potessero essere applicate su scala reale (Salem et al., 2002; 2003). Nell'ultimo decennio, l'applicazione di modelli matematici ha permesso di valutare l'applicabilità del bio-arricchimento su scala reale anche al processo di nitrificazione risolvendo in parte i problemi legati alla scarsa prevedibilità del processo stesso (Salem et al., 2002; Salem et al., 2003). Nonostante questo, i sistemi di bio-augmentation per l'arricchimento dei fanghi attivi, tranne qualche eccezione (Novak e Havrilikova, 2004; Smith et al., 2008, Wanner et al 2009), risultano ancora poco diffusi a larga scala a causa dei numerosi inconvenienti legati all'evoluzione del processo che ancora persistono in situazioni diverse, sia dal punto di vista impiantistico che concettuale.

1.3.1 Bio-arricchimento di biomassa nitrificante

Solitamente, all'interno degli impianti di depurazione delle acque reflue il processo di nitrificazione avviene nello stesso comparto in cui si ha la rimozione della sostanza carboniosa ad opera di batteri eterotrofi, che presentano cinetiche di crescita superiori rispetto agli autotrofi. Questo significa che nei sistemi a fanghi attivi tradizionali il tempo di residenza cellulare necessario a garantire sufficienti ratei di nitrificazione viene applicato anche a tutti i batteri eterotrofi, e in generale a tutti i solidi sospesi presenti nell'impianto. Inoltre, la rimozione dell'azoto ammoniacale costituisce, spesso, una criticità a causa delle basse temperature ($< 15^{\circ}\text{C}$) causando la necessità di prevedere un aumento dei volumi necessari al comparto biologico che risultano elevati e molto superiori a quelli necessari per la rimozione della sostanza carboniosa. Questo si traduce in un aumento dei costi per

la gestione dell'intero comparto biologico, soprattutto per quanto riguarda l'aerazione e i costi d'investimento.

Allo scopo di incrementare l'efficacia del processo di nitrificazione e di svincolare l'età del fango del processo da quella minima necessaria per garantire la presenza di batteri nitrificanti all'interno del sistema, è possibile prevedere l'applicazione del processo di bio-arricchimento della biomassa nitrificante, riducendo i problemi associati alle cinetiche lente dei nitrificanti e ottenendo vantaggi in termini di: minori volumetrie dei reattori, minor produzione di fanghi, minor consumo energetico, maggiore rimozione d'azoto.

La bio-augmentation della biomassa nitrificante garantisce, in linea teorica, un aumento del tasso di nitrificazione, permettendo una riduzione dell'età del fango (SRT) necessaria al raggiungimento di caratteristiche dell'effluente in linea con gli standard di qualità, e con essa una riduzione contemporanea del volume necessario alla nitrificazione (Rittmann, 1996; Head and Oleszkiewicz, 2003; Salem et al., 2003).

Una prima grossolana distinzione tra le configurazioni impiantistiche adottate a prescindere dal fattore di scala, permette di individuare due tipologie di bio-arricchimento:

- **Bio-arricchimento esterno**: prevede l'aggiunta di biomassa nitrificante proveniente da sorgenti esterne alla filiera dell'impianto;
- **Bio-arricchimento in situ**: prevede l'aggiunta di biomassa nitrificante cresciuta in reattori dedicati all'interno della filiera di trattamento dell'impianto.

La possibilità di utilizzare per la bio-augmentation una biomassa sviluppatasi sotto le stesse condizioni operative del reattore aerobico della linea di trattamento (batteri autoctoni) è, secondo alcuni autori (Head et al., 2004; Salem, et al., 2003; Van Limbergen and Top, 1998) preferibile all'introduzione di batteri nitrificanti alloctoni, potenzialmente non rappresentativi della popolazione batterica. Questo poiché nell'insieme dei fenomeni che compongono il decadimento endogeno della biomassa ricade anche l'attività predatoria di alcune componenti del fango (ad es. i protozoi) nei confronti delle frazioni più semplici dello stesso, inserendo una biomassa esterna essa potrebbe venir distrutta dalla biomassa indigena del sistema. Yu et al. (2011), ad esempio, nonostante non sia evidente l'effetto della predazione sull'efficienza del processo di bioaugmentation, hanno evidenziato un'influenza significativa della predazione stessa soprattutto su batteri k-strategist a causa dei minori ratei di crescita rispetto agli r-strategist.

Considerando impianti di grandi dimensioni (> 100'000 A.E.) dotati di linea di trattamento fanghi, la bio-augmentation può, tuttavia, rappresentare una soluzione molto interessante. Facendo

sviluppare la biomassa nitrificante in un reattore separato, sfruttando flussi ad elevato carico di azoto ammoniacale ed a temperatura relativamente alta provenienti dalla linea fanghi (come ad esempio il surnatante del digestore anaerobico), si ottengono numerosi vantaggi, tra cui la riduzione dell'azoto in ingresso al comparto biologico eliminando la componente proveniente dalla linea fanghi (Janus, et al., 1997). L'applicazione di tale processo permette l'ottenimento di una biomassa nitrificante molto concentrata su una filiera secondaria di trattamento biologico (Head, et al., 2004) che può, tuttavia, presentare una composizione diversa da quella autoctona del comparto biologico (Smith, et al., 2008).

A prescindere dalla caratterizzazione della biomassa inoculata, la configurazione di processo costituisce un fattore che può influire in maniera determinante sull'efficacia della bio-augmentation, non solo in termini di rimozione del substrato azotato, ma anche in termini di gestione dell'impianto: configurazioni diverse comportano risultati e problematiche differenti, per cui è importante andare a confrontare le diverse soluzioni testate e rese conseguentemente disponibili per la realizzazione del processo.

1.3.2 Bio-arricchimento esterno

Le soluzioni impiantistiche utilizzate per l'applicazione del bio-arricchimento esterno sono molteplici e in generale prevedono l'immissione di biomassa nitrificante proveniente da una sorgente esterna (Filiera Side-Stream) all'interno della filiera principale di trattamento biologico (Main-Stream) riducendo parzialmente l'effetto dell'età del fango del Main-Stream sull'efficienza di rimozione dell'azoto.

Di seguito è riportato un elenco delle principali soluzioni impiantistiche e gestionali:

- *Arricchimento con prodotti esterni:* in questo caso è possibile incrementare l'attività nitrificante con l'aggiunta di biomassa proveniente da fornitori esterni all'impianto di depurazione. Nonostante in alcuni casi di studio questa soluzione abbia permesso l'instaurarsi della nitrificazione anche a basse temperature gli elevati quantitativi di biomassa nitrificante necessari per effettuare il bio-arricchimento in continuo e la perdita di efficacia di biomasse esterne legata allo stoccaggio e all'inoculo all'interno della filiera di processo rendono, di fatto, inapplicabile tale processo a scala reale (Parker e Wanner, 2007).
- *Arricchimento con biomassa da reattori esterni a biomassa sospesa alimentati col surnatante di digestione dei fanghi:* diverse soluzioni impiantistiche sono state sperimentate a scala laboratorio e a scala pilota per l'applicazione del processo di bio-augmentation e la simulazione dei processi biologici all'interno delle filiere Side-Stream e Main-Stream, tra cui:

- Processo TF/PAS – *Trickling Filter/ Pushed Activated Sludge* (Daigger et al., 1993): è stato il primo esempio pratico di bio-arricchimento esterno con biomassa nitrificante generata all'interno dell'impianto di trattamento. Questo processo prevede la realizzazione di un letto percolatore il cui carico organico totale è regolato in modo tale da garantire una percentuale di nitrificazione del 50%; i microorganismi nitrificanti formatisi all'interno del letto vengono poi inviati a un processo a fanghi attivi con SRT di 2÷4 giorni, permettendo un incremento della rimozione di azoto, sia grazie all'immissione della biomassa nitrificante, sia grazie alla rimozione di sostanze tossiche o inibenti durante il passaggio attraverso il letto percolatore (Figura 1-3).

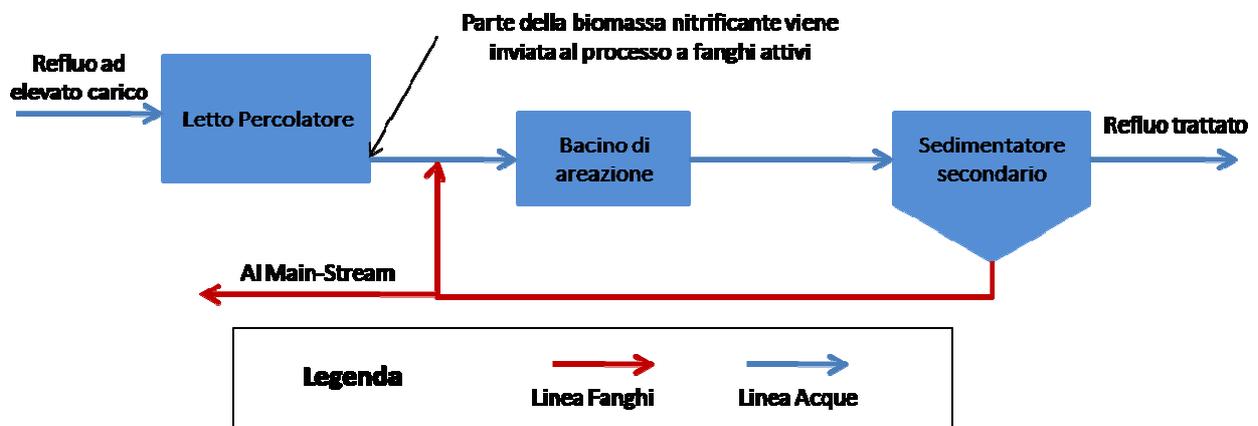


Figura 1-3 Diagramma del processo TF/PAS

- Arricchimento da processi paralleli: nelle diverse applicazioni sono stati tendenzialmente proposti due diversi schemi di processo (Figura 1-4). Nel primo si ipotizza di far crescere la biomassa nitrificante all'interno di un impianto MBR (*Membrane BioReactor*, Bioreattore a Membrana) per poi inviarla al comparto biologico della filiera principale di trattamento. Utilizzare un impianto MBR in cui si abbia completa ritenzione dei solidi permette l'ottenimento di elevate concentrazioni di biomassa attiva, anche di quella caratterizzata da ratei di crescita limitati come quella nitrificante. Il secondo schema prevede invece due filiere a fanghi attivi accoppiate tramite un trattamento a membrana: una delle due filiere è alimentata con flussi a elevato carico di ammonio ed ha a valle una separazione a membrana, processo dal quale si preleva il fango per l'arricchimento della biomassa nitrificante della seconda filiera.

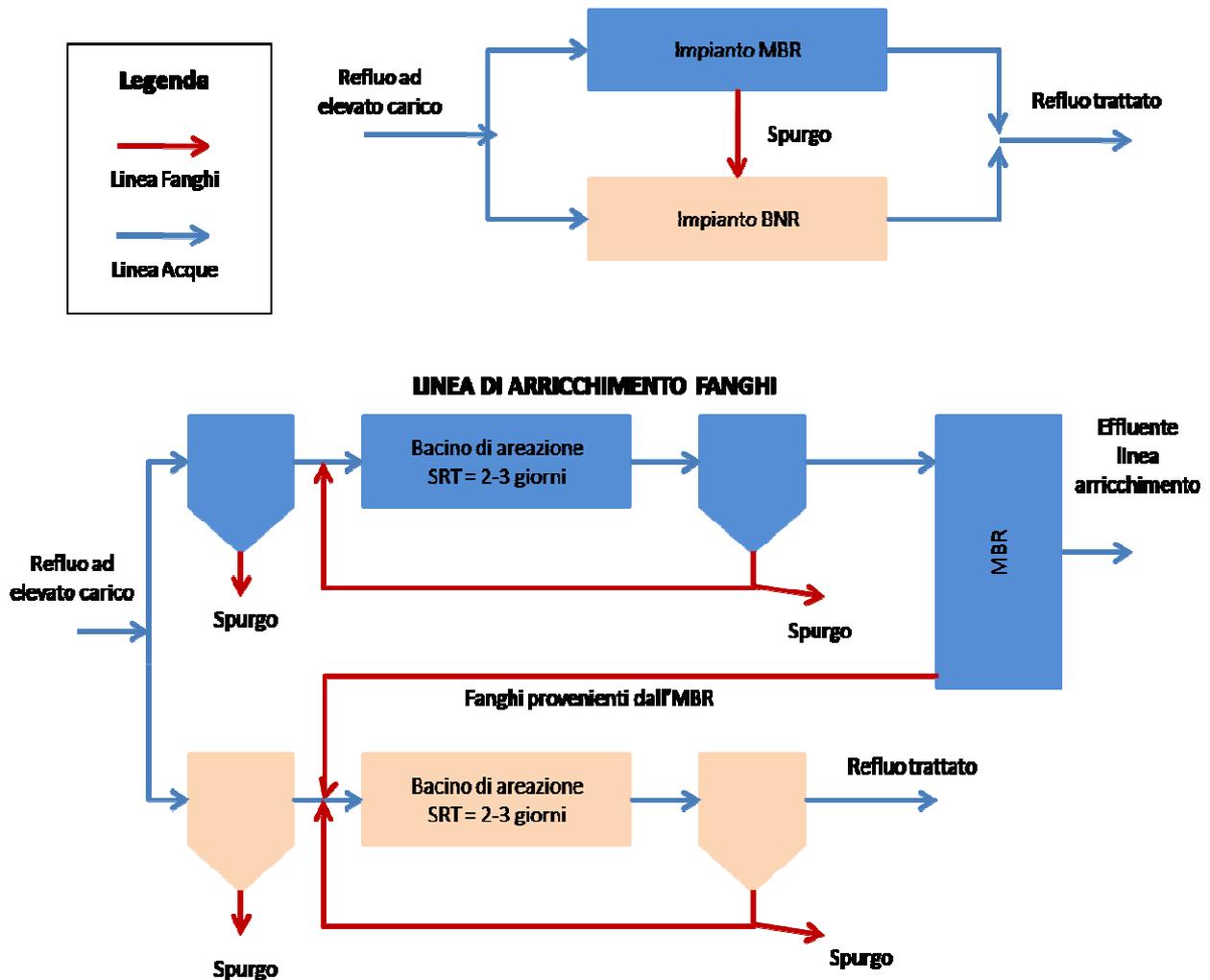


Figura 1-4 Sistemi di arricchimento da processi paralleli

- *Processo In-Nitri®*: è un processo basato sull'arricchimento della biomassa nitrificante contenuta nel Main-Stream con microorganismi sviluppatasi all'interno del reattore Side-Stream alimentato con flussi ad elevato carico di ammonio. L'alimentazione del Side-Stream può essere realizzata con il surnatante dalla digestione dei fanghi e/o il flusso liquido proveniente dall'ispessimento dei fanghi. Con questo metodo è possibile ottenere la nitrificazione anche nei periodi più freddi con la sola aggiunta di un reattore aerobico di piccole dimensioni e di un sistema di separazione della biomassa nitrificante (Figura 1-5).

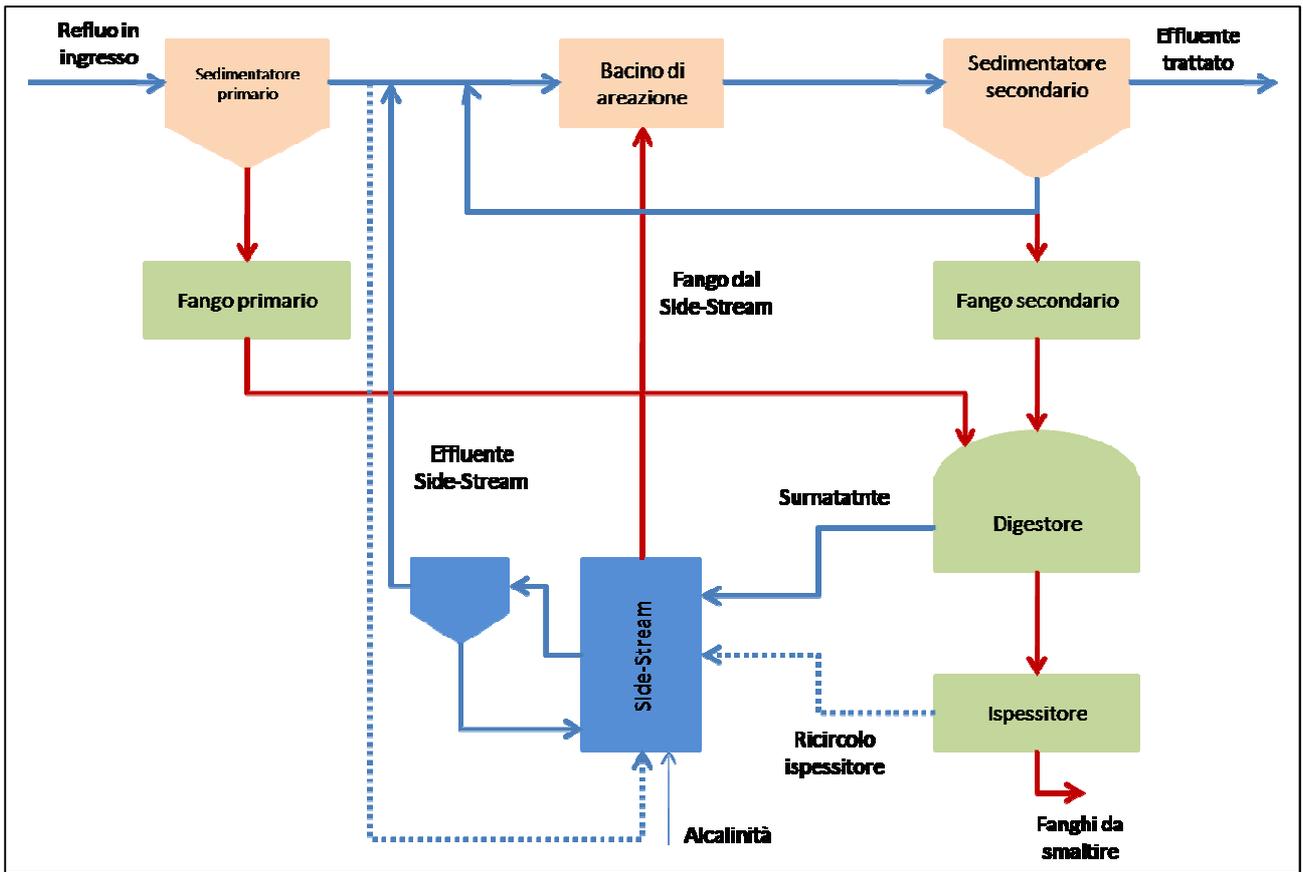


Figura 1-5 Diagramma del processo In-Nitri

1.3.3 Bio-arricchimento in situ

Con il bio-arricchimento in situ l'obiettivo è quello di incrementare l'attività della biomassa già presente all'interno della filiera di trattamento. Questo approccio permette di evitare il problema già sottolineato del possibile incremento del decadimento della biomassa aumentata, come può accadere per il bio-arricchimento esterno, a causa delle diverse condizioni di processo tra la filiera Side-Stream e quella Main-Stream.

Alcune soluzioni impiantistiche ad oggi introdotte per la bio-augmentation in situ sono:

- Processo BAR - *Bio-augmentation Reareation* (negli USA) o *Regeneration* (in Repubblica Ceca): in questo caso la filiera Side-Stream riceve contemporaneamente il flusso di ricircolo dei fanghi dalla linea Main-Stream e un flusso ad elevato carico in ammonio, proveniente dall'ispessimento del fango digerito in condizioni anaerobiche. Il processo consegue la completa nitrificazione e la biomassa nitrificante viene poi re-inviata al reattore Main-Stream permettendo una riduzione dell'età del fango richiesta per la completa nitrificazione. Nonostante vi sia la presenza di una linea esterna, la bio-augmentation è comunque classificabile come in situ poiché la biomassa di partenza è, di fatto, quella autoctona (Novak and Havrlikova, 2004; Smith et al., 2008). In Figura 1-6 è riportato uno schema del processo BAR facendo riferimento alla sola filiera Side-Stream.

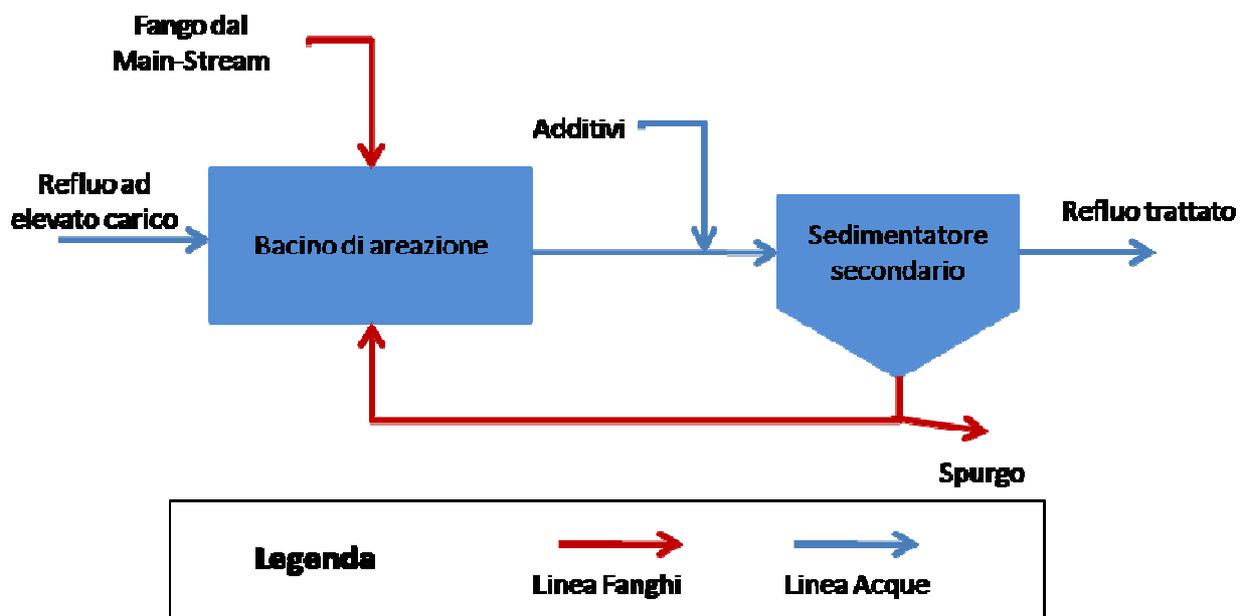


Figura 1-6 Diagramma del processo BAR

- Processo BABE - *Bio-Augmentation Batch Enhanced*: è composto da un SBR (Sequential Bio Reactor) Side-Stream alimentato con l'effluente dell'ispessimento fanghi e con fango di ricircolo dalla linea di trattamento. Il ciclo di funzionamento dell'SBR prevede una fase di riempimento ed areazione, una di reazione, la sedimentazione e l'eliminazione dei fanghi in eccesso (Figura 1-7). All'interno del reattore Side-Stream si mantiene un SRT elevato, permettendo l'acclimatazione e la crescita della biomassa nitrificante proveniente dalla linea di trattamento principale (Salem et al., 2002; Salem et al., 2003).

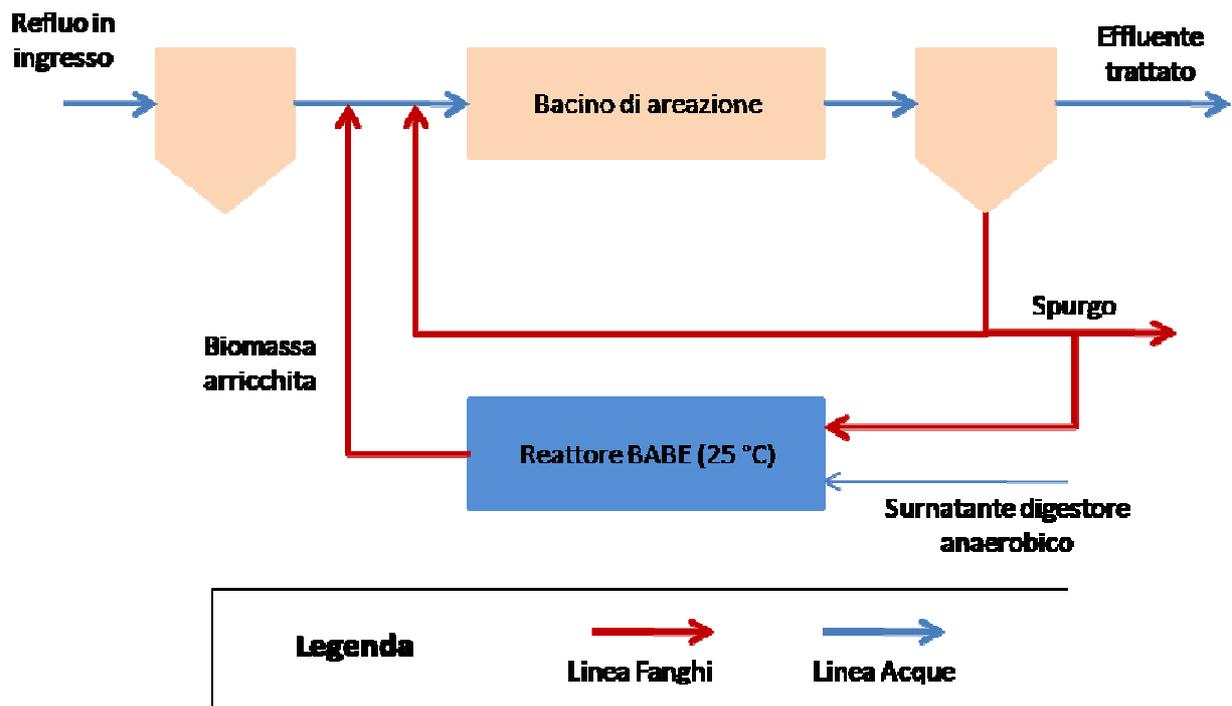


Figura 1-7 Diagramma del processo BABE

- Processo MAUREEN - *Main-stream AUtotropic Recycle Enabling Enhanced N-removal*: include un reattore Side-Stream all'interno del quale avviene la nitrificazione e la denitrificazione del flusso ad alto carico ammoniacale per mezzo della biomassa nitrificante proveniente dalla linea Main-Stream. In particolare questo processo è stato sviluppato per impianti dotati di due linee con trattamento biologico: il fango secondario viene fatto ricircolare nel reattore biologico del Side-Stream, dove sono mantenute condizioni che favoriscono la crescita dei batteri ammonio ossidanti, per poi tornare nella linea Main-Stream (Figura 1-8).

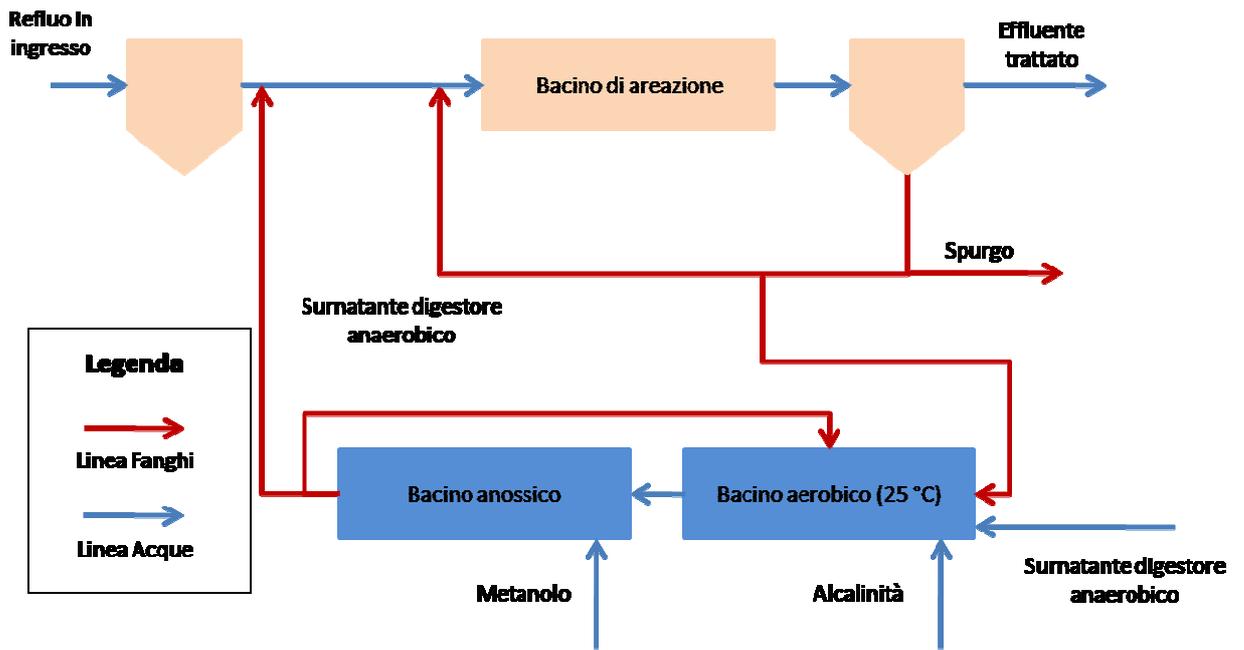


Figura 1-8 Diagramma del processo MAUREEN

1.3.4 Basi teoriche del bio-arricchimento

Per capire l'effetto della bio-augmentation sui trattamenti biologici utilizzati per la rimozione della sostanza azotata è necessario tener conto di come l'immissione di biomassa attiva influenzi i parametri che caratterizzano i processi di rimozione. Tuttavia, non è possibile fermare lo studio della bio-augmentation a questo aspetto: sono infatti da tenere in considerazione altri elementi come l'effetto di sbalzi termici sulla biomassa attiva o l'eventuale fenomeno di selezione della popolazione batterica durante la fase di arricchimento a causa delle condizioni di processo (pH, ossigeno disciolto, concentrazione del substrato, età del fango).

1.3.4.1 Effetto del bio-arricchimento sui parametri del processo biologico

La progettazione e la gestione di reattori biologici a biomassa sospesa sono normalmente basate sull'età del fango (SRT, θ_x). Tale parametro da un lato è limitato (θ_x^{\min}) dal tasso massimo di crescita batterica (l'età del fango deve essere maggiore di tale valore per evitare il dilavamento della biomassa), dall'altro lato la concentrazione del substrato limitante alle condizioni stazionarie è legata a tutte le $\theta_x > \theta_x^{\min}$ dalla cinetica di Monod:

$$\frac{1}{\theta_x} = \mu' = Y \cdot \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} - k_d \quad [\text{Eq. 1-9}]$$

Dove:

- Y: fattore di resa [$M_x M_s^{-1}$];
- μ_{\max} : tasso massimo di utilizzo del substrato [$M_x M_s^{-1} T^{-1}$];
- K: costante di semisaturazione [$M_s L^{-3}$];
- S: concentrazione del substrato [$M_s L^{-3}$];
- k_d : coefficiente di decadimento endogeno [T^{-1}];
- M_x : biomassa;
- M_s : massa di substrato.

Le basi teoriche e matematiche che permettono di utilizzare l'età del fango per la progettazione e la gestione dei processi biologici risiedono in due assunzioni:

1. La concentrazione di biomassa è allo stato stazionario. L'uguaglianza tra $1/\theta_x$ e μ' espressa in Eq. 1-9 è, infatti, vera solo allo stato stazionario e non può essere applicata a situazioni transitorie;
2. Assenza di biomassa attiva in ingresso al sistema.

Dall'equazione di bilancio di massa della popolazione batterica allo stato stazionario (Eq. 1-9), dove M_a^e rappresenta i flussi di massa in uscita dal volume di controllo [$M_s L^{-1}$], mentre X_a è la concentrazione di biomassa attiva presente,

$$\frac{dX_a}{dt} = 0 = -M_a^e + \mu' X_a V \quad [\text{Eq. 1-9}]$$

risulta:

$$\theta_x = \frac{X_a \cdot V}{M_a^e} \quad [\text{Eq. 1-10}]$$

In questa forma è possibile applicare l'età del fango come parametro di processo di sistemi che ricevono in ingresso quantitativi significativi di biomassa attiva. Ovviamente, questo diviene di grande importanza per lo studio e la comprensione dell'effetto della bio-augmentation sui trattamenti a fanghi attivi.

È intuitivo che la sola aggiunta di biomassa attiva all'interno della filiera di trattamento ne incrementa la concentrazione e le dà un vantaggio competitivo su altre specie che utilizzano gli stessi substrati; questi due effetti possono essere quantificati con un incremento dell'età del fango (Rittmann, 1996). L'effetto, da un punto di vista quantitativo, dell'incremento di X_a su θ_x non è però ovvio poiché con l'aggiunta di biomassa il substrato S tenderà a diminuire, mentre M_a^e tenderà ad aumentare: questi due effetti porterebbero a un decremento della SRT.

L'effetto della bio-augmentation sull'età del fango è facilmente comprensibile facendo riferimento ad un reattore CSTR (Continuous Stirred-Tank Reactor).

Allo stato stazionario e senza considerare un ingresso di biomassa si può calcolare l'SRT apparente (θ_x^a), che in questo caso risulta uguale a HRT ($\theta = V/Q$), dalla Eq. 1-10:

$$\theta_x^a = \theta_x = \frac{X_a \cdot V}{M_a^e} = \frac{X_v \cdot V}{M_v^e} \quad [\text{Eq. 1-11}]$$

Quando viene inserita nuova biomassa attiva e inerti, il bilancio di massa allo stato stazionario del substrato limitante (S), della biomassa attiva (X_a), dei solidi inerti (X_i) e dei SSV (X_v) segue le seguenti relazioni:

Substrato:

$$0 = Q \cdot S^0 - Q \cdot S - \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \cdot X_a \cdot V \quad [\text{Eq. 1-12}]$$

Biomassa attiva:

$$0 = Q \cdot X_a^0 - Q \cdot X_a + Y \cdot \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \cdot X_a \cdot V - k_d \cdot X_a \cdot V \quad [\text{Eq. 1-13}]$$

Solidi inerti:

$$0 = Q \cdot X_i^0 - Q \cdot X_i + (1 - f_d) \cdot k_d \cdot X_a \cdot V \quad [\text{Eq. 1-14}]$$

Biomassa attiva:

$$0 = Q \cdot X_a^0 + Q \cdot X_i^0 - Q \cdot X_a - Q \cdot X_i + Y \cdot \frac{k \cdot S}{K_s + S} \cdot X_a \cdot V - f_d \cdot k_d \cdot X_a \cdot V \quad [\text{Eq. 1-15}]$$

All'interno delle equazioni di bilancio di massa riportate sono inclusi:

- La cinetica di Monod;
- Le concentrazioni dei flussi in ingresso al reattore, indicati con l'apice 0;
- La crescita di biomassa attiva, proporzionale secondo il fattore di resa (Y) al consumo di substrato;
- Il decadimento endogeno della biomassa attiva attraverso k_d ;
- La formazione di S_I dalla porzione di decadimento endogeno che porta alla formazione di inerti ($1 - f_d$);
- Il bilancio di massa degli SSV (Solidi Sospesi Volatili) ottenibile come somma delle equazioni relative alla biomassa attiva e ai S_I .

Le equazioni Eq. 1-12 e Eq. 1-13 possono essere risolte quando SRT è definita come:

$$\theta_x = \frac{X_a \cdot V}{Q \cdot X_a - Q \cdot X_a^0} = \frac{\theta}{1 - X_a^0/X_a} \quad [\text{Eq. 1-16}]$$

Il termine al denominatore ($1 - X_a^0/X_a$) rappresenta la crescita netta della nuova biomassa nel reattore, mentre θ rappresenta l'età del fango apparente calcolata secondo la Eq. 1-10 o la Eq. 1-11. Quindi l'SRT dalla Eq. 1-16 rimane il reciproco del tasso di crescita netto ed è maggiore di HRT quando X_a^0 è una frazione rilevante di X_a (Rittmann, 1996).

Il valore di S risulta quindi:

$$S = K_s \cdot \left(1 + \frac{k_d \cdot \theta_x}{\theta_x (Yk - k_d) - 1} \right) \quad [\text{Eq. 1-17}]$$

Quando S è noto è possibile ottenere X_a dalla Eq. 1-11:

$$X_a = \frac{\theta_x \cdot Y \cdot (S^0 - S)}{\theta \cdot (1 + k_d \cdot \theta_x)} \quad [\text{Eq. 1-18}]$$

Le Eq. 1-17 e la Eq. 1-18 sono identiche nel caso del CSTR tradizionale, ma al posto di θ si adotta θ_x che si calcola secondo la Eq. 1-16. La concentrazione della biomassa (X_a) è aumentata dal fattore di concentrazione θ_x/θ .

Questo approccio permette di indagare l'effetto della bio-augmentation allo stato stazionario in un sistema CSTR sui parametri di processo più importanti ma non fornisce alcuna informazione sull'effetto che la bio-augmentation può avere sull'età del fango minima, cioè quel valore al di sotto del quale non si verifica rimozione degli inquinanti a causa del wash-out della biomassa. La conoscenza di $\theta_{x,\min}$ risulta, tuttavia, fondamentale allo scopo di valutare l'efficienza del processo di bio-augmentation.

Per approfondire lo studio si può adottare un approccio diverso, partendo sempre dal bilancio di massa della popolazione batterica nitrificante considerando un reattore aerobico dotato di ricircolo dei fanghi:

$$\frac{dX_a}{dt} = \text{crescita} - \text{decadimento} - \text{uscite} \quad [\text{Eq. 1-19}]$$

Dove:

- Crescita = $\mu_{nm} \cdot \frac{N}{K_n + N} \cdot X_a$
- Decadimento = $k_d \cdot X_a$
- Uscite = $\frac{M_a^e}{V} = \frac{X_a}{\theta_x}$

Allo stato stazionario l'equazione Eq. 1-18 diviene:

$$\mu_{nm} \cdot \frac{N}{K_n + N} = k_d + \frac{1}{\theta_x} \quad [\text{Eq. 1-20}]$$

È possibile stimare il tempo di residenza minimo, cioè il valore di SRT sotto il quale si ha dilavamento della biomassa. Il valore di SRT_{\min} può essere ricavato dalla Eq. 1-20 come:

$$SRT^{\min} = \frac{K_n + N}{N\mu_{nm} - k_d \cdot (K_n + N)} \quad [\text{Eq. 1-21}]$$

I due parametri k_d e μ^{\max} dipendono dalla temperatura secondo la relazione di Arrhenius.

Il bilancio di massa riportato nella Eq. 1-19 può essere riscritto tenendo conto dell'apporto dato dalla bio-augmentation della biomassa nitrificante:

$$\frac{dX_a}{dt} = \text{crescita} + \text{aggiunta} - \text{decadimento} - \text{uscite} \quad [\text{Eq. 1-22}]$$

Dove con il termine “aggiunta” ci si riferisce al rateo di arricchimento di microorganismi nitrificanti (in g di autotrofi/m³ giorno). È possibile esprimere tale rateo di arricchimento come un tasso di addizione (k_{add}), cioè come il rapporto tra la biomassa aggiunta nel tempo e la biomassa già presente (Salem, et al., 2003). In questo modo il tasso di arricchimento può essere facilmente messo in relazione con i tassi di crescita e decadimento. È quindi possibile, considerando lo stato stazionario, scrivere:

$$\mu_{nm} \cdot \frac{N}{K_n + N} = k_d + \frac{1}{\theta_x} - k_{add} \quad [\text{Eq. 1-23}]$$

Da cui è possibile ricavare il tempo di residenza cellulare minimo:

$$SRT_{\min} = \frac{K_n + N}{N \cdot \mu_{nm} - (k_d - k_{add}) \cdot (K_n + N)} \quad [\text{Eq. 1-24}]$$

Con il bio-arricchimento è dunque possibile ottenere la nitrificazione anche con valori molto bassi dell'età del fango, e di conseguenza è possibile ridurre il volume necessario per il reattore aerobico ottenendo miglioramenti del processo tanto più elevati quanto più elevato è il valore di k_{add} , in quanto si va ad aumentare la concentrazione di biomassa nitrificante nel reattore arricchito.

La concentrazione di nitrificanti è ottenibile tramite un bilancio di massa del substrato:

$$\frac{dN}{dt} = \text{influyente}_N - \text{effluente}_N - \text{abbattimento} \quad [\text{Eq. 1-25}]$$

La Eq. 1.25 può essere riscritta come:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{Q \cdot N^0}{V} - \frac{Q \cdot N}{V} - k \cdot \frac{N}{K_n + N} \cdot X_a \quad [\text{Eq. 1-26}]$$

Imponendo lo stato stazionario nella Eq. 1-26 si ottiene:

$$k \cdot \frac{N}{K_n + N} \cdot X_a = \frac{Q \cdot (N^0 - N)}{V} \quad [\text{Eq. 1-27}]$$

Sostituendo la Eq. 22 nella Eq. 26 è possibile introdurre l'effetto della bio-augmentation:

$$X_a = \frac{\theta_x}{\theta} \frac{Y \cdot (N^0 - N)}{1 + (k_d - k_{add}) \cdot \theta_x} \quad [\text{Eq. 1-28}]$$

Dalla Eq. 1-28 risulta evidente come l'aumento del rateo di addizione determini un incremento della biomassa nitrificante presente nel sistema.

Mediante l'applicazione di un modello matematico che prevede l'implementazione del processo BABE all'interno della filiera di trattamento di un impianto preesistente, Salem et al. (2003) hanno determinato un incremento di microorganismi nitrificanti di circa il 60% a 12°C e del 30% a 20°C con HRT (tempo di ritenzione idraulica) di 2 ore, SRT di 4 giorni e k_{add} di 0.10 g/g·giorno.

L'effetto della bio-augmentation sull'età del fango della filiera Side-Stream è stata valutata anche da Head et al. (2004) utilizzando 4 SBR da 2 L ciascuno, mantenuti a 10°C con HRT di 43.6, 53.3, 68.6 e 96 ore, SRT apparente di 4 giorni e refluo sintetico assimilabile al surnatante di digestione anaerobica dei fanghi di depurazione come influente (Figura 1-9).

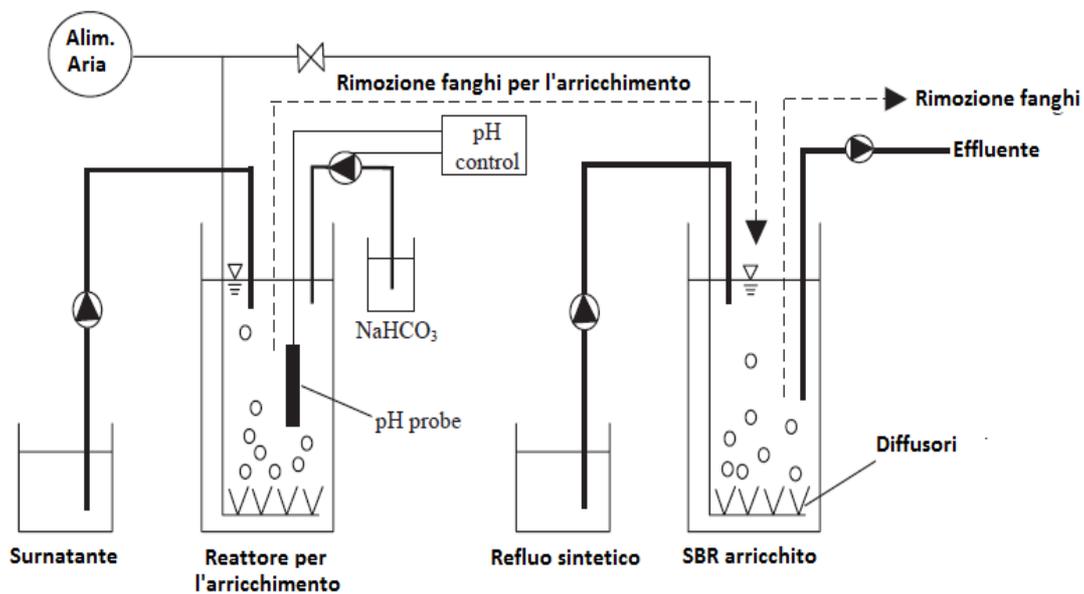


Figura 1-9 Configurazione del reattore sperimentale (Head et al., 2004)

Considerando la configurazione di Figura 1-9 è possibile calcolare l'età del fango dei reattori arricchiti, conoscendo la concentrazione di biomassa nitrificante presente nel flusso proveniente dal reattore Side-Stream (X_a^0) che può essere stimata come (mg SSV/L) dalla Eq. 1-29:

$$X_a^0 = \frac{Q^S}{Q^i + Q^S} \frac{Y \cdot (S^0 - S)}{1 + k_d \cdot \theta_x} \quad [\text{Eq. 1-30}]$$

Dove:

- Q^S : portata del flusso di arricchimento [$\text{m}^3 \text{giorno}^{-1}$];

- Q^i : portata dell'influente [$\text{m}^3 \text{giorno}^{-1}$];
- S^0 : concentrazione del substrato nell'influente [$\text{mg N}_{\text{NH}_3} \text{L}^{-1}$];
- S : concentrazione del substrato nell'effluente [$\text{mg N}_{\text{NH}_3} \text{L}^{-1}$].

Il primo termine rappresenta la porzione della portata di arricchimento, contenente la biomassa proveniente dal reattore Side-Stream sul totale dell'alimentazione in ingresso al Main-Stream. Il secondo termine invece rappresenta la concentrazione di biomassa attiva presente nel reattore Side-Stream (Head, et al., 2004).

L'età del fango del reattore, considerando l'effetto del bio-arricchimento, può essere quindi calcolata secondo la Eq. 1-16, che adattandola alla configurazione impiantistica diviene:

$$\theta_x = \frac{X_a \cdot V_r}{Q^w \cdot X_a + Q^e \cdot X_a^e - Q^i \cdot X_a^0} \quad [\text{Eq. 1-31}]$$

Dove:

- Q^w : portata di spurgo [$\text{m}^3 \text{d}^{-1}$];
- Q^e : portata dell'effluente [$\text{m}^3 \text{d}^{-1}$];
- X_a^e : concentrazione dei batteri nitrificanti nell'effluente [mg SSV L^{-1}];
- X_a : concentrazione dei batteri nitrificanti nel reattore [mg SSV L^{-1}].

La concentrazione di nitrificanti nell'uscita del SBR Main-Stream può essere determinata ipotizzando che il rapporto tra biomassa attiva (X_a) e i solidi sospesi volatili (X_v) all'interno del reattore si mantenga inalterato anche nell'effluente:

$$P = X_a / X_v \quad [\text{Eq. 1-32}]$$

Per cui, indicando con X_e la concentrazione di SSV all'interno dell'effluente, la Eq. 1-29 può essere riscritta come:

$$\theta_x = \frac{X_a \cdot V_r}{Q^w \cdot X_a + Q^e \cdot P \cdot X_e - Q^i \cdot X_a^0} \quad [\text{Eq. 1-33}]$$

Adesso la concentrazione della biomassa nitrificante all'interno del SBR può essere stimata riprendendo l'equazione Eq. 1-18:

$$X_a = \frac{\theta_x \cdot Y \cdot (S^0 - S)}{\theta \cdot 1 + k_d \cdot \theta_x} \quad [\text{Eq. 1-34}]$$

In questo caso S^0 indica la concentrazione del substrato nel refluo sintetico con cui si alimentano gli SBR a bassa temperatura, con S la più bassa concentrazione raggiungibile in uscita da questi reattori e con k_d il tasso di decadimento alla temperatura di riferimento.

Le equazioni Eq. 1-30 e Eq. 1-34 vengono risolte simultaneamente per determinare la SRT della biomassa nitrificante (θ_x).

I valori di k_d e Y sono stati assunti pari a 0.10 d^{-1} e $0.24 \text{ g VSS/g N-NH}_3$ a 20°C . L'effetto della temperatura sul rateo di decadimento è stato stimato sulla base dell'equazione di Arrhenius:

$$k_d^T = 0.10 \cdot e^{k(T-20)} \quad [\text{Eq. 1-36}]$$

con k pari a $0.0844 \text{ 1}^\circ\text{C}$.

È stato osservato che la concentrazione di N-NH_3 nell'effluente dei reattori Main-Stream scende sotto 5 mgL^{-1} dopo 26/32 giorni dall'avvio della bio-augmentation (Fig. 1-10) e in tutti i reattori viene raggiunta la rimozione quasi completa di ammonio, almeno fino a quando l'arricchimento è mantenuto attivo. Se la bio-augmentation viene interrotta, la rimozione di ammonio subisce un brusco calo a causa del rapido dilavamento della biomassa (Head et al., 2004).

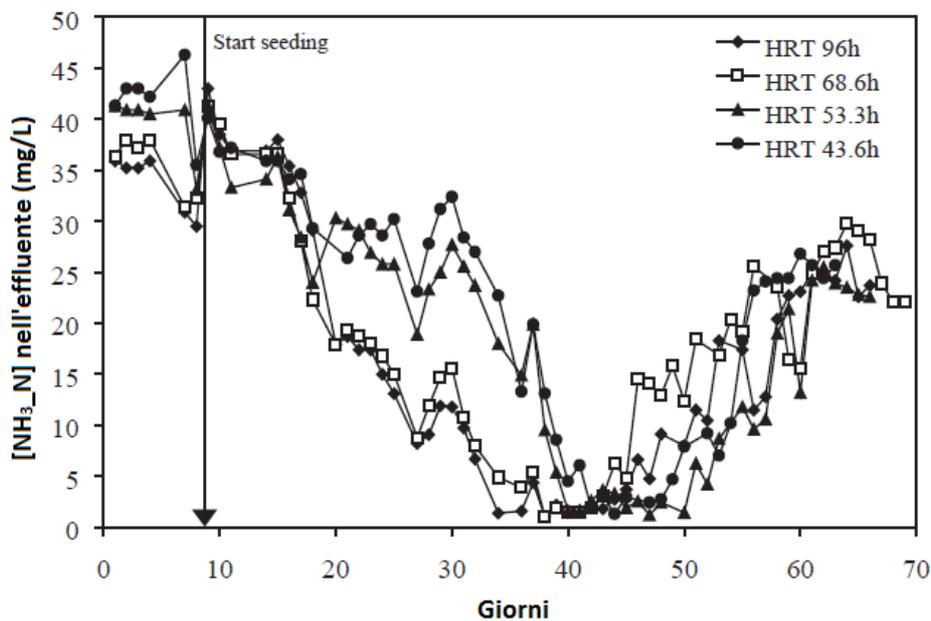


Figura 1-10 - $[\text{N-NH}_3]$ nell'effluente dei SBR arricchiti per diversi valori di HRT. La bio-augmentation è stata avviata per tutti i reattori il giorno 9 ed è stata interrotta nei giorni 47, 50, 47 e 45 rispettivamente per i reattori a HRT(h) 43.6, 53.3, 68.6 e 96 (Head et al., 2004)

Dall'esperienza riportata risulta quindi il raggiungimento della completa nitrificazione in SBR a bassa temperatura, operanti a SRT non sufficienti a garantire la nitrificazione. Prima del processo di bio-arricchimento la nitrificazione non era presente, come indicato dall'elevata concentrazione di N-NH_3 nell'effluente e dalla scarsità di nitrati. Con l'arricchimento la SRT dei batteri nitrificanti è

stata aumentata rispetto alla SRT apparente ottenuta dal bilancio di massa del reattore. L'età del fango apparente varia tra i 3.5 giorni (dell'SBR funzionante con HRT di 43.3 h) e i 4 giorni (dell'SBR con HRT di 96 h), mentre la SRT calcolata considerando l'effetto della bio-augmentation varia tra 7.5 giorni e 23.5 giorni.

1.3.4.2 Effetto della temperatura sul processo di bio-arricchimento

L'effetto della temperatura sul processo di nitrificazione è usualmente determinato applicando l'equazione di Arrhenius per la stima della riduzione dei parametri cinetici di crescita (μ) e di decadimento endogeno (k_d) per temperature diverse da quella di riferimento su cui sono stati calcolati.

Nei sistemi che prevedono il bio-arricchimento è inoltre possibile che la temperatura a cui è stata fatta crescere la biomassa sia diversa rispetto alla temperatura presente all'interno del reattore aerobico in cui tale biomassa viene inoculata, determinando l'inefficacia del processo di arricchimento della biomassa nitrificante a seguito ad esempio dell'instaurazione di shock termici.

Nel corso di diversi studi è stata valutata la variazione di efficacia della nitrificazione legata a rapide variazioni di temperatura spiegabili facendo riferimento a coefficienti di Arrhenius diversi da quelli presenti in letteratura (Head and Oleszkiewicz, 2004; Head and Oleszkiewicz, 2005).

I sistemi in situ garantiscono, ovviamente, minori problematiche connesse all'acclimatazione della biomassa.

I processi di bio-arricchimento esterno, di contro, possono essere maggiormente influenzati da variazioni delle condizioni ambientali come temperatura, concentrazione di substrato e frazionamento della biomassa. In sistemi analoghi al BABE, infatti, è evidente la maggiore temperatura della filiera Side-Stream a seguito dell'immissione di flussi caldi (come il surnatante della digestione anaerobica) rispetto al Main-Stream.

È quindi importante verificare se la biomassa nitrificante alimentata con flussi ad alta temperatura possa essere utilizzata per indurre/aiutare la nitrificazione all'interno di reattori a bassa temperatura operanti a SRT inferiore a quello minimo per la nitrificazione. In questo contesto, gli aspetti da valutare sono diversi: in primo luogo se un rapido abbassamento della temperatura consente il mantenimento dell'attività nitrificante della biomassa utilizzata per l'arricchimento, ed eventualmente quanto tale attività viene limitata dal raffreddamento. In seguito, è necessario valutare se la bio-augmentation sia risulta efficace nonostante l'inibizione introdotta dal salto

termico, e in che modo l'intensità di tale variazione influenzi il processo di nitrificazione all'interno della filiera principale.

Per studiare l'effetto della temperatura sulla bio-augmentation, Head et al. (2004) hanno utilizzato reattori Side-Stream alimentati con refluo sintetico assimilabile al surnatante prodotto dalla digestione di fanghi di supero in cui è stata mantenuta una temperatura elevata (fino a 30 °C) simulando l'influenza del surnatante. Il mantenimento di elevate temperature permette, inoltre, elevate cinetiche di crescita della biomassa e quindi la possibilità di trattare maggiori carichi di ammonio o di mantenere minori età del fango e volumi di reazione più contenuti.

Per studiare l'effetto sulla biomassa nitrificante di improvvisi cambiamenti delle condizioni operative, Head, et al. (2004) utilizzano 3 SBR da 2,4L ciascuno per la simulazione della filiera Side-Stream. Tali reattori sono alimentati con refluo avente concentrazione media di N-NH₃ compresa nel range 600 – 700 mg L⁻¹. Gli SBR lavorano con SRT di 5 giorni, temperatura di 20°C, 25°C o 30°C e pH pari o superiore a 7.2 unità. Il fango rimosso dal reattore nitrificante è rapidamente raffreddato fino a 10°C prima di dosare 35 mL di centrato e prevedere una seconda fase di areazione. I ratei di rimozione dell'ammonio sono determinati campionando direttamente dal reattore raffreddato e analizzando la concentrazione di ammonio residuo.

La diminuzione del rateo di nitrificazione per diversi range di temperatura può essere determinata con l'Eq. 1-37.

$$\left[\left(\frac{\Delta N}{\Delta t_T} - \frac{\Delta N}{\Delta t_{10^\circ C}} \right) / \frac{\Delta N}{\Delta t_T} \right] \cdot 100\% = \frac{\mu_T - \mu_{10^\circ C}}{\mu_T} \cdot 100\% \quad [\text{Eq. 1-37}]$$

La diminuzione percentuale del rateo di nitrificazione è uguale alla diminuzione percentuale del rateo di crescita, come mostrato nell'Eq. 1-37.

$$\mu_{\max} = \frac{Y \cdot (-\Delta N / \Delta t)}{X_a} \quad [\text{Eq. 1-38}]$$

I risultati di questa sperimentazione hanno dimostrato che il rapido abbassamento della temperatura dei fanghi comporta un significativo decremento del rateo di rimozione, la cui intensità è legata al gradiente termico (ΔT).

È possibile fare una comparazione diretta tra i ratei di rimozione dei reattori ad elevata temperatura con quelli dei reattori raffreddati, poiché le condizioni iniziali (concentrazione del substrato, pH e condizioni aerobiche) sono state mantenute omogenee (Fig. 1-11). La riduzione media dei ratei di

nitrificazione in seguito a improvvisi abbassamenti di temperatura è risultata del $58 \pm 8.2\%$ per la biomassa operante a 20°C , del $71 \pm 4.7\%$ per quella a 25°C e del $82 \pm 1.4\%$ a 30°C . In questo caso è stato riscontrato che la costante θ dell'equazione di Arrhenius, legata al rapido abbassamento di temperatura, risulta pari a 1.088 (Head, et al., 2004).

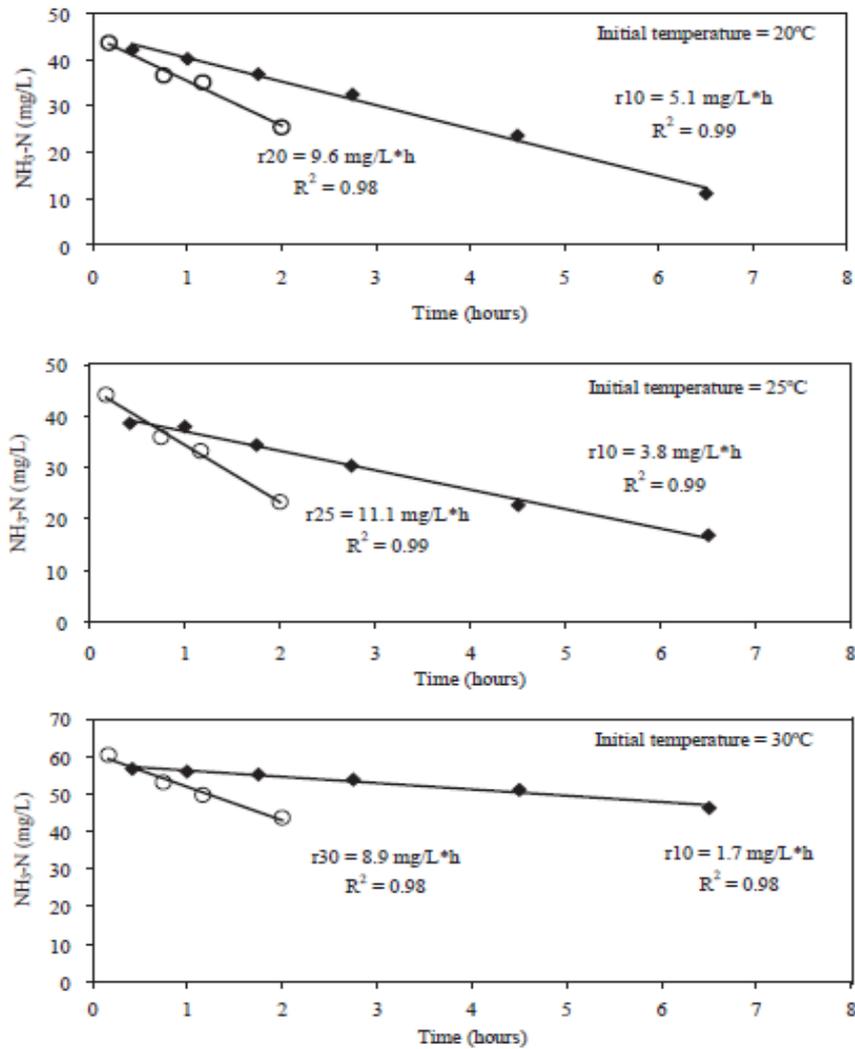


Figura 1-11Ratei di nitrificazione per biomasse operanti a 20°C , 25°C e 30°C prima e dopo l'abbassamento di temperatura a 10°C (Head et al., 2004). In figura i cerchi bianchi e nei indicano i dati ottenuti rispettivamente prima e dopo l'abbassamento di temperatura.

La precedente sperimentazione è stata approfondita da Head et al. (2005) verificando l'effetto dell'immissione di biomassa nitrificante proveniente da tre SBR Side-Stream operanti a 20°C (NB20), 25°C (NB25) e 30°C (NB30), in reattori Main-Stream a bassa temperatura. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti da un processo di bio-augmentation con un SBR Side-Stream a bassa temperatura, alimentato con surnatante a 10°C (NB10), SRT (= HRT) di 12 giorni e pH ≥ 8.

Per i reattori Side-Stream la sperimentazione ha previsto l'utilizzo di sette SBR da 2L, mantenuti alla temperatura di funzionamento di 10°C e con SRT apparente di 4 giorni. L'alimentazione per questi reattori viene realizzata con il refluo sintetico assimilabile, per composizione qualitativa e quantitativa ad un refluo civile. Quattro degli SBR lavorano con HRT di 12 ore, mentre gli altri tre di 24 ore.

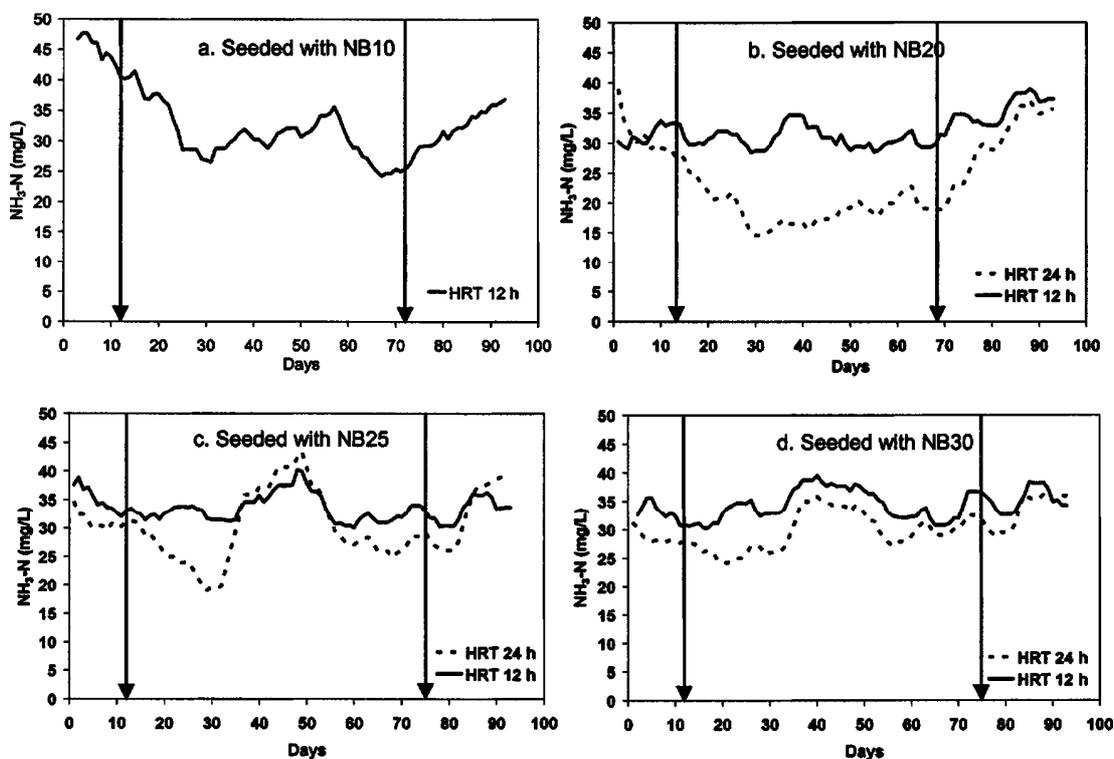


Figura 1-12 Andamento della concentrazione di $[N-NH_3]$ nell'effluente dei SBR MAIN-STREAM alimentati con biomassa nitrificante acclimatata a diverse temperature (Head et al., 2005).

Durante la fase di stato stazionario dei Side-Stream con il processo di bio-arricchimento attivo, gli SBR con HRT 24 h hanno mostrato, a parità della temperatura dei reattori per l'arricchimento, una concentrazione di $N-NH_3$ nell'effluente inferiore rispetto a quella dei reattori a HRT 12 h (Figura 1-12 (b,d)). Tra i reattori Side-Stream con HRT di 24 h la maggiore rimozione di $N-NH_3$ è stata ottenuta alimentando dal reattore mantenuto a 20°C. La concentrazione di $N-NH_3$ nell'effluente è stata ridotta di circa 20 mg L^{-1} , rispetto alle condizioni precedenti alla bio-augmentation. Il reattore

Main-Stream alimentato con biomassa acclimatata a 25°C presenta una concentrazione di ammonio nell'effluente inferiore rispetto a quello alimentato con biomassa acclimatata a 30°C (Head, et al., 2005).

Nei reattori Main-Stream con HRT di 12 h il solo reattore ad avere avuto un incremento della rimozione di N-NH₃ è stato quello alimentato con biomassa proveniente dal reattore Side-Stream mantenuto a 10°C (Fig.1-12a), confermando la crescente importanza del gradiente di temperatura tra Side-Stream e Main-Stream al diminuire dell'età del fango della filiera Main-Stream.

Dall'applicazione di modelli dinamici per la descrizione del processo di bio-augmentation implementato mediante l'applicazione del processo BABE, Salem et al. (2003) evidenziano come l'impatto dell'inoculo di biomassa nitrificante dalla filiera Side-Stream sia maggiore al diminuire della temperatura presente all'interno delle filiera Main-Stream e come al diminuire della temperatura diminuisca il rateo di bio-arricchimento (K_{add} , Eq. 1.23) necessario per osservare l'effetto del processo. In termini percentuali la diminuzione di SRT^{min} ottenibile con la bio-augmentation risulta del 45%, 35% e 20% rispettivamente a temperature del reattore accettore di 8°C, 12°C e 20°C (Salem, et al., 2003)

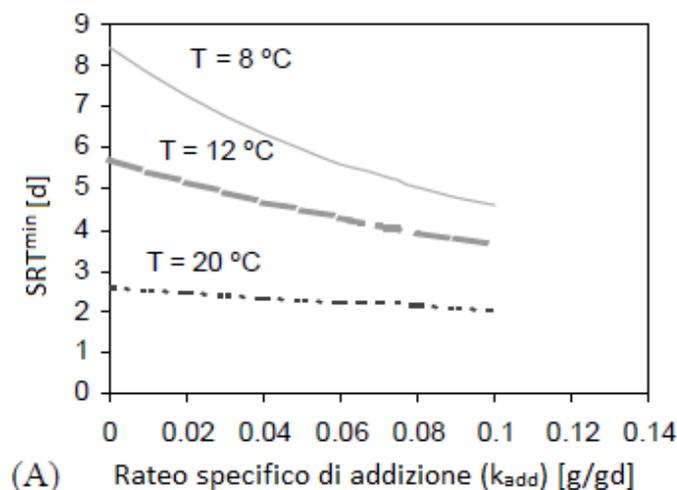


Figura1-13 - SRT minimo necessario nella filiera Main-Stream per l'ottenimento della completa nitrificazione in funzione del rateo di inoculo (Salem et al., 2003)

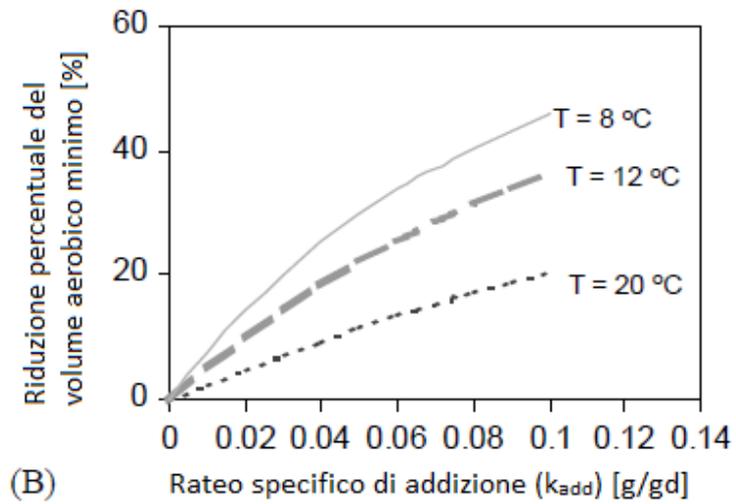


Figura1-14 -Effetto della bio-augmentation sul SRT minimo a temperature diverse; (A) come funzione del minimo SRT aerobico richiesto, (B) come funzione percentuale di riduzione del volume aerobico minimo (parametri utilizzati: $N = 2\text{mg N/L}$, $K_n = 1\text{mg N/L}$) (Salem, et

1.3.4.3 Effetto della SRT sul processo di bio-arricchimento

L'utilizzo di flussi ad elevato carico di ammonio come influente per la linea Side-Stream risulta particolarmente efficace in quanto permette l'abbassamento del carico in ingresso all'impianto principale e la produzione di una biomassa molto concentrata utilizzabile per la bio-augmentation (Janus, et al., 1997; Head, et al., 2004). Tuttavia, per conseguire un abbattimento significativo dell'azoto ammoniacale in ingresso all'impianto e per evitare il rischio di dilavamento della biomassa nitrificante, può essere necessario adottare un'età del fango nel reattore Side-Stream significativamente elevata. L'utilizzo di SRT particolarmente grandi comporta la richiesta di volumi elevati per la linea di trattamento, andando così a ridurre uno dei vantaggi più significativi dal punto di vista progettuale e gestionale indotti dalla bio-augmentation, cioè la possibilità di ottenere miglioramenti del processo con piccoli ingombri volumetrici.

Una prima conseguenza dell'adozione di elevate SRT, accoppiata con elevati carichi in ingresso, è comunque l'instaurarsi di elevate concentrazioni di biomassa all'interno del reattore Side-Stream. Questo, se da un lato rappresenta un vantaggio per la bio-augmentation incrementando la concentrazione di biomassa nel flusso di arricchimento e garantendo una minore sensibilità ad eventuali picchi della concentrazione di substrato, dall'altro può rappresentare un problema per il processo di separazione finale della filiera Side-Stream e introdurre un incremento dei costi di gestione, legati ad esempio all'aerazione.

La struttura dei fiocchi, in termini di dimensione e forma, influenza in maniera significativa l'efficienza e i costi di realizzazione e gestione di una filiera di trattamento a fanghi attivi tradizionale. Avere fiocchi di grandi dimensioni garantisce buone caratteristiche di sedimentabilità al fango, mentre una eccessiva concentrazione di fiocchi, soprattutto se di piccole dimensioni, determina una maggiore difficoltà nella separazione della fase liquida dalla componente solida. Dimensioni e struttura dei fiocchi sono inoltre strettamente legate all'età del fango: elevati tempi di ritenzione cellulare comportano, infatti, una scarsa tendenza del fango a formare fiocchi e quindi a sedimentare, mentre per valori troppo bassi i fiocchi risultano essere facilmente soggetti a rottura (Liao, et al., 2006).

Nel caso in cui il fango sia composto da fiocchi aventi distribuzione irregolare relativamente alla dimensione si può ottenere un peggioramento della sedimentabilità e il verificarsi di fenomeni di bulking (Liao, et al., 2006).

Confrontando la distribuzione dimensionale di fiocchi sviluppatasi ad SRT differenti con le distribuzioni dimensionali tipiche di fiocchi provenienti da fanghi che non presentano bulking ($SVI < 100 \text{ mL g}^{-1}SS$) e fanghi che lo presentano ($100 < SVI < 200 \text{ mL g}^{-1}SS$) è stato osservato che per

età del fango elevate (da 9 a 20 giorni) la distribuzione ha un andamento del tipo log-normale, simile a quella dei fanghi con $SVI < 100 \text{ ml g}^{-1} \text{ SS}$; con età del fango comprese tra 4 e 6 giorni la distribuzione ha un andamento bimodale, che riprende quello di fanghi soggetti a bulking (Liao, et al., 2006).

Altri studi, sviluppati adottando reattori del tipo CSTR, mostrano invece che al variare dell'età del fango corrisponde una grossa variazione nella dimensione dei fiocchi di fango attivo, che risulta più accentuata rispetto a quella verificata per impianti SBR (Barbusiński, et al., 1994). Da un punto di vista pratico questa differenza può indicare una maggiore stabilità dei reattori SBR in termini di dimensione dei fiocchi, e potenzialmente di sedimentabilità degli stessi (Liao, et al., 2006).

Benché non sia evidente la relazione tra SRT e la dimensione dei fiocchi, è stata osservata una tendenza generale per cui le distribuzioni dimensionali più stabili risultano quelle di fanghi con SRT superiore a 9 giorni, come evidente dal valore ridotto della deviazione standard riportata in Figura 1-15 (Liao, et al., 2006).

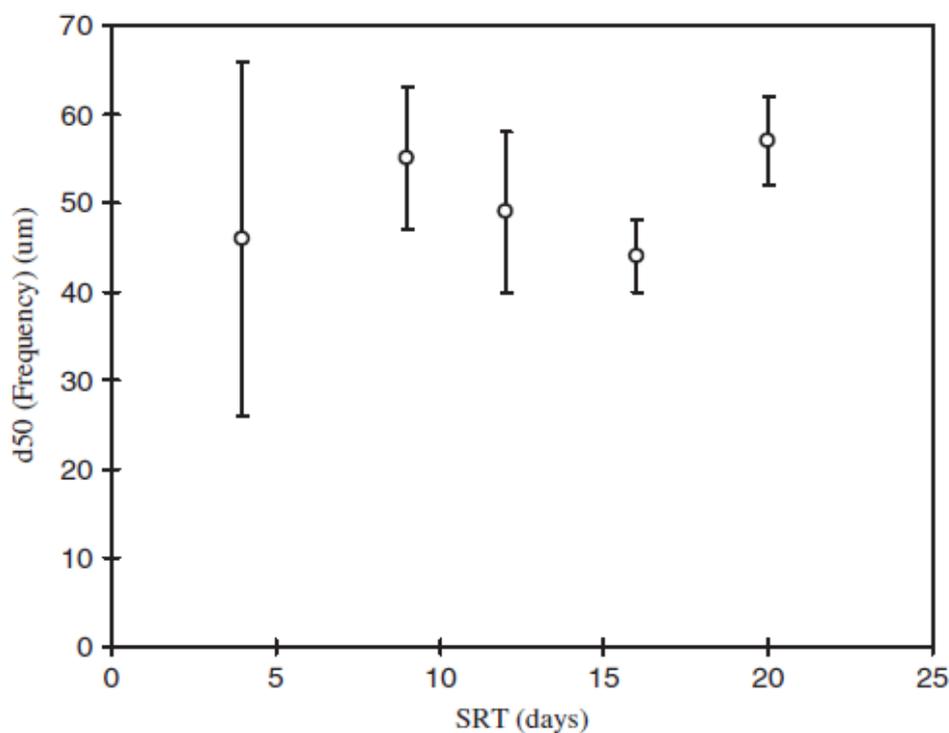


Figura 1-15 - Effetto della SRT sulla mediana della distribuzione dimensionale dei fiocchi.

Oltre alla dimensione, anche la forma dei fiocchi subisce l'effetto della SRT: per tempi di residenza cellulare compresi tra 4 e 6 giorni i fiocchi si presentano più irregolari e di forma cilindrica; con SRT maggiore di 9 giorni i fiocchi hanno, invece, una struttura più compatta e sferica.

Su impianti con separazione gravimetrica solido-liquido, è stato osservato che SRT di 16 e 20 giorni garantiscono una concentrazione dei solidi dell'effluente inferiore rispetto a soluzioni con SRT minore (dai 4 ai 12 giorni). La maggiore sedimentabilità dei fanghi con SRT più elevata è dovuta alla minore carica negativa superficiale e al carattere marcatamente idrofobo.

La relazione tra età del fango, configurazione impiantistica e caratteristiche di sedimentabilità dei fanghi è quindi un effetto di cui tenere conto nella gestione delle filiere Main-Stream e Side-Stream con impianti a fanghi attivi convenzionali (CAS, *Conventional Activated Sludge plants*), in cui una diversa sedimentabilità può fare la differenza tra l'efficacia e la non efficacia del processo di arricchimento.

1.3.4.4 Effetto del sistema di separazione solido-liquido sulla selezione batterica

I reattori biologici a membrana vengono adottati sempre più frequentemente nell'ambito dei trattamenti di depurazione delle acque reflue, soprattutto dove si hanno a disposizione solo spazi ristretti o devono essere rispettati limiti molto restrittivi sulla qualità dell'effluente (Manser, et al., 2005).

L'adozione di una membrana come sistema di separazione finale dei solidi in sostituzione del sedimentatore secondario permette, infatti, di mantenere una elevata concentrazione di solidi sospesi nel mixed liquor (Hongyan et al., 2006) e l'ottenimento di diversi vantaggi rispetto a impianti tradizionali con sedimentatori:

- possibilità di applicare un carico volumetrico (quantità di contaminanti applicata, nell'unità di tempo, al volume della vasca di aerazione) maggiore, quindi di diminuire il tempo di residenza idraulico e di conseguenza il volume delle vasche di processo (Bin et al., 2009);
- possibilità di ridurre la produzione di fanghi di supero (Ng and Hermanowicz, 2005);
- possibilità di trattenere all'interno del sistema biomasse caratterizzate da bassi ratei di crescita, come ad esempio i nitrificanti, anche in condizioni di basse età del fango (Tian et al., 2012);
- possibilità di incrementare la capacità del sistema di rispondere a rapide variazioni qualitative dell'influenza (Bin et al., 2009);
- possibilità di rimuovere, ad alte età del fango, composti recalcitranti o caratterizzati da un basso grado di biodegradabilità (Tian et al., 2012);
- possibilità di lavorare con minori concentrazioni di ossigeno disciolto e quindi di ottenere, sotto certe condizioni, la presenza simultanea presenza di processi di nitrificazione e di denitrificazione se il sistema è dimensionato con età del fango elevata (Jin et al., 2006);

- produzione di un effluente di elevata qualità, in termini di basso contenuto di torbidità, batteri, SST e BOD (Holakoo et al., 2007);
- necessità di minori impegni di superficie per il trattamento dei reflui (Paetkau and Cicek, 2011).

Inoltre, con l'adozione di impianti MBR viene meno la necessità di considerare la relazione tra età del fango, configurazione impiantistica e caratteristiche di sedimentabilità dei fanghi, la cui importanza per impianti CAS è descritta nel paragrafo 1.3.4.3.

Di contro, i sistemi MBR presentano elevati costi d'investimento iniziale e di manutenzione, nonché elevati consumi energetici e gestionali legati allo sporcamento delle membrane e di conseguenza alle operazioni necessarie alla loro pulizia. Tale effetto, in quanto direttamente collegato alla concentrazione di substrato nell'influenza (Nuengjamnong et al., 2005), alla concentrazione di materiale colloidale (Fan et al., 2006), dei solidi in vasca (Germain et al., 2005) e dei prodotti dell'attività batterica (come ad esempio gli EPS, Extracellular Polymeric Substances) (Nagaoka et al., 1996) risulta un fattore di primaria importanza qualora si lavori con reattori con elevate età del fango.

Essendo l'ottenimento di elevate concentrazioni di biomassa l'obiettivo primario della filiera Side-Stream, l'adozione di un sistema MBR rappresenta sicuramente una soluzione vantaggiosa, sia per i vantaggi già citati, sia per la possibilità di avere un maggiore controllo dell'età del fango del sistema. Questo è un aspetto molto importante soprattutto se si considerano sistemi Side-Stream alimentati con flussi ad elevato carico di ammonio, che possono risultare particolarmente difficili da gestire (Head, et al., 2005). In particolare in tali sistemi può essere necessario mantenere una elevata SRT e quindi una elevata concentrazione di solidi, con tutti i problemi di sedimentazione connessi (Campos, et al., 1999).

Secondo alcuni studi (Munz et al., 2008; Munz et al., 2010) risulta che l'adozione di sistemi MBR porta a cambiamenti nelle caratteristiche cinetiche del fango attivo, anche se non sono evidenti variazioni della popolazione batterica, se confrontata con quella sviluppatasi in impianti a fango attivo convenzionali. Una possibile spiegazione risiede nel fatto che le costanti di semisaturazione dell'ossigeno e del substrato sono influenzate da possibili fenomeni di trasferimento di massa all'interno dei fiocchi di fango attivo, che dipendono dalle dimensioni dei fiocchi stessi, le quali a loro volta sono legate alla configurazione impiantistica (Manser et al., 2005). Da diversi studi risulta che le dimensioni dei fiocchi in sistemi MBR sono minori rispetto a quelle ottenute in sistemi CAS (Conventional Activated Sludge), osservazione in accordo con il fatto che nei primi sono sufficienti concentrazioni di ossigeno inferiori per il mantenimento dell'attività aerobica. È

stato infatti osservato che i fiocchi all'interno di sistemi CAS sono circa dieci volte più grandi di quelli presenti negli MBR; questo è probabilmente dovuto all'assenza di una selezione dei fiocchi in base alla sedimentabilità all'interno degli MBR, per cui i batteri non sono indotti a aggregarsi in ammassi di grandi dimensioni. Inoltre l'adozione di un'areazione a bolle grosse per la pulizia delle membrane comporta elevate tensioni di taglio sui fiocchi andando a limitarne l'aggregazione in strutture di dimensioni maggiori (Figura 1-16) (Manser, et al., 2005).

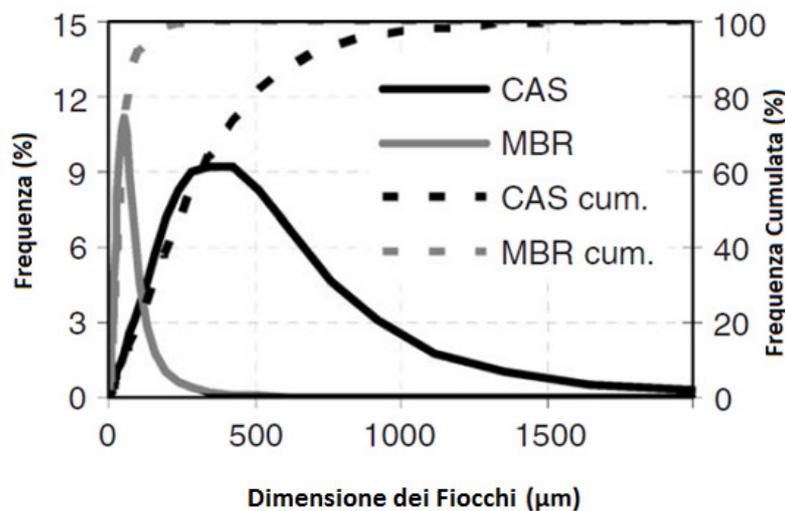


Figura 1-16 - Confronto tra le distribuzioni dimensionali dei fiocchi di sistemi CAS e MBR (Manser et al., 2005)

Diversamente dalla distribuzione dimensionale, secondo Manser et al. (2005), la composizione della popolazione batterica non è influenzata dal tipo di separazione finale adottata. La cinetica batterica è però influenzata da fenomeni di trasferimento di massa dalla fase liquida verso l'interno del fiocco (Figura 1-17). Relativamente al processo di nitrificazione, le concentrazioni di ossigeno e di ammonio diminuiscono dall'esterno verso l'interno del fiocco, mentre i nitriti prodotti dagli AOB (Ammonium Oxidizing Bacteria) sono immediatamente consumati dagli NOB (Nitrite Oxidizing Bacteria): di conseguenza la disponibilità di nitriti non è influenzata dalla sua diffusione all'interno del fiocco. È inoltre presente il fenomeno di consumo di ossigeno da parte dello strato esterno del fiocco composto da biomassa eterotrofa, che ne causa una diminuzione della disponibilità per la nitrificazione (Manser, et al., 2005).

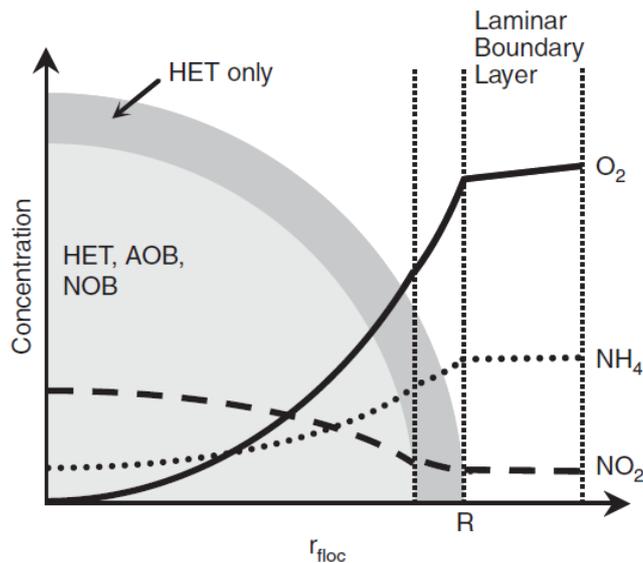


Figura 1-17 - Schema dell'andamento della concentrazione dei substrati all'interno del fiocco (Manser et al., 2005)

Questo potrebbe comportare l'instaurarsi di condizioni limitanti in termini di ossigeno e azoto ammoniacale all'interno di fiocchi di dimensioni maggiori, andando a determinare diversi valori delle costanti di semisaturazione e quindi della cinetica del processo. Tale condizione favorisce, dunque, le cinetiche dei sistemi MBR che presentano strutture del fiocco molto più piccole e quindi meno soggette a variazioni delle concentrazioni dei substrati all'interno del fiocco.

1.3.4.5 Effetto di selezione della biomassa nitrificante

La possibilità di ottenere, in filiere Side-Stream, popolazioni batteriche nitrificanti con cinetiche di crescita più rapide rispetto a quelle dei nitrificanti presenti all'interno del Main-Stream, rimane, ad oggi un aspetto che richiede di essere approfondito. In particolare, l'adozione di configurazioni impiantistiche o condizioni ambientali diverse durante il lungo periodo possono portare alla selezione di diverse popolazioni batteriche nitrificanti e quindi alla modifica dei tassi di nitrificazione complessivi della biomassa attraverso la combinazione di cinetiche enzimatiche, tassi di crescita e tassi di decadimento.

Dal punto di vista cinetico, i batteri possono essere suddivisi in *r-strategist* o *k-strategist*. La prima categoria, in cui ricadono nitrificanti comuni come *Nitrosomonas* (AOB) e *Nitrobacter* (NOB), comprende tutti quei batteri che crescono velocemente in presenza di elevate concentrazioni di substrato caratterizzati da alti valori dei tassi di crescita e della costante di semisaturazione per il substrato. Di contro i *k-strategist*, come *Nitrosospira* (AOB) e *Nitrospira* (NOB), crescono lentamente, ma possono sopravvivere a periodi più lunghi in condizioni di bassa concentrazione di

substrato a causa dei bassi valori di K_N . Alcune caratteristiche cinetiche delle popolazioni batteriche nitrificanti sono riportate in Tabella 1-1; tali valori, se non specificato diversamente, fanno riferimento alla temperatura di 20°C e pH compreso tra 7.5 e 8.5 (Dytczak et al., 2008).

Tabella 1-1 Parametri cinetici per AOB e NOB (Dytczak et al., 2008)

Batteri nitrificanti		Strategia	K_{NH} [mg N/L]	K_o [mg O ₂ /L]	μ_{nm} [h ⁻¹] (30°C)	k_{dn} [d ⁻¹] (30°C)
AOB	Nitrosospira	K (lenti)	1.96 (NH ₄ ⁺)	-	-	-
	Nitrosomonas	r (veloci)	26.60 (NH ₄ ⁺)	0.51	0.043	0.26
NOB	Nitrospira	K (lenti)	0.14 (NO ₂ ⁻)	0.13	-	0.14
	Nitrobacter	r (veloci)	7 (NO ₂ ⁻)	1.98	0.020	0.07

La selezione di comunità batteriche diverse da quelle iniziali permette il mantenimento del processo di nitrificazione anche in condizioni intollerabili per le frazioni più presenti all'interno del fango iniziale dal punto di vista della concentrazione di substrato, pH, Ossigeno Disciolto e età del fango. Diversi studi hanno dimostrato, infatti, come popolazioni batteriche inizialmente identiche fatte crescere in condizioni ambientali diverse, possono subire variazioni significative dal punto di vista della distribuzione della comunità in funzione della concentrazione di azoto ammoniacale e del pH senza però variare significativamente l'attività nitrificante complessiva del fango attivo (Prinčič, et al., 1998; Smith, et al., 2008).

L'effetto della concentrazione del substrato azotato nell'influente può determinare una variazione nel contenuto percentuale di AOB rispetto al totale dei microorganismi presenti nel reattore. In particolare è stato osservato un incremento del contenuto di AOB con l'aumentare della concentrazione di azoto ammoniacale nell'influente, passando dal 6% per basse concentrazioni (35 mg N-NH₄⁺L⁻¹), al 18-30% per concentrazioni moderate (65-70 mg mg N-NH₄⁺L⁻¹) e fino a 35-76% per concentrazioni elevate (500-700 mg mg N-NH₄⁺L⁻¹). Analogamente agli AOB, anche il contenuto percentuale degli NOB rispetto alla biomassa totale presenta una elevata variabilità in funzione della concentrazione di NH₄⁺-N, passando dal 2.5% al 14%, fino a raggiungere il 22-39% (Dytczak, et al., 2008). Tali risultati risultano fortemente legati al rapporto influente tra Carbonio e Azoto (Carrera, et al., 2004).

La selezione batterica potrebbe però essere influenzata anche da altri fattori, oltre che dalle caratteristiche di processo e dell'influente. È stato riscontrato che l'adozione di particolari soluzioni impiantistiche può portare all'instaurarsi di popolazioni batteriche *r-strategist*, e quindi elevati ratei di nitrificazione. Nell'esperienza di Dytczak, et al. (2008b) un SBR operante alternativamente in

condizioni aerobiche ed anossiche è stato utilizzato per valutare l'effetto della successione delle due fasi sul processo di nitrificazione rispetto all'applicazione di un trattamento strettamente aerobico. Tassi di nitrificazione pari a $6.16 \pm 0.34 \text{ mg NH}_4^+-\text{N gVSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sono stati ottenuti in condizioni alternate mentre il processo di nitrificazione in condizioni strettamente aerobiche ha mostrato rimozioni di $2.95 \pm 0.26 \text{ mg NH}_4^+-\text{N gVSS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e maggiori effetti inibenti dovuti all'accumulo di ammoniaca libera. Tale diversità risulta però dipendente non tanto dalle diverse condizioni operative quanto, effettivamente, dalle diverse comunità batteriche selezionate all'interno dei due sistemi. Verificando la composizione delle popolazioni batteriche nelle due configurazioni impiantistiche, risulta che il reattore strettamente aerobico è dominato batteri *k-strategist* come *Nitrosospira*, mentre nell'alternato sono più comuni gli *r-strategist*, come *Nitrosomonas*. Inoltre, la percentuale di batteri ammonio ossidanti rispetto al totale dei microorganismi presenti è maggiore nel reattore alternato, dove raggiunge il 25.9%, contro il 19.9% del reattore strettamente aerobico.

1.3.4.6 Problematiche riscontrate, insuccessi e aspetti "oscuri"

Dagli studi effettuati sulla bio-augmentation di biomassa nitrificante risulta che i problemi più significativi hanno riguardato la gestione dei reattori Side-Stream, in particolare se alimentati con flussi ad elevato carico di ammonio (Torà et al., 2010). La gestione di tali sistemi risulta delicata e spesso possono presentarsi limitazioni al processo di nitrificazione, per insufficiente alcalinità o malfunzionamenti degli aeratori. Questo comporta una diminuzione della biomassa utilizzabile per la bio-augmentation e un innalzamento della concentrazione di ammonio sia in uscita dagli impianti Side-Stream, sia dai Main-Stream. In merito a questo è però da considerare che su scala reale l'apporto volumetrico in ingresso ai Main-Stream dai Side-Stream è molto minore rispetto a quello testato in molte sperimentazioni a scala ridotta. In alcune sperimentazioni viene adottata una portata di bio-augmentation pari al 9-20% del flusso totale in ingresso, mentre in sistemi reali questa percentuale si può ridurre all' 1-2% (Head, et al., 2005; Head, et al., 2004).

In alcuni casi, nell'effluente dei Main-Stream è stato osservato un aumento delle concentrazioni di nitrati ($\text{NO}_3\text{-N}$) (Figura 1-18), dovuto al fatto che all'interno del flusso di arricchimento c'è una concentrazione di $\text{NO}_3\text{-N}$ di quasi 600 mg/L, all'incirca pari alla concentrazione di ammonio nell'alimentazione dei reattori Side-Stream. La concentrazione di nitrati, oltre ad essere limitata dalla normativa per quanto riguarda lo scarico, se troppo elevata può comportare fenomeni di rising (risospensione dei fanghi) all'interno dei sedimentatori, compromettere la qualità dell'effluente anche per quanto riguarda la concentrazione di solidi e abbassare l'età del fango complessiva del sistema.

Anche la concentrazione del COD solubile (sCOD) nell'effluente dei Main-Stream può presentare un incremento simile a quello visto per i nitrati. Questo è dovuto al fatto che il flusso di bio-augmentation contiene COD solubile (sCOD), che contribuisce all'ingresso di sCOD nei reattori Side-Stream. In particolare il contributo è stato stimato pari allo 1.8 – 5.4% del sCOD in ingresso. Questo sCOD è non biodegradabile o lentamente biodegradabile dato che il refluo trattato nei reattori Side-Stream proviene in molti casi da fasi di digestione anaerobica (Head, et al., 2005; Head, et al., 2004). Ancora una volta però, sono da considerare le diverse proporzioni del flusso di bio-arricchimento tra il caso sperimentale e quello reale.

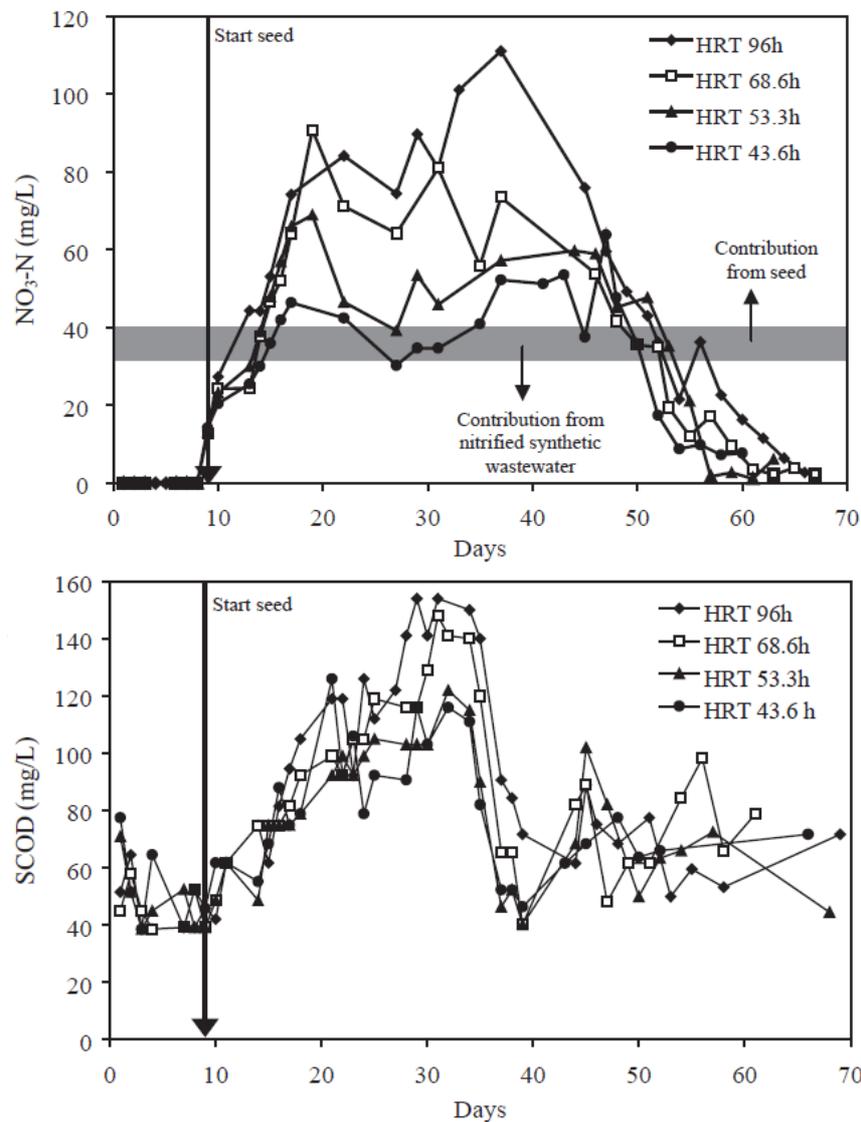


Figura 1-18 - Andamento delle concentrazioni di nitrati e di sCOD nell'effluente dei SBR MAIN-STREAM (Head, et al., 2004).

È stato inoltre osservato che la biomassa nitrificante aggiunta con la bio-augmentation può subire dilavamento in tempi molto ridotti una volta inoculata all'interno della filiera Main-Stream il che

significa che la massa di nitrificanti aggiunta non può essere usata da sola per predire il buon esito della bio-augmentation (Head, et al., 2005; Abeysinghe, et al., 2002) nonostante sia evidente la tendenza ad ottenere efficienze maggiori del processo di bio-arricchimento all'aumentare delle quantità di biomassa inoculata.

Il processo di bio-arricchimento applicato su sistemi con biomassa ben sviluppata e già in grado di raggiungere buone rimozioni degli inquinanti non presenta benefici significativi (Qasim, et al., 1982), sottolineando l'efficacia della bio-augmentation solo in condizioni di stress della biomassa nitrificante.

Nei casi in cui la biomassa è stata fatta crescere utilizzando flussi ad elevato carico e alte temperature possono verificarsi problemi di acclimatazione della biomassa all'ambiente Main-Stream (Head, et al., 2005), che causano malfunzionamenti o completi insuccessi del processo di bio-arricchimento.

1.4 L'evoluzione del controllo del processo di nitrificazione

Il controllo dell'efficacia del processo di nitrificazione costituisce una delle operazioni fondamentali nella gestione degli impianti di depurazione data la facilità con cui il processo può essere negativamente influenzato da fenomeni d'inibizione e dati i limiti sempre più restrittivi previsti dalle attuali normative sugli scarichi. Allo scopo di ottenere informazioni sempre più precise e più frequenti sullo stato del processo, le tradizionali analisi di qualità dell'effluente del processo biologico sono sempre più di frequente affiancate da strumenti innovativi in grado di permettere ai gestori degli impianti di depurazione il riconoscimento di una condizione non favorevole al corretto svolgimento del processo o un'anomalia significativa nel refluo affluente all'impianto.

Recentemente sono state implementate una serie di nuove tecnologie respirometriche denominate "Upset Early Warning Technologies", UEWT (Love N.G., 2000). Queste tecniche, basate su una nuova generazione di sensori, risultano essere particolarmente efficaci e veloci, in quanto consentono di misurare in tempo reale l'efficienza del processo di depurazione misurando direttamente l'attività della biomassa, piuttosto che controllare indirettamente le concentrazioni degli inquinanti di vario tipo nell'effluente.

Le UEWT risultano particolarmente efficaci nel monitorare e segnalare in tempo reale i cambiamenti nell'attività metabolica della biomassa (fattore di primaria importanza se si considera che in gran parte degli impianti di depurazione presenti in Italia l'efficacia della rimozione degli

inquinanti da parte della biomassa può essere propriamente rilevata nell'effluente, e quindi con un ritardo che è funzione del tempo di ritenzione idraulica del sistema), ma richiedono buone conoscenze dei processi metabolici in quanto non è attualmente possibile predire con sufficiente anticipo la formazione di condizioni limitanti per la biomassa nelle vasche di processo.

Nonostante il crescente interesse verso lo sviluppo di simili tecnologie, molte di queste non hanno mai avuto un reale sbocco sul mercato, sia per il costo elevato, sia per la scarsa adattabilità a matrici ambientali, come nel caso delle acque reflue industriali, che possono variare notevolmente la loro composizione in funzione del processo da cui si originano.

Le principali caratteristiche che una tecnologia UEWT dovrebbe possedere sono (Ficara and Rozzi, 2004; Love and Bott, 2000):

- rapidità nella risposta per attivare contromisure in tempi efficaci;
- basso costo d'acquisto e manutenzione;
- facilità d'uso.

Agli esordi, la tecnica respirometrica si basava unicamente sul controllo del consumo di ossigeno da parte della biomassa e solo successivamente sono state sviluppate tecniche in grado di monitorare altre grandezze sperimentali direttamente correlate con il metabolismo batterico. Tali tecniche di misura dell'interazione tra la biomassa e il refluo sono caratterizzate dall'essere fortemente legate alla componente biologica, caratteristica che permette di ottenere una maggior completezza nell'informazione rispetto ai tradizionali sensori fisico-chimici.

Tra le tecniche più utilizzate, oltre alla misura dell'Oxygen Uptake Rate (OUR) si ricordano:

- *la titolazione pH-stat*: monitora la capacità di alcuni microrganismi di cambiare il carattere acido, basico o neutro di alcuni substrati. Si tratta di una tecnica molto versatile e applicabile a qualunque reazione che coinvolga un cambiamento di pH;
- *la microcalorimetria*: consiste nel valutare l'attività metabolica misurando l'energia termica prodotta;
- *i biosensori a cella intera* : stima lo stato metabolico della comunità microbica attraverso la valutazione di parametri chimico-fisici. Tra i biosensori a cella intera il più comune è il Microtox® , che determina l'intensità luminosa della bioluminescenza naturalmente prodotta da diverse specie batteriche di origine marina;
- *biosensori a base molecolare* : in questi dispositivi la componente biologica è una specifica molecola (come un enzima, una catena di nucleotidi o molecole di anticorpo) che reagiscono con un substrato specifico. Tali dispositivi hanno la caratteristica di essere molto specifici, e rispondono

solamente alla classe di analiti per cui sono stati studiati. Il loro uso corrente comprende il rilevamento di pesticidi e composti organici di vario tipo, presenti sia nell'industria alimentare che nel campo della tutela e del monitoraggio ambientale.

Fino a qualche anno fa, le tecniche respirometriche applicate al monitoraggio della nitrificazione potevano essere divise in due grandi categorie: quelle basate sulla domanda biochimica di ossigeno e quelle basate sulla titolazione pH-stat. I metodi basati sulla domanda di ossigeno fanno sorgere il problema della discriminazione del contributo legato al consumo di ossigeno da parte dei batteri nitrificanti dal consumo dovuto alla respirazione endogena e alla degradazione di substrati carboniosi da parte dei batteri eterotrofi, nonostante quest'ultimo contributo possa essere facilmente minimizzato adoperando un fango che sia già arrivato alle condizioni endogene. Inoltre, poiché entrambe le fasi della nitrificazione richiedono ossigeno, diventa difficile calcolare separatamente la velocità di nitrificazione e quella di nitrificazione. Il respirometro NITROX (Verschuere L., 1995; Surmacz-Gorska J, 1995; Surmacz-Górska J., 1996; Gernaey, 1997), ad esempio, è stato proposto per valutare il tasso massimo di nitrificazione con un metodo che si basa sulla differenza tra l'OUR calcolato sul metabolismo cumulato dagli organismi eterotrofi e di quelli autotrofi e l'OUR calcolato dopo l'inibizione selettiva degli AOB attraverso l'aggiunta di inibitori selettivi (ad esempio Alliltiourea, ATU). Conseguentemente, data l'inattivazione della biomassa si rende necessaria la ripetizione di ogni prova con nuovi volumi di fango attivo.

E' stato pensato anche di valutare le costanti cinetiche di entrambe le popolazioni (eterotrofa e autotrofa) dosando simultaneamente substrati carboniosi e azotati in un respirometro aperto (Vandebroek R., 1986; Vanrolleghem P.A., 1990), dove il profilo dell'OUR deriva sia dalla diffusione dell'ossigeno all'interno del bioreattore sia dalla respirazione complessiva della biomassa. Una elaborazione adeguata permette la divisione del respirogramma in due parti: una prima parte in cui il consumo dell'ossigeno è dovuto anche all'ossidazione del substrato carbonioso, e una seconda dove il consumo di ossigeno è attribuibile unicamente alla respirazione della popolazione autotrofa. Utilizzando questa tecnica non è comunque possibile separare l'attività di nitrificazione da quella di nitrificazione, mentre più efficace è in questo senso l'utilizzo delle procedure di titolazione, in quanto nel processo di nitrificazione si ha una variazione di pH non presente durante l'ossidazione di nitriti a nitrati.

In letteratura, tuttavia, si trovano pochi esperimenti basati esclusivamente sulla titolazione in quanto, a distanza di poco tempo dalla diffusione di questa tecnica nella comunità scientifica, ha fatto la sua comparsa una nuova e più efficiente metodologia, ovvero la combinazione della misura dell'ossigeno disciolto e delle procedure titrimetriche. Poiché per comprendere le potenzialità della

combinazione delle tecniche che sfruttano la domanda biochimica di ossigeno e delle tecniche di titolazione pH-stat è necessario conoscerle prima singolarmente, queste metodologie verranno descritte più approfonditamente nei paragrafi seguenti.

1.1.1. Tecniche titrimetriche

1.4.1.1 Titolazione DO-Stat

La respirometria classica, che prevede la misura diretta del consumo di ossigeno, è ancora oggi tra le tecniche più utilizzate per lo studio dei processi metabolici. Esperimenti di questo tipo ben progettati consentono di raccogliere informazioni sull'attività della biomassa, sulla natura e la concentrazione del substrato e sulla presenza di particolari gruppi trofici (come ad esempio i batteri autotrofi ammonio ossidanti ed eterotrofi carbonio ossidanti). Sono stati implementati molti tipi di respirometri classici, ma quelli usati più comunemente sono classificabili secondo due criteri:

- se il respirometro è aperto o chiuso rispetto ai flussi di gas e di liquido;
- se la concentrazione dell'ossigeno viene misurata in fase acquosa o gassosa.

Utilizzando respirometri aperti il bilancio di massa dell'ossigeno all'interno dei reattori include il trasferimento di massa del gas, che per essere calcolato richiede la conoscenza di k_{la} (Coefficiente di trasferimento dell'Ossigeno) e di DO_{sat} (Concentrazione di saturazione dell'ossigeno in fase liquida). Entrambi i parametri dipendono a loro volta da molti fattori, come la pressione e la temperatura a cui si trova il sistema e le proprietà più generali delle fasi liquide coinvolte. Per avere misure accurate si rende quindi necessario che la loro stima venga ripetuta anche parecchie volte nel corso dell'esperimento, rendendo quest'ultimo molto impegnativo.

Per eliminare la necessità di ripetute aerazioni successive attraverso flussi di aria sono stati progettati sistemi alternativi che potessero fornire continuamente aria alla sospensione di fango attivo, anche tramite un flusso di liquido aerato. Negli ultimi anni ha conquistato consensi e quote di mercato sempre maggiori la tecnologia della titolazione DO-stat, che si basa sul valutare il consumo di ossigeno da parte dei microrganismi misurando la quantità di titolante usato per mantenere costante nel tempo la concentrazione di ossigeno disciolto nel mixed liquor. La tecnologia DO-stat può essere considerata paragonabile a quella di un normale respirometro senza flusso di gas che però ammetta un flusso liquido in ingresso a cui non ne corrisponda uno in uscita. Questo sistema consiste sostanzialmente in un bioreattore in cui è inserita una sonda per l'ossigeno disciolto e in un sistema di titolazione automatico caricato con una soluzione che è in grado di mantenere costante il livello di ossigeno disciolto all'interno del bioreattore. La soluzione titolante è generalmente una

diluizione di perossido di idrogeno, che una volta aggiunto alla sospensione viene rapidamente convertito in acqua e ossigeno molecolare dall'enzima *catalasi* naturalmente prodotto dalla biomassa. Per allestire una prova DO-stat automatizzata si pone un'aliquota di fango attivo all'interno di un bioreattore ben agitato e termostato. Dunque vengono applicate al bioreattore una sonda per l'ossigeno disciolto e una sonda per il controllo della temperatura, le quali vengono connesse, attraverso un'apparecchiatura di controllo, a un computer per la raccolta e l'elaborazione dei dati. Quando la concentrazione dell'ossigeno disciolto misurata all'interno del bioreattore scende al di sotto del valore di set-point impostato, una piccola quantità di soluzione titolante viene aggiunta alla sospensione dal sistema di dosaggio. Il sistema di dosaggio è composto da un contenitore dove è mantenuta la soluzione titolante, una pompa e delle elettrovalvole controllate dal computer per la gestione dell'erogazione della soluzione.

Il titolo della soluzione deve ovviamente essere noto e controllato e deve potersi mantenere stabile nel breve periodo.

In questo caso il consumo di ossigeno da parte della biomassa risulta proporzionale al tasso di aggiunta della soluzione titolante. La tecnica in questione è stata convalidata dal confronto con le tecniche di respirometria aperta e con le tecniche di respirometria chiusa. In seguito è stata applicata con successo alla valutazione della cinetica della nitrificazione e della respirazione eterotrofa (Ficara, 2000; Ficara and Flocchi, 2004; Artiga et al., 2005; Flocchi et al., 2006; Munz et al., 2010). Non solo la ripetibilità di queste tecniche è soddisfacente, ma sono stati riscontrati molti vantaggi rispetto alle tecnologie classiche di respirometria:

- la possibilità di lavorare a concentrazioni di ossigeno liberamente scelte dall'operatore. Poiché il sistema è considerato chiuso rispetto ai flussi di gas, l'unico limite imposto sulla selezione del valore di DO a cui lavorare viene dalla necessità di evitare trasferimenti significativi di ossigeno tra la fase liquida e quella gassosa. Tale problematica può comunque essere trascurata se il bioreattore è progettato in maniera tale da minimizzare il contatto di superficie tra le due fasi;
- la possibilità di trascurare il coefficiente di trasferimento di massa dell'ossigeno ($K_L a$), in quanto l'ossigeno è fornito tramite un flusso di liquido;
- la possibilità di condurre una misurazione continua, in quanto non sono necessari cicli di ri-aerazione (l'ossigeno viene fornito in base al consumo);
- la non necessità di richiedere una risposta particolarmente accurata della sonda dell'ossigeno in range molto estesi, in quanto quest'ultima è impiegata soltanto per valutare variazioni di ossigeno disciolto all'interno di un range limitato.

- il tempo di risposta del sistema di misura non ha effetto sulla stima del rateo di consumo dell'ossigeno, in quanto influenza soltanto la larghezza delle oscillazioni rilevabili di DO attorno al valore fissato.

In una tipica curva di titolazione DO-stat, la quantità di ossigeno aggiunta espressa come equivalenti di acqua ossigenata è rappresentata in funzione del tempo. Generalmente si osserva una prima fase in cui la curva presenta una pendenza limitata tipica della respirazione endogena. Al momento dell'aggiunta del substrato nutriente la pendenza della curva subisce un repentino aumento dovuto all'incrementato consumo di ossigeno necessario per la respirazione esogena. Quando tutto il substrato è stato consumato, la pendenza della curva si assesta velocemente a valori tipici della fase endogena. Il tasso di respirazione esogeno è calcolato quindi sottraendo dalla pendenza della porzione curva di titolazione relativa alla fase esogena la pendenza della curva relativa alla respirazione endogena.

I valori di DO misurati all'interno del bioreattore potrebbero subire nel corso dell'esperimento leggere oscillazioni dovute al sovrapporsi dei seguenti processi:

- la dispersione delle gocce di H_2O_2 all'interno della sospensione;
- l'efficacia della conversione catalitica dell' H_2O_2 in acqua e ossigeno;
- i tempi di risposta della sonda dell'ossigeno.

Questi fenomeni potrebbero generare degli scalini nella curva di addizione dell' H_2O_2 , comunque fino a quando queste dinamiche sono più veloci delle reazioni da controllare, la determinazione dei parametri respirometrici non è influenzata dagli scalini presenti nella curva di titolazione. Gli svantaggi di questa tecnica sono dovuti al fatto che, in esperimenti di lunga durata e in quelli che presentano un alto tasso di respirazione cellulare, maggiore di $1,2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Ficara, 2000), si può incorrere in una leggera sottostima del consumo di ossigeno. Dunque è bene evitare di condurre esperimenti con la tecnica DO-stat con sospensioni di fango dove sono state riscontrate alte concentrazioni iniziali di bCOD.

Per finire, grazie alla sua semplicità, questa procedura è applicabile ad ogni metodo per il controllo on-line e per ogni software che possa essere ritenuto utile per il calcolo dei coefficienti respirometrici. Per quanto riguarda la riproducibilità dei dati ottenuti con questa tecnica, analisi sperimentali di confronto condotte sui tassi di respirazione della biomassa eterotrofa dimostrano come i risultati basati sulla tecnologia DO-stat collimino molto bene con quelli ottenuti tramite le tecniche classiche di respirometria aperta e chiusa (Ficara E., 2000). Un altro inconveniente che può verificarsi nel corso di prove DO-stat è l'inibizione dell'attività batterica e quindi una sottostima della stessa a seguito del dosaggio di eccessivi quantitativi di perossido di idrogeno nonché

l'aumento, del valore del coefficiente di decadimento endogeno della biomassa dovuto alla presenza di H_2O_2 .

1.4.1.2 Titolazione pH-stat

La titolazione a pH costante è una tecnica derivata dalla titolazione DO-stat e può essere applicata a qualsiasi tipo di reazione biologica che causi consumo o produzione di ioni H^+ . Si consideri, a titolo di esempio, una generica reazione biologica che avviene nel mixed liquor di un bioreattore. Tale reazione converte un substrato S in un prodotto P con la concomitante formazione di protoni causando una variazione di pH dipendente dalla capacità tampone del sistema.

Il tasso di consumo del substrato è dunque proporzionale alla produzione/consumo di acidità secondo lo specifico rapporto stechiometrico della reazione, e misurando la variazione di pH nel tempo si può quindi calcolare indirettamente la velocità del metabolismo cellulare. Tuttavia, le alterazioni del pH all'interno del bioreattore possono creare condizioni limitanti per l'attività della biomassa, e gli esperimenti in cui il pH è lasciato libero di variare possono fornire risultati falsati. Si può ovviare a questo inconveniente tamponando la variazione di pH all'interno del bioreattore con l'aggiunta di una soluzione appropriata, acida o basica. Operando in questo modo la quantità di acidità prodotta (o consumata) dai processi biologici viene misurata indirettamente dalla quantità di soluzione titolante aggiunta. Il senso della titolazione pH-stat è quello di misurare la produzione o il consumo di acidità dovuti ad un processo metabolico attraverso la misura degli equivalenti di soluzione titolante che devono essere aggiunti nel tempo al mixed liquor per mantenere costante il pH della sospensione. Una postazione per la titolazione pH-stat (Figura 1-19) consiste essenzialmente in un bioreattore in cui inserire il fango attivo (10), un sistema di dosaggio di soluzioni a più canali indipendenti (4) ed un misuratore di pH (9). Il sistema di titolazioni pH-stat deve necessariamente prevedere anche la presenza di un sistema di ossigenazione del mixed liquor necessario a mantenere in vita la biomassa (11).

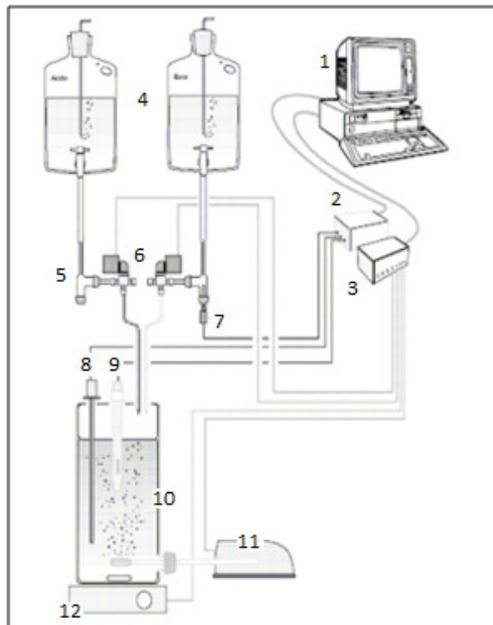


Figura 1-19 schema per una postazione generica per la procedura di titolazione pHstat : 1) PC, 2) 3) dispositivi per il controllo della titolazione automatica, 4) soluzioni titolanti, 5) sistema idraulico, 6) elettrovalvole, 7),8) sonde per il controllo della temperatura 9) pHmetro, 10) bioreattore, 11) aeratore, 12) agitatore magnetico. (Massone et al., 1998)

Nella pratica, un esperimento di titolazione pH-stat consiste nell'aggiunta controllata di una soluzione a titolo noto di un acido o di una base forte per mantenere costante il pH durante il processo in esame. Quando nel bioreattore è presente solamente il fango il sistema di controllo provvede a dosare titolante fino a raggiungere il valore di pH di set-point ed a compensare le minime variazioni di pH indotte dal metabolismo endogeno. Una volta aggiunto substrato all'interno del bioreattore, il sistema di controllo aumenta la velocità di aggiunta per compensare l'acidificazione o la basificazione del sistema ad opera delle reazioni biologiche che sono portate avanti dalla biomassa. Nel caso della nitrificazione, dato che il pH è mantenuto costante tramite la titolazione e poiché la velocità con cui viene aggiunta la base equivale alla velocità di produzione di protoni liberi, è possibile ricavare il tasso di ossidazione di un'aliquota di ammonio aggiunto al fango attivo conoscendo i rapporti stechiometrici della reazione in questione.

Affinché il sistema pH-stat fornisca sempre dati interpretabili è necessario che vengano rispettate le seguenti condizioni:

- la concentrazione di substrato aggiunto non deve mai divenire limitante per i processi biologici;
- le dinamiche delle reazioni che coinvolgono gli equilibri dei tamponi carbonici naturali devono essere più veloci dei processi biologici che si vanno a monitorare;
- al pH di esercizio, la capacità tampone del sistema deve essere esplicita prevalentemente dagli equilibri carbonici;

- lo scambio di gas tra la fase liquida e quella gassosa all'interno del bioreattore deve essere trascurabile.

La produzione o il consumo di protoni non è tuttavia l'unico sistema con il quale un processo biologico può alterare il pH del mezzo. Infatti, variazioni del pH possono essere prodotte anche da reazioni che coinvolgano l'equilibrio dei carbonati e dei fosfati.

1.4.1.3 Titolazioni a pH costante di reazioni che producono anidride carbonica

La procedura pH-stat può essere efficacemente adattata, modificando opportunamente il sistema di titolazione, al monitoraggio delle reazioni che coinvolgono l'equilibrio dei carbonati.

Le equazioni fondamentali che sono necessarie per calcolare analiticamente la curva di titolazione sono le costanti di equilibrio di dissociazione dell'acido carbonico, descritte nelle equazioni Eq. 1-31 e 1-32.

$$K_{a1} = \frac{[HCO_3^-][H^+]}{[H_2CO_3]} \quad [\text{Eq. 1-31}]$$

$$K_{a2} = \frac{[CO_3^{2-}][H^+]}{[HCO_3^-]} \quad [\text{Eq. 1-32}]$$

In questo particolare caso è inoltre necessario tenere conto che la risposta in termini di pH della biomassa a seguito dei suoi processi biologici cambia a seconda che l'intero sistema oggetto di studio sia aperto o chiuso rispetto ai flussi di gas con particolare riferimento alla possibilità della CO₂ di allontanarsi dal sistema. Sperimentalmente, infatti, si osserva un aumento di pH in sistemi aperti in quanto gli equilibri carbonici tendono a favorire lo sviluppo dell'anidride carbonica prodotta biologicamente per degradazione di substrato carbonioso o per respirazione endogena. Al contrario in un sistema chiuso il valore del pH tende a calare, in quanto la CO₂ prodotta non può abbandonare il bioreattore.

La capacità delle tecniche di titolazione a pH costante di monitorare reazioni che producono anidride carbonica (come l'ossidazione di un substrato organico a CO₂ e acqua) è meno diretta, in quanto l'effetto sul pH dell'aumento della concentrazione di CO₂ dipende dall'alcalinità della soluzione, dalla pressione parziale di questo stesso gas e dall'efficacia dello stripping (se presente). Consideriamo per esempio il caso di una reazione che produce CO₂, valutando l'aggiunta di un'aliquota di substrato facilmente biodegradabile a un campione di fango attivo ormai giunto alla fase di metabolismo endogeno. Come conseguenza della biodegradazione, un certo quantitativo di CO₂ viene prodotto per respirazione esogena secondo la generica reazione Eq. 1-33, che schematizza una serie di complessi processi biologici:



La concentrazione della CO_2 all'interno della fase acquosa aumenta, e questa tende a reagire con gli ioni ossidrili naturalmente presenti in ogni soluzione acquosa formando bicarbonato e abbassando il pH della soluzione. A questo punto, per mantenere l'equilibrio, se l'ambiente è basificato, una frazione di bicarbonato si dissocia per formare carbonato e un protone libero (mentre la reazione inversa, la protonazione del carbonato a formare acido carbonico, può essere trascurata):



Per mantenere il pH costante è dunque necessario che per ogni mole di CO_2 prodotta venga aggiunta una mole di OH^- che possa neutralizzare l'abbassamento di pH dovuto alla neutralizzazione di ioni ossidrili, e in più si rende necessaria l'aggiunta di un'aliquota di base aggiuntiva dovuta alla formazione di ione carbonato e al conseguente rilascio di protoni nella fase acquosa. Istante per il istante il tasso di aggiunta della soluzione titolante (R_t) che si rende necessario per mantenere stabile il pH può essere stimato come segue:

$$R_t = -\frac{d[CO_2]}{dt} + \frac{d[CO_3^{2-}]}{dt} \quad [\text{Eq. 1-35}]$$

Tenendo conto delle condizioni di pH costante e dell'equilibrio tra i carbonati in soluzione l'intera equazione può essere riscritta in funzione della sola concentrazione della CO_2 :

$$R_t = K_{a1} * 10^{pH} * (1 + 2 * K_{a2} * 10^{pH}) * \frac{d[CO_2]}{dt} \quad [\text{Eq. 1-36}]$$

L'equazione sopra descritta si applica sia per sistemi aperti che per sistemi chiusi. Per determinare il profilo dell'aggiunta di titolante è necessario dunque conoscere il bilancio di massa dell'anidride carbonica, che dipende dal metodo che si sta studiando. Senza sviscerare le differenze tra i due sistemi, si può affermare che, in condizioni di pH stabile, i sistemi chiusi sono più facilmente utilizzabili per misurare la cinetica delle reazioni che coinvolgono l'equilibrio della CO_2 rispetto a quelli aperti. Per i sistemi aperti invece, l'auspicabile misura dell'alcalinità condotta all'inizio e alla fine della titolazione a pH costante può essere usata per controllare la precisione del procedimento.

1.4.1.4 Effetti della capacità tampone di una soluzione sulla titolazione a pH costante

Nonostante una determinazione qualitativa del processo di nitrificazione sulla base del pH risulti abbastanza banale, non sempre la quantificazione accurata e precisa del tasso di nitrificazione risulta semplice in quanto la relazione tra il calo del pH e la liberazione di protoni è fortemente dipendente dalla capacità tampone del sistema. Tale capacità dipende essa stessa dal pH a cui si trova il campione in esame e quindi varia mentre avvengono reazioni chimiche che alterano l'acidità del sistema. La necessità di tenere in considerazione questi fattori rende l'utilizzo dei dati sul pH meno competitivo rispetto ad altre tecniche (come la respirometria classica) per la valutazione dei processi di rimozione biologica dell'ammonio. Tutto questo, in associazione con l'interesse sempre crescente nella rimozione dell'azoto dovuta a limiti normativi sempre più stringenti, può spiegare lo sviluppo di tecnologie sempre più efficienti che combinino la respirometria tradizionale con la titolazione a pH costante condotta con l'ausilio di macchinari automatizzati. La titolazione pH-stat permette, tuttavia, di trascurare il naturale instaurarsi di sistemi tampone. Infatti la capacità tampone (β) può soltanto influenzare la quantità di ioni ossidrilici (OH^-), o di protoni (H^+), che devono essere prodotti prima che il pH della sospensione esca dall'intervallo di tolleranza impostato ($\text{pH-stat} \pm \Delta\text{pH}$). Una volta che questo accade, l'unità pH-stat si aziona e dosa la giusta quantità di titolante. Poiché la quantità di soluzione titolante che viene aggiunta è sempre la stessa per ripristinare il valore impostato di pH, non dovrebbero sorgere errori analitici. Tuttavia, in quanto è presente un intervallo di tolleranza, questo fattore porta a una sottostima dei protoni prodotti o consumati di una quantità stimabile in prima battuta a circa $\beta \cdot \Delta\text{pH}$.

Un altro effetto della capacità tampone di un sistema è la riduzione della pendenza della curva di titolazione. Se tale capacità cresce, il tempo richiesto dal processo di nitrificazione per produrre un abbassamento del pH tale da poter essere letto dall'unità automatica pH-stat cresce sensibilmente. Inoltre potrà essere osservata una maggiore discontinuità nel dosaggio. La presenza di "scalini" non impedisce una stima corretta dei parametri cinetici, in quanto è sufficiente stimare questi ultimi da un intervallo sufficientemente grande da limitare gli errori.

Infine il tampone può ridurre la sensibilità del sistema se si ha a che fare con tassi di nitrificazione molto bassi. Può infatti accadere che il tempo di abbassamento del pH possa diventare troppo lungo per seguire adeguatamente la dinamica del processo di nitrificazione. Un parametro che può essere usato per valutare la sensibilità del sistema è il tasso minimo di nitrificazione che è richiesto per abbassare il pH di 0,02 unità in un intervallo fisso di tempo (per esempio 2 minuti). Questo significa

che, se l'intervallo di tolleranza del macchinario è impostato a 0,02 unità di pH, si comincia a rilevare l'attività nitrificante solo dopo 2 minuti dal suo inizio effettivo. Ancora non sono state condotte approfondite analisi su questo punto, tuttavia da un primo screening (Ficara E., 2000) emerge come la sensibilità dei sistemi pH-stat sia messa a dura prova da concentrazioni elevate di CO₂ e da concentrazioni elevate di bicarbonato all'interno della sospensione di cui si intende valutare l'attività di nitrificazione.

1.4.1.5 Errori di misurazione insiti nel metodo pH-stat e possibili relazioni di interferenza dovute a metabolismi concorrenti

Al giorno d'oggi le tecniche automatiche di titolazione a pH-stat sono sufficientemente evolute da poter consentire di valutare con precisione la velocità di nitrificazione e la concentrazione iniziale di ammonio in un refluo valutando il volume totale di soluzione titolante aggiunto. Tuttavia, come detto in precedenza, anche le normali reazioni chimiche che coinvolgono gli equilibri CO₂/HCO₃⁻/CO₃²⁻, oltre che reazioni biologiche che avvengono simultaneamente al processo di nitrificazione, possono influenzare il pH della sospensione ed andare a rendere l'esperimento condotto poco significativo. Le possibili interferenze che si possono avere durante un esperimento di questo tipo sono:

1. la biodegradazione di substrati organici carboniosi a CO₂ e H₂O. La risposta dell'unità titolante dipende in questo caso innanzitutto dalla concentrazione di CO₂/HCO₃⁻/CO₃²⁻ all'interno del bioreattore e dall'intensità di aerazione (se questa è presente).
2. l'iniziale sovraturazione o sottaturazione della CO₂. Se durante la titolazione la CO₂ si muove verso il suo valore di equilibrio di concentrazione questo può richiedere una domanda extra di titolante per compensare l'acidificazione dovuta alla ridissoluzione del gas o l'alcalinizzazione conseguente allo stripping.
3. la degradazione di sali organici. Questo perché i sali organici prima di essere ossidati sono convertiti nel loro acido corrispondente, il che richiede, alle condizioni usuali di pH e di aerazione un'aliquota extra di titolante.
4. l'idrolisi di urea ad ammonio ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^- + \text{OH}^-$) che produce alcalinità.
5. la presenza di processi di denitrificazione ad opera della fauna eterotrofa facoltativa (molte specie appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Spirilluse* altri ancora) normalmente presente nei fanghi attivi. In condizioni di anossia queste specie batteriche attivano un metabolismo facoltativo che gli permette di portare avanti una normale respirazione cellulare utilizzando

l'ossigeno strappato ai nitrati presenti in soluzione invece di quello normalmente disciolto e producendo alcalinità.

Come precedentemente evidenziato i principali fattori che possono influenzare il pH all'interno di un bioreattore sono le reazioni che producono e consumano protoni o anidride carbonica. Le reazioni che producono direttamente protoni non presentano tuttavia particolari problemi di errore se la titolazione viene condotta ad un pH tale per cui i sistemi tampone naturali sono poco efficaci. Quando bisogna monitorare una reazione che produce anidride carbonica è necessario allestire sistemi chiusi; in quanto si ha la sicurezza di titolare tutta la CO₂ prodotta e il tasso di aggiunta del titolante è uguale al tasso di degradazione dei substrati carboniosi (se l'anidride carbonica è in stato di sovrasaturazione in un sistema chiuso non si hanno perdite di gas per stripping. Lo stripping della CO₂ genera infatti una domanda extra di soluzione titolante acida). In caso di sistema chiuso può quindi essere impiegato qualsiasi pH di lavoro compatibile con le condizioni da preservare per la vitalità della biomassa. Tuttavia dalla curva di titolazione totale deve essere sottratto il contributo di produzione della CO₂ dovuto alla respirazione cellulare basale. In letteratura troviamo esempi di analisi teoriche (Ficara E., 2000) che dimostrano come, per quanto riguarda le reazioni che dipendono direttamente dagli equilibri carbonici, intorno a pH 8 i sistemi chiusi non sono abbastanza sensibili alla variazione di concentrazione delle singole specie chimiche carbonatiche. Al contrario i sistemi aperti, anche se hanno un comportamento iniziale simile, consentono di seguire la cinetica di reazione una volta che il tasso di produzione della CO₂ (conseguenza della titolazione del bicarbonato) uguaglia il tasso di stripping. Se siamo in presenza di reazioni interferenti di nitrificazione, si può ovviare al problema aggiungendo alla sospensione di fango attivo qualche mL di una soluzione di alliltiourea (ATU) che risulta essere un inibitore selettivo dei processi nitrificatori. Questa procedura rende inoltre anche possibile la valutazione delle reazioni di interferenza che possono presentarsi durante gli esperimenti di nitrificazione. L'ATU, se presente in concentrazioni sufficientemente elevate, inibisce completamente i processi di nitrificazione, quindi la curva di titolazione che si forma in questo caso è da doversi considerare solamente dovuto alle reazioni di interferenza.

La presenza simultanea di reazioni che producono protoni (come ad esempio la nitrificazione) e di una o più delle reazioni elencate sopra può portare ad una curva di titolazione che sarà cumulativa di molti processi e che quindi potrebbe essere difficile da analizzare. L'elaborazione dei dati può in aggiunta rendere risultati non significativi se le condizioni di operatività cambiano nel corso dell'esperimento. Molti dei processi sopra descritti infatti, accelerano o rallentano a seconda delle condizioni ambientali in cui si svolgono. Da qui discende la necessità di operare in condizioni controllate per quanto riguarda tutti i più importanti parametri sperimentali (pH, ossigeno disciolto e

temperatura). Sotto questo punto di vista, mentre il problema di stabilizzare la temperatura a cui deve essere svolto l'esperimento può essere banalmente risolto con l'aiuto di un criotermostato e l'impostazione stessa della procedura pH-stat provvede a stabilizzare il pH, la tecnologia DO-stat descritta in precedenza fornisce un valido aiuto per mantenere efficacemente stabile la concentrazione di ossigeno a cui si svolge la prova. In letteratura si trovano esempi di monitoraggio di reazioni biologiche condotti efficacemente tramite l'affiancamento delle tecniche pH-stat e DO-stat (Ficara E., 2000; Artiga P., 2005). Le due tecniche sono state combinate per monitorare la respirazione di substrati semplici in termini di consumo di ossigeno e di produzione di anidride carbonica, in modo da poter ottenere una conoscenza accurata dei processi di degradazione delle sostanze complesse che avvengono di norma all'interno della vasca di ossidazione di un impianto di trattamento di acque reflue. Le tecniche di titolazione pH-stat e DO-stat possono inoltre essere facilmente combinate in un singolo strumento, il quale può a sua volta essere applicato simultaneamente nella valutazione dell'ossidazione dell'ammonio e dei nitriti.

1.4.1.6 Combinazione delle tecniche pH-stat e DO-stat per la valutazione della cinetica di nitrificazione

E' stato ampiamente descritto dalla letteratura come le tecniche pH-stat possano essere applicate per stimare la velocità di nitrificazione e la concentrazione iniziale di ammonio in un refluo; questo perché è facile controllare l'aggiunta di una soluzione titolante basica necessaria per neutralizzare l'acidità che si produce in un fango nitrificante. La stechiometria delle reazioni chimico-biologiche su cui ci si basa per effettuare queste valutazioni è la seguente:



E' quindi possibile concepire una procedura che possa descrivere compiutamente entrambe le fasi della nitrificazione utilizzando contemporaneamente entrambe le forme di titolazione, la DO-stat (per mantenere stabili le condizioni ambientali) e la pH-stat (per misurare la velocità dei processi nitrificanti). E' così possibile effettuare misure del tasso di nitrificazione della biomassa autotrofa presente in un fango trascurando le variazioni di velocità delle reazioni stesse causate dal cambiamento delle condizioni ambientali. Questi test sono veloci e facili da eseguire, ma il loro risultato è a volte reso poco chiaro da un'alta variabilità dovuta alla non sempre buona risposta della sonda dell'ossigeno a brusche variazioni della concentrazione di ossigeno disciolto. Inoltre, il

complicato intreccio di processi metabolici che si riscontrano nei processi biologici tipici del fango attivo possono complicare non poco l'interpretazione del respirogramma e il calcolo manuale delle velocità di nitrificazione.

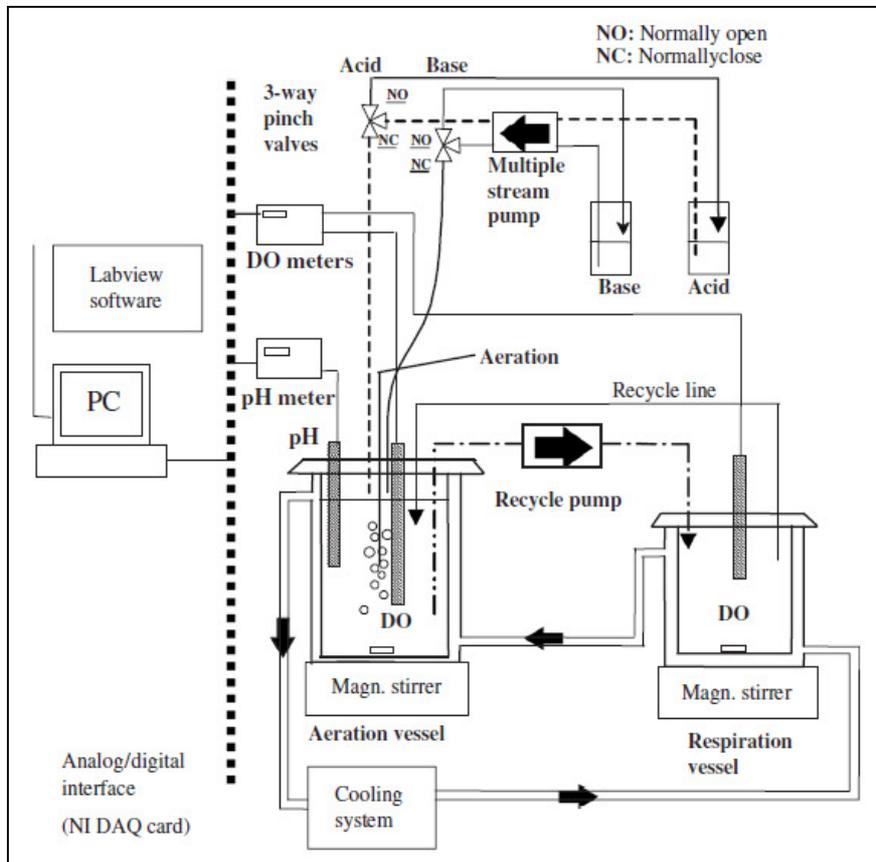


Figura 1-20 Schema combinato per l'esecuzione di prove respirometriche e titrimetriche (Gerneay et al., 2001)

Le strategie di controllo del processo di nitrificazione, sviluppate parallelamente alle strumentazioni per il monitoraggio del processo, possono essere complessivamente suddivise in due categorie in funzione delle variabili controllate, quelle che prevedono il controllo di parametri chimici e quelle basate sul controllo di parametri biologici. L'efficacia delle strategie che coinvolgono la misura dei composti chimici è fortemente dipendente dalle caratteristiche dei reflui trattati nonché delle condizioni operative mantenute all'interno dei bioreattori e prevedono la possibilità di effettuare misure dirette (sensori per la misura dell'ammonio e dei nitrati) o indirette (pH, redox). In ogni caso, gran parte delle strategie adottate sono in grado di evidenziare problemi relativi al processo di nitrificazione solamente ex-post, ossia quando il margine di sicurezza adottato nella gestione del processo è esaurito. Da questo punto di vista le tecniche respirometriche e titrimetriche costituiscono degli strumenti potenzialmente efficaci per il controllo del processo di nitrificazione dato che permettono di misurare l'effettivo rateo di nitrificazione in funzione delle caratteristiche

dell'influente e delle condizioni operative. La messa a punto di un sensore on-line ottimizzato basato sull'effettuazione di tecniche titrimetriche darebbe la possibilità di avvisare in tempo reale circa l'instaurazione di condizioni sfavorevoli per il processo di nitrificazione sia nella composizione dell'influente sia all'interno delle vasche di processo permettendo un immediato intervento di gestione del processo. La stima del rateo di nitrificazione ed eventualmente delle cinetiche della biomassa ammonio ossidante si basa sulla possibilità di utilizzare composti inibenti per gli AOB (ad esempio Allilthiourea, ATU) per comparare il consumo di alcalinità sia in presenza che in assenza di tali composti. La differenza tra i ratei di consumo dell'alcalinità permette di determinare quello legato al processo di nitrificazione. L'introduzione di titrimetri on-line è stata finora ostacolata dall'elevato costo delle strumentazioni, dalla complessità legata all'elaborazione dei dati e dalla difficoltà nel rendere completamente automatico il processo.

Ad oggi, gran parte dei titrimetri on-line sono basati sulla stima del rateo di nitrificazione della biomassa presente in un aliquota di mixed-liquor campionata dalle vasche di processo in sistemi semi-batch, con il conseguente svantaggio di ottenere in ritardo le informazioni ricercate.

Allo scopo di superare tali svantaggi, nel corso dell'attività sperimentale oggetto della ricerca in oggetto, è stato testato un titrimetro differenziale on-line allo scopo di determinare il rateo di nitrificazione della biomassa nitrificante presente all'interno di un impianto MBR a scala pilota.

1.5 Fenomeni di inibizione

L'inibizione parziale o totale dell'attività batterica ad opera di sostanze presenti nel refluo in ingresso a un impianto di depurazione può rallentare, se non addirittura bloccare, le cinetiche di rimozione dei substrati e quindi influenzare in senso negativo i rendimenti del processo. Conoscere la concentrazione di inibente che si può ammettere in ingresso alla fase biologica di un impianto di trattamento delle acque reflue, in particolar modo se di origine industriale, può consentire un appropriato dimensionamento delle fasi preliminari e primarie, evitando così, di alterare l'attività biologica. La presenza di sostanze inibenti in un fango attivo causa l'inibizione delle cellule batteriche e quindi il blocco, o almeno il rallentamento, delle funzioni vitali, con una diminuzione dell'attività enzimatica e soprattutto del livello di respirazione; questo consente, l'utilizzo della respirometria per valutare l'entità dell'inibizione sulla biomassa. In alcuni casi, la popolazione batterica può gradualmente acclimatarsi in modo spontaneo al livello di concentrazione della sostanza tossica applicata al sistema: questa acclimatazione si può sviluppare o a seguito dell'attività stessa dei microrganismi, rivolta alla degradazione dei composti tossici se presenti in

modesta quantità, oppure in seguito alla crescita selettiva all'interno della popolazione batterica di specie meno sensibili a tali composti tossici (Andreottola et al., 2002).

Se questo è noto per un fango CAS, altrettanto non si può affermare con assoluta certezza per un fango MBR. Infatti, è comprovata (Judd, 2006) l'esistenza di differenze microbiologiche tra i due fanghi dovute principalmente, all'assenza, nel secondo caso, di un selettore naturale come quello costituito dalle unità di sedimentazione; la presenza di una membrana, che è capace di trattenere tutti i microrganismi all'interno del reattore, fa sì che la selezione non sia dovuta a motivi fisici di sedimentabilità, ma esclusivamente biologici di adattamento alle condizioni di operatività del reattore. Non si può, quindi, escludere a priori la possibilità che il fango MBR possa avere una maggiore o minore resistenza ad inibitori rispetto ad un fango CAS.

1.5.1.1 Effetti di inibizione sulle cinetiche dei batteri nitrificanti

I microrganismi nitrificanti sono sensibili alle variazioni di numerosi fattori e riescono a svilupparsi e a crescere soltanto in ambienti con range limitati di pH, temperatura, ossigeno disciolto, concentrazione di nutrienti e presenza di carbonio inorganico (TIC, Total Inorganic Carbon). Il processo di nitrificazione, oltre ad essere limitato da determinati valori dei parametri operativi sopra citati è inibito dalla presenza di concentrazioni eccessive di substrato, ossia di ammoniaca libera (NH_3^+) e di acido nitroso libero (HNO_2^-).

L'ammoniaca libera è stata a lungo identificata come un inibitore per l'ossidazione dei nitriti, tuttavia, tentativi passati di usare questo composto per eliminare l'ossidazione dei nitriti e quindi promuovere strategie più efficaci di abbattimento dell'azoto durante il trattamento biologico delle acque reflue non hanno portato a risultati soddisfacenti.

Il primo stadio di nitrificazione, ossia di ossidazione dell'azoto ammoniacale a nitrito, riveste un ruolo fondamentale nella rimozione dell'ammonio dalle acque reflue in quanto bloccando l'ossidazione dell'ammonio a nitriti si possono ottenere risparmi della domanda di ossigeno fino al 25% (Gali A., 2007) evitando il consumo dell'ossigeno necessario all'ossidazione dei nitriti a nitrati.

La nitrificazione parziale viene raggiunta a condizione che la crescita dei batteri ammonio ossidanti (AOB) sia favorita e la crescita dei batteri nitrito ossidanti (NOB) sia limitata o inibita (Jubany, 2009a). A causa delle nuove tecnologie di processo (processi di nitrificazione/denitrificazione e processi Anammox), sono stati condotti diversi studi per identificare le condizioni ottimali di processo per l'ottenimento della nitrificazione parziale. Il punto chiave è quello di favorire il processo di nitrosazione (ossidazione dell'ammonio a nitriti) e al tempo stesso di inibire o

sopprimere il processo di nitratazione (ossidazione dei nitriti a nitrati) mediante l'ottenimento di una biomassa arricchita in AOB e povera di NOB. I principali fattori che influenzano l'attività di AOB ed NOB in un diverso grado sono:

- *Temperatura*. Sopra i 15°C (Figura 14) il tasso di crescita massimo di AOB è superiore al tasso di crescita massimo degli NOB. Questa caratteristica viene utilizzata nel processo SHARON (Single reactor High activity Ammonia Removal Over Nitrite) il cui funzionamento prevede un tempo di ritenzione idraulica (HRT), pari al tempo di ritenzione dei fanghi (SRT), di 1 giorno, temperatura di 35 °C e bassissima concentrazione di biomassa (Hellings, 1999) allo scopo di ottenere il washout degli NOB.

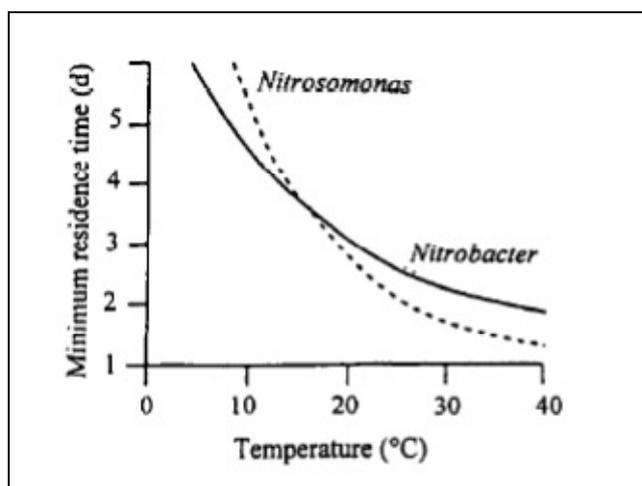


Figura 1-21 SRT minimo per AOB e NOB in funzione della temperatura (Hellings, 1999)

- *Ossigeno disciolto (DO)*: i batteri NOB hanno minore affinità con l'ossigeno disciolto rispetto agli AOB (Guisasola et al., 2005) quindi l'accumulo di nitriti è favorito a basse concentrazioni di DO (Garrido et al., 1997; Pollice et al., 2002; Ruiz et al., 2003).

- *pH*: il pH influenza l'equilibrio di $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ e $\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$. Il range ottimale di pH per la crescita di batteri ammonio ossidanti è tra 5.8 e 8.5, mentre per i batteri nitrito ossidanti è tra 6.5 e 8.5. Basandosi, per esempio, su di uno studio condotto da Anthonisen (Anthonisen, 1976), i batteri nitrito ossidanti sono più sensibili degli ammonio ossidanti all'ammoniaca libera (FA Free Ammonia, NH_3^+) e all'acido nitroso libero (FNA Free Nitrous Acid, HNO_2^-); se il pH nel reattore aumenta (maggiore FA) o diminuisce (maggiore FNA), è dunque probabile che si verifichi l'inibizione degli NOB. Le equazioni utilizzate da Anthonisen per determinare la concentrazione di FA e di FNA in funzione del pH, della Temperatura e della concentrazione dei composti azotati sono riportate nelle Eq. 1-39 e Eq. 1-40 in cui TAN rappresenta la concentrazione di $\text{N-NH}_3 + \text{N-NH}_4^+$ e TNN rappresenta la concentrazione di $\text{N-NO}_2 + \text{N-HNO}_2$.

$$FA = \frac{17}{14} \frac{TAN \cdot 10^{pH}}{[\exp(6334/273 + ^\circ C) + 10^{pH}]} \quad [\text{Eq. 1-39}]$$

$$FNA = \frac{47}{14} \frac{TNN}{[\exp(-2300/273 + ^\circ C) \cdot 10^{pH} + 1]} \quad [\text{Eq. 1-40}]$$

In riferimento al medesimo studio, per quanto concerne l'ossigeno disciolto, è stato osservato che basse concentrazioni di ossigeno disciolto, inferiori a 2 mgL⁻¹, limitano la nitrificazione e provocano l'accumulo di nitriti. Ulteriori studi come ad esempio quelli condotti da Jayamohan et al. (1988) hanno confermato i precedenti risultati con la puntualizzazione che i nitrito ossidanti risultano essere più sensibili a limitate concentrazioni di ossigeno disciolto rispetto agli ammonio ossidanti.

I wash-out degli NOB a seguito dell'impostazione di determinate condizioni operative (basse concentrazioni di DO, elevate temperature e limitate SRT) è stato ottenuto in processi a fanghi attivi senza ritenzione della biomassa (Fux, 2002) o con biomassa granulare in reattori sequenziali (SBR, Sequencing Batch Reactor) (Kim and Seo, 2006).

Per quanto riguarda l'ammoniaca libera (Anthonisen et al., 1976) è stato osservato che l'inibizione per i nitrito ossidanti comincia a concentrazioni di 0.1 – 1.0 mg FA L⁻¹, mentre per gli ammonio ossidanti comincia a 10 – 150 mg FA L⁻¹. Considerando invece l'effetto dell'FNA sulla biomassa nitrificante (Vadivelu V.M., 2006) la crescita degli AOB viene inibita a partire da valori di 0.10 mg FNA L⁻¹ e diventa totale a 0.4 mg FNA L⁻¹, mentre per gli NOB comincia per concentrazioni di 0.011 mg FNA L⁻¹ e diventa completa a 0.10 mg FNA L⁻¹.

Gli effetti dell'inibizione da ammoniaca libera e acido nitroso libero sui batteri ammonio ossidanti, risultano maggiormente significativi in presenza di limitate concentrazioni di carbonio inorganico totale (Park and Bae, 2009; Jubani et al., 2009a; Torà et al., 2010).

Per la stima dell'effetto inibente di FA e FNA si fa spesso riferimento a modelli che descrivono il processo enzimatico di inibizione come “competitivo” (uncompetitive) o “non competitivo” (non-competitive). Nel primo caso l'inibitore si lega al blocco enzima-substrato causando contemporaneamente sia la riduzione del reato massimo di crescita della biomassa nitrificante che la riduzione della costante di semi-staurazione del substrato. Nel secondo, invece, l'inibitore si lega all'enzima in un sito diverso da quello in cui si legherebbe il substrato comportando la sola riduzione del reato massimo di crescita in presenza di inibente.

Generalmente l'inibizione da substrato viene modellizzata utilizzando le equazioni di Haldane Eq. 1-41 che descrivono il carattere "competitivo" del processo di inibizione (Carvalho et al., 2002; Picioreanu et al., 1997; Sheintuch et al., 1995). Tuttavia, in diversi studi vengono riportati modelli diversi. Ad esempio, Wett e Rauch (2003) utilizzano modelli di tipo non competitivo mentre Gee et al., (1990) utilizzano un modello di Haldane modificato, introducendo l'inibizione da ammonio nel processo di nitratazione. Relativamente all'inibizione da ammonio per gli NOB e da nitrito per gli AOB vengono spesso utilizzati modelli di tipo "non competitivo" (Gee et al., 1990; Pambrun et al., 2006) Eq. 1-41 dove K_I è il coefficiente di inibizione e S_I la concentrazione del substrato inibente.

$$r = r_{mac} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad [\text{Eq. 1-41}]$$

$$r = r_{max} \frac{K_I}{K_I + S_I} \quad [\text{Eq. 1-42}]$$

I modelli sopra citati sono stati applicati con successo da Jubani et al. (2009) per la valutazione dell'effetto combinato di FA e FNA sull'inibizione (Jubany, 2009a) dell'attività metabolica di biomassa ammonio ossidante e nitrito ossidante.

L'inibizione del metabolismo degli AOB (Eq. 1-43) in funzione della concentrazione di FA e degli NOB (Eq. 1-44) in funzione dell'FNA risultano descritte correttamente dal modello di Haldane Eq. 1-41, mentre l'inibizione di AOB da FNA e di NOB da FA sono state descritte con un modello non competitivo (Jubany, 2008).

$$\mu_{AOB} = \mu_{max,AOB} \frac{FA}{K_{FA,AOB} + FA + \frac{FA^2}{K_{I,FA,AOB}}} \frac{K_{I,FNA,AOB}}{K_{I,FNA,AOB} + FNA} \quad [\text{Eq. 1-43}]$$

$$\mu_{NOB} = \mu_{max,NOB} \frac{FNA}{K_{FNA,NOB} + FNA + \frac{FNA^2}{K_{I,FNA,NOB}}} \frac{K_{I,FA,NOB}}{K_{I,FA,NOB} + FA} \quad [\text{Eq. 1-44}]$$

Dove:

μ_{AOB} = rateo di crescita degli AOB

$\mu_{max,AOB}$ = rateo massimo di crescita degli AOB

FA = NH_3

FNA = HNO_2

K_{FA}, K_{FNA} = Costanti di semisaturazione per FA e FNA

KI_{FA}, KI_{FNA} = Coefficienti di inibizione per FA e FNA

Un modello diverso da quello utilizzato da Jubani et al. (2009) è stato proposto da Park and Bae (2009) in cui si tiene comunque conto delle equazioni di Anthonisen per la determinazione della concentrazione di FA e di FNA in funzione di pH e Temperatura.

$$\mu_{AOB} = \mu_{\max,AOB} TAN \frac{1}{K_{TAN,AOB} + TAN \left(1 + \frac{FA}{K_{I,FA,AOB}}\right)} \frac{1}{(K_{TAN,AOB} + TAN) \left(1 + \frac{FNA}{K_{I,FNA,AOB}}\right)} \quad [\text{Eq. 1-45}]$$

$$\mu_{NOB} = \mu_{\max,NOB} NO_2 \frac{1}{K_{NO2,NOB} + TNN \left(1 + \frac{FA}{K_{I,FA,NOB}}\right)} \frac{1}{(K_{NO2,NOB} + TNN) \left(1 + \frac{FNA}{K_{I,FNA,NOB}}\right)} \quad [\text{Eq. 1-46}]$$

μ_{AOB} = rateo di crescita degli AOB

$\mu_{\max,AOB}$ = rateo massimo di crescita degli AOB

$TAN = NH^3 + NH_4^+$

$TNN = NO_2^- + HNO_2$

NO_2^- = concentrazione di NO_2^-

K_{TAN}, K_{NO2} = Costanti di semisaturazione per TAN e NO_2^-

KI_{FA}, KI_{FNA} = Coefficienti di inibizione per FA e FNA

In diversi studi è stato, inoltre, valutato l'effetto della carenza di carbonio inorganico (TIC, Total Inorganic Carbon) sul processo di nitrificazione (Torà et al., 2010; Guisasola et al., 2007) spesso dovuta alla mancanza di sufficiente TIC nell' influente (Parkes, 2007; Wett, 2003; Whang, 2009). L'accumulo di nitriti o di ammoniaca, congiuntamente alla mancanza di TIC, sono situazioni utili per il dilavamento della popolazione di NOB. Un aspetto ancora più importante è che, in queste circostanze, l'inibizione da mancanza di TIC può avvenire anche contemporaneamente all'inibizione da FA e FNA. A questo proposito è rilevante lo studio condotto da Torà ed al. (2010) in cui è evidenziato come l'inibizione da eccessive concentrazioni di FA o di FNA, descritti mediante l'applicazione del modello di Haldane, può aumentare, in condizioni limitanti di TIC, anche del 50%.

2 Materiali e Metodi

2.1 Gli impianti

2.1.1 L'impianto Cuoidepur S.p.a.

Il Consorzio Cuoidepur S.p.a. è la società incaricata della gestione dell'impianto di depurazione a servizio del distretto conciario di Ponte a Egola e San Romano (San Miniato, Pisa – Italia). Il consorzio è costituito da 150 aziende che, insieme al Comune di San Miniato, formano la compagine sociale. La potenzialità di trattamento dell'impianto è di 10.000 m³ al giorno e annualmente tratta oltre 1.300.000 m³ di scarichi industriali, provenienti prevalentemente da processi di concia al vegetale, e 1.200.000 m³ di scarichi civili. L'impianto fa parte del progetto integrato "Progetto Arno – Comprensorio del Cuoio Area 17" previsto nel piano regionale di risanamento delle acque. L'area più direttamente interessata all'impianto di depurazione ha una superficie totale di 130 Km², con una popolazione di circa 35.000 abitanti. L'utenza industriale dell'impianto è costituita da oltre 110 insediamenti produttivi, dei quali 90 sono concerie (50% cuoifici, 30% concerie al vegetale e 20% concerie al cromo) e 20 aziende con lavorazione conto terzi. Il processo di depurazione si articola secondo il seguente schema a blocchi (Figura 2-1).

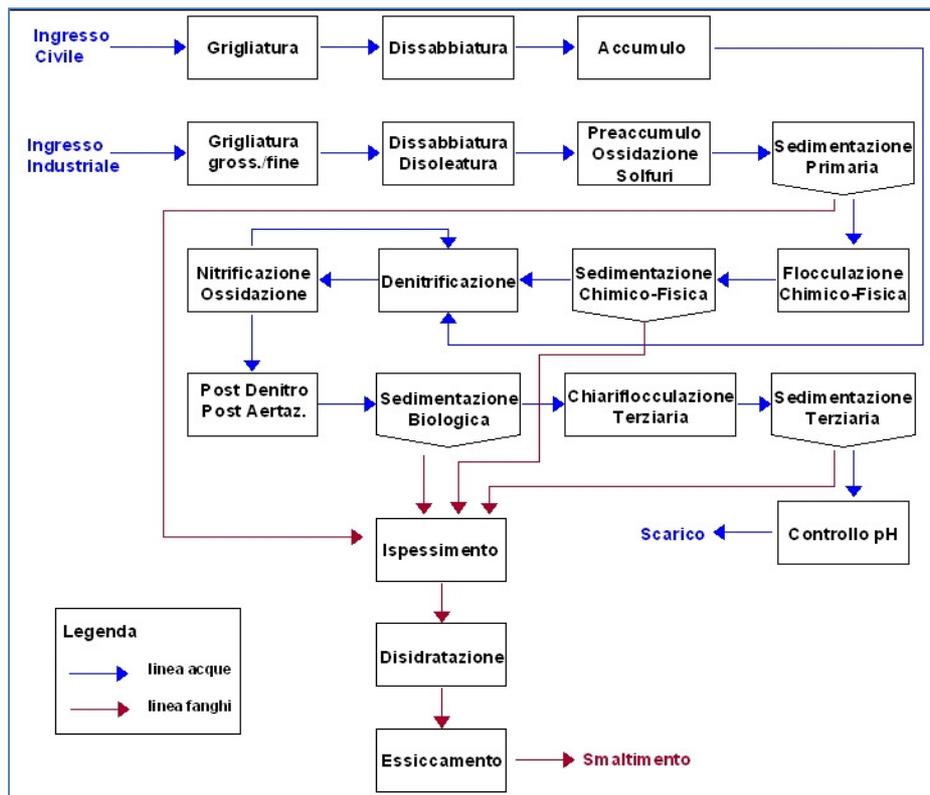


Figura 2-1- Schema di funzionamento dell'impianto Cuoidepur S.p.a.

La linea acque della filiera di trattamento Cuoidepur S.p.a. prevede il pre-accumulo e l'ossidazione dei solfuri, una sedimentazione primaria, il trattamento biologico composto da denitrificazione, ossidazione e nitrificazione, sedimentazione secondaria e chiariflocculazione terziaria.

2.1.1.1 Prospettive per il trattamento dei reflui conciari nel distretto del cuoio

All'interno del Distretto del Cuoio toscano che comprende i comuni di Castelfranco di Sotto, Fucecchio, Montopoli Val D'Arno, San Miniato, Santa Croce sull'Arno e Santa Maria a Monte, gran parte dei reflui conciari vengono trattati all'interno dei tre maggiori impianti di depurazione: quello gestito dal consorzio Cuoidepur, quello gestito dal Consorzio Aquarno (Santa Croce Sull'Arno, Pisa) e quello gestito dal Consorzio Conciatori di Fucecchio (Ponte a Cappiano - Fucecchio, Firenze).

I tre impianti sono caratterizzati da linee di processo diverse e fortemente dipendenti dalle caratteristiche quali-quantitative dei reflui trattati: all'impianto Cuoidepur vengono trattati prevalentemente reflui provenienti da processi di concia al vegetale mentre presso l'impianto Aquarno e presso l'impianto di Ponte a Cappiano vengono prevalentemente trattati reflui prodotti dalla concia al cromo.

Nel corso degli anni sono state testate varie tecnologie (bioreattori a membrana, processi di ossidazione avanzata, configurazioni di processo innovative) nell'ottica di una riorganizzazione del sistema depurativo del comprensorio, che prevede, tra l'altro, di mettere in comunicazione i due impianti di depurazione gestiti da Aquarno e Cuioidepur. Nella nuova configurazione, all'interno dell'impianto Cuioidepur verrà trattata la quasi totalità dei reflui civili prodotti all'interno del comprensorio, parte di quelli prodotti nei territori della Valdera, della Valdelsa e della Valdinievole e avrà luogo il pre-trattamento dei reflui conciarci provenienti da processi di concia al vegetale. Questi ultimi, a valle del processo di ossidazione dei solfuri e sedimentazione primaria saranno inviati all'impianto Aquarno dove, successivamente alla miscelazione con i reflui provenienti da processi di concia al cromo saranno sottoposti a trattamento biologico per la rimozione dei nutrienti e della sostanza organica. L'affinamento del trattamento biologico avverrà successivamente all'interno delle vasche di processo dell'impianto Cuioidepur prima dello scarico in corpo idrico recettore. Uno schema della futura configurazione del sistema depurativo dei reflui prodotti dal comprensorio è riportata in Figura 2-2.

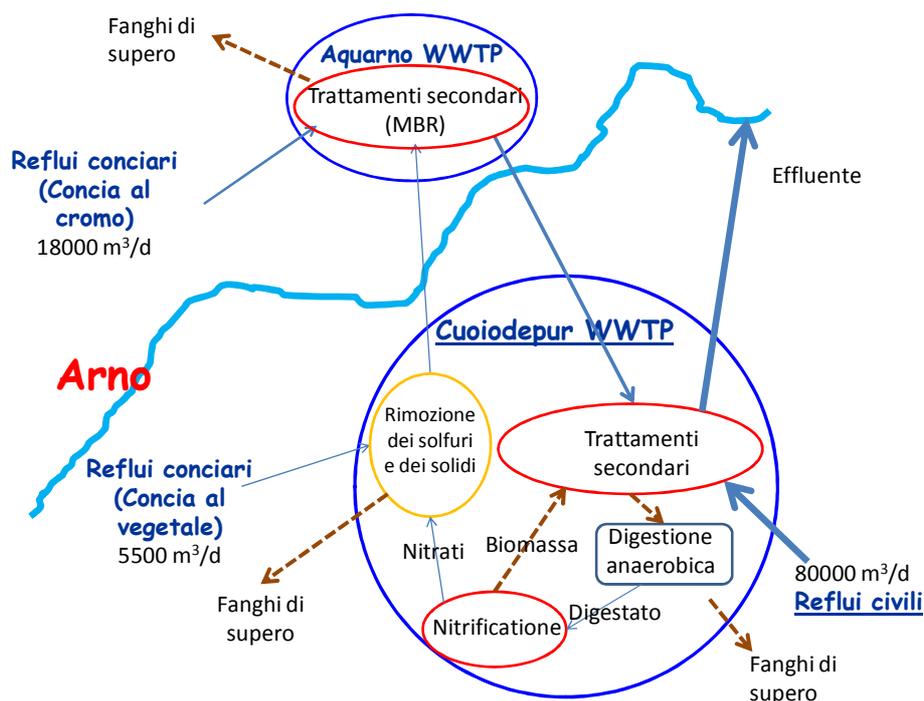


Figura 2-2 - Futura configurazione del sistema depurativo dei reflui prodotti all'interno del comprensorio del cuoio toscano

Data la natura del progetto e delle fasi di depurazione, la riorganizzazione causerà l'ingresso all'impianto Cuioidepur di un refluo caratterizzato da uno sbilanciamento tra carbonio e nutrienti (azoto e fosforo) tale da implicare l'applicazione di trattamenti chimico-fisici per la rimozione del fosforo comportando un aumento significativo dei costi di trattamento. L'obiettivo della

riorganizzazione sarà, dunque, quello di inserire delle modifiche all'interno della filiera di processo dell'impianto Cuoiodepur allo scopo di rendere il trattamento meno oneroso.

Data la consistenza della quota di reflui civili in ingresso, l'idea è quella di prevedere un opportuno trattamento anaerobico dei fanghi e, successivamente, del surnatante prodotto in un reattore esterno alla filiera principale di processo. Il fango biologico di quest'ultimo verrebbe poi utilizzato per alimentare in continuo le vasche principali riducendo il consumo energetico e migliorando la stabilità del processo aerobico di nitrificazione.

Inoltre si potrebbe ipotizzare di utilizzare il nitrato prodotto all'interno della filiera di trattamento del surnatante per sostituire l'ossigeno nelle fasi di ossidazione del solfuro nei pre-accumuli comportando numerosi vantaggi: minor consumo di ossigeno, riduzione della concentrazione di azoto nell'effluente, possibilità di rimozione biologica del fosforo grazie al carbonio biodegradabile residuo.

L'ipotetica futura filiera di trattamento dell'impianto Cuoiodepur è riportata in Figura 2-3.

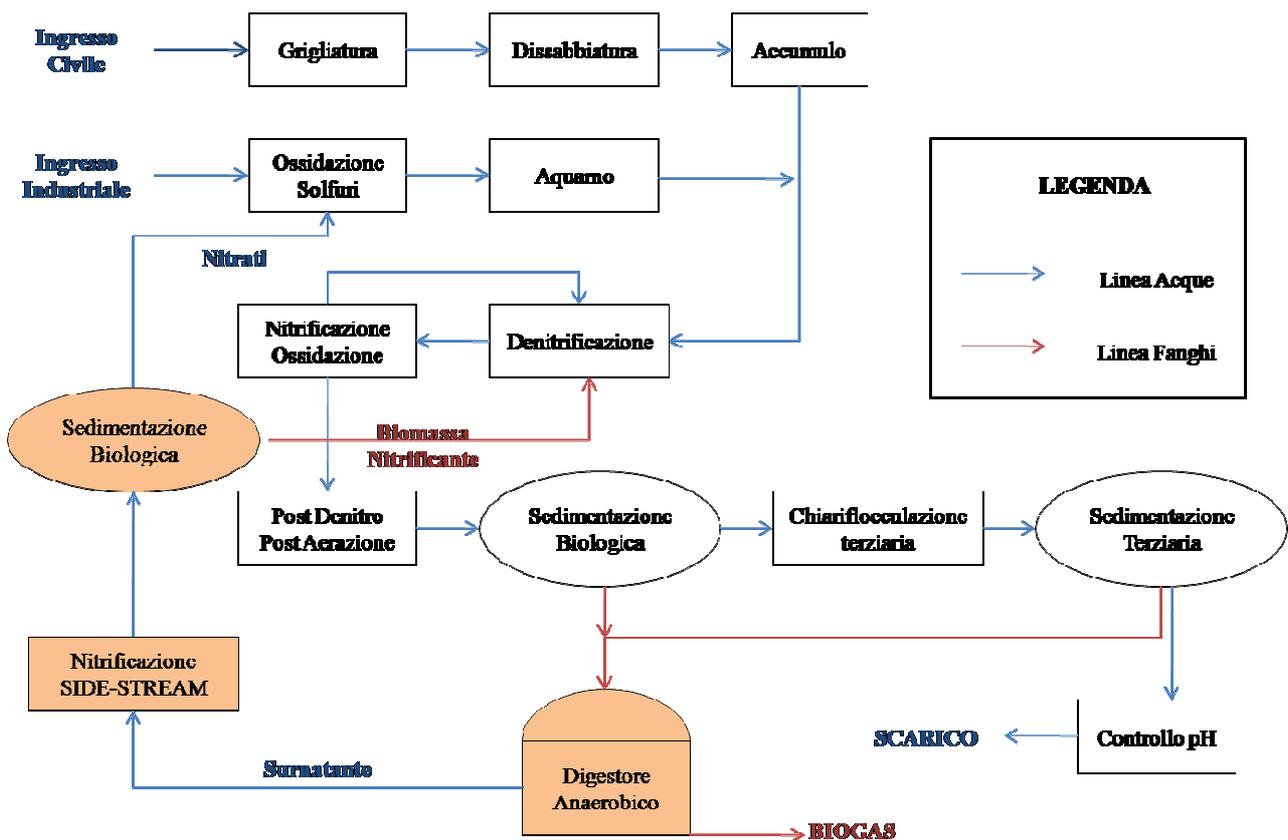


Figura 2-3 - Schema futuro dell'impianto di depurazione Cuoiodepur S.p.a.

Questa configurazione permetterà in primo luogo di semplificare la filiera di trattamento, permettendo il conseguimento di un notevole risparmio in termini di additivi chimici, di energia e

quindi dei costi di depurazione. In secondo luogo, l'adozione del processo di bio-arricchimento con la costruzione di una filiera SIDE-STREAM di trattamento dei flussi ad elevato carico di ammonio (come quelli prodotti dal processo di digestione dei fanghi biologici) permetterà il conseguimento di un incremento del rendimento di rimozione dell'azoto ammoniacale e la diminuzione dell'età del fango necessaria al processo depurativo nella filiera principale e, di conseguenza, la riduzione dei volumi dei reattori. Questo consentirebbe l'ottenimento di un fango più fresco, quindi con un contenuto carbonioso più elevato, permettendo un maggiore recupero energetico dalla digestione anaerobica.

Allo scopo di simulare a scala pilota, la nuova configurazione del trattamento biologico dell'impianto Cuoidepur e gli effetti del processo di bioarricchimento, sono stati progettati, costruiti, collaudati e gestiti, presso il Laboratorio CER²CO (Laboratorio Congiunto tra il Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale dell'Università di Firenze ed il Consorzio CuoidepurSpA) tre impianti pilota: due impianti per la linea principale, Main Stream, ed uno per quella Side Stream.

2.1.2 Gli impianti pilota della filiera Main-Stream

Per lo studio dell'effetto del bio-arricchimento con biomassa nitrificante su una filiera di trattamento di acque reflue civili sono stati utilizzati due impianti pilota dotati di vasca di pre-denitrificazione, nitrificazione e separazione finale solido/liquido. I due impianti, gemelli, differiscono unicamente per il sistema di separazione solido-liquido: uno è dotato di un sedimentatore secondario e simula una filiera di trattamento tradizionale (CAS, Conventional Activated Sludge, Figura 2-4), mentre l'altro prevede la filtrazione del mixed-liquor su membrane a fibra cava nella modalità dead-end (MBR), Figura 2-5.

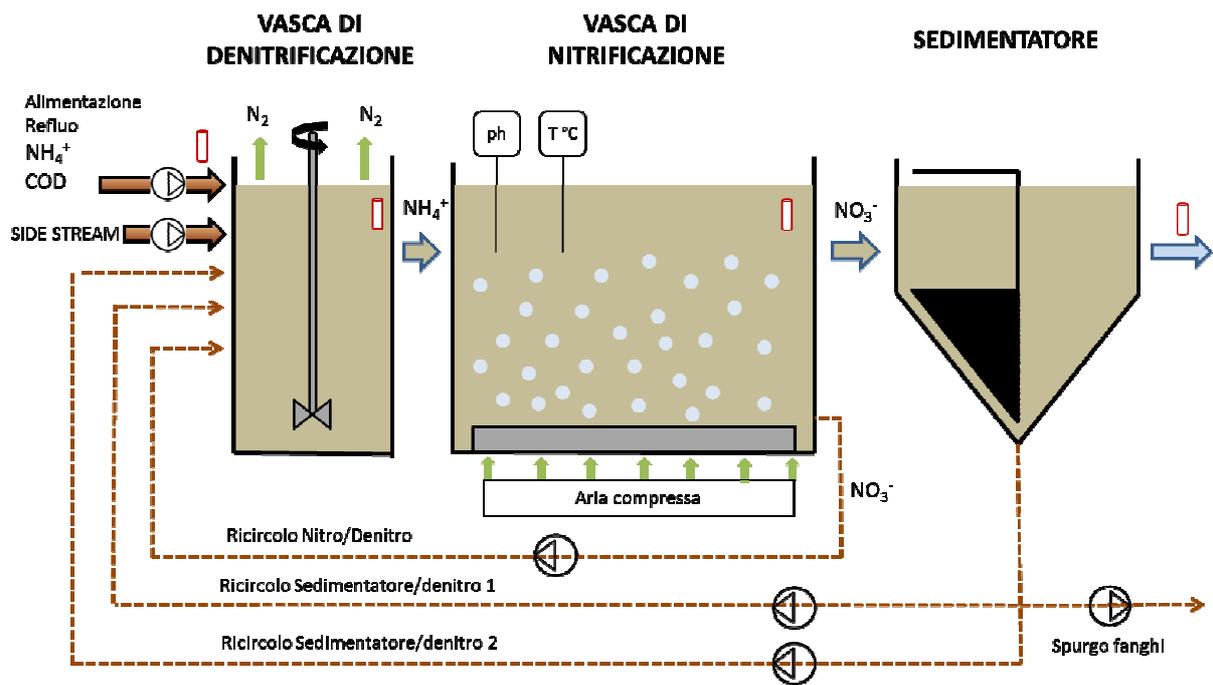


Figura 2-4 - Schema di flusso dell'impianto CAS della Filiera Main-Stream

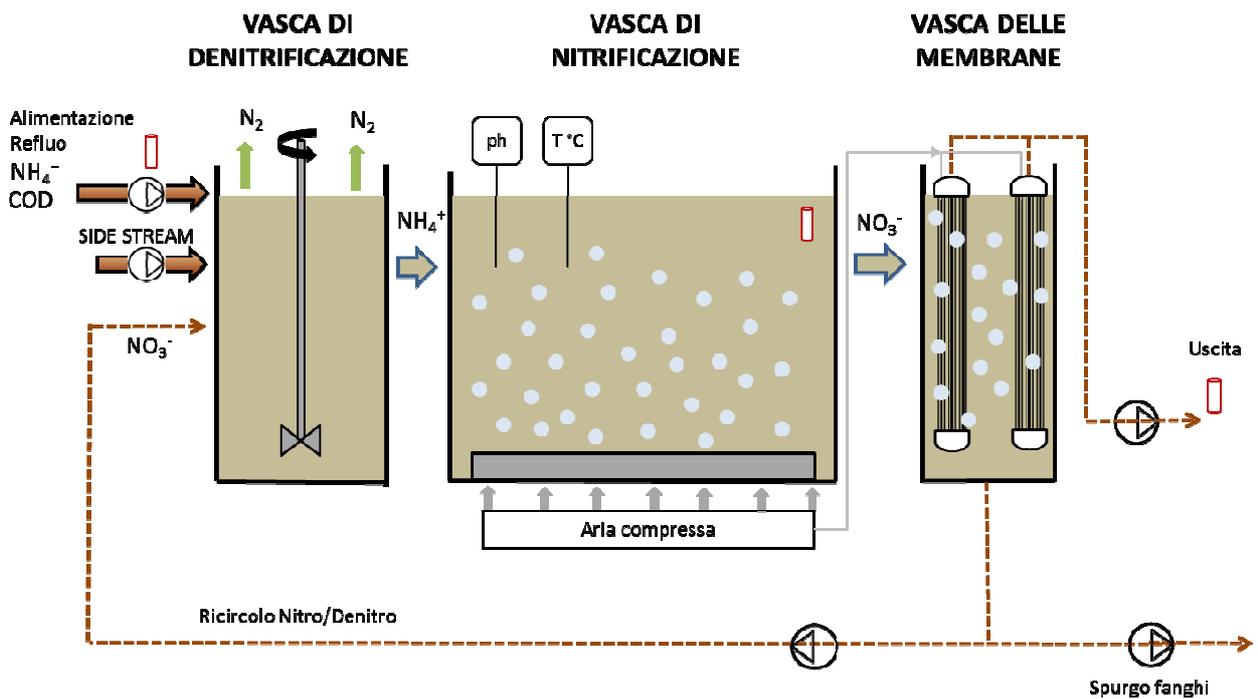


Figura 2-5 - Schema di flusso dell'impianto MBR della Filiera Main-Stream

Un terzo impianto pilota simula la filiera di trattamento Side-Stream Figura 2-6. L'impianto è alimentato con refluo sintetico ottenuto a partire dal refluo civile in ingresso all'impianto Cuoiodepura a cui è stato aggiunto Ammonio sotto forma di Cloruro d'Ammonio allo scopo di

conferire all'influente caratteristiche simili (in termini di rapporto $COD/N-NH_4^+$) a quelle del surnatante della digestione anaerobica di fanghi civili.

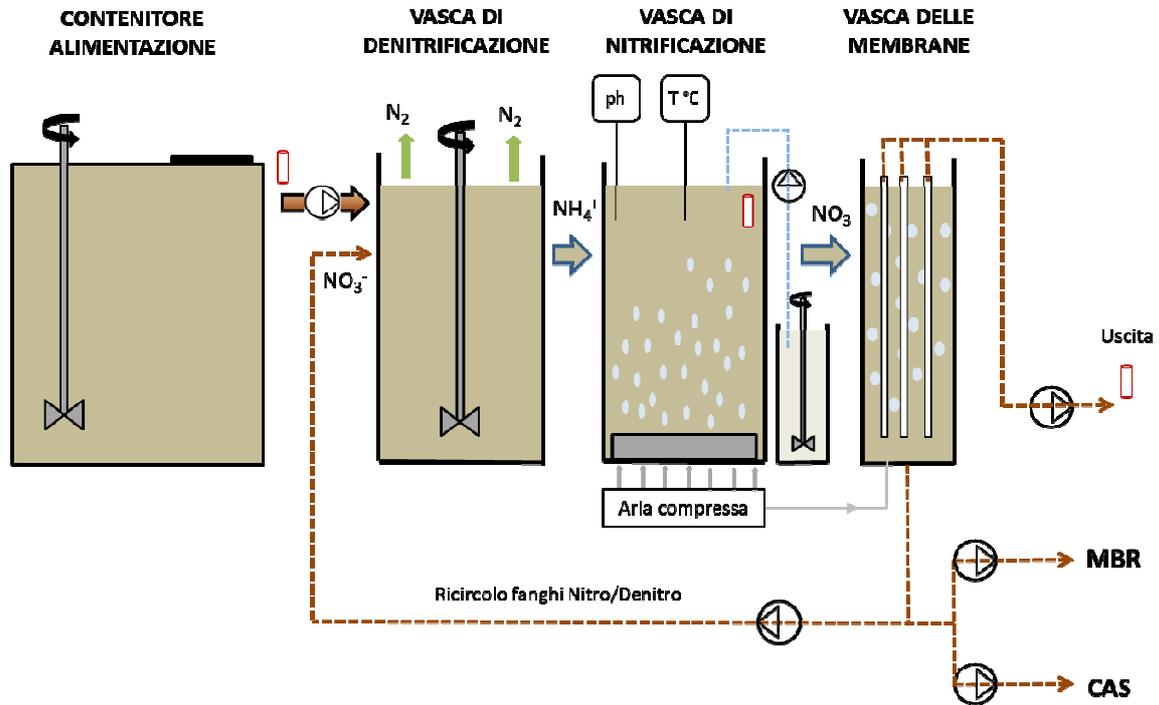


Figura 2-6 - Schema di flusso dell'impianto della Filiera Side-Stream

All'interno della filiera Side-Stream viene fatta crescere la biomassa nitrificante da inoculare nei due impianti Main-Stream durante il processo di bio-arricchimento. Lo schema in cui è esplicitato il collegamento tra gli impianti è riportato in Figura 2-7.

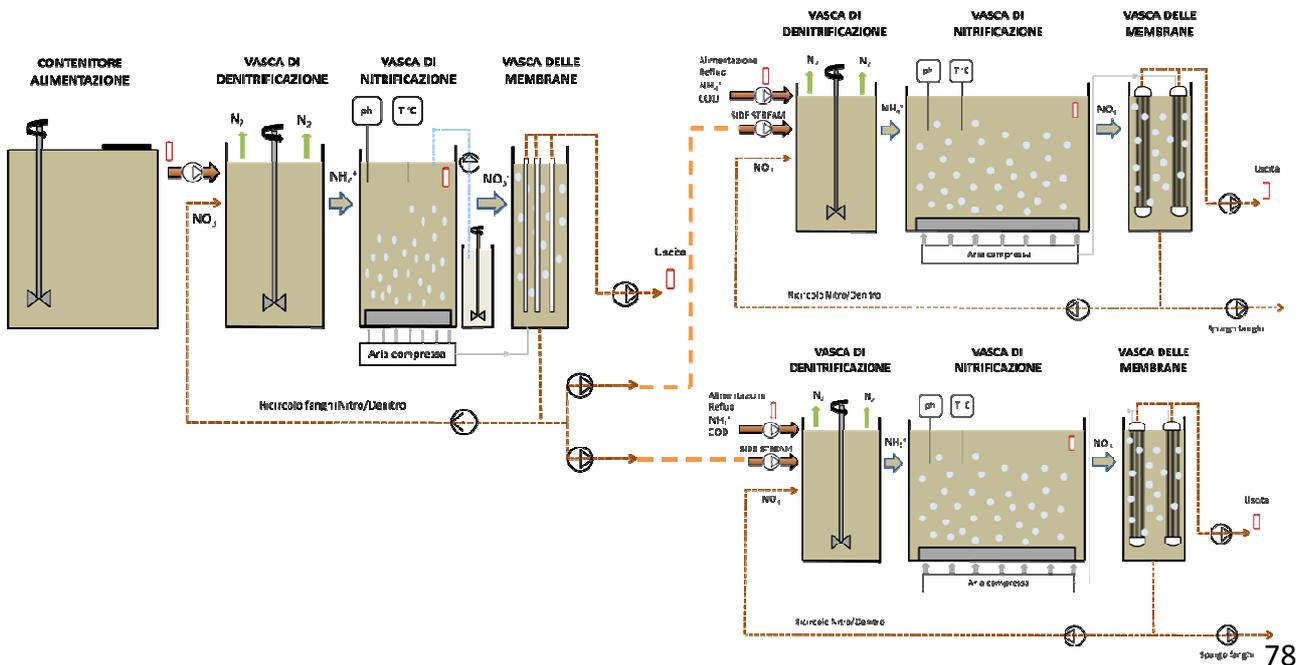


Figura 2-7 - Modalità di collegamento tra la filiera Side-Stream e la Filiera Main-Stream

Le filiere Side e Main-Stream simulano, quindi, il funzionamento di un impianto di trattamento dei reflui civili in cui è prevista l'applicazione di processi anaerobici ai fanghi di supero della filiera principale e il trattamento del surnatante prodotto all'interno di una filiera secondaria di trattamento (Figura 2-8).

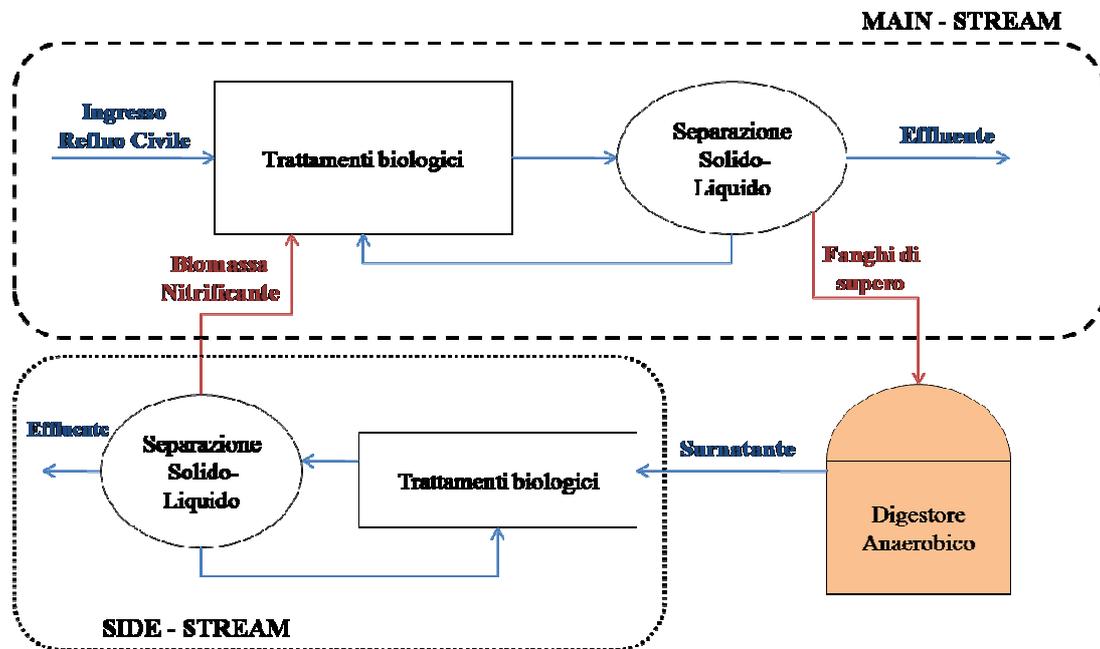


Figura 2-8 - Schema descrittivo della filiera di trattamento completa

La scelta di prevedere l'utilizzo di impianti MBR per entrambe le filiere di trattamento è dettata dai vantaggi che la loro applicazione comporta in termini di stabilità del processo rispetto agli impianti convenzionali, condizione fondamentale per la raccolta di dati utili per una buona calibrazione dei modelli utilizzati per la descrizione del processo di nitrificazione e per la quantificazione dei vantaggi legati all'applicazione del bioarricchimento nonché per la verifica dell'effetto che le diverse condizioni operative tra Side e Main-Stream hanno sulla selezione della biomassa nitrificante.

Il fatto di utilizzare un impianto di tipo convenzionale (CAS) gestito in parallelo rispetto all'MBR della filiera Main-Stream permette invece di simulare il processo di bioaugmentation in condizioni analoghe a quelle adottate in gran parte delle sperimentazioni a scala banco e pilota presenti in letteratura e verificare l'effetto della configurazione impiantistica utilizzata sugli effetti del processo di bioaugmentation.

2.1.2.1 Impianto CAS

L'impianto Main-Stream con configurazione tradizionale è costituito da tre comparti: una vasca di pre-denitrificazione, dotata di un sistema di agitazione meccanica per evitare fenomeni di sedimentazione, una vasca di ossidazione/nitrificazione ed un sedimentatore secondario all'interno del quale avviene la separazione finale dei solidi per via gravimetrica. L'alimentazione dell'impianto CAS è realizzata con il refluo civile in ingresso all'impianto Cuoiodepur e la gestione delle portate e del funzionamento temporizzato delle pompe è affidata ad un PLC (*Programmable Logic Controller*) Figura 2-9.



Figura 2-9 Impianto CAS della filiera Main-Stream e particolare del sedimentatore

Le componenti principali dell'impianto CAS sono:

- Vasca di pre-denitrificazione del volume di 130 L;
- Vasca di ossidazione-nitrificazione del volume di 310 L;
- Sedimentatore secondario del volume di 135 L e superficie di 0.39 m²;
- Vasca di raccolta del chiarificato.

Come riportato nel P&I in Figura 2-10, l'alimentazione dell'impianto è effettuata da una pompa peristaltica (P1), operante in continuo. Il refluo civile è inviato alla vasca di pre-denitrificazione, per poi passare alla vasca di ossidazione-nitrificazione: qui l'aerazione è mantenuta in continuo ad opera di aeratori a bolle fini, alimentati con aria compressa, posti sul fondo della vasca. Lo spurgo

per il controllo dell'età del fango viene realizzato tramite una pompa peristaltica (P4) dalla linea del ricircolo interno.

Il sedimentatore secondario è dotato di un raschiatore di fondo (RS) ad avviamento automatico e di un sistema di pulizia superficiale. I fanghi rimossi dal fondo del sedimentatore vengono inviati tramite due pompe peristaltiche (P3a e P3b) alla vasca di pre-denitrificazione.

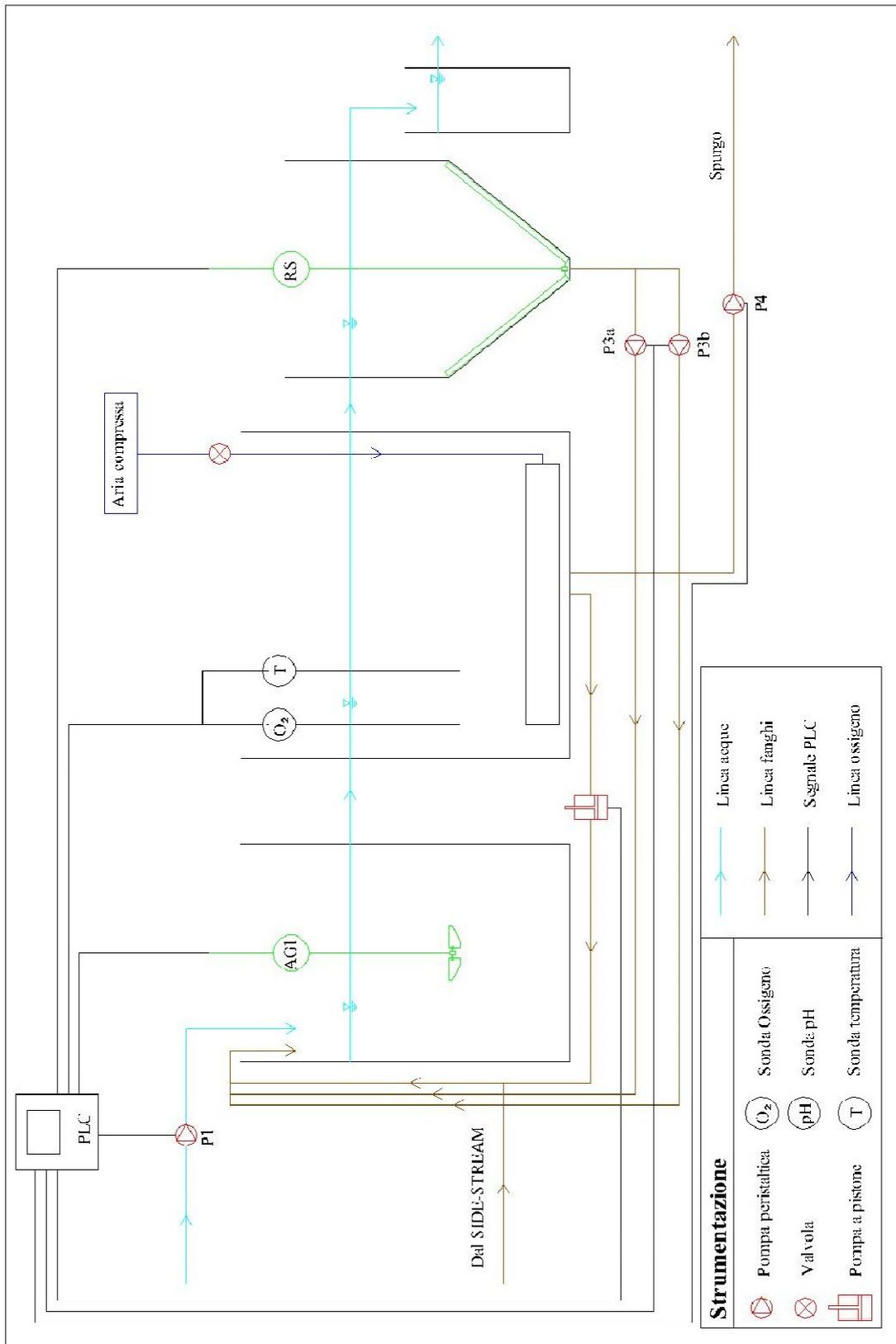


Figura 2-10 P&I dell'impianto CAS

2.1.2.2 *Impianto MBR*

L'impianto MBR è costituito da tre comparti: una vasca di pre-denitrificazione, dotata di un sistema di agitazione (AG1) per evitare fenomeni di sedimentazione, una vasca di ossidazione/nitrificazione e una di filtrazione. L'alimentazione dell'impianto, come nel caso del CAS, viene realizzata con il refluo civile in ingresso all'impianto Cuoiodepur, e la relativa gestione è realizzata attraverso un PLC dedicato (Figura 2-11).



Figura 2-11 Impianto MBR della filiera Main-Stream e particolare della vasca di filtrazione

Le componenti principali dell'impianto MBR sono:

- Vasca di pre-denitrificazione del volume di 130 L;
- Vasca di ossidazione-nitrificazione del volume di 280 L;
- Vasca di separazione finale dei solidi, contenente i due moduli di filtrazione, del volume di 30 L;
- Vasca di raccolta del permeato.

L'alimentazione dell'impianto è effettuata da una pompa a pistone (P1) comandata da una sonda di livello posta nella vasca di nitrificazione: quando il livello scende sotto al valore impostato come limite inferiore, il PLC (Figura 2-12) avvia la pompa di alimentazione fino al raggiungimento del valore di soglia superiore. Il sistema di alimentazione è dotato di una misura di sicurezza che prevede un livello minimo, raggiungibile ad esempio in caso di malfunzionamento della pompa di alimentazione, sotto il quale l'intero impianto viene stoppato per evitarne lo svuotamento. Il refluo civile viene alimentato all'interno della vasca di pre-denitrificazione collegata alla vasca di ossidazione-nitrificazione: qui l'aerazione è continua ed è ottenuta per mezzo di aeratori a bolle fini posizionati sul fondo della vasca.

Nella vasca di filtrazione è presente un'ulteriore sonda di livello necessaria per mantenere le due membrane completamente immerse. I due moduli installati sono del tipo a fibra cava ZeeWeed® realizzati da Zenon Environmental Inc. (Oakville, Canada) con porosità di 0.04 μm . Le membrane sono dotate di un sistema di aerazione per garantire lo scuotimento delle fibre, in modo da limitare gli inconvenienti legati allo sporco. La filtrazione avviene con flusso dall'esterno verso l'interno (out-to-in), per mezzo di un gradiente di pressione creato dalla pompa di processo (P3).

Per la filtrazione è stata adottata una pompa ad ingranaggi a trascinamento magnetico bidirezionale gestita da un PLC che permette l'adozione di un processo (dalla durata complessiva di 10 minuti) composto di tre fasi operative:

- *Filtrazione*: processo durante il quale viene effettuata l'estrazione del permeato;
- *Controlavaggio*: una porzione del permeato, raccolto in una vasca apposita, viene inviato in direzione opposta rispetto a quella di filtrazione, in modo da rimuovere una parte del materiale depositatosi sulle membrane e limitare il fenomeno del fouling;
- *Relaxation*: fase durante la quale la pompa di processo P3 viene stoppata, mentre l'aerazione, per effetto dello scuotimento, consente la rimozione di una parte della sostanza depositata sulla superficie delle membrane.

La vasca delle membrane è inoltre dotata di una pompa a pistone (P2) per il ricircolo dei fanghi verso la vasca di pre-denitrificazione. Lo spurgo viene effettuato dalla vasca di filtrazione per mezzo di una pompa peristaltica (P4) comandata da PLC. Per la stima della concentrazione di solidi all'interno della vasca delle membrane si utilizza il rapporto di ricircolo, secondo cui:

$$X_r = \frac{1+\alpha}{\alpha} \cdot X \quad [\text{Eq. 2-1}]$$

Dove:

- X: concentrazione dei solidi all'interno del comparto biologico;
- α : rapporto tra la portata ricircolata e la portata in ingresso;
- X_r : concentrazione dei solidi nella vasca di separazione finale.

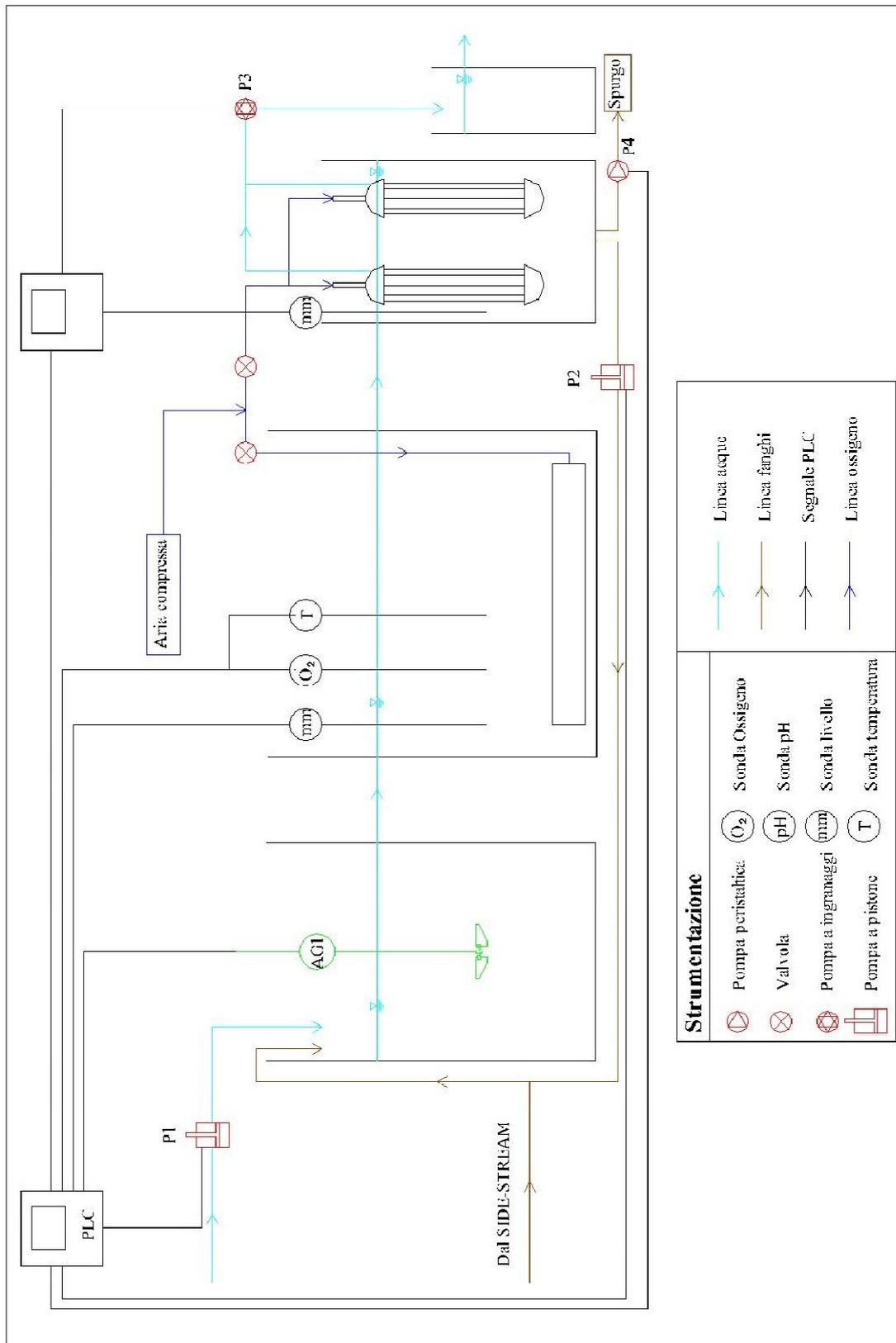


Figura 2-12 P&I dell'impianto MBR

2.1.2.2.1 Gestione degli impianti Main-Stream

Durante la sperimentazione i due impianti sono stati condotti in parallelo, cercando di mantenere condizioni operative simili tra loro. In Tabella 2-1 sono riportate le condizioni medie di funzionamento dei due impianti allo stato stazionario.

Tabella 2-1 Condizioni operative degli impianti Main-Stream

Parametro	Descrizione	Impianto CAS	Impianto MBR
Aerazione	<i>Areazione Mixed Liquor</i>	Continua con aria compressa	Continua con aria compressa
Q_{in} [L/giorno]	<i>Portata in ingresso</i>	670	670
Q_{RAS} [L/ giorno]	<i>Portata di ricircolo dei fanghi</i>	1600	2600
Q_{ND} [L/ giorno]	<i>Portata di ricircolo interno Nitro/Denitro</i>	1000	-
HRT _{aerobico} [giorni]	<i>Tempo di residenza idraulico in condizioni aerobiche</i>	0.46	0.46
HRT _{anossico} [giorni]	<i>Tempo di residenza idraulico in condizioni anossiche</i>	0.20	0.20
SRT [giorni]	<i>Età del Fango</i>	2.5	2.5

I due impianti sono sprovvisti di un sistema di regolazione della temperatura e di controllo del pH: in questo modo è possibile studiare l'attività nitrificante in condizioni simili a quelle che si avrebbero in impianti reali, che sono soggetti alle variazioni stagionali di temperatura. Si è reso quindi indispensabile monitorare pH e temperatura all'interno dei due impianti Main-Stream, in modo da poter studiare l'effetto di entrambi i parametri sulla cinetica nitrificante e sul processo di bio-arricchimento.

Un aspetto importante nella gestione dei due impianti è il controllo dell'età del fango per mezzo delle portate di spurgo, in modo particolare per l'impianto CAS, dove è necessario considerare, oltre ai solidi uscenti con lo spurgo, eventuali solidi in uscita dal sedimentatore secondario. L'impianto è stato quindi dotato di una vasca del volume di 44.5 L per la raccolta del campione medio del chiarificato e la determinazione della concentrazione di solidi totali media dell'influente.

2.1.3 L'impianto pilota della filiera Side-Stream

L'impianto pilota Side-Stream permette la coltivazione della biomassa nitrificante da inoculare successivamente nei due impianti Main-Stream durante il processo di bio-augmentation. L'alimentazione dell'impianto Side-Stream deve simulare il surnatante proveniente dalla digestione

anaerobica dei fanghi, per cui è stato utilizzato il refluo civile in ingresso all'impianto Cuoiodepur arricchito con:

- **Cloruro d'ammonio** (NH_4Cl), in modo da mantenere la concentrazione di ammonio prossima a 650 mg N- NH_4^+ /L;
- **Bicarbonato di sodio** (NaHCO_3), in modo da non avere eccessiva richiesta di alcalinità all'interno del reattore biologico.

L'alimentazione è quindi stata preparata all'interno di un serbatoio da 1000 L dotato di un sistema di agitazione (AG1), azionato da un timer, per rendere il refluo omogeneo. L'alimentazione dell'impianto pilota avviene dal fondo del serbatoio per mezzo della pompa di alimentazione (P1), che immette il refluo nella vasca di denitrificazione (Figura 2-14).

L'impianto Side-Stream vero e proprio si costituisce di tre reattori, due di forma cilindrica e volume di 30 litri circa e l'ultimo a forma di parallelepipedo a base rettangolare. I tre reattori sono collegati attraverso tubazioni di diametro nominale di 20 mm.

Nei reattori cilindrici avvengono, in sequenza, denitrificazione e nitrificazione (Figura 2-13). Tali reattori sono mantenuti in completa miscelazione attraverso due agitatori (AG2 e AG3), che li rendono a tutti gli effetti dei CSTR. La vasca di pre-denitrificazione è alimentata con il refluo in ingresso e con i fanghi di ricircolo provenienti dalla vasca delle membrane (P5).

Nell'ultimo reattore sono alloggiato tre membrane piane. Tale reattore è dotato di un aeratore e di una pompa per il ricircolo interno (P6) necessaria per evitare fenomeni di stratificazione dei fanghi nella vasca. La rimozione del permeato viene realizzata per mezzo della pompa di filtrazione (P7), la cui uscita viene inviata ad un contenitore di raccolta e poi scaricata. Inoltre, sull'uscita della P7 è installata una pompa a membrana (P8) per la raccolta, ad intervalli di tempo fissati, di un campione medio del permeato su cui realizzare le analisi dei parametri più significativi.



Figura 2-13 Reattori di denitrificazione (V1-1) e nitrificazione (V2-1) della filiera Side-Stream

La scelta del sistema di separazione a membrana è giustificata dai grossi vantaggi introdotti rispetto a un sistema tradizionale, soprattutto considerando la possibilità di un maggiore controllo sull'SRT del processo.

L'alimentazione dell'impianto è funzione del livello raggiunto nella vasca delle membrane, costantemente monitorato da una sonda di livello. Il controllo del pH e dell'ossigeno in vasca di nitrificazione è indispensabile per il mantenimento delle condizioni più adatte al processo di nitrificazione: le due sonde sono collegate rispettivamente a pompe dosatrici (P3 e P4) e alla valvola di emissione dell'ossigeno. Le pompe dosatrici per il controllo del pH sono due, per il dosaggio della soluzione alcalina e di quella acida. La valvola di emissione regola l'attivazione dell'areazione, ottenuta per mezzo di un aeratore a bolle fini funzionante ad aria compressa. La sonda del livello nella vasca delle membrane viene utilizzata per la regolazione dell'alimentazione: quando il livello nella vasca scende al di sotto del valore minimo impostato la pompa viene attivata fino al ripristino del set-point del livello.

Dalla tubazione di ricircolo dei fanghi dalla vasca delle membrane al reattore di pre-denitrificazione è previsto lo spurgo del fango da utilizzare per il processo di bio-arricchimento. Lo spurgo è effettuato per mezzo di due pompe (P-Bio) che, durante il processo di bio-arricchimento, inviano il fango di supero direttamente nelle vasche anossiche dei due impianti Main-Stream. Uno schema dell'impianto Side-Stream è riportato in Figura 2-14.

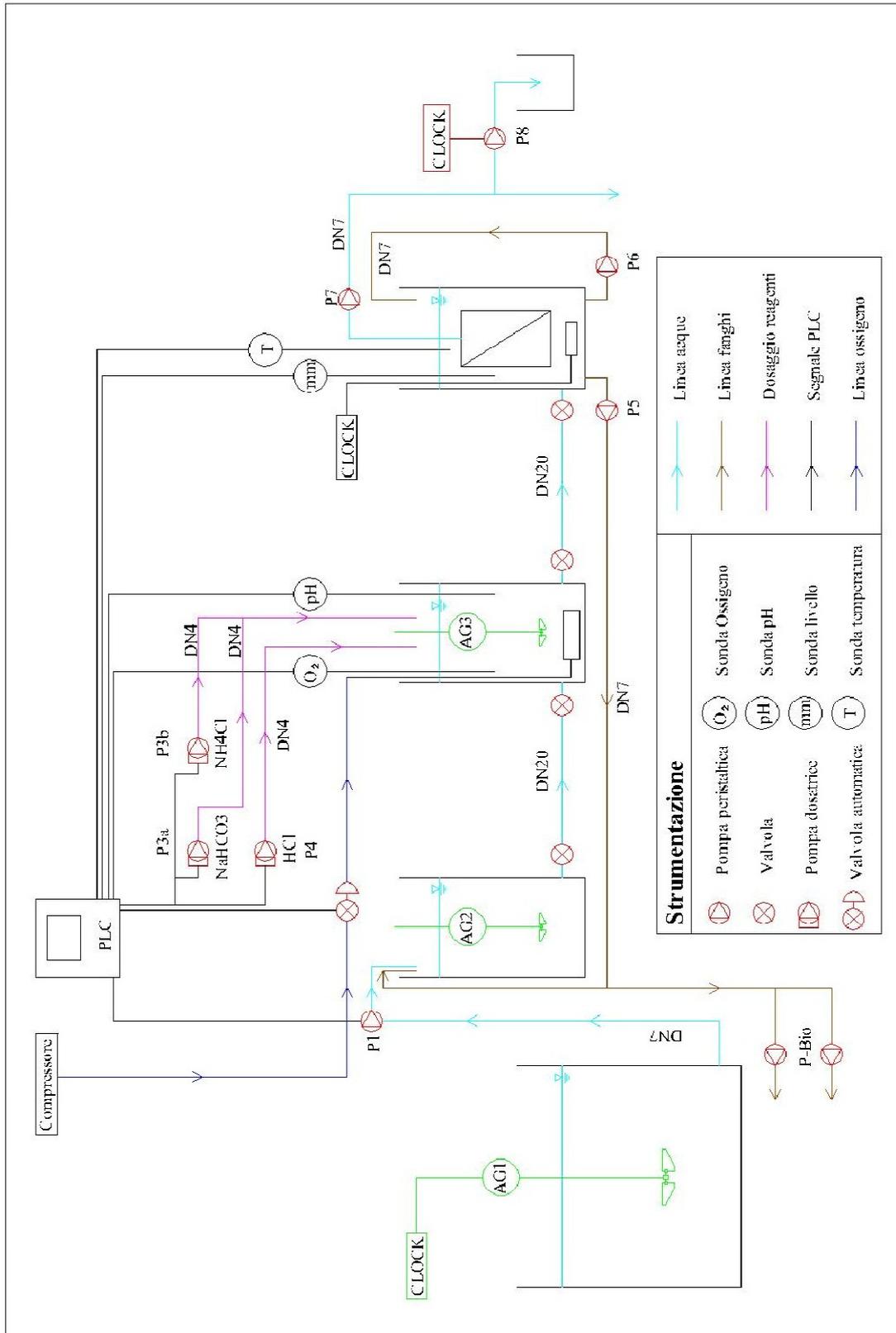


Figura 2-14 P&I dell'impianto Side-Stream

2.1.3.1.1 Gestione dell'impianto SIDE-STREAM

La gestione dell'impianto Side-Stream è una componente importante del lavoro di sperimentazione durante il quale è stato necessario mantenere un costante controllo delle condizioni operative e effettuare una continua manutenzione delle componenti installate. La prima fase di gestione ha previsto lo start-up dell'impianto ed il raggiungimento delle condizioni di processo desiderate:

- Concentrazione di azoto ammoniacale nell'alimentazione: 650 mg N-NH₄⁺/L;
- Portata di filtrazione: 60 L/giorno;
- SRT: 20 giorni
- HRT: 24 h
- T: 20°C
- Set Point pH: 7.9
- Set Point DO: 4 mg L⁻¹

La scelta quantitativa del carico di ammonio in ingresso è strettamente legata alla volontà di simulare il flusso di surnatante proveniente da due ipotetici digestori anaerobici dei fanghi associati agli impianti Main-Stream. Una portata di 30 L giorno⁻¹ corrisponde, infatti, a circa il 4.5% della portata in ingresso alla linea acque degli impianti Main-Stream, valore in linea con quanto riportato in letteratura anche per quanto riguarda la ripartizione dei carichi.

L'SRT adottata risulta, dal punto di vista teorico, più che sufficiente per la rimozione dell'azoto ammoniacale in ingresso all'impianto Side-Stream, considerando che la temperatura nei reattori è mantenuta a circa 20±0,5 °C mediante un sistema di riscaldamento della vasca di nitrificazione. Tuttavia, benché mantenuto un'età del fango di 20 giorni e le condizioni operative sopra citate sia possibile ottenere un flusso di bio-arricchimento molto concentrato (Janus, et al., 1997), le portate che ne risultano sono limitate. Inoltre una SRT così elevata permette di ottenere, in via teorica, notevoli vantaggi per quel che riguarda la stabilità del processo ed una maggiore sedimentabilità dei fanghi (a parità di concentrazione di solidi nel mixed liquor) nelle linee arricchite (Liao, et al., 2006).

2.2 Il refluo trattato

Il refluo utilizzato per l'alimentazione di tutti gli impianti pilota nel corso della sperimentazione è il refluo civile in ingresso all'impianto Cuoiodepur caratterizzato dalla composizione riportata in

Tabella 2-2 tenendo conto delle analisi effettuate sull'influente agli impianti Main-Stream al momento dell'immissione in vasca di denitrificazione. Il refluo utilizzato per l'alimentazione della filiera Side-Stream differisce da quello riportato in tabella unicamente per la concentrazione di azoto ammoniacale che varia nel corso dello start-up ed è successivamente mantenuta costante e prossima a 650 mg L^{-1} nel corso della sperimentazione.

Tabella 2-2 - Composizione del refluo utilizzato nel corso della sperimentazione

Parametro	Media	Max	Min	Dev. St.
<i>pH</i>	8.0	8.6	7.5	0.2
<i>T (°C)</i>	16.1	28.7	6.8	4.3
<i>COD_{iq} (mg L⁻¹)</i>	286.7	527	120	75.7
<i>COD_{solubile} (mg L⁻¹)</i>	194.8	327	52.9	54.6
<i>SST (mg L⁻¹)</i>	117	215	30	87
<i>N – NH₄⁺ (mg L⁻¹)</i>	32.3	44.5	10.7	5.0
<i>N – Totale (mg L⁻¹)</i>	38	49	28	24
<i>P – Totale (mg L⁻¹)</i>	0.7	1.1	0.1	0.4

2.3 Avvio e gestione degli impianti pilota

2.3.1 Impianto Side-Stream

L'impianto MBR per la simulazione della filiera Side-Stream è stato inoculato con 10 litri di fango provenienti dalla vasca di nitrificazione/ossidazione dell'impianto di depurazione di Sant'Agostino (Pistoia, Italia) caratterizzato da una concentrazione di solidi totali pari a 4800 mg L^{-1} preventivamente filtrato con un setaccio con maglia di 1 mm. L'impianto è stato successivamente riempito con refluo civile in ingresso all'impianto Cuoiodepur al quale è stato addizionato Cloruro di Ammonio fino al raggiungimento di una concentrazione di N-NH_4^+ di 45 mg L^{-1} . Sono stati successivamente impostate le seguenti condizioni operative:

- portata di filtrazione (Q): 60 L giorno^{-1} ;
- portata di ricircolo: 5Q;

- set-point pH: 7.9;
- set-point ossigeno: 4 mg L⁻¹.

Una volta avviato, l'impianto è stato tenuto costantemente sotto controllo e quotidianamente sono state effettuate analisi relative ad ammonio, nitriti, nitrati e COD dell'effluente e concentrazione di solidi totali in vasca di nitrificazione.

L'avvio del processo biologico costituisce la fase più delicata nella gestione di un impianto di trattamento e se non viene realizzato in maniera adeguata si corre il rischio di avere perdite di biomassa e una diminuzione delle efficienze di rimozione del processo. Quest'aspetto è stato sottolineato in diversi studi (Van Hulle, et al., 2005) e diviene particolarmente importante nel caso di impianti BNR (Biological Nutrient Removal) che adottino elevati carichi di ammonio in ingresso (Ruiz, Jeison, & Chamy, 2003). In questi casi, infatti, si corre il rischio di avere un accumulo di azoto ammoniacale e di nitriti che vanno a inibire il processo di nitrificazione (Van Hulle, et al., 2010).

Allo scopo di evitare sovraccarichi del sistema è stato previsto un protocollo per l'incremento graduale dei carichi in ingresso che ha previsto l'aumento della concentrazione di ammonio nell'influenza di 50 mg L⁻¹ all'ottenimento di rimozioni percentuali superiori al 95% fino al raggiungimento dell'obiettivo prefissato di 750 mg L⁻¹ di ammonio nel refluo da trattare.

Un secondo start-up eseguito a seguito di malfunzionamenti e di una perdita significativa di biomassa dall'impianto è stato condotto sfruttando contemporaneamente due sistemi di alimentazione: la normale alimentazione principale, mantenuta a concentrazioni di ammonio comprese tra 100 e 180 mg N-NH₄⁺L⁻¹, affiancata da un'alimentazione secondaria costituita da una soluzione di ammonio (2950 mg N-NH₄⁺L⁻¹) e bicarbonato in rapporto quasi stechiometrico con leggero eccesso di N-NH₄⁺. Il dosaggio della soluzione avviene ogni qual volta il sistema necessita di un innalzamento del pH e tende ad aumentare progressivamente con la crescita della biomassa sul substrato dosato.

I due sistemi di alimentazione sono stati mantenuti attivi fino a quando il carico complessivo giornalmente rimosso dall'impianto non è risultato simile a quello che sarebbe stato immesso con un'alimentazione con 650 mg N-NH₄⁺L⁻¹ e portata di 60 L giorno⁻¹, cioè circa 39 g giorno⁻¹ di N-NH₄⁺.

2.3.2 Impianti Main-Stream

Dopo aver effettuato la verifica idraulica e verificato il funzionamento del sistema automatizzato di gestione delle portate, l'impianto CAS è stato inoculato con 100 Litri di fango biologico prelevato

dalle vasche aerobiche dell'impianto Cuoidepur ($SST = 8700 \text{ mg L}^{-1}$) e successivamente riempito ed alimentato con refluo civile sotto le condizioni operative riportate in Tabella 2-1.

Una volta verificato il raggiungimento dello stato stazionario sulla base della concentrazione di ammonio, nitriti, nitrati, COD e solidi totali in uscita e della concentrazione di solidi in vasca di nitrificazione, 350 L di Mixed Liquor sono stati prelevati dall'impianto e immessi all'interno dell'impianto MBR. Entrambi gli impianti sono stati successivamente riempiti con refluo civile. Al momento dell'avvio contemporaneo dell'impianto CAS e MBR, entrambi i sistemi sono caratterizzati da una concentrazione di solidi pari a $580 \text{ mg SST L}^{-1}$.

2.4 Metodologia di analisi dei parametri di processo

Per il controllo dei tre impianti pilota e per la raccolta delle informazioni necessarie alla valutazione del processo di bioarricchimento è stata realizzata una campagna di campionamento e analisi dei parametri di interesse.

La raccolta e l'analisi dei campioni è stata realizzata tre volte alla settimana in punti specifici dell'impianto e con metodologie standardizzate.

2.4.1 Campionamento

Durante la sperimentazione le analisi sono state effettuate su campioni prelevati dai tre impianti pilota per mezzo di campionatori in plastica del volume di 250 ml. Tutti i campioni sono stati prelevati sempre dagli stessi punti dell'impianto e sempre adottando la stessa procedura. In Figura 2-15 e 2-16 sono evidenziati i punti di raccolta dei campioni nei tre impianti pilota.

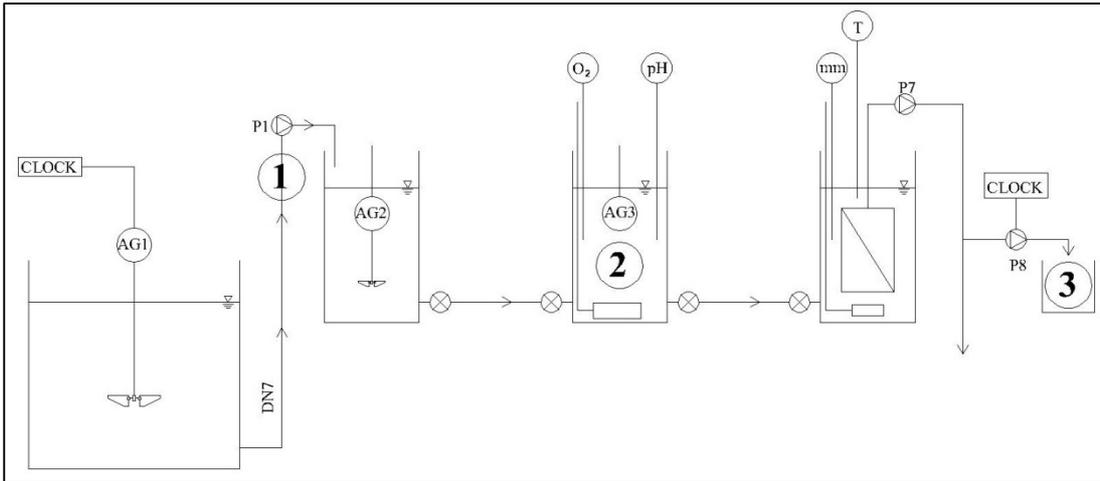


Figura 2-15 Punti di campionamento impianto Side-Stream

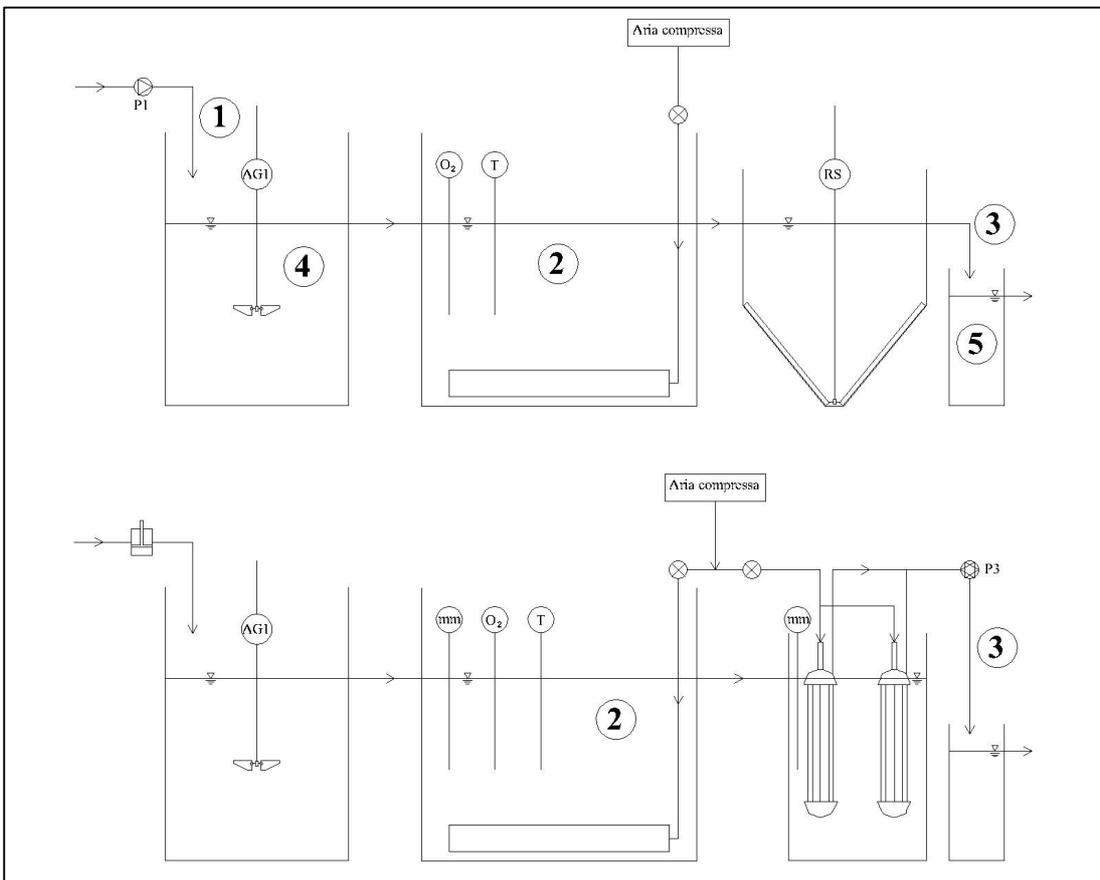


Figura 2-16 Punti di campionamento impianti Main-Stream

Ad ogni punto di campionamento corrispondono gruppi di analisi standard, a cui possono essere poi affiancate analisi di approfondimento (Tabella 2-3).

Tabella 2-3 - Punti di campionamento e parametri analizzati

Parametro		Punti di campionamento (Side-Stream)			Punti di campionamento (Main-Stream)				
		1	2	3	1	2	3	4	5
NH_4^+		x		x	x		x		
NO_2^-				x			x	x	
NO_3^-				x			x	x	
COD	Totale	x		x					x
	Disciolto	x		x		x			x
SST			x			x			x

2.4.2 Metodi analitici

L'attività analitica è indispensabile per permettere il controllo e la comprensione dei fenomeni che si sviluppano all'interno dei tre impianti. I parametri analizzati durante la sperimentazione sono stati:

- *Ione Ammonio* (N- NH_4^+): la determinazione viene effettuata con metodo colorimetrico mediante l'utilizzo di test fotometrici in kit e spettrofotometro per l'analisi del campione precedentemente filtrato su carta rapida;
- *Ione nitrito* (N- NO_2^-): la determinazione viene effettuata con metodo colorimetrico mediante l'utilizzo di test fotometrici in kit e spettrofotometro per l'analisi del campione precedentemente filtrato su carta rapida;
- *Ione nitrato* (N- NO_3^-): la determinazione viene effettuata con metodo colorimetrico mediante l'utilizzo di test fotometrici in kit e spettrofotometro per l'analisi del campione precedentemente filtrato su carta rapida;
- *COD*: la determinazione viene effettuata con metodo colorimetrico mediante l'utilizzo di test fotometrici in kit e spettrofotometro per l'analisi del campione precedentemente filtrato su carta rapida e digerito;
- *Solidi Sospesi Totali (SST)*: la determinazione viene effettuata secondo la metodologia standard che prevede la raccolta dei solidi su un apposito filtro a membrana e la loro determinazione per via gravimetrica dopo essiccamento del filtro ad una temperatura di 103-105°C fino a peso costante.

- pH, T e DO: sono stati misurati direttamente nei reattori tramite analizzatore multiparametrico portatile Hach Lange HQ40d.

Per quanto concerne l'analisi delle concentrazioni di ammonio, nitriti, nitrati e COD, queste vengono effettuate tramite l'impiego di kit appositi (LANGE, Berlino, Germania). I test in cuvetta (Figura 14) sono disponibili in confezioni che comprendono tutto l'occorrente, tra cui i reattivi predosati necessari per l'analisi, con indicazioni molto precise riguardo la loro metodica ed il loro impiego.



Figura 2-17 – Test in cuvetta LANGE per la misura dei parametri di interesse

La determinazione della concentrazione del parametro di interesse avviene per via spettrofotometrica mediante l'utilizzo dello spettrofotometro XION 500 (LANGE, Berlino, Germania).



Figura 2-18 - Spettrofotometro XION 500

2.4.3 Parametri di interesse per il monitoraggio degli impianti pilota

La fase successiva alla raccolta dei dati è la loro elaborazione, in cui dall'informazione analitica si passa alla caratterizzazione dei processi che si sviluppano all'interno dei tre impianti pilota e alla valutazione dell'effetto della bioaugmentation.

Nei due impianti Main-Stream e in quello Side-Stream una prima elaborazione dei dati consiste nel calcolo di alcuni parametri di processo, utili per verificare lo stato di funzionamento dell'impianto:

- *SALR – Specific Ammonia Loading Rate:*

È il carico di ammonio applicato giornalmente al volume della vasca aerobica (Eq. 2-2).

$$ALR(mg L^{-1} d^{-1}) = \frac{N_{-NH_4^+}(mg L^{-1}) \cdot Q(L d^{-1})}{V_{aerobico}(L)} \quad [Eq. 2-2]$$

- *CE – Capacità di Eliminazione*

È la massa di azoto ammoniacale rimossa giornalmente dalla biomassa attiva; viene calcolata come la differenza tra la concentrazione di ammonio in ingresso e in uscita moltiplicata per la portata di refluo trattato giornalmente:

$$CE - NH_4^+ (g d^{-1}) = (N_{-NH_4^+ in} (g L^{-1}) - N_{-NH_4^+ out} (g L^{-1})) \cdot Q (L d^{-1}) \quad [Eq. 2-3]$$

- *R - Rateo specifico di nitrificazione:*

È una misura grossolana di quanto substrato viene rimosso e viene espresso come $g(N) g^{-1}(SST) d^{-1}$.

$$R [g(N) g^{-1}(SST) \cdot d^{-1}] = \frac{rN_{-NH_4^+}}{SST \cdot V_{aerobico}} \quad [Eq. 2-4]$$

- *HRT (Hydraulic Retention Time) – Tempo di Ritenzione Idraulica:*

Rappresenta la durata media di permanenza di un composto solubile all'interno di un reattore ed è definito dal rapporto tra il volume del reattore e la portata in ingresso ad esso:

$$\theta = \frac{V}{Q} \quad [Eq. 2-5]$$

- *SRT (Sludge Retention Time) – Età del Fango:*

La formula per il calcolo della SRT deriva dal bilancio di massa sviluppato considerando il volume di controllo che comprende la vasca di aerazione e il sedimentatore secondario.

$$SRT(d) = \frac{V \cdot X}{Q_w \cdot X_R + Q_e \cdot X_e} \quad [Eq. 3-6]$$

Dove:

V è il volume del reattore biologico;

X è la concentrazione in massa nella vasca di aerazione;

Q_w è la portata volumetrica di spurgo dalla linea di ricircolo;

X_R è la concentrazione di fango in termini di SST nella linea di ricircolo;

Q_e è la portata volumetrica effluente dal sedimentatore secondario;

X_e è la concentrazione di SST nella corrente effluente.

Il calcolo della SRT differisce tra i due impianti Main-Stream poiché nel CAS si ha allontanamento dei solidi sia con lo spurgo che con l'effluente chiarificato, che nell'MBR risulta completamente privo di solidi. Questo significa che per la valutazione della SRT del sistema CAS è necessario valutare la concentrazione media di SST nell'effluente.

2.5 Modellistica di processo

L'utilizzo di modelli matematici si rende necessario allo scopo di studiare in dettaglio il processo biologico di nitrificazione e di stimare i parametri più significativi per la caratterizzazione cinetica della biomassa attiva mediante la calibrazione del modello stesso sui dati sperimentali.

Nel corso della sperimentazione, allo scopo di descrivere sia i dati raccolti nel corso della campagna di monitoraggio degli impianti pilota sia quelli ottenuti nel corso dei test cinetici sulla biomassa nitrificante, sono stati utilizzati come modelli di riferimento l'ASM1 Model redatto dal task group dell'IAWQ (International Association on Water Quality) nel 1987 e un modello basato sull'ASM1 in cui si tiene conto della presenza dei due step di nitrificazione (ASMN) e degli effetti inibenti legati alla presenza di FA e FNA sulla biomassa AOB e NOB.

2.5.1 Il modello ASM1

Il modello ASM1 prevede l'utilizzo delle variabili di processo riportate in Tabella 2-4 per la caratterizzazione dell'influenza e dei flussi interni al sistema di trattamento delle acque ed i coefficienti cinetici, dipendenti dalla temperatura secondo la Legge di Arrhenius, riportati in Tabella 2-5.

Tabella 2-4 - Variabili di processo del modello ASM1

Variabile di processo	Descrizione
H₂O	Acqua
S_I	COD solubile inerte
S_S	COD rapidamente biodegradabile
S_O	Ossigeno disciolto
S_{NO}	Nitriti e Nitrati
S_{NH}	Ammonio

S_ND	Sostanza azotata solubile biodegradabile
S_ALK	Alcalinità
X_I	COD particolato inerte
X_S	COD lentamente biodegradabile
X_BH	Biomassa eterotrofa
X_BA	Biomassa autotrofa
X_P	COD particolato prodotto dal decadimento della biomassa
X_ND	Azoto biodegradabile particolato

Tabella 2-5 - Parametri cinetici del Modello ASM1

Parametro	Descrizione	Valore di default	Unità di misura
Temp	Temperatura del fango attivo	--	°C
Temp_Ref	Temperatura alla quale sono definiti i parametri	20	°C
theta_mu_H	Fattore di conversione per μ_H	1.072	
theta_mu_A	Fattore di conversione per μ_A	1.12	
theta_b_H	Fattore di conversione per b_H	1.072	
theta_b_A	Fattore di conversione per b_A	1.12	
theta_k_h	Fattore di conversione per k_h	1.116	
theta_k_a	Fattore di conversione per k_a	1.072	
theta_K_X	Fattore di conversione per K_X	1.116	
Y_H	Fattore di resa per la biomassa eterotrofa	0.67	$\frac{g(COD)}{g(COD)}$
i_XB	Massa di azoto per massa di COD della biomassa	0.08	$\frac{g(N)}{g(COD)}$
Y_A	Fattore di resa per la biomassa autotrofa	0.24	$\frac{g(COD)}{g(N)}$
f_P	Fattore di biomassa convertita in materiale inerte	0.08	--
i_XP	Massa di azoto per COD dei prodotti del decadimento endogeno	0.08	$\frac{g(N)}{g(COD)}$
K_S	Costante di semi-saturazione per la biomassa eterotrofa	10	$g(COD) m^{-3}$
K_OH	Costante di semi-saturazione dell'ossigeno per la biomassa eterotrofa	0.2	$g(O_2) m^{-3}$
K_NO	Costante di semi-saturazione dei nitrati per la biomassa eterotrofa	0.5	$g(NO_3) m^{-3}$
b_H	Coefficiente di decadimento endogeno per la biomassa eterotrofa	0.62	d^{-1}
mu_H	Rateo Massimo di crescita per la biomassa eterotrofa	6	d^{-1}
n_g	Fattore di conversione per la crescita della biomassa eterotrofa in condizioni anossiche	0.8	--
K_OA	Costante di semi-saturazione dell'ossigeno per la biomassa autotrofa	0.4	$g(O_2) m^{-3}$
K_NH	Costante di semi-saturazione dell'ammonio per la biomassa autotrofa	1	$g(NH_4) m^{-3}$
b_a	Coefficiente di decadimento endogeno della biomassa autotrofa	0.08	d^{-1}
mu_A	Rateo massimo di crescita della biomassa autotrofa	0.8	d^{-1}
k_a	Rateo massimo specifico di ammonificazione	0.08	$\frac{m^3 g(COD)}{d^{-1}}$
K_X	Costante di semi-saturazione per l'idrolisi del substrato lentamente biodegradabile	0.03	$\frac{g(COD)}{g(COD)}$
n_H	Fattore di correzione per l'idrolisi in condizioni anossiche	0.8	--

k_h	Rateo massimo specifico di idrolisi	3	$\frac{g(\text{COD})}{g(\text{COD}) \cdot d}$
K_{la}	Coefficiente di trasferimento dell'ossigeno	--	d^{-1}
S_{O_Sat}	Concentrazione a saturazione dell'Ossigeno	--	$g(\text{O}_2) \cdot m^{-3}$

Il modello tiene in considerazione sia i processi di rimozione della sostanza organica che il processo di nitrificazione e denitrificazione in funzione della temperatura. Allo scopo di modellizzare il processo di depurazione, le componenti riportate in Tabella 2-4 sono suddivise in due gruppi distinti: le componenti organiche, espresse come COD (Tabella 2-6) e le componenti azotate (Tabella 2-7).

Tabella 2-6 - Componenti organiche previste del Modello ASM1

COD Totale					
COD Biodegradabile		COD Non Biodegradabile		Biomassa Attiva	
S _S solubile	X _S particolato	S _I solubile	X _I e X _P particolato	X _{BH}	X _{BA}

Con *S_S* è indicata la sostanza organica rapidamente biodegradabile mentre con *X_S* quella lentamente biodegradabile costituita da molecole di grandi dimensioni, solubili come particolate, che non possono passare attraverso la membrana cellulare e devono quindi essere idrolizzate prima di poter essere metabolizzate.

La frazione non biodegradabile del COD è indicata con *X_I* e *X_P*, che costituiscono rispettivamente la frazione particolata del COD contenuto nel refluo e quella prodotta a seguito dei processi di decadimento della biomassa.

X_{BH} e *X_{BA}* rappresentano rispettivamente la biomassa eterotrofa, che necessita di carbonio organico esterno come fonte di energia e per il metabolismo anabolico, e la biomassa autotrofa.

Tabella 2-7 - Le componenti azotate del Modello ASM1

Azoto Totale Kjeldahl (TKN)						Nitriti e Nitrati (S _{NO})
Ammonio (S _{NH})	Azoto Organico				Ammonio nella biomassa attiva (X _{NB})	
	Solubile		Particolato			
	Non biodegradabile (S _{NI})	Biodegradabile (S _{ND})	Non biodegradabile (X _{NI} e X _{NP})	Biodegradabile (X _{ND})		

S_{NH} indica la concentrazione di ammonio sia come ammoniaca libera che come ione ammonio, S_{ND} e X_{ND} costituiscono la frazione azotata, solubile e particolata che, con S_{NH} , costituiscono l'Azoto Totale Kjeldahl (TKN).

Il TKN è la misura, dunque, dell'ammonio e dell'azoto organico presente nel refluo e non tiene conto dei nitriti e dei nitrati che vengono considerati separatamente nella componente S_{NO} .

Non tutte le effettive componenti del TKN sono implementate nel modello: la frazione azotata solubile non biodegradabile S_{NI} e particolata X_{NI} e X_{NP} non vengono, infatti, esplicitamente menzionate dal modello anche se le ultime due risultano facilmente determinabili.

Il modello comprende inoltre S_O (Ossigeno disciolto) e S_{Alk} (Alcalinità).

Relativamente alle reazioni che coinvolgono le diverse variabili di processo riportate in Tabella 2-4, il Modello ASM1 considera:

- *Crescita della biomassa eterotrofa in condizioni aerobiche*

La crescita della biomassa comporta consumo della sostanza organica biodegradabile (S_S) e dell'Ossigeno disciolto entrambi limitanti per la velocità di reazione così come l'ammonio (S_{NH}) utilizzato come nutriente nel metabolismo anabolico. Solamente una parte di S_S è effettivamente utilizzata nel processo di crescita (espressa attraverso il fattore di resa della biomassa eterotrofa Y_H) mentre l'altra viene utilizzata esclusivamente come fonte di energia.

- *Crescita della biomassa eterotrofa in condizioni anossiche*

In assenza di ossigeno in forma molecolare, la biomassa eterotrofa può crescere utilizzando il nitrato come accettore di elettroni producendo azoto gassoso (processo di denitrificazione) e consumando sostanza organica rapidamente biodegradabile come substrato. Il processo di denitrificazione è fortemente influenzato dalla presenza di ossigeno ed il consumo di S_S e del nitrato (S_{NO}) sono entrambi limitanti, così come l'ammonio utilizzato per il metabolismo anabolico.

Allo scopo di considerare i minori ratei di crescita della biomassa in condizioni anossiche rispetto a quelle aerobiche, legato al fatto che solamente una frazione della biomassa eterotrofa è in grado di crescere anche in assenza di ossigeno, il rateo massimo di crescita della biomassa eterotrofa in condizioni aerobiche è moltiplicato per un fattore di correzione ($n_g < 1$).

- *Nitrificazione*

Il processo di nitrificazione è strettamente correlato al processo di crescita della biomassa autotrofa che ossida l'ammonio a nitrato utilizzando l'ossigeno come accettore di elettroni in condizioni aerobiche e parte dell'ammonio nel processo di crescita cellulare. Il fattore di resa è basso (Y_A) e la crescita risulta quindi meno significativa rispetto a quella della biomassa eterotrofa.

- *Decadimento endogeno della biomassa eterotrofa ed autotrofa*

Il processo di decadimento endogeno è modellizzato tenendo conto del concetto di death-regeneration (Dold et al. 1980) e avviene secondo ratei ben definiti. Una parte dei prodotti del decadimento non sono biodegradabili e vengono considerati all'interno del parametro X_P . Il resto è considerato lentamente biodegradabile (X_S) mentre l'ammonio associato resta disponibile come X_{ND} . Il processo non dipende dalla presenza/assenza di ossigeno ed avviene con lo stesso rateo sia in condizioni aerobiche che anossiche che anaerobiche.

- *Ammonificazione*

La frazione azotata della sostanza organica viene convertita a S_{NH} secondo un processo del primo ordine catalizzato dalla biomassa eterotrofa attiva.

- *Idrolisi della frazione organica particolata*

Mediante il processo di idrolisi, la componente lentamente biodegradabile della sostanza organica (X_S) viene idrolizzata a S_S e resa disponibile per il metabolismo batterico. Il processo avviene per l'azione di enzimi extracellulari prodotti dalla biomassa ed è modellizzato sulla base di cinetiche di reazione superficiale esclusivamente in condizioni aerobiche ed anossiche (in questo caso viene considerato un fattore di correzione $n_h < 1$). Il rateo di idrolisi è proporzionale alla concentrazione di biomassa ma tende a saturarsi quando si verificano concentrazioni di substrato troppo elevate rispetto alla concentrazione di biomassa attiva.

- *Idrolisi della frazione azotata particolata*

Il processo avviene con un rateo proporzionale a quello di idrolisi della sostanza organica particolata e permette la trasformazione di X_{ND} a S_{ND} .

Tabella 2-8 - Processi del Modello ASM1

<i>Processo</i>	<i>Rateo</i>	<i>Nome</i>
<i>Crescita aerobica della biomassa autotrofa</i>	$\mu_A \left(\frac{S_{NH}}{K_{NH} + S_{NH}} \right) \left(\frac{S_O}{K_{OA} + S_O} \right) X_{BA}$	ρ_1

Crescita aerobica della biomassa eterotrofa	$\mu_H \left(\frac{S_S}{K_S + S_S} \right) \left(\frac{S_O}{K_{OH} + S_O} \right) \left(\frac{S_{NH}}{K_{NH_H} + S_{NH}} \right) X_{BH}$	ρ_2
Aereazione	$Kla(S_{O_Sat} - S_O)$	ρ_3
Ammonificazione	$k_a * S_{ND} * X_{BH}$	ρ_4
Crescita anossica degli eterotrofi	$\mu_H \left(\frac{S_S}{K_S + S_S} \right) \left(\frac{K_{OH}}{K_{OH} + S_O} \right) \left(\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) \left(\frac{S_{NH}}{K_{NH} + S_{NH}} \right)^{n_g} * X_{BH}$	ρ_5
Decadimento endogeno autotrofi	$b_A * X_{BA}$	ρ_6
Decadimento endogeno eterotrofi	$b_H * X_{BH}$	ρ_7
Idrolisi della sostanza organica	$\frac{k_h * \left(\frac{X_S}{X_{BH}} \right)}{K_X + \left(\frac{X_S}{X_{BH}} \right)} \left(\frac{S_O}{K_{OH} + S_O} \right) + n_h \left(\frac{K_{OH}}{K_{OH} + S_O} \right) \left(\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) X_{BH}$	ρ_8
Idrolisi della frazione organica azotata	$\frac{k_h * \left(\frac{X_S}{X_{BH}} \right)}{K_X + \left(\frac{X_S}{X_{BH}} \right)} \left(\frac{S_O}{K_{OH} + S_O} \right) + n_h \left(\frac{K_{OH}}{K_{OH} + S_O} \right) \left(\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) X_{BH} \left(\frac{X_{ND}}{X_S} \right)$	ρ_9

La variazione della concentrazione delle diverse componenti del modello avviene secondo ratei che dipendono dai processi in cui tali variabili di processo sono coinvolte, e la variazione nel tempo, in riferimento alla Tabella 2-8, è ottenuta sommando i prodotti tra i coefficienti stechiometrici ed i relativi i ratei della reazione.

$$\frac{dX_i}{dt} = \sum r_j \rho_j$$

La tabella stechiometrica complessiva del Modello ASM1 è riportata in Tabella 2-9.

Tabella 2-9 Matrice stechiometrica del modello ASM1

$j \downarrow i \rightarrow$	S_s	X_s	X_{BH}	X_{BA}	X_P	S_o	S_{NO}	S_{NH}	S_{ND}	X_{ND}	
Crescita aerobica eterotrofa	$-\frac{1}{Y_H}$		1			$-\frac{1-Y_H}{Y_H}$		$-i_{XB}$			ρ_1
Crescita anossica eterotrofa	$-\frac{1}{Y_H}$		1			$-\frac{1-Y_H}{2.86 Y_H}$		$-i_{XB}$			ρ_2
Crescita aerobica autotrofa						$-\frac{4.57-Y_A}{Y_A}$	$-\frac{1}{Y_A}$	$-i_{XB} - \frac{1}{Y_A}$			ρ_3
Decadim. eterotrofo		$1-f_P$	-1		f_P					$i_{XB} - f_P i_{XP}$	ρ_4
Decadim. autotrofo		$1-f_P$		-1	f_P					$i_{XB} - f_P i_{XP}$	ρ_5
Ammonif.								1	-1		ρ_6
Idrolisi Carb. org.	1	-1									ρ_7
Idrolisi Azoto org.									1	-1	ρ_8

2.5.2 Modello ASMN

Il modello si basa sul modello ASM1 e prevede la presenza del doppio step di nitrificazione oltre all'inibizione delle biomasse ammonio ossidante (AOB) e nitrito ossidante (NOB) da ammoniaca libera (FA) e acido nitroso libero (FNA). L'inibizione da FA e FNA nei confronti della biomasse AOB e NOB sono descritte dalle equazioni riportate nelle Eq. 1-43 e 1-44 e le concentrazioni di FA e FNA sono calcolate secondo le equazioni proposte da Anthonisen (1976) riportate nell' Eq. 1-39 e 1-40. Rispetto al modello ASM1-2N4DN proposto da Hiatt and Grady (2008), il modello non tiene tenuto conto dei quattro step di denitrificazione ma considera esclusivamente il passaggio del nitrato a nitrito e del nitrito a azoto gassoso.

Le variabili di processo ed i processi del modello ASM1-2N4DN modificato sono riportati rispettivamente in Tabella 2-10 e 2-11:

Tabella 2-10 - Variabili di processo del modello ASMN

Variabile di processo		Descrizione
ASM1	ASM1-2N4DN	
H2O	H2O	Acqua
S_I	S_I	COD solubileinerte
S_S	S_S	COD rapidamentebiodegradabile
S_O	S_O	OssigenoDisciolto
S_NO	S_NO3	Nitrati
	S_NO2	Nitriti
S_NH	S_NH	Ammonio
-	S_N2	Azoto gassoso

S_ND	S_ND	Sostanza azotata solubile biodegradabile
S_ALK	S_ALK	Alcalinità
X_I	X_I	COD particolato inerte
X_S	X_S	COD lentamente biodegradabile
X_BH	X_BH	Biomassa eterotrofa
X_BA	X_BA1	Biomassa Ammonio Ossidante
	X_BA2	Biomassa Nitrito Ossidante
X_P	X_P	COD particolato prodotto dal decadimento della biomassa
X_ND	X_ND	Azoto organico biodegradabile particolato

Tabella 2-11 - Processi del modello ASMN

<i>Processo</i>	Descrizione
ASMI-2N4DN	
1	Ammonificazione del azoto organico solubile
2	Idrolisi della componente organica particolata
3	Idrolisi della componente azotata particolata
4	Crescita aerobica della biomassa eterotrofa
5	Crescita anossica eterotrofi su nitrati
6	Crescita anossica eterotrofi su nitriti
7	Crescita aerobica della biomassa AOB
8	Crescita aerobica della biomassa NOB
9	Decadimento aerobico biomassa eterotrofa
10	Decadimento AOB
11	Decadimento NOB
12	Areazione

In Tabella 2-12 sono riportati i parametri del modello ASMN:

Tabella 2-12 - Parametri del modello ASMN

Parametro	Descrizione	Valore di default	Unità di misura
i_XB	Massa di azoto per massa di COD della biomassa	0,086	--
i_XP	Massa di azoto per COD dei prodotti del decadimento endogeno	0,06	--
f_P	Fattore di biomassa convertita in materiale inerte	0,08	--
F_TSS_COD	Rapporto tra TSS e COD	0,75	--
F_BOD_COD	Rapporto tra BOD e COD	0,65	--
n_H	Fattore di correzione per l'idrolisi in condizioni anossiche	0,4	--
n_Y	Fattore di resa in condizioni anossiche	0,9	--
n_g2	Fattore di correzione crescita anossica su nitrati	0,28	--
n_g3	Fattore di correzione crescita anossica su nitriti	0,16	--
Y_H	Fattore di resa per la biomassa eterotrofa	0,67	--
Y_A1	Fattore di resa AOB	0,18	--
Y_A2	Fattore di resa NOB	0,06	--
theta_mu_H	Fattore di conversione per mu_BH	1,072	
theta_mu_A1	Fattore di conversione per mu_BA1	1,103	
theta_mu_A2	Fattore di conversione per mu_BA2	1,103	

theta_b_H	Fattore di conversione per b_BH	1.112	
theta_b_A1	Fattore di conversione per b_BA1	1.116	
theta_b_A2	Fattore di conversione per b_BA2	1.116	
theta_k_h	Fattore di conversione per k_h	1.116	
theta_k_a	Fattore di conversione per k_a	1.072	
theta_K_X	Fattore di conversione per K_X	1.116	
k_h	Rateo massimo specifico di idrolisi	2,208	d ⁻¹
k_a	Rateo massimo specifico di ammonificazione	3,8592	$\frac{m^3}{g(COD) \cdot d^{-1}}$
mu_BH	Rateo Massimo di crescita per la biomassa eterotrofa	6,25	d ⁻¹
mu_BA1	Rateo massimo di crescita AOB	0.78	d ⁻¹
mu_BA2	Rateo massimo di crescita NOB	0.78	d ⁻¹
b_BH	Coefficiente di decadimento endogeno per la biomassa eterotrofa	0.408	d ⁻¹
b_BA1	Coefficiente di decadimento endogeno AOB	0.096	d ⁻¹
b_BA2	Coefficiente di decadimento endogeno NOB	0.096	d ⁻¹
K_X	Costante di semi-saturazione per l'idrolisi del substrato lentamente biodegradabile	0.15	--
K_S1	Costante di semi-saturazione per la biomassa eterotrofa, R1	20	g m ⁻³
K_S2	Costante di semi-saturazione per la biomassa eterotrofa, R2	20	g m ⁻³
K_S3	Costante di semi-saturazione per la biomassa eterotrofa, R3	20	g m ⁻³
K_NO3	Costante di semi-saturazione dei i nitrati per la biomassa eterotrofa	0.2	g m ⁻³
K_NO2	Costante di semi-saturazione dei i nitriti per la biomassa eterotrofa	0.2	g m ⁻³
KFA	Costante di semisaturazione per Ammoniaca Libera	0,0075	g m ⁻³
KFNA	Costante di semisaturazione per Azoto Nitroso Libero	0,0001	g m ⁻³
K_OH	Costante di semi-saturazione dell'ossigeno per la biomassa eterotrofa	0.1	g(O ₂) m ⁻¹
K_OH1	Costante di semi-saturazione dell'ossigeno per la biomassa eterotrofa, R1	0.1	g(O ₂) m ⁻¹
K_OH2	Costante di semi-saturazione dell'ossigeno per la biomassa eterotrofa, R2	0.1	g(O ₂) m ⁻¹
K_OH3	Costante di semi-saturazione dell'ossigeno per la biomassa eterotrofa, R3	0.1	g(O ₂) m ⁻¹
K_OA1	Costante di semi-saturazione dell'ossigeno AOB	0.6	g(O ₂) m ⁻¹
K_OA2	Costante di semi-saturazione dell'ossigeno NOB	1,2	g(O ₂) m ⁻¹
K_I9FA	Coefficiente di inibizione da FA, R9	1	g m ⁻³
K_I9FNA	Coefficiente di inibizione da FNA, R9	0,1	g m ⁻³
K_I10FA	Coefficiente di inibizione da FA, R10	0,2	g m ⁻³
K_I10FNA	Coefficiente di inibizione da FNA, R10	0,04	g m ⁻³
S_O_Sat	Concentrazione a saturazione dell'Ossigeno	--	g(O ₂) m ⁻¹
Temp_Ref	Temperatura alla quale sono definiti i parametri	20	°C
pH	pH	7	--

In Figura 2-17 è riportata la matrice stechiometrica del processo

	S ₁	S _S	S _O	S _{NO3}	S _{NO2}	S _{NH}	S _{ND}	S _{ALK}	X ₁	X _S	X _{BH}	X _{BA1}	X _{BA2}	X _P	X _{ND}
P1		-1/Y _H	-(1-Y _H)/Y _H			-i _{XB}		-i _{XB} /14			1				
P2		-1/(Y _H *n _V)		-(1-Y _H *n _V)/(1.14*Y _H *n _V)	(1-Y _H *n _V)/(1.14*Y _H *n _V)	-i _{XB}		-i _{XB} /14			1				
P3		-1/(Y _H *n _V)			-(1-Y _H *n _V)/(0.57*Y _H *n _V)	-i _{XB}		-i _{XB} /14 + (1-Y _H *n _V)/(8.0*Y _H *n _V)			1				
P6									1-f _P	-1				f _P	[a]
P7			-(3.43-Y _{A1})/Y _{A1}		1/Y _{A1}	-i _{XB} - 1/Y _{A1}		-i _{XB} /14 - 1/(7*Y _{A1})				1			
P8			-(1.14-Y _{A2})/Y _{A2}	1/Y _{A2}	-1/Y _{A2}	-i _{XB}		-i _{XB} /14					1		
P9									1-f _P		-1			f _P	[a]
P10									1-f _P			-1		f _P	[a]
P11						1	-1	1/14							
P12		1								-1					
P13							1								-1
P14			1												

Figura 2-19 - Matrice stechiometrica del modello ASMN (Note: [a] i_{XB}-f_P*I_{XF})

I tassi dei processi previsti dal modello ASM1 sono riportati in Tabella 2-13 e Tabella 2-14

Tabella 2-13 - Tassi dei processi del modello ASMN

	Processo	Simbolo	Rateo
P1	Crescita aerobica eterotrofi	--	$\mu_{H_Temp} * C[X_BH] * (C[S_S] / (K_S + C[S_S])) * (C[S_O] / (K_OH1 + C[S_O]))$
P2	Crescita anossica eterotrofi su nitrati	R2	$\mu_{H_Temp} * n_{g2} * C[X_BH] * MonodTerm_SS_2 * MonodTerm_NO3 * InhibitionTerm_OH_2$
P3	Crescita anossica eterotrofi su nitriti	R3	$\mu_{H_Temp} * n_{g3} * C[X_BH] * MonodTerm_SS_3 * MonodTerm_NO2 * InhibitionTerm_OH_3 * InhibitionTerm_NO_3$
P6	Decadimento eterotrofi	--	$b_{H_Temp} * C[X_BH]$
P7	Crescita aerobica AOB	R7	$\mu_{A1_Temp} * C[X_BA1] * InhibitionTerm_FA_9 * MonodTerm_OA_1 * InhibitionTerm_FNA_9$
P8	Crescita aerobica NOB	R8	$\mu_{A2_Temp} * C[X_BA2] * InhibitionTerm_FNA_10 * MonodTerm_OA_2 * InhibitionTerm_FA_10$
P9	Decadimento AOB	R9	$b_{A1} * C[X_BA1]$
P10	Decadimento NOB	R10	$b_{A2} * C[X_BA2]$
P11	Ammonificazione componente azotata organica solubile	--	$k_{a_Temp} * C[S_ND] * C[X_BH]$
P12	Idrolisi componente particolata sostanza	--	$k_{h_Temp} * (C[X_S] / C[X_BH]) / (K_{X_Temp} + (C[X_S] / C[X_BH])) * ((C[S_O] / (K_{OH} + C[S_O])) + n_h * (K_{OH} / (K_{OH} + C[S_O])))$

	organica		$(S_NOx / (K_NO3 + S_NOx)) * C[X_BH]$
P13	Idrolisi componente particolata azoata	--	$k_h_Temp * (C[X_S] / C[X_BH]) / (K_X_Temp + (C[X_S] / C[X_BH]))$ $* ((C[S_O] / (K_OH + C[S_O])) + n_h * (K_OH / (K_OH + C[S_O]))) *$ $(S_NOx / (K_NO3 + S_NOx)) * C[X_BH] * (C[X_ND] / C[X_S])$
P14	Areazione	--	$Kla_Actual * (S_O_Saturation - C[S_O])$

Tabella 2-14 - Ratei del modello ASMN

Variabile di stato	Equazione
MonodTerm_SS_2	$C[S_S] / (C[S_S] + K_S2)$
MonodTerm_SS_3	$C[S_S] / (C[S_S] + K_S3)$
MonodTerm_OA_1	$C[S_O] / (K_OA1 + C[S_O])$
MonodTerm_OA_2	$C[S_O] / (K_OA2 + C[S_O])$
MonodTerm_NO3	$C[S_NO3] / (K_NO3 + C[S_NO3])$
MonodTerm_NO2	$C[S_NO2] / (K_NO2 + C[S_NO2])$
InhibitionTerm_OH_2	$K_OH2 / (K_OH2 + C[S_O])$
InhibitionTerm_OH_3	$K_OH3 / (K_OH3 + C[S_O])$
InhibitionTerm_FA_9	$S_FA / (K_FA + S_FA + pow(S_FA, 2) / K_I9FA)$
InhibitionTerm_FA_10	$K_I10FA / (K_I10FA + S_FA)$
InhibitionTerm_FNA_9	$K_I9FNA / (K_I9FNA + S_FNA)$
InhibitionTerm_FNA_10	$S_FNA / (K_FNA + S_FNA + pow(S_FNA, 2) / K_I10FNA)$
X_TSS	$(C[X_BH] + C[X_BA1] + C[X_BA2] + C[X_I] + C[X_S] + C[X_P]) * F_TSS_COD$
S_FA	$C[S_NH] * pow(10, pH_) / (Kb_Kw + pow(10, pH_))$
S_FNA	$C[S_NO2] * 1 / (K_A + pow(10, pH_))$

2.6 Test cinetici sulla biomassa nitrificante

L'esecuzione di test cinetici sulla biomassa presente all'interno degli impianti pilota, parallelamente al monitoraggio degli stessi, ha permesso di ottenere importanti informazioni circa la selezione batterica avvenuta all'interno dei sistemi e di poter spiegare i fenomeni osservati nel corso dell'elaborazione dei dati sperimentali.

L'indagine cinetica della biomassa è avvenuta in diverse fasi della sperimentazione (Tabella 2-15) ed è stata condotta mediante test batch e test titrimetrici in continuo con lo scopo di determinare i parametri di maggiore interesse utili per verificare la selezione di biomassa diverse all'interno delle due filiere di trattamento testate: il rateo massimo di crescita (μ_{\max}) e la costante di semisaturazione per il substrato (K_{NH}). Parallelamente al monitoraggio del processo e all'esecuzione di test cinetici, sono stati effettuati campionamenti del mixed liquor dei diversi impianti allo scopo di ottenere, mediante l'applicazione di tecniche di biologia molecolare (paragrafo 2.7), informazioni circa la composizione della biomassa selezionata.

Tabella 2-15 Le diverse fasi della sperimentazione su impianti pilota

FASE	Dal Giorno	Al Giorno	Note	Test effettuati	Campionamento Mixed-Liquor		
					Side- Stream	Main- Stream MBR	Main- Stream CAS
A	1	647	Side-Stream Attivo	Test Batch	X		
B	224	647	Main-Stream Attivi		X	X	X
C	444	600	Bio-arricchimento attivo	Test Batch	X	X	X
D	600	647	Bio-arricchimento non attivo	Test Batch Test Titrimetrici			

2.6.1 Test batch

Test batch a scala di laboratorio sono stati effettuati sia sulla biomassa prelevata dalla filiera Side-Stream che su quella prelevata dall'impianto MBR della filiera Main-Stream allo scopo di determinare la costante di semisaturazione per il substrato azotato, il rateo massimo di crescita specifica della biomassa ammonio ossidante e il rateo massimo di nitrificazione.

I test sulla biomassa prelevata dalla filiera Side-Stream sono stati effettuati utilizzando 0.5 L di mixed liquor dalla vasca di nitrificazione diluiti con 0.5 L di permeato in uscita dal processo di filtrazione in modo tale da non creare shock salini sulla biomassa. Date le minori concentrazioni di solidi, il fango prelevato dal reattore MBR è stato concentrato al fine di ottenere una concentrazione di solidi di partenza pari a tre volte quella effettivamente presente nelle vasche dell'impianto pilota.

Una volta diluito, il fango è stato areato e miscelato fino al raggiungimento delle condizioni endogene, verificate da una concentrazione nulla di ammonio e nitriti. L'areazione è garantita dall'insufflazione di bolle fini di aria sul fondo del reattore (volume 1L) e la miscelazione dall'adozione di un agitatore magnetico. Una volta verificato il raggiungimento dell'endogeno, in tutte le prove è stato aggiunto Cloruro di Ammonio allo scopo di ottenere concentrazioni iniziali non limitanti e non inibenti per il processo di nitrificazione. Ogni prova è stata condotta nelle medesime condizioni operative: il pH è stato mantenuto nell'intervallo compreso tra 7,8 e 8,2 mediante dosaggio di una soluzione di Bicarbonato di Sodio e l'Ossigeno Disciolto è stato mantenuto sempre superiore a 4 mg L^{-1} .

Relativamente ai test sulla biomassa del Main-Stream, la temperatura alla quale sono stati effettuati i test è fortemente dipendente dalla temperatura presente all'interno delle vasche dell'impianto pilota al momento del prelievo di campione e a seconda della prova varia tra i 18 ed i 21°C. La temperatura alla quale sono stati effettuati i test sulla biomassa prelevata dalla filiera Side-Stream è invece sempre pari a 20°C.

Successivamente al dosaggio di ammonio, un campione di 5 mL di mixed liquor è stato prelevato ad intervalli regolari di 30 minuti, filtrato ($0,45 \mu\text{m}$) ed analizzato per la determinazione della concentrazione residua di azoto ammoniacale fino al raggiungimento delle condizioni endogene.

Nota la concentrazione iniziale di biomassa nitrificante, assumendo da letteratura il valore relativo al coefficiente di decadimento endogeno della biomassa AOB è possibile calibrare i valori dei parametri di interesse sulla base dell'andamento nel tempo della concentrazione residua di ammonio. Il modello ASMN è stato applicato mediante l'utilizzo del software WEST2011byDHI (DHI, Copenhagen, Danimarca).

2.6.2 Test titrimetrici in continuo

Nel corso della sperimentazione sono stati condotti test titrimetrici in continuo con l'obiettivo di testare la possibilità di utilizzare la titrimetria differenziale on-line come tecnica per il monitoraggio del processo di nitrificazione mediante la determinazione in continuo del rateo di nitrificazione.

2.6.2.1 L'apparato sperimentale

I test, pH/DO-stat, sono stati condotti utilizzando come strumentazione di base un respirometro di tipo elettrochimico costituito da:

- 2 reattori cilindrici in plexiglas della capacità di 2 litri, aventi un coperchio dotato di fori finalizzati all'inserimento delle sonde per la misura dell'ossigeno disciolto, della temperatura, e del pH, per il passaggio delle tubazioni necessarie all'ingresso e all'uscita del mixed-liquor ed al dosaggio dei reagenti, e dell'agitatore;
- agitatore meccanico per mantenere una condizione di completa miscelazione;
- unità di controllo MARTINA (Multiple Analysis Reprogrammable Titration Analyser) e relativo software Biolab®, per la gestione, da pc, degli esperimenti e per il salvataggio dei dati (Figura 2-20).

L'unità di controllo e acquisizione dati è dotata di un sistema di 2 pompe peristaltiche e 4 elettrovalvole utilizzabili per il dosaggio controllato dei reagenti. Il software di gestione prevede la restituzione grafica in tempo reale e il trasferimento ad un foglio di calcolo dei seguenti parametri: tempo, DO, T, pH, ORP (potenziale redox), volume dosato dei reagenti.

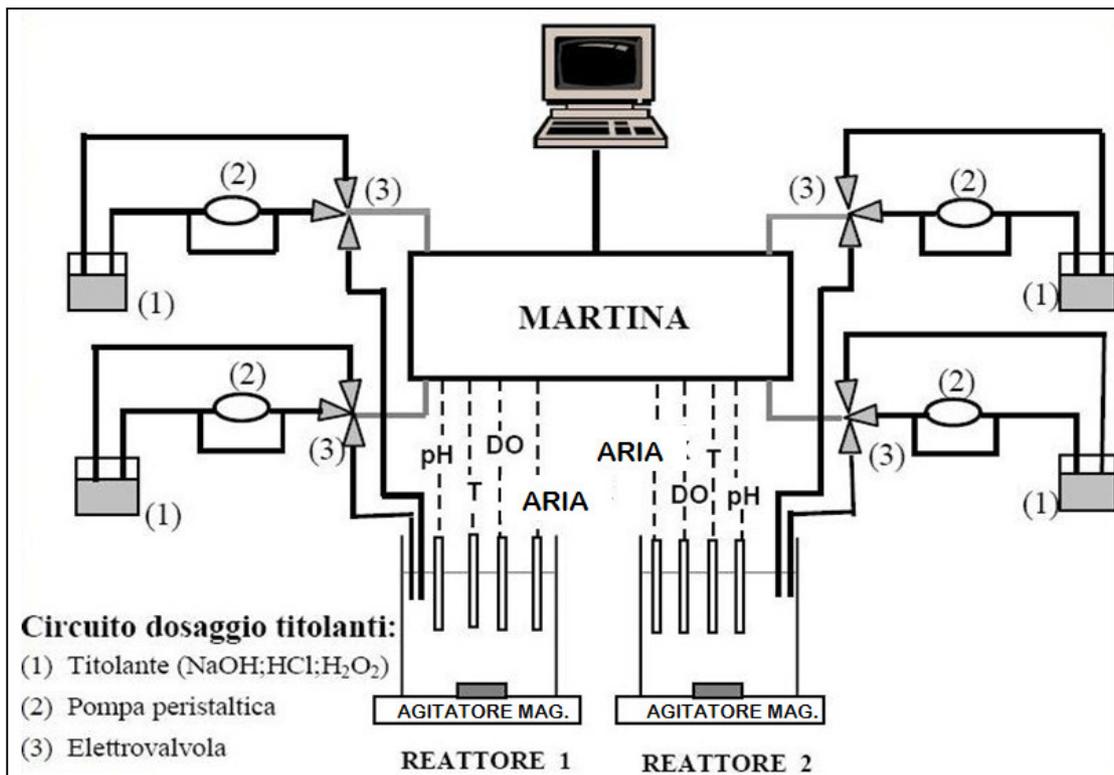


Figura 2-20 - Schema illustrativo del sistema di gestione delle prove ti trimetriche.

La temperatura all'interno dei reattori è mantenuta costante mediante ricircolo, all'interno delle camicie esterne dei reattori, di acqua a temperatura controllata mediante criotermostato.

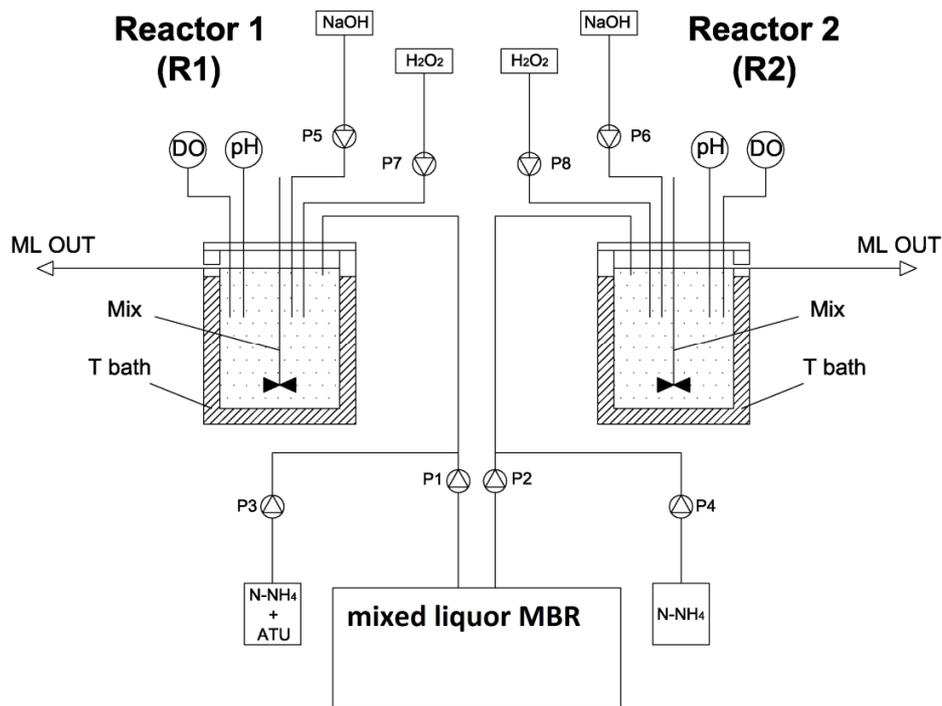
Il titolatore automatico MARTINA® (Spes, Fabriano – Italia) consente di poter dosare fino a quattro reagenti differenti, divisi in due sistemi a pompa peristaltica che possono essere pilotati in maniera indipendente. A ciascuna linea viene collegato un serbatoio di soluzione tramite tubazioni di silicone; il dosaggio delle soluzioni avviene mediante l'azione di pompe peristaltiche ad avviamento automatico.

Allo scopo di monitorare il processo di nitrificazione è stato allestito, sulla base dell'apparecchiatura sperimentale descritta, un sistema in grado di permettere l'applicazione di tecniche titrimetriche in continuo. L'obiettivo è quello di validare una tecnica innovativa per il monitoraggio del processo di nitrificazione basata sulla determinazione, in continuo, del rateo di ossidazione dell'azoto ammoniacale. La stima del rateo di nitrificazione si basa sulla determinazione del rateo di dosaggio di una soluzione alcalina necessario per compensare le variazioni di pH legate all'ossidazione dell'ammonio a nitrito (paragrafo 1.4.1.2)

I test sono stati effettuati unicamente sulla biomassa presente all'interno dell'impianto MBR, sostanzialmente per ragioni legate alla maggiore stabilità del sistema rispetto all'impianto CAS della filiera Main-Stream.

Il fatto di eseguire i test in continuo implica l'utilizzo di due reattori CSTR distinti, di due sistemi gemelli di dosaggio del mixed-liquor prelevato dall'impianto di riferimento, di allontanamento del mixed-liquor, di miscelazione e di termoregolazione.

Uno schema dettagliato con la descrizione delle componenti e una foto del prototipo utilizzato sono riportati rispettivamente in Figura 2-21 , Figura 2-22..



P1 e P2	Pompe peristaltiche per l'ingresso del mixed liquor
P3	Pompe peristaltiche per il dosaggio del substrato e dell'inibente
P4	Pompa peristaltica per il dosaggio del substrato
P5 e P6	Pompe peristaltiche per il dosaggio della soluzione di NaOH
P7 e P8	Pompe peristaltiche per il dosaggio della soluzione di H ₂ O ₂
DO	Sonde per l'Ossigeno Disciolto
pH	Sonde pH
Mix	Sistema di agitazione meccanica del mixed liquor
T bath	Sistema di termostatazione
ML out	Uscita del mixed liquor

Figura 2-21 Schema dell'apparato sperimentale per i test titrimetrici in continuo



Figura 2-22 L'apparecchiatura sperimentale per i test titrimetrici in continuo

Per ciascun reattore è prevista la presenza di una sonda DO, una sonda pH, e una sonda PT100 per il controllo della temperatura.

- Sonda DO: la concentrazione di ossigeno disciolto viene misurata tramite un ossimetro a membrana Cellox 325 (WTW GmbH, Germany).
- Sonda pH: il pH all'interno dei reattori viene misurato con una sonda pH Polyplast Pro (Hamilton, Switzerland).

2.6.2.2 Effettuazione del test

L'applicazione di metodiche di titolazione pH/DO-stat ha permesso il mantenimento all'interno dei CSTR valori costanti di pH e di Ossigeno Disciolto mediante il dosaggio controllato di opportuni titolanti. I valori dei parametri di riferimento sono monitorati mediante sonde pH e sonde DO collegate al sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati MARTINA.

L'ingresso di mixed-liquor, contenente biomassa nitrificante, e di ammonio permette, allo stato stazionario, di ottenere un rateo di nitrificazione costante (a meno di variazioni legate a cambiamenti delle condizioni operative o della qualità dell'influente) all'interno dei due CSTR,

evidenziabile da un costante dosaggio di soluzione alcalina necessario per il mantenimento del set-point di pH (Figura 2-23).

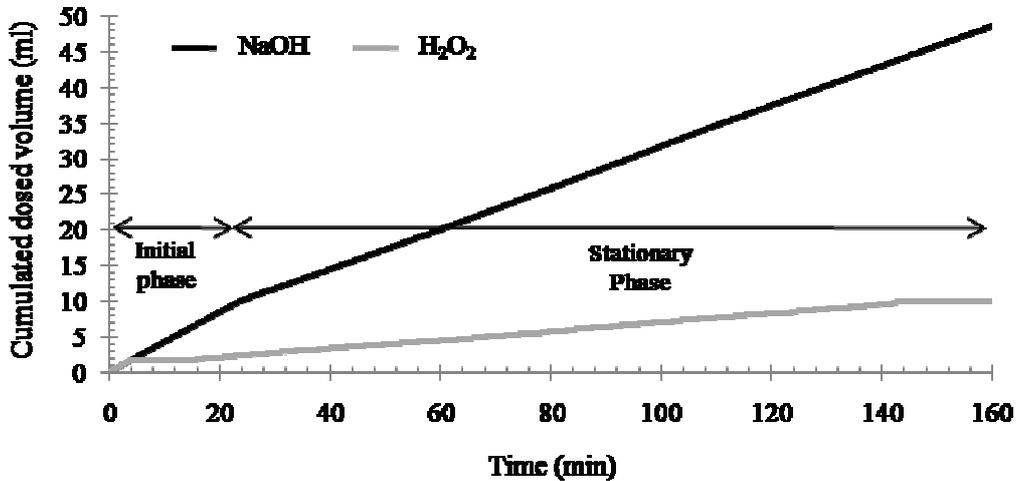


Figura 2-23 – Esempio del volume cumulado di NaOH e H₂O₂ nel corso di un test ti trimetrico in continuo

Date le condizioni operative relative all'impianto MBR (paragrafo 2.1.2.2.1), la componente di biomassa eterotrofa in ingresso ai CSTR non è trascurabile e il processo di ossidazione dell'azoto ammoniacale a nitrito non può essere considerato come la sola causa di variazioni del pH. La produzione di CO₂ legata all'ossidazione di eventuali frazioni residue di COD biodegradabile nel mixed liquor in ingresso, al metabolismo endogeno degli eterotrofi e degli autotrofi e lo stripping della CO₂ contribuiscono a variare sensibilmente il pH della soluzione. Allo scopo di determinare il dosaggio di soluzione alcalina legato esclusivamente al processo di nitrificazione è dunque necessario utilizzare due CSTR distinti, inibire la crescita degli autotrofi in uno dei due mediante dosaggio in continuo di inibente (ad es. Alliltiurea, ATU) e determinare il parametro di interesse dalla differenza tra i ratei di dosaggio del reattore non inibito e inibito.

Noti dunque i dosaggi di idrossido di sodio nei due CSTR [mL min⁻¹], la molarità della soluzione di NaOH e la stechiometria del primo step di nitrificazione (Eq. 1-37) è possibile determinare il rateo massimo di nitrificazione mantenendo la concentrazione all'interno dei reattori sempre in condizioni non limitanti per il processo secondo l'Eq. 3-7:

$$\frac{d(N - NH_4^+)}{dt} \left[\frac{mg}{h} \right] = (m_1 - m_2) N_{NaOH} MM_N f \quad [\text{Eq. 3-7}]$$

Dove:

- m_1 : dosaggio di NaOH nel reattore non inibito [ml h^{-1}]
- m_2 : dosaggio di NaOH nel reattore [ml h^{-1}]
- N_{NaOH} : molarità della soluzione di NaOH utilizzata;
- f : rapporto di conversione tra moli di azoto rimosse e moli di NaOH consumate, pari a 0,5
- MM_N : massa atomica dell'azoto.

Ogni test effettuato è caratterizzato dalle condizioni operative riportate in Tabella 2-17.

Tabella 2-16 Condizioni operative nei test titrimetrici in continuo

Parametro	Valore	Unità
Tempo di campionamento	10	s
Portata Mixed Liquor	1,5	L h^{-1}
Portata N-NH_4^+	12	mL h^{-1}
Ammonio in ingresso ai CSTR	23 – 28	mg L^{-1}
SRT	1	h
pH set-point	8	unità
DO set-point	4	mg L^{-1}

I test sono stati effettuati a temperature analoghe a quelle presenti all'interno dell'impianto pilota MBR al momento delle prove ($20 - 24 \text{ }^\circ\text{C}$) allo scopo di non creare shock termici che avrebbero potuto causare differenze tra i valori stimati del rateo massimo di nitrificazione e quelli effettivi all'interno dell'impianto. In tal modo è stato possibile utilizzare i risultati dei test titrimetrici nel processo di calibrazione del modello matematico descritto nel Paragrafo 2.5.

Parallelamente al test sono state condotte a cadenze regolari analisi relative all'ammonio residuo all'interno dei CSTR, ai nitriti e ai nitrati allo scopo di validare i ratei stimati sulla base del bilancio di massa delle componenti azotate effettuati sulle uscite sia del reattore inibito che di quello non inibito.

Nel corso della sperimentazione sono state utilizzate soluzioni 0,2M di H_2O_2 e 0,1 di NaOH per la correzione rispettivamente dell'Ossigeno Disciolto e del pH. La concentrazione in ingresso ai CSTR è determinata dalla media pesata tra quella in ingresso dall'impianto MBR e quella elaborata dalle pompe P3 e P4. Per garantire il dosaggio di inibente all'interno del CSTR inibito è stata aggiunta Alliltiourea alla soluzione di azoto ammoniacale in modo da ottenere una concentrazione all'interno dei reattori all'equilibrio di circa 20 mg L^{-1} sufficienti a garantire la completa inibizione delle biomassa autorofa.

2.6.2.3 Valutazione dell'effetto di rapide variazioni di temperatura sul massimo rateo di nitrificazione

L'effetto della temperatura sul rateo di nitrificazione, anche in riferimento a rapide variazioni del parametro, è generalmente spiegato facendo riferimento alle equazioni di Arrhenius (Head et al., 2004). Nonostante la temperatura giochi un ruolo fondamentale nelle cinetiche della biomassa nitrificante e le basse temperature negli impianti di depurazione siano uno dei motivi che stanno alla base dell'applicazione del processo di bio-augmentation non sono presenti in letteratura studi che mettano in relazione la rapidità della variazione della temperatura con la variazione del rateo massimo di nitrificazione. L'utilizzo dell'apparecchiatura sperimentale descritta nel paragrafo 2.6.3.1 permette di studiare in continuo tale fenomeno sfruttando la flessibilità della strumentazione ed il metodo con cui viene determinato il parametro di interesse. Sono stati dunque condotti test allo scopo di studiare come una variazione della temperatura (sia in fase di riscaldamento che di raffreddamento) influenzi la cinetica batterica sfruttando, per il controllo della temperatura stessa, il criotermostato ed il ricircolo dell'acqua nelle camice esterne dei reattori costituenti il titrimetro. Nell'ipotesi che l'efficienza del processo non dipenda unicamente dalla temperatura a cui avviene ma anche dalla velocità con cui il sistema è arrivato a tale condizione partendo da una condizione iniziale diversa, è possibile ritenere il rateo dipendente dalle condizioni operative secondo l'equazione generica Eq. 3-8.

$$\left(\frac{dN}{dt}\right)_{T=T_1} = f\left[T_1; \left(\frac{dT}{dt}\right)_{T_0 \rightarrow T_1}\right] \quad [\text{Eq. 3-8}]$$

L'obiettivo di questa fase di sperimentazione è quello di mettere in luce diversi aspetti legati alle variazioni della temperatura, in particolar modo la dipendenza tra la velocità di abbassamento e di innalzamento della temperatura (intesi come dT/dt , °C/h) ed il rateo di nitrificazione.

Il rateo di nitrificazione è stato misurato in continuo testando diversi ratei di variazione della temperatura, compresi tra 1,2 e 4,0 °C/h. L'andamento del processo nel tempo permette di esplicitare quali siano le variazioni del rateo in funzione della temperatura e di definire, per ogni rateo di variazione (dT/dt) il coefficiente di Arrhenius.

I test sono stati effettuati utilizzando la biomassa presente all'interno dell'impianto MBR al termine della sperimentazione relativa alla valutazione del processo di bioaugmentation. In tutti i test la

temperatura è stata fatta variare all'interno dello stesso range (18 – 11°C) in modo tale da poter determinare il valore del coefficiente di Arrhenius in funzione di dT/dt a parità di salto termico ΔT .

Dal punto di vista teorico, la tecnica titrimetrica descritta nel paragrafo 2.6.2.2 permette, a seguito di una variazione della temperatura di individuare l'effetto sul rateo di nitrificazione attraverso la variazione del rateo di dosaggio della soluzione alcalina all'interno dei reattori del titrimetro.

Tutti i test sono stati effettuati con metodiche pH/DO-stat mantenendo all'interno dei due reattori che costituiscono il titrimetro una concentrazione di DO compresa tra 4 e 5 mg L^{-1} e un pH di $8,0 \pm 0,1$ unità di pH. La portata del mixed liquor in ingresso ai chemostati è stata fissata a $1,5 \text{ L h}^{-1}$ (SRT = 1 h) ed è previsto il dosaggio di una soluzione di ammonio sotto forma di NH_4Cl tale da permettere il mantenimento di concentrazioni di azoto ammoniacale all'interno dei due reattori sempre superiori 15 mg/L.

In Figura 2-24 si riporta a titolo di esempio l'andamento della temperatura nel corso di un test titrimetrico e i ratei di dosaggio della soluzione alcalina all'interno dei reattori. Nel caso preso ad esempio la prova ha inizio una volta raggiunto lo stato stazionario all'interno dei CSTR. Da una temperatura iniziale di 16°C il sistema subisce in sequenza un raffreddamento, un riscaldamento ed un nuovo raffreddamento. Tali variazioni della temperatura si ripercuotono sui ratei di dosaggio di soda all'interno di entrambi i reattori in funzione dei quali potrà essere determinato il rateo di nitrificazione. Il rateo di variazione di temperatura è calcolato mediante interpolazione lineare dei tratti discendenti (o ascendenti) della temperatura stessa.

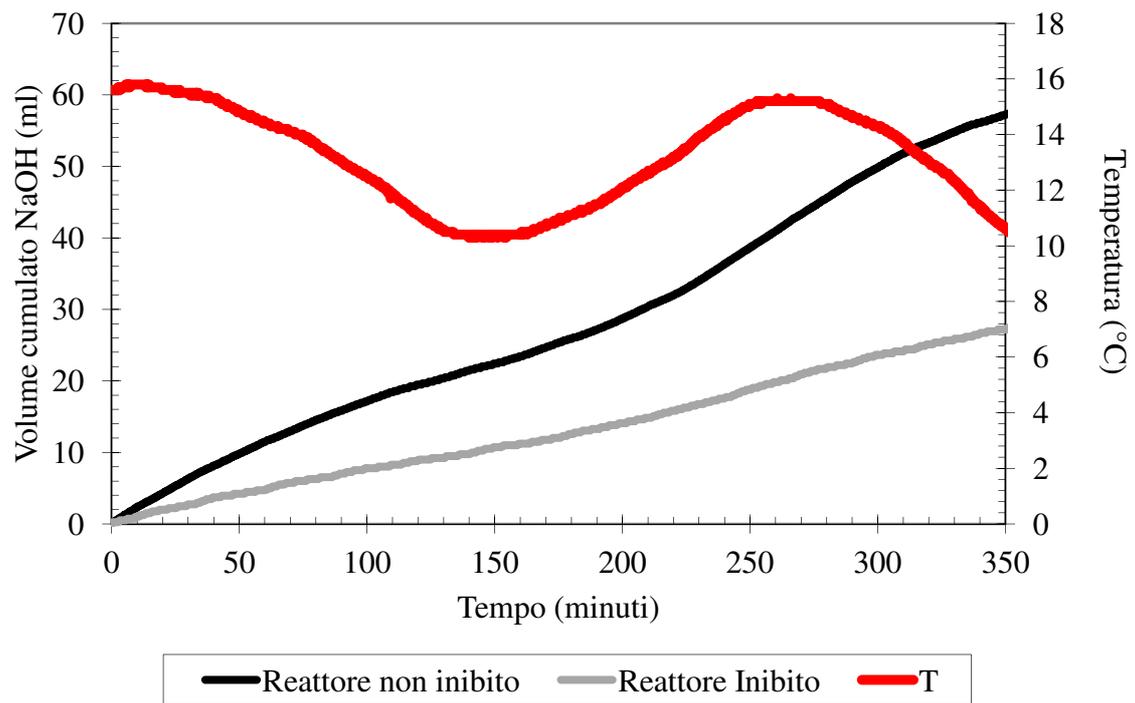


Figura 2-24 – Andamento nel tempo della temperatura e dei dosaggi di NaOH nei reattori inibito e non inibito

Dalla differenza tra il dosaggio di NaOH nei due reattori è dunque possibile determinare il rateo di nitrificazione secondo l'Eq. 3-7 (Figura 2-25).

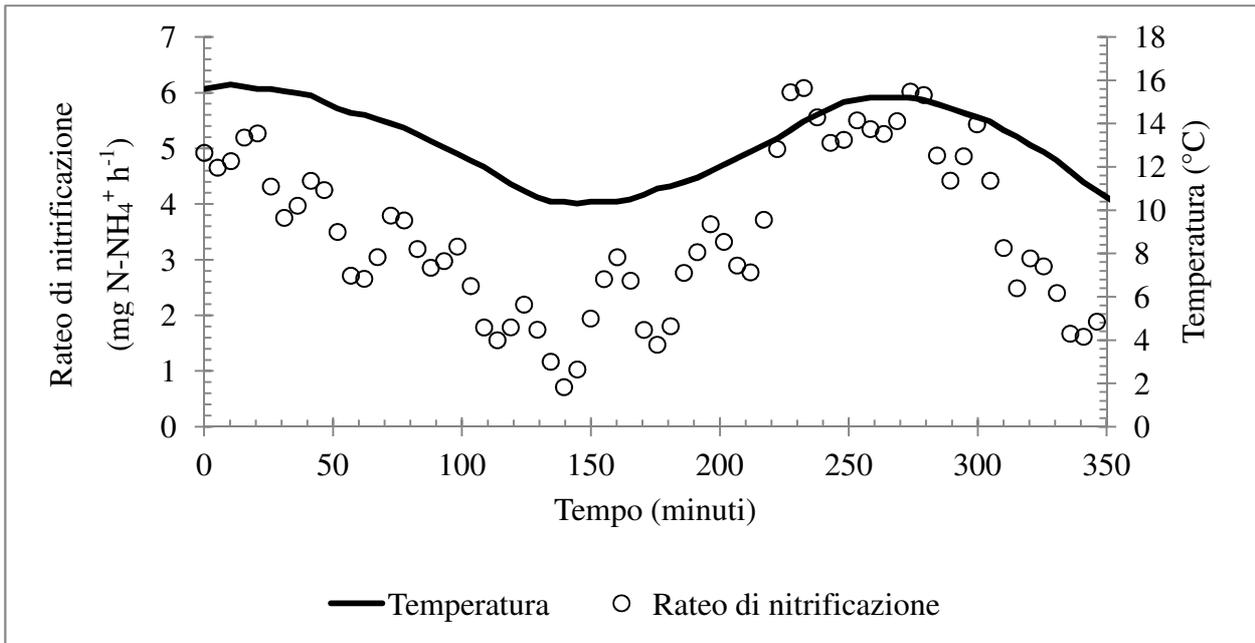


Figura 2-25 – Andamento nel tempo della temperatura e del rateo di nitrificazione

Ogni serie di punti relativi ai ratei di nitrificazione corrispondenti ad un tratto di temperatura discendente (o ascendente) è poi approssimato con un'equazione del tipo di Arrhenius in cui il parametro θ viene assunto pari al valore che rende minima la distanza tra il modello ed i dati sperimentali (Figura 2-26).

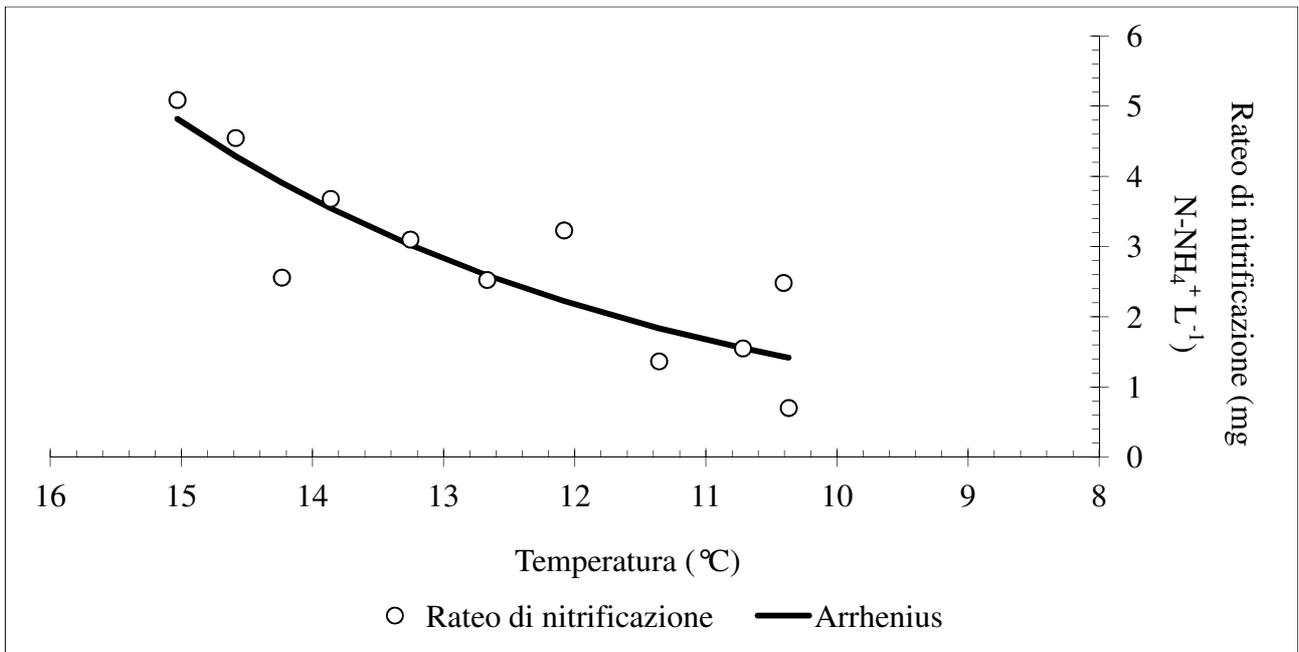


Figura 2-26 – Rateo di nitrificazione vs Temperatura

2.7 Analisi microbiologiche

Allo scopo di valutare l'impatto del processo di bioaugmentation sulla selezione delle comunità microbiche presenti all'interno dei reattori delle filiere Side-Stream e Main-Stream sono state utilizzate diverse tecniche biologico-molecolari volte alla costruzione di librerie geniche per il gene codificante l'RNA ribosomale batterico 16S.

Questo gene è molto utilizzato nella classificazione microbica, perché muta molto lentamente durante l'evoluzione e solo in rarissimi casi è soggetto ad eventi di trasferimento genico orizzontale. Poiché, la molecola dell'RNA ribosomale 16S entra a far parte dei ribosomi (in particolare, della subunità minore), essa deve prendere correttamente contatto con le altre componenti del ribosoma stesso per dare origine a un complesso funzionante. La molecola è soggetta quindi a forti "costrizioni" strutturali e funzionali. In altre parole, mutazioni che possono alterare la struttura tridimensionale del 16S rRNA sono svantaggiose. Il gene codificante questo rRNA è perciò costituito da regioni "conservate" (sequenze che sono identiche o molto simili in tutti gli organismi viventi) e regioni "variabili", quelle che possono accettare delle mutazioni e che differiscono tra microrganismi diversi. Inoltre, la presenza di regioni altamente conservate all'inizio e alla fine del gene stesso permettono la sua amplificazione in vitro mediante PCR (Polymerase Chain Reaction). La sua dimensione è in effetti compatibile con l'amplificazione via PCR e con uno sforzo di sequenziamento non eccessivo.

L'esecuzione delle tecniche descritte nei paragrafi seguenti è avvenuta presso i laboratori del Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa.

2.7.1 Campionamento

I campioni sono stati prelevati con cadenza periodica a partire dal 30 settembre 2010 fino al 19 gennaio 2012 dalle vasche di nitrificazione di ciascuno dei tre impianti pilota.

Una volta effettuato il campionamento con contenitori sterili i campioni sono stati fissati mediante stoccaggio a -20°C e in etanolo al 70° alla temperatura di -20°C e conservati in glicerolo.

2.7.2 PCR

La reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction), comunemente nota con l'acronimo PCR, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali consentendo molto rapidamente l'ottenimento in vitro della quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

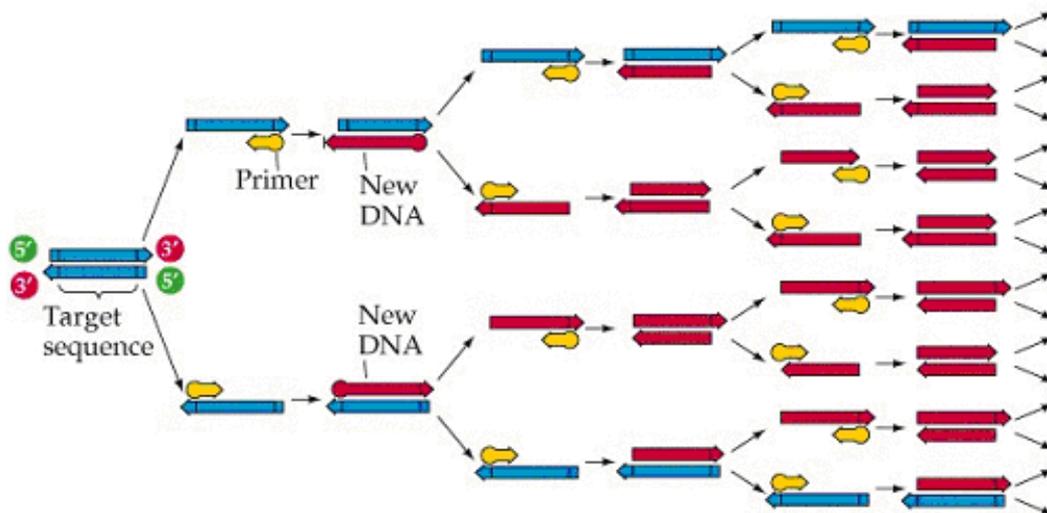


Figura 2-27 Schema della reazione a catena della polimerasi

La PCR sfrutta la reazione di sintesi in vitro del DNA, catalizzata dalla DNA polimerasi. Questo enzima richiede per il suo funzionamento uno stampo rappresentato da un filamento di DNA a cui deve trovarsi appaiato un primer (corto oligodeossinucleotide), che funge da innesco fornendo un 3'-OH libero, e la presenza di deossinucleosidi 5'-trifosfato (dNTPs).

La reazione di PCR si basa sull'uso di due primers di lunghezza pari a 18-20 nucleotidi, che sono disegnati in modo da essere esattamente complementari alle corrispondenti sequenze fiancheggianti il tratto di DNA da amplificare. I due primers sono diretti in direzione opposta ma convergente e definiscono le estremità del futuro prodotto amplificato. I primers forward e reverse utilizzati per la PCR sono stati rispettivamente il primer BAC F7-2deg con sequenza 5'-AGAGTTTGAT(CT)(AC)TGGCTCAG-3' e il primer BacR1492 con sequenza 5'-GG(AGCT)(AT)ACCTTGT TACG ACTT-3' marcati con due diversi fluoro cromi (FAM e NED). L'attività della DNA polimerasi determinerà la sintesi di nuovi filamenti a partire da ciascun primer.

L'obiettivo della PCR è, in questo caso, quello di amplificare il gene codificante l'RNA ribosomiale 16S dei campioni analizzati che sono quelli relativi alla filiera Side-Stream (19/01/2012) e quelli relativi all'impianto MBR della filiera Main-Stream prima dell'avvio della bioaugmentation (20/12/2011) e immediatamente prima della relativa interruzione (19/01/2012).

Ogni reazione di PCR è stata replicata tre volte utilizzando una diluizione 1:200 del campione prelevato dalla filiera Side-Stream e 1:50 per i campioni dell'impianto MBR.

2.7.3 Elettroforesi

L'elettroforesi è una delle tecniche maggiormente utilizzate nei laboratori di biologia molecolare, che permette la separazione e la visualizzazione di molecole di interesse biologico quali acidi nucleici e proteine in base al peso molecolare e alla carica elettrica.

Nel caso particolare, come supporto, è stato utilizzato un gel di agarosio ottenuto dalla soluzione in Tris Borato EDTA (TBE) 1x e successiva solidificazione ad una concentrazione dell'1% per i campioni amplificati e del 2% per i prodotti della T-RFLP. La cella elettroforetica è costituita da 2 vaschette contenenti il tampone ed in comunicazione tra loro, alle quali sono collegati il polo negativo e quello positivo tra cui si genera una differenza di potenziale. La miscela di molecole comincerà a migrare verso il polo positivo (per la presenza di cariche negative all'interno) in base al loro diverso peso molecolare: quelle più pesanti migreranno più lentamente rispetto a quelle più leggere, che a loro volta migreranno più velocemente.

La determinazione della concentrazione dei frammenti ottenuti nel corso dell'analisi è stata possibile mediante l'utilizzo di Blu di Metilene e di Ladder, un marcatore costituito da una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare e concentrazioni noti

Terminata la corsa elettroforetica è possibile visualizzare le bande eventualmente presenti su gel grazie ad una colorazione specifica data dal Bromuro di Etidio (EtBr), un agente intercalante che si frappone tra le basi azotate ed è evidenziabile tramite un'illuminazione ultravioletta.

2.7.4 T-RFLP (Terminal – Restriction Fragment Length Polymorphism)

La sigla RFLP deriva da RestrictionFragmentLengthPolymorphism (polimorfismo da lunghezza dei frammenti di restrizione) e viene utilizzata per indicare sia una caratteristica delle molecole di DNA che consente di distinguerle l'una dall'altra, grazie alle differenze nelle sequenze nucleotidiche che le compongono, sia la tecnica di laboratorio che sfrutta tali caratteristiche per mettere a confronto le varie molecole di DNA.

La tecnica di laboratorio si basa sull'uso di enzimi di restrizione detti endonucleasi, che tagliano unicamente in corrispondenza di particolari sequenze nucleotidiche, specifiche per ogni enzima. Il DNA viene quindi sezionato in frammenti di restrizione, che verranno separati per lunghezza mediante elettroforesi su gel d'agarosio. La distanza tra le posizioni di taglio degli enzimi di restrizione (i cosiddetti siti di restrizione) è variabile tra un individuo e l'altro, dando così luogo a variazioni nella lunghezza dei frammenti. Ciò si riflette in una diversa posizione delle bande sul gel (da cui il termine polimorfismo).

Tutti i campioni, una volta sottoposti a PCR, sono stati sottoposti a digestione enzimatica separatamente sia con l'enzima BsuR1, che riconosce e taglia in corrispondenza del sito 5'-GG[^]CC-3', sia con l'enzima Alu1, che riconosce e taglia in corrispondenza del sito 5'-AG[^]CT-3'.

I prodotti di digestione sono stati successivamente purificati e risospesi in di acqua distillata e sottoposti ad elettroforesi capillare.

2.7.5 Elettroforesi capillare

L'elettroforesi avviene all'interno di un tubo sottile avente un diametro interno nel range di 25-75 µm e diametro esterno di 350-400 µm rivestito da uno strato protettivo di poliammide. La miscela contenente gli amplificati di interesse (5,5 µl) viene iniettata nel capillare all'estremità anodica che contiene un buffer appropriato. La migrazione delle particelle e la loro successiva separazione sono permesse grazie all'applicazione di un campo elettrico fra le due estremità del capillare collegando gli elettrodi al generatore di alta tensione. Tutti gli ioni migrano nella stessa direzione grazie al flusso elettroosmotico. Le particelle si separano durante lo spostamento per via della loro mobilità elettroforetica e sono rilevate all'altro capo del capillare grazie ad un rilevatore che sfrutta una rilevazione a fluorescenza (vista la presenza di fluorocromi nella miscela) permessa dall'uso di un laser focalizzato sul capillare. Dal rilevatore le informazioni sono trasmesse ad un sistema di raccolta dati, che li traduce in un elettroferogramma costituito da una serie di picchi di colore diverso ognuno associato ad un dato fluorocromo, con aree sottese proporzionali all'intensità di emissione.

Le differenze nelle dimensioni e quindi nei pesi molecolari dei TRFs riflettono le differenze nelle sequenze dei geni. L'elettroferogramma è quindi un grafico a due dimensioni su cui è riportata una serie di picchi che differiscono per peso molecolare (lunghezza del frammento), altezza ed area sottesa. Tale grafico riporta sull'asse delle ascisse la lunghezza dei frammenti espressa in paia di basi mentre sull'asse delle ordinate viene espressa l'intensità del segnale fluorescente.

Il valore assoluto dell'altezza di ogni picco va quindi trattato con cautela anche a causa dell'annealing preferenziale del primer su alcuni frammenti rispetto ad altri. Ogni picco inoltre dovrebbe essere indicativo di una determinata entità microbica presente nella comunità, ma questo non sempre è vero e si può verificare che sequenze appartenenti a microrganismi diversi, tagliate da una stessa endonucleasi, forniscano frammenti della stessa dimensione. In questo caso nel grafico si avrà comunque uno ed un solo picco non permettendo così la distinzione e l'identificazione delle due differenti specie. Ottenuto l'elettroferogramma è necessario distinguere il segnale dal "rumore di

fondo" che varia da corsa a corsa e per cui di solito si fissa un valore soglia. Nel caso in esame è stato scelto un valore soglia di 50 FU.

2.7.6 Analisi dei dati

Dopo aver ottenuto i profili di tutti i campionamenti dei tre diversi impianti, è stata effettuata manualmente una correzione dei picchi scartando quelli con una altezza inferiore alle 50 FU. Ciascun elettroferogramma è stato corretto manualmente ed i valori di lunghezza dei frammenti sono stati arrotondati alle unità. Successivamente, i profili dei campioni, suddivisi per tipologia di impianto di provenienza ed in base all'enzima di restrizione utilizzato per la digestione (e quindi al fluorocromo), sono stati allineati in ordine temporale ottenendo una matrice di dati.

Il set di dati è stato così utilizzato sul programma PAST da cui sono stati ottenuti alcuni indici che informano circa la diversità biologica dei campioni.

- Numero di Taxa
- Indice di Shannon
- Indice di Simpson
- Evenness

Successivamente, i dati sono stati ulteriormente modificati per adattarli ad uno studio di analisi multivariata dopo la conversione dei valori in percentuali. Il tipo di analisi multivariata condotta è stata la DCA (Detrended Correspondance Analysis) usata per cercare di trovare i fattori principali per rappresentare nel modo più semplice e completo possibile matrici di dati di grandi dimensioni.

La definizione dei picchi dell'elettroferogramma ha permesso la comparazione delle informazioni ottenute con quelle presenti all'interno del database *GeneBank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e il *Ribosomal Database Project* (RDP) (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

Attraverso l'uso del NCBI e del RDP, è stato possibile ottenere dati riguardanti:

- descrizione, phylum di appartenenza e *accessionnumber* dell'organismo (identificato da entrambi i *database*)
- % di similarità tra la sequenza ottenuta
- *S_{ab} score* ottenuto dal RDP

Il risultato di tale operazione è la costruzione di tabelle, una per ogni library, in cui sono riportati tutti i cloni sequenziati con le relative informazioni.

3 Risultati e Discussioni

3.1 Start-up dell'impianto pilota della filiera Side-Stream

Durante la prima parte delle sperimentazione si sono volute ottenere, all'interno dell'impianto della filiera Side-Stream, elevate concentrazioni di biomassa nitrificante a partire da un fango attivo prelevato da un impianto di depurazione di reflui civili. L'obiettivo è perseguibile sottoponendo la biomassa a reflui caratterizzati da carichi crescenti di azoto ammoniacale. Lo start-up dell'impianto è stato effettuato sottoponendo il fango ad aumenti gradualidel carico di azoto fino a raggiungere l'obiettivo di 750-800 mg L⁻¹ di N-NH₄⁺ nell'influyente da trattare. Per i primi 15 giorni successivi all'avvio, è stato mantenuto un carico influente pari a 45 mg d⁻¹; ogni volta che la concentrazione di azoto ammoniacale in uscita scendeva sotto i 5 mg L⁻¹e/o il sistema raggiungeva efficienze di rimozione superiori al 95%, il carico veniva aumentato di 10 – 30 mg d⁻¹ di N-NH₄⁺.

Successivamente, il carico è stato aumentato di 50 mgN-NH₄⁺ L⁻¹, fino a concentrazioni di 350 mgN-NH₄⁺ L⁻¹ e di 100 mgN-NH₄⁺ L⁻¹ per concentrazioni superiori, fino al raggiungimento di 750 mg L⁻¹ di azoto ammoniacale nel refluo influente.

Allo scopo di valutare l'evoluzione del processo di nitrificazione all'interno degli impianti pilota è necessario considerare due grandezze di processo fondamentali: il carico di azoto ammoniacale in ingresso a ciascun impianto e il rendimento di rimozione raggiunto. Tali parametri possono essere rappresentati tramite l'ALR (Ammonia Loading Rate, mg N-NH₄⁺d⁻¹) e la rimozione percentuale del substrato azotato (ER, Efficienza di Rimozione espressa in %). Un ulteriore parametro da considerare allo scopo di valutare la stabilità del processo è la concentrazione di solidi sospesi totali all'interno dei reattori.

L'andamento del carico di ammonio influente, espresso come ALR e dell'efficienza di rimozione (ER) dell'azoto ammoniacale nel tempo sono riportati in Figura 3-1.

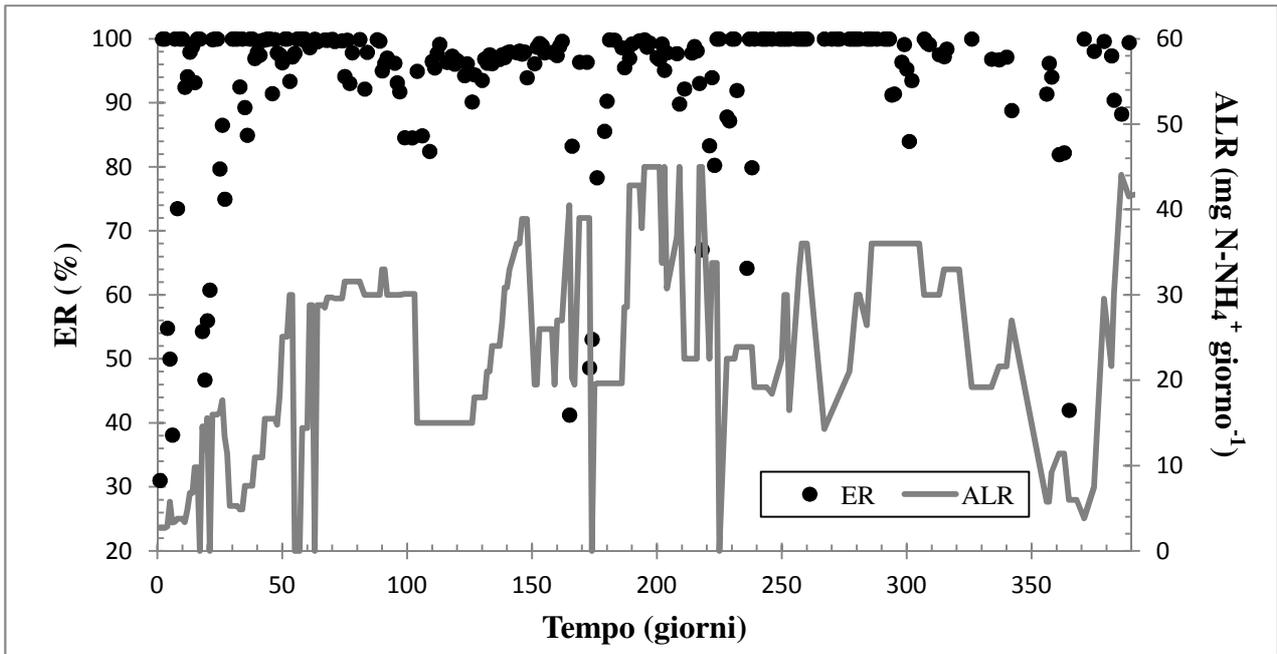


Figura 3-1 - Side-Stream: ALR e Efficienza di Rimozione dell'ammonio vs tempo

Il principale problema emerso da questo primo studio è la facilità con cui si verificano sovraccarichi di ammonio imputabili ad un errata valutazione della capacità di nitrificazione della biomassa presente all'interno dell'impianto e conseguentemente ad un eccessivo aumento del carico influente. L'accumulo di ammonio in vasca, comporta l'incremento della concentrazione di FA che può raggiungere valori inibenti per l'attività sia degli AOB che degli NOB causando l'innalzamento delle concentrazioni di nitrito all'interno delle vasche (Figura 3-2).

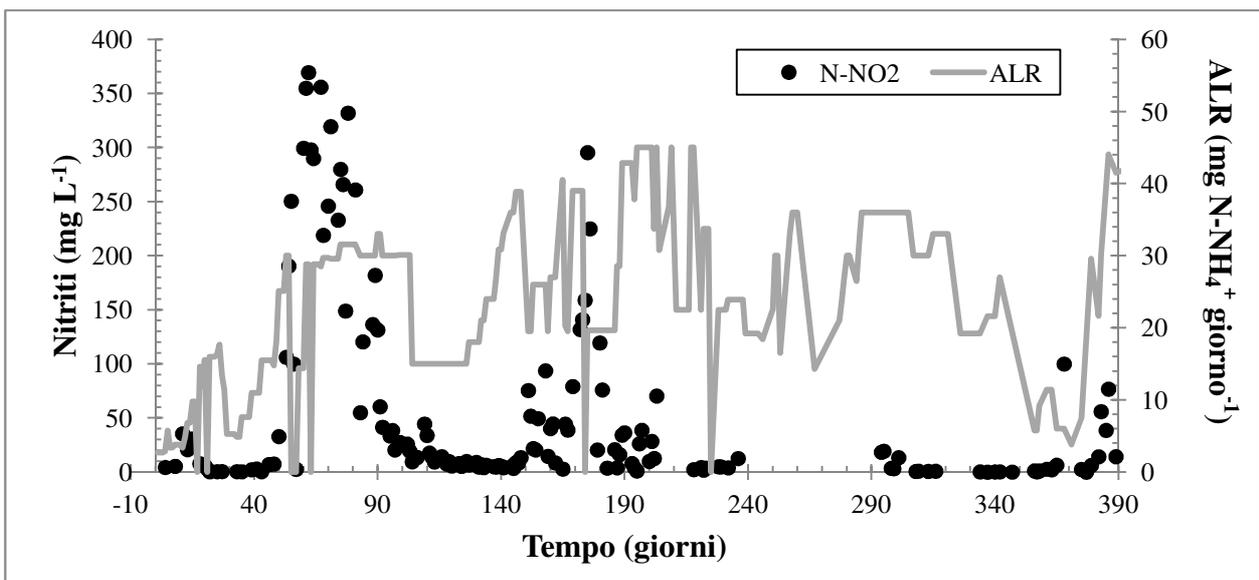


Figura 3-2 - Side-Stream: Nitriti e ALR vs tempo

Come si evince dalla Figura 3-2, si sono verificati due eventi distinti in cui le concentrazioni di nitriti nell'effluente hanno raggiunto valori superiori ai 50 mg L^{-1} .

Alte concentrazioni di nitriti portano ad alte concentrazioni di FNA e, conseguentemente, ad un incremento dell'inibizione dell'attività sia degli AOB che degli NOB.

Allo scopo di ridurre in tempi rapidi la concentrazione di ammonio e nitrito si è provveduto a ridurre, o addirittura ad annullare, il carico di ammonio in ingresso salvo poi verificare nuovi incrementi NO_2^- a seguito del ripristino delle condizioni operative precedenti l'intervento. Al fine di mantenere l'effetto positivo nel tempo delle rimozione "forzata" dei nitriti è stato previsto il dosaggio di sostanza organica rapidamente biodegradabile in vasca di denitrificazione. Una soluzione idroalcolica con COD pari a 5200 mg L^{-1} è stata dosata all'interno dell'impianto mediante l'utilizzo di una pompa a membrana con una portata di $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ogni qual volta la concentrazione di nitrito superava il valore di 50 mg L^{-1} . Il dosaggio di bCOD e la concentrazione di NO_2^- nel tempo sono riportanti in Figura 3-3.

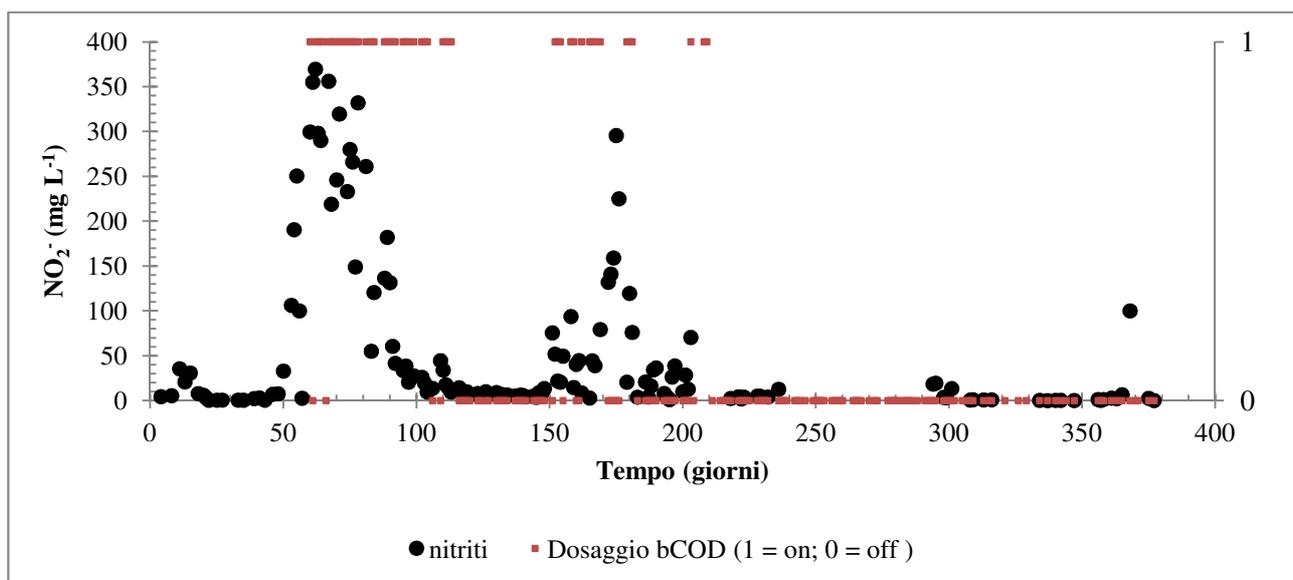


Figura 3-3 -Attivazione dosaggio bCOD e andamento dei nitriti nel tempo. Dosaggio bCOD attivo (1), Dosaggio bCOD spento (0)

Nonostante il controllo della concentrazione di nitrito mediante dosaggio di bCOD risulti estremamente efficace, la soluzione adottata è sicuramente controcorrente rispetto all'idea di risparmiare sui costi di gestione in scala reale, in quanto i nitrati prodotti nel Side-Stream non necessiterebbero di essere trattati in loco ma verrebbero inviati all'interno della filiera di trattamento principale, rendendo la denitrificazione superflua. Tuttavia, può essere prevista

solamente in fase di start-up allo scopo di limitare l'inibizione da nitriti, favorire la crescita della biomassa nitrito ossidante e ridurre i tempi necessari all'avviamento dell'impianto.

In linea generale, a seguito di sovraccarichi limitati di ammonio e nitrito che non hanno richiesto l'avvio del dosaggio di bCOD, si è intervenuti in due modi distinti:

- bloccando l'alimentazione dell'impianto per un numero di ore variabile tra le 8 e le 24 a seconda dell'importanza del sovraccarico;
- dimezzando il carico in ingresso, per poi aumentarlo nuovamente in maniera più graduale.

Tuttavia, nonostante tali operazioni siano facilmente implementabili su scala pilota, risultano di difficile applicazione su scala reale ove può verificarsi l'impossibilità di agire sul carico di ammonio in ingresso o bloccare la portata in arrivo all'impianto per tempi sufficientemente lunghi. Al massimo, trattando una filiera predisposta al trattamento del surnatante uscente dal digestore anaerobico potrà essere possibile ritardare, in caso di necessità, l'arrivo del refluo all'impianto sfruttando le volumetrie dei digestori normalmente predisposte per l'accumulo di biogas.

A seguito di numerosi inconvenienti che hanno causato uno svuotamento quasi completo dell'impianto Side-Stream con conseguente perdita del fango attivo si è reso necessario, a partire dal giorno 360 l'avvio di una nuova fase si start-up.

Dovendo valutare l'applicabilità della tecnica, sperimentata su scala pilota, ad un impianto reale si è pensato di affrontare il problema mettendo a punto un sistema di alimentazione alternativo a quello che prevede l'incremento graduale del carico in ingresso mediante aumenti della concentrazione di ammonio nell'influente. Il sistema alternativo prevede un'alimentazione continua mantenuta a concentrazioni di ammonio comprese tra 100 e 180 mg N-NH₄⁺L⁻¹, affiancata da un'alimentazione discontinua di ammonio (2950 mg N-NH₄⁺L⁻¹) e bicarbonato di sodio necessario per tamponare gli abbassamenti di pH legati al processo di ossidazione dell'ammonio. I due sistemi di alimentazione sono stati mantenuti attivi fino a quando il carico complessivo giornalmente rimosso dall'impianto non è risultato simile a quello che sarebbe stato immesso con un'alimentazione pari a 650 mg N-NH₄⁺L⁻¹ e portata di 60 L giorni⁻¹, cioè circa 39 g giorni⁻¹ di azoto come ione ammonio.

Il vantaggio ottenuto a seguito della messa a punto del sistema di auto-regolazione dell'alimentazione è legato alla minore probabilità che i sovraccarichi hanno di verificarsi con un'alimentazione direttamente dipendente dalla capacità nitrificante del sistema. Questo comporta un notevole risparmio di tempo e la possibilità di portare l'impianto a regime in tempi relativamente brevi, limitando al minimo l'effetto di numerosi problemi tecnici sull'evoluzione del processo. Improvvise perdite di efficienza del sistema (ad esempio svuotamenti parziali delle vasche di

processo e malfunzionamenti dei sistemi di areazione) comportano, infatti, la riduzione della produzione di protoni e conseguentemente la riduzione dell'afflusso sia di bicarbonato che di ammonio, impedendo il sovraccarico. La tecnica di start-up sperimentata può inoltre ricoprire un ruolo importante nella fase di recovery delle efficienze di processo limitando i periodi di blocco dell'impianto.

3.2 Funzionamento dell'impianto Side-Stream allo stato stazionario

Le condizioni operative, mantenute costanti successivamente all'avvio dello spurgo avvenuto il giorno 384, sono riportate in Tabella 3-1.

Tabella 3-1 -Condizioni operative impianto Side-Stream

Parametro	Valore	Unità
Portata di ingresso	60	L giorni ⁻¹
Concentrazione influente	650 ±20	mg N-NH ₄ ⁺ giorni ⁻¹
Portata di ricircolo	480	L giorni ⁻¹
Portata di spurgo	3	L giorni ⁻¹
SRT	20	giorni

Successivamente all'avvio dello spurgo, avvenuto il giorno 385 si è osservata una continua riduzione dei solidi totali presenti in impianto ed il raggiungimento dello stato stazionario intorno al giorno 444 (giorno in cui è stata attivata la bioaugmentation degli impianti della filiera Main-Stream) (Figura 3-4). Al raggiungimento dello stato stazionario, la concentrazione di solidi in vasca tende a stabilizzarsi su un valore medio di 2920 mg L⁻¹ e le concentrazioni di NH₄⁺, NO₂⁻ e NO₃⁻ indicano un corretto mantenimento della stazionarietà del processo, tranne nel caso di fenomeni di lieve intensità e breve durata caratterizzati da concentrazioni di nitriti superiori a 50 mg L⁻¹ (Figura 3-5).

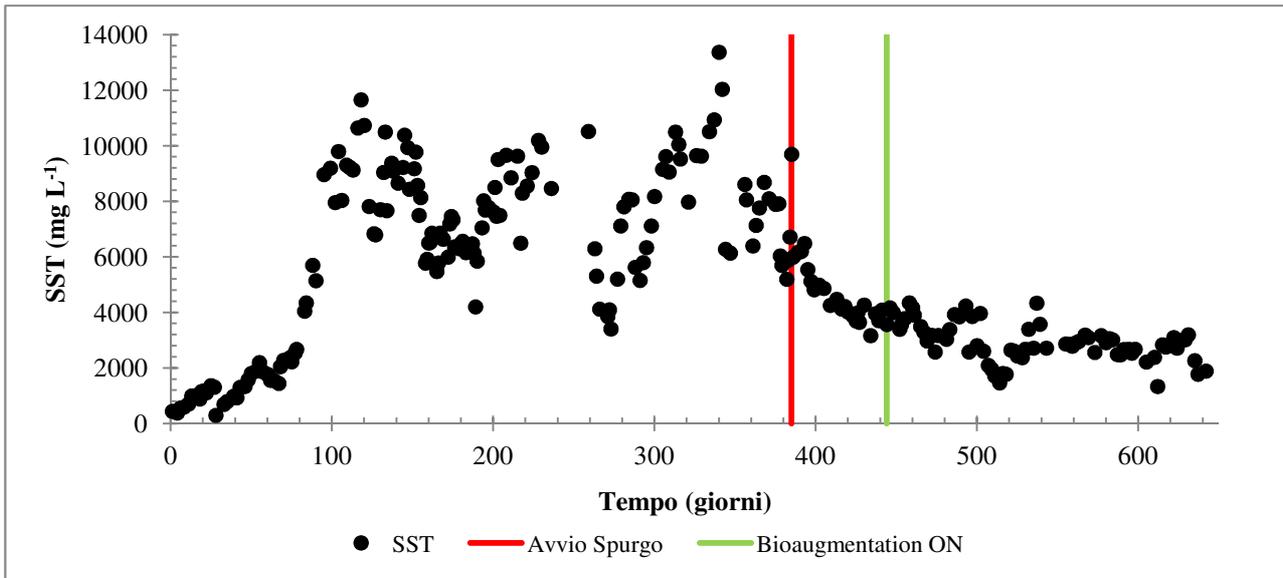


Figura 3-4 - SST vs Tempo

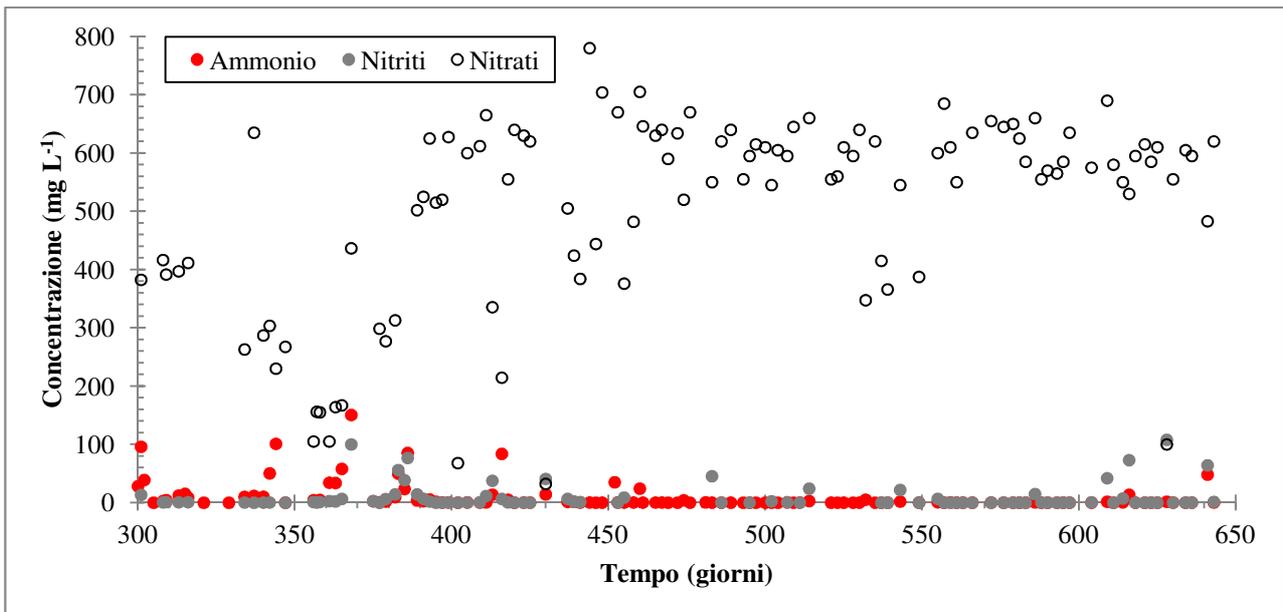


Figura 3-5 - Ammonio, Nitriti e Nitrati vs tempo

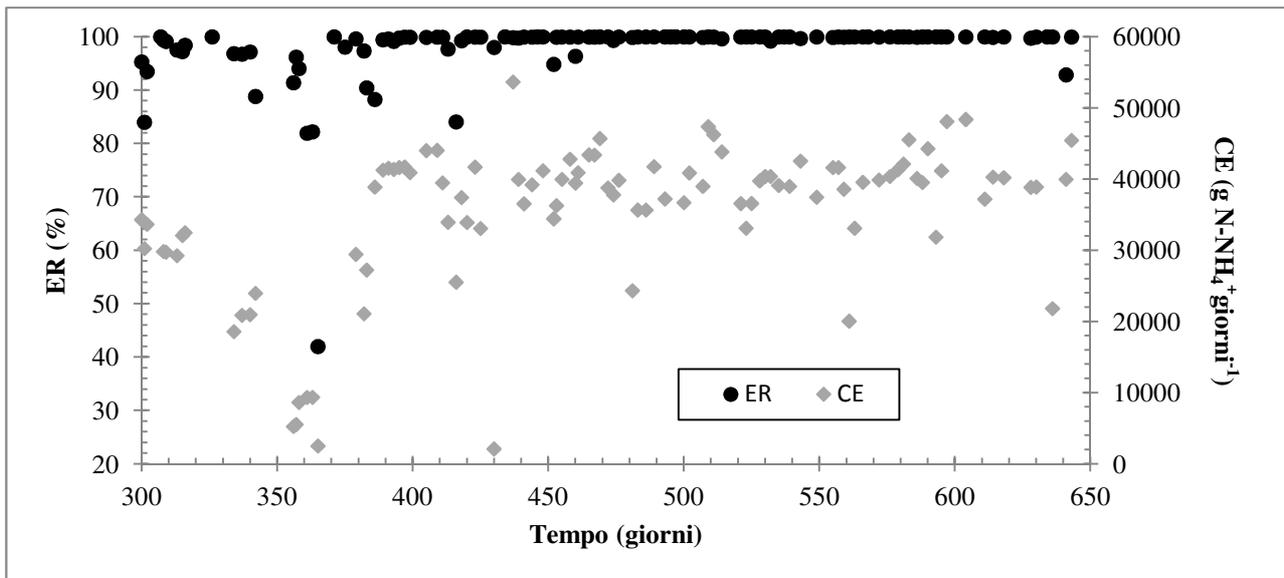


Figura 3-6 - Efficienza di rimozione e Capacità di Eliminazione dell'azoto ammoniacale

Dall'analisi del rendimento di rimozione dell'azoto ammoniacale riportato in Figura 3-6 emerge un processo sufficientemente regolare nel tempo, in grado di conseguire costantemente efficienze di rimozione dell'azoto ammoniacale superiori al 95%, pari ad una Capacità di Eliminazione (CE) media di 40 g di $N-NH_4^+$ al giorno che corrisponde ad una rimozione specifica circa pari a 0.8 g di $N-NH_4^+$ al giorno per litro di volume aerobico e circa a 15 mg di $N-NH_4^+$ per mg di SST al giorno.

I rari casi in cui si è verificata una significativa riduzione dell'efficienza di rimozione dell'ammonio sono tutti da ricondurre a malfunzionamenti occasionali del sistema:

- malfunzionamenti del controllo del pH. Abbassamenti incontrollati del pH causano un incremento delle concentrazioni di ammoniaca libera (FA) e conseguentemente degli effetti di inibizione sulla biomassa AOB.
- malfunzionamenti della sonda per l'ossigeno disciolto.
- Malfunzionamenti del sistema di aerazione

3.3 Funzionamento degli impianti Main-Stream allo stato stazionario

I dati riportati ed analizzati in questo paragrafo sono quelli raccolti durante l'intero periodo di funzionamento della filiera Main-Stream che, considerando il giorno "0" quello di avvio della filiera Side-Stream, sono stati avviati a partire dal giorno 224. Successivamente ad una fase iniziale di start-up, i due impianti sono stati fatti lavorare in parallelo, prevedendo per entrambi le stesse

condizioni operative di portata, età del fango, Ossigeno Disciolto e pH in vasca di nitrificazione. La gestione dell'età del fango, relativamente all'impianto CAS è risultata fin da subito complicata a causa di continui fenomeni di rising del fango presente nel sedimentatore e della conseguente perdita di biomassa con l'effluente. Il mantenimento di un'età del fango pari a 2,5 giorni per entrambi i reattori è stato possibile solo dal giorno 324, in seguito all'apporto di modifiche al sistema di raschiamento di fondo e di pulizia superficiale del sedimentatore.

Diversamente da quanto previsto relativamente alla filiera Side-Stream, l'andamento dell'ALR, nel tempo risulta fortemente dipendente dalle variazioni qualitative del refluo civile in ingresso all'impianto Cuoiodepur. L'alimentazione dei due Main-Stream, anche se mantenuta sufficientemente omogenea per quello che riguarda la portata, risente quindi degli effetti di diluizione legati ad eventi piovosi, anche di notevole intensità e durata, che si sono verificati nel corso della sperimentazione.

Come previsto, un altro aspetto ambientale quale la Temperatura ha influito notevolmente sulle efficienze di nitrificazione. E' evidente come a seguito del termine della stagione estiva ed il conseguente graduale abbassamento delle temperature si osservi una progressiva perdita di efficienza del processo. In Figura 3-7 sono riportati gli andamenti nel tempo dell'ALR e della ER registrati relativamente agli impianti CAS ed MBR ed è evidente come la rimozione percentuale dell'ammonio in ingresso all'impianto, subisca un continuo abbassamento a partire dal giorno 349 (14 Settembre).

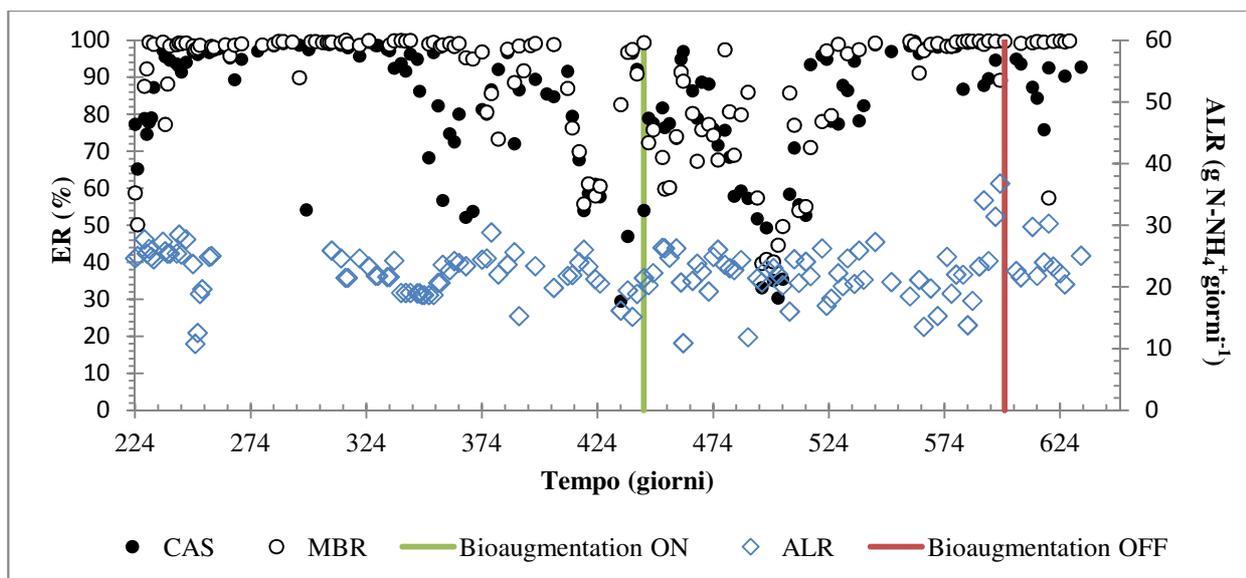


Figura 3-7 -Andamento nel tempo di ALR e dell'Efficienza di Rimozione dell'ammonio

Una valutazione più accurata dell'andamento della rimozione all'interno dell'impianto CAS e MBR in cui si evidenzia la relazione con la Temperatura è possibile facendo riferimento alle Figure 3-8 e 3-9.

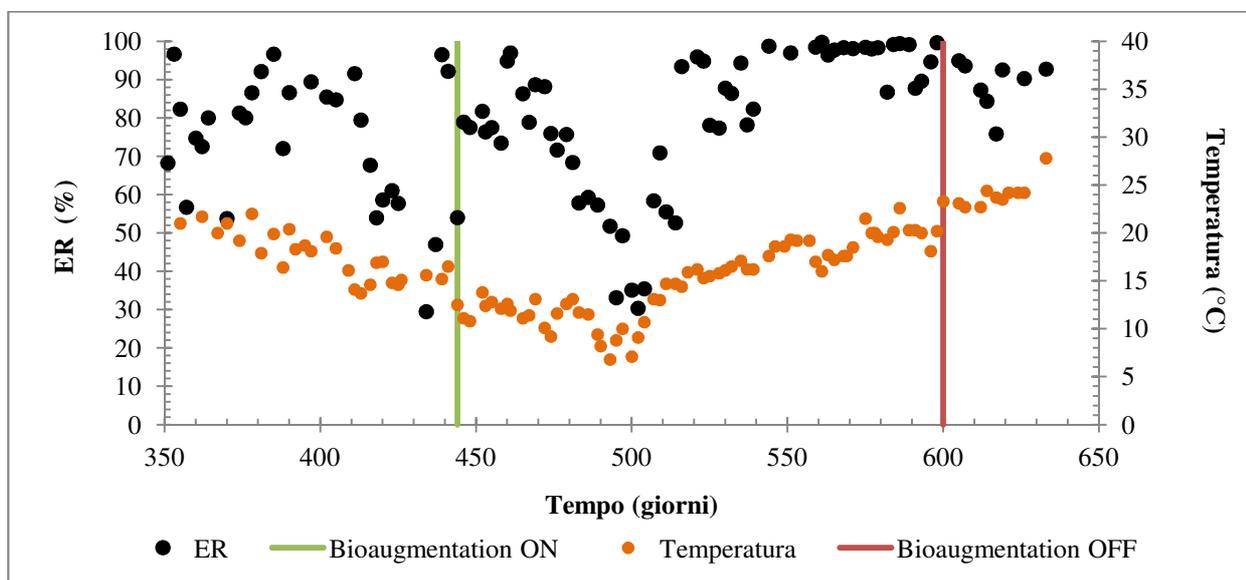


Figura 3-8 - CAS: Andamento nel tempo dell'Efficienza di Rimozione dell'ammonio

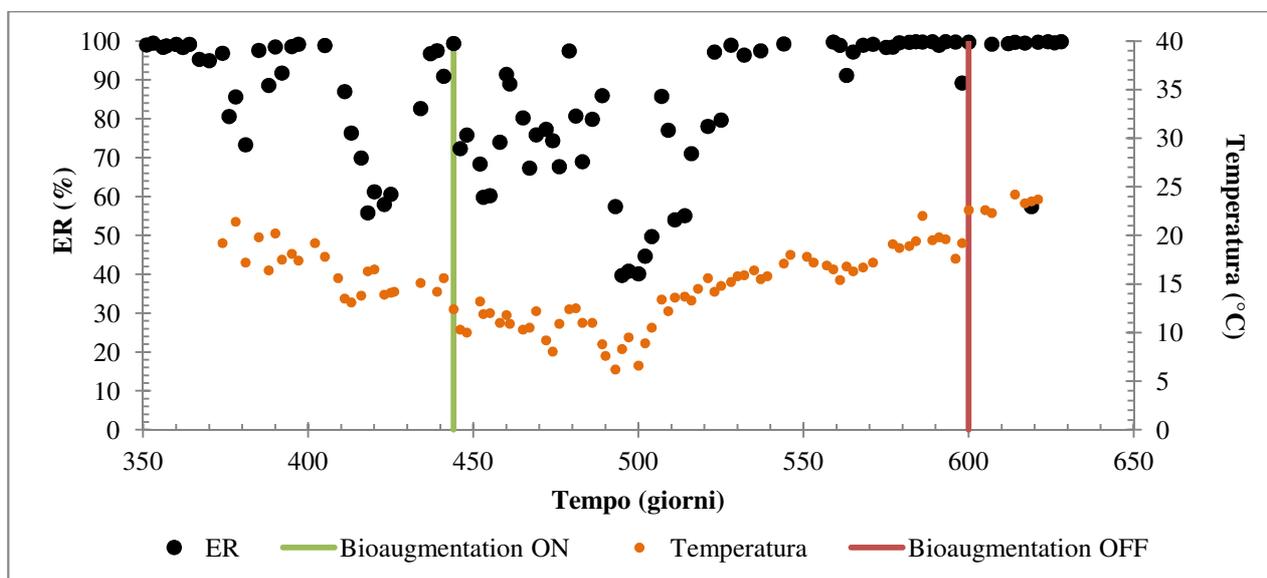


Figura 3-9 - MBR: Andamento nel tempo dell'Efficienza di Rimozione del substrato azotato

Un primo aspetto da considerare è che, nonostante la SRT sia mantenuta a circa 2.5 d, molto inferiore ai valori riportati in letteratura (4-7 d per $T = 20^{\circ}\text{C}$ o anche 10-20 d a $T = 10^{\circ}\text{C}$ (Metcalf and Eddy, 2006)), in riferimento al periodo di assenza di bioaugmentation, nei due impianti vengono raggiunte ER prossime al 75%. Il mancato raggiungimento di ER prossime al 100% è, tuttavia, un

fatto voluto. In tali condizioni, infatti, è più facile poter valutare un eventuale incremento delle capacità nitrificanti del sistema dovuto all'innesco del processo di bioaugmentation.

Confrontando i rendimenti depurativi dei due impianti della filiera Side-Stream in funzione della temperatura è evidente come l'MBR risponda con circa 30 giorni di ritardo all'abbassamento di temperatura rispetto all'impianto CAS, sottolineando la maggiore capacità dell'MBR nel mantenere la stabilità del processo al variare delle condizioni operative.

La maggiore stabilità della nitrificazione è legata al maggiore controllo delle condizioni processo, in particolare sul controllo della concentrazione di solidi nelle vasche, e quindi sulla SRT, garantito dalla presenza delle membrane.

Dall'analisi comparata dei rendimenti dei due impianti pilota testati emerge come, anche se con tempi diversi, il progressivo abbassamento della temperatura, a parità di altre condizioni (età del fango, ossigeno disciolto, pH), all'inizio della stagione invernale comporti una progressiva riduzione delle efficienze della nitrificazione, causando, dal punto di vista dell'applicazione della bioaugmentation le condizioni migliori per la valutazione degli effetti legati all'avvio del tale processo: nitrificazione incompleta, accumulo limitato di nitriti Figure 3-10 e 3-11.

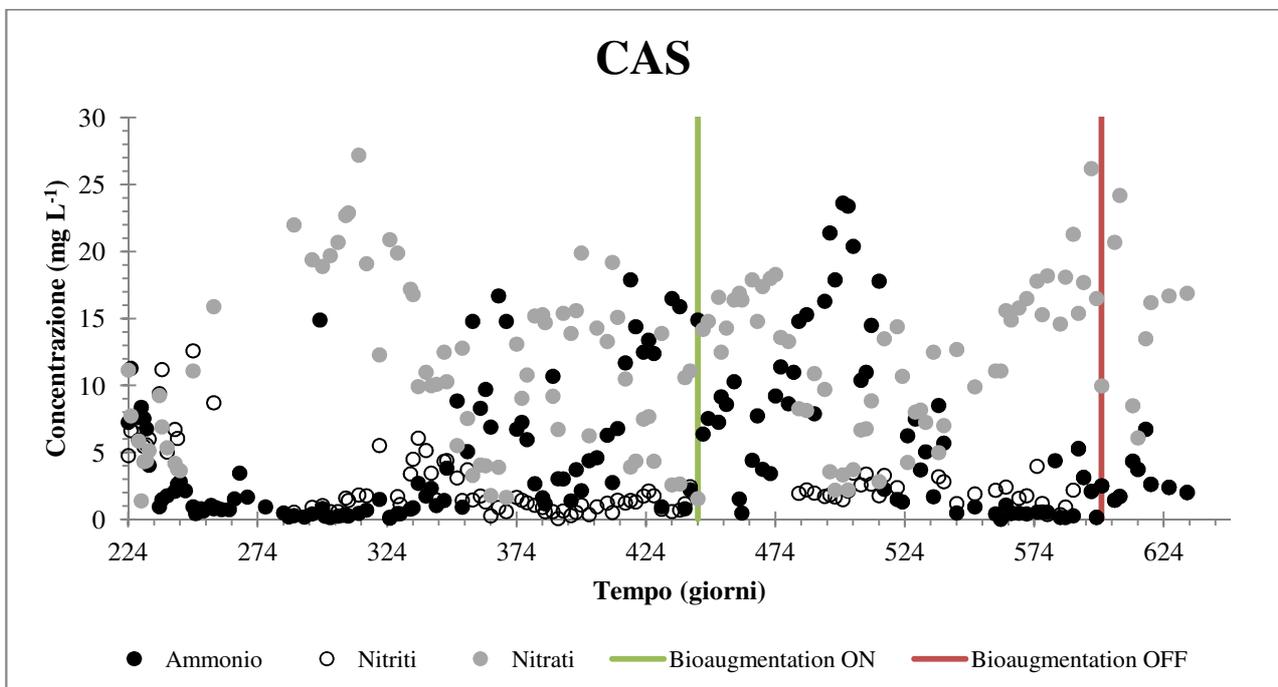


Figura 3-10 - CAS: Ammonio, Nitriti e Nitrati vs Tempo

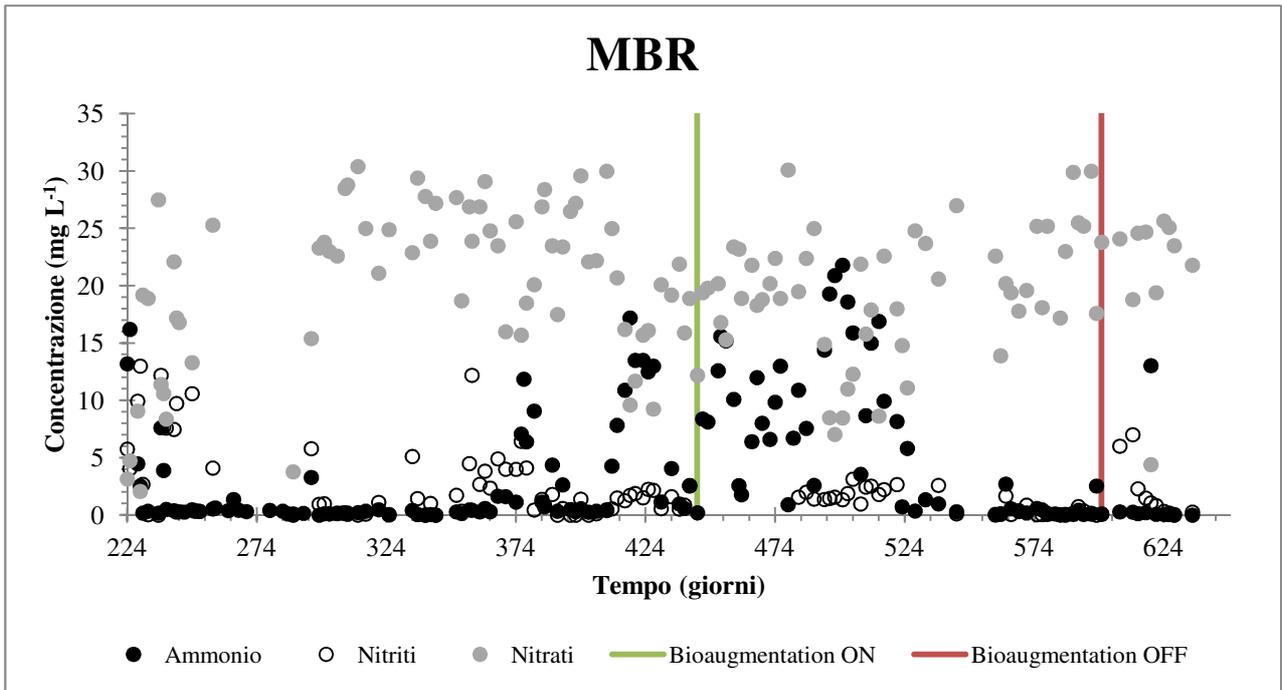


Figura 3-11 - MBR: Ammonio, Nitriti e Nitrati vs Tempo

Un ulteriore parametro il cui controllo risulta fondamentale per la verifica del funzionamento e del mantenimento dello stato stazionario degli impianti Main-Stream è la concentrazione dei Solidi Sospesi Totali. Questo è particolarmente importante per quanto riguarda il sistema CAS (Figura 3-12), dove il contenuto di solidi è fortemente influenzato da eventuali problemi del comparto di sedimentazione, come ad esempio l'instaurarsi di fenomeni di rising.

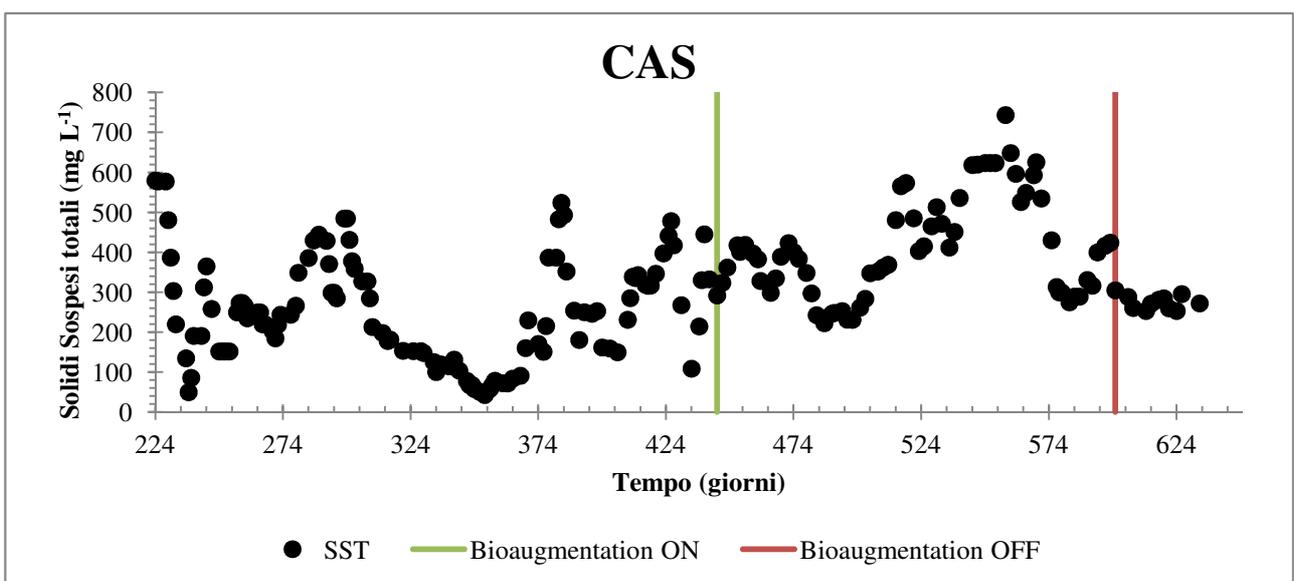


Figura 3-12 - CAS: SST vs tempo

Per quanto riguarda i SST presenti all'interno del comparto biologico dell'impianto MBR (Figura 3-13) è evidente un andamento molto più omogeneo rispetto a quello presentato dall'impianto CAS grazie al maggiore controllo sui flussi di massa in uscita dall'impianto garantito dalla separazione attraverso membrane, e conseguentemente alla maggiore stabilità dell'età del fango (Figura 3-14).

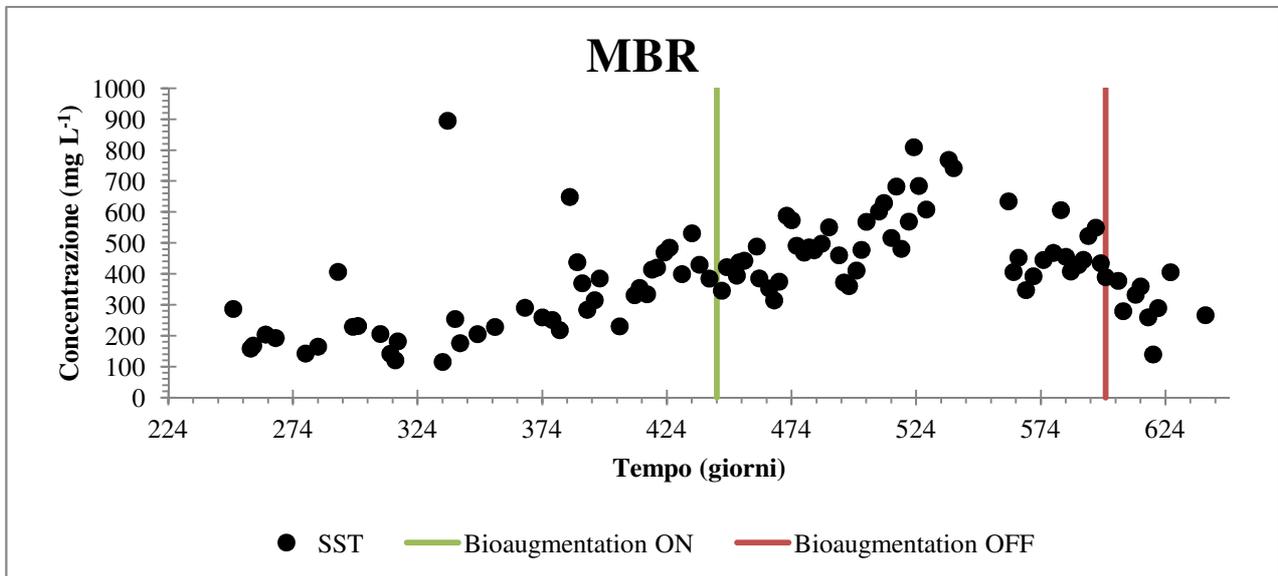


Figura 3-13 -MBR: SST vs tempo

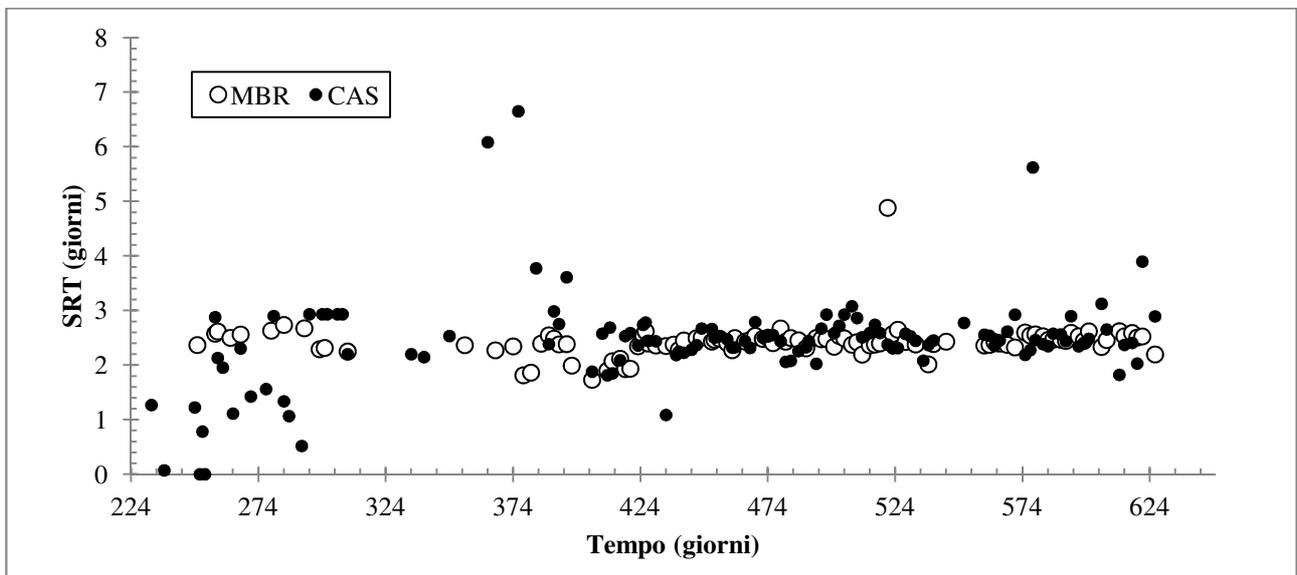


Figura 3-14 -SRT vs Tempo

3.4 Effetto del bioarricchimento sull'efficienza del processo di nitrificazione

In questo paragrafo verranno analizzati nel dettaglio gli effetti introdotti dal processo di bioarricchimento sui due impianti Main-Stream. Per fare questo è utile riprendere in considerazione l'andamento della ER dell'azoto ammoniacale, andando però a diversificare i dati in base alla presenza o meno del processo di bio-arricchimento e facendo riferimento al periodo in cui sono evidenti gli effetti della temperatura sull'efficienza del processo di nitrificazione.

In Figura 3-15 è riportato l'andamento della rimozione percentuale di ammonio (ER) nel CAS durante l'intera sperimentazione.

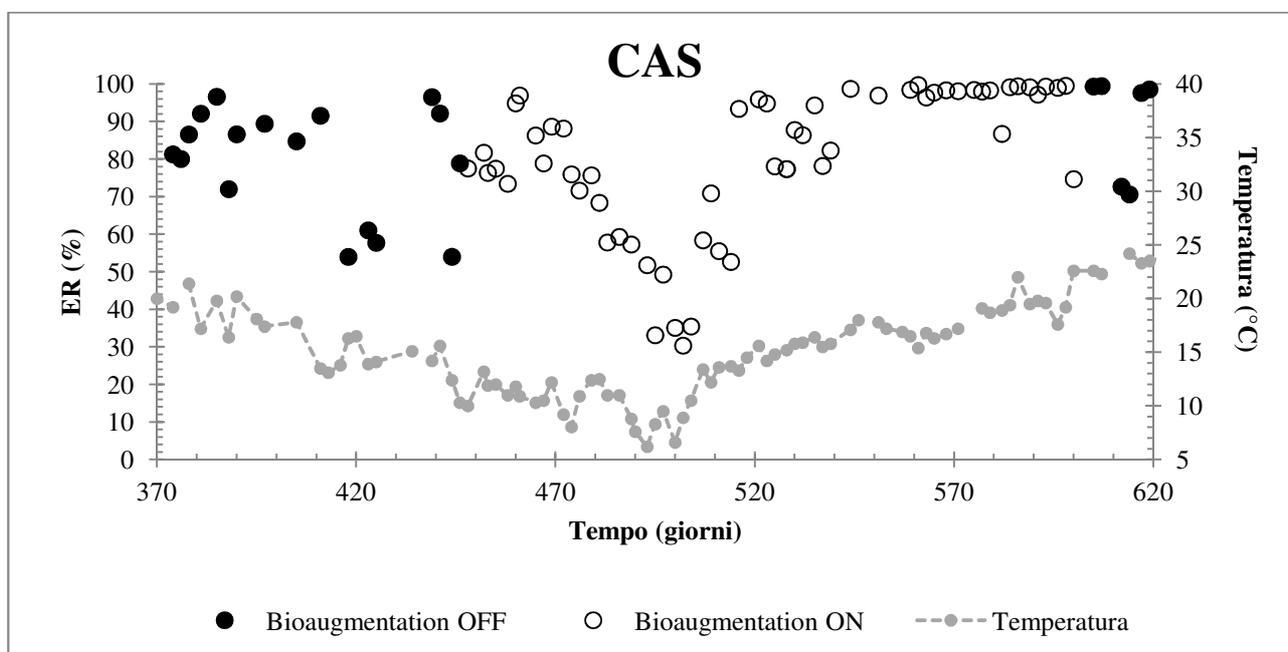


Figura 3-15 - CAS: Efficienza di rimozione dell'Ammonio vs tempo

Un primo effetto che è possibile sottolineare è un incremento dell'attività nitrificante durante la prima fase di bioarricchimento (tra il giorno 444 e il giorno 469). Nei 30 giorni precedenti l'avvio della bioaugmentation il sistema è stato in grado di rimuovere mediamente il 63% dell'ammonio in ingresso ad una temperatura media di 15°C. Durante la prima sessione di arricchimento, fino al giorno 480 si riesce a conseguire un rendimento percentuale stabilmente superiore al 72% con una media di ER pari al 78%, nonostante la continua diminuzione della temperatura (valore medio = 12°C) ed il raggiungimento di picchi minimi prossimi agli 8°C. L'efficienza media del processo (46%) si riduce drasticamente nel periodo tra il giorno 489 e il giorno 502 durante il quale le

temperature rimangono costantemente al di sotto di 9°C con valori minimi prossimi ai 6°C. Nel corso dell'ultima fase del processo di bioaugmentation (dal giorno 550), con una temperatura media di 19 °C) si ottiene una rimozione media dell'azoto ammoniacale del 97%, superiore a quella registrata a parità di temperatura in assenza di bioaugmentation, dal giorno 370 al giorno 410 (85.5 %).

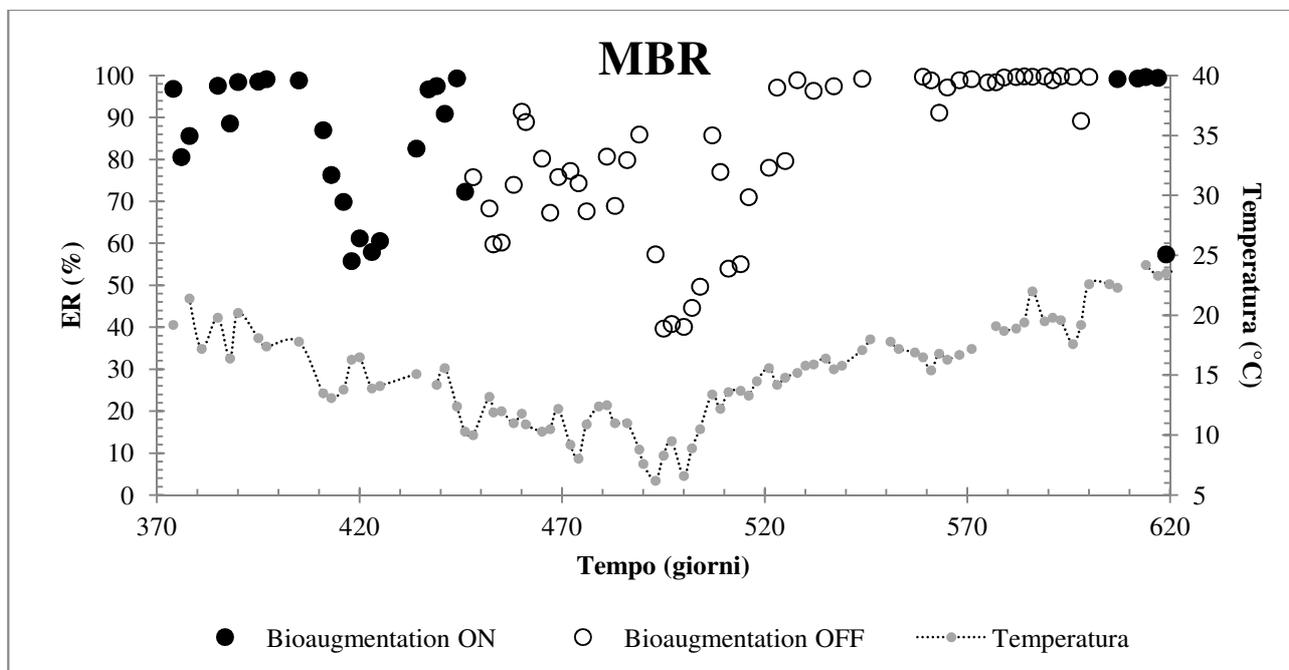


Figura 3-16 - MBR: Efficienza di rimozione dell'Ammonio vs tempo

Considerazioni simili a quelle fatte per l'impianto CAS possono essere fatte anche per quello che riguarda l'impianto MBR (Figura 3-16), anche se in questo caso l'incremento dell'attività introdotto dal bio-arricchimento risulta meno evidente nei giorni immediatamente successivi all'avvio dell'inoculo di biomassa proveniente dalla filiera Side-Stream a causa del maggiore rendimento di rimozione nell'impianto MBR durante la fase non arricchita. La presenza di bioaugmentation permette, dal giorno 444 al giorno 480 il raggiungimento di una ER media del 74%, valore in linea con quello ottenuto nel corso dei 30 giorni antecedenti all'avvio del processo anche se ottenuto con temperature mediamente pari a 11°C, 3.5°C inferiori rispetto a quelle verificate tra il giorno 410 ed il giorno 450.

Durante il periodo in cui si verificano le temperature minime (dal giorno 489 al giorno 502) l'ER ottenuta nell'impianto MBR è mediamente pari al 53,6%. Facendo riferimento al periodo compreso tra il giorno 550 ed il giorno 600, caratterizzato da temperature medie (18.5°C) analoghe a quelle misurate prima dell'avvio della bioaugmentation (giorno 370 – 410), si ottiene una ER del 98%.

Indipendentemente dal periodo di riferimento, in Figura 3-17 e 3-18 è riportata l'Efficienza di Rimozione dell'azoto ammoniacale in funzione della temperatura registrata in vasca di nitrificazione rispettivamente per l'impianto CAS e MBR.

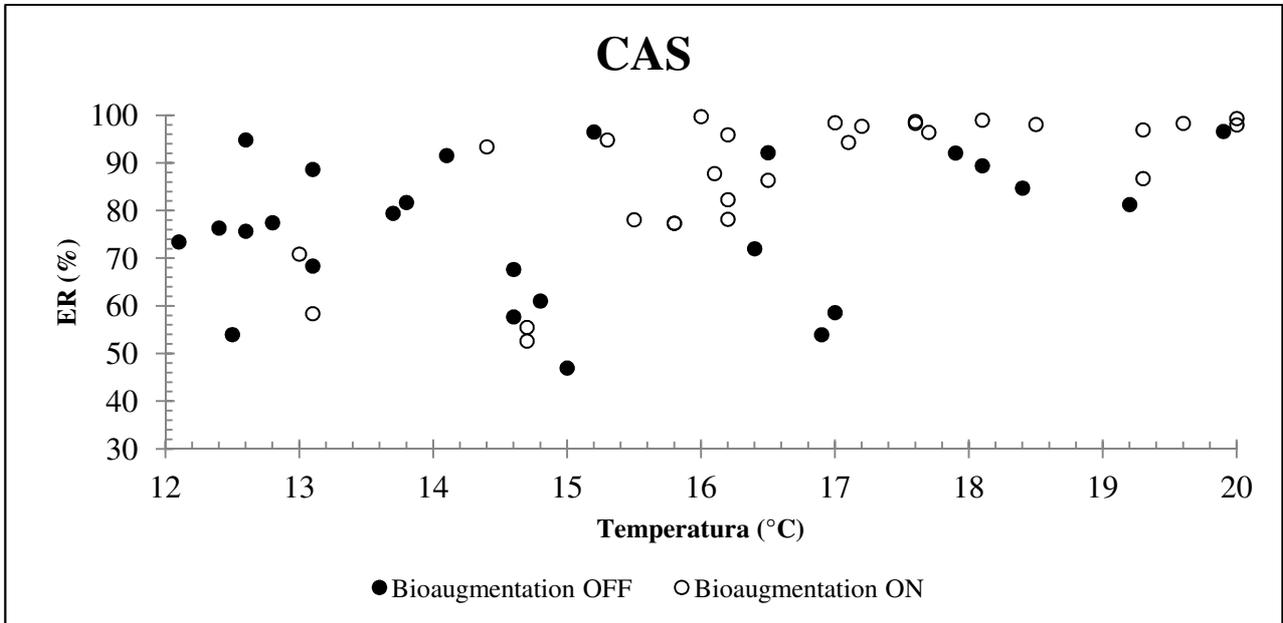


Figura 3-17 - CAS: Efficienza di Rimozione dell'ammonio vs Temperatura

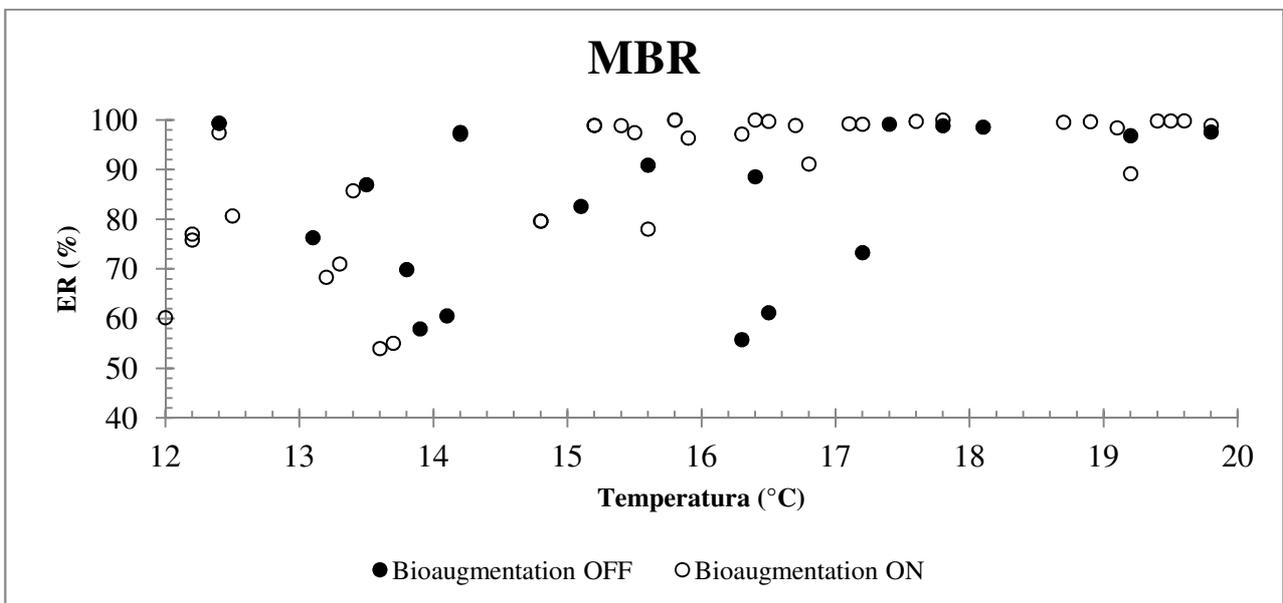


Figura 3-18 - MBR: Efficienza di Rimozione dell'ammonio vs temperatura

Dall'analisi dei grafici riportati in Figura 3-17 e 3-18 emerge come complessivamente la presenza dell'inoculo continuo di biomassa nitrificante dalla filiera Side-Stream agli impianti delle filiera

Main-Stream comporti un incremento dell'attività nitrificante. Allo scopo di quantificare l'impatto della bioaugmentation, l'intero range di temperatura è stato suddiviso in tre intervalli (da 12 a 15°C, da 15 a 17°C e da 17 a 20°C) per ognuno dei quali l'effetto della presenza di bioarricchimento (ΔER) è determinato come differenza tra l'efficienza di rimozione media in presenza ed in assenza di bioaugmentation.

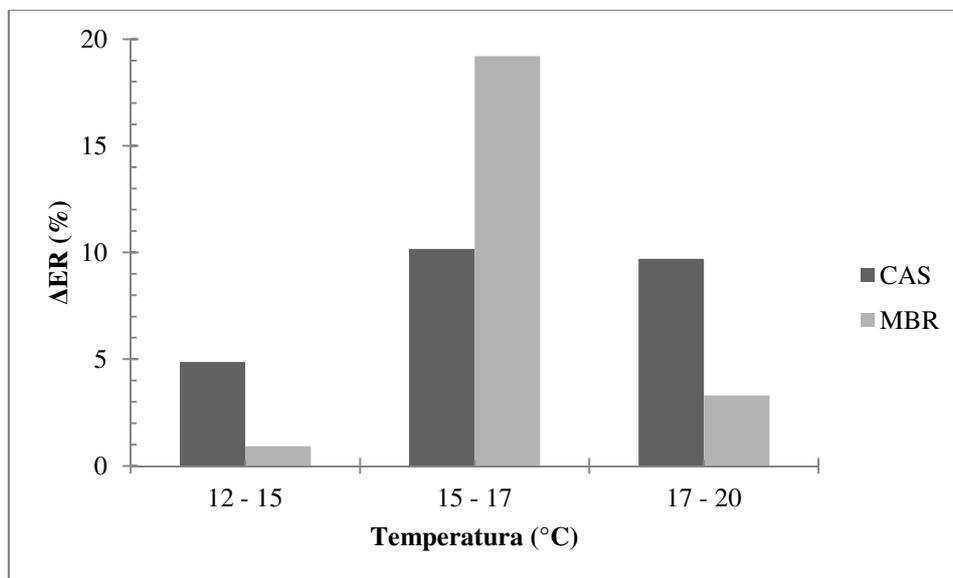


Figura 3-19 -Effetto della bioaugmentation sul processo di nitrificazione in funzione dalla differenza di temperatura tra l'impianto Side-Stream e gli impianti Main-Stream

In presenza di elevate temperature (superiori a 17°C) l'efficienza di rimozione dei sistemi testati, anche in assenza di bioarricchimento risulta sempre superiore all'80% e al 90% rispettivamente per il CAS e per l'MBR. Il verificarsi di elevate ER fa sì che la presenza del bioarricchimento non comporti vantaggi significativi ulteriori in termini di efficienza di processo, soprattutto per quanto riguarda l'impianto MBR. Per temperature comprese tra 12 e 15 °C, l'incremento medio di efficienza risulta del 5% e dell'1% rispettivamente per il CAS e per l'MBR. Il motivo alla base della limitata attività della biomassa nitrificante proveniente dalla filiera Side-Stream nei sistemi riceventi è probabilmente legata allo shock termico che la biomassa stessa subisce passando quasi istantaneamente da un sistema che si trova costantemente alla temperatura di 20°C ad un sistema in cui la temperatura è di 5-8 °C inferiore. L'effetto del rapido abbassamento della temperatura sulle cinetiche batteriche è stato valutato mediante l'esecuzione di test titrimetrici in continuo i cui risultati sono riportati nel paragrafo 3.8.

In entrambi i sistemi testati, la massima efficacia della bioaugmentation è stata ottenuta per temperature del mixed liquor comprese tra 15 e 17°C: 11% nell'impianto MBR e 19% nell'impianto CAS.

3.5 Test cinetici batch

La rimozione biologica dell'ammonio è fortemente sensibile a diversi fattori ambientali ed operativi (pH, temperatura, concentrazione di substrato, età del fango) al variare dei quali la biomassa nitrificante risulta caratterizzata da diversi comportamenti cinetici rendendo possibile la selezione di diverse comunità di batteri nitrificanti in sistemi caratterizzati da diverse condizioni operative.

La conoscenza delle cinetiche batteriche risulta un fattore chiave per la definizione e l'ottimizzazione di modelli matematici in grado di descrivere il processo di nitrificazione e per la comprensione del processo stesso in particolari condizioni come quella che prevede la presenza di bio-augmentation tra sistemi caratterizzati da condizioni operative fortemente diverse.

Lo scopo dei test è quello di valutare, dal punto di vista cinetico, la diversità tra la biomassa nitrificante selezionata all'interno della filiera Side-Stream e quella selezionata all'interno dell'impianto MBR della filiera Main-Stream. Durante il periodo dei test l'impianto MBR della filiera Side-Stream (MBR1) è stato alimentato con refluo sintetico assimilabile al surnatante del processo di digestione anaerobica di fanghi biologici ($\text{COD} = 300 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{N-NH}_4^+ = 650 \text{ mg L}^{-1}$) mentre l'impianto della filiera Main-Stream (MBR2) con il refluo domestico in ingresso all'impianto Cuoiodepur ($\text{COD} = 325 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{N-NH}_4^+ = 32 \text{ mg L}^{-1}$).

Per l'esecuzione dei test, campioni prelevati dalle vasche di nitrificazione dei due impianti, sono stati mantenuti agitati ed areati fino al raggiungimento delle condizioni endogene evidenziate dall'assenza di ammonio e nitrito. Questa fase, così come il test di degradazione del substrato azotato, è stata effettuata in condizioni di pH e temperatura analoghe a quelle presenti all'interno delle vasche di processo allo scopo di evitare fenomeni di shock che avrebbero potuto interferire con le cinetiche batteriche presenti normalmente nelle vasche degli impianti pilota. Date le basse concentrazioni di azoto ammoniacale presenti in vasca al momento dei campionamenti, il raggiungimento delle condizioni endogene è stato ottenuto, in ogni caso, in tempi sufficientemente ridotti da non causare variazioni significative della temperatura rispetto a quella presente all'interno degli impianti. Nel corso di ogni singolo test, la temperatura ha subito variazioni sempre inferiori a $1,2^\circ\text{C}$.

I test sono stati effettuati utilizzando contenitori in Pirex del volume di 1L, un sistema di areazione a bolle fini, una sonda DO e un sensore multiparametrico per il controllo di pH e temperatura. All'inizio di ogni test, è stato effettuato un dosaggio di una soluzione di NH_4Cl allo scopo di ottenere una concentrazione non limitante e non inibente di ammonio all'interno dei reattori contenenti il mixed liquor. Analisi spettrofotometriche per la determinazione della concentrazione di ammonio sono state effettuate ad intervalli regolari nel corso del test.

Nel corso della sperimentazione sono stati effettuati quattro test sul fango prelevato da MBR1 e quattro sul fango MBR2 in presenza di bio-augmentation. Ogni test è stato ripetuto per tre volte.

Il modello ASMN, descritto nel paragrafo 2.5.2, è stato applicato allo scopo di descrivere l'andamento nel tempo dell'ammonio presente all'interno dei reattori e stimare i parametri cinetici di interesse (il rateo massimo specifico di crescita della biomassa ammonio ossidante e la costante di semi-saturazione per l'ammonio) previa stima della concentrazione di biomassa attiva all'interno del mixed liquor al momento dell'esecuzione del test e assunzione del rateo di decadimento endogeno della biomassa AOB pari a 0.17 d^{-1} (Jubani et al., 2008). La concentrazione di biomassa AOB è stata stimata sulla base dei risultati del monitoraggio dei parametri di interesse (ammonio, nitriti, nitrati, solidi sospesi totali, COD effluente) all'interno delle vasche di processo degli impianti pilota.

In Figura 3-20 è riportato a titolo esemplificativo l'andamento nel tempo dell'ammonio sperimentale ed il risultato della modellizzazione del processo di nitrificazione di uno dei test effettuati (a) sulla biomassa dell'impianto MBR1 e (b) su quella dell'impianto MBR2 in presenza di bioarricchimento.

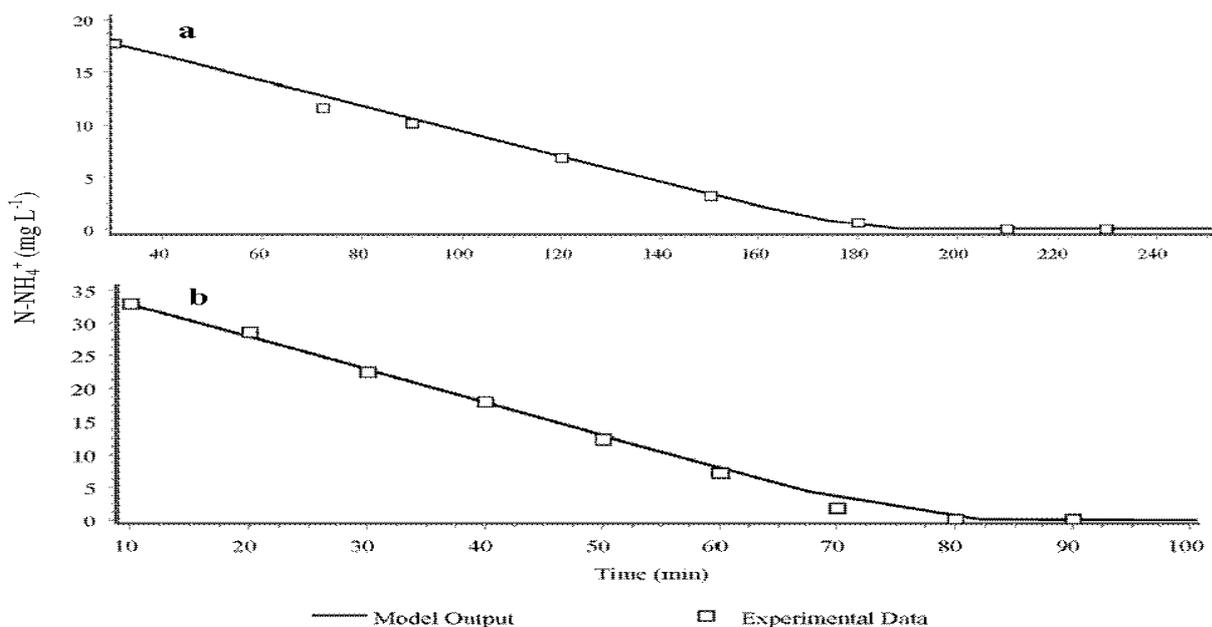


Figura 3-20 - Test cinetici batch: Dati sperimentali e output del modello

I test sulla biomassa dell'impianto MBR2 sono stati replicati, a partire dal ventiquattresimo giorno successivo allo stop del processo di bio-arricchimento allo scopo evidenziare eventuali variazioni del comportamento cinetico della biomassa legati alla presenza dell'inoculo in continuo dall'impianto MBR1. In Tabella 3-2 sono riportati i risultati della calibrazione di μ_{max} e K_{NH} a 20°C relativi all'impianto MBR1 e all'impianto MBR2 in presenza ed in assenza di bioarricchimento.

Tabella 3-2 -Parametri cinetici della biomassa nitrificante a 20 °C

Parametro	Unità	MBR1		MBR2		MBR2	
		(Side-Stream)		(Main-Stream)		(Main-Stream)	
		Media (n=4)	Dev. Std.	Bioaugmentation ON		Bioaugmentation OFF	
		Media (n=4)	Dev. Std.	Media (n=4)	Dev. Std.	Media (n=4)	Dev. Std.
$K_{NH_4^+}$	mg L ⁻¹	0.8	0.28	0.4	0.14	0.39	0.24
$\mu_{AOB,max}$	d ⁻¹	0.95	0.025	0.85	0.015	0.84	0.019

Sulla base dei risultati della calibrazione possono essere fatte due diverse considerazioni:

- La bio-augmentation non comporta, dal punto di vista cinetico, un cambiamento della biomassa presente all'interno della filiera Main-Stream ed eventuali incrementi di attività

nitrificante all'interno dei reattori Main-Stream sono da imputare all'azione di biomassa nitrificante avente le stesse caratteristiche cinetiche di quella presente prima dell'avvio del bioarricchimento.

- Si è verificata una selezione di due biomasse diverse all'interno del sistema Main-Stream e del sistema Side-Stream. La biomassa selezionata all'interno del reattore MBR1 risulta infatti caratterizzata da maggiori ratei massimi specifici di crescita, valori maggiori della costante di semi-staurazione e maggiori ratei specifici di ossidazione dell'ammonio rispetto a quella selezionata all'interno di MBR2, $3,67 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ mg}_-1 \text{ X}_{\text{AOB}} \text{ d}^{-1}$ e $2,92 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ mg}_-1 \text{ X}_{\text{AOB}} \text{ d}^{-1}$, rispettivamente.

Nonostante la necessità di prevedere un'indagine più approfondita degli effetti che rapidi cambi di determinate condizioni operative (ad esempio la temperatura) dovuti al passaggio di biomassa tra due sistemi diversi possano avere sul processo di nitrificazione, i test forniscono risultati fondamentali per la modellazione dell'efficienza di rimozione dell'ammonio del sistema complessivo composto da una filiera di trattamento Side-Stream alimentata con refluo ad elevate concentrazioni di ammonio e da una filiera Main-Stream, bioarricchita con biomassa nitrificante proveniente dalla filiera Side-Stream, alimentata con reflui domestici.

3.6 Test Microbiologici

3.6.1 Determinazione del numero di Unità Tassonomiche Operazionali (OTU)

La prima parte dell'analisi microbiologica della biomassa presente nelle vasche di processo dei tre impianti pilota (MBR Side-Stream, MBR Main-Stream e CAS Main-Stream) è stata rivolta alla determinazione della diversità microbica, mediante la definizione del numero di OTU (OperationalTaxonomicUnits, Unità Tassonomiche Operazionali) presenti all'interno dei campioni di fango prelevati nel corso della prima parte della sperimentazione ovvero nel periodo in cui non è previsto l'inoculo di biomassa dalla filiera Side-Stream verso gli impianti CAS e MBR.

L'OTU costituisce una unità tassonomica determinata arbitrariamente in base a criteri diversi ma estremamente utile allo scopo di studiare la biodiversità di campioni ambientali. Nel caso in esame, per OTU si intende il singolo picco presente sull'elettroferogrammarisultato delle analisi T-RFLP (Figura 3-21).

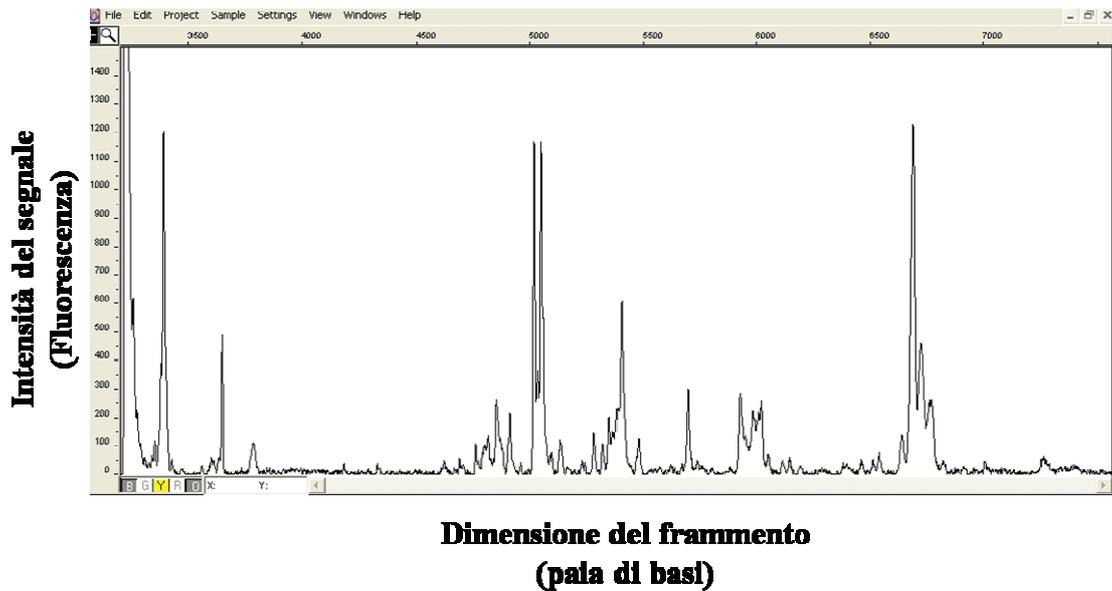


Figura 3-21 - Esempio di elettroferogramma ottenuto dall'analisi T-RFLP sul fango Side-Stream

Ogni OTU è quindi associata ad una lunghezza del frammento terminale di restrizione ben precisa ed è espressa in paia di basi. Per ogni reattore, la definizione del numero di OTU è stata effettuata facendo riferimento a due enzimi di restrizione utilizzati nel corso della sperimentazione: *AluI* e *BsuRI*.

In Figura 3-22, 3-23 e 3-24 sono riportati i numeri di OTU per i campioni degli impianti Side Stream, CAS e MBR determinati per ogni singolo campione analizzato, identificato con la data in cui è stato effettuato il campionamento.

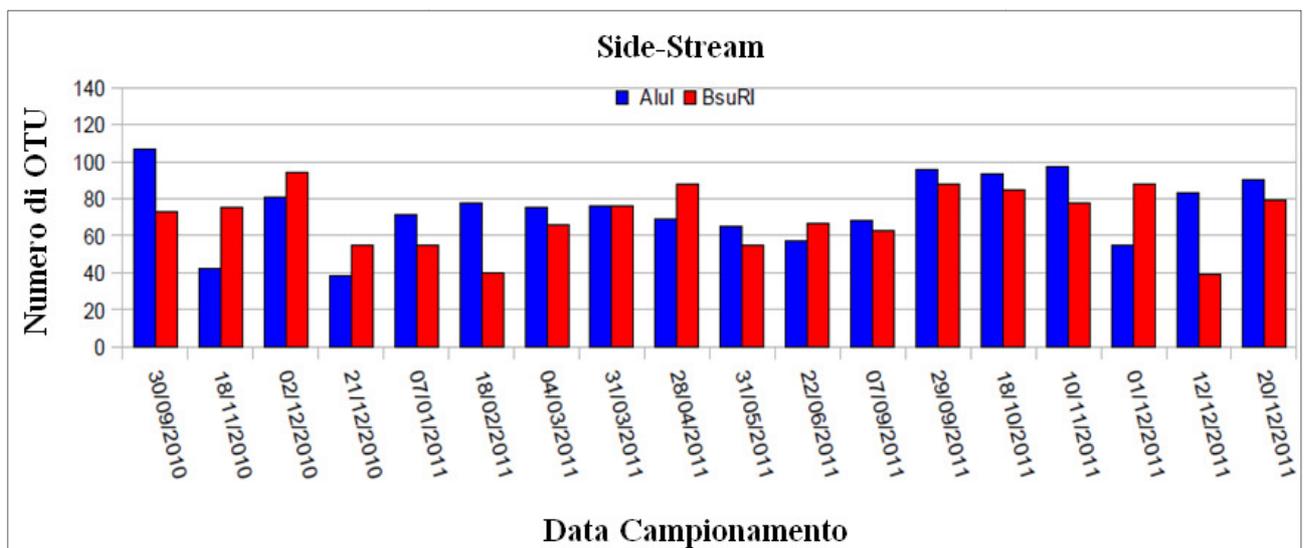


Figura 3-22- Side-Stream: Numero di OTU determinato con enzima di restrizione AluI (blu) e BsuRI (rosso)

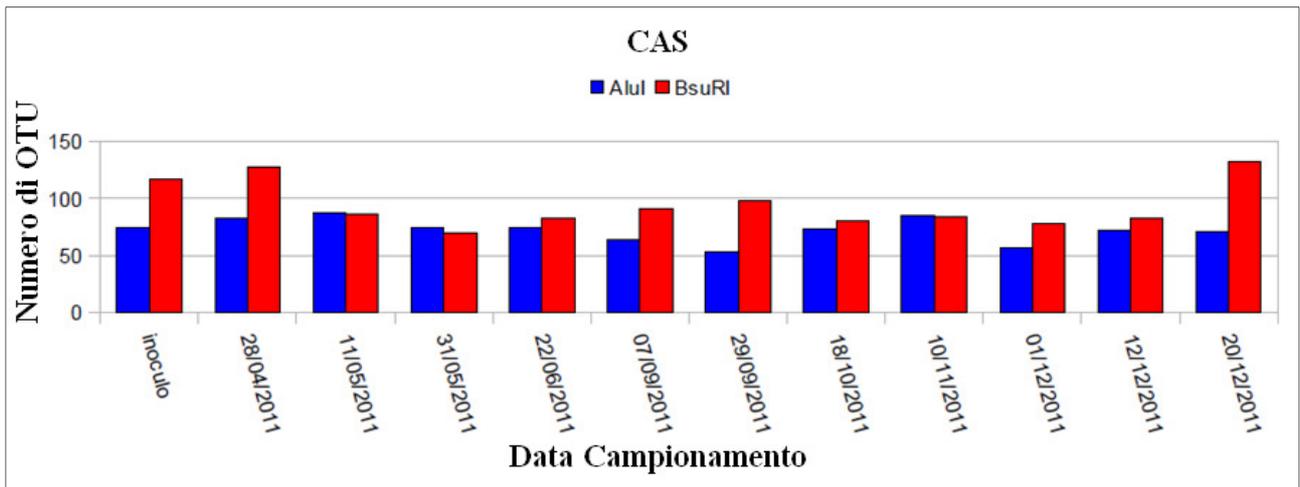


Figura 3-23 -CAS: Numero di OTU determinato con enzima di restrizione AluI (blu) e BsuRI (rosso)

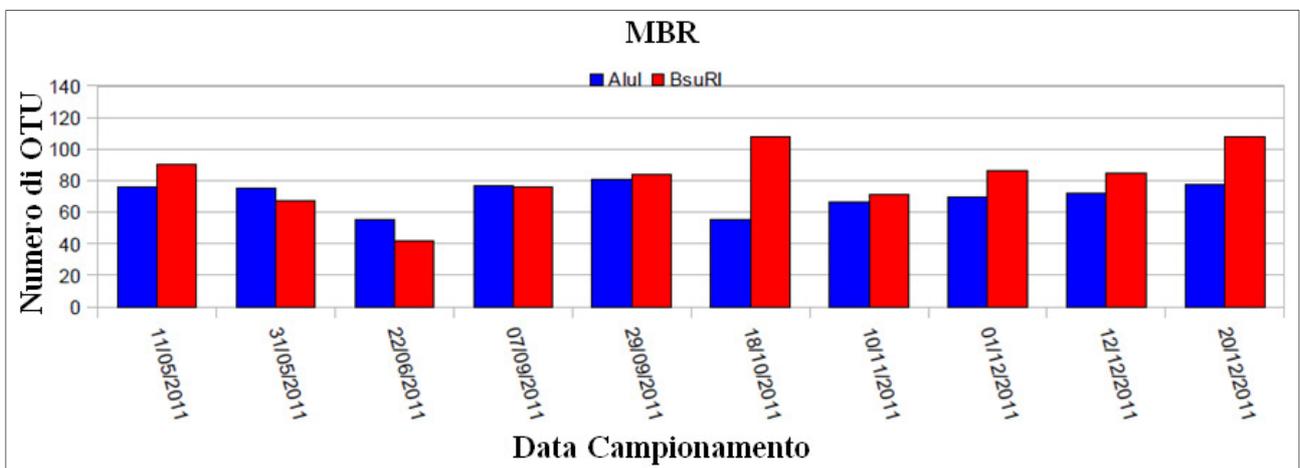


Figura 3-24 -MBR: Numero di OTU determinato con enzima di restrizione AluI (blu) e BsuRI (rosso)

Reattore MBR Side-Stream:

- L' enzima AluI ha individuato un range che va da un minimo di 38 OTU del campione 21/12/10 ad un massimo di 107 OTU del campione 30/09/10;
- L' enzima BsuRI ha individuato un range che va da un minimo di 39 OTU del campione 12/12/11 ad un massimo di 94 OTU del campione 02/12/10.

Reattore CAS Main-Stream:

- L' enzima AluI ha individuato un range che va da un minimo di 53 OTU del campione 29/09/11 ad un massimo di 88 OTU del campione 11/05/11;

· L' enzima BsuRI ha individuato un range che va da un minimo di 70 OTU del campione 31/05/11 ad un massimo di 132 OTU del campione 20/12/11.

Reattore MBR Main-Stream:

· L' enzima AluI ha individuato un range che va da un minimo di 55 OTU nei campioni del 22/06/11 e del 18/10/11 ad un massimo di 81 OTU del campione 29/09/11;

· L' enzima BsuRI ha individuato un range che va da un minimo di 42 OTU del campione 22/06/11 ad un massimo di 108 OTU nei campioni del 18/10/11 e del 20/12/11.

A causa della specifica sequenza di basi, diversa per ogni enzima di restrizione, che viene riconosciuta ed in corrispondenza della quale il frammento di DNA viene tagliato, i due enzimi di restrizione utilizzati discriminano OTU diverse. Considerando gli impianti della filiera Main-Stream si nota che il numero di OTU individuate dall'enzima BsuRI è maggiore di quello ottenuto con l'enzima AluI: nell'impianto CAS sono state discriminate 1130 OTU da BsuRI e 868 da AluI, nell'impianto MBR 817 da BsuRI e 705 da AluI.

3.6.2 Definizione del grado di diversità microbica

Il grado di diversità microbica dei diversi campioni analizzati è stato valutato mediante l'utilizzo di indici specifici di diversità: Indice di Shannon-Wiener, Indice di Simpson, Indice di Evenness.

Indice di Shannon-Wiener:

$$H_i = -\sum_i p_i \log_2(p_i)$$

In cui p_i è il rapporto tra il numero di individui di una specie "i" e il numero totale di individui.

L'indice di Shannon-Wiener è utilizzato allo scopo di valutare l'equità della ripartizione delle OTU all'interno dello stesso campione, ossia l'incidenza quantitativa delle diverse OTU nell'ambito del campione analizzato, che risulta tanto maggiore quanto più alto è il valore di H_i .

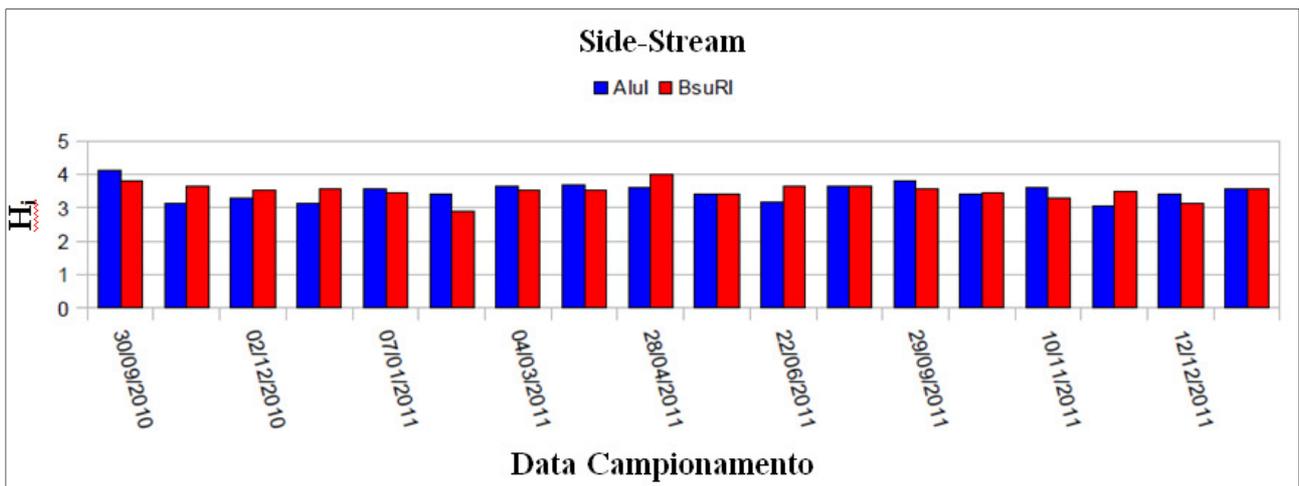


Figura 3-25 -Side-Stream: Indice di Shannon-Wiener determinato con enzima di restrizione Alul (blu) e BsuRI (rosso)

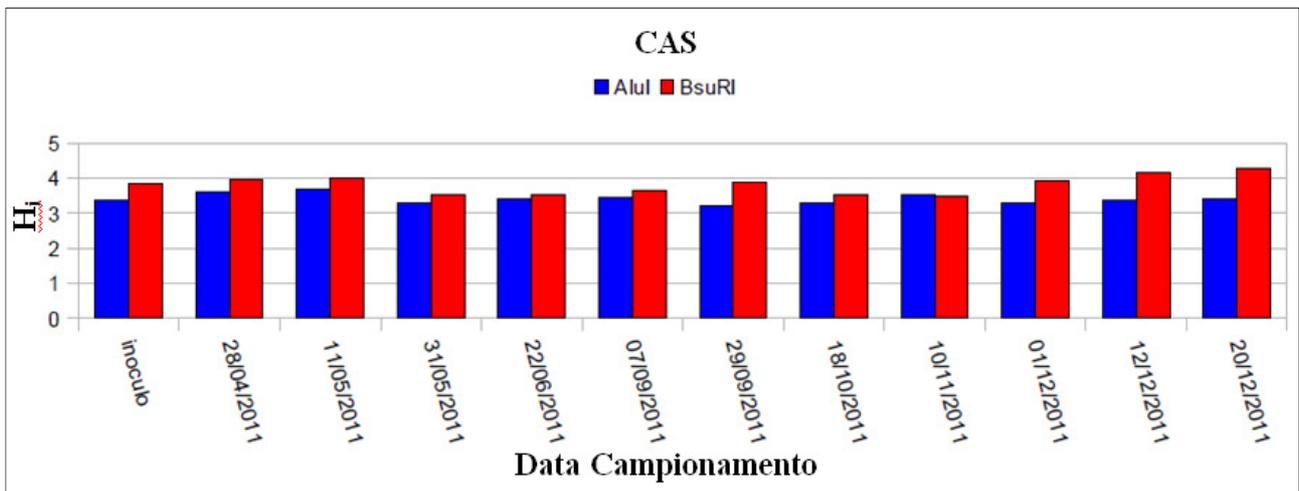


Figura 3-26 -CAS: Indice di Shannon-Wiener determinato con enzima di restrizione Alul (blu) e BsuRI (rosso)

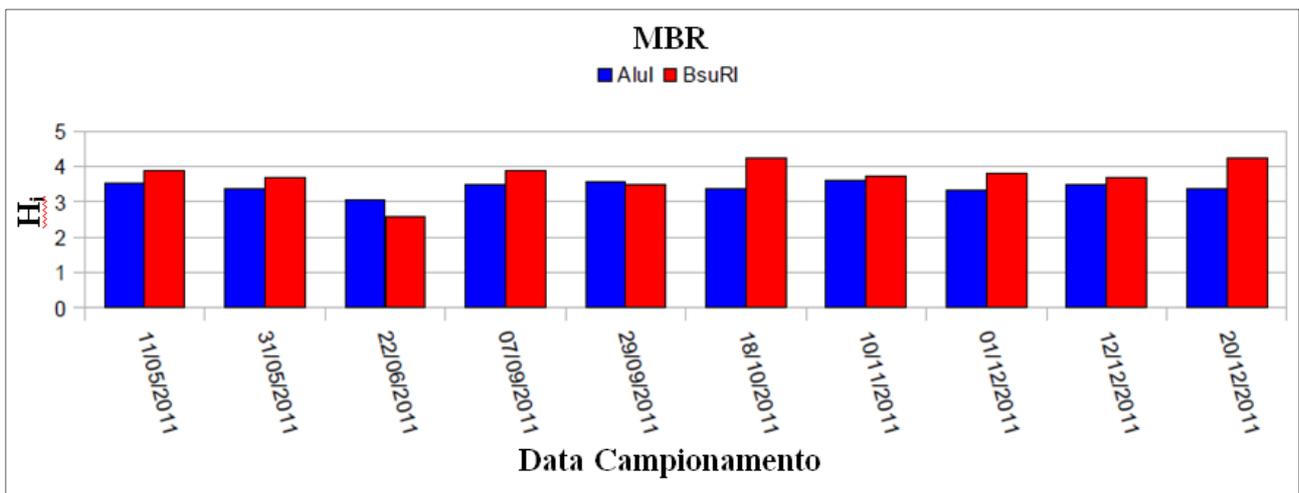


Figura 3-27 -MBR: Indice di Shannon-Wiener determinato con enzima di restrizione Alul (blu) e BsuRI (rosso)

Dall'analisi dei risultati, dato che il valore H_i può assumere valori compresi tra 0 e $+\infty$, emerge un'elevata biodiversità dei singoli campioni analizzati, indipendentemente dall'impianto di riferimento.

Indice di Simpson

$$S = 1 - \lambda = 1 - \sum_i p_i^2$$

Dove parametro λ rappresenta la probabilità che due individui scelti a caso nel campione in esame appartengano alla stessa OTU. L'indice di Simpson costituisce un indice di equità se valutato come $1-\lambda$ o un indice di dominanza se valutato semplicemente come λ . Esprimendo una probabilità, S può assumere valori nell'intervallo 0-1 ed è tanto più alto quanto più diversificata è la comunità batterica presente nei campioni. Facendo riferimento ai risultati ottenuti, riportati in Figura 3-28, 3-29 e 3-30 rispettivamente per gli impianti Side-Stream, CAS e MBR, emerge l'alta eterogeneità e biodiversità dei popolamenti analizzati testimoniata dall'ottenimento di valori di S sempre molto prossimi a 1.

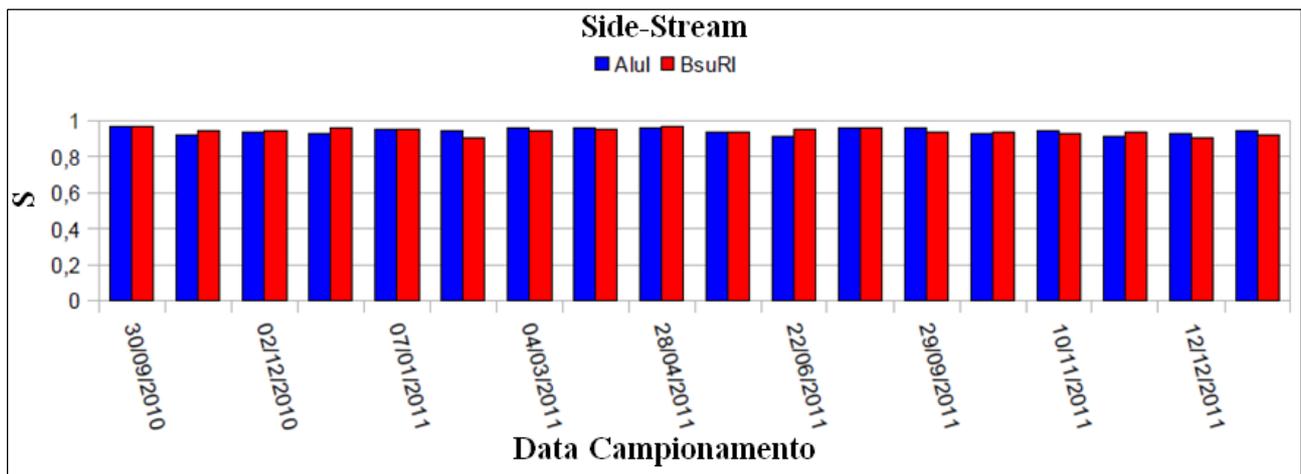


Figura 3-28 -Side-Stream: Indice di Simpson determinato con enzima di restrizione AluI (blu) e BsuRI (rosso)

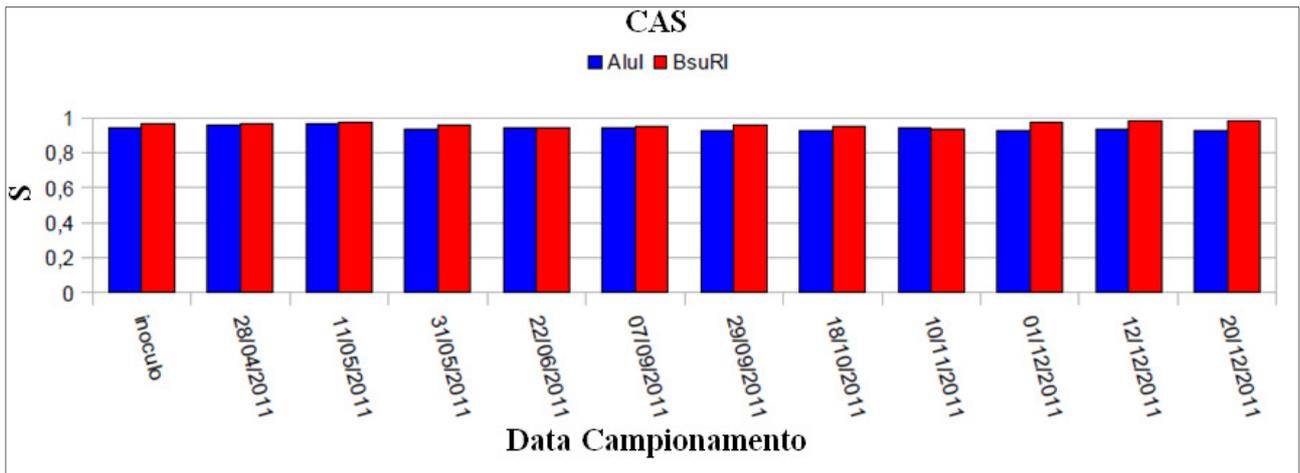


Figura 3-29 -CAS: Indice di Simpson determinato con enzima di restrizione AluI (blu) e BsuRI (rosso)

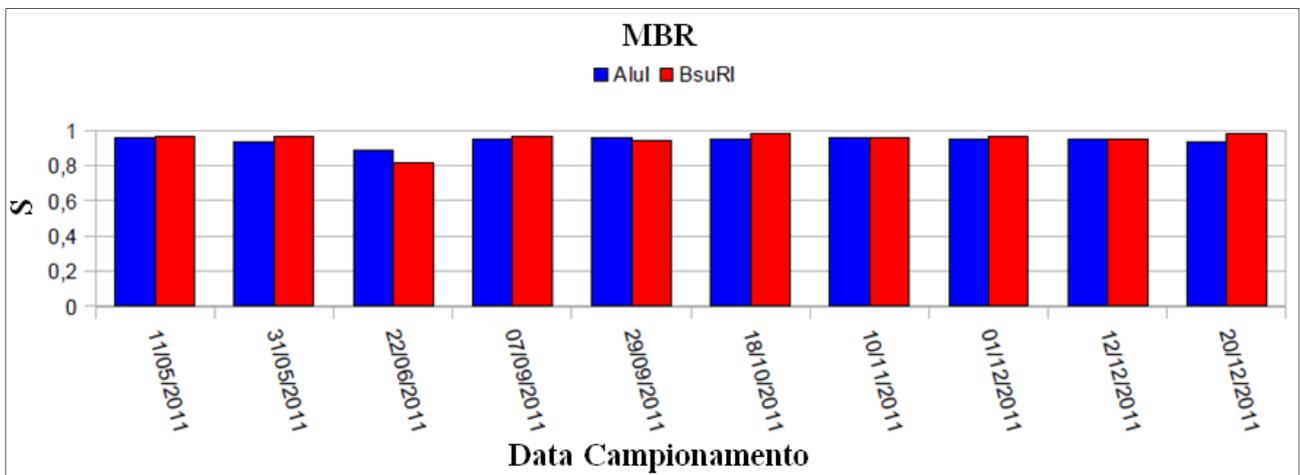


Figura 3-30 -MBR: Indice di Simpson determinato con enzima di restrizione AluI (blu) e BsuRI (rosso)

Indice di Evenness

L'indice di Evenness misura la distribuzione della ripartizione degli elementi, in questo caso delle OTU, all'interno del sistema considerato (il campione) e indica, di fatto, il rapporto tra la diversità presente nel sistema e la diversità massima possibile. Utilizzando tale indice, compreso tra 0 e 1, è possibile quindi determinare l'eterogeneità ecosistemica: il valore massimo della eterogeneità è raggiunto quando tutte le categorie sono rappresentate in eguale proporzione. L'algoritmo è riportato di seguito.

$$Es = \frac{Hi}{\ln(n)}$$

Dove:

- Dp è l'indice di Shannon

- n è il numero di OTU del campione

Osservando i risultati, si osserva un andamento nel tempo di Es diverso tra gli impianti del Main-Stream e l'impianto Side-Stream. Sia per quanto riguarda il CAS che l'MBR della filiera principale emerge un andamento fluttuante (molto più marcato nel caso del BsuRI) per tutto il periodo analizzato e l'assenza di una qualsiasi tendenza (Figura 3-31 e 3-32).

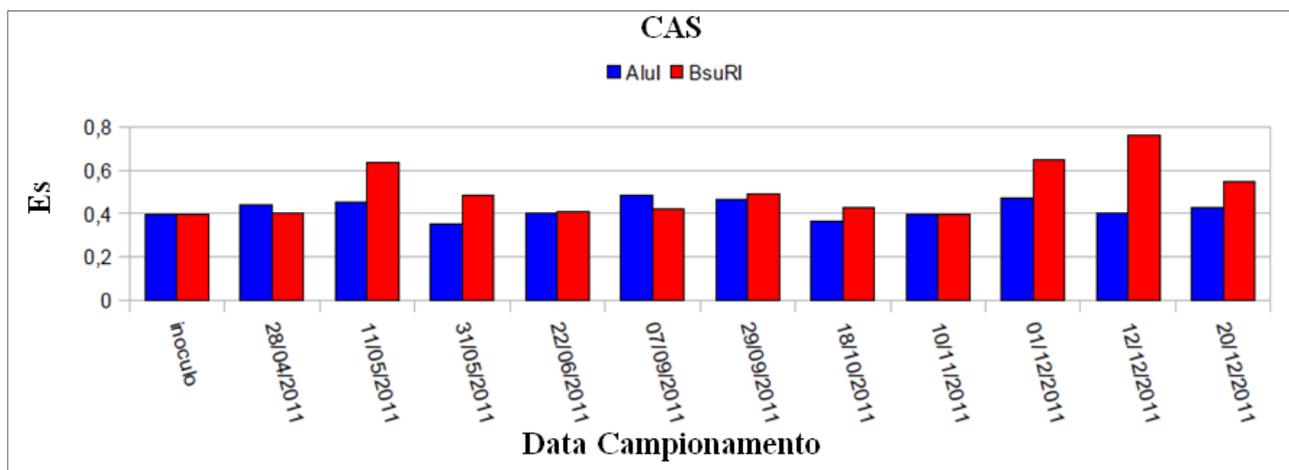


Figura 3-31 -CAS: Indice di Evenness determinato con enzima di restrizione AluI (blu) e BsuRI (rosso)

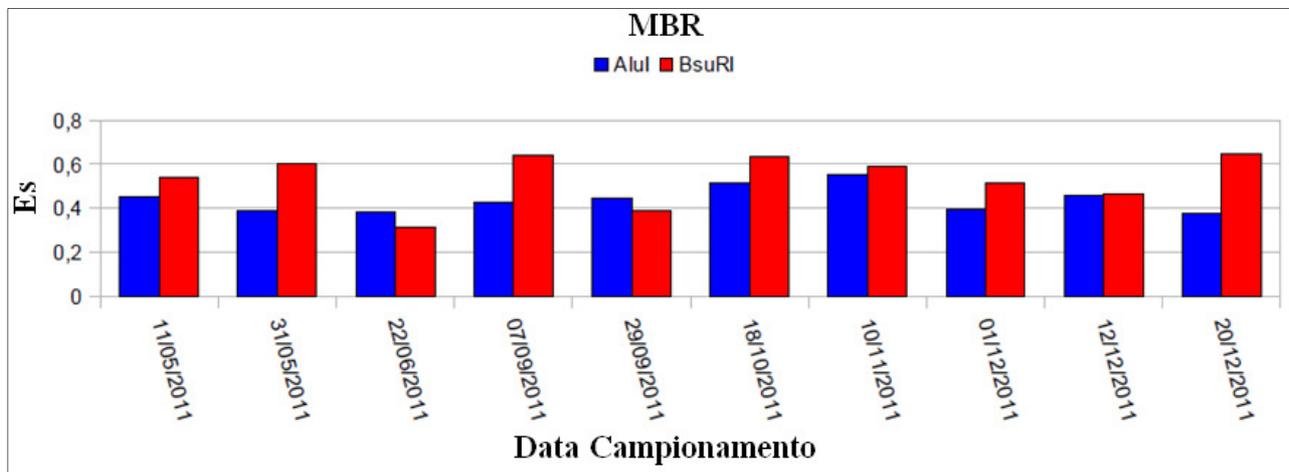


Figura 3-32 -MBR: Indice di Evenness determinato con enzima di restrizione AluI (blu) e BsuRI (rosso)

Per quanto riguarda l'impianto Side-Stream è invece evidente come, a partire dal campionamento effettuato il giorno 18 Ottobre 2011, i valori di Es tendano a stabilizzarsi intorno a 0.38 (in riferimento all'enzima AluI) indicando il mantenimento nel tempo di una eterogeneità della comunità batterica inferiore rispetto a quella registrata precedentemente (Figura 3-33). L'osservazione risulta perfettamente in accordo con le modifiche operative apportate all'impianto

Side-Stream per il quale è stato avviato lo spurgo del fango di supero (allo scopo di mantenere l'età del fango di 20 giorni) il giorno 385 (29 Settembre 2011) ovvero il giorno del campionamento immediatamente precedente quello del 18 Ottobre. La presenza di spurgo, e conseguentemente l'abbassamento dell'età del fango, funge quindi da selettore cinetico limitando la presenza all'interno dell'impianto della sola biomassa in grado di crescere con cinetiche tali da non causarne il wash-out e riducendo, allo stesso tempo, l'eterogeneità della comunità batterica del sistema.

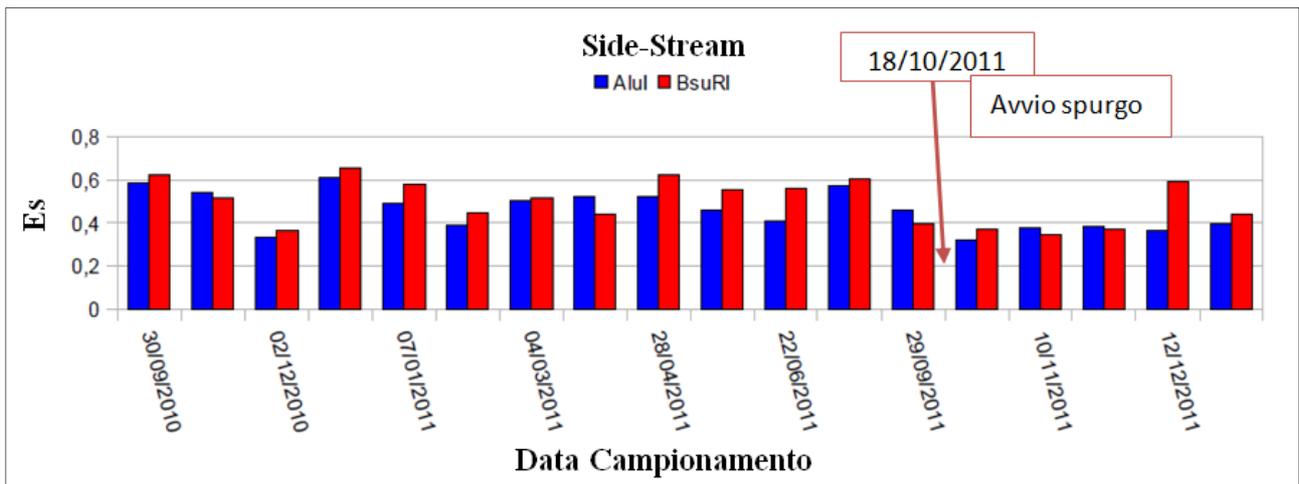


Figura 3-33 -Side-Stream: Indice di Evenness determinato con enzima di restrizione AluI (blu) e BsuRI (rosso)

3.6.3 Determinazione qualitativa della comunità batterica

La definizione dei picchi degli elettroferogrammi risultati dall'analisi T-RFLP ha permesso una caratterizzazione qualitativa delle OTU presenti nei singoli campioni mediante la comparazione delle informazioni ottenute dal sequenziamento del DNA batterico con quelle presenti all'interno del database Gene Bank de l'National Center for Biotechnology Information (NCBI) e il Ribosomal Database Project (RDP).

Attraverso l'uso del NCBI e del RDP, è stato possibile ottenere dati riguardanti:

- la descrizione, phylum di appartenenza e accession number dell'organismo (identificato da entrambi i database)
- % di similarità tra la sequenza ottenuta e quella presente nel database NCBI
- S_{ab} score ottenuto dal RDP

Il risultato di tale operazione è la costruzione di tabelle, una per ogni library, in cui sono riportati tutti i cloni sequenziati con le relative informazioni. Le operazioni di sequenziamento del DNA batterico e conseguentemente l'analisi qualitativa della composizione della biomassa presente all'interno dei tre impianti pilota è stata effettuata unicamente su campioni significativi:

- A) Fango di inoculo dell'impianto Side-Stream, prelevato il giorno 1;
- B) Fango prelevato dall'impianto Side-Stream immediatamente prima dell'avvio della fase di bioaugmentation (giorno 445);
- C) Fango prelevato dall'impianto Side-Stream dopo un mese dall'avvio della bioaugmentation (giorno 475)
- D) Fango prelevato dall'impianto MBR della filiera Main-Stream immediatamente prima dell'avvio della fase di bioaugmentation (giorno 445)
- E) Fango prelevato dall'impianto MBR della filiera Main-Stream dopo un mese dall'avvio della bioaugmentation (giorno 475)

Una volta ottenute le tabelle, sono state calcolate le percentuali di ogni OTU sul numero totale di cloni (pari a 110 e uguale per tutti i campioni), quelle relative ai phyla e alle classi di appartenenza dei cloni stessi.

Un primo risultato significativo dell'effetto delle condizioni operative sul processo di selezione batterica si ottiene confrontando i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni A, B e C.

La Figura 3-34 è riportata la distribuzione delle diverse OTU all'interno del campione A, costituito dal fango di inoculo dell'impianto Side-Stream.

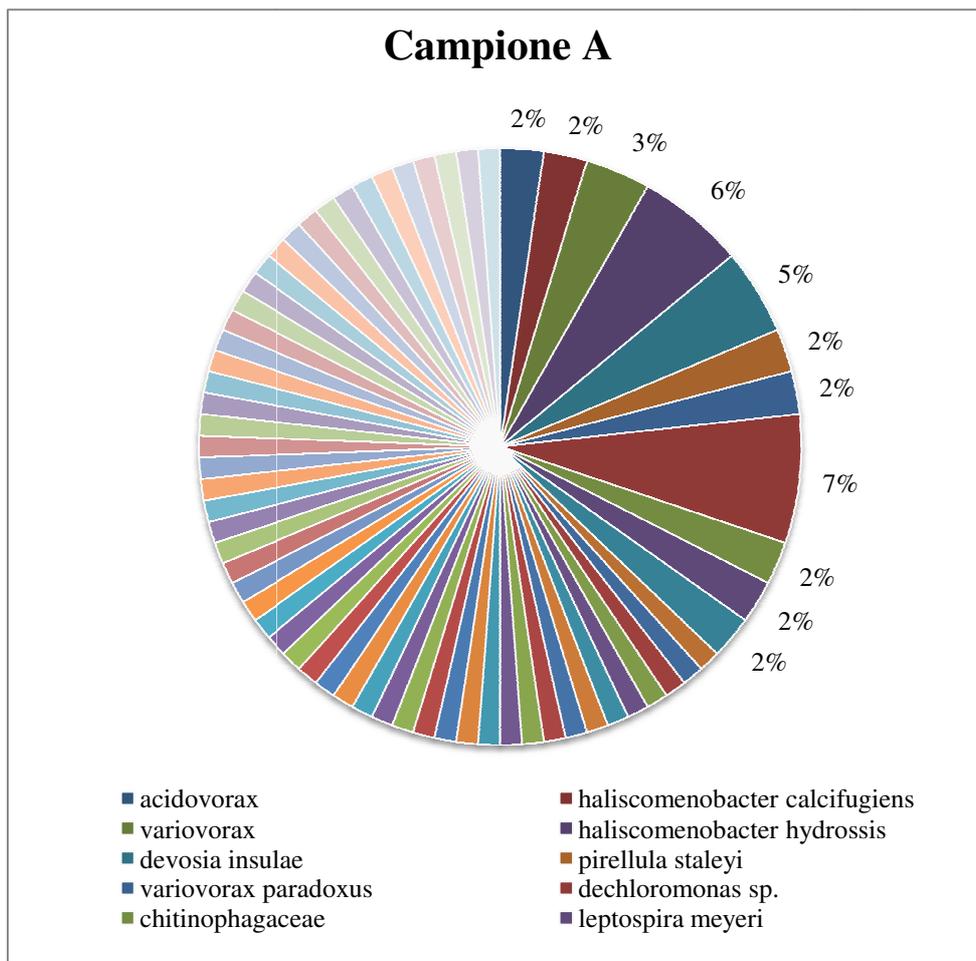


Figura 3-34 -Distribuzione delle OTU nel Campione A

Il fango di inoculo è caratterizzato da una forte biodiversità, confermata dall'elevato numero (47) di OTU singole e diverse, che costituiscono il 65% del totale delle OTU individuate, e dall'assenza di uno o più generi dominanti.

Al momento dell'avvio del processo di bioaugmentation, avvenuto il giorno 445 (Figura 3-35) si osserva, di contro, una netta predominanza di batteri ammonio ossidanti (AOB) appartenenti ai generi *nitrosomonassp.* (41%) e *nitrosococcusmobilis* (9%). E' da segnalare, inoltre, la presenza di *AzotobacterChrococum* (2%), *Actinobacterium* (2%), *Cytopagasp.* (2%), *Amaricoccus* (2%) e di 46 altre singole OTU (42%).

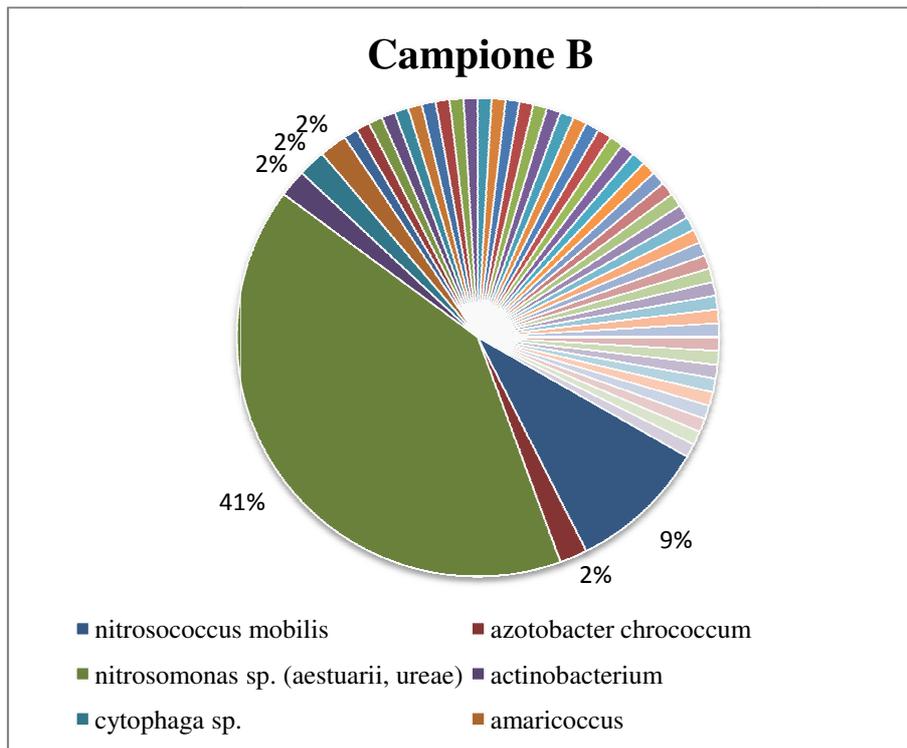


Figura 3-35 -Distribuzione delle OTU nel Campione B

La dominanza di batteri ammonio ossidanti è confermata anche dall'analisi del campione C prelevato ad un mese di distanza dall'avvio della bioaugmentation, (Figura 3-35). In questo caso si osserva una netta predominanza del genere *nitrosomonas* (51%), concentrazioni rilevanti di *dolkonella sp.* (10%) e *pseudomonas sp.* (9%), presenza di *acquorivita sublithicola* (3%), *marine bacterium* (4%), *bacterioidetes bacterium* (3%), *chelatooccus dacquensis* (2%), *sulphide oxidizing bacteria* (3%) e una netta riduzione del numero complessivo di OTU singole e diverse tra loro (15%) tra cui è indubbiamente da segnalare la presenza di batteri nitrito ossidanti (*Nitrobacter Vinogradsky*).

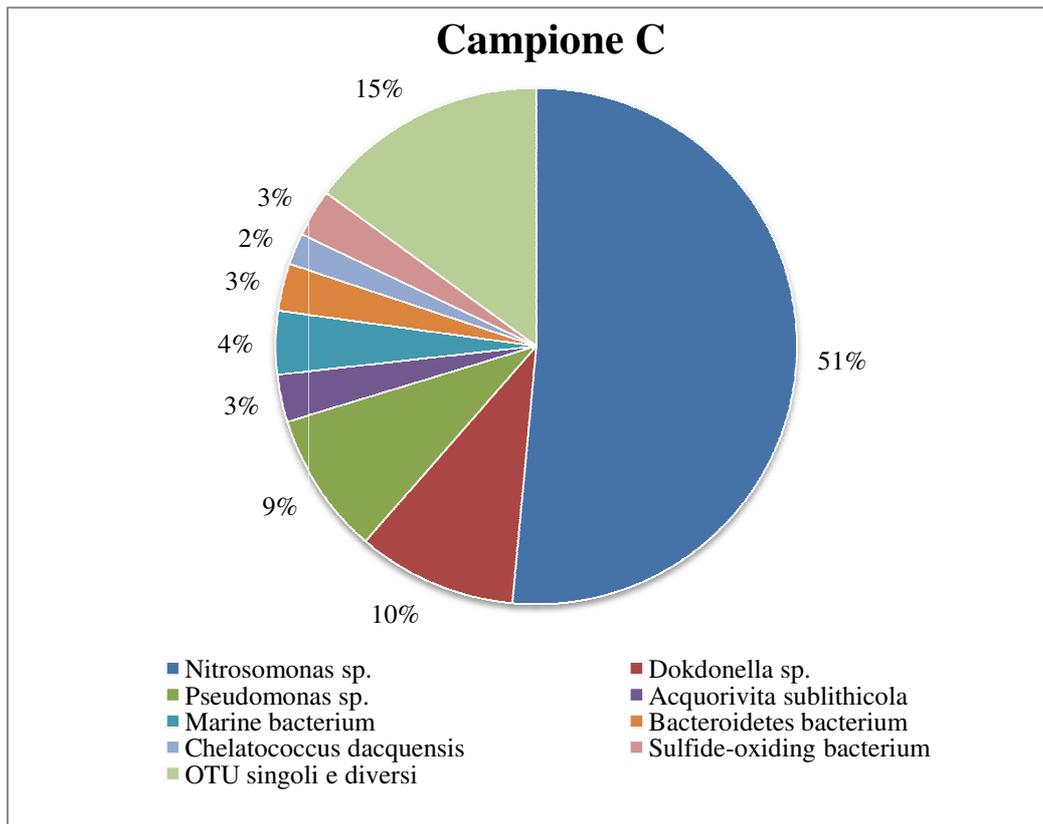


Figura 3-36 -Distribuzione delle OTU nel Campione C

Complessivamente, è evidente come nel tempo la comunità batterica presente all'interno dell'impianto Side-Stream subisca delle variazioni significative che portano ad un progressivo aumento della frazione di biomassa attiva nitrificante e ad una contemporanea riduzione della biodiversità confermata dalla continua riduzione del numero di OTU singole e diverse: 65% del totale nel campione A, 42% nel campione B e 15% nel campione C.

Relativamente alla selezione di biomassa nitrificante è evidente il progressivo aumento di batteri appartenenti al genere *nitrosomonas*, costituito da batteri ammonio ossidanti. Tale aspetto, soprattutto se riferito alla differenza di concentrazione tra il campione A (1%) ed il campione B (41%) è in accordo con il continuo incremento della capacità nitrificante dell'impianto Side-Stream. I *nitrosomonas*, dal punto di vista cinetico, appartengono alla categoria degli *r-strategist* che comprende tutti quei batteri che crescono velocemente in presenza di elevate concentrazioni di substrato, caratterizzati da alti valori dei rati massimi di crescita (μ_{max}) e della costante di semisaturazione (K_{NH}). La presenza di AOB *r-strategist* all'interno dell'impianto Side-Stream è inoltre in accordo con i risultati ottenuti nel corso dei test cinetici effettuati sulla biomassa che indicano la presenza in tale impianto di batteri ammonio ossidanti caratterizzati da μ_{max} e

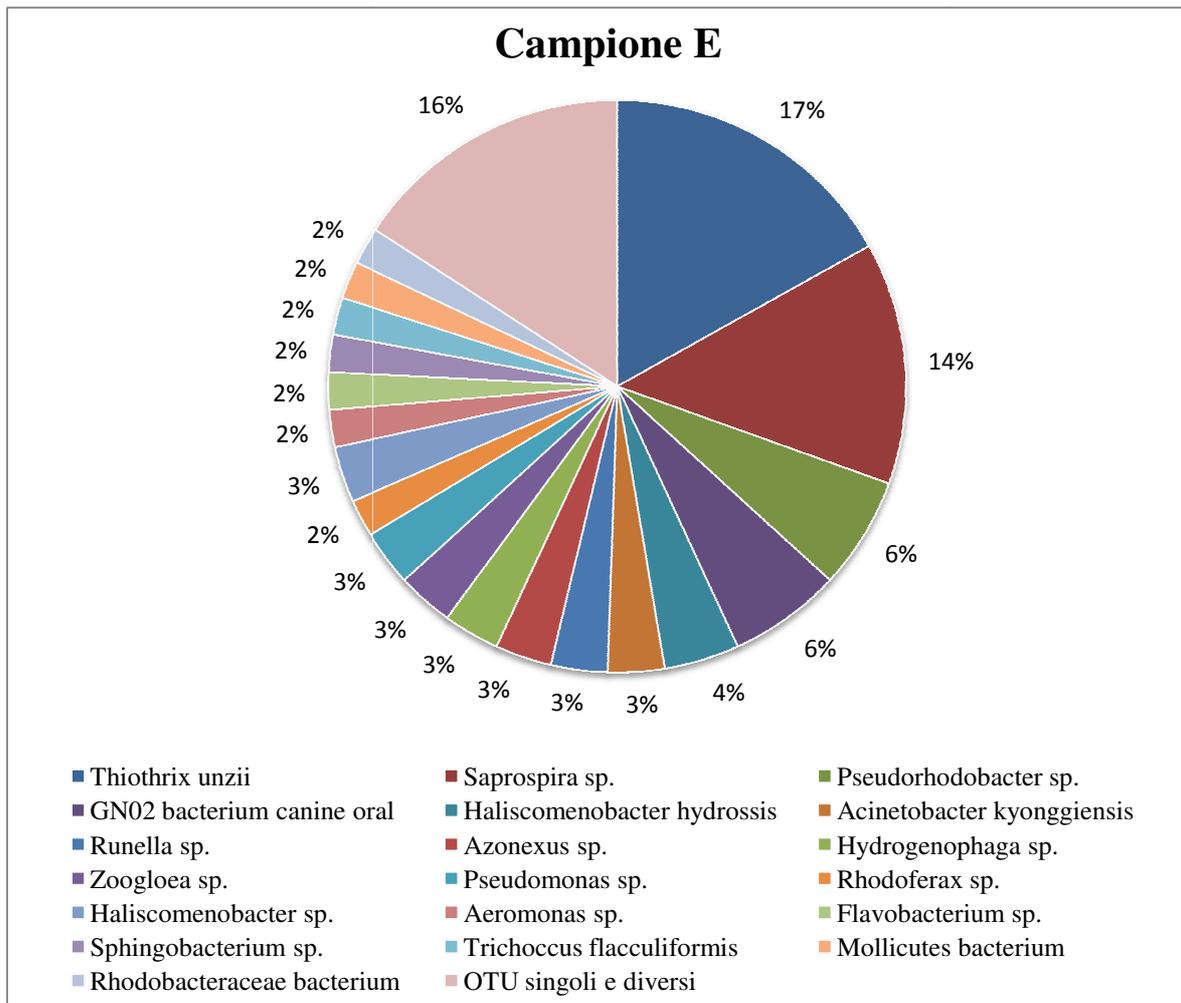


Figura 3-38 -Distribuzione delle OTU nel Campione E

Dal confronto dei risultati dell'analisi dei campioni dell'impianto MBR con quelli delle analisi fatte allo stato stazionario sull'impianto Side-Stream(Campione B e C) emerge una maggiore eterogeneità della comunità microbica dell'impianto MBR indipendentemente dalla presenza della bio-augmentation. La library D è caratterizzata da una notevole presenza di OTU singole (26%), la maggior presenza è data da *Thiothrix unzii* (15%), un batterio solfuro-ossidante. Percentuali intorno al 4% comprendono *Arcobacter sp.*, *Novosphingobium sp.* e *Pseudomonas sp.*, mentre tra il 5 e il 6% si trovano *Zoogloea caeni*, *Haliscomenobacter sp.* e *Lewinella cohaerens*. Tra le OTUs con un singolo clone, è importante sottolineare la presenza di *Nitrospira sp.*, un batterio nitrito-ossidante appartenente alla categoria dei *k-strategist*.

Thiothrix unzii si ritrova anche nella library E (17%) in cui sono presenti anche *Saprospira sp.* con un 14%, piccole percentuali intorno al 6% riguardanti *Pseudorhodobacter sp.* e *GN02 bacterium canine oral*. Anche in questa library troviamo un gruppo costituito da OTU con un solo clone, che rappresenta circa il 16% dei cloni analizzati.

Ciò che emerge chiaramente dall'analisi delle library D ed E è la totale assenza di biomassa nitrificante all'interno dell'impianto MBR. Questo risultato è chiaramente in disaccordo con quanto ottenuto in termini di efficienza di nitrificazione sia dal monitoraggio sul lungo periodo dell'impianto MBR che dai test cinetici effettuati. Altro aspetto da evidenziare è la quasi totale assenza di batteri nitrito ossidanti in tutti i campioni analizzati.

La mancata individuazione di nitrificanti è tuttavia riconducibile al numero limitato di cloni utilizzati che rende necessaria, allo scopo di valutare l'impatto della bioaugmentation sulla selezione batterica all'interno del sistema ricevente, l'effettuazione ulteriori analisi.

3.6.4 Analisi multivariata dei dati

3.6.4.1 Analisi DCA

Il primo tipo di analisi multivariata utilizzata nel corso della sperimentazione è stata la DCA (Detrended Correspondence Analysis) eseguita mediante l'utilizzo del software open source PAST (PAleontological STatistics). L'analisi dei dati mediante DCA permette l'individuazione di due o più parametri che possano essere utilizzati allo scopo di classificare la popolazione del campione analizzato. Dal punto di vista grafico, quindi, i punti (tanti quanti i campioni di fango analizzati) risulteranno tanto più vicini tra loro quanto più risulteranno simili in riferimento ai due parametri utilizzati per la definizione dello spazio bidimensionale, ovvero quelli in grado di spiegare meglio la diversità del campione. L'insieme dei punti appartenenti ad un determinato ambiente di partenza, in questo caso i campioni prelevati dallo stesso impianto, è delimitato da un'ellisse che definisce lo spazio dei punti che appartengono all'insieme con un grado di confidenza del 95%.

In Figura 3-39 sono riportati, in forma grafica, i risultati ottenuti applicando l'analisi al set di dati ottenuti prima dell'avvio del processo di bioaugmentation su tutti gli impianti indipendentemente dall'enzima di restrizione utilizzato.

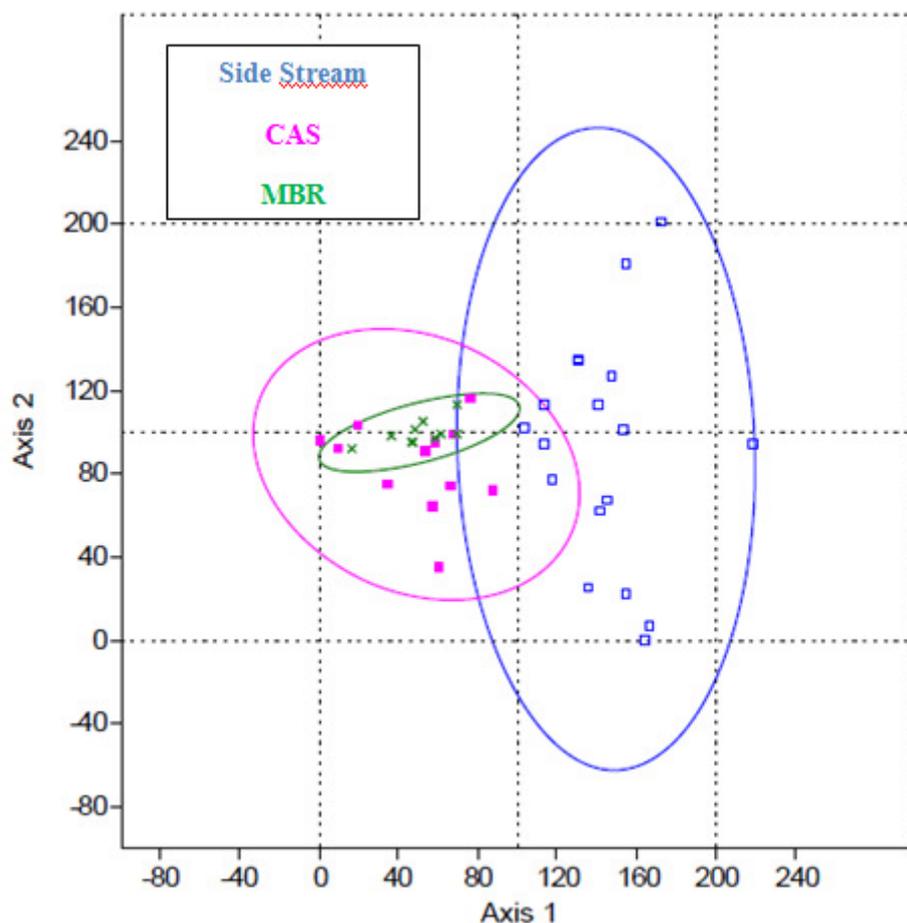


Figura 3-39 - Risultato analisi DCA, indipendentemente dall'enzima di restrizione utilizzato. Autovalori: Axis 1=0,2337; Axis 2=0,1384; Axis 3=0,114; Axis 4=0,08564.

Dall'analisi del grafico in Figura 3-39 è evidente una spiccata similitudine tra i campioni prelevati dall'impianto CAS e quelli dell'impianto MBR della filiera Main-Stream mentre quelli relativi all'impianto Side-Stream si discostano maggiormente.

Di seguito si riportano, rispettivamente in Figura 3-40 e 3-41 i risultati della DCA applicata ai dati discriminati in base all'enzima di restrizione utilizzato, *AluI* e *BsuRI*.

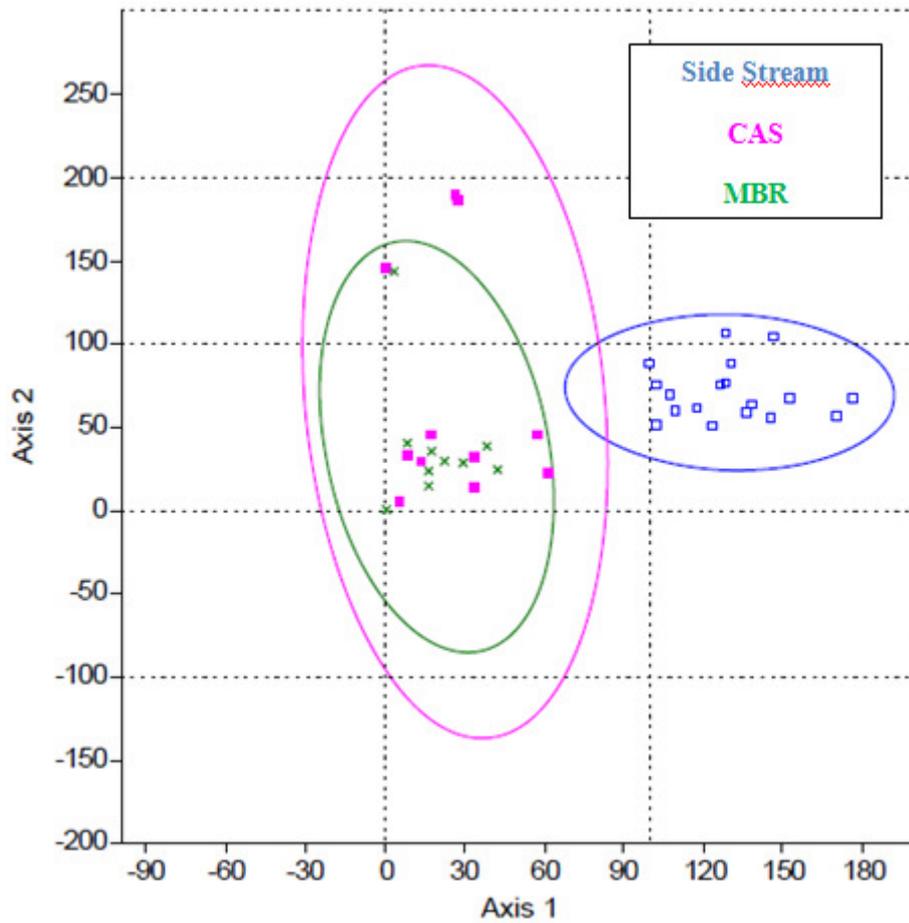


Figura 3-40 - Risultato analisi DCA, indipendentemente dall'enzima di restrizione utilizzato. Autovalori: Axis 1=0,2474; Axis 2=0,1841; Axis 3=0,1469; Axis 4=0,1032.

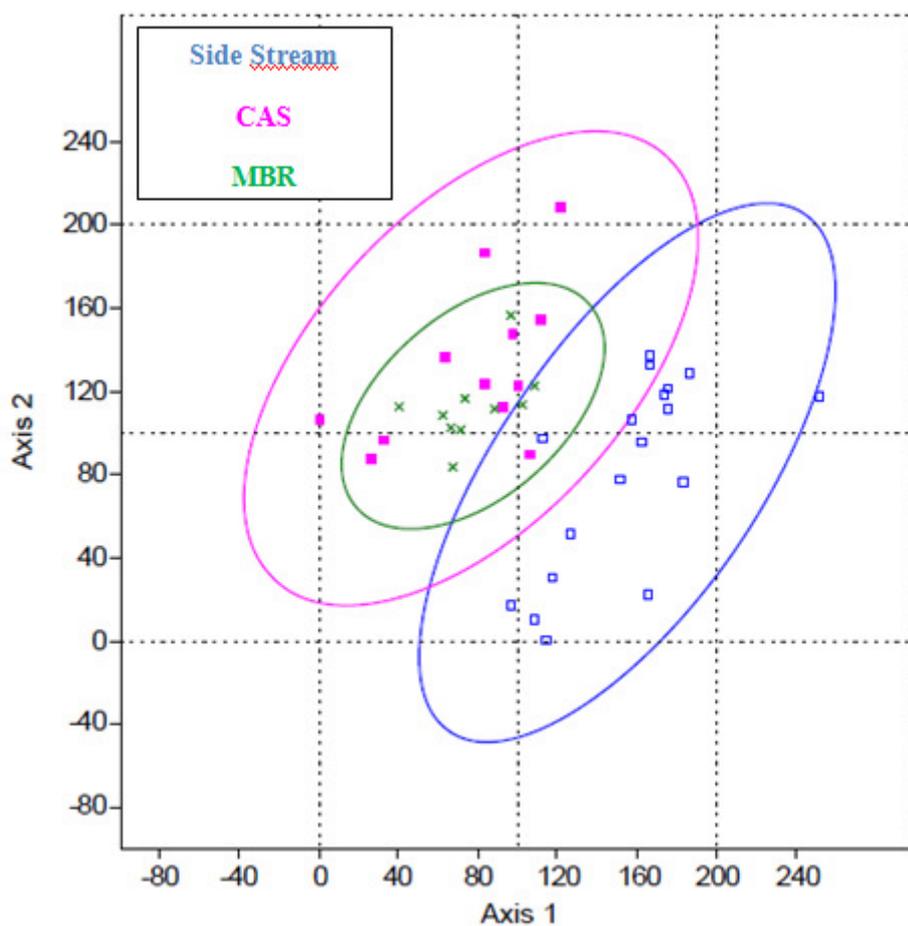


Figura 3-41 - Risultato analisi DCA, indipendentemente dall'enzima di restrizione utilizzato. Autovalori: Axis 1=0,2394; Axis 2=0,1614; Axis 3=0,1375; Axis 4=0,1036.

Indipendentemente dall'enzima utilizzato emerge la diversità tra le comunità batteriche presenti nella filiere Side e Main-Stream anche se tale diversità risulta più marcata utilizzando l'enzima *AluI*, evidentemente in grado di individuare maggiormente le OTU che differenziano la comunità presente nell'impianto Side-Stream dalle comunità presenti negli altri due impianti.

Un'importante considerazione può essere fatta in riferimento alle dimensioni delle ellissi di confidenza individuate, indipendentemente dall'enzima di restrizione utilizzato, per l'impianto CAS e MBR. In ogni caso, infatti, l'ellisse dell'MBR è completamente contenuta all'interno di quella del CAS evidenziando una minore variabilità della comunità batterica dell'MBR rispetto a quella dell'impianto convenzionale. Tale aspetto può essere giustificato tenendo conto dei problemi avuti nella gestione dell'impianto CAS nel periodo in cui è stato effettuato il campionamento. L'instaurazione di fenomeni di rising all'interno del sedimentatore e la perdita incontrollata di biomassa può aver causato perturbazioni al sistema non sufficienti a modificare drasticamente la comunità batterica ma in grado, comunque, di ridurre la stabilità rispetto al sistema

MBR, caratterizzato da un sistema di ritenzione totale dei solidi e conseguentemente molto più stabile nel tempo.

Il diverso sistema di separazione solido/liquido non è invece sufficiente per spiegare la diversità della comunità del CAS rispetto a quella dell'MBR della filiera Side-Stream. Tale diversità, infatti si mantiene anche tra i due impianti a membrana del Main e del Side-Stream. La diversità tra le comunità individuate nelle due filiere, in accordo con i risultati dei test cinetici, è infatti da imputare alle diverse condizioni operative degli impianti, in particolar modo alla maggiore età del fango e ai maggiori carichi di ammonio in ingresso all'impianto Side-Stream.

Allo scopo di studiare gli effetti del processo di bioaugmentation sulla selezione della biomassa nitrificante all'interno degli impianti Main-Stream, l'analisi T-RFLP e, successivamente, l'analisi multivariata DCA, sono state replicate su tre campioni prelevati da ciascuno dei tre impianti a partire dal ventesimo giorno successivo all'avvio del processo di bioarricchimento. Data la maggiore capacità di discriminare le comunità dei diversi impianti, le analisi sono state ripetute utilizzando esclusivamente l'enzima *AluI*.

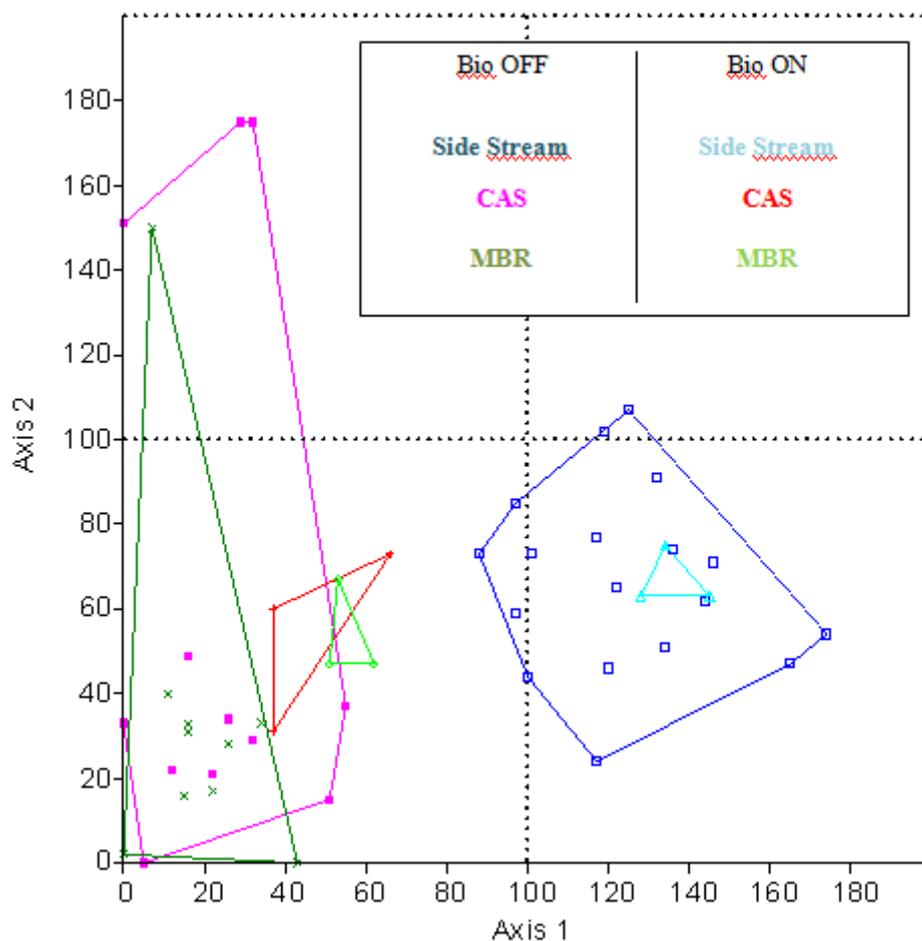


Figura 3-42 - Analisi DCA: Confronto campioni in assenza e in presenza di bioaugmentation

Nel caso in esame, allo scopo di migliorare la leggibilità dei risultati, non sono state riportate le ellissi di confidenza e si è provveduto unicamente a racchiudere all'interno della figura convessa più piccola possibile tutti i puntirelativi allo stesso impianto e alle stesse condizioni (Bioaugmentation ON o OFF). Essendo il flusso di biomassa nitrificante verso gli impianti Main-Stream lo spurgo dell'impianto Side-Stream, la presenza della bio-augmentation è del tutto ininfluenta per l'impianto Side-Stream e tale aspetto viene confermato dalla presenza di tutti e tre i punti relativi ai campionamenti "BioON" all'interno dell'insieme contenente i punti campionati nel periodo "BioOFF". La stessa cosa non vale per entrambi gli impianti della filiera Main-Stream.

Sia per il CAS che per l'MBR, infatti, i punti campionati nello stato "BioON" escono dall'insieme dei punti campionati in assenza di bio-augmentation spostandosi significativamente verso l'insieme dei punti dell'impianto Side-Stream evidenziando, dal punto di vista microbiologico un cambiamento della comunità batterica e una tendenza a aumentare l'omogeneità delle comunità delle due filiere studiate.

3.6.4.2 Analisi MDS

Nonostante i risultati ottenuti con l'analisi DCA confermino quanto ipotizzato circa la possibilità di causare variazioni significative della comunità batterica di un impianto in presenza di bio-augmentation, tali risultati non possono essere considerati sufficientemente affidabili. Nella DCA i due assi che vengono individuati rappresentano le due componenti in grado di spiegare la maggior fetta della variabilità presente nei dati. L'analisi DCA, infatti, individua una serie di componenti di cui la prima spiega una percentuale maggiore della variabilità, la seconda una percentuale minore, la terza una ancora minore e così via. La rappresentazione grafica viene però effettuata unicamente tenendo conto delle prime due componenti ed è considerata una visualizzazione ottimale del set di dati quando la somma delle percentuali relative ai primi due assi è maggiore del 50%. In tutti i casi riportati la somma delle componenti utilizzate per la rappresentazione bidimensionale dei dati è inferiore al 50%. Per questo motivo l'analisi multivariata è stata ripetuta utilizzando l'analisi di "Non Metric Multi Dimensional Scaling" (MDS) in cui le distanze tra i vari punti che nello spazio bidimensionale rappresentano i campioni analizzati sono legati in maniera più diretta ai valori di similarità calcolati sulla base della matrice di dati.

Nelle figure seguenti sono riportati in forma grafica i risultati ottenuti dall'applicazione della MDS ai campioni prelevati dai tre impianti prima dell'avvio della bioaugmentation (Figura 3-43) e con la bioaugmentation attiva (Figura 3-44) e trattati con l'enzima *AluI*.

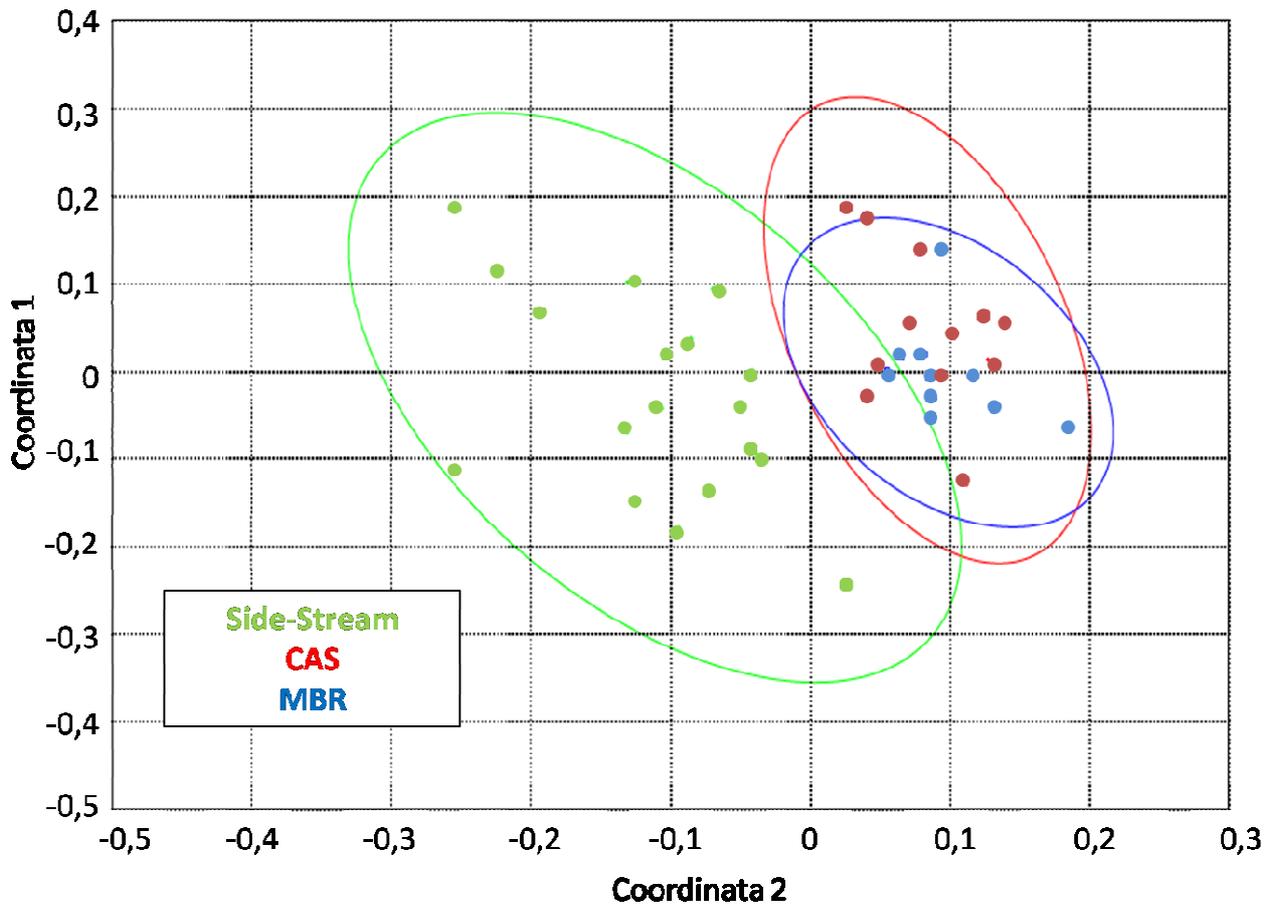


Figura 3-43 – Analisi MDS sui campioni prelevati prima dell'avvio della bio-augmentation. Enzima di restrizione utilizzato : AluI.

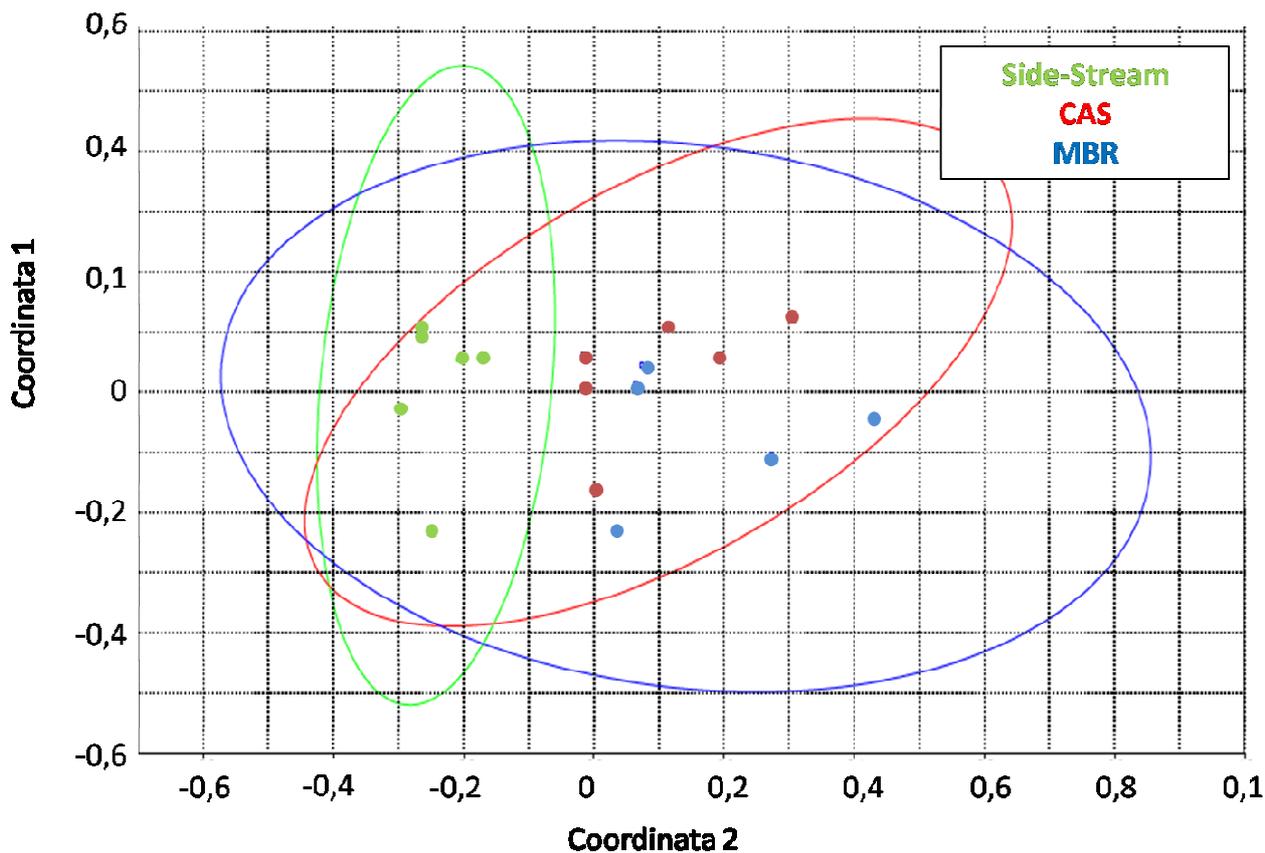


Figura 3-44 – Analisi MDS effettuata sui campioni prelevato con la bio-augmentation attiva. Enzima di restrizione utilizzato: AluI.

Nelle figure seguenti sono riportati in forma grafica i risultati ottenuti dall'applicazione della MDS ai campioni prelevati dai tre impianti prima dell'avvio della bioaugmentation (Figura 3-45) e con la bioaugmentation attiva (Figura 3-46) e trattati con l'enzima *BsuRI*.

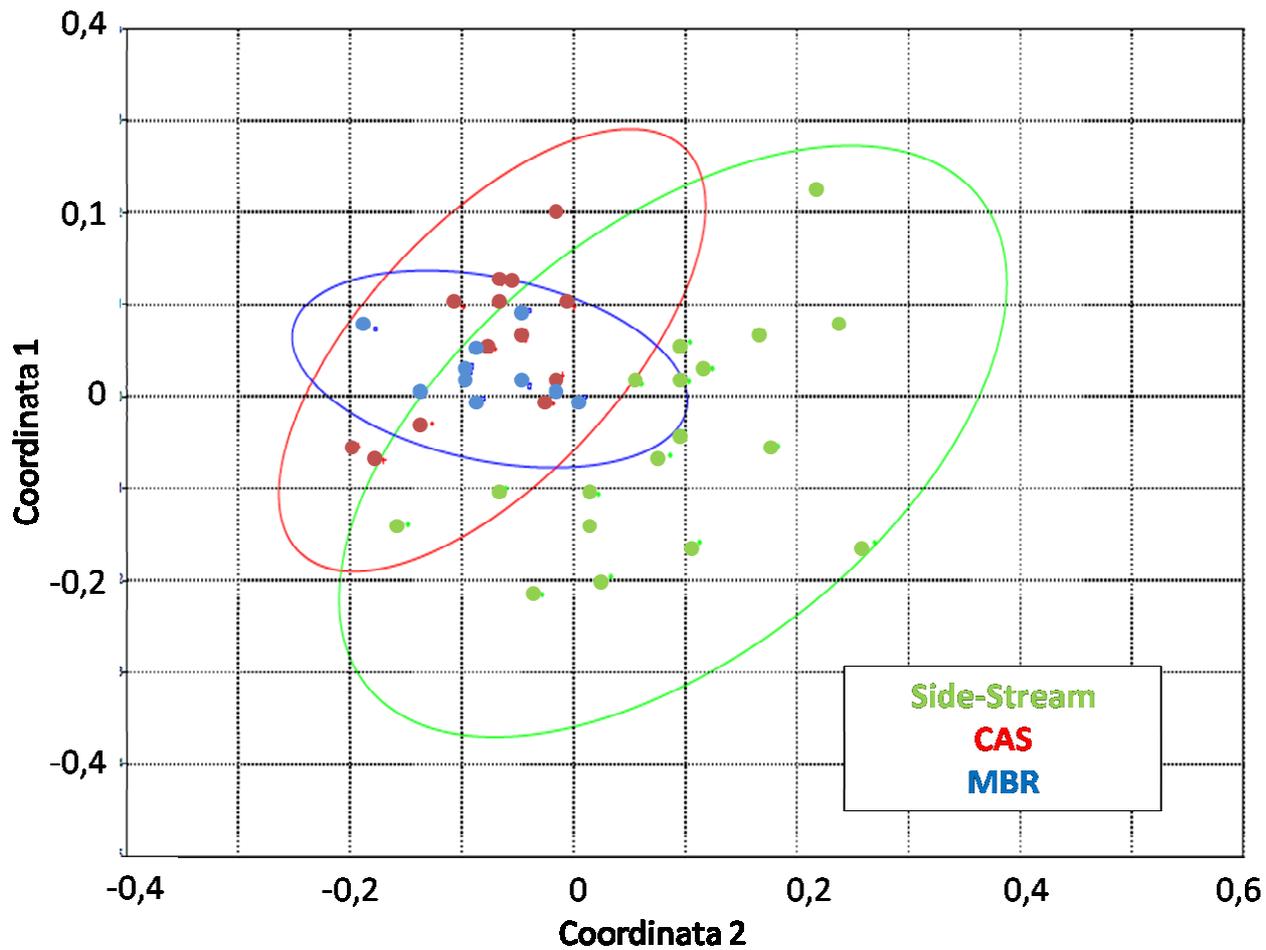


Figura 3-45 – Analisi MDS effettuata sui campioni prelevati prima dell'avvio della bio.augmentation. Enzima di restrizione utilizzato: BsuRI.

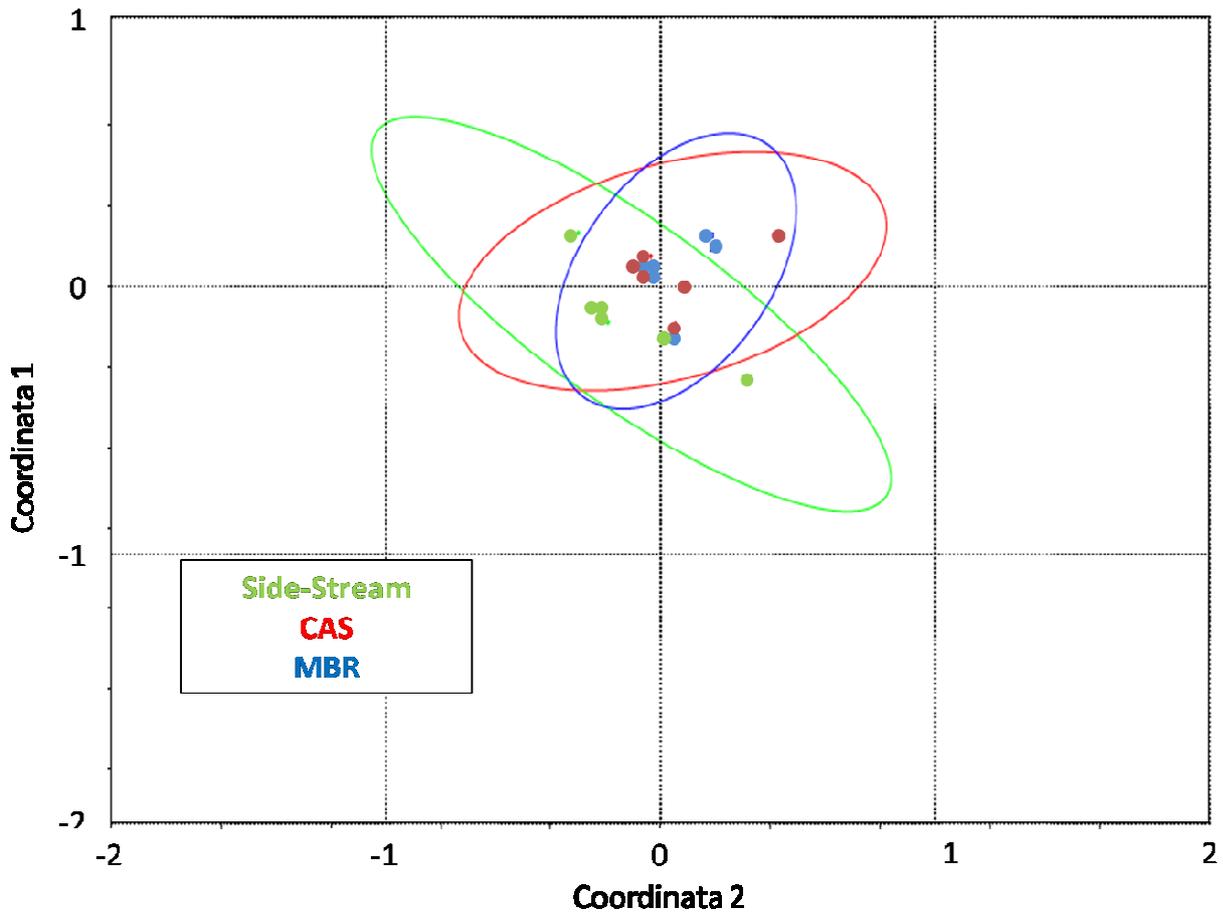


Figura 3-46 – Analisi MDS effettuata sui campioni prelevati durante il processo di bio-augmentation. Enzima di restrizione utilizzato: BsuRI.

Indipendentemente dall'enzima di restrizione utilizzato, risulta evidente come la presenza di bio-augmentation comporti un incremento dell'omogeneità delle comunità batteriche presenti negli impianti CAS e MBR e nell'impianto Side-Stream. I punti relativi ai campioni degli impianti MBR e CAS risultano, infatti, tra loro estremamente simili già prima dell'avvio della bioaugmentation e permangono tali anche con la bioaugmentation attiva a conferma del fatto che condizioni operative analoghe comportano la selezione di comunità batteriche analoghe. I due insiemi distano inizialmente in maniera significativa dall'insieme dei punti che descrivono i campioni dell'impianto Side-Stream; tale distanza si riduce notevolmente in presenza di bioaugmentation.

3.7 Analisi modellistica

3.7.1 Filiera Side-Stream

Il modello ASMN descritto in dettaglio all'interno del paragrafo 2.5.2 è stato utilizzato allo scopo sia di descrivere la capacità di nitrificazione dell'impianto Side-Stream sia di ottenere informazioni circa la caratterizzazione cinetica della biomassa ammonio ossidante e di determinare la concentrazione di biomassa attiva AOB all'interno delle vasche di processo al momento dell'esecuzione dei test cinetici batch (paragrafo 3.5) e dei test titrimetrici in continuo (paragrafo 3.8).

I valori del rateo massimo specifico di crescita della biomassa ammonio ossidante ($\mu_{\max, AOB}$) e della costante di semisaturazione dell'ammonio (K_{NH}) sono stati calibrati in riferimento all'andamento della concentrazione di azoto ammoniacale in uscita dall'impianto tra i giorni 300 e 444. Nel periodo di riferimento si sono verificati sporadici accumuli di ammonio e nitrito (Figura 3-5) attribuibili a malfunzionamenti del sistema di aerazione o di controllo del pH. In ogni caso, tuttavia, l'entità di tali inconvenienti risulta tale da poter essere annullata prevedendo un blocco temporaneo dell'alimentazione della durata di poche ore. Per questo motivo la calibrazione dei parametri di interesse non tiene conto dei casi in cui l'elevata concentrazione di nutrienti è riconducibile alla casistica sopra riportata.

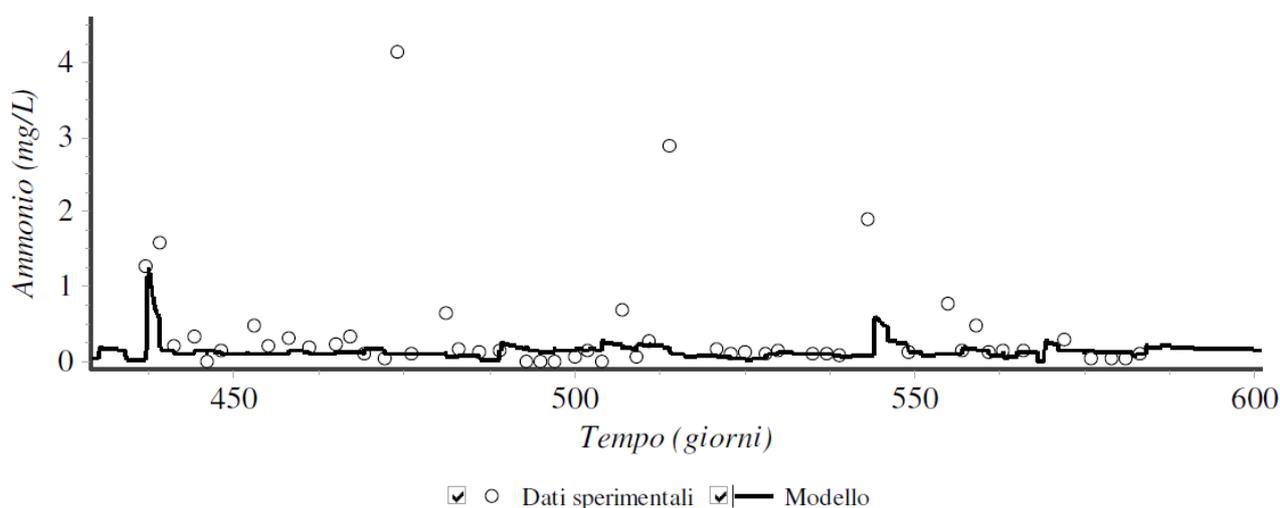


Figura 3-47 - Side-Stream - Ammonio. Dati sperimentali e modello

In Figura 3-47 sono riportati i risultati dell'attività di monitoraggio relativa alla concentrazione di ammonio in uscita dall'impianto e l'andamento della concentrazione di ammonio restituita dal modello.

Tale risultato è stato ottenuto implementando i parametri cinetici della biomassa AOB, NOB ed eterotrofa riportati in Tabella 3-3 Per quanto concerne i parametri non espressamente riportati si fa riferimento ai valori determinati da Hiatt e Grady (2008), Tabella 2-12.

Tabella 3-3 – Parametri del modello riferito alla temperatura di 20°C.

Parametro	Valore	Unità di misura	Riferimenti
$\mu_{\max, \text{AOB}}$	0.95	d^{-1}	<i>Calibrato</i>
$\mu_{\max, \text{NOB}}$	0.77	d^{-1}	<i>Rostron et al., 2001</i>
$\mu_{\max, \text{HET}}$	6	d^{-1}	<i>Salem et al., 2003</i>
K_{NH}	0.8	mg L^{-1}	<i>Calibrato</i>
b_{AOB}	0.17	d^{-1}	<i>Jubani et al., 2008</i>
b_{NOB}	0.17	d^{-1}	<i>Jubani et al., 2008</i>
b_{HET}	0.24	d^{-1}	<i>Salem et al., 2003</i>
Y_{AOB}	0.17	--	<i>Salem et al., 2003</i>
Y_{NOB}	0.07	--	<i>Salem et al., 2003</i>
Y_{HET}	0.63	--	<i>Salem et al., 2003</i>
$\Theta_{\mu_{\text{AOB}}}$	1.088	--	<i>Calibrato</i>
$\Theta_{\mu_{\text{NOB}}}$	1.012	--	<i>Calibrato</i>
$K_{i\text{NH}}$	70	mg L^{-1}	<i>Jubani et al., 2008</i>

Il modello ASMN considera come substrato per la biomassa ammonio ossidante l'ammoniaca libera (FA). Allo scopo di rendere i risultati di questa sperimentazione più facilmente confrontabili con la maggior parte dei risultati presenti in letteratura, la costante di semisaturazione e la costante di inibizione per il substrato sono riportate in termini di concentrazione di azoto ammoniacale. Tali valori sono determinati a partire dal valore di FA in funzione delle condizioni operative tenendo conto dell'equazione Eq. 1-39.

Di seguito si riportano, in Figura 3-48 e 3-49 gli andamenti nel tempo misurati nel corso del monitoraggio e determinati dall'applicazione del modello dei nitriti e dei nitrati in uscita dall'impianto Side-Stream.

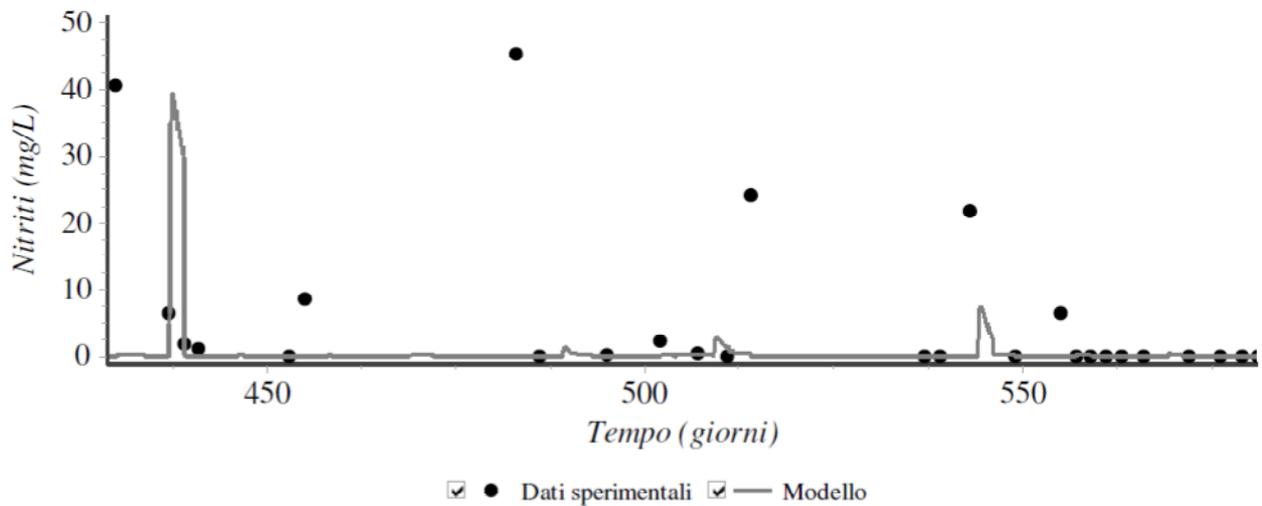


Figura 3-48 - Side-Stream - Nitriti. Dati sperimentali e modello

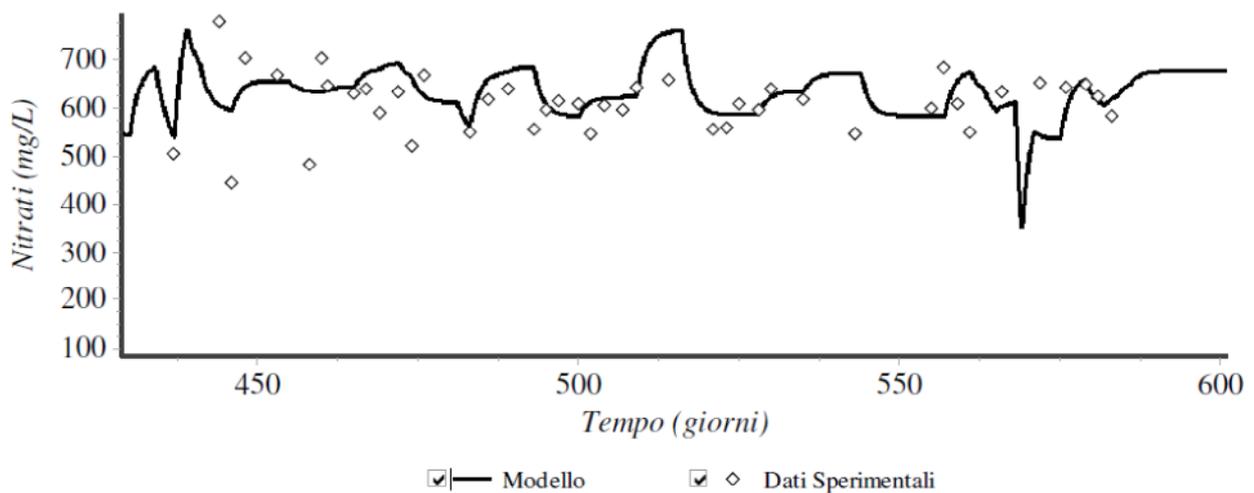


Figura 3-49 - Side-Stream - Nitrati. Dati Sperimentali e modello

Il modello è in grado di descrivere correttamente anche i solidi presenti all'interno della vasca di nitrificazione dell'impianto pilota tranne in casi particolari come, ad esempio nel periodo compreso tra il giorno 500 e 530. In quest'arco di tempo si sono verificati continui malfunzionamenti del sistema di ricircolo interno alla vasca delle membrane causando un accumulo di solidi all'interno

della vasca e conseguentemente una riduzione degli stessi in vasca di nitrificazione dalla quale viene prelevato il campione per le analisi. Sulla base delle efficienze del processo di nitrificazione è comunque possibile affermare il mantenimento di una concentrazione complessiva di solidi all'interno dei comparti areati (vasca di nitrificazione e di filtrazione) compresa nel range 2300-2800 mg SST L⁻¹ (Figura 3-49).

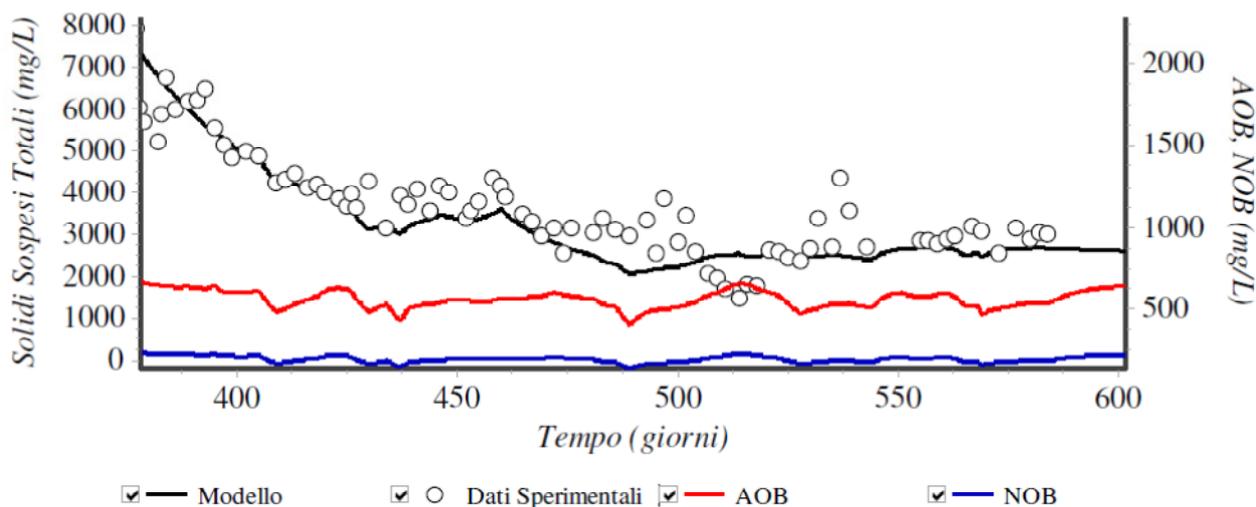


Figura 3-50 - Side-Stream. Dati sperimentali e modello relativi alla concentrazione di SST. Risposta del modello in termini di concentrazione di biomassa attiva AOB e NOB

In Figura 3-49 sono riportate, oltre all'andamento dei solidi totali nel tempo, le concentrazioni di biomassa attiva AOB e NOB determinate dal modello. I valori di tali concentrazioni risultano fondamentali allo scopo di poter applicare in maniera corretta il modello stesso ai dati sperimentali di ammonio misurati nel corso dei test batch e titrimetrici mediante i quali è stato possibile effettuare la caratterizzazione cinetica della biomassa.

3.7.2 Filiera Main-Stream: Impianto MBR

Analogamente a quanto fatto per l'impianto Side-Stream, il modello ASMN è stato utilizzato per descrivere la capacità di nitrificazione dell'impianto MBR della filiera Main-Stream. In questo caso oltre ad ottenere informazioni circa la caratterizzazione cinetica della biomassa ammonio ossidante e a determinare la concentrazione di biomassa attiva AOB all'interno delle vasche di processo, l'applicazione del modello risulta fondamentale allo scopo di valutare l'efficacia del processo di bioaugmentation in termini di incremento della capacità nitrificante.

Il primo obiettivo è stato quello di calibrare, in assenza di bioaugmentation, il rateo massimo specifico di crescita della biomassa ammonio ossidante ($\mu_{\max, AOB}$) e la costante di semisaturazione dell'ammonio (K_{NH}) in modo tale da poter valutare l'effettiva selezione di biomasse nitrificanti diverse, dal punto di vista cinetico, nei due impianti. La calibrazione è stata dunque effettuata sui valori sperimentali di ammonio in uscita dall'impianto MBR nel periodo compreso tra il giorno 300 ed il giorno 444 (Figura 3-51).

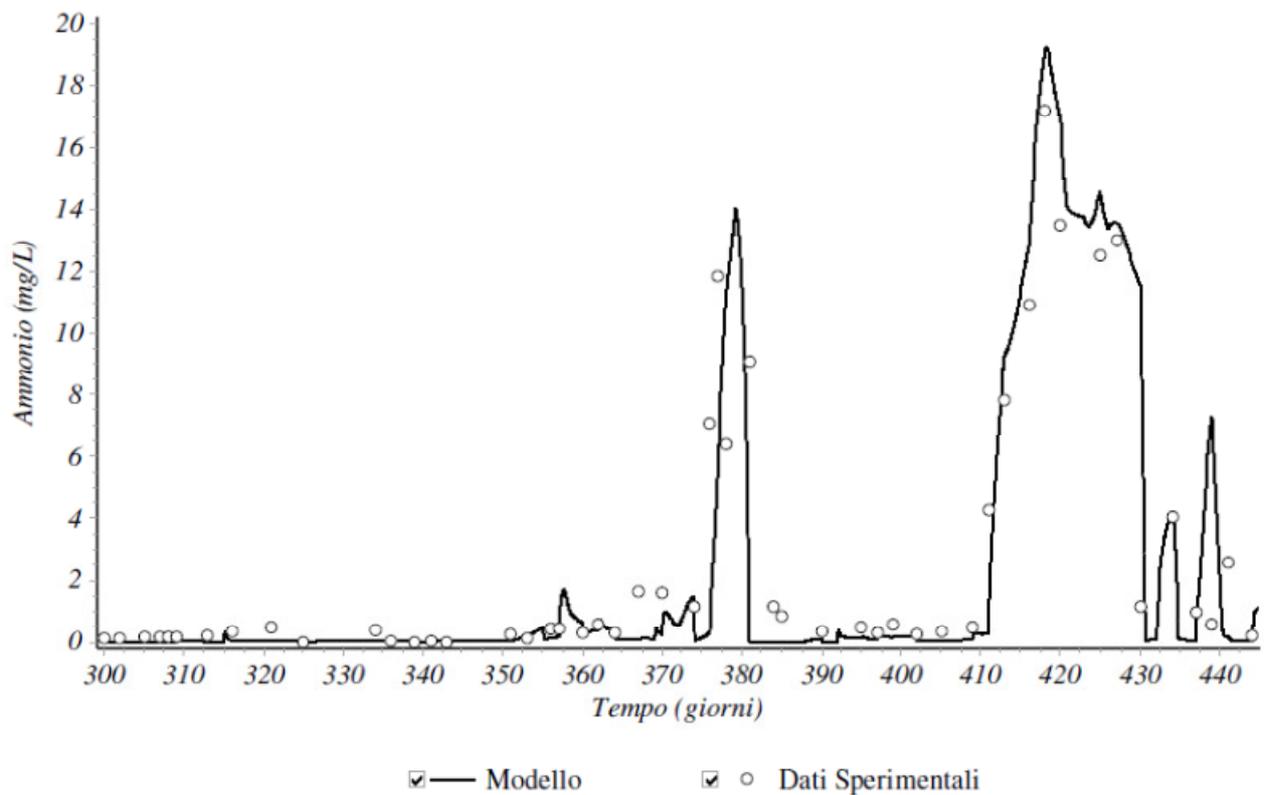


Figura 3-51 - MBR - Ammonio. Dati sperimentali e modello

Il risultato riportato in Figura 3-51 è stato ottenuto implementando i parametri cinetici della biomassa AOB, NOB ed eterotrofa riportati in Tabella 3-4. Per quanto concerne i parametri non espressamente riportanti si fa riferimento a quelli determinati da Hiatt e Grady (2008), Tabella 2-12.

Tabella 3-4 – Parametri del modello riferiti alla temperatura di 20°C.

Parametro	Valore	Unità di misura	Riferimenti
$\mu_{\max, \text{AOB}}$	0.85	d^{-1}	<i>Calibrato</i>
$\mu_{\max, \text{NOB}}$	0.77	d^{-1}	<i>Rostron et al., 2001</i>
$\mu_{\max, \text{HET}}$	6	d^{-1}	<i>Salem et al., 2003</i>
K_{NH}	0.39		<i>Calibrato</i>
b_{AOB}	0.17	d^{-1}	<i>Jubani et al., 2008</i>
b_{NOB}	0.17	d^{-1}	<i>Jubani et al., 2008</i>
b_{HET}	0.24	d^{-1}	<i>Salem et al., 2003</i>
Y_{AOB}	0.17	--	<i>Salem et al., 2003</i>
Y_{NOB}	0.07	--	<i>Salem et al., 2003</i>
Y_{HET}	0.63	--	<i>Salem et al., 2003</i>
$\Theta_{\mu_{\text{AOB}}}$	1.088	--	<i>Calibrato</i>
$\Theta_{\mu_{\text{NOB}}}$	1.012	--	<i>Calibrato</i>
$K_{i\text{NH}}$	70	mg L^{-1}	<i>Jubani et al., 2008</i>

In Figura 3-52 e 3-53 sono riportati gli andamenti nel tempo dei nitriti e dei nitrati in uscita dall'impianto MBR: tranne casi occasionali, il modello approssima correttamente i dati sperimentali confermando la bontà della calibrazione.

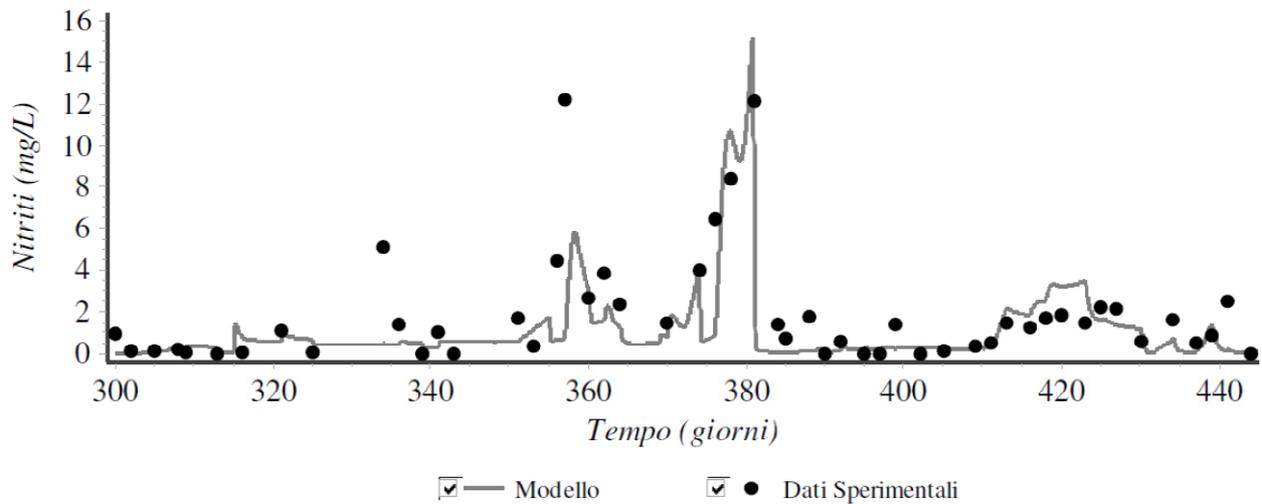


Figura 3-52 - MBR in assenza di bioaugmentation. Andamento dei nitriti nel tempo: Dati sperimentali e modello

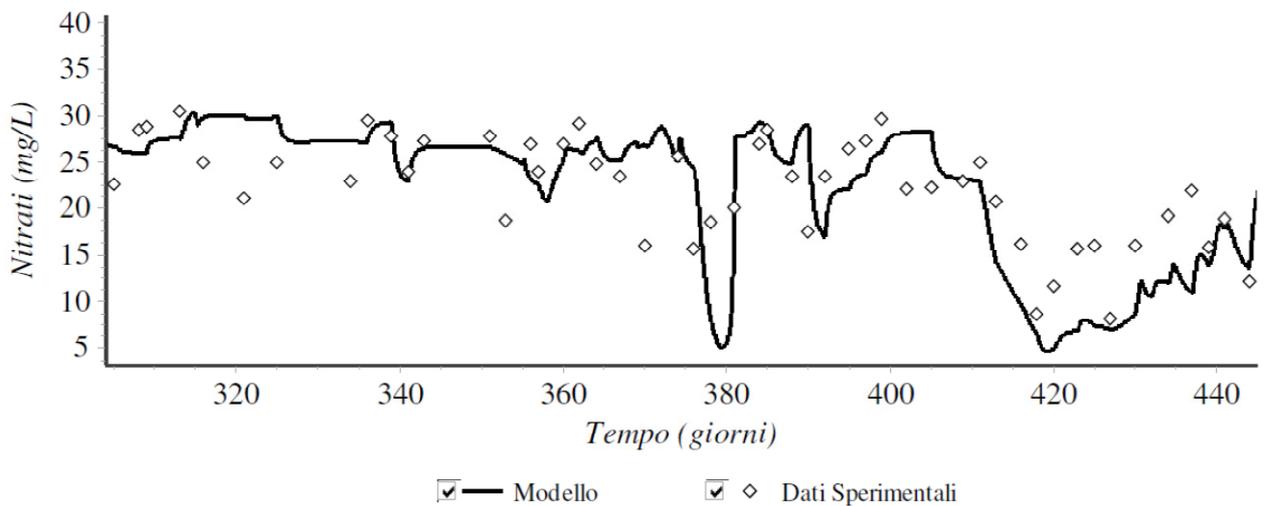


Figura 3-53 - MBR in assenza di bioaugmentation. Andamento dei nitrati nel tempo: Dati sperimentali e modello

Successivamente alla validazione del modello sui risultati ottenuti in assenza di bio-augmentation, l'obiettivo è stato quello di modellizzare il processo stesso di bio-arricchimento per evidenziare le differenze in termini di efficienza del processo di nitrificazione tra la presenza e l'assenza di inoculo continuo di biomassa dalla filiera Side-Stream all'impianto MBR della filiera Main-Stream. La presenza di un effetto positivo del bio-arricchimento è evidente anche solo facendo riferimento alla differenza tra i dati sperimentali e le risposte del modello che non prevede la bio-augmentation, nel periodo in cui la bio-augmentation è rimasta attiva, dal giorno 444 al giorno 600 (Figura 3-54).

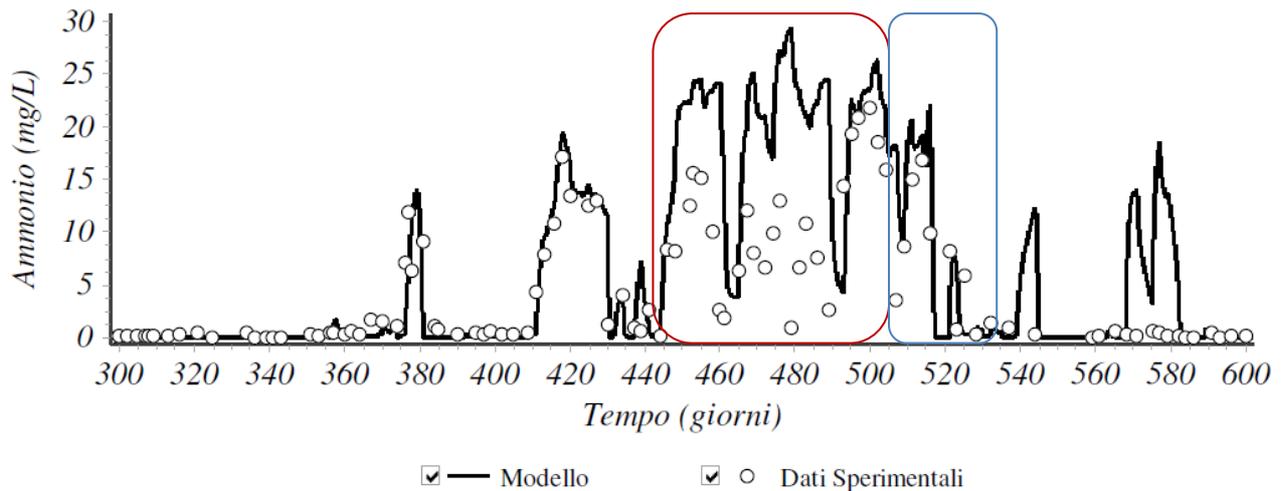


Figura 3-54 – MBR: Ammonio nell’effluente. Dati sperimentali e risposta del modello senza tener conto della presenza della bio-augmentation

Dal confronto tra i dati sperimentali e la risposta del modello è evidente come, a partire dal giorno 444 la differenza tra le due serie di dati aumenti significativamente sottolineando la maggiore efficacia dell’effettivo processo di nitrificazione rispetto a quello teorico descritto dal modello. A partire dal giorno 510, tuttavia, il modello riesce a descrivere correttamente i dati sperimentali almeno fino al giorno 540 benché il processo di inoculo dal Side-Stream sia ancora attivo. Dal giorno 540 fino al giorno 600 l’andamento reale e teorico dell’ammonio tendono a discostarsi nuovamente.

L’inoculo di biomassa all’interno degli impianti della filiera Main-Stream avviene, dal punto di vista pratico, tramite l’azione di pompe peristaltiche che suddividono equamente i 3 L giorno⁻¹ di fango di supero dell’impianto Side-Stream tra l’impianto CAS e l’MBR.

Allo scopo di chiarirne l’inserimento all’interno del modello è necessario definire alcuni aspetti alla base del processo di bioaugmentation considerato:

- La biomassa inoculata, una volta immessa all’interno della filiera Main-Stream si comporta, dal punto di vista cinetico, come la biomassa autoctona. Tale assunzione si basa sui risultati ottenuti dall’esecuzione dei test cinetici batch (paragrafo 3.5) effettuati sulla biomassa dell’impianto MBR in presenza ed in assenza di bio-arricchimento: l’inoculo di nitrificanti dall’impianto Side-Stream non comporta alcuna variazione né del rateo massimo di crescita specifica né della costante di semi-saturazione per il substrato. L’incremento dell’efficienza di nitrificazione è quindi attribuibile esclusivamente all’incremento della concentrazione di biomassa nitrificante all’interno del comparto aerobico dell’impianto MBR.

- L'attività della biomassa inoculata, una volta all'interno dell'impianto MBR, è funzione della temperatura, ma unicamente di quella presente all'interno delle vasche di processo dell'impianto ricevente. Non si tiene conto, quindi di eventuali shock termici legati al passaggio tra i due impianti e del relativo effetto sulle cinetiche di crescita della biomassa inoculata.
- La biomassa non subisce, una volta inoculata, alcuna perdita di efficienza legata a fenomeni di predazione o in generale, alle diverse condizioni operative presenti nell'impianto inoculato rispetto a quello di origine.

Il processo di inoculo di biomassa (AOB, NOB ed eterotrofi) è considerato, analogamente a quanto proposto da Salem et al. (2003), mediante la definizione del coefficiente k_{add} espresso come massa di microrganismi inoculati nell'unità di tempo per volume di reattore ($\text{mg m}^{-3} \text{d}^{-1}$), Eq. 1-23.

La presenza di un flusso costante di biomassa attiva in ingresso comporta, allo stato stazionario un incremento della concentrazione di nitrificanti all'interno delle vasche dell'impianto inoculato. La concentrazione di biomassa attiva in assenza ed in presenza di bioaugmentation è determinata facendo riferimento alle Eq. 3-1 e 3-2.

$$X_a = \frac{\theta_x}{\theta} \cdot \frac{Y_{AOB} \cdot (N^0 - N)}{1 + b_{AOB} \cdot \theta_x} \quad [\text{Eq. 3-1}]$$

$$X_a = \frac{\theta_x}{\theta} \cdot \frac{Y_{AOB} \cdot (N^0 - N)}{1 + (b_{AOB} - k_{add}) \cdot \theta_x} \quad [\text{Eq. 3-2}]$$

Dove:

θ : Tempo di ritenzione idraulica

θ_x : Età del Fango

Y_{AOB} : Fattore di resa della biomassa ammonio ossidante

N^0, N : Concentrazione di ammonio in ingresso ed in uscita

b_{AOB} : Coefficiente di decadimento endogeno biomassa ammonio ossidante

k_{add} : Rateo di inoculo della biomassa ammonio ossidante.

In Figura 3-55 sono riportati l'andamento dell'ammonio nel tempo misurato sull'effluente dell'impianto MBR e la risposta del modello in cui si tiene conto della presenza dell'inoculo di biomassa dall'impianto Side-Stream.

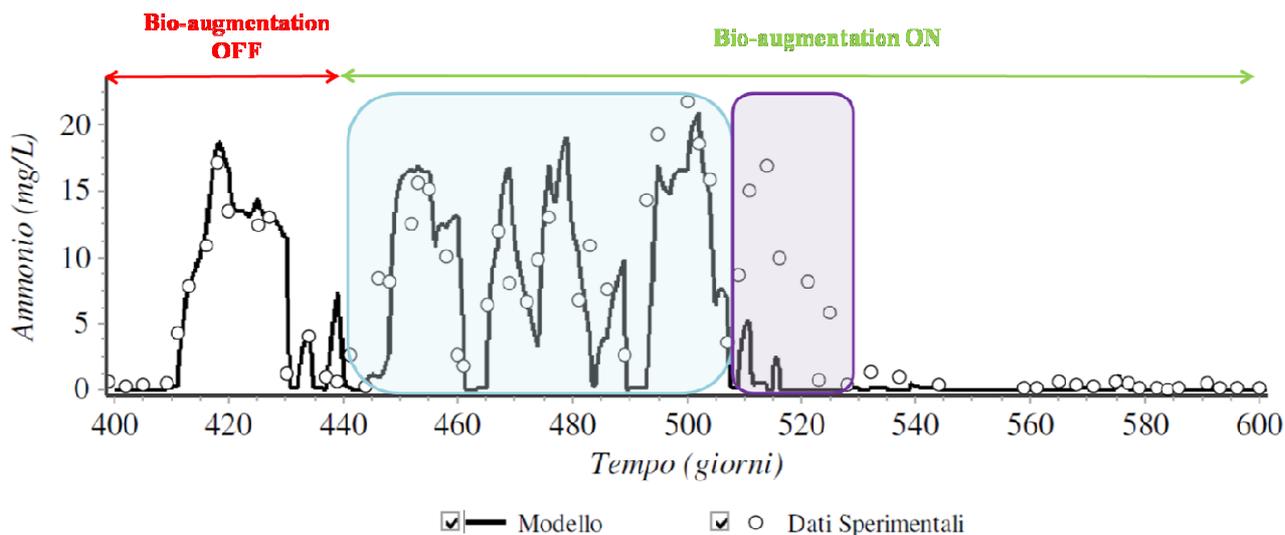


Figura 3-55 – MBR: Ammonio nell’effluente. Dati sperimentali e risposta del modello che prevede la presenza di bioaugmentation

La presenza di bio-augmentation permette al modello di seguire correttamente i dati sperimentali fino al giorno 510 e dal giorno 540 fino all’interruzione dell’inoculo. Allo scopo di chiarire i motivi alla base dell’errata interpretazione dei dati compresi tra i giorni 510 e 540 è necessario porre l’attenzione sull’andamento nel tempo della temperatura all’interno dell’impianto MBR.

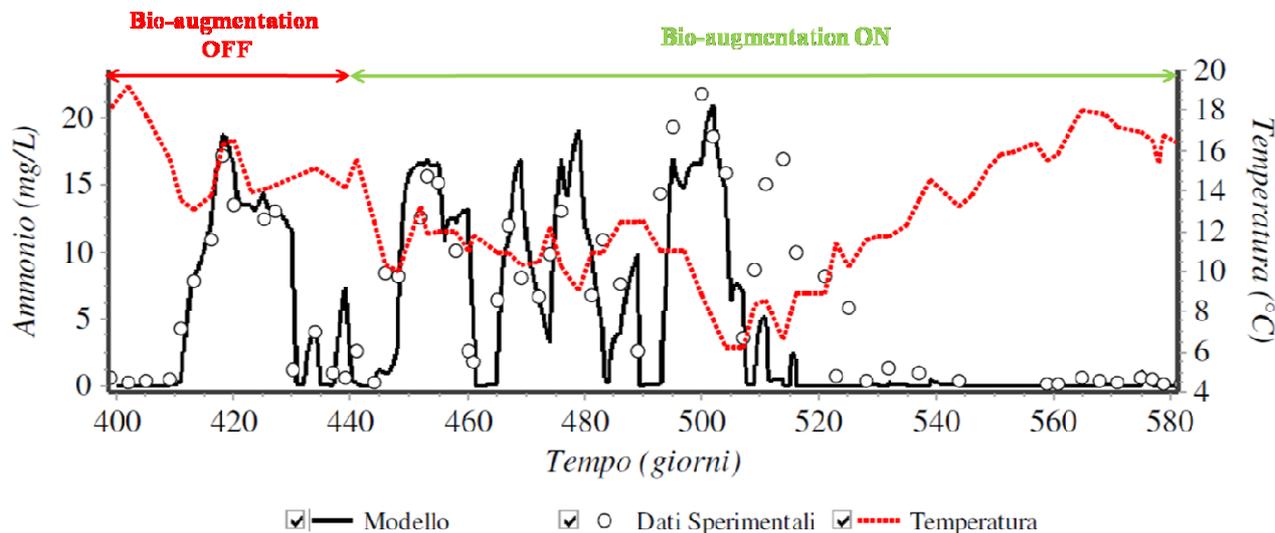


Figura 3-56 - MBR: Ammonio nell’effluente e Temperatura in vasca di nitrificazione. Dati sperimentali e risposta del modello che prevede la presenza della bio-augmentation

Come si può osservare dalla Figura 3-56 nel periodo compreso tra il giorno 505 ed il giorno 520 si verificano all’interno dell’impianto le temperature più basse registrate nel corso dell’intera

sperimentazione le quali arrivano a scendere anche al di sotto dei 7 °C. Data la costanza di tutte le condizioni operative controllate nel periodo di riferimento è possibile individuare nella temperatura il motivo che causa la mancata descrizione delle effettive efficienze di nitrificazione da parte del modello.

La dipendenza dalla temperatura delle cinetiche di crescita della biomassa ammonio ossidante adottata all'interno del modello non è evidentemente sufficiente a descrivere i dati sperimentali. Per meglio chiarire come la temperatura possa influenzare il processo di bio-augmentation non è quindi sufficiente fare riferimento ai valori di temperatura presenti nell'MBR. L'ipotesi è che sia necessario considerare l'effetto del cambio di temperatura che la biomassa inoculata dall'impianto Side-Stream subisce una volta all'interno dell'MBR. Nel corso di questa sperimentazione, l'impianto Side-Stream è mantenuto costantemente alla temperatura di 20 ± 0.2 °C. Nel periodo in esame, quindi, la biomassa inoculata subisce uno shock termico medio di circa 12 °C.

Head e Oleskiewicz hanno dimostrato come un repentino abbassamento della temperatura possa compromettere l'attività nitrificante della biomassa arrivando a stimare una riduzione del $58 \pm 8,2$ % a seguito di un passaggio da 20°C a 10°C.

Confrontando i risultati ottenuti senza considerare la bioaugmentation all'interno del modello con quelli ottenuti inserendo il processo di bioaugmentation (Figura 3-55 e 3-57) risulta, nel caso studiato, una riduzione dell'attività nitrificante inoculata dall'impianto Side-Stream prossima al 80% quando il salto termico tra i due impianti è mediamente pari a 12°C.

Come evidente dalla Figura 3-57, analogamente a quanto avviene per l'ammonio, il modello non spiega correttamente neppure i dati sperimentali relativi ai nitrati in uscita dall'impianto nell'intorno del giorno 510, indicando un effetto significativo del salto termico tra l'impianto Side-Stream e l'MBR oltre che per la biomassa ammonio ossidante, anche per quella nitrito-ossidante.

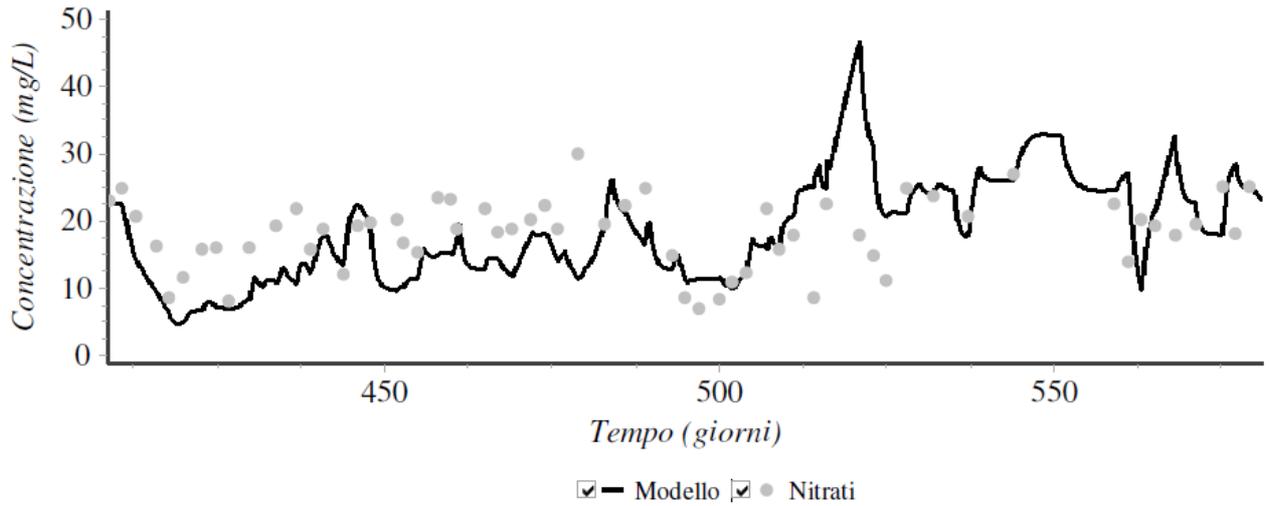


Figura 3-57 – MBR: Nitrati: Dati sperimentali e risposta del modello che prevede la presenza di bioaugmentation

L'andamento nel tempo della concentrazione di Solidi Sospesi Totali all'interno dell'impianto MBR e la concentrazione di biomassa attiva AOB e NOB determinata dal modello è riportata in Figura 3-58.

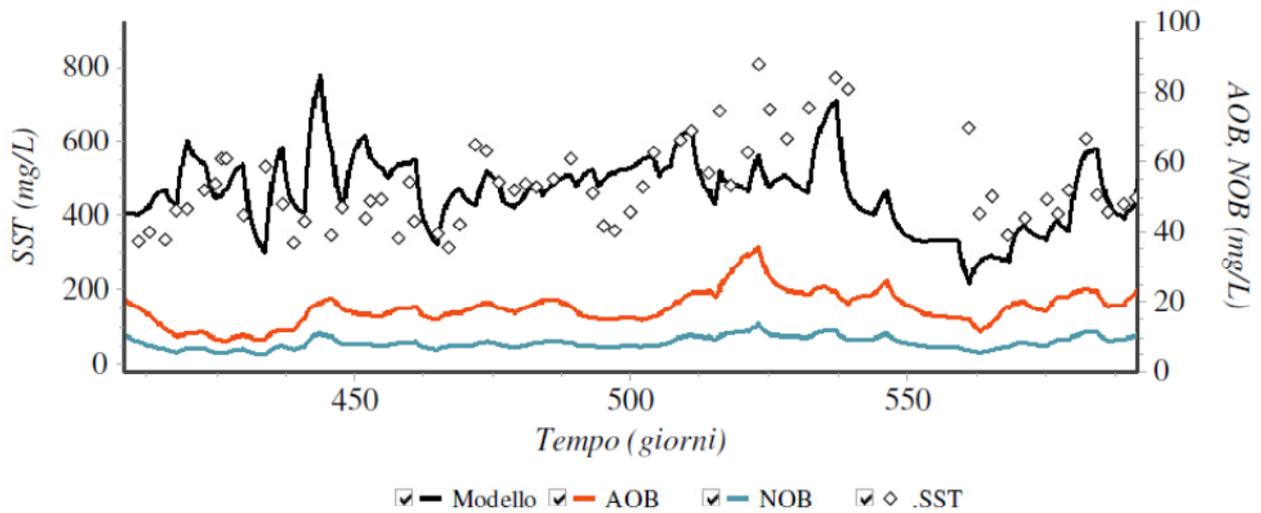


Figura 3-58 – MBR: Solidi Totali, AOB e NOB. Dati Sperimentali e risposta del modello che prevede la presenza di bioaugmentation

L'effetto della concentrazione dell'inoculo in continuo di biomassa all'interno dell'MBR sulla concentrazione di biomassa attiva ammonio ossidante è riportato in Figura 3-59.

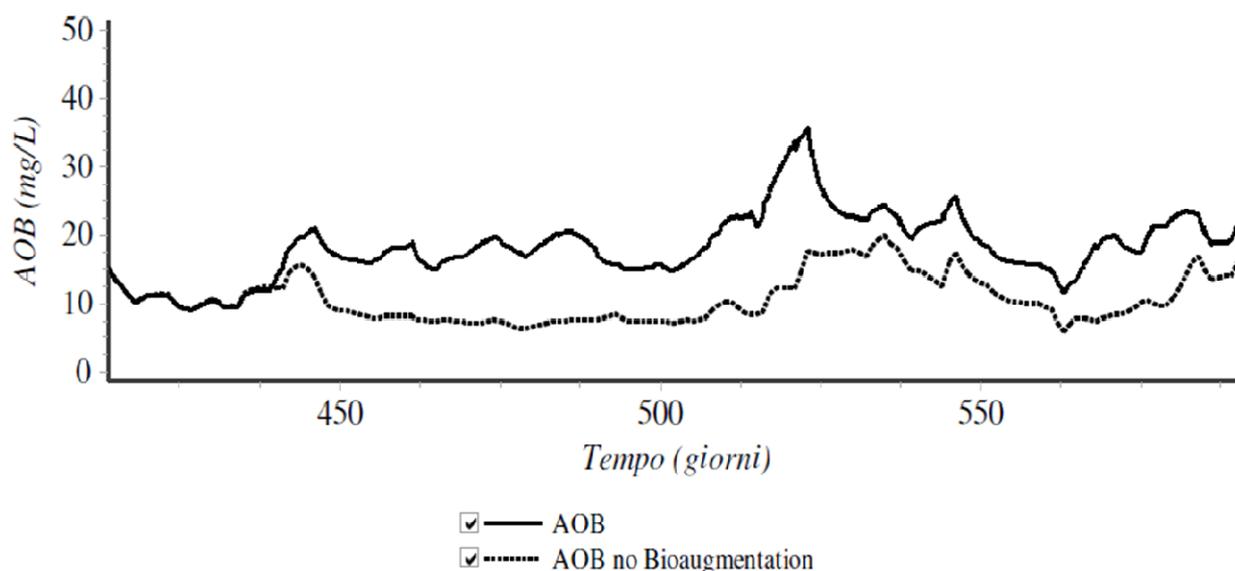


Figura 3-59 – MBR: Concentrazione della biomassa AOB in presenza ed in assenza di bioaugmentation

La concentrazione di AOB in assenza di bioaugmentation risulta prossima a 10 mg/L e tenderebbe a rimanere costante all'interno dell'impianto, in assenza di inoculo, almeno fino al giorno 520 quando si è verificata per una durata di 2 giorni una riduzione incontrollata della portata di spurgo che passa da circa 150 L al giorno a circa 80 L al giorno. In presenza di bio-augmentation la concentrazione medi ad AOB nel periodo di riferimento è di circa 18 mg L⁻¹. L'effetto della bioaugmentation è, dunque, tale da comportare un aumento significativo della biomassa ammonio ossidante che, nel periodo tra i giorni 450 e 500 subisce un incremento medio del 55%.

3.8 Test titrimetrici

Il carattere innovativo della tecnica di monitoraggio del processo di nitrificazione mediante l'esecuzione di test titrimetrici in continuo ha reso necessaria una serie di test fondamentali per la messa a punto dell'apparecchiatura sperimentale e la definizione delle condizioni operative ottimali per l'esecuzione delle prove. Al termine della prima fase di test è stato quindi possibile identificare le condizioni ottimali per la determinazione del rateo massimo di nitrificazione della biomassa prelevata dall'impianto MBR della filiera Main-Stream in termini di concentrazione delle soluzioni di perossido di idrogeno e di idrossido di sodio, portata e concentrazione della soluzione di ammonio, concentrazione di inibente per l'ottenimento della completa inibizione del processo di

nitrosazione, tempo di residenza idraulica all'interno dei CSTR. Tali condizioni, mantenute costanti nel corso dei diversi test effettuati sono riportate in Tabella 2-17.

In Figura 3-60 è riportato a titolo esemplificativo un confronto tra i ratei di dosaggio della soluzione di NaOH e di H₂O₂ tra il reattore non inibito ed il reattore in cui è stata dosata ATU. In tutti i test effettuati il dosaggio dei reagenti allo stato stazionario può essere approssimato ad una retta con un errore inferiore allo 0,01 %.

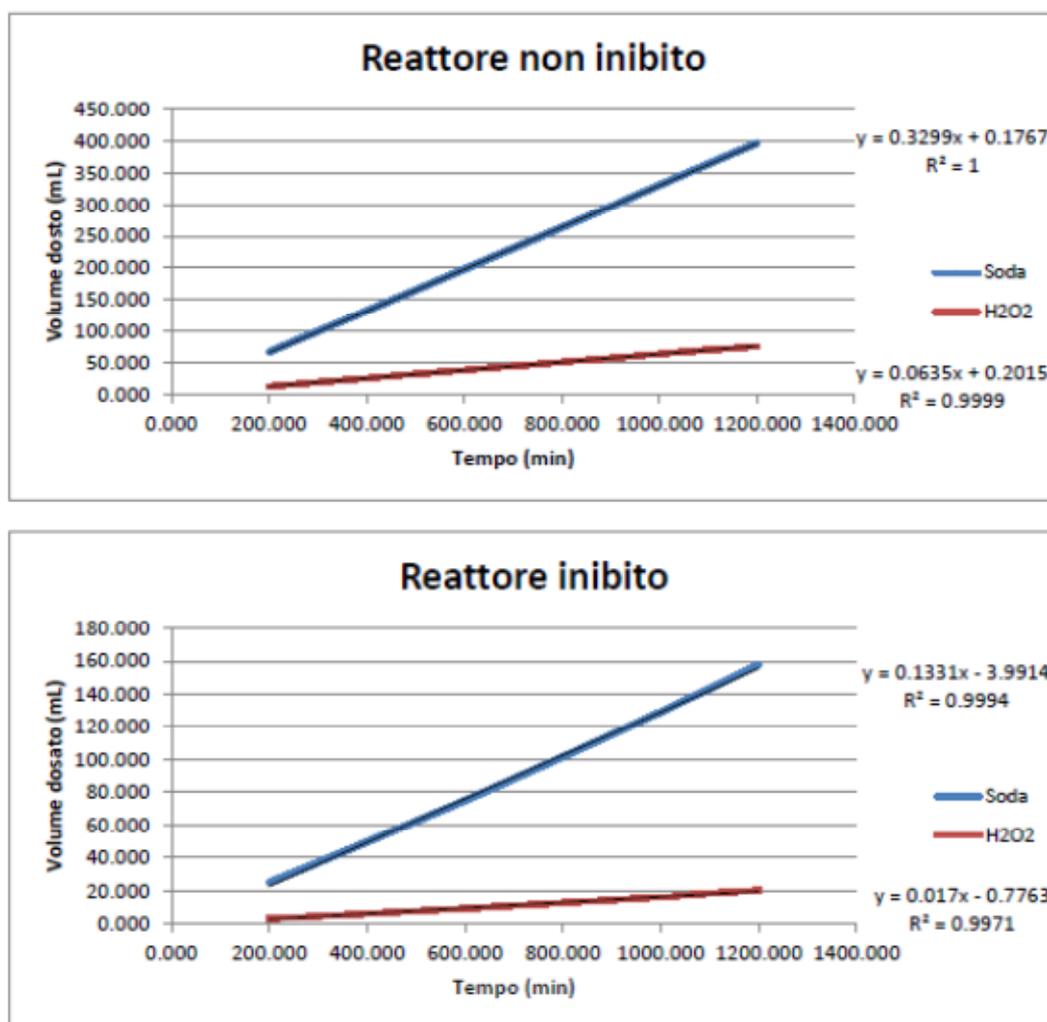


Figura 3-60– Output del sistema di acquisizione ed elaborazione dati. Confronto tra i risultati relativi ai due reattori, non inibito ed inibito.

Dalla differenza tra le pendenze dei dosaggi cumulati di NaOH, note la concentrazione della soluzione dosata e i coefficienti stechiometrici del processo di nitrosazione è possibile determinare il rateo di nitrificazione, che, date le condizioni di substrato ed ossigeno non limitanti e non inibenti, rappresenta il rateo massimo di nitrificazione della biomassa presente al momento del test all'interno dell'impianto MBR della filiera Main-Stream.

Allo scopo di validare i risultati e conseguentemente la tecnica di monitoraggio di processo utilizzata, i reati massimi di nitrificazione (r_{max}) ottenuti con i test titrimetrici sono stati confrontati con quelli determinati attraverso un bilancio di massa dei composti azotati tra l'ingresso e l'uscita dei due reattori CSTR che costituiscono il titrimetro.

Noto la concentrazione di nitriti e nitrati in ingresso ed in uscita dal sistema, essendo il sistema strettamente aerobico è infatti possibile determinare la frazione di ammonio ossidata a nitrito all'interno del CSTR allo stato stazionario, secondo l'equazione Eq. 3-3:

$$r_{max} = \frac{(NO_{3,OUT} + NO_{2,OUT}) + (NO_{3,IN} + NO_{2,IN})}{HRT} \cdot V_{CSTR} \quad [\text{Eq. 3-3}]$$

I valori di r_{max} determinati nel corso dei test sono riportati in Figura 3-61.

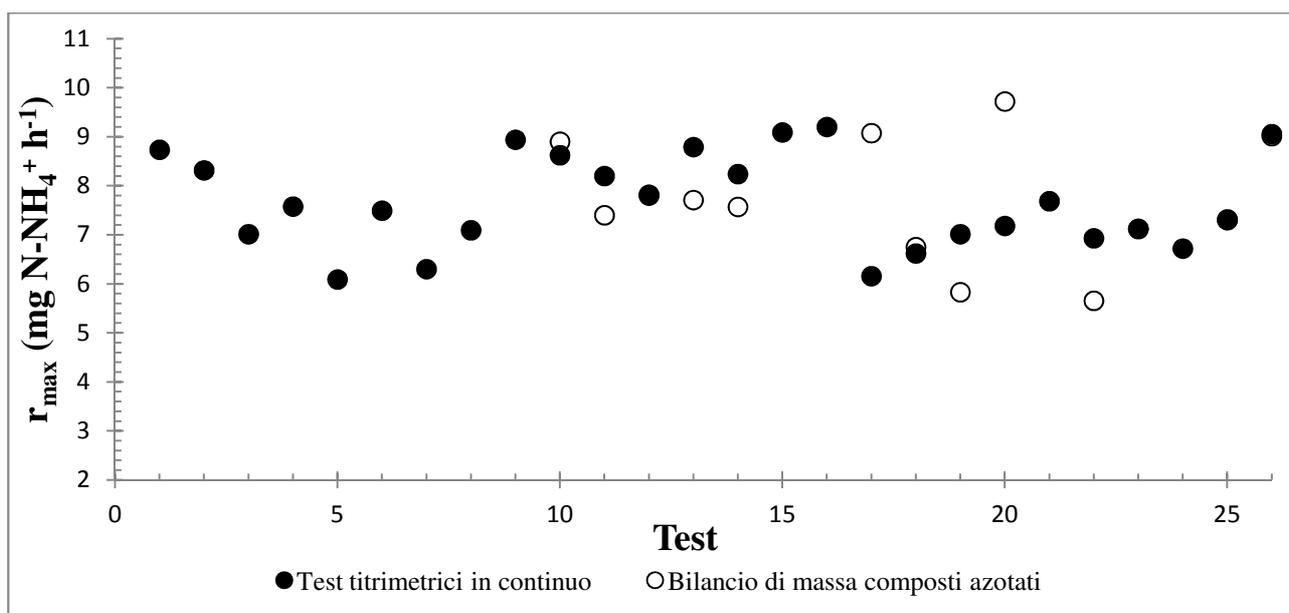


Figura 3-61 – Rateo massimo di nitrificazione ottenuto mediante test titrimetrici in continuo e bilancio di massa dei composti azotati

Complessivamente, con l'esecuzione dei test titrimetrici e attraverso il bilancio di massa dei composti azotati sono stati ottenuti valori medi di r_{max} pari, rispettivamente a 7.66 ± 0.96 mg N-NH₄⁺ h⁻¹ e 7.68 ± 1.23 mg N-NH₄⁺ h⁻¹. La differenza molto limitata tra i valori del rateo di nitrificazione determinati con i test titrimetrici e attraverso un bilancio di massa allo stato stazionario dei composti azotati è tale da confermare la possibilità di utilizzare la tecnica testata come un efficace strumento di controllo on-line del processo di nitrificazione.

Il modello ASMN è stato successivamente applicato, allo stato stazionario, in modo tale da effettuare una caratterizzazione cinetica della biomassa MBR. Nel corso dei test, la concentrazione di ammonio all'interno dei CSTR è stata mantenuta sempre superiore a 15 mg L^{-1} in modo tale da non permettere l'instaurazione di concentrazioni limitanti di substrato. Tale condizione, tuttavia, non permette una corretta calibrazione della costante di semi-saturazione. Per la calibrazione del rateo massimo di crescita specifica della biomassa AOB è stato quindi necessario assumere come valore di K_{NH} quello determinato a seguito dell'esecuzione di test cinetici batch. Il tempo di ritenzione idraulica ($\text{HRT} = 1 \text{ h}$) dei CSTR è tale da non permettere un incremento della concentrazione di biomassa attiva che nel corso della prova che è stata, dunque, assunta costante e pari a quella determinata dall'applicazione del modello ASMN ai dati sperimentali ottenuti nel corso del monitoraggio dell'impianto MBR. In Figura 3-62 sono riportati i valori di $\mu_{\text{max,AOB}}$ calibrati sul rateo massimo di nitrificazione determinato mediante i test titrimetrici in continuo imponendo alla biomassa AOB i parametri cinetici riportati in Tabella 3-5.

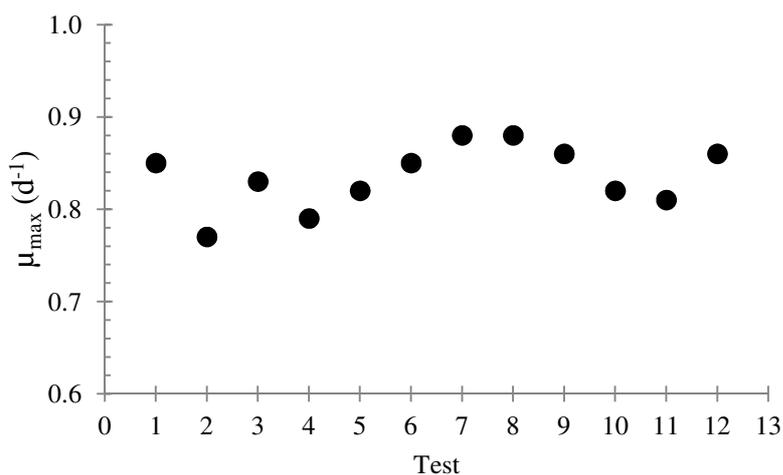


Figura 3-62 – Valori di $\mu_{\text{max,AOB}}$ calibrati mediante l'applicazione del modello ASMN sui dati sperimentali relativi ai ratei di nitrificazione ottenuti mediante test titrimetrici in continuo.

Tabella 3-5– Parametri del modello ASMN riferiti alla temperatura di 20°C.

Parametro	Valore	Unità di misura	Riferimenti
$\mu_{\max, \text{AOB}}$	0.85	d^{-1}	<i>Calibrato</i>
$\mu_{\max, \text{NOB}}$	0.77	d^{-1}	<i>Ronstron et al., 2005</i>
$\mu_{\max, \text{HET}}$	6	d^{-1}	<i>Salem et al., 2003</i>
K_{NH}	0.39		<i>Questa sperimentazione</i>
b_{AOB}	0.17	d^{-1}	<i>Jubani et al., 2008</i>
b_{NOB}	0.17	d^{-1}	<i>Jubani et al., 2008</i>
b_{HET}	0.24	d^{-1}	<i>Salem et al., 2003</i>
Y_{AOB}	0.17	--	<i>Salem et al., 2003</i>
Y_{NOB}	0.07	--	<i>Salem et al., 2003</i>
Y_{HET}	0.63	--	<i>Salem et al., 2003</i>
$\Theta_{\mu_{\text{AOB}}}$	1.088	--	<i>Calibrato</i>
$\Theta_{\mu_{\text{NOB}}}$	1.012	--	<i>Calibrato</i>
K_{NH}	70	mg L^{-1}	<i>Jubani et al., 2008</i>

Dall'applicazione del modello ASMN ai risultati dei test titrimetrici risulta un rateo massimo di crescita specifica della biomassa ammonio ossidante pari a $0.84 \pm 0.027 \text{ d}^{-1}$. La differenza tra il valore di $\mu_{\max, \text{AOB}}$ determinati mediante esecuzione dei test titrimetrici in continuo e test cinetici convenzionali risulta inferiore al 2% confermando la possibilità di utilizzare la titrimetria on-line in continuo non solo come un'efficace sonda per il processo di nitrificazione ma anche come strumento di analisi cinetica della biomassa nitrificante.

3.9 Valutazione dell'effetto di rapide variazioni di temperatura sul massimo rateo di nitrificazione

Nel corso della sperimentazione, l'effetto di rapide variazioni della temperatura sulle capacità nitrificanti della biomassa dell'impianto MBR è stata valutata mediante l'esecuzione di test titrimetrici in continuo. Oltre a quanto previsto nella procedura per la determinazione del rateo massimo di nitrificazione, in questo caso si rende necessario variare nel tempo la temperatura all'interno dei CSTR sfruttando la presenza del criotermostato e del sistema di regolazione della temperatura.

Complessivamente sono stati effettuati 18 test: 13 in cui è stata valutato l'effetto della velocità di riduzione della temperatura e 5 in cui si è valutato l'effetto della velocità di risalita della temperatura.

Per ogni test, sulla base delle risposte fornite dal titrimetro in termini di dosaggio di soda all'interno dei due reattori è stato possibile determinare il coefficiente θ in grado di spiegare i risultati sperimentali mediante l'applicazione di un'equazione del tipo di Arrhenius secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.6.2.3.

In Tabella 3-6 sono riportate le condizioni operative dei test effettuati.

Tabella 3-6 – Temperatura iniziale, finale e rateo di variazione adottati nei test

Test	Temperatura iniziale (°C)	Temperatura finale (°C)	dT/dt (°C h ⁻¹)
1	18	10	1.20
2	18	10	1.86
3	17	10	2.02
4	18	10	2.12
5	18	9	2.40
6	18	10	2.64
7	18	10	2.88
8	16	10	3.06

9	16	11	3.12
10	16	10	3.30
11	18	12	3.54
12	18	12	3.72
13	16	10	4.02
14	10	18	1.25
15	10	16	1.4
16	10	16	1.24
17	10	18	1.25
18	10	18	1.15

La biomassa in ingresso al reattore, indipendentemente dalla velocità con cui poi viene variata la temperatura, subisce uno shock termico istantaneo pari alla differenza tra la temperatura di ingresso (quella dal Main-Stream) e la temperatura presente all'interno dei CSTR al momento dell'ingresso. Nel corso di ogni test, dunque il salto termico ΔT aumenta (o diminuisce) con una velocità pari a dT/dt .

Considerando il coefficiente di Arrhenius costante all'interno del range di temperatura testato è possibile confrontare i valori calibrati per ogni singolo test effettuato e valutare l'influenza della velocità di variazione della temperatura sul θ stesso (Figura 3-63).

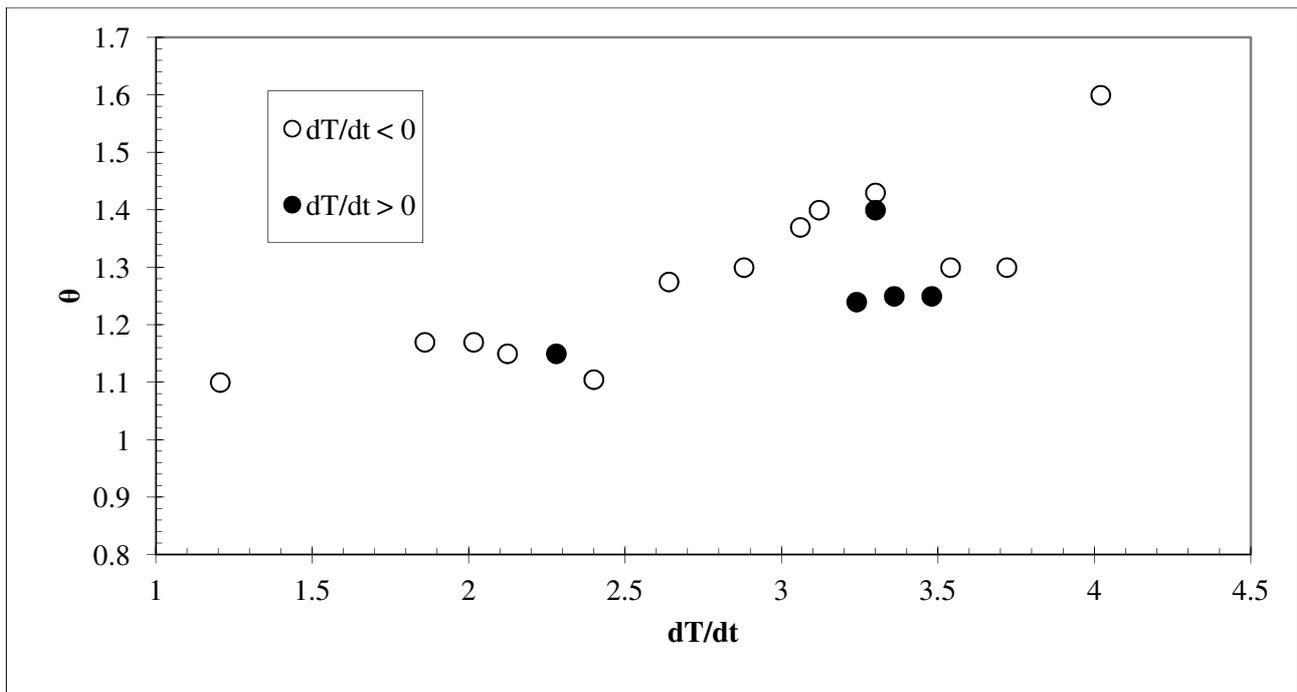


Figura 3-63 – Variazione del coefficiente θ di Arrhenius in funzione della velocità di variazione della temperatura

Ciò che risulta evidente dalla Figura 3-63 è che all'aumentare della velocità di variazione di temperatura (indipendentemente dal fatto che si tratti di un processo di riscaldamento o di raffreddamento) il coefficiente di Arrhenius aumenta comportando, di conseguenza, una maggiore riduzione del rateo di nitrificazione a parità di salto termico, ad esempio tra due sistemi come il Side-Stream ed il Main-Stream.

I risultati dei test confermano, quindi, l'ipotesi che il rateo di nitrificazione della biomassa AOB non dipenda esclusivamente dalla temperatura attuale ma risenta in maniera determinante del salto termico passato e della velocità con cui ha avuto luogo e spiegano il continuo aumento della differenza tra le efficienze di nitrificazione misurate sperimentalmente e le risposte del modello all'aumentare del salto termico tra l'impianto Side-Stream e l'MBR della filiera Main-Stream (paragrafo 3.7.2).

Conclusioni

L'obiettivo della presente tesi è stato quello di studiare a scala pilota il processo di bioaugmentation mediante l'utilizzo di un impianto MBR (Side-Stream) dove possa essere selezionata, ad elevate concentrazioni, biomassa nitrificante caratterizzata da elevate cinetiche di crescita e di due impianti (MBR e CAS) in cui tale biomassa è stata inoculata.

L'efficacia della bioaugmentation è stata valutata mediante il monitoraggio dei parametri di processo dei tre impianti pilota, confrontando i rendimenti del processo di nitrificazione degli impianti della filiera Main-Stream in assenza ed in presenza di inoculo in continuo di biomassa nitrificante proveniente dall'impianto Side-Stream.

L'impianto MBR della filiera Main-Stream, garantendo la completa ritenzione dei solidi presenti in vasca permette un controllo migliore delle condizioni di processo e, in particolar modo, dell'età del fango. La gestione dell'impianto CAS è risultata, di contro, estremamente difficoltosa a causa delle continue fuoriuscite di solidi con l'effluente ed i conseguenti interventi volti al mantenimento di un'età del fango più costante possibile.

La maggiore stabilità dell'impianto MBR ha effetto sulle efficienze del processo di ossidazione dell'azoto ammoniacale che risultano del 91% e del 77% quando si verificano temperature medie pari rispettivamente a 17 e 14,5°C. Per quanto riguarda l'impianto CAS l'efficienza del processo di nitrosazione risulta del 85% a temperature di 19 °C e del 63% a 15°C. Per temperature superiori a 20°C entrambi gli impianti permettono il raggiungimento di efficienze di rimozione superiori al 95% anche a basse età del fango (2,5 giorni).

L'introduzione dell'inoculo in continuo di biomassa nitrificante dalla linea Side-Stream comporta, oltre ad una maggiore stabilità del processo, un incremento significativo delle efficienze di rimozione dell'azoto ammoniacale. In presenza di bio-augmentation l'impianto CAS, sebbene operato a SRT vicine alla minima necessaria per garantire la presenza di nitrificanti, garantisce efficienze di rimozione dell'ammonio comprese tra il 47 e il 97 % nel range 8 - 19 °C. Nello stesso range di temperatura le ER dell'impianto MBR risultano comunque maggiori e pari (tra il 54 e il 98%).

L'efficacia dell'inoculo in termini di incremento dell'attività nitrificante complessiva del sistema dipende dalla temperatura presente all'interno dell'impianto inoculato. In presenza di elevate temperature (superiori a 17°C) l'efficienza di rimozione dei sistemi testati, anche in assenza di bio-

arricchimento risulta sempre superiore all'80% e al 90% rispettivamente per il CAS e per l'MBR. Il verificarsi di elevate efficienze fa sì che la presenza del bio-arricchimento non comporti vantaggi significativi ulteriori in termini di efficienza di processo, soprattutto per quanto riguarda l'impianto MBR. Per temperature comprese tra 12 e 15 °C, l'incremento medio di efficienza risulta del 5% e dell'1% rispettivamente per il CAS e per l'MBR. In entrambi i sistemi testati, la massima efficacia della bioaugmentation è stata ottenuta per temperature del mixed liquor comprese tra 15 e 17°C: 11% nell'impianto MBR e 19% nell'impianto CAS.

L'esecuzione di test batch ha permesso di evidenziare le differenze, dal punto di vista cinetico tra la biomassa nitrificante selezionata all'interno delle due filiere. All'interno dell'impianto MBR Side-Stream è stata selezionata una biomassa nitrificante caratterizzata da un rateo massimo di crescita specifica ($\mu_{\max, AOB}$) e da una costante di semisaturazione per il substrato (K_{NH}) rispettivamente pari a $0.95 \pm 0.025 \text{ d}^{-1}$ e $0,8 \pm 0.28 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$. I valori di tali parametri risultano minori per la biomassa AOB selezionata all'interno dell'impianto MBR della filiera MainStream ($\mu_{\max, AOB} = 0.85 \pm 0.015 \text{ d}^{-1}$ e $K_{NH} = 0,4 \pm 0.14 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$).

La differenza in termini di $\mu_{\max, AOB}$ e K_{NH} è confermata tramite la calibrazione di un modello matematico che prevede la presenza del doppio step di nitrificazione ai dati sperimentali ottenuti nel corso della campagna di monitoraggio degli impianti pilota.

Le differenze osservate tra le cinetiche dei nitrificanti nei tre reattori, sono in accordo con le condizioni di processo impostate negli impianti e che miravano alla selezione nel reattore sidestream di nitrificanti dotati di elevate cinetiche di crescita (r-strategist) per rendere più efficace l'inoculo.

La selezione di biomasse diverse, non solo dal punto di vista cinetico ma anche da quello della composizione della comunità batterica è confermato da analisi filogenetiche eseguite sui campioni di mixed-liquor prelevati dalle vasche dei tre impianti pilota nel corso della sperimentazione.

Il grado di diversità microbica dei diversi campioni analizzati è stato valutato mediante l'utilizzo di indici specifici di diversità (Indice di Shannon-Wiener, Indice di Simpson, Indice di Evenness).

Dall'analisi dei risultati relativi ai campioni prelevati in assenza di bioaugmentation, ottenuti mediante l'applicazione di analisi T-RFLP, emerge un'elevata biodiversità dei singoli campioni analizzati, indipendentemente dall'impianto di riferimento. Diversamente da quanto osservato per gli impianti Main-Stream, per i quali l'eterogeneità dell'ecosistema rimane costante nel tempo, all'interno dell'impianto Side-Stream è evidente una riduzione della stessa a seguito dell'avvio della rimozione del fango di supero al termine della fase di start-up; l'abbassamento dell'età del fango,

dunque ha esercitato una pressione selettiva che ha da selettore cinetico limitando la presenza all'interno dell'impianto della sola biomassa in grado di crescere con cinetiche tali da non causarne il wash-out e ridotto l'eterogeneità della comunità batterica.

Dall'analisi qualitativa della composizione della comunità batterica effettuata mediante comparazione dei risultati del sequenziamento del DNA batterico risulta evidente, per l'impianto Side-Stream un processo di selezione di biomassa nitrificante a conferma dei risultati dei test cinetici effettuati sulla stessa biomassa. La frazione di AOB appartenenti al genere *Nitrosomonas* aumenta sensibilmente facendo riferimento dal campione dell'inoculo del sistema (1%), a quello prelevato al termine della fase di start-up (41%) fino a quello prelevato al raggiungimento dello stato stazionario (51%) in accordo con il continuo incremento della capacità nitrificante dell'impianto. I *Nitrosomonas*, dal punto di vista cinetico, appartengono alla categoria degli *r-strategist*, e la loro presenza all'interno dell'impianto è in accordo con i risultati ottenuti nel corso dei test cinetici effettuati sulla biomassa che indicano la presenza in tale impianto di batteri ammonio ossidanti caratterizzati da μ_{max} e K_{NH} maggiori rispetto a quelli che caratterizzano la biomassa dell'impianto MBR della filiera Main-Stream.

Dal confronto dei risultati dell'analisi dei campioni dell'impianto MBR con quelli delle analisi fatte allo stato stazionario sull'impianto Side-Stream emerge una maggiore eterogeneità della comunità microbica dell'impianto MBR indipendentemente dalla presenza della bio-augmentation. L'impossibilità di identificare, tramite sequenziamento, specie batteriche appartenenti agli AOB e il ridotto numero di quelle appartenenti agli NOB (*Nitrosospira*, 1%) all'interno dell'impianto MBR sono in disaccordo con quanto ottenuto in termini di efficienza di nitrificazione sia dal monitoraggio sul lungo periodo dell'impianto MBR che dai test cinetici effettuati e risultano attribuibili al numero limitato di cloni analizzati.

Allo scopo di valutare l'impatto della bioaugmentation sulla selezione batterica all'interno del sistema ricevente, sono state applicate due tecniche di analisi multivariata dei risultati della T-RFLP: DCA (Detrended Correspondence Analysis) e MDS (Non Metric Multidimensional Scaling). In entrambi i casi, i campioni prelevati dagli impianti Main-Stream in assenza di bioaugmentation risultano, dal punto di vista della composizione microbica, molto simili tra loro e significativamente diversi da quelli prelevati dall'impianto Side-Stream. In presenza di bioaugmentation si osserva un cambiamento della comunità batterica presente all'interno degli impianti Main-Stream e una tendenza a aumentare l'omogeneità delle comunità delle tre filiere studiate.

La presenza dell'inoculo, tuttavia, non comporta un cambiamento delle caratteristiche cinetiche della biomassa nitrificante. Da test cinetici effettuati sulla biomassa AOB presente all'interno

dell'impianto MBR della filiera Main-Stream nel periodo in cui la bio-augmentation è attiva, risultano infatti valori di $\mu_{\max, AOB}$ e K_{NH} pari rispettivamente a $0.84 \pm 0.019 \text{ d}^{-1}$ e $0,39 \pm 0.24 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ in linea con quelli ottenuti in assenza di bioaugmentation.

Dall'applicazione del modello ASMN ai dati del monitoraggio degli impianti pilota emerge una netta dipendenza del processo di bioaugmentation dallo shock termico che la biomassa inoculata subisce nel passaggio da un impianto all'altro. In presenza di un salto termico superiore a 12°C si osserva una riduzione dell'attività nitrificante della biomassa inoculata dell'80%.

Per verificare questa osservazione, nel corso della sperimentazione è stato messo a punto un prototipo sperimentale di titrimetro differenziale mediante il quale l'attività batterica è valutata attraverso la determinazione in continuo del rateo massimo di nitrificazione di biomassa AOB. L'ottimizzazione e la validazione di questa tecnica sono stati parte integrante di questa tesi ed hanno permesso di confermare la possibilità di utilizzare la titrimetria on-line in continuo non solo come un'efficace biosensore per il processo di nitrificazione ma anche come strumento di analisi cinetica della biomassa nitrificante.

Da test tritrimetrici specifici è emersa la dipendenza tra la riduzione dell'efficienza di nitrificazione della biomassa, il salto termico che questa subisce e la velocità con cui questo si verifica: maggiore velocità di abbassamento della temperatura, a parità di salto termico, comporta maggiori riduzioni del rateo di nitrificazione.

Tale aspetto non è considerato nell'attuale approccio modellistico al processo di bio-augmentation di biomassa nitrificante e può spiegare l'errata descrizione del processo di nitrificazione da parte del modello utilizzato nel caso in cui il salto termico tra i due sistemi non sia più tale da non comportare variazioni significative del rateo di nitrificazione della biomassa inoculata.

Riferimenti Bibliografici

- Abeysinghe DH., Viraj De Silva DJ, Stahl DA, Rittmann BE. *The Effectiveness of Bioaugmentation in Nitrifying Systems Stressed by a Washout Condition and Cold Temperature*. Water Environ. Res., 74, 187. 2002
- Alcalde M., Ferrer M., Plou FJ., Ballesteros A. *Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes*, Trends in Biotechnology, 24 (6), p.281-287. 2006
- Alvarez VM., Marques JS., Korenblum E., Seldin L. *Comparative bioremediation of crude oil-amended tropical soil microcosms by natural attenuation, bioaugmentation, or bioenrichment*, Appl. Environ. Soil Sci. 1-10. 2011
- Andreottola G., Foladori P., Ferrai M., Ziglio G. *Respirometry for Wastewater Treatment: Principles and Methods*. 2002
- Andreottola G., Foladori P., Ragazzi M. *Upgrading of a small wastewater treatment plant in a cold climate region using a moving-bed biofilm reactor (MBBR) system*. Water Science and Technology, 41, 1, 177-185. 2000
- Anthonisen A., Loehr R., Prakasam T., Srinath E. *Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid*. J. Water Pollut. Control Fed. 48, 5, 835–852. 1976
- Artiga P., Gonzalez F., Mosquera – Corral A., Campos J., Garrido J. *Multiple analysis reprogrammable analyser for the kinetic characterization of nitrifying and autotrophic denitrifying biomass*. Biochemical Engineering Journal, 26, 176-183. 2005
- Barbusiński K, Kościelniak H., *Influence of substrate loading intensity on floc size in activated sludge process*. Water Research, 7, 29. 1994
- Belotte D., Curien J.B., Maclean R.C., Bell G. *An experimental test of local adaptation in soil bacteria*. Evolution, 57: 27–36. 2003
- Bin Z., Baosheng S., Min J, Huina L. *Population dynamic succession and quantification of ammonia-oxidizing bacteria in a membrane bioreactor treating municipal wastewater*. Journal of Hazardous Materials. 165, 796 – 803. 2009
- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Juretschko S., Dore J., Delgenes P. *Ecological study of a bioaugmentation failure*. Environ Microbiol 2: 179–190. 2000
- Campos JL., Garrido-Fernandez JM., Mendez R., Lema JM., *Nitrification at high ammonia loading rates in an activated sludge unit*. Bioresource Technology. 68, 2, 141 – 148. 1999
- Carrera J., Jubany I., Carvallo L., Chamyb R., Lafuente J. *Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilized biomass systems*. Process Biochemistry 39, 1159–1165. 2004
- Carvallo L., Carrera J., Chany R. *Nitrifying activity monitoring and kinetic parameters determination in a biofilm air lift reactor by respirometry*. Biotechnology Letters 24, 24, 2063-2066. 2002
- Daigger G. T., Norton L. E., Watson R. S., Crawford D, Sieger R. B. *Process and Kinetic Analysis of Nitrification in Coupled Trickling Filter/Activated Sludge Processes*. Water Environ. Res., 65 (6), 750–758. 1993

- De Gusseme B., Vanhaecke L., Verstraete W., Boon N., *Degradation of acetaminophen by Delftia tsuruhatensis and Pseudomonas aeruginosa in a membrane bioreactor*, Water Res. 45, 1829–1837. 2011
- Dold P., Ekama G.A., Marais G.V.R. *A general model for the activated sludge process*. Water science and technology 52(10-11), 469-477. 1980
- Dytczak M. A., Kathleen L. L., Oleszkiewicz J. A. *Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates*. Water research, 8, 42. 2008
- Dytczak M. A., Kathleen L. L., Oleszkiewicz J. A. *Nitrifying Genera in Activated Sludge May Influence Nitrification Rates*. Water Environment Research. 2008b
- Fan F., Zhou H., Husain H. *Identification of wastewater characteristics to predict critical flux for membrane bioreactor processes*. Water Res. 40, 205–212. 2006
- Fan L. *Bioaugmentation treatment of bromoamine acid wastewater with Sphingomonas sp. FL*, Adv. Mater. Res. 183–185, 814–818. 2011
- Ficara E., Rozzi A. *Coupling pH-stat and DO-stat titration to monitor degradation of organic substrates*. Water Science and Technology. 49, 1, 69 – 77. 2004
- Fiocchi N., Ficara E., Canziani R., Luccarini L., Ciappelloni., Ratini P., Pirani M., Mariani S. *SBR on-line monitoring by set-point titration*. Water Science and Technology, 53, 4, 541-549. 2006
- Fux C., Bohler M., Huber P., Brunner I., Siegrist H. *Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant*. Biotechnol. 99, 295–306. 2002
- Gali A., Dosta J., van Loosdrecht M.C.M., Mata-Alvarez J. *Two ways to achieve an anammox influent from real reject water treatment at lab-scale: partial SBR nitrification and SHARON process*. Process Biochemistry. 42, 4, 715-720. 2007
- Garrido J., van Benthum W., van Loosdrecht M., Heijnen J. *Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor*. Biotechnol. Bioeng. 53, 168–178. 1997
- Gee CS., Suidan MT., Pfeffer JT. *Modeling of nitrification under Substrate-Inhibiting Conditions*. Journal of Environmental Engineering. 116, 1, 18-31. 1990
- Germain E., Stephenson E., Pearce P. *Biomass characteristics and membrane aeration: toward a better understanding of membrane fouling in submerged membrane bioreactors (MBRs)*. Biotechnol. Bioeng. 90, 316–322. 2005
- Gernaey K., Bogaert H., Massone A., Vanrolleghem P., Verstraete W. *On-line nitrification monitoring in activated sludge with a titrimetric sensor*. Environ. Sci. Technol., 31, 2350–2355. 1997
- Gernaey K., Petersen B., Ottoy JP., Vanrolleghem PA. *Activated sludge monitoring with combined respirometric-titrimetric measurements*. Water Res. 35,5, 1280–1294. 2001
- Goddard V.J., Bailey M.J., Darrah P., Lilley A.K., Thompson I.P. *Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: a community approach for the improved selection of rhizosphere competent bacteria*. Plant Soil, 232: 181–193. 2001
- Guisasola A., Jubany I., Baeza J.A., Carrera J., Lafuente J. *Respirometric estimation of the oxygen affinity constants for biological ammonium and nitrite oxidation*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 80, 388–396. 2005

- Guisasola A., Petzet S., Baeza J.A., Carrera J., Lafuente J. *Inorganic carbon limitations on nitrification: experimental assessment and modelling*. Water Res. 41, 277–286. 2007
- Head MA, Oleszkiewicz JA. *Bioaugmentation for nitrification at cold temperatures*. Water Research, 38, 3, 523 – 530. 2004
- Head MA., Oleszkiewicz JA. *Bioaugmentation with Nitrifying Bacteria Acclimated to Different Temperatures*. Journal of Environmental Engineering, 131, 7. 2005
- Head, MA., Oleszkiewicz JA. *Bioaugmentation with Nitrifying Bacteria Acclimated to Different Temperatures*. J. Environ. Eng., 131 (7), 1046–1051. 2005
- Hellinga C., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. *Model based design of a novel process for nitrogen removal from concentrated flow*. Mathematical and computer Modelling of Dynamical System. 5, 4, 351-371. 1999
- Hiatt WC., Grady C. P. L. Jr. *An updated process model for carbon oxidation, nitrification, and denitrification*, Water Environment Research, 80, 2145-2156. 2008
- Holakoo L., Nakhla G., Bassi AS., Yanful EK. *Long term performance of MBR for biological nitrogen removal from synthetic municipal wastewater*. Chemosphere 66, 849–857. 2007
- Hongyan L., Min Y., Zhang Y., Yua T., Kamagata Y. *Nitrification performance and microbial community dynamics in a submerged membrane bioreactor with complete sludge retention*. Journal of biotechnology 123, 60–70. 2006
- Janus HM, Van Der Roest HF. *Don't reject the idea of treating reject water*. Water Science and Technology, 10, 35. 1997
- Jayamohan S., Ohgaki S., Hanaki K. *Effect of DO on kinetics of nitrification*. Water Supply, Jo'nköping, Sweden, 6, 141– 150. 1988
- Jubany I., Lafuente J., Baeza JA., Carrera J. *Total and stable washout of nitrite oxidizing bacteria from a nitrifying continuous activated sludge system using automatic control based on Oxygen Uptake Rate measurements*. Water Research, 43, 11, 2761-2772. 2009
- Jubany I., Carrera, J., Lafuente, J., Baeza, J.A. *Start-up of a nitrification system with automatic control to treat highly concentrated ammonium wastewater: experimental results and modeling*. Chem. Eng. J. 144, 407–419. 2008
- Jubany I., Lafuente, J., Baeza, J.A., Carrera, J. *Total and stable washout of nitrite oxidizing bacteria from a nitrifying continuous activated sludge system using automatic control based on oxygen uptake rate measurements*. Water Res. 43, 2761–2772. 2009a
- Kim DJ., Seo D. *Selective enrichment and granulation of ammonia oxidizers in a sequencing batch airlift reactor*. Process Biochem. 41, 1055–1062. 2006
- Liao B.Q., Droppo IG, Leppard GG, Liss SN. *Effect of solids retention time on structure and characteristics of sludge flocs in sequencing batch reactors*. Water Research, 13, 40. 2006
- Love N.G., Bott C. B. *A review and needs survey of upset early warning systems*. Water Environment Research Foundation (WERF) 2000
- Ma J., Quan X., Yang Z., Li A. *Biodegradation of a mixture of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and multiple chlorophenols by aerobic granules cultivated through plasmid pJP4 mediated bioaugmentation*. Chem. Eng. J. 181–182, 144–151, 2011

- Madueno L., Coppotelli BM., Alvarez HM., Morelli IS. *Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina*, Int. Biodeterior. Biodegradation 65 345–351. 2011
- Manser R., Gujer W., Siegrist H. *Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers*. Water Research, 19, 39. 2005
- Manser R., Gujer W., Siegrist H. *Decay processes of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment systems*. Water Research, 12, 40. 2006
- Massone A., Gernaey K., Rozzi A., Verstraete, W. *Measurement of ammonium concentration and nitrification rate by a new titrometric biosensor*. WEF Res. J. 70, 3, 343–350. 1998
- Massone A. G., Gernaey K., Bogaert H., Vanderhasselt A., Rozzi A., Verstraete, W. *Biosensors for nitrogen control in wastewaters*. Water Sci. Technol. 34(1–2), 213–220. 1996
- Metcalf & Eddy, Inc. *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*, Fourth Edition. Milano : McGraw-Hill, 2006
- Mrozik A., Miga S., Piotrowska-Seget z. *Enhancement of phenol degradation by soil bioaugmentation with Pseudomonas sp. JS150*. J. Appl. Microbiol. 111, 1357–1370. 2011
- Munz G., De Angelis D., Gori R., Mori G., Casarci M., Lubello C., *The role of tannins in conventional and membrane treatment of tannery wastewater*. Journal of Hazardous Materials, 164, 2-3, 733-739. 2008
- Munz G., Gori R., Cammilli L., Lubello C., *Characterization of tannery wastewater and biomass in a membrane bioreactor using respirometric analysis*. Bioresource Technology, 99, 18, 8612-8618. 2008
- Munz G., Lubello C. and Oleszkiewicz J. A., *Modeling the decay of ammonium oxidizing bacteria*, Water Research, 45, 2, 557-564. 2011
- Munz G., Lubello C., Oleszkiewicz Jan A., *Factors affecting the growth rates of ammonium and nitrite oxidizing bacteria*, Chemosphere, 85, 5, 720-725. 2011
- Munz G., Mori G., Vannini C., Lubello C., *Kinetic parameters and inhibition response of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria in membrane bioreactors and conventional activated sludge processes*, Environmental Technology, 14, 31, 1557-64. 2010
- Nagaoka H., Ueda S., Miya A. *Influence of bacterial extracellular polymers on the membrane separation activated sludge process*. Wat. Sci. Tech., 34(9), 165–172. 1996
- Ng HY., Hermanowicz SW. *Membrane bioreactor operation at short solids retention times: performance and biomass characteristics*. Water Research 39, 981–992. 2005
- Novák L., Havlíková D.. *Performance intensification of Prague wastewater treatment plant*. Water Science and Technology. 50, 7, 139-146. 2004
- Nuengjamnong C., Kweon J.H., Cho J., Polprasert C., Ahn K.H. *Membrane fouling caused by extracellular polymeric substances during microfiltration processes*. Desalination 179, 117–124. 2005
- Paetkau M., Cicek N. *Comparison of nitrogen removal and sludge characteristics between a conventional and a simultaneous nitrification–denitrification membrane bioreactor*. Desalination 283, 165–168. 2011
- Pambrun V., Paul., Sperandio M. *Modeling the partial nitrification in sequencing batch reactor for biomass adapted to high ammonia concentration*. Biotechnology and Bioengineering. 95, 1, 120-131. 2006

- Park S., Bae W. *Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid*. *Process Biochem.* 44, 631–640. 2009
- Parker D., Wanner J. *Review of Approaches for Improving Nitrification Through bioaugmentation*. Proceedings of the 80th Annual Water Environment Federation Technical Conference and Exposition [CD-ROM]; San Diego, California, Oct 11–15. 2007
- Parkes S., Jolley, D., Wilson, S. *Inorganic nitrogen transformations in the treatment of landfill leachate with a high ammonium load: a case study*. *Environ. Monit. Assess.* 124, 51–61. 2007
- Passannanti S., Ponente S., Sbriziolo C. *Principi di chimica*. Ed. Tramontana, Torino. 2000
- Paul D., Pandey G., Pandey j., Rakesh KJ. *Assessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration*. *Trends Biotechnol.*, 23, 135–142. 2005
- Picioreanu C., Van Loosdrecht MCM., Heijnen JJ. *Modelling the effect of oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor*. *Water Science and Technology.* 36, 1, 147-156. 1997
- Pollice A., Tandoi V., Lestingi C. *Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate*. *Water Res.* 36, 2541–2546. 2002
- Princic A., Mahne I., Megusar F., Paul EA., Tiedje JM. *Effects of pH and Oxygen and ammonium concentration on the community structure of nitrifying bacteria from wastewaters*. *Applied Environmental Microbiology.* 64, 10, 3584 – 3590. 1998
- Qasim S.R., Stinehelfer M.L. *Effect of Bacterial Culture Products on Biological Kinetics*. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 54, 255. 1982
- Quan X., Tang H., Ma J. *Effects of gene augmentation on the removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a biofilm reactor under different scales and substrate conditions*. *J. Hazard. Mater.* 185 689–695. 2011
- Rittmann BE. *How input active biomass affects sludge age and process stability*. *J. Environ. Eng.-ASCE* 122(1), 4–8. 1996
- Rostron WM., Stuckey DC., Young A. *A Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilisation media*, *Water Research*, 35 (5), 1169-1178. 2001
- Ruiz G., Jeison D., Chamy R. *Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration*. *Water Research* 37, 1371–1377. 2003
- Ruiz G., Jeison D., Chamy R. *Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration*. *Water Research* 37. - pp. 1371–1377. 2003
- Salem S., Berends D., Heijnen JJ., van Loosdrecht MCM. *Model – based evaluation of a new upgrading concept for N – removal*, *Water Science and Technology.* *Wat. Sci. Tech.*, 45(6), 169–176. 2002
- Salem S., Berends D., van Loosdrecht MCM., Heijnen JJ. *Bioaugmentation by nitrification with return sludge*. *Wat. Res.*, 37, 1794–1804. 2003
- Santharam S., Ibbini J., Davis LC., Erickson LE. *Field study of biostimulation and bioaugmentation for remediation of tetrachloroethene in groundwater*, *Remediat. J.* 21, 51–68. 2011
- Semrany S., Favieria L., Djelal H., Tahac S., Amrane A. *Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs)*. *Biochemical Engineering Journal.* 62, 75 – 86. 2012

- Sheintuch M., Tartakovsky B., Narkis N., Rebhun M. *Substrate inhibition and multiple states in a continuous nitrification process*. Water Research. 29, 3, 953-963. 1995
- Singer AC., van der Gast CJ., Thompson IP. *Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation*. Trends in Biotechnology, 23, 2, 74-77. 2005
- Singh A., Singh B., Ward O. *Potential applications of bioprocess technology in petroleum industry*, Biodegradation, 23, 6, 865-880. 2012
- Smith RC, Saikaly PE, Zhang K, Thomatos S., Oerther DB. *Ecological engineering of bioaugmentation from sidestream nitrification*. Water Science and Technology. 57,12, 1927 – 1933. 2008.
- Surmacz-Gorska J., Gernaey K., Demuynck C., Vanrolleghem P., Verstraete W. *Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements*. Water Research, 30, 1228 - 1236. 1996
- Surmacz-Gorska J., Gernaey K., Demuynck C., Vanrolleghem P., Verstraete W. *Nitrification process control in activated sludge using oxygen uptake rate measurements*. Environmental Technology, 16, 6, 569-577. 1995
- Tale VP., Maki JS., Struble CS., Zitomer DH. *Methanogen community structure–activity relationship and bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters*. Water Res. 45, 5249–5256. 2011
- Thompson IP., van der Gast CJ., Ciric L., Singer A.C. *Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection*. Environmental Microbiology. 7(7), 909–915. 2005
- Tora` J.A., Lafuente J., Baeza J.A., Carrera J. *Combined effect of inorganic carbon limitation and inhibition by free ammonia and free nitrous acid on ammonia oxidizing bacteria*. Bioresource Technology 101 (15), 6051 - 6058. 2010
- Vadivelu VM., Keller J., Yuan ZG. *Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched Nitrosomonas culture*. Water Sci. Technol. 56, 7, 89–97. 2006
- Van den Berg L., Ashmore M., Jorgensen SE., Fath B. *Nitrogen*. Encyclopedia of Ecology. Elsevier, York UK. 2008
- Van der Gast C.J., Whiteley A.S., Starkey M., Knowles C.J., Thompson I.P. *Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemical effluents*. Biotechnol Prog 19: 1156–1161. 2003
- Van Limbergen H., Top EM. *Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives*. Appl Microbiol Biotechnol. 1, 50. 1998
- Vandebroek R. *Study and development of a microcomputer controlled sensor for the determination of the biodegradability and toxicity of wastewaters: the RODTOX 1986*. Riksuniversiteit te Gent, Gent. 1986
- Vanrolleghem P.A., Dries D., Verstraete W. *ROD TOX: Biosensor for rapid determination of the biochemical oxygen demand and on line monitoring of the toxicity of wastewaters*. Proceedings Fifth European Congress on Biotechnology. Copenhagen, Denmark, July 8-13 1990. Vol. 1, 161-164. 1990.
- Verschuere L., Gernaey K., Verstraete W. *De NITROX: een snelle en gevoelige on-line toxiciteitsmeter voor water en afvalwater*. Water, 14, 163 – 168. 1995
- Vogel T.M., Walter M.V. *Bioaugmentation*. In Manual of Environmental Microbiology. 2001
- Volcke EIP, Vanrolleghem PA. *Construction, start-up and operation of a continuously aerated laboratory-scale SHARON reactor in view of coupling with an Anammox reactor*. Water SA, 31, 3, 327 – 334. 2005.

- Wagner-Döbler I. *Microbial inoculants: snake oil or panacea?* In *Bioremediation: A Critical Review*. Head, I.M., Singleton, I., and Milner, M.G. (eds). Wymondham, Norfolk: Horizon Scientific Press, pp. 259–289. 2003
- Wanner J., Kos M., Novák L. *Intensification of Prague Central WWTP - Ten years of practical experiences with the in-situ bioaugmentation nitrification method*. Water Practice & Technology, 2009.
- Wett B., Rauch, W. *The role of inorganic carbon limitation in biological nitrogen removal of extremely ammonia concentrated wastewater*. Water Res. 37, 1100–1110. 2003
- Wang L., Yang, K., Yang, Y., Han, Y., Chen, Y., Cheng, S. *Microbial ecology and performance of ammonia oxidizing bacteria (AOB) in biological processes treating petrochemical wastewater with high strength of ammonia: effect of Na₂CO₃ addition*. - 2009. Water Sci. Technol. 59, 2, 223–231. 2009
- Yu L, Peng D, Pan R. *Shifts in nitrification kinetics and microbial community during bioaugmentation of activated sludge with nitrifiers enriched on sludge reject water*. J Biomed Biotechnol. doi: 10.1155/2012/691894. 2012
- Yu T, Xinying S. *Relation between the stability of activated sludge flocs and membrane fouling in MBR: Under different SRTs*. Bioresource Technology 118, 477–482. 2012
- Yu-Lan J., Woo-Nyoung L., Chung-Hak L., In-Soung C., Xia H., Swaminathan T. *Effect of DO concentration on biofilm structure and membrane filterability in submerged membrane bioreactor*. Water Research, 40, 2829 – 2836. 2006