



# PROGETTO BRAIN

## Processi biologici innovativi di rimozione dell'azoto dai digestati

Politecnico di Milano, Polo di Cremona

20 Giugno 2013

## Risultati del processo biologico anammox

*Claudio Lubello, Elena Ficara*

*Davide Scaglione, Giorgio Tornotti, Simone Caffaz, Cecilia Caretti*



**POLITECNICO  
DI MILANO**



**MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE  
ALIMENTARI E FORESTALI**



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE**

**DICEA**  
DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA CIVILE  
E AMBIENTALE



## Introduzione

- La via biologica di rimozione autotrofa dell'azoto
- Attuale diffusione della tecnologia

## Risultati alla scala laboratorio

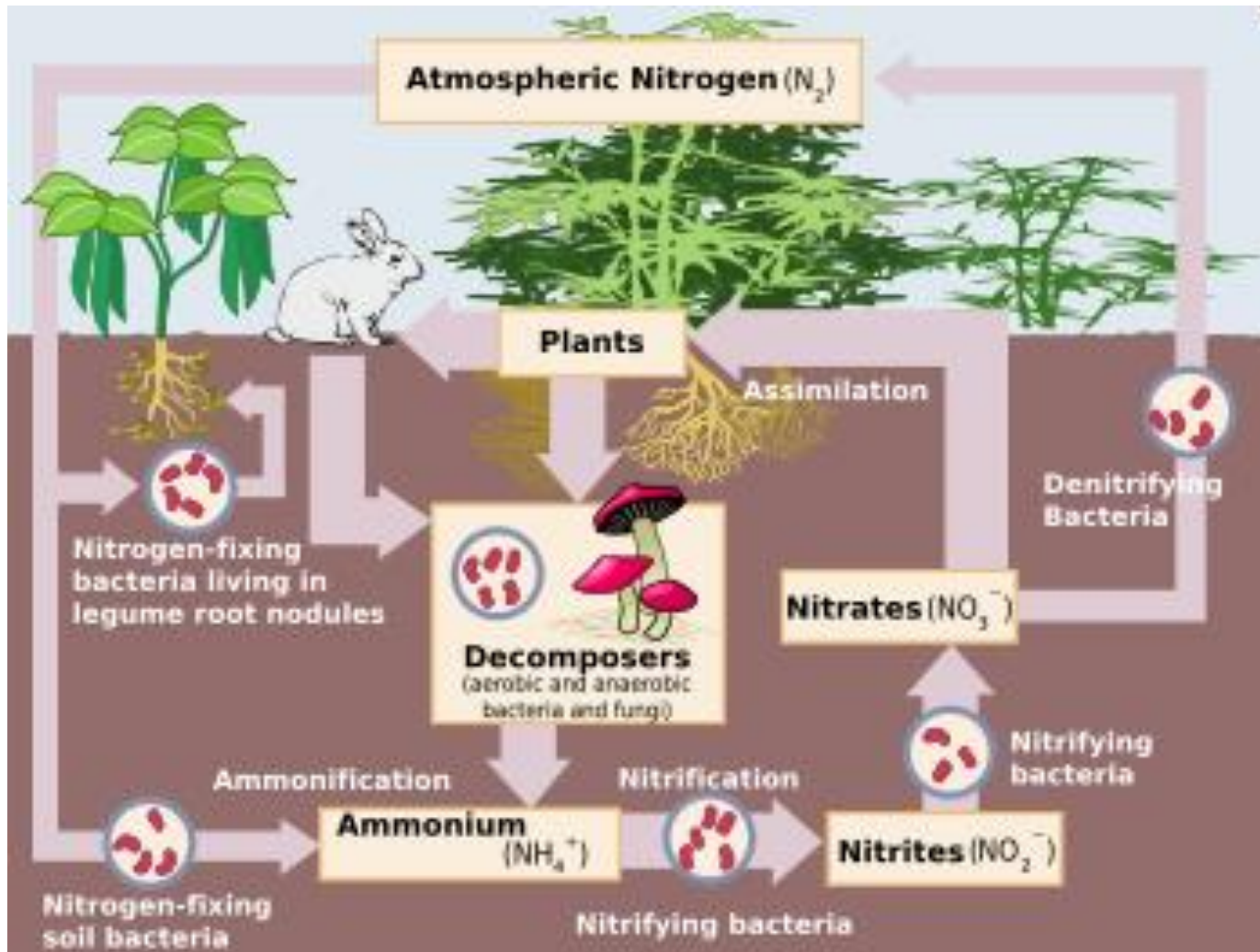
- Coltivazione di batteri anammox
- Trattabilità del digestato zootecnico: confronto tra diverse soluzioni reattoristiche
- Approfondimenti: verifica dell'inibizione da inibenti specifici, strategie di recupero

## Risultati alla scala pilota

- Il processo PARNIT e Anammox: efficienze conseguite

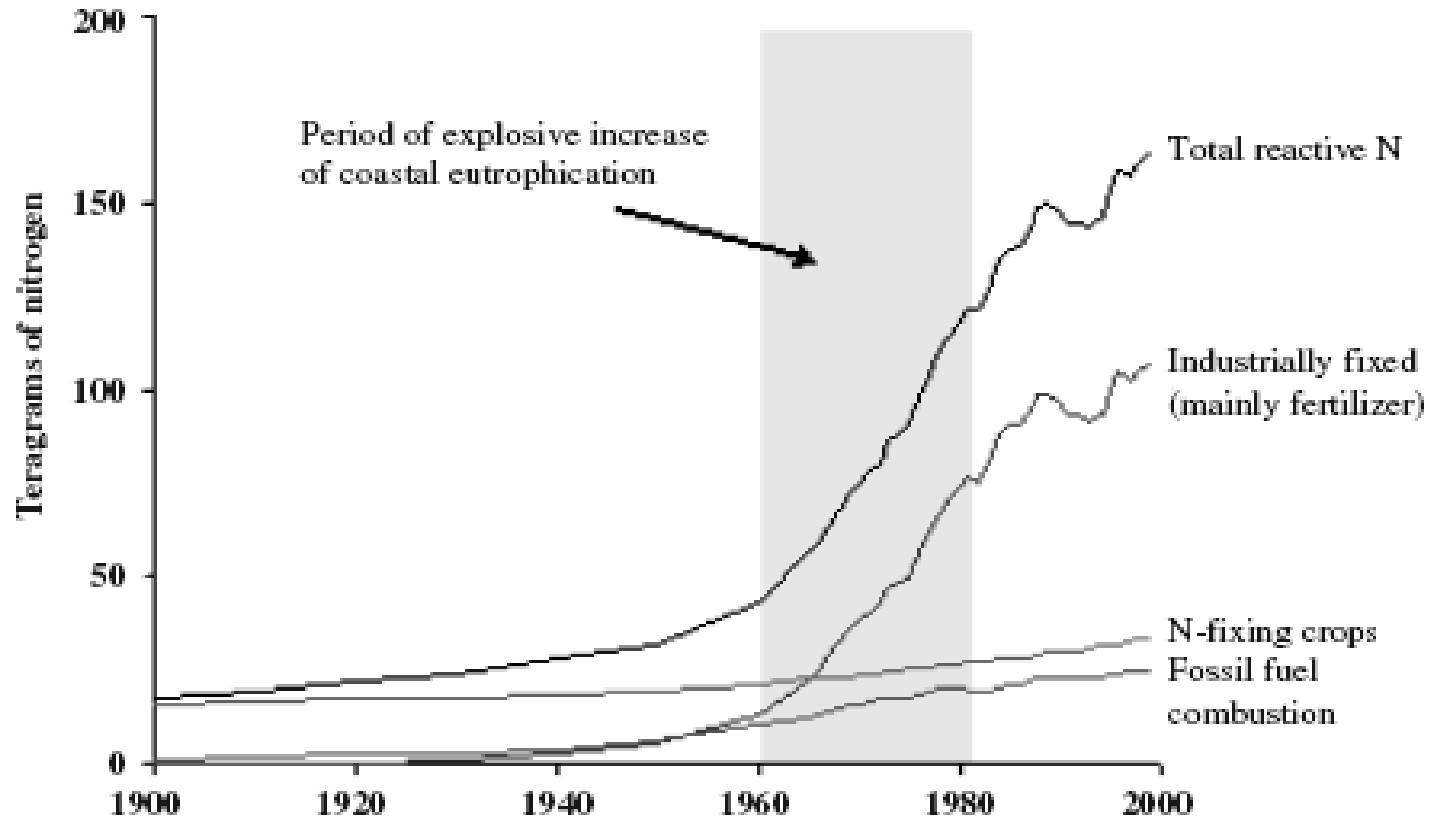


# Il ciclo biogeochimico dell'azoto



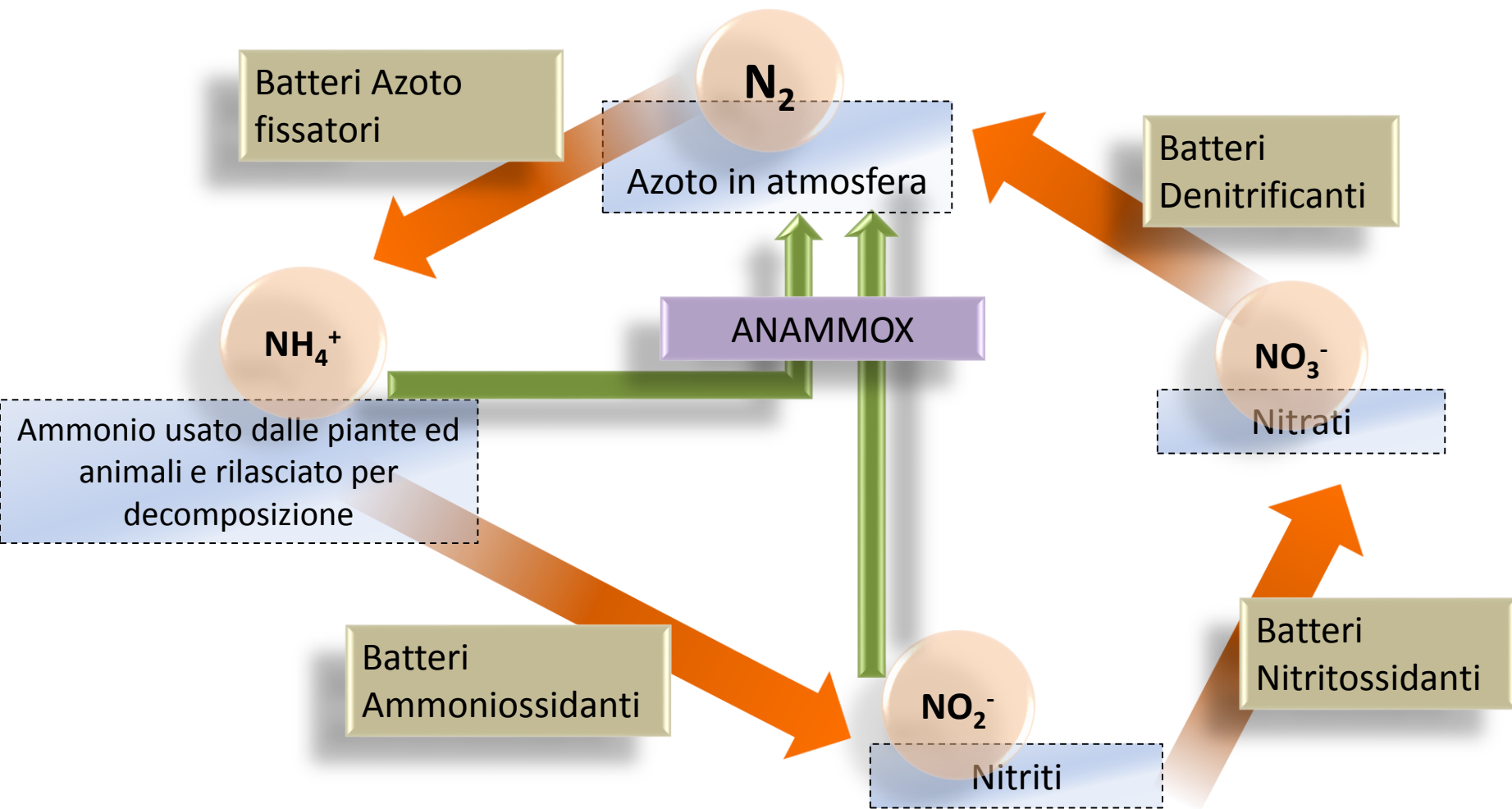


# Il ciclo biogeochimico dell'azoto



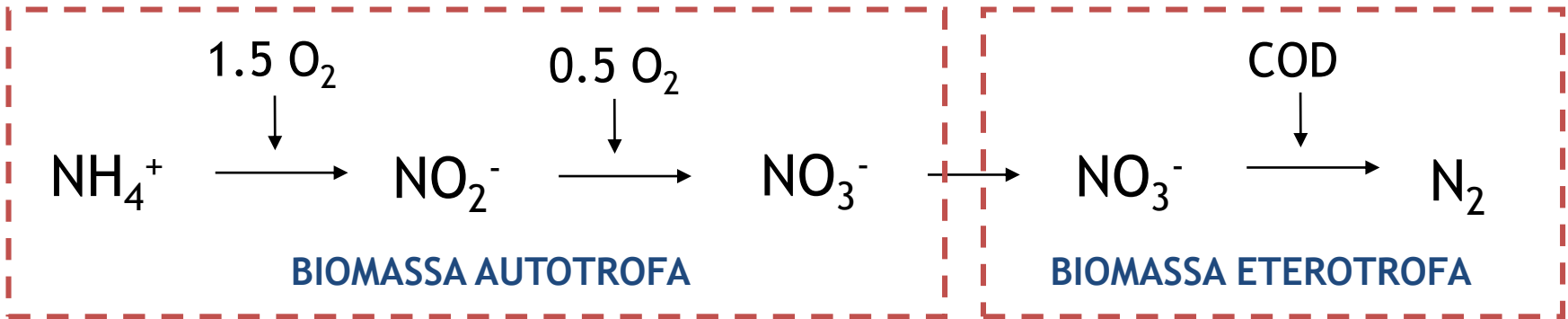


# La via autotrofa di rimozione dell'azoto

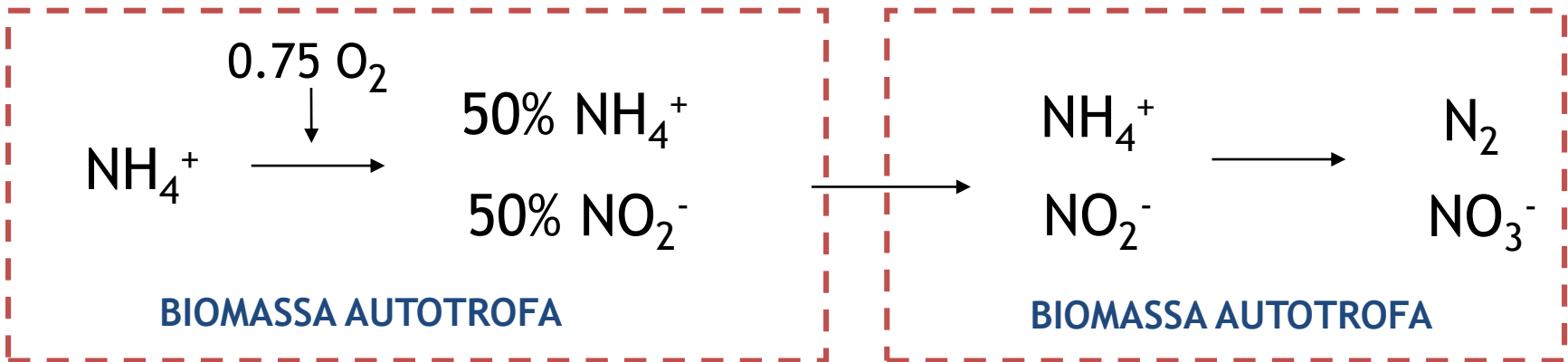




## Processo convenzionale di Nitrificazione - Denitrificazione



## Processo combinato Nitrificazione Parziale - Anammox







### SOLUZIONI OGGI DISPONIBILI IN PIENA SCALA

- Fango “flocculante” - SBR (Svizzera, EAWAG)
- Fiocchi e Granuli (Austria, Bernard Wett)
- Biomassa adesa in sospensione (Vari Paesi Anox-Kaldness; AnitaMOX, Veolia; DeAmmon Purac)
- Granuli (Olanda/Cina, Paques).

CIRCA 50 APPLICAZIONI IN PIENA SCALA NEL MONDO



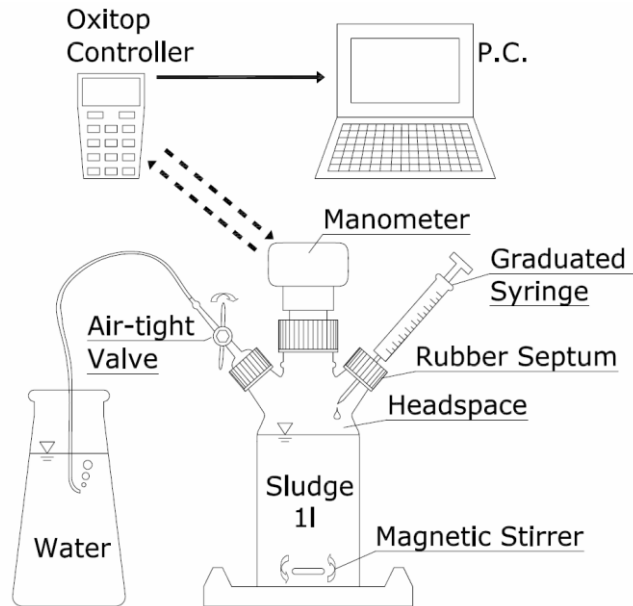


## IMPIANTI PAQUES

Company	Country	Wastewater from:	ANAMMOX® reactor vol	Ammonia load kg/day	Year
Kuaijishan Shaoxing Winery	China	Distillery	560	900	2011
Confidential client	The Netherlands	-	-	-	2011
Severn Trent	United Kingdom	Reject water sludge treatment	1760	4000	2011
Xinjiang Meihua Amino Acid	China	Monosodium glutamate	5400	10710	2011
Jiangsu Hangguang Bio-engineering	China	Sweetener	1600	2180	2011
Confidential client	Poland	Distillery (Wheat stillage)	900	1460	2011
Shandong Xiangrui	China	Corn starch and MSG	4300	6090	2011
Waterschap Groot Salland*	The Netherlands	Reject water sludge treatment	425	600	2010
Meihua II	China	Monosodium glutamate	4100	9000	2010
Meihua I	China	Monosodium glutamate	6600	11000	2009
Angel Yeast	China	Yeast	500	1000	2009
ARA Niederglatt	Switzerland	Reject water sludge treatment	180	60	2008
Semiconductor plant	Japan	Semiconductor	50	220	2006
Waterstromen Steenderen	The Netherlands	Potato	600	1200	2006
Industry Water Lichtenvoorde	The Netherlands	Tannery	100	325	2004
WSHD	The Netherlands	Reject water sludge	72	500	2002



E' possibile iniziare senza un inoculo specifico?



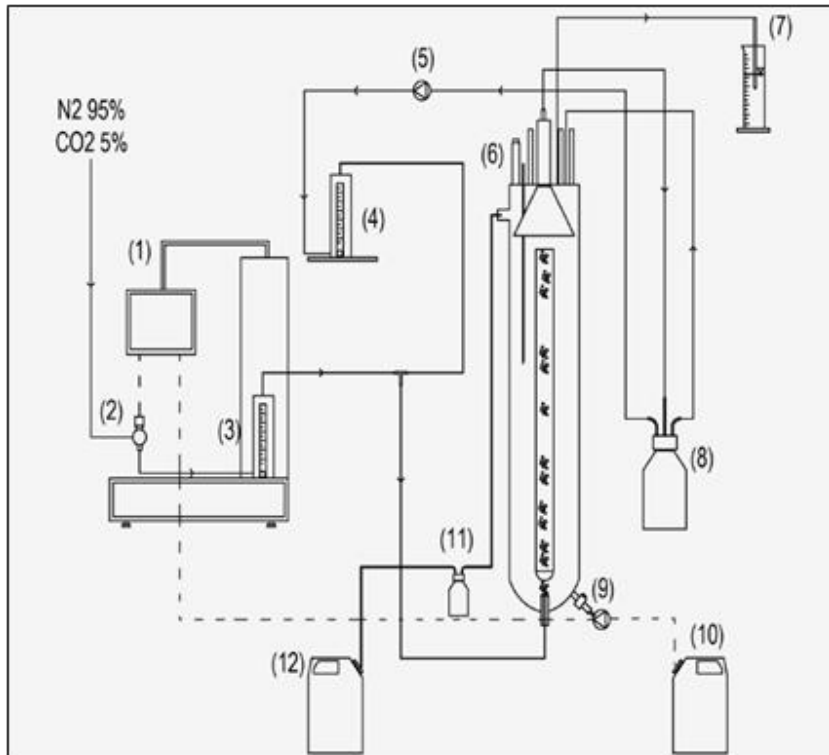
**Schema della configurazione in semi-batch con indicazione dell'utilizzo della testa manometrica per la misura in linea della pressione. A destra: Reattori in semi-batch in miscelazione e termostatazione.**



- La procedura di arricchimento in reattori alimentati in discontinuo con soluzione di micro e macro-nutrienti ha consentito di selezionare i batteri Anammox.
- Batteri Anammox erano presenti in tutti i campioni di fango utilizzati pur provenendo da impianti diversi; ciò consente di dedurre che questi batteri possono considerarsi ampiamente diffusi.
- Dopo circa 100 giorni di arricchimento l'attività Anammox ha raggiunto valori compresi tra 3 and 10  $\text{mgN-NH}_4^+ \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , valutabile con prove di tipo manometrico.
- L'accrescimento in reattore SBR continuo ha consentito di incrementare la capacità di trattamento della miscela ottenuta a partire dai campioni precedentemente arricchiti. Dai bilanci di massa condotti e dalle analisi microbiologiche FISH si può inoltre concludere che l'attività microbiologica prevalente è quella associata a batteri Anammox.
- **Si può concludere che la procedura di selezione ed arricchimento sia stata efficace nel consentire la crescita dei batteri Anammox e nella loro selezione rispetto ad altri microorganismi in grado di utilizzare ammonio o nitrito.**



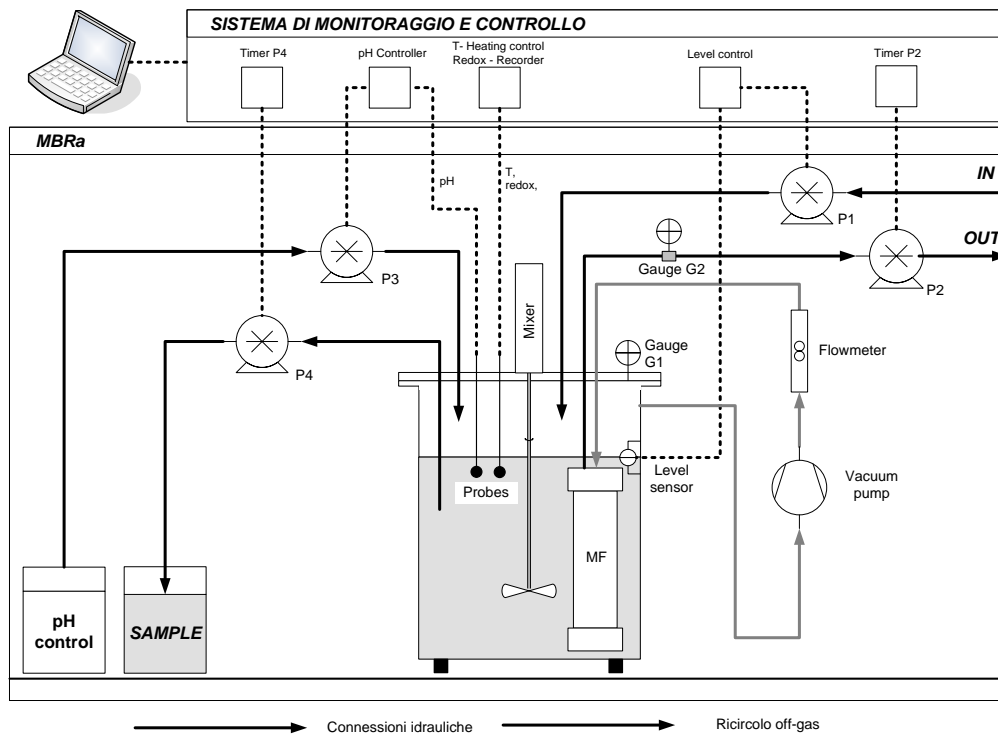
## Gas lift





# Trattabilità del digestato: apparati sperimentali

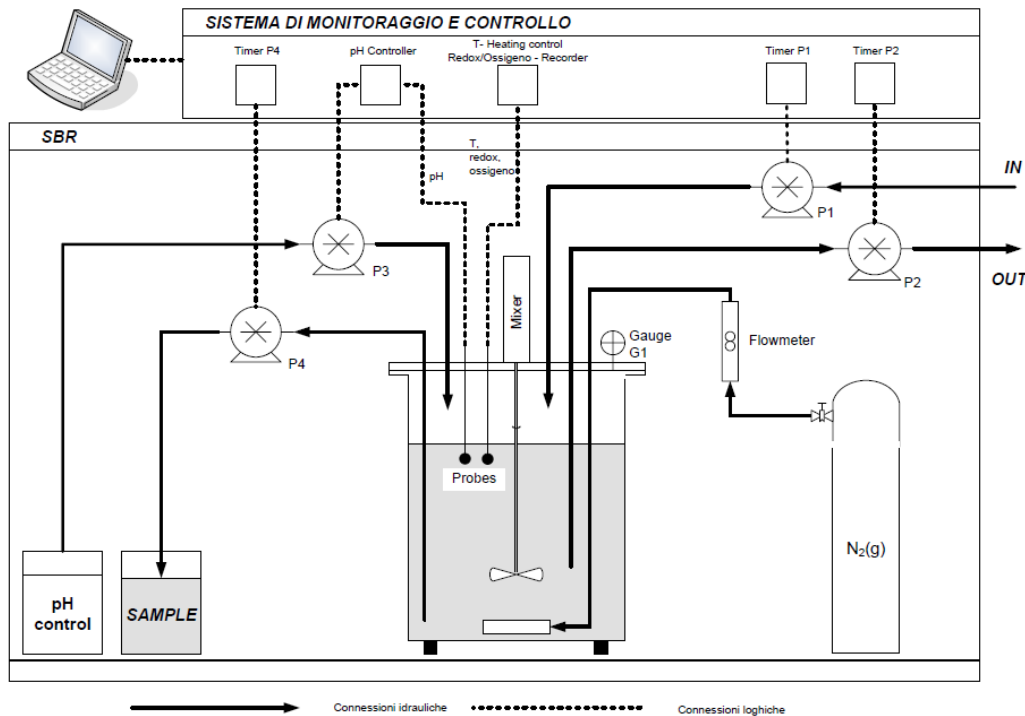
## MBR





# Trattabilità del digestato: apparati sperimentali

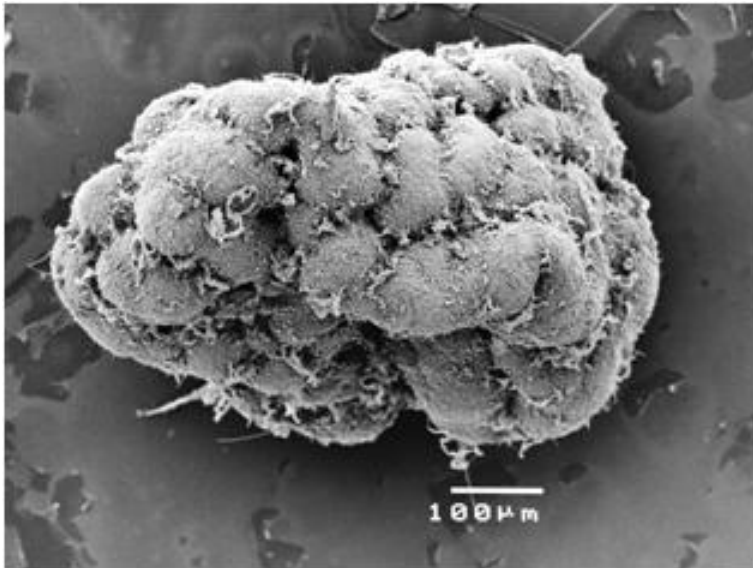
## SBR



## Composizione influente:

Combinazione di digestato suino con refluo sintetico

Aggiunta di nutrienti (Ammonio e Nitrito) fino a concentrazioni di  $2.25 \pm 0.32 \text{ g N L}^{-1}$ .



Giorno sperimentale	Digestato su refluo sintetico [%] (Percentuale rapporto volumetrico)
0-6	0
7-11	10
12-18	25
19-25	50
26-36	75
37-53	100
54-56	75
57-102	0

## Biomassa granulare:

- elevata attività biologica a parità di peso rispetto ai fanghi fioccosi
- basso SVI (Sludge Volume Index)
- facile separazione tra effluente trattato e fango prodotto



# REATTORE GAS LIFT

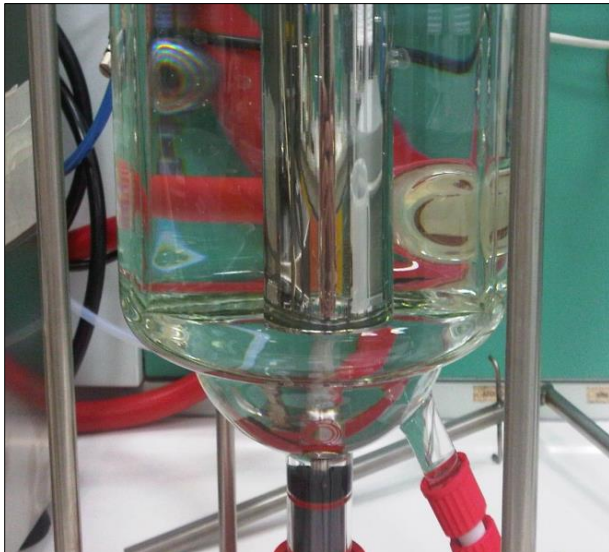
## Parametri operativi



1



2



**Working Volume = 6.95 L**  
**h = 90 cm**  
**Driser = 5 cm**  
**Ddowncomer = 13 cm**



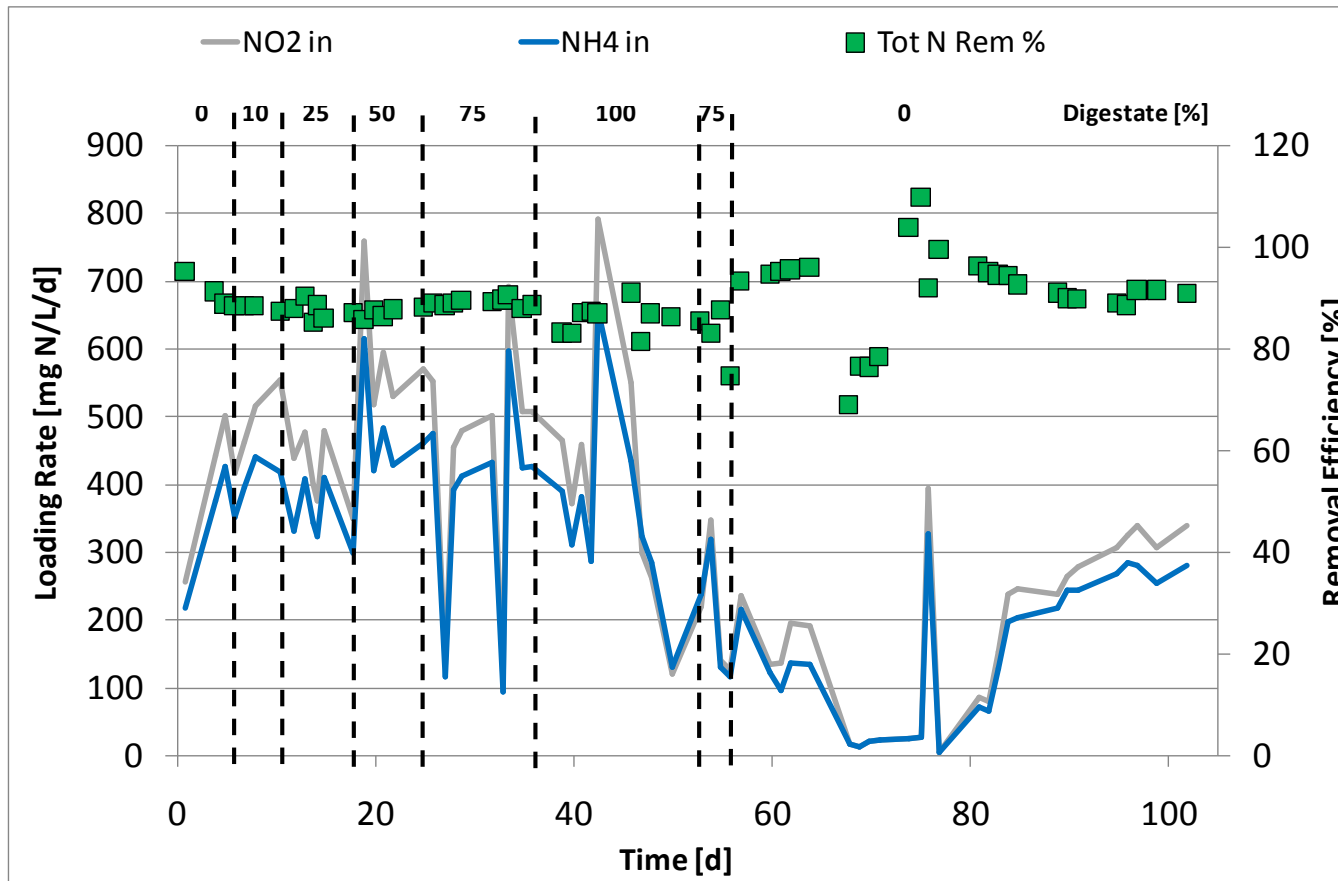




# RISULTATI

**Rimozione Nitrito:** > 99.7%  
(> 95.8% dopo il fenomeno di inibizione)

**Rimozione Ammonio:** > 90%, in diminuzione per volumi di digestato > 50%  
(69% durante il fenomeno di inibizione, in seguito > 75%)





# RISULTATI

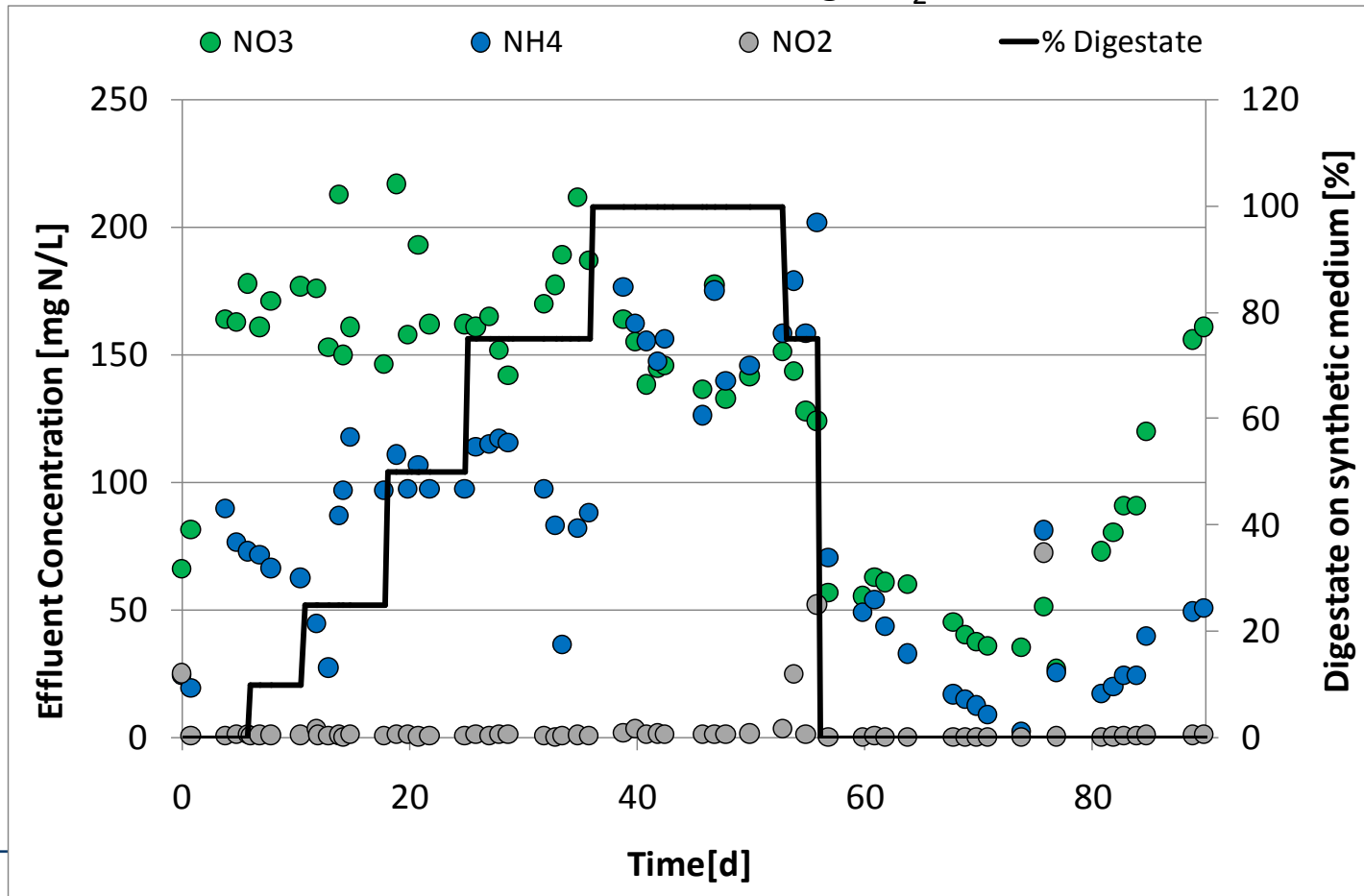
## Giorno 0 – 53

**Nitrogen Load Rate (NLR):**  $390 \pm 220 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

$470 \pm 290 \text{ mg NO}_2\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

**Nitrogen Removal Rate (NRR):**  $350 \pm 200 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

$470 \pm 280 \text{ mg NO}_2\text{-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$



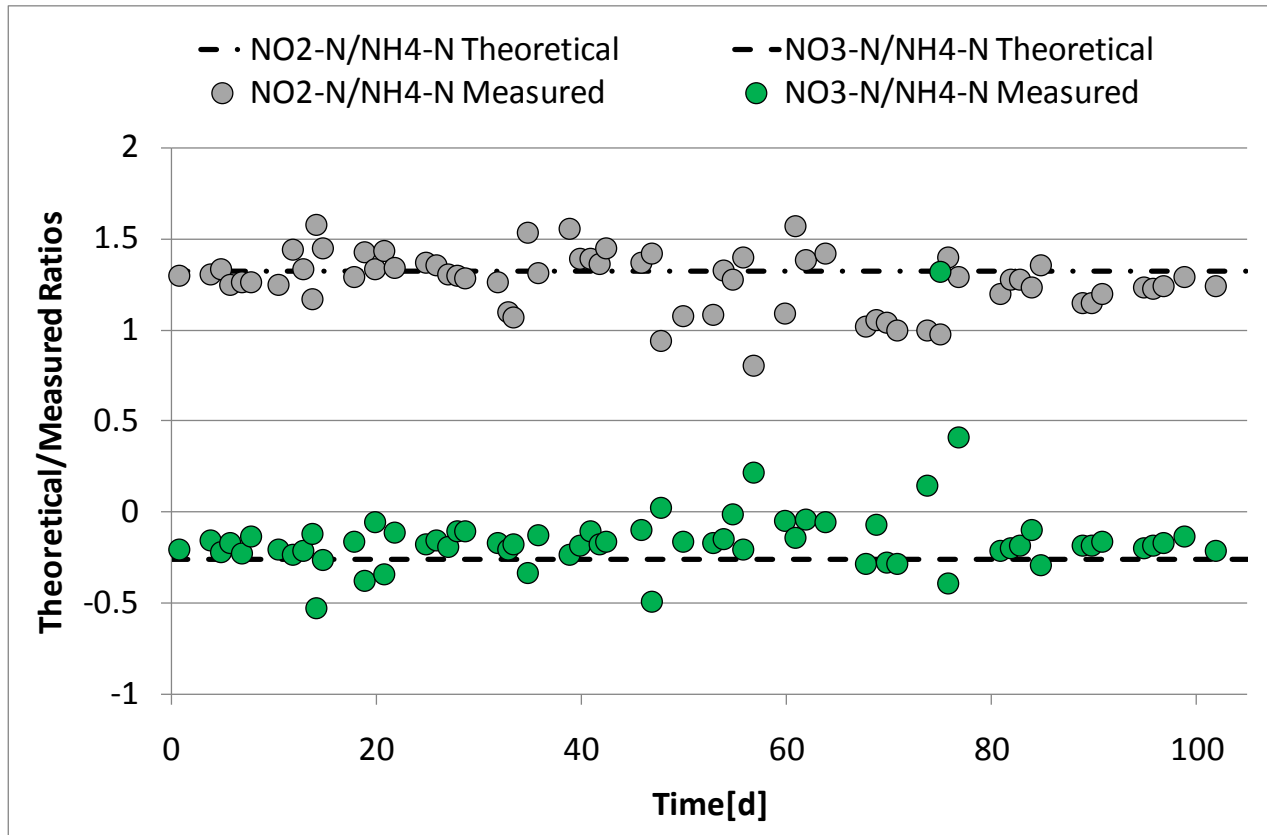


# RISULTATI

## Rapporti delle specie azotate:

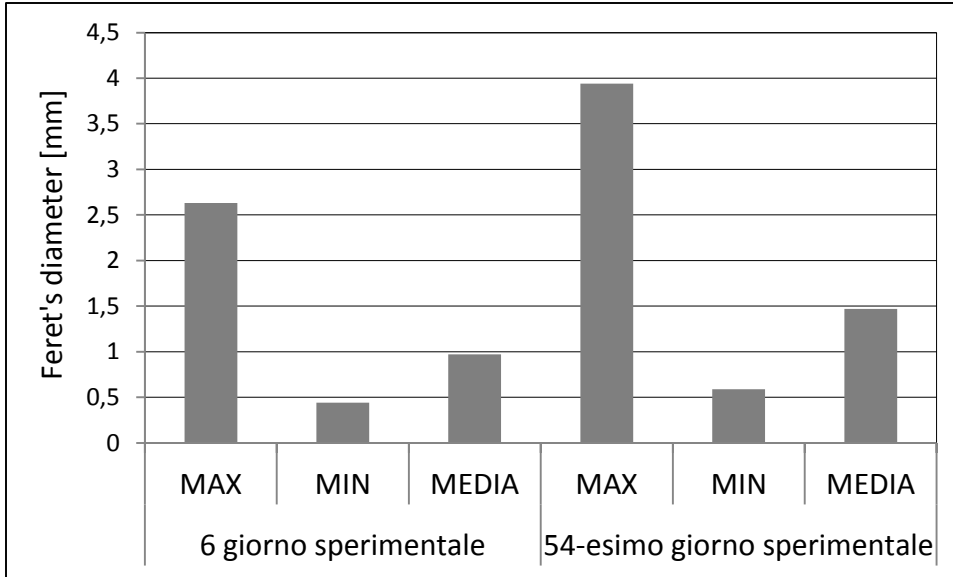
$\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_2^-\text{-N} = 1.27$  (valore teorico pari a 1.32)

$\text{NO}_3^-\text{-N}/\text{NH}_4^+\text{-N} = 0.15$  (valore teorico pari a 0.26)

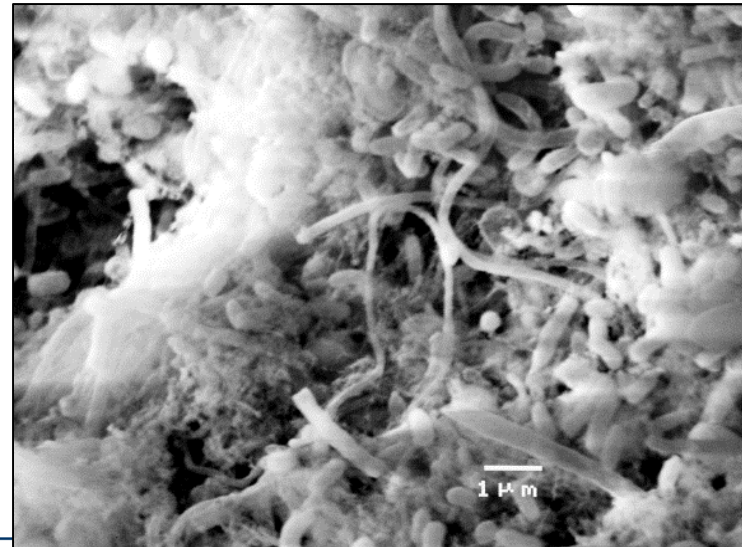
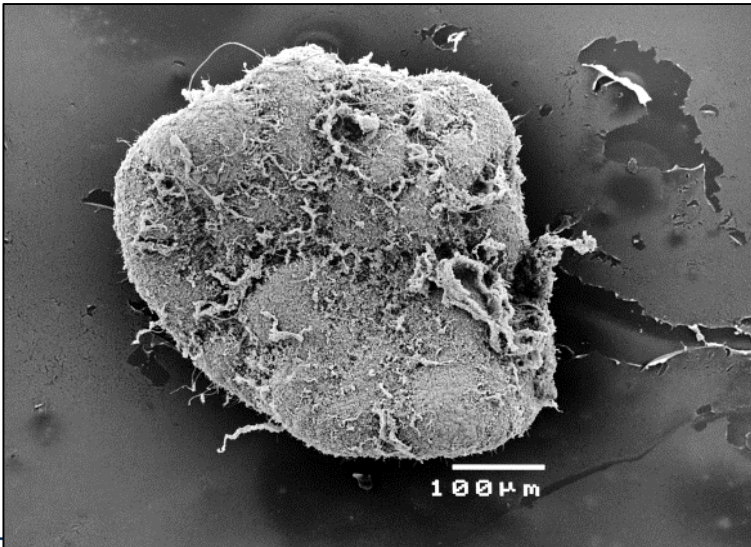
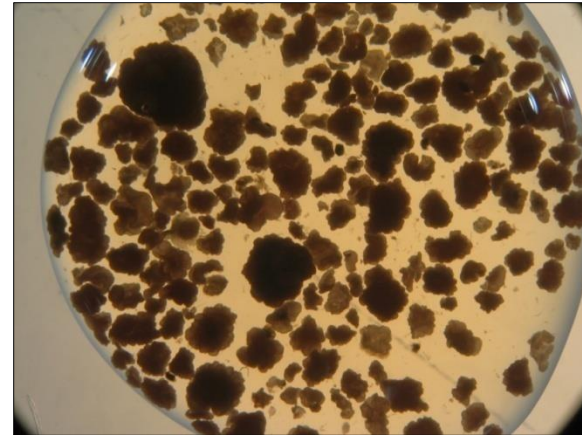




# Morfologia e dimensione dei granuli



Range Feret's diameter :  
**0.44-3.94 mm**





## CONCLUSIONI

- ❑ Alti rendimenti di rimozione di Ammonio (96%), Nitrito (99%), ed Azoto Totale (89%).
- ❑ Implementazione di una metodica di stima della massima attività anammox mediante misurazioni manometriche on-line.
- ❑ Attività stabile del processo fino alla presenza del 75% di digestato.
- ❑ Fenomeno di inibizione occorso durante l'alimentazione con refluo reale non diluito (perdita di attività fino al 98.5%): ciò non ripeterà nell'impianto in piena scala.
- ❑ Recupero dell'attività ottenuto alimentando unicamente con soluzione sintetica.

### ELEMENTI CHIAVE DEL TRATTAMENTO

- Variabilità di composizione del refluo da trattare (COD, metalli pesanti, antibiotici ed altre sostanze potenzialmente inibenti)
- Possibili pretrattamenti necessari per eliminare i fattori inibenti



## Possibili fenomeni di inibizione

### Prove batch di attività: Reattore OxiTop<sup>®</sup> Control System

- Volume totale 330 mL
- pH 7.5 (buffer HEPES)
- Condizioni anossiche
- Temperatura 35 °C
- Agitazione con piastra basculante



Misura della variazione della pressione interna mediante il trasduttore di pressione *OxiTop<sup>®</sup>-C Measuring Head*

Ricavo della produzione di azoto mediante l'applicazione della Legge dei Gas Perfetti:

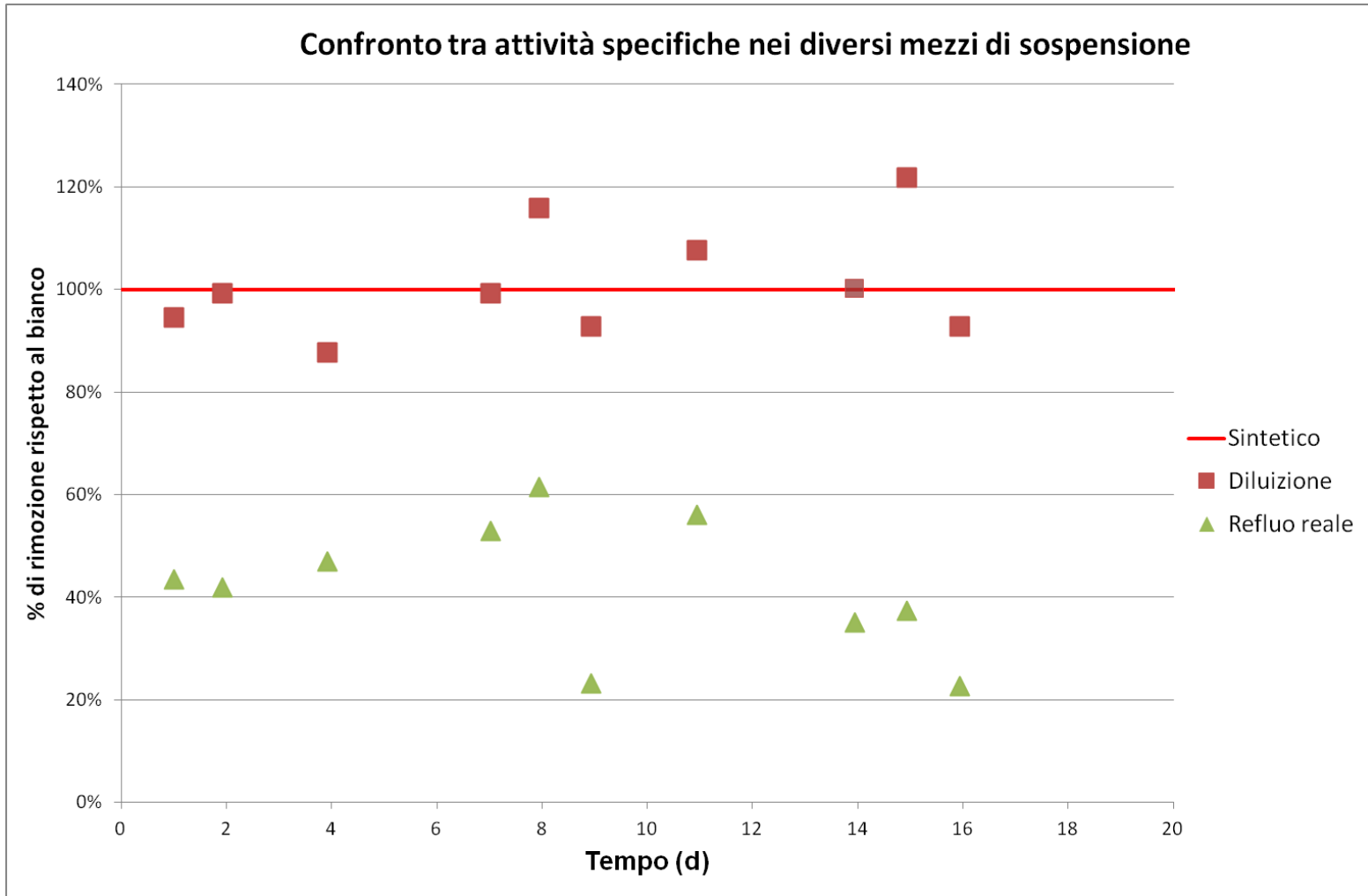
$$PV = nRT$$

Conoscendo la produzione di azoto si può stimare l'attività dei batteri





# Possibili fenomeni di inibizione





# Possibili fenomeni di inibizione

## Composizione delle Prove a Breve Termine (24 ore)

	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
<b>Rame</b>	0	0.25	0.5	1	2	5	10	-
<b>Zinco</b>	0	0.25	0.5	1	2	5	10	20
<b>Ossitetraciclina</b>	0	100	250	500	750	1000	-	-
<b>Sulfatiazolo</b>	0	100	250	500	750	1000	-	-

- ☑ Perdita di attività calcolata rispetto alle prove di controllo
- Concentrazione di metalli pesanti nei reflui suini: 0.5 – 2 mg/L
- ☐ Calcoli della IC<sub>50</sub>
- (concentrazione per cui si verifica l'inibizione del 50% dell'attività)
- Concentrazione di antibiotici nei reflui suini: 100 – 250 mg/L;
- ☐ Test di attività dopo 1 ora e 24 ore di esposizione al potenziale inibente fino a 1.5 g/L per associazioni di farmaci

Huang et al., 2001

## Composizione delle Prove a Lungo Termine (14 giorni)

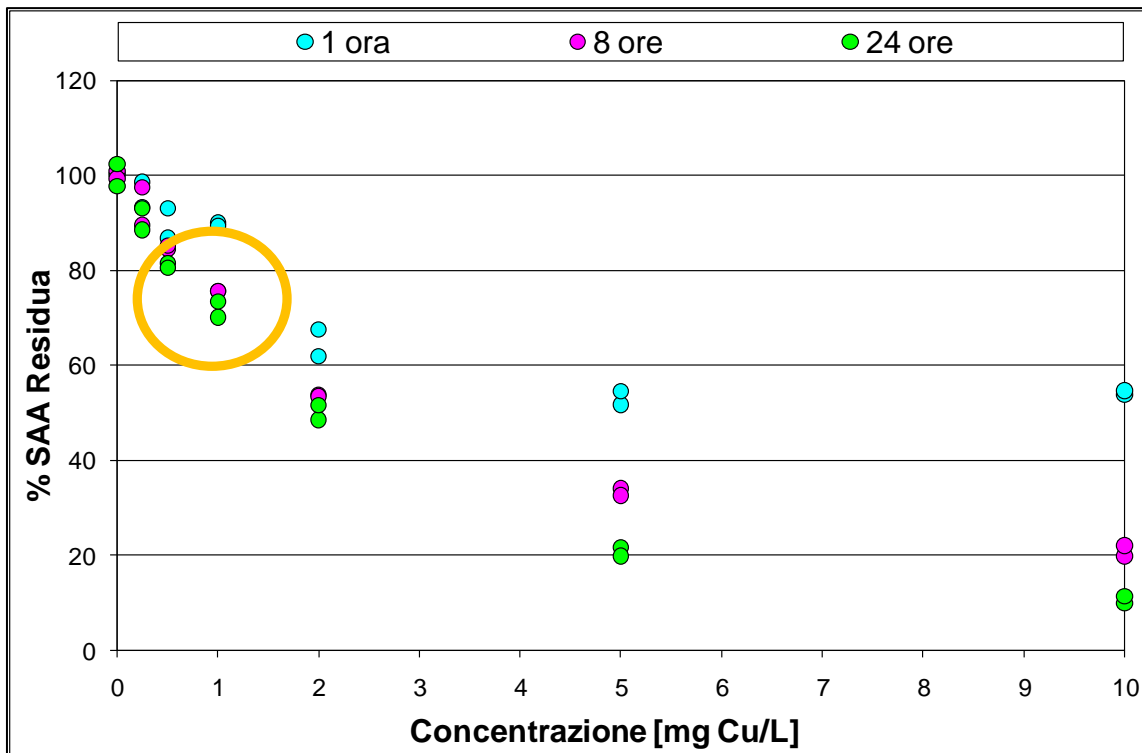
	mg/L	mg/L	mg/L
<b>Ossitetraciclina</b>	0	100	500
<b>Sulfatiazolo</b>	0	100	500





## Test con Metalli Pesanti: Rame

- Test effettuato dopo 1, 8 e 24 ore di esposizione
- Perdita di attività riscontrata sia nell'immediato che con il trascorrere del tempo
- Processo inibitorio in corso dopo 24 ore di esposizione
- Effetto considerevole già a concentrazioni di 1 mg/L
- $IC_{50}$  dopo 24 ore prossimo alla concentrazione di rame contenuta nei reflui zootecnici

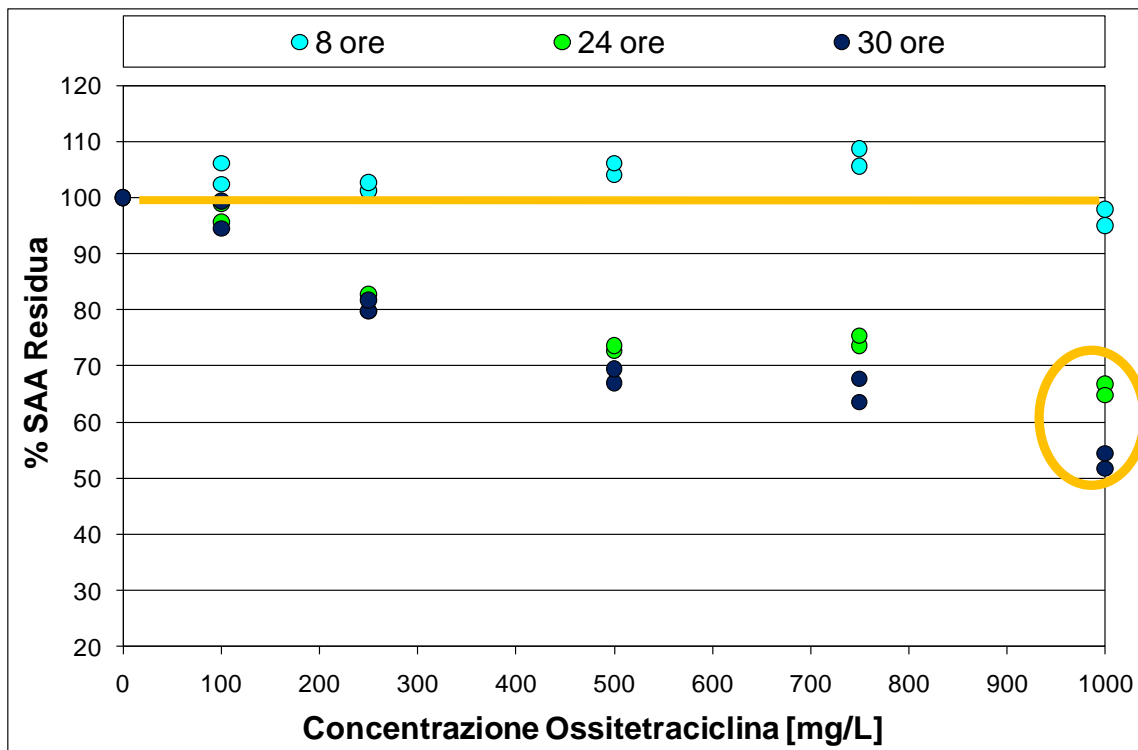


<b><math>IC_{50}</math> 1 ora</b> <b>[mg/L]</b>	<b><math>IC_{50}</math> 8 ore</b> <b>[mg/L]</b>	<b><math>IC_{50}</math> 24 ore</b> <b>[mg/L]</b>
<b>5.0</b>	<b>2.57</b>	<b>1.91</b>



## Test con Antibiotici: Ossitetraciclina

- Test effettuato dopo 8, 24 e 30 ore di esposizione
- Perdita di attività nulla dopo 8 ore di esposizione
- Attività residua superiore al 50% anche per i test alle concentrazioni maggiori
- Processo inibitorio ancora in corso dopo 30 ore
- Valori di  $IC_{50}$  calcolati mediante un modello di cinetica di inibizione



$IC_{50}$ 8 ore [mg/L]	$IC_{50}$ 24 ore [mg/L]	$IC_{50}$ 30 ore [mg/L]
-	1800	1300



# Possibili soluzioni

**DILUIZIONE**

**PRETRATTAMENTO**

**PARTICOLATO**

**DISCIOLTO**

Chiariflocculazione e Filtrazione a Membrane

**FISICO:**

- Carboni Attivi

**CHIMICO:**

- Ozonizzazione

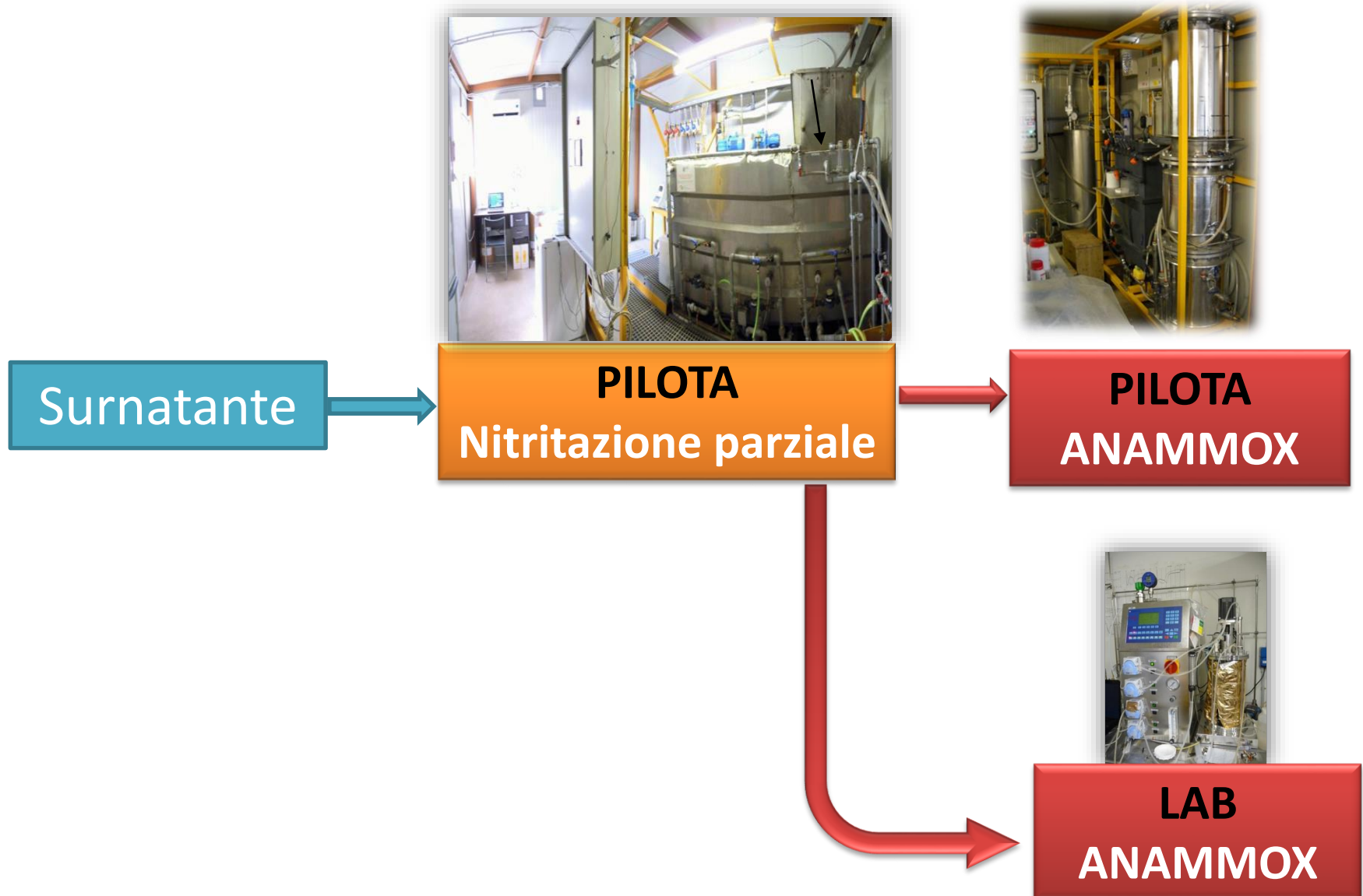
**BIOLOGICO:**

- Stabilizzazione Biologica



## Surnatante di digestione

	Intervallo	Media $\pm$ dev.st.
N-NH <sub>4</sub> mgN/L	<b>619 – 1.616</b>	1.151 $\pm$ 251
COD mg/L	<b>1.325 – 7.500</b>	2.634 $\pm$ 1.178
COD/N g/g	<b>0,9 – 6,3</b>	2,2 $\pm$ 1,2



## Impianto pilota SBR (già utilizzato per DENO2)



### •Parametri operativi:

Tempo di ritenzione idraulica:  $HRT = 2.0$  d,

Carico volumetrico di azoto:  $NLR = 0.6-0.7$  kgN/m<sup>3</sup>/d

Ciclo: durata = 6 h (45 min FILL, 3.5 h REACT AEROBICO (incluso FILL), 30 min SETTLE+DRAW, 1 h IDLE)

### •Controllo del grado di ossidazione dell'ammonio:

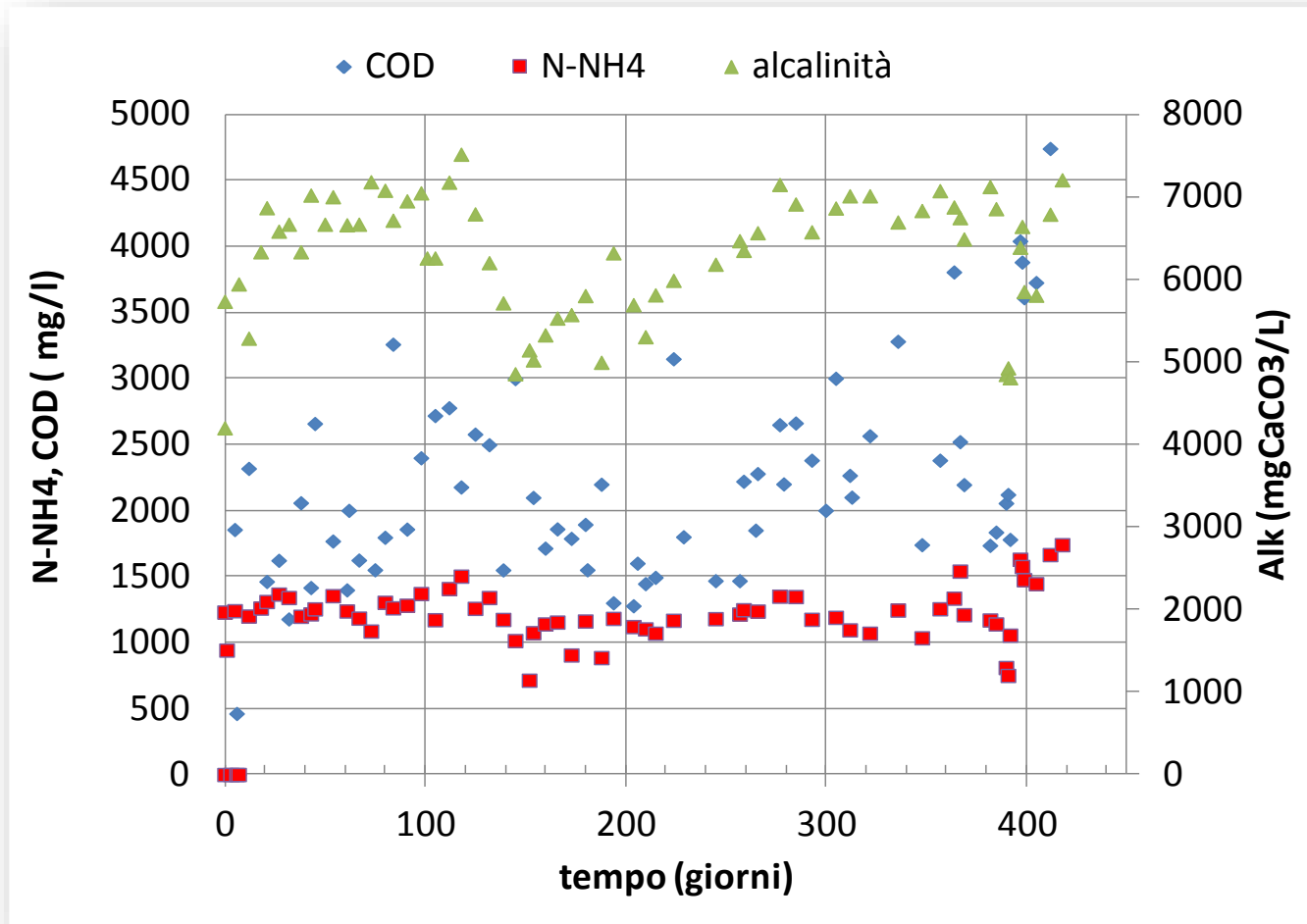
Riduzione dell'alcalinità in ingresso fino al rapporto ottimale:

$$\text{Alk} : \text{N-NH}_4^+ = 1 : 1$$

### •Start up: *Aprile 2012*



## Che tipo di refluo tratta?



## Che tipo di refluo tratta?

TKN	mg/L	1590 ±10%
NH <sub>4</sub> -N	mg/L	1225± 16%
COD <sub>sol</sub>	mg/L	2348 ± 50%
BOD <sub>5</sub> <sub>sol</sub>	mg/L	500 ± 48%
BOD <sub>20</sub> <sub>sol</sub>	mg/L	620 ± 37%
pH	-	8,1 ± 1%
conducibilità	(mS/cm)	14,7 ± 8%
SSV	mg/L	274 ± 45%
SST	mg/L	326 ± 54%
Alcalinità	mgCaCO <sub>3</sub> /L	6333 ± 11%
NH <sub>4</sub> /alk	mol/mol	0,70± 13%





## Che tipo di refluo tratta?

TKN	mg/L	1590 ±10%
NH4-N	mg/L	1225± 16%
<b>CODsol</b>	<b>mg/L</b>	<b>2348 ± 50%</b>
<b>BOD<sub>5</sub>sol</b>	<b>mg/L</b>	<b>500 ± 48%</b>
<b>BOD<sub>20</sub> sol</b>	<b>mg/L</b>	<b>620 ± 37%</b>
pH	-	8,1 ± 1%
conducibilità	(mS/cm)	14,7 ± 8%
SSV	mg/L	274 ± 45%
SST	mg/L	326 ± 54%
Alcalinità	mgCaCO <sub>3</sub> /L	6333 ± 11%
<b>NH<sub>4</sub>/alk</b>	<b>mol/mol</b>	<b>0,70± 13%</b>



- Elevata variabilità del contenuto e della degradabilità della sostanza organica
- Eccesso di alcalinità

## Come funziona?

Le condizioni operative favoriscono:

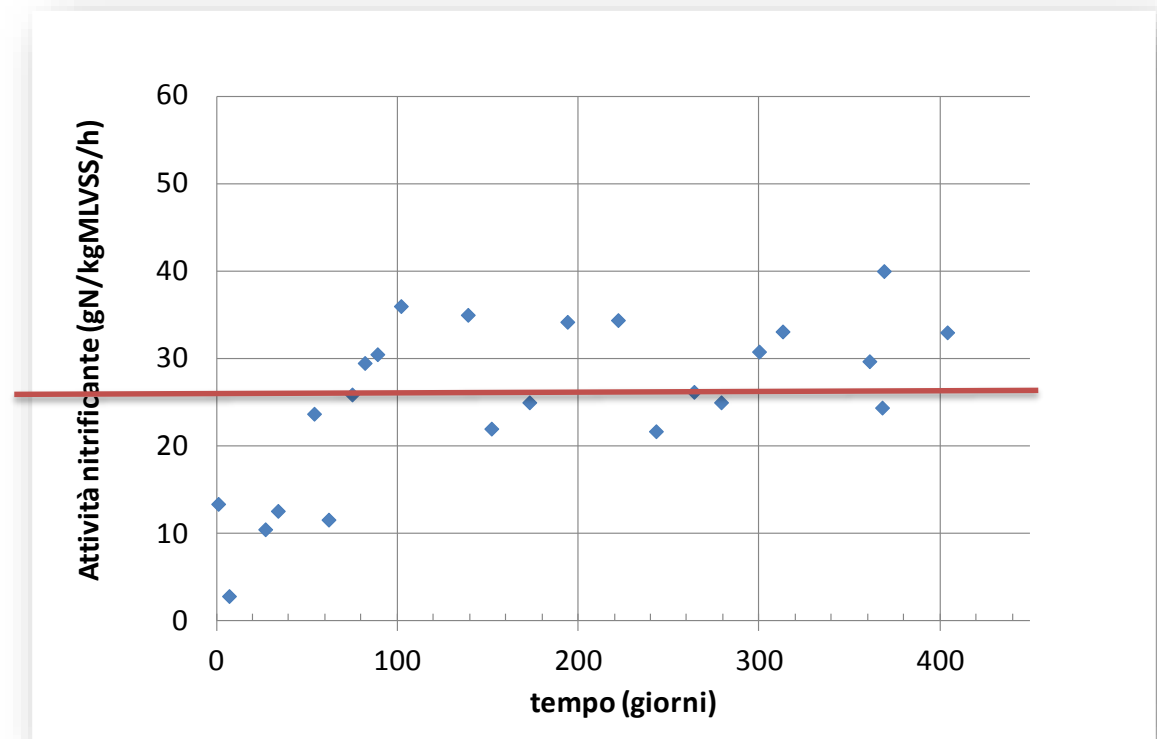
- Sviluppo di una stabile popolazione di batteri ammonio ossidanti (AOB)
- Dilavamento batteri nitrito ossidanti (NOB)



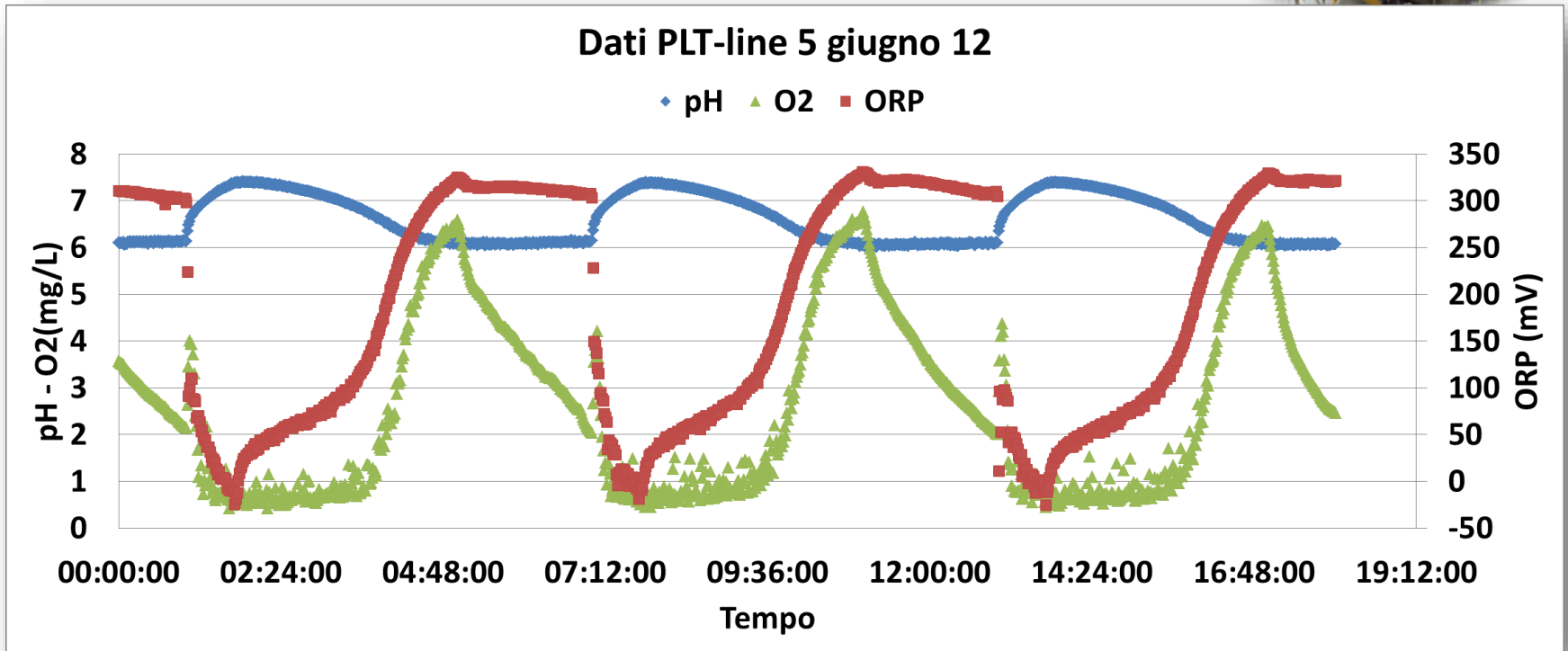
→ Verificata da specifiche misure di attività batterica

Att. AOBmax:

$26 \pm 9,3$  gN/kgMLVSS/h



## Come funziona?



## PARNIT: caratteristiche in uscita



➤ Degradazione della **sostanza organica degradabile**

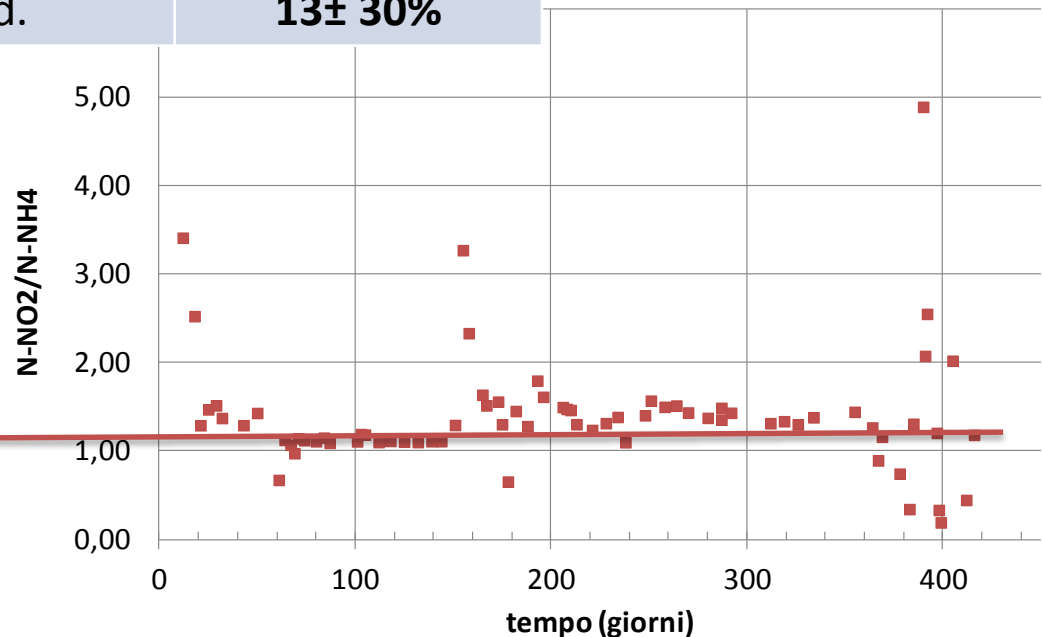
		IN	OUT
COD <sub>sol</sub>	mg/L	2348 ± 50%	1324 ± 35%
BOD <sub>5sol</sub>	mg/L	500 ± 48%	25 ± 60%
BOD <sub>20sol</sub>	mg/L	620 ± 37%	49 ± 53%



## PARNIT: caratteristiche in uscita:

## AZOTO

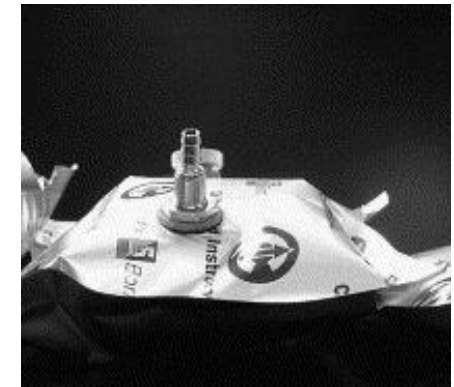
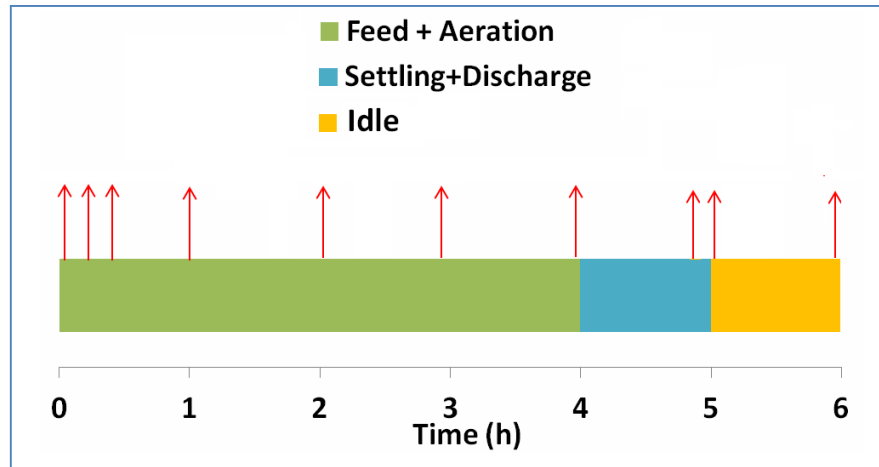
		IN	OUT
TKN	mg/L	1590 ±10%	486 ±35%
N-NH4	mg/L	1225± 16%	452 ±28%
N-NO2	mg/L	n.d.	570±27%
N-NO3	mg/L	n.d.	13± 30%



**N-NO2/N-NH4 = 1,26**  
*Adatto ad alimentare  
 Reattore Anammox*

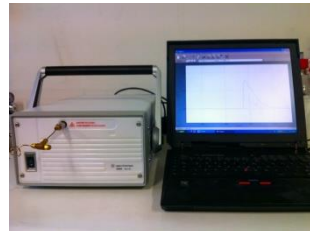
## PARNIT: emissioni $N_2O$ e $NH_3$

- campionamento off-gas mediante *gas-bags*



Cali-5-bond™

- misura (spettrofotometro IR/ microGC)



Emissioni  $N_2O$ :  
 $\leq 5\%$  N ingresso  
Emissioni  $NH_3$ :  
 $\sim 0,1\%$  N ingresso

## ANAMMOX: Il reattore@lab

- **Scopo:** valutazione potenziale inibizione refluo reale per definire piano di carico pilota (*reattore sentinella*)
- **Inoculo:** biomassa ANAMMOX granulare
- **Ciclo:** 8 h (5,5 h FILL, 7,5 h REACT AEROBICO (incluso FILL), 20 min SETTLE+DRAW, 10 min IDLE)

Reattore SBR a **scala di laboratorio**

- **Gestione:**

HRT = 2d

NLR circa 0,5 kgN/m<sup>3</sup>/d

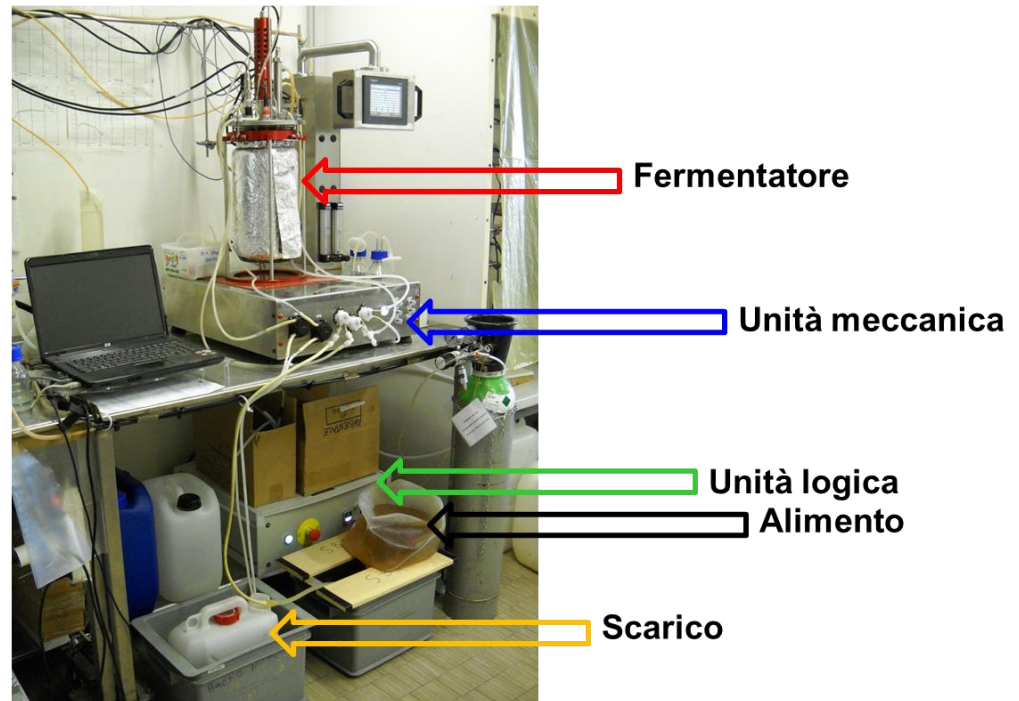
N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub> = 1,1-1,3

9 maggio – 13 luglio 2012

(0-50% di refluo reale)

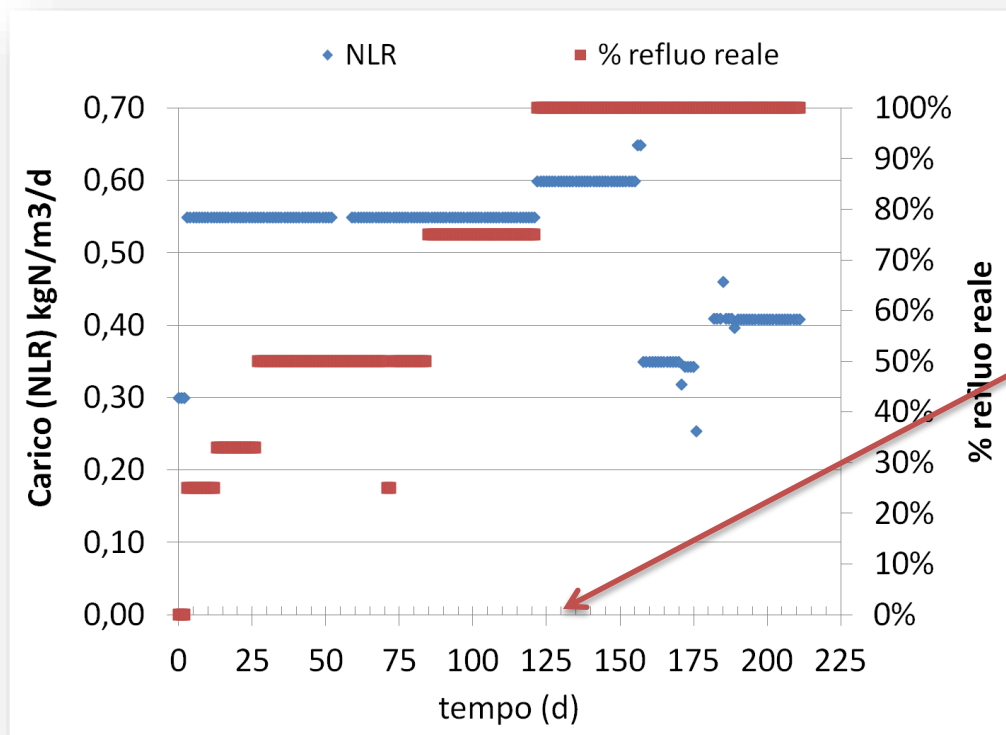
**11 ott 2012 – *ongoing***

(0-100% di refluo reale)



## ANAMMOX: Il reattore@lab

- **Scopo:** valutazione potenziale inibizione refluo reale per definire piano di carico pilota (reattore sentinella)
- **Inoculo:** biomassa ANAMMOX granulare
- **Gestione:**

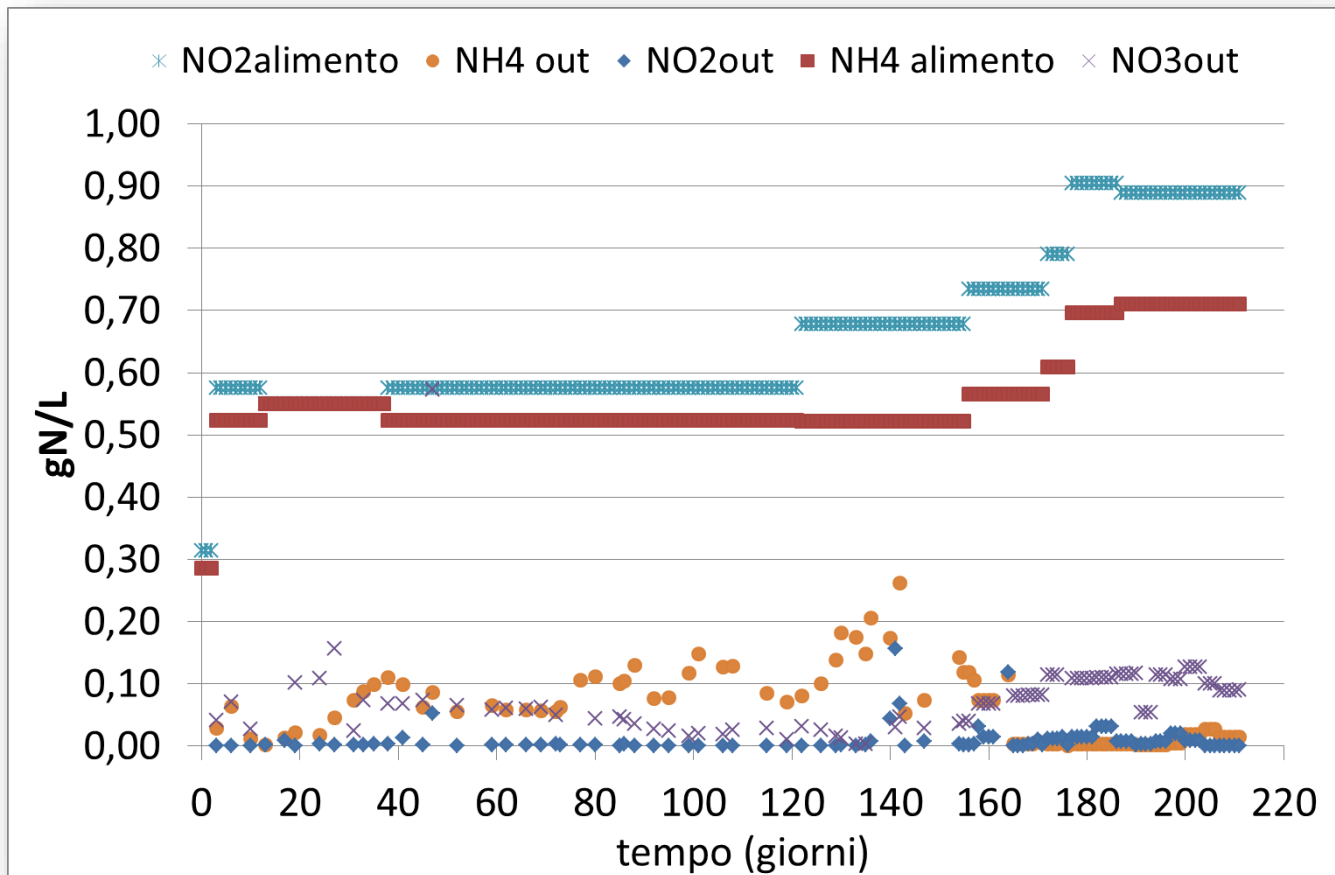


Dal  
24 febbraio 2013  
tratta refluo reale tal  
quale



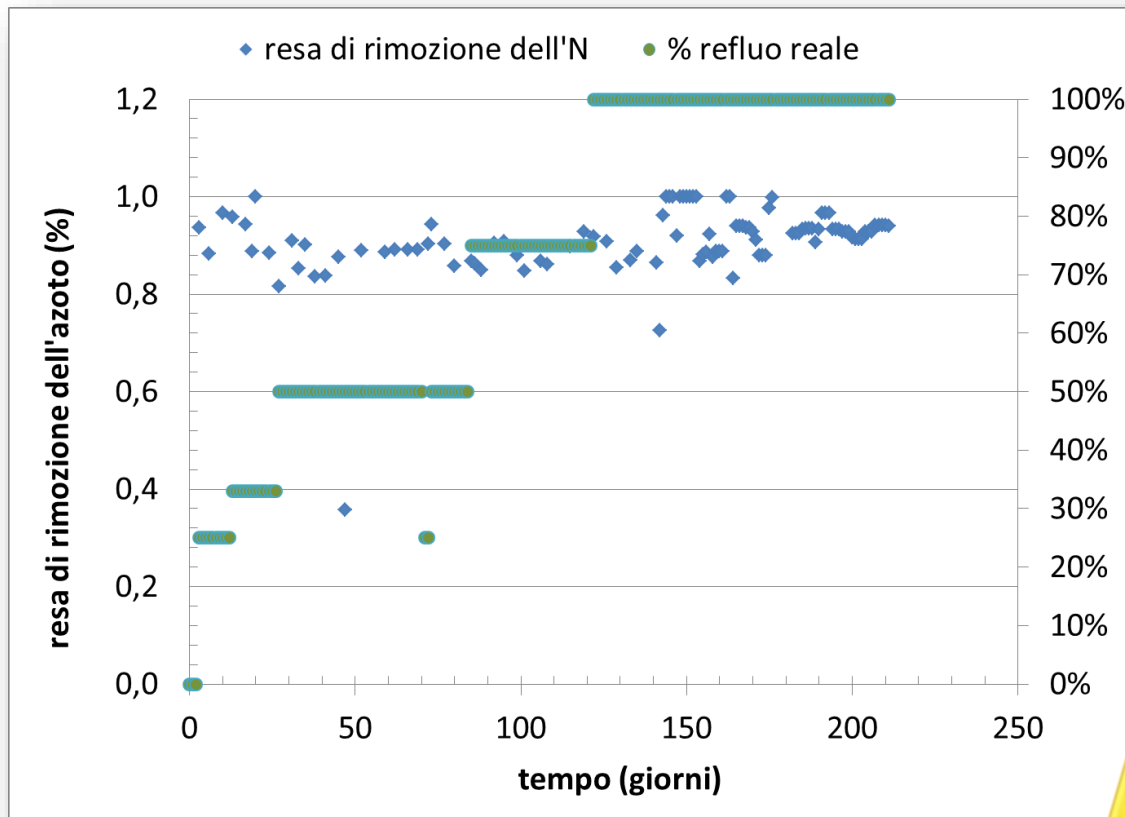
## ANAMMOX: Il reattore@lab

Forme dell'AZOTO in ingresso ed in uscita



## ANAMMOX: Il reattore@lab

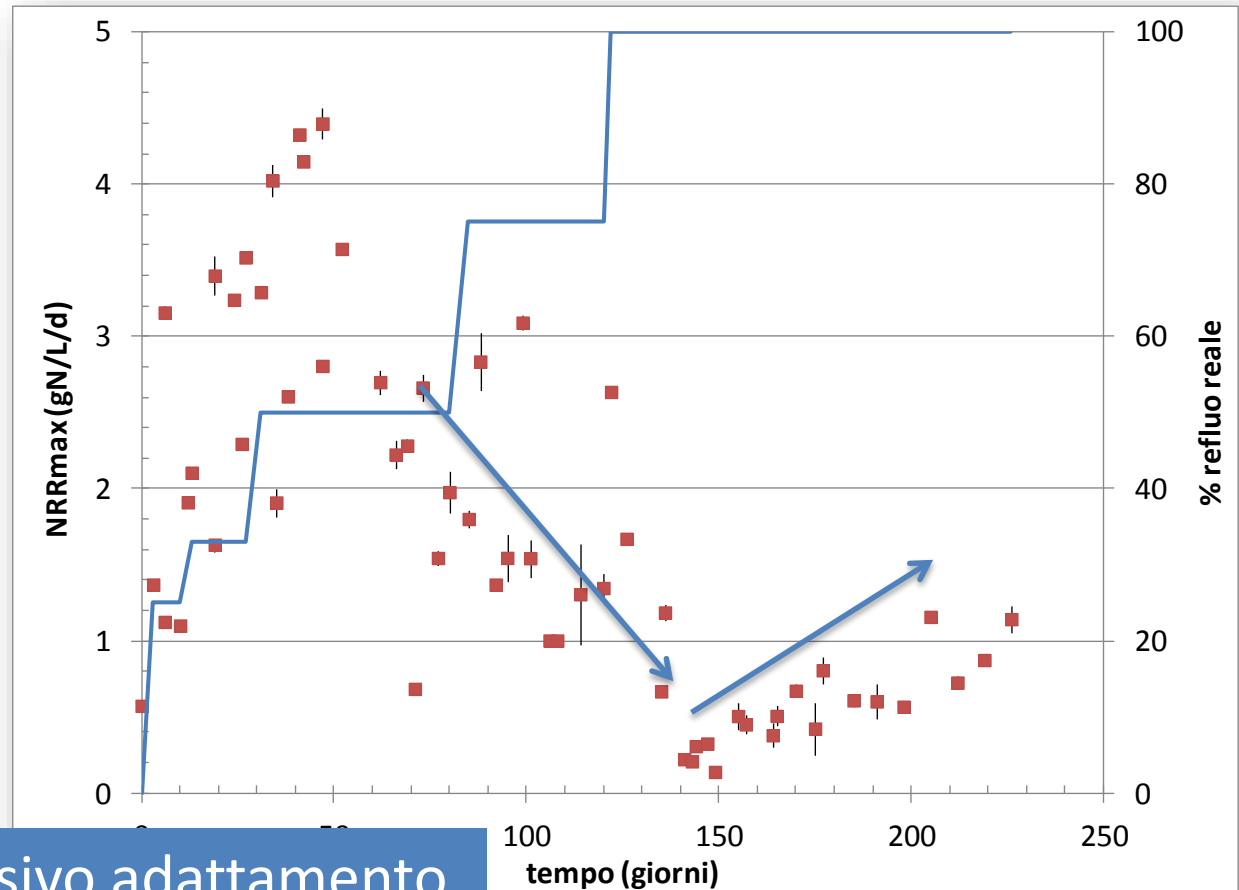
### Resa di rimozione dell'Azoto



**Resa media di  
rimozione dell'azoto:  
93%**

## ANAMMOX: Il reattore@lab

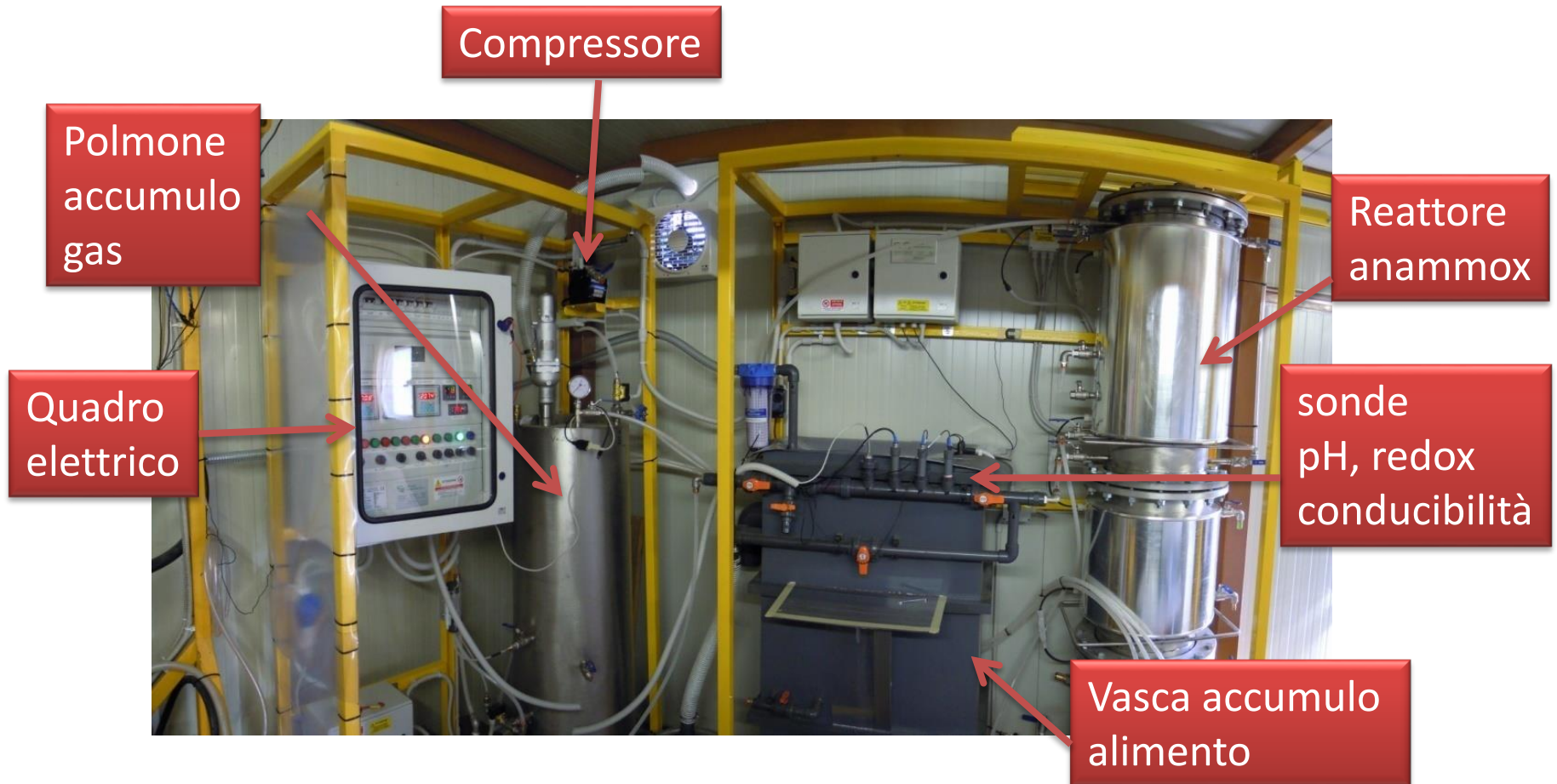
Verifica dell'attività anammox



Progressivo adattamento

## ANAMMOX: Il reattore

Reattore SBR (150 L), miscelazione garantita da ricircolo gas e liquido



## ANAMMOX: il reattore

### Impostazione del ciclo

12 h (7 h FILL, 11,67 h REACT (incluso FILL), 35 min SETTLE+DRAW)

### Parametri operativi:

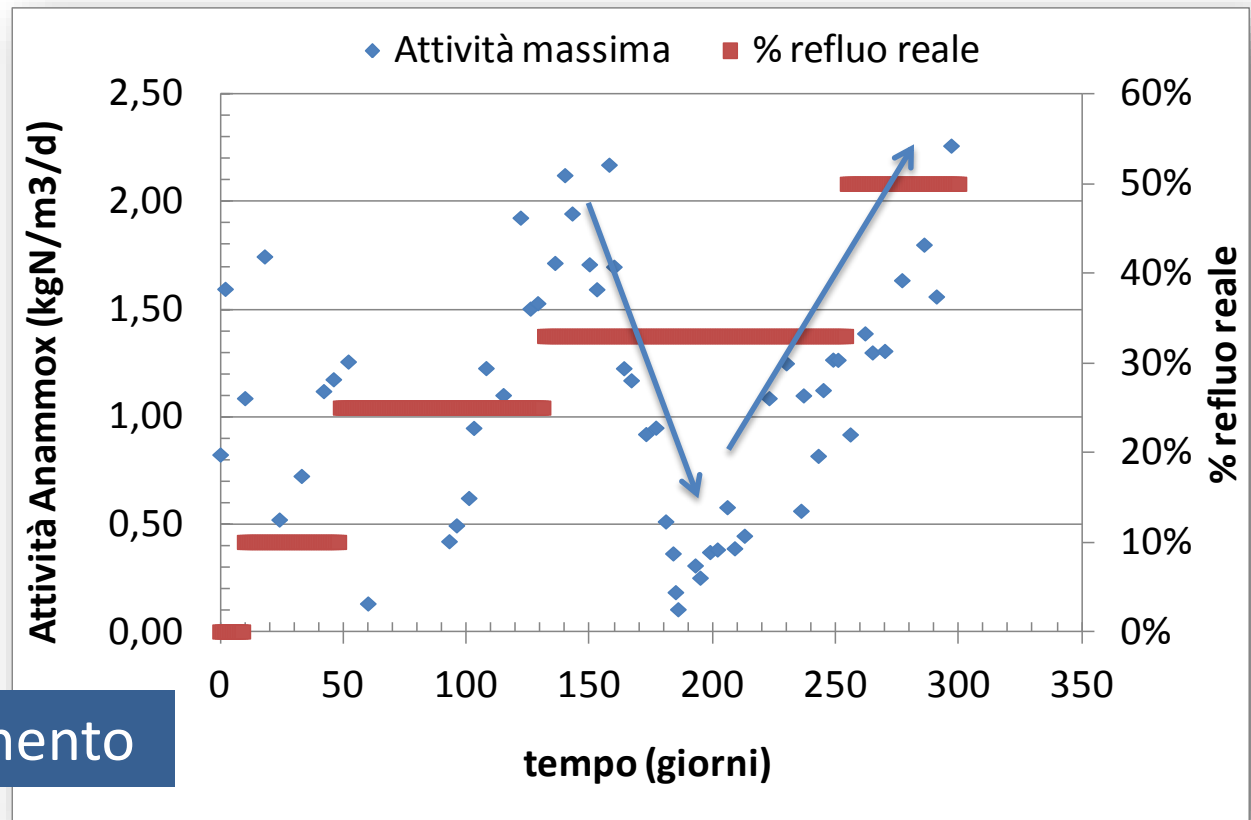
- Tempo di ritenzione idraulico:  $HRT = 2 \text{ d}$ ,
- Carico di Azoto applicato:  $NLR = 0.5-0.7 \text{ kgN/m}^3/\text{d}$
- Rapporto ,  $N\text{-NO}_2/N\text{-NH}_4 = 1.1-1.3$

*Avvio:* Avviamento dell'impianto utilizzando la biomassa granulare ANAMMOX preformata 5 maggio 2012



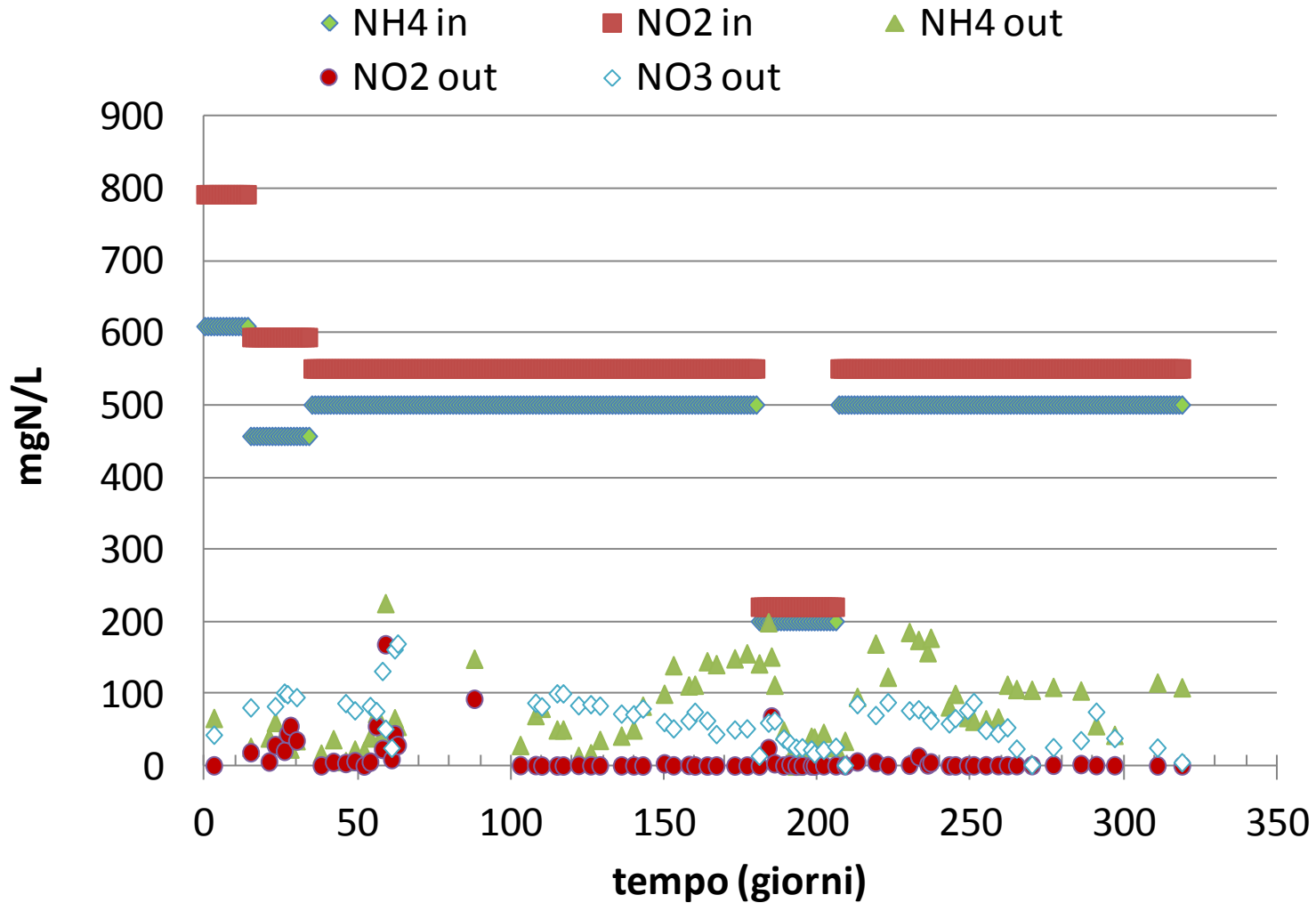


## ANAMMOX: Come funziona?



Progressivo adattamento

## ANAMMOX: Risultati



## ANAMMOX: Caratteristiche dell'effluente

$\text{NH}_4\text{-N}$	mg/L	78 $\pm$ 69%
$\text{NO}_2$	mg/L	11 $\pm$ 235%
$\text{NO}_3$	mg/L	64 $\pm$ 51%
CODsol	mg/L	261 $\pm$ 68%
BOD <sub>5</sub> sol	mg/L	17 $\pm$ 45%
BOD <sub>20</sub> sol	mg/L	50 $\pm$ 30%





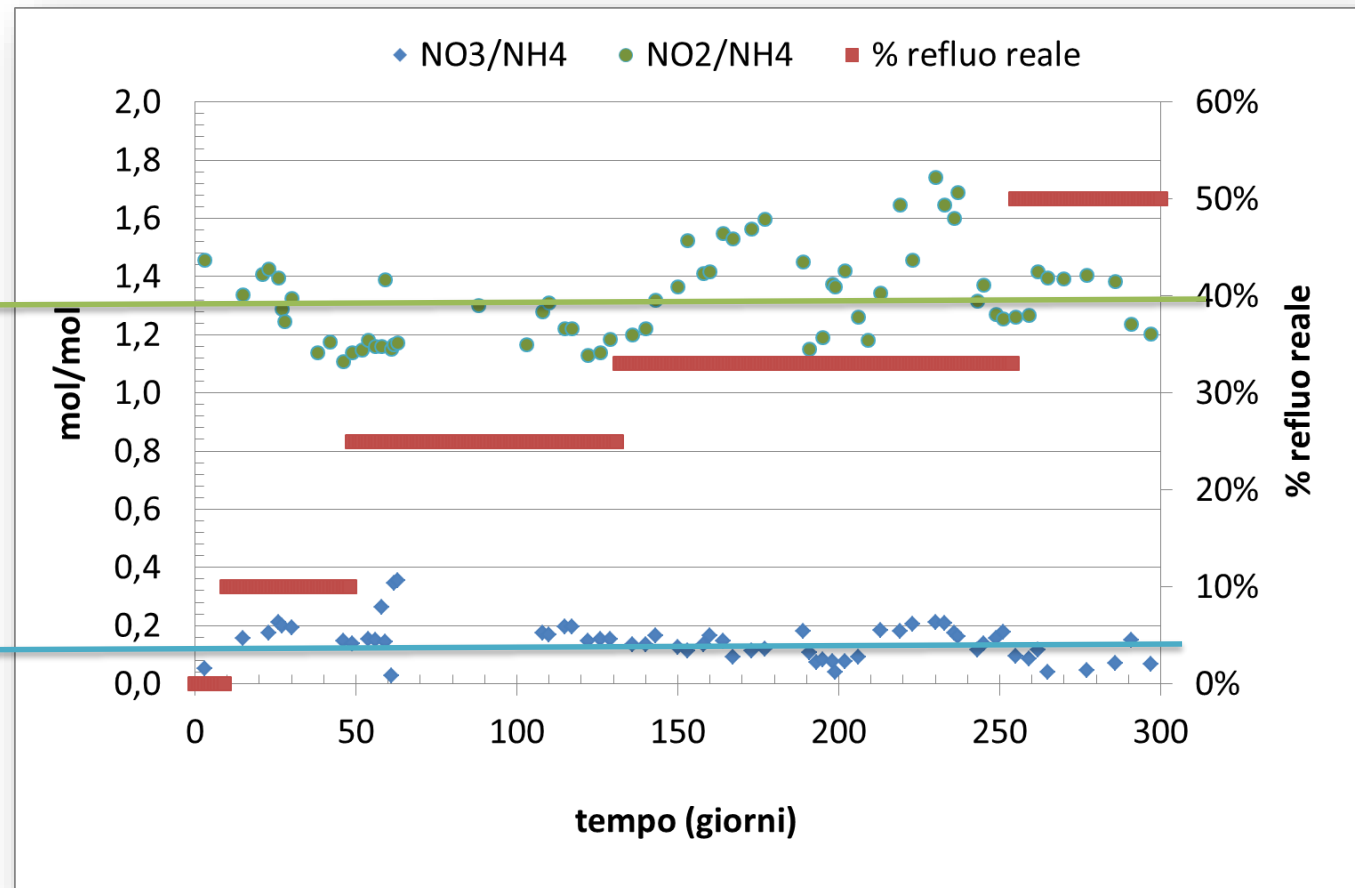
## Sono veramente batteri anammox??

Verifiche:

### 1) Rapporti di rimozione, rispetto a stechiometria

N-NO<sub>2</sub>/N-NH<sub>4</sub>  
Misurato=  $1,32 \pm 5\%$   
Stechiom.= 1,32

N-NO<sub>3</sub>/N-NH<sub>4</sub>  
Misurato=  $0,14 \pm 49\%$   
Stechiom.= 0,26



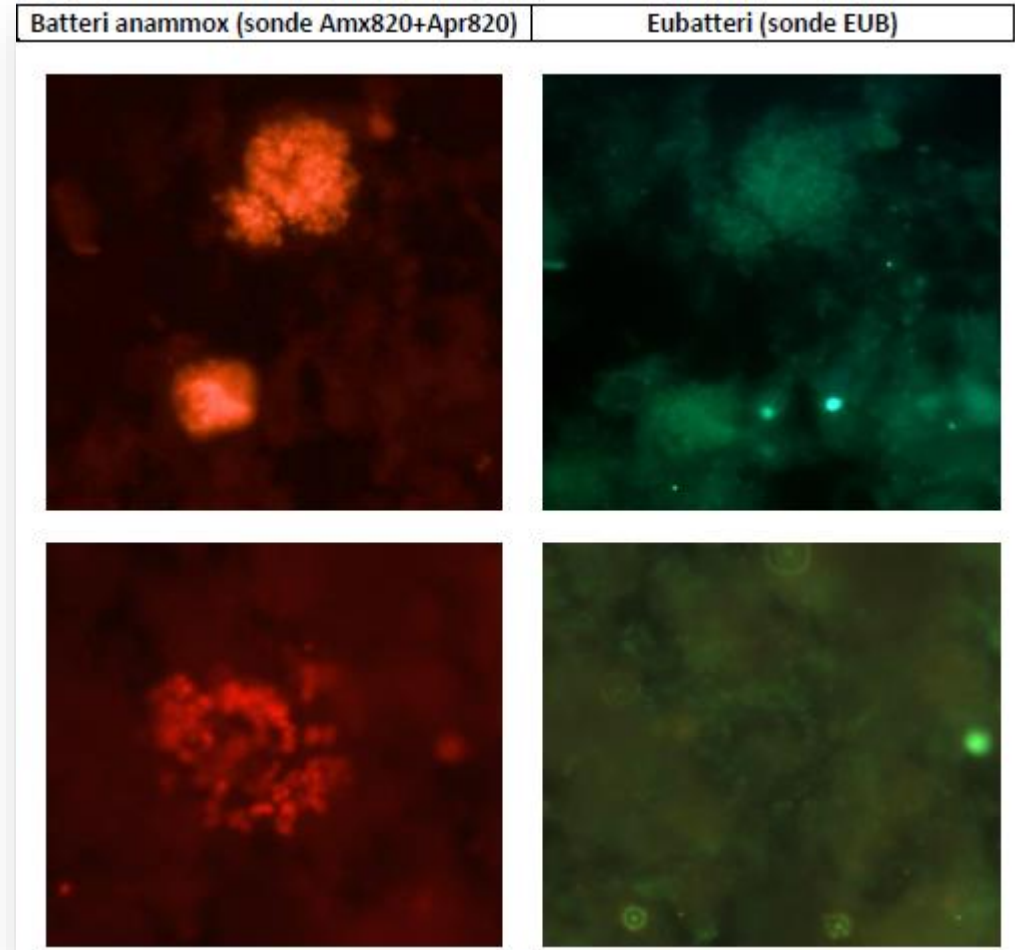
## Sono veramente batteri anammox??

Verifiche:

2) Verifiche microbiologiche

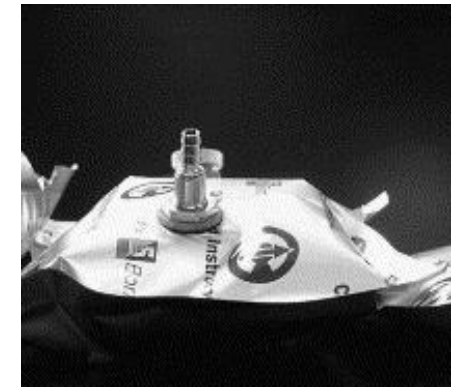
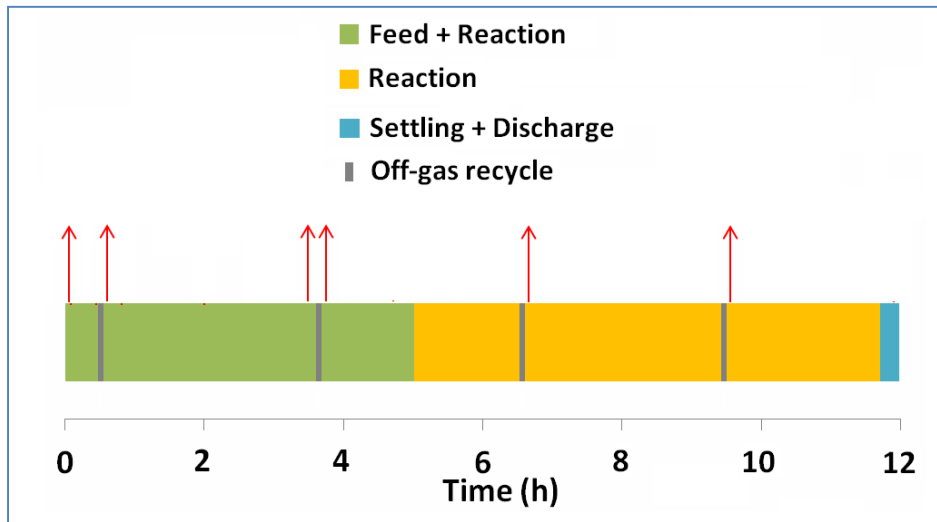
esempio: **FISH**

(Fluorescent In-Situ hybridization)



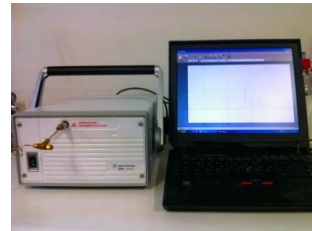
## ANAMMOX: emissioni $N_2O$ e $NH_3$

- campionamento off-gas mediante *gas-bags*



Cali-5-bond™

- misura (spettrofotometro IR/ microGC)



Emissioni  $N_2O$ :  
**<0,3% N ingresso**  
Emissioni  $NH_3$ :  
**trascurabile**



## Sperimentazione alla scala pilota:



➤ **PARNIT:** processo stabile in grado di produrre effluente adatto a successivo processo anammox (nonostante variabilità degli ingressi)

### ➤ **Anammox:**

- Effluente PARNIT è trattabile da batteri Anammox anche senza diluizione
- Efficienza di rimozione tra 85 e 93%

# Ringraziamo

- Cecilia Caretti, Simone Caffaz (*UNIFI*)
- Davide Scaglione, Giorgio Tornotti, Aronne Teli (*POLIMI*)
- Tommaso Lotti, Mark Van Loosdrecht (*TU Delft*)
- Domiziano Basilico, Roberto Villano (*SEAM engineering*)
- Giuseppina Bestetti, Isabella Gandolfi (*Università Statale Milano-Bicocca*)
- Mario Drago (*Società Agr. CorteGrande*)