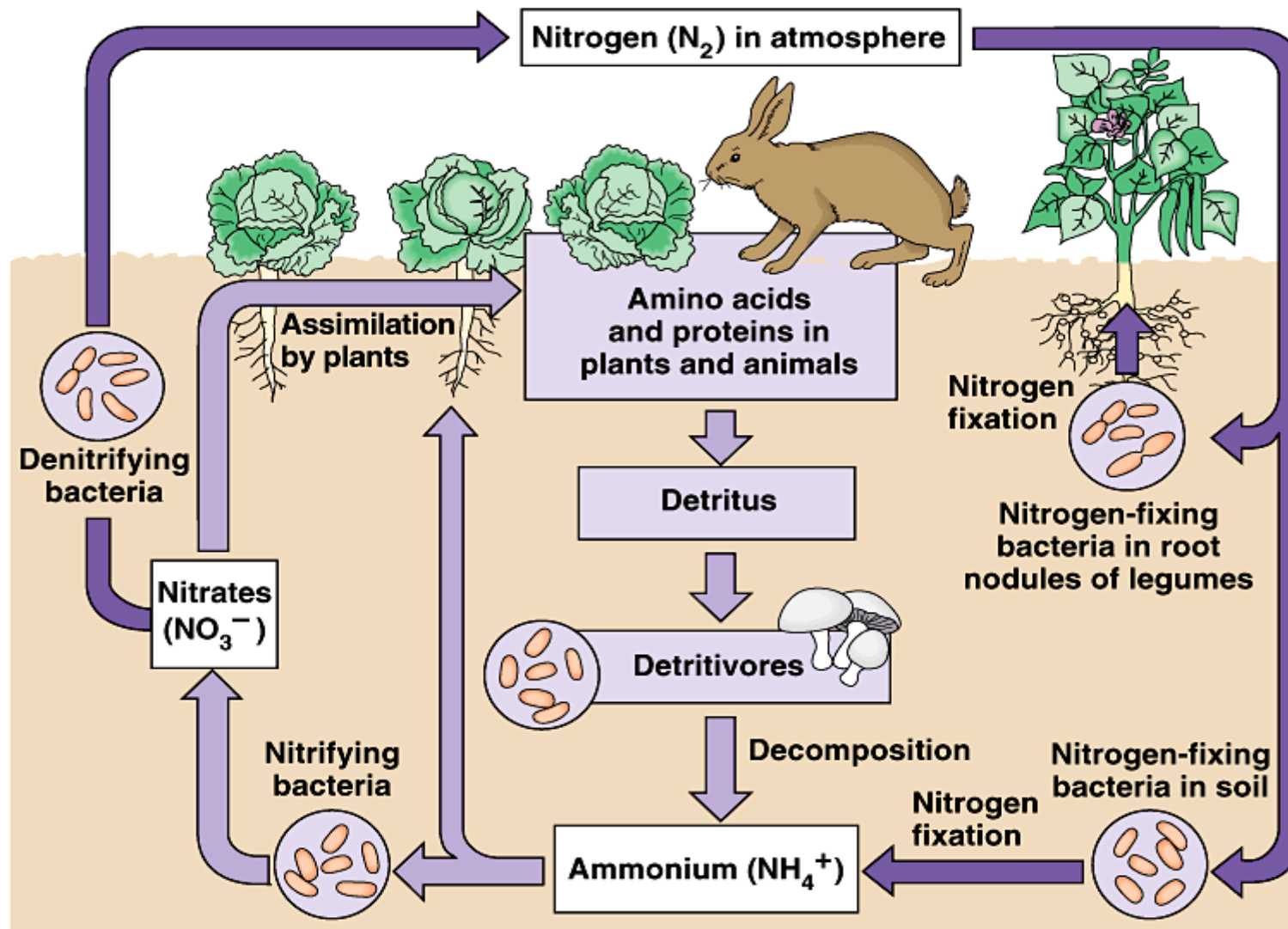
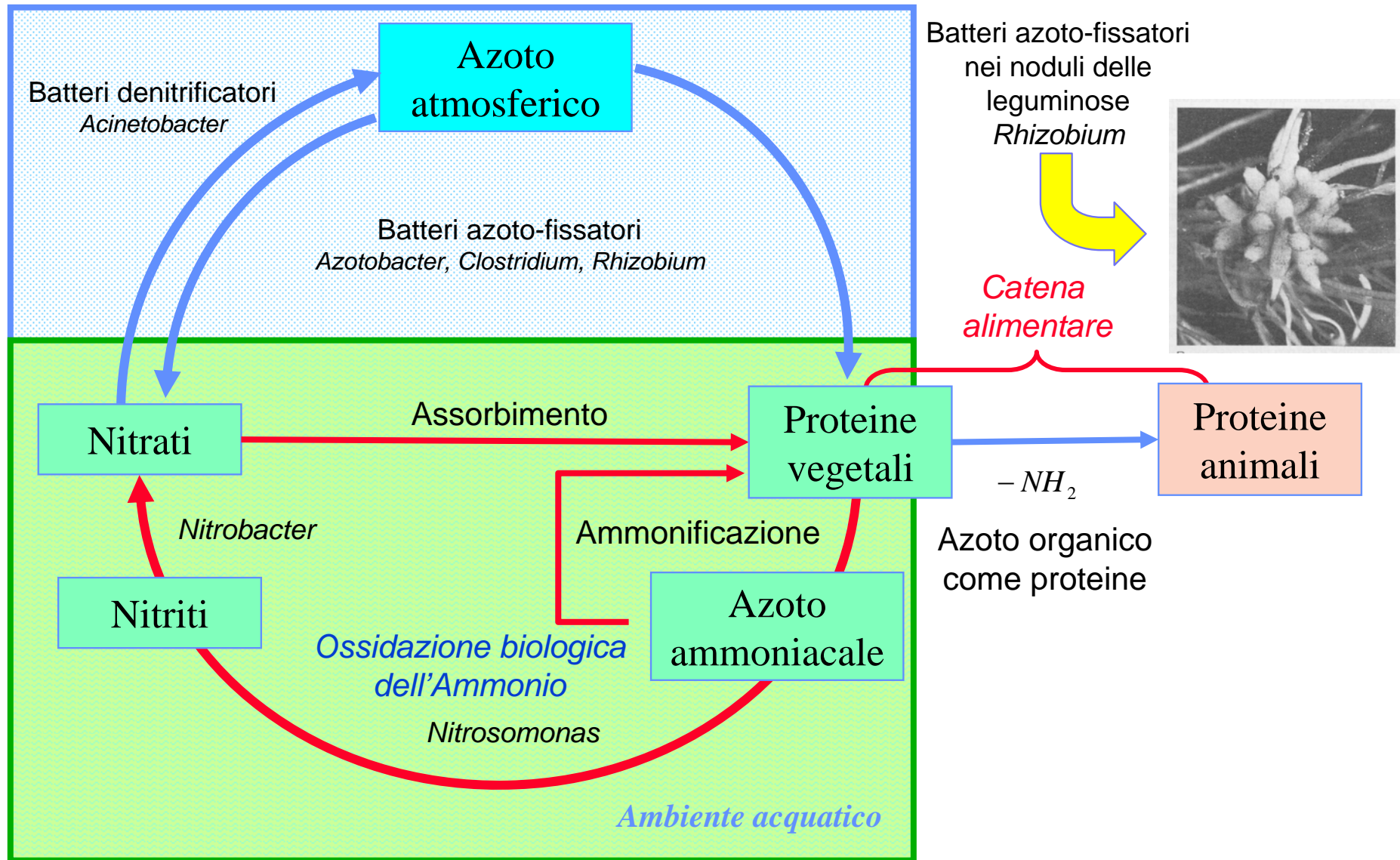


Ciclo dell'Azoto



Copyright © 2003 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Ciclo dell'Azoto

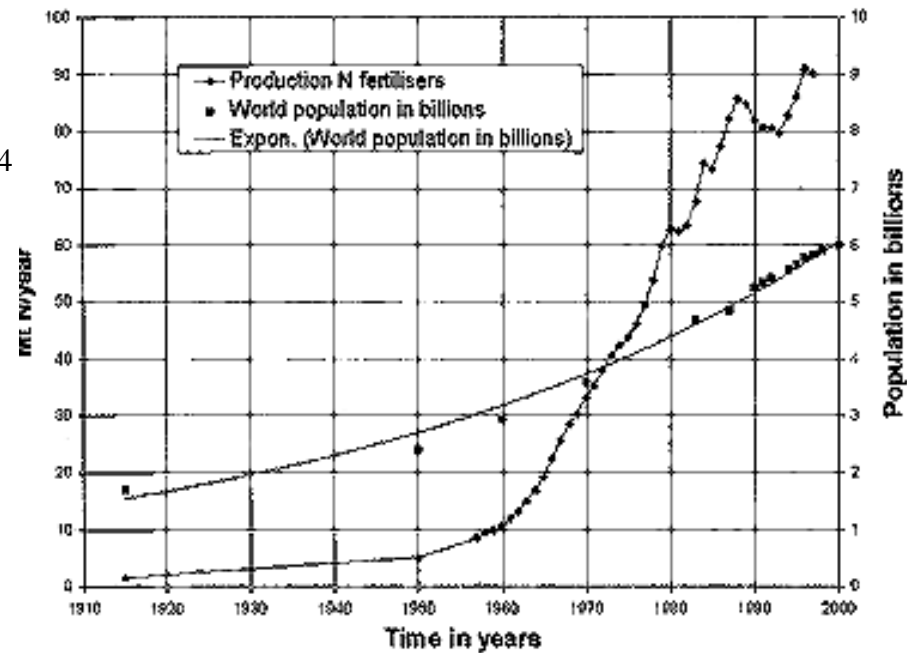


Ciclo dell'Azoto

- ☞ Ciclo gassoso a controllo essenzialmente biologico
- ☞ Principale riserva in atmosfera (N_2 & O_2)
- ☞ Forme principali e comparti prevalenti
 - ⇒ N_2 azoto elementare (atmosfera)
 - ⇒ NH_3 e NH_4^+ ammoniaca e ione ammonio (pedosfera e idrosfera)
 - ⇒ NO_2 nitriti (pedosfera e idrosfera)
 - ⇒ NO_3 nitrati (pedosfera e idrosfera)
 - ⇒ N organico (biosfera, pedosfera e idrosfera)
- ☞ Principali reazioni che regolano il ciclo dell'azoto
 - ⇒ Azoto fissazione (batteri)
 - ⇒ Assimilazione e biosintesi (piante e successivamente animali)
 - ⇒ Decomposizione (batteri e funghi)
 - ⇒ Ammonificazione (batteri)
 - ⇒ Nitrificazione (batteri)
 - ⇒ Denitrificazione (batteri)

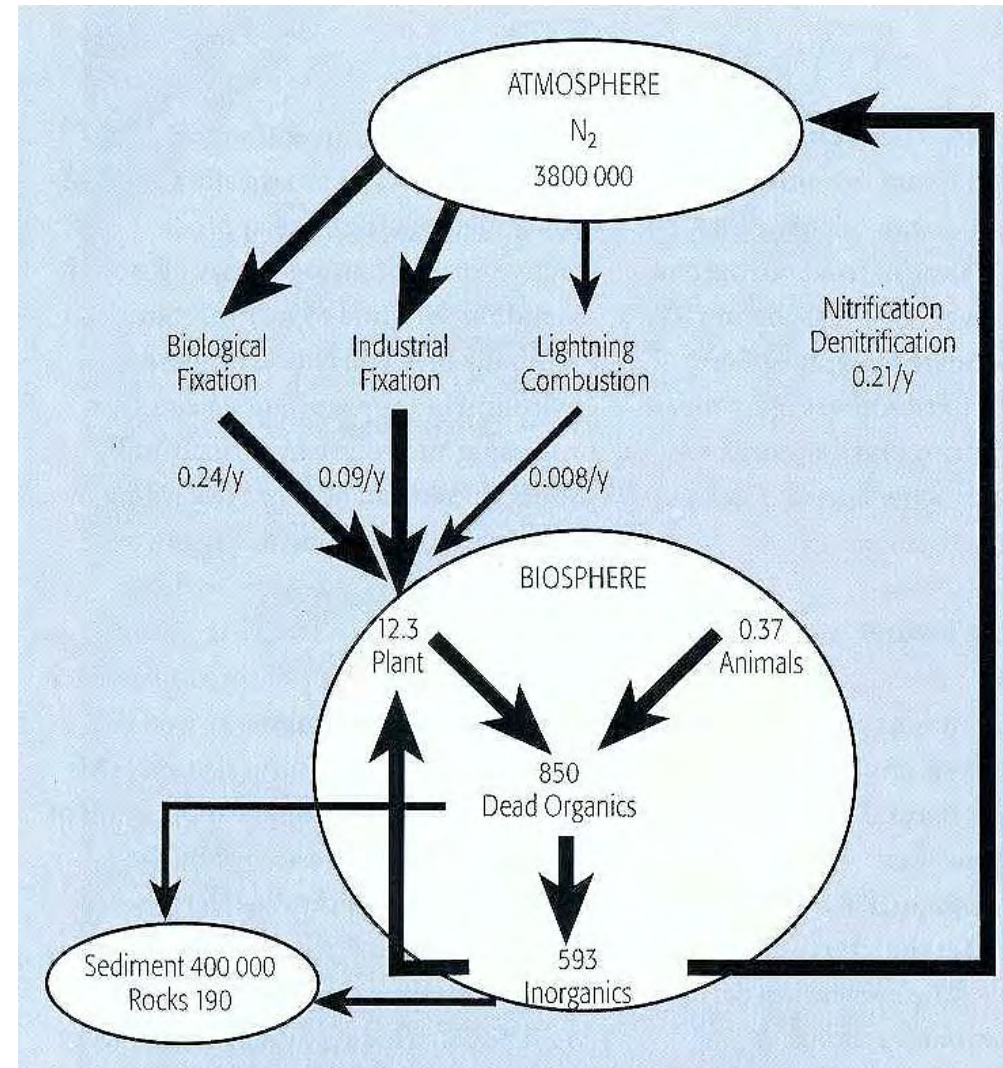
Alterazioni al ciclo dell'Azoto

- ☞ Il ciclo naturale viene sconvolto dalla scoperta della sintesi dell'ammoniaca (Haber, 1913) industrializzata da Bosch (1960)
- ☞ Da allora la produzione di forme reattive di azoto come fertilizzante è cresciuta più in fretta della popolazione mondiale
- ☞ Conseguenze negative dell'aumento di N reattivo nella biosfera:
 - ⇒ Bloom algale → Eutrofizzazione
 - ⇒ Rilascio tossine dalle alghe
 - ⇒ Debito di O_2 per ossidazione NH_4
 - ⇒ Perdita di biodiversità
- ☞ La quantità di azoto immessa nella biosfera è maggiore di quella rimossa attraverso i processi di Nitro/Denitro nei depuratori biologici



Bilancio mondiale dell'azoto (Ciclo naturale)

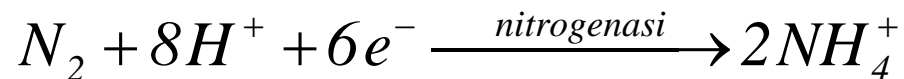
- 👉 La Biosfera viene rifornita di Azoto dall'atmosfera attraverso i processi di
 - ➡ fissazione biologica dell'azoto (*Rhizobium*)
 - ➡ Apporto di nitrati con la pioggia
- 👉 Normalmente l'Azoto torna in atmosfera attraverso la denitrificazione, preceduta dall'ossidazione biologica delle forme ridotte dell'azoto



Valori in 10¹² Kg/anno

Azoto-fissazione biologica

- 👉 I batteri azotofissatori (procarioti, batteri e cianobatteri) possono vivere sia liberi che in simbiosi, molti generi sono eterotrofi, altri autotrofi.
- 👉 Fra gli eterotrofi alcuni generi sono anaerobi obbligati, (per esempio Clostridium), altri aerobi facoltativi (per esempio Klebsiella), altri ancora aerobi (per esempio Azotobacter).
- 👉 I batteri autotrofi presentano un tipo primitivo di fotosintesi, ricavando sia il carbonio che l'azoto dall'aria (come il Rhodospirillum).
- 👉 Fra i batteri che vivono in simbiosi, i più importanti e specializzati appartengono al genere Rhizobium, (chemioorganotrofi aerobi) che formano **noduli radicali** in molte specie di leguminose.
- 👉 Tutti i microorganismi capaci di fissare l'azoto sono provvisti di un sistema enzimatico denominato **nitrogenasi**
- 👉 La reazione di azotofissazione biologica, catalizzata dal complesso enzimatico nitrogenasi è



Azoto-fissazione in ambiente acquatico

In ambienti acquatici la fissazione dell'azoto è operata da cianobatteri, impropriamente detti anche alghe azzurre.

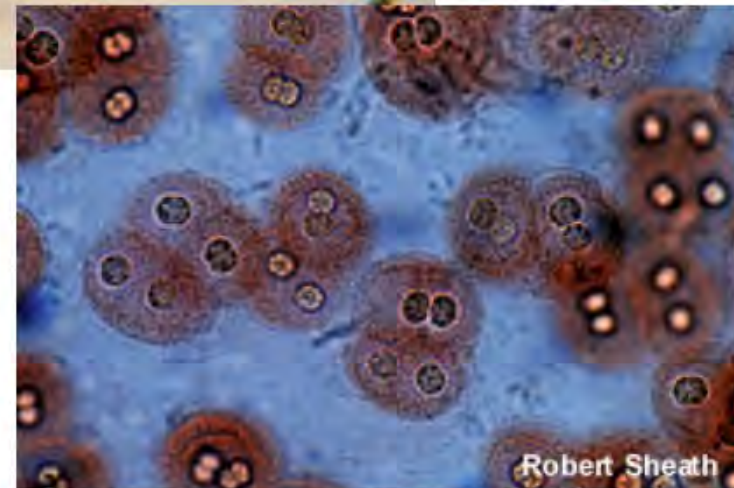
I cianobatteri sono liberi, non simbionti, capaci di fare la fotosintesi.

Quindi sono in grado di utilizzare direttamente l'azoto fissato.



Oscillatoria princeps

Robert Sheath



Gloeocapsa sp.

Robert Sheath

Efficienza dell'azoto-fissazione

Ambiente terrestre

Batteri simbiotici

Varie specie di *Rhizobium* associate a diverse specie di leguminose (alfalfa, soia, fagiolo, ecc.) **da 50 a 200 kg N/ha anno**

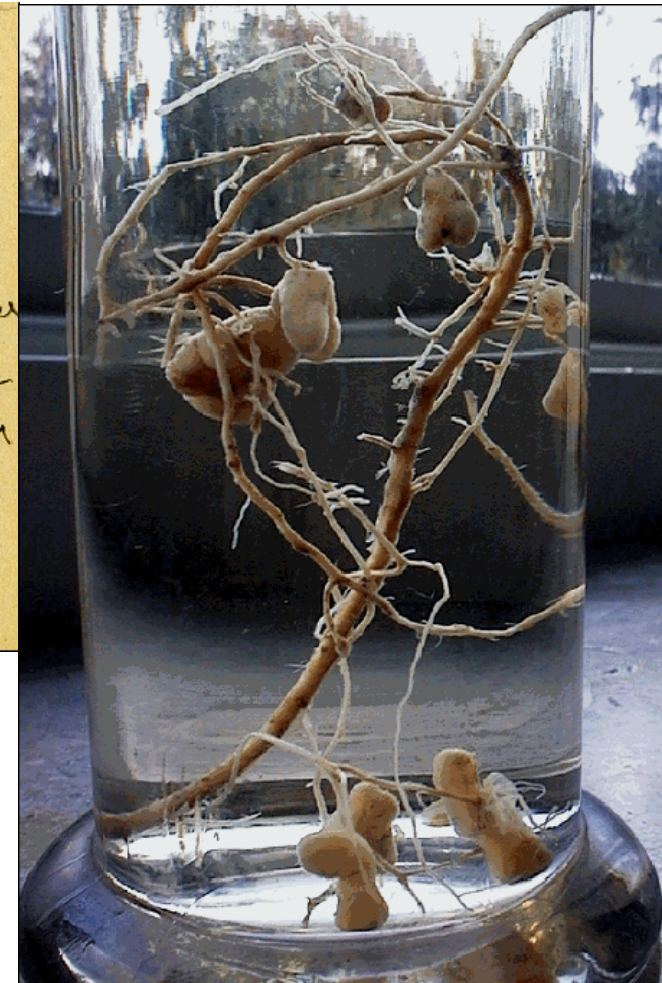
Batteri non simbiotici

Azotobacter e *Clostridium* **da 5 a 20 kgN/ha anno**

Ambiente acquatico

Cianobatteri **da 10 a 50 kgN/ha anno**

Azoto-fissazione by *Rhizobium*

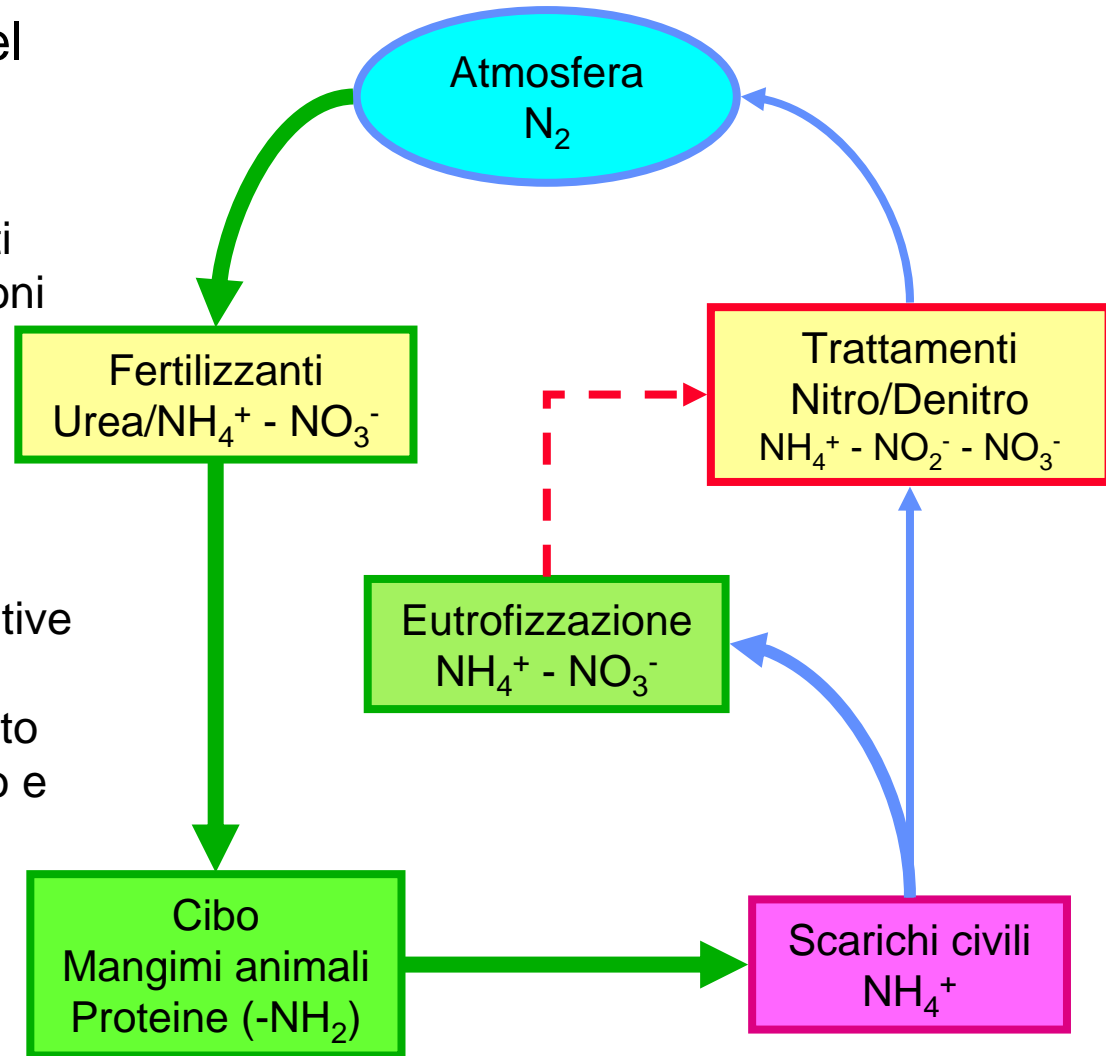


Simbiosi con le radici delle leguminose

Ciclo antropizzato dell'azoto

☞ L'attuale sbilanciamento del ciclo dipende da

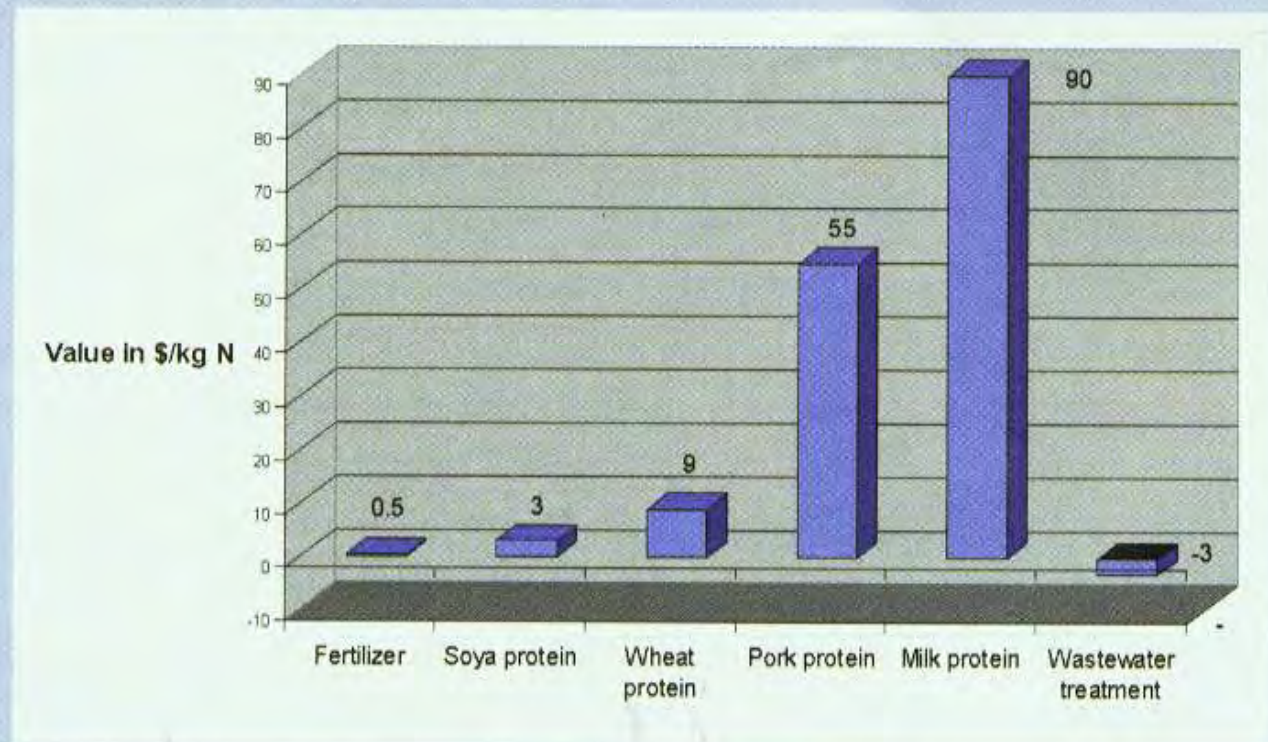
- ⇒ Eccessiva produzione ed applicazione di fertilizzanti
- ⇒ Inefficienza nelle produzioni vegetali ed animali
- ⇒ Il 30% della fissazione dell'azoto è industriale
- ⇒ Solo il 10% dell'azoto applicato in agricoltura si trasforma in proteine nutritive
- ⇒ L'assorbimento umano di azoto è appena 1%. Il resto viene espulso come rifiuto e finisce in fognatura
- ⇒ Solo il 5% dell'acqua di scarico subisce un trattamento terziario (Nitro/Denitro)



Valore dei prodotti azotati

Values of different N-products

Passing through the N-cycle, nitrogen is transformed into different products each with a typical financial value. The prices per kilogram of nitrogen vary from \$0.5 for fertiliser to \$90 for milk protein. On the other hand, treating waste nitrogen will cost money and therefore this form of nitrogen carries a negative value.

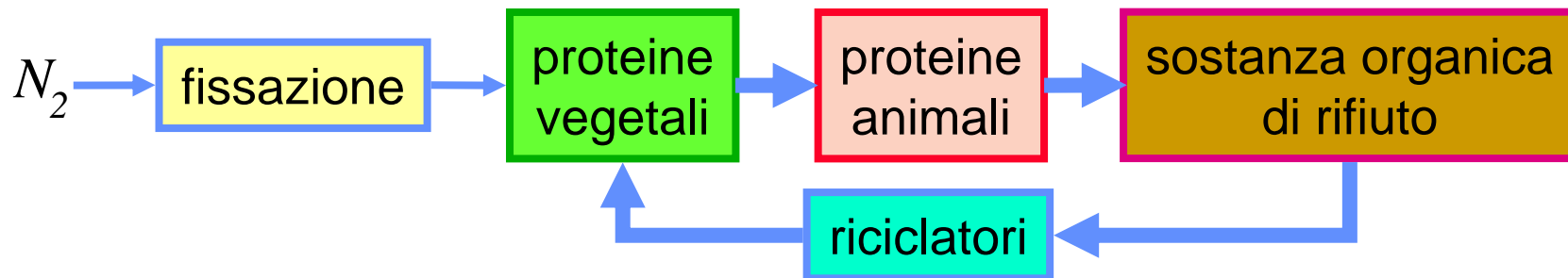


Considerazioni sul ciclo antropogenico dell'azoto

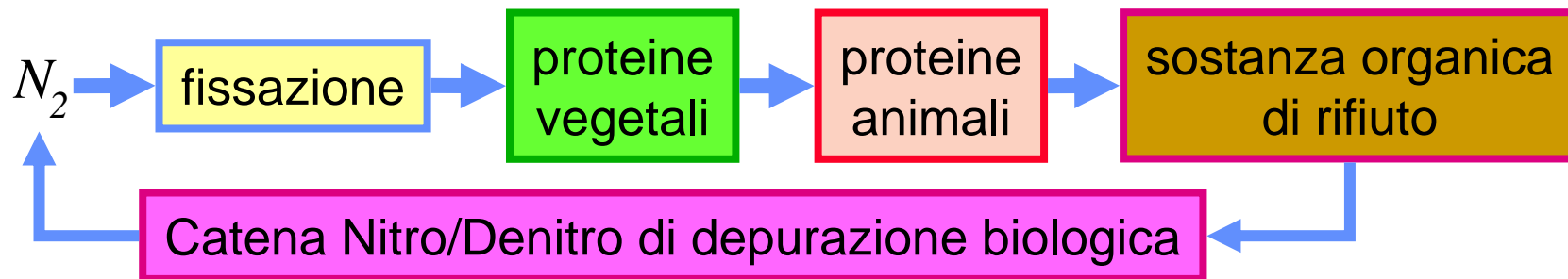
- ☞ Il ciclo antropizzato è basato sullo *spreco*
- ☞ Nello sfruttamento della risorsa
 - ⇒ La produzione di proteine nutritive richiede una grande quantità di energia non rinnovabile (produzione di N-fertilizzante, coltivazione, lavorazione)
 - ⇒ Solo una minima parte viene assimilata dai consumatori (animali ed umani)
 - ⇒ circa il 99% dell'azoto "pregiato" finisce in fognatura come rifiuto
- ☞ Nel tentativo di recupero
 - ⇒ Nel processo Nitro/Denitro vengono distrutti molti composti utili (ad es. fertilizzanti) per convertirli in N_2
 - ⇒ Anche questo processo utilizza notevoli energie non rinnovabili
- ☞ Nel ciclo naturale, pochissimo N viene portato a N_2
- ☞ La soluzione sta nel passare dal ciclo
 - ⇒ Produzione → Consumo → Rifiuto
 - a
 - ⇒ Produzione → Consumo → Riciclaggio

Inefficienza del ciclo antropizzato

- ☞ Nel ciclo naturale, pochissimo N viene portato a N_2 perché ciò è biologicamente ed energeticamente inefficiente
- ☞ La sostanza organica di rifiuto viene mineralizzata nel suolo e riciclata verso i produttori primari come NO_3^- e NH_4^+
- ☞ Il riuso di questi composti azotati spiega l'alta efficienza del sistema naturale



- ☞ Il ciclo antropizzato sottrae questi composti alla biosfera ed allunga i tempi di ricircolo



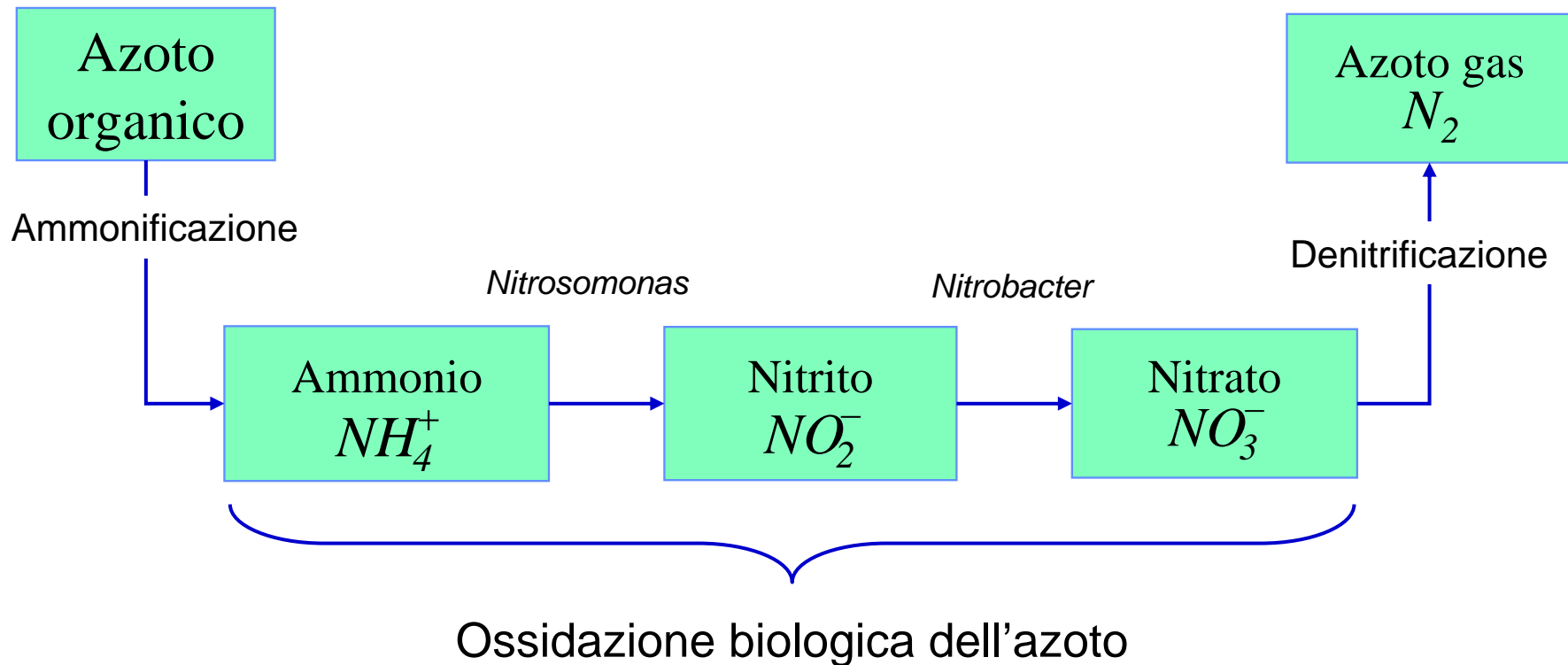
Soluzioni?

- 👉 Imitare i cicli naturali, dove non esiste RIFIUTO, ma solo RICICLAGGIO
- 👉 Riutilizzo di fertilizzanti organici azotati da acque di scarico, dopo sterilizzazione
- 👉 Riutilizzo di nutrienti da parte di organismi fototrofi (alghe, fitodepuratori, agricoltura)
- 👉 Queste soluzioni saranno possibili solamente se viene radicalmente rivisto l'intero ciclo produttivo
 - ➡ Separazione degli scarichi
 - ➡ Separazione degli acquedotti
 - ➡ Sistemi di depurazione parziale e disinfezione
 - ➡ Utilizzo massiccio ed integrato di microrganismi aerobici, anaerobici e fototrofi.

Ciclo dell'Azoto nei depuratori biologici

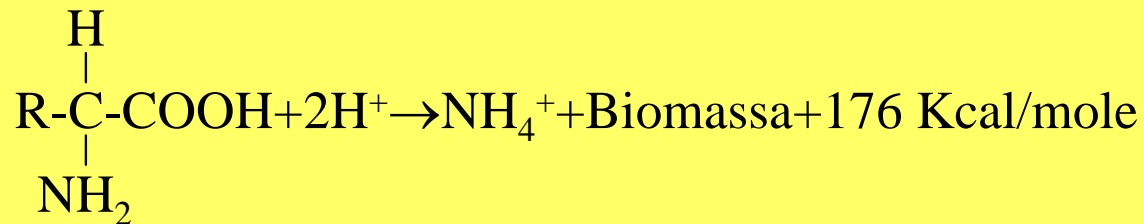
Nei sistemi di depurazione l'azoto organico e/o ammoniacale in arrivo subisce due processi successivi:

- 1) in ambiente aerobico viene ossidato biologicamente a nitrato (nitrificazione)
- 2) successivamente, in ambiente anossico viene convertito in azoto gas (denitrificazione)

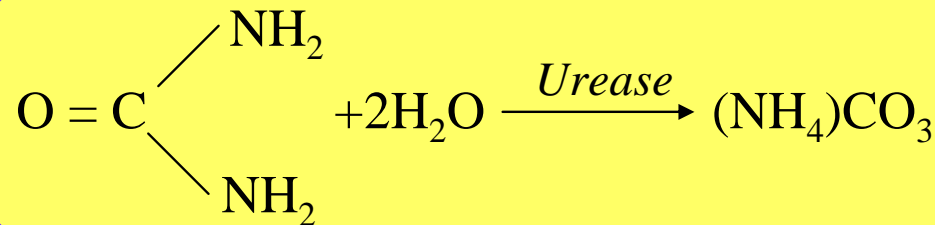


Ammonificazione

- ☞ Nella degradazione di composti azotati organici (Proteine), il Carbonio organico può servire sia come fonte energetica che come substrato.
- ☞ L'Ammonio prodotto viene incorporato nelle nuove cellule per quanto necessita alla crescita mentre l'eccesso viene rilasciato come NH_4^+ .
 - ⇒ **De-amminazione**: processo energetico che produce NH_4^+ in eccesso al fabbisogno cellulare partendo da gruppi amminici ($-\text{NH}_2$)



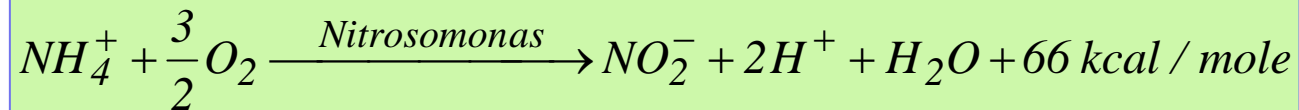
- ⇒ **Idrolisi dell'urea**: con formazione di carbonato di ammonio



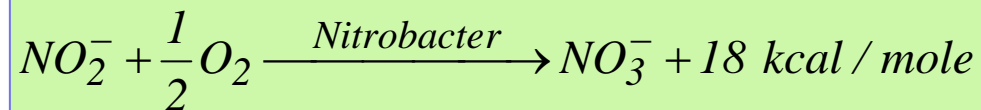
Nitrificazione

- ☞ Alcuni batteri (*chemio-autotrofi*) attraverso un metabolismo aerobico usano come fonte di energia composti inorganici come NH_4^+ , NO_2^- , Fe^{++} e H_2S .
- ☞ I composti organici sono ossidati per produrre ATP e potere riducente per convertire carbonio inorganico (CO_2) in costituenti cellulari (*anabolismo*).
- ☞ Nel caso della Nitrificazione, i più importanti batteri chemio-autotrofi che effettuano la **nitrificazione**

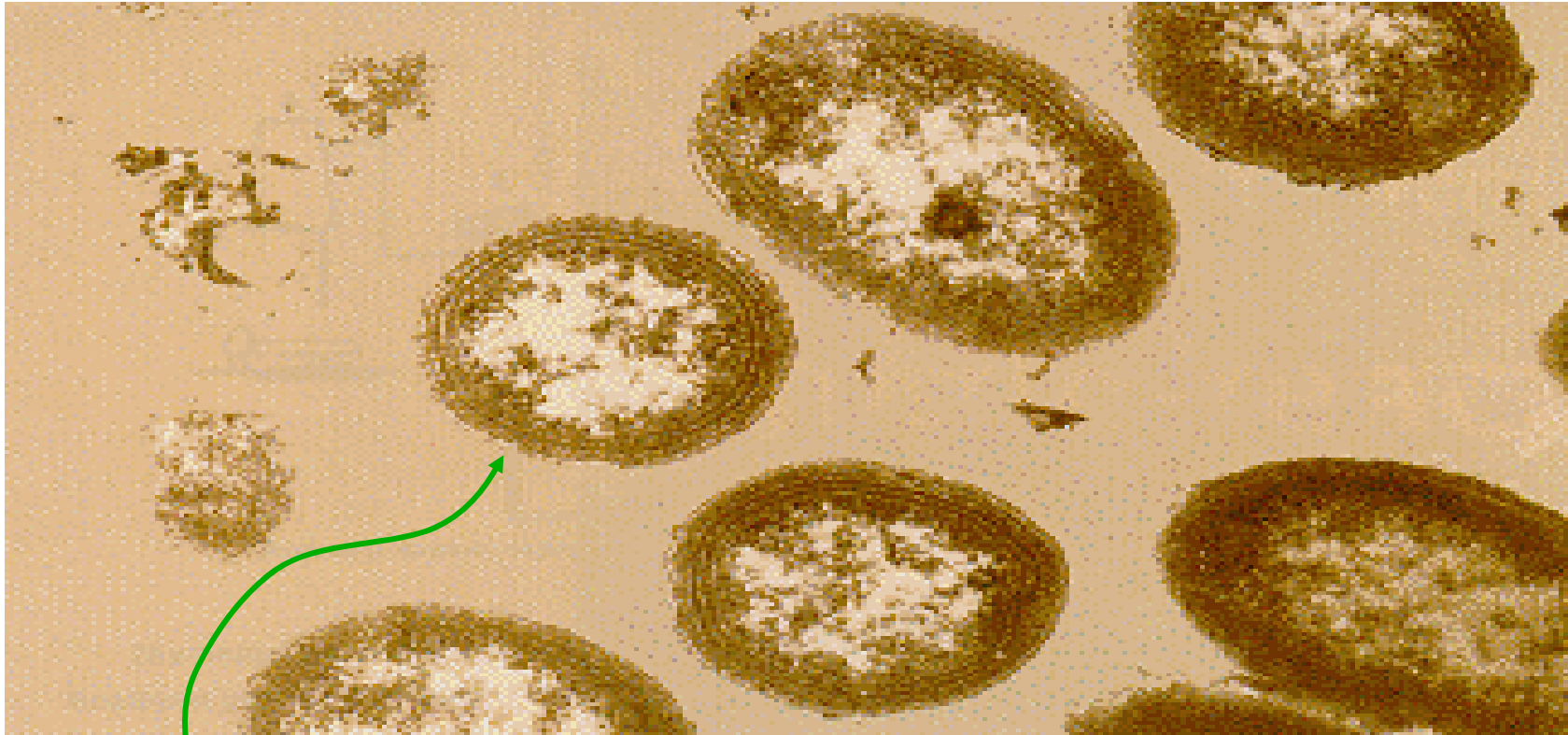
⇒ Nitrosomonas



⇒ Nitrobacter

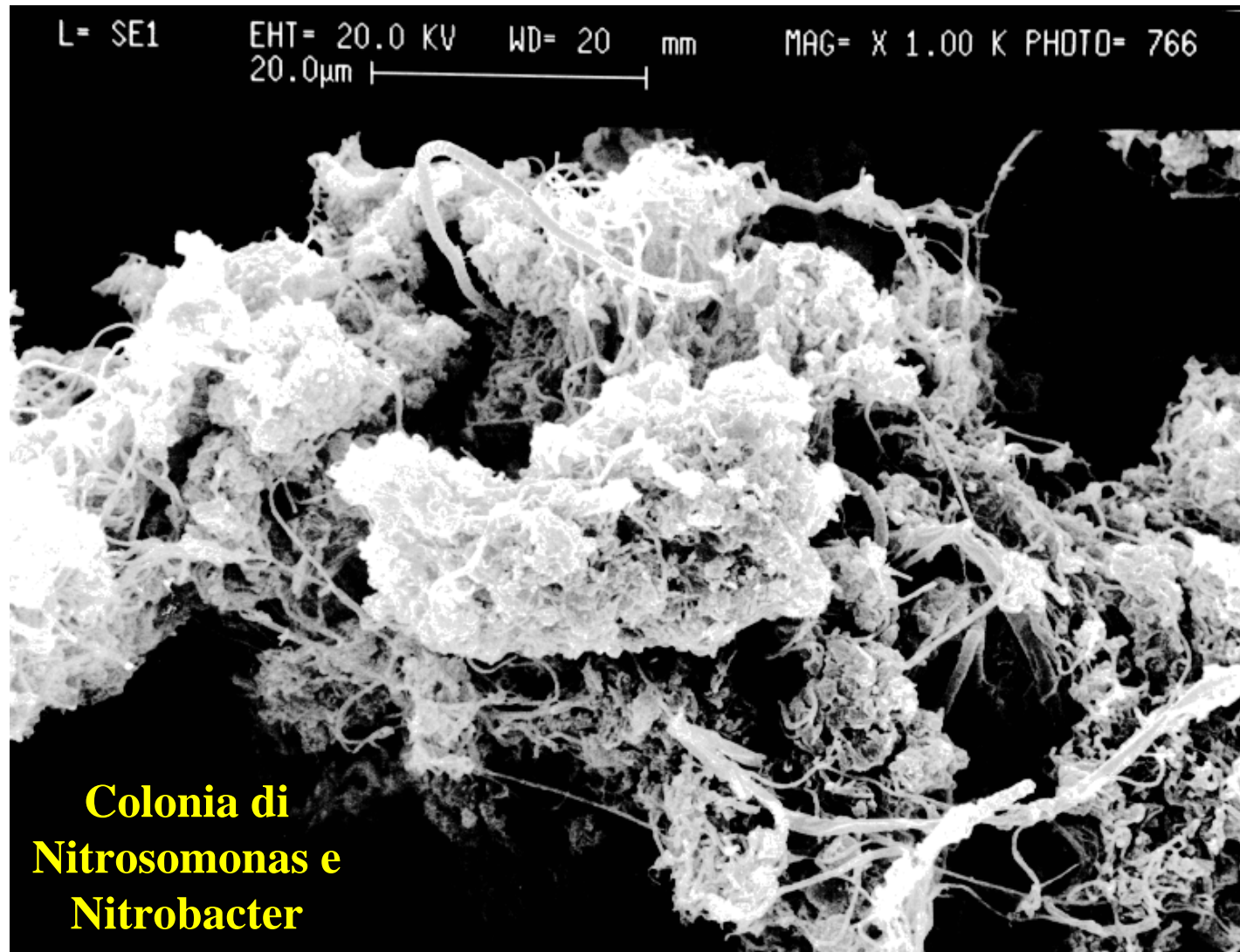


Batteri nitrificanti *Nitrosomonas* (x9000)



Le **membrane multiple** sono una caratteristica tipica dei batteri nitrificanti e sono essenziali per la conversione di ammoniaca in nitrito. L'ossidazione dell'ammonio genera relativamente poca energia, così i batteri hanno bisogno di una grande quantità di ammonio da ossidare per poter crescere.

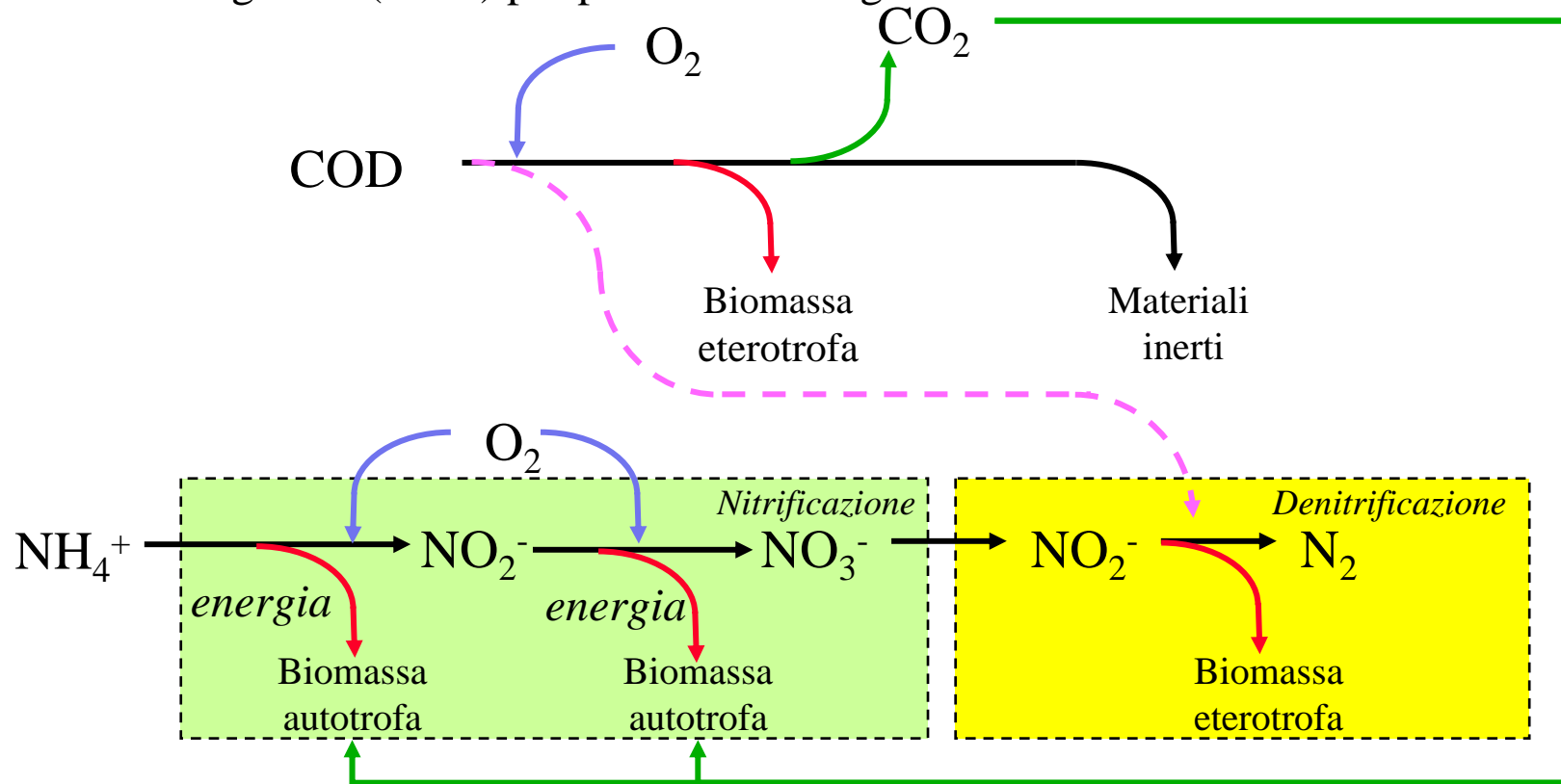
Batteri nitrificanti



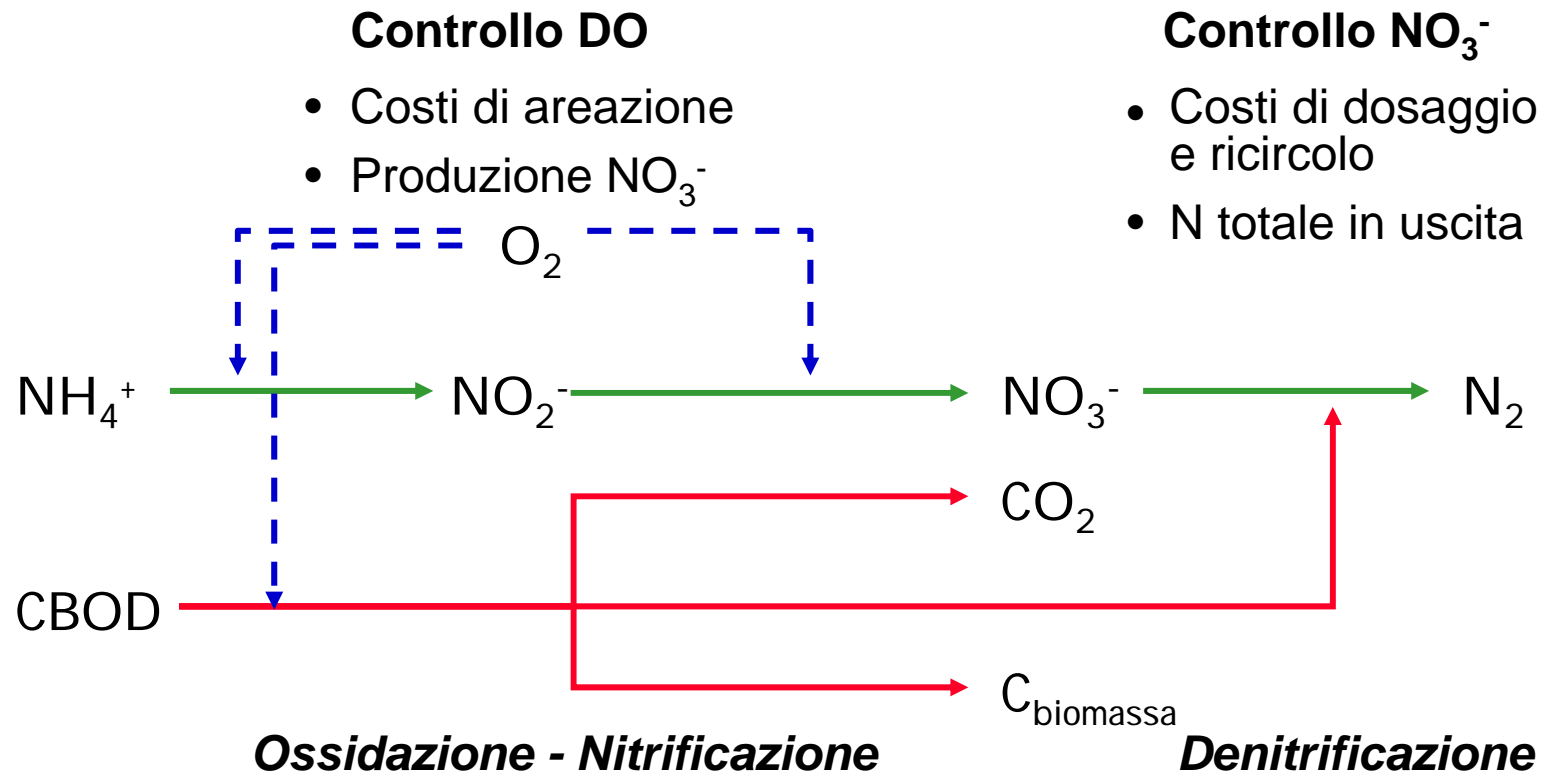
Ciclo dell'azoto nel depuratore

Nitrificazione: i batteri chemio-autotrofi utilizzano come substrato il carbonio inorganico disciolto (CO_2), mentre l'ossidazione dell'ammoniaca fornisce l'energia necessaria per l'anabolismo

Denitrificazione: i batteri eterotrofi facoltativi riducono il nitrato, in presenza di carbonio organico (COD) per produrre azoto gas



Relazione fra controllo COD e Azoto

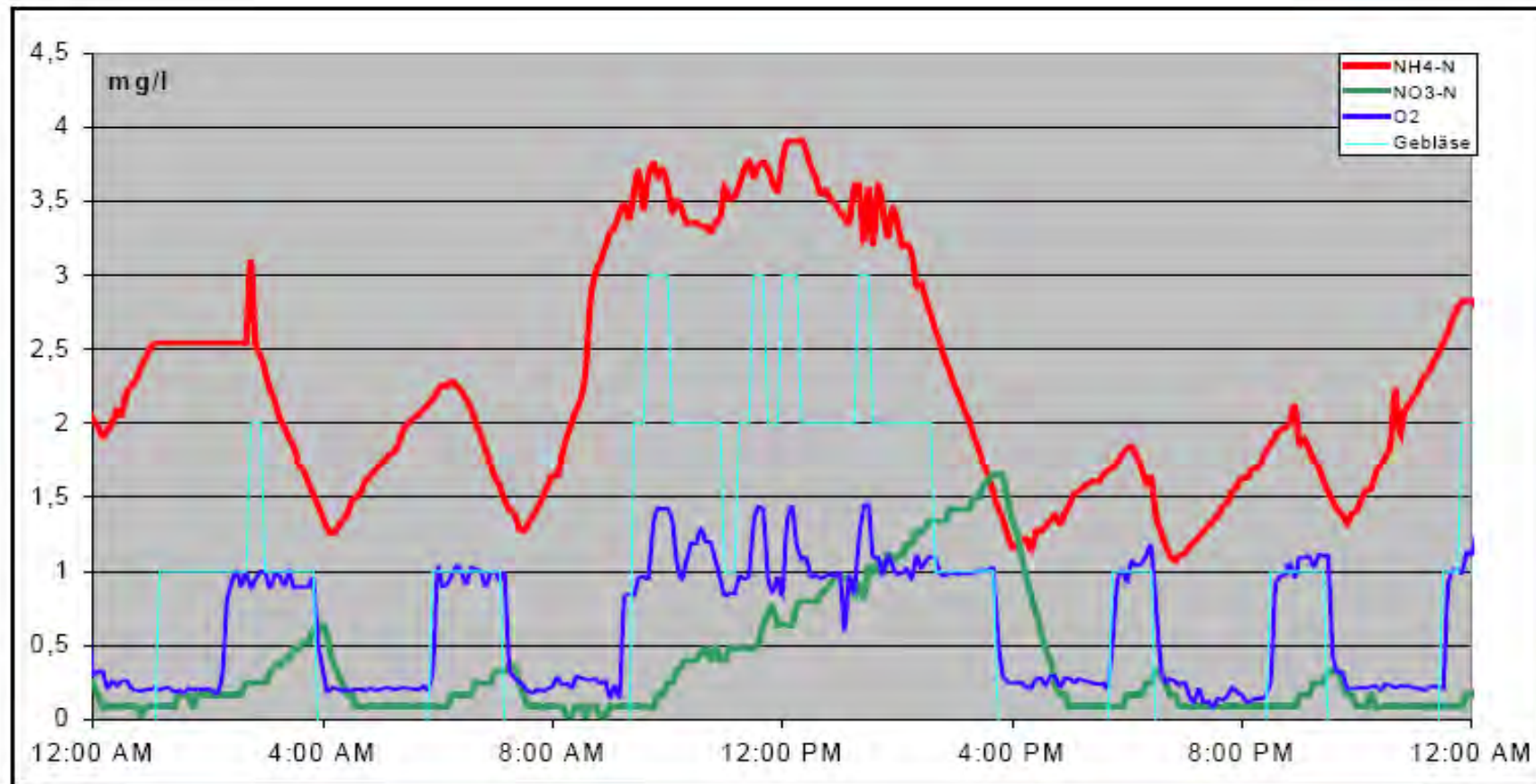


Solo una parte del carbonio organico biodegradabile (CBOD) venga rimossa per via aerobica, mentre la rimanente (spesso oltre il 50%) è utilizzata come fonte di carbonio per la denitrificazione, stabilendo un collegamento fra la fase aerobica (abbattimento del CBOD e nitrificazione) e fase anossica.

Ciò dà origine ad un complesso problema di controllo costituito dal coordinamento del controllo di DO in ossidazione e di nitrato in denitrificazione

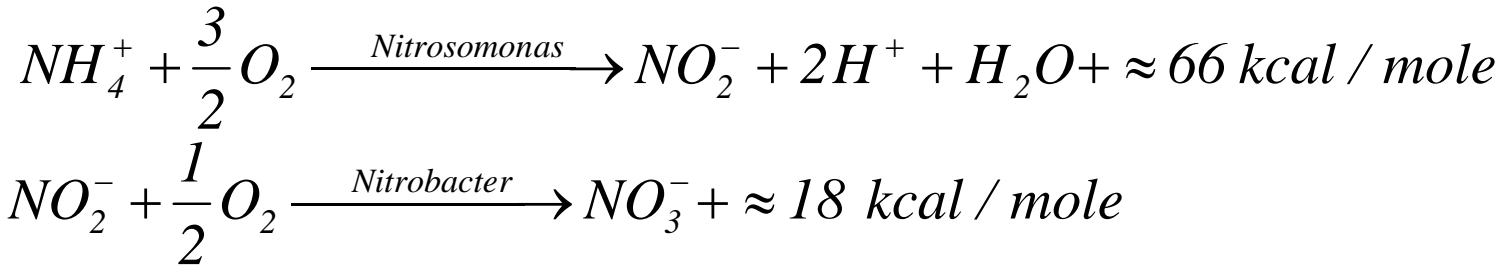
Processi a fasi alternate

Per la rimozione dell'azoto è fondamentale ***l'alternanza*** fra una ***fase aerobica*** (ossidazione dell'ammonio a nitrato) seguita da una ***fase anossica*** (denitrificazione = riduzione del nitrato a N_2)



Richiesta di ossigeno per la nitrificazione

L'ossidazione dell'ammoniaca si svolge secondo la seguente reazione in due stadi:



Se tutto l'Azoto ammoniacale fosse ossidato a nitrato
l'ossidazione di 1 mole di Azoto richiederebbe 4 moli di Ossigeno
perciò il rapporto stechiometrico è:

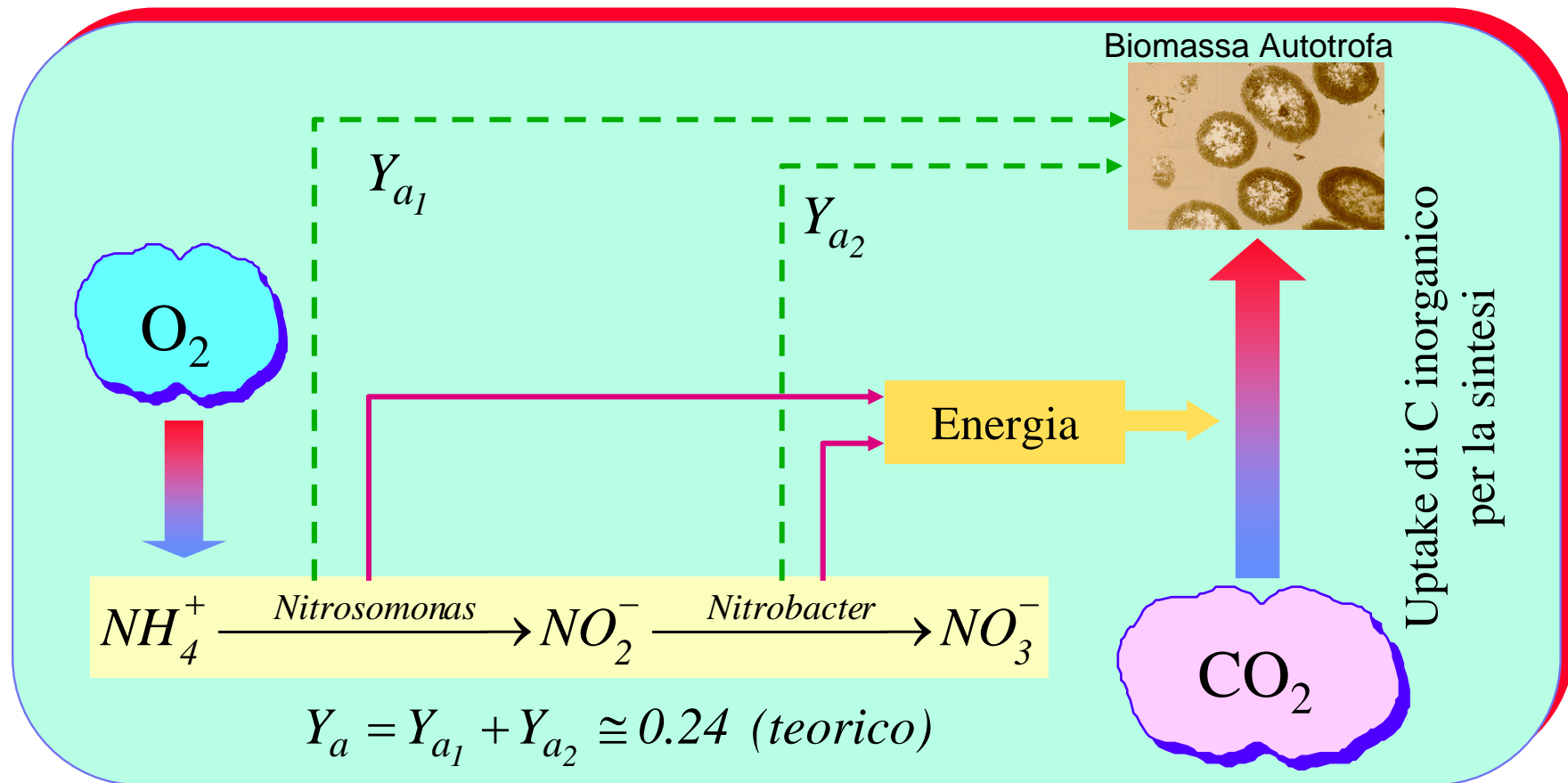
$$\frac{4 O}{N} = \frac{4 \times 16}{14} = 4.57$$

Dato che **sperimentalmente** si nota che il rapporto fra consumo di ossigeno e di azoto è circa 4.33, si deduce che parte dell'azoto viene utilizzato dai batteri. Perciò il fattore di resa dato dalla differenza fra il rapporto stechiometrico e l'osservazione sperimentale

$$Y_a = Y_{a1} + Y_{a2} = 4.57 - 4.33 = 0.24$$

Uptake di Azoto nella nitrificazione

Parte dell'Azoto trasformato nel processo di ossidazione viene utilizzato dalla biomassa autotrofa per i processi di sintesi, mentre dall'ossidazione essi ricavano l'energia necessaria per la conversione del Carbonio da forma inorganica (CO_2) a organica (C_{org}).



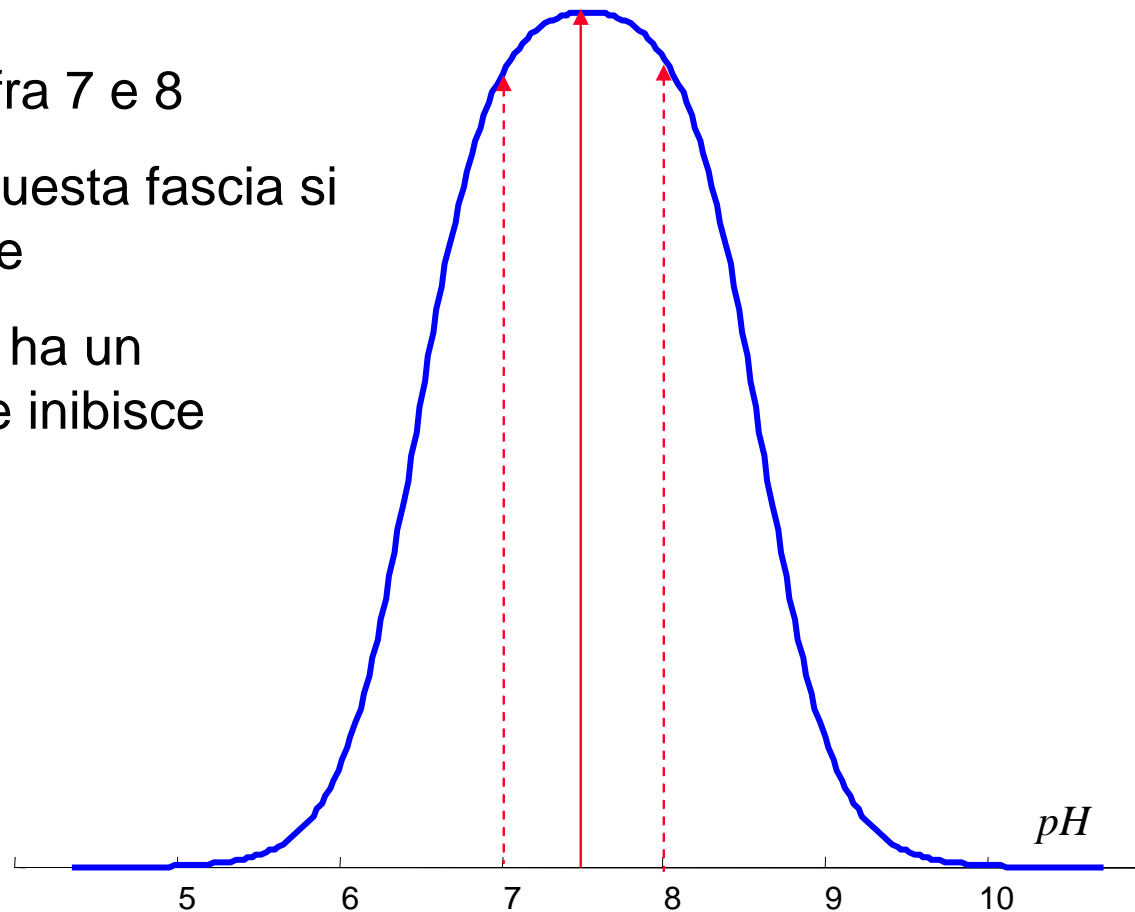
Influenza del pH sulla nitrificazione

La nitrificazione è fortemente pH-dipendente

I valori ottimali sono fra 7 e 8

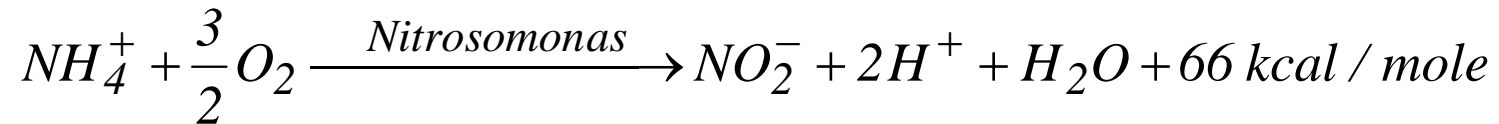
per valori inferiori a questa fascia si ha una forte inibizione

per valori superiori si ha un accumulo di NO_2 che inibisce



Nitrificazione e pH

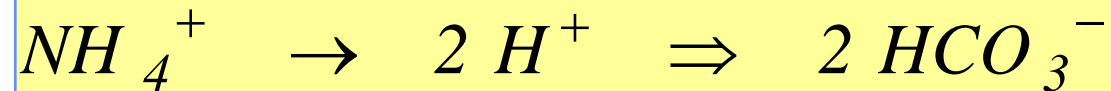
☞ La nitrificazione (nel primo stadio) abbassa il pH:



☞ Per ogni mole di Ammonio ossidato, si generano 2 H⁺

☞ La nitrificazione “consuma” alcalinità e questo provoca un abbassamento del pH

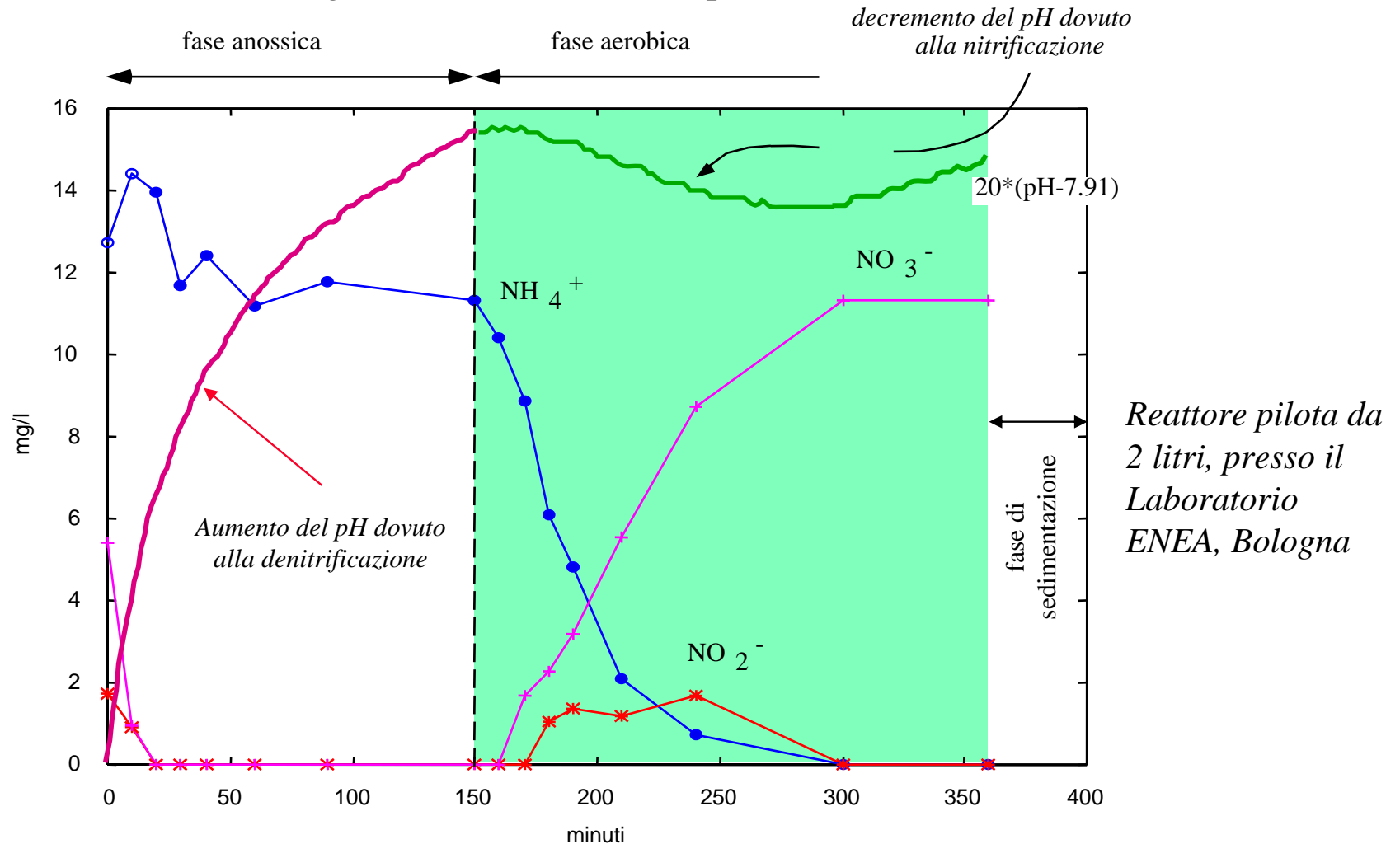
☞ Per mantenere costante il pH, si dovrebbe rifornire il sistema di alcalinità, ad es. aggiungendo 2 moli di bicarbonato per ogni mole di Ammonio



☞ Se è presente una forte corrente d'aria, lo “strippaggio” della CO₂ può mascherare questo effetto acidificante

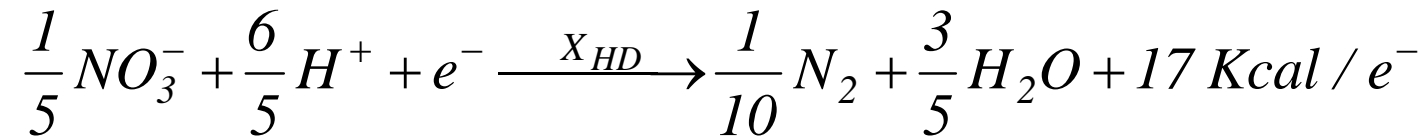
Effetto della nitrificazione sul pH

In un reattore SBR durante la fase ossidativa avviene la nitrificazione, con conseguente diminuzione del pH



Denitrificazione

- Alcuni batteri eterotrofi facoltativi (X_{HD}) possiedono un metabolismo respiratorio usando nitrato come accettore finale di elettroni



- Questo processo (*Denitrificazione*) è alla base della rimozione dell'Azoto dalle acque di scarico.
- La Denitrificazione è connessa alla normale catena respiratoria da speciali enzimi, che permettono ai batteri denitrificatori di operare anche in assenza di Ossigeno.
- La Denitrificazione può svolgersi **solo se** è presente una sufficiente quantità di Carbonio Organico (deve fornire 5 moli di elettroni per ogni mole di nitrato.....)
- La reazione avviene mediante una catena di reazioni mediate da specifici enzimi all'interno dei batteri

Fabbisogno di nitrato per la denitrificazione

- ☞ Per definizione di coefficiente di resa, sono richiesti $(1-Y_{HD}) e^-$ per ogni e^- di substrato consumato
- ☞ Dalla precedente reazione catabolica, la quantità richiesta di accettore (nitrato) è data da

$$1e^- \left(NO_3^- - N \right) \frac{1}{5} = \frac{14}{5} = 2.8$$

- ☞ Perciò $2.8(1-Y_{HD}) NO_3^- - N$ saranno ridotti per il consumo di $1e^-$ di substrato, che a sua volta corrisponde a 8 g O_2

$$2.8(1-Y_{HD}) e^- \leftrightarrow 1e^- \text{ substrato} = 8 \text{ g } (COD_{rimosso})$$

- ☞ Perciò il rapporto fra peso di azoto nitrato e COD rimosso è

$$\frac{COD_{rimosso}}{\left(NO_3^- - N \right)_{denitr}} = \frac{8}{2.8(1-Y_{HD})} = \frac{2.86}{1-Y_{HD}}$$

Fabbisogno di Substrato organico

- ☞ Con analoghi procedimenti, il fabbisogno di azoto *nitrito* è pari a

$$\frac{COD_{rimosso}}{(NO_2^- - N)_{denitr}} = \frac{1.71}{1 - Y_{HD}}$$

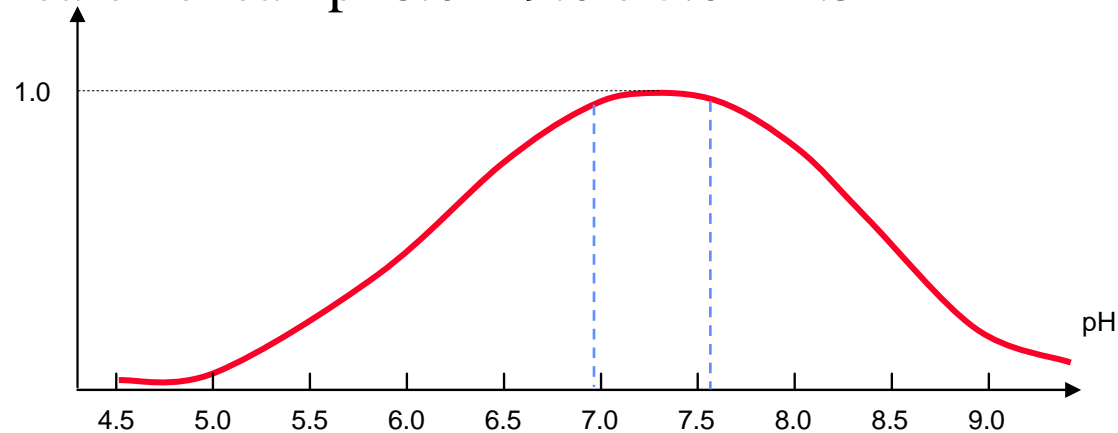
- ☞ Globalmente, supponendo che avvenga denitrificazione sia da nitrato che da nitrito e tenendo conto della domanda di ossigeno per deossigenazione, la richiesta totale di substrato organico sarà

$$S_s = \frac{2.86}{1 - Y_{HD}} S_{NO_3} + \frac{1.71}{1 - Y_{HD}} S_{NO_2} + \frac{1}{1 - Y_{HD}} S_o$$

- ☞ L'ultimo termine si riferisce al fatto che il fango introdotto in vasca anossica dal ricircolo possiede un certo quantitativo di ossigeno, che verrà usato preferenzialmente dagli organismi facoltativi, prima di iniziare la respirazione anossica riducendo nitriti e nitrati

Alcune considerazioni pratiche

- 👉 La condizione di assenza di ossigeno è abbastanza facile da realizzare perchè il carbonio organico immesso tende ad essere ossidato dagli stessi eterotrofi, eliminando così l'ossigeno, che rimane l'accettore di elettroni *preferenziale*
- 👉 Il processo di denitrificazione genera alcalinità, perciò il pH tende ad aumentare durante la denitro
- 👉 Sperimentalmente si osserva che il pH ottimale per la denitrificazione è nel campo 7.0 ÷ 7.5, e che si ha un decremento quasi lineare nei campi 8.0 ÷ 9.0 e 7.0 ÷ 4.5






Processi innovativi

Rimozione dell'Azoto accorciando il ciclo Nitro/Denitro



- ⇒ L'ossidazione dell'Ammoniaca a Nitrato richiede energia
- ⇒ La denitrificazione da Nitrato richiede carbonio organico

Si stanno studiando processi alternativi a minore impatto energetico (*Delft Technical University, Dept. of Biotechnology*)

⇒ **SHARON** (Single-reactor High-rate Ammonia Removal Over Nitrite)

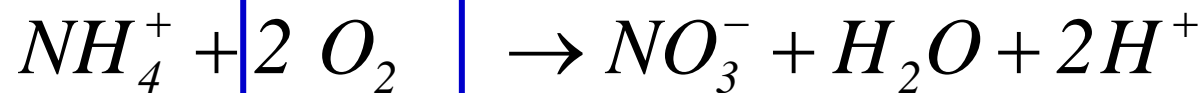
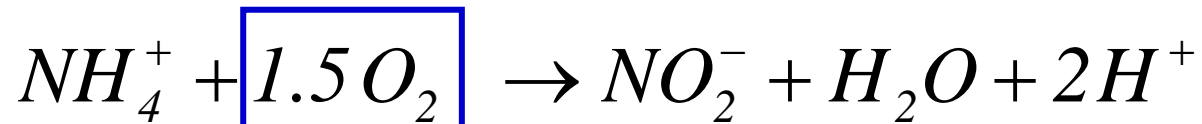
-  Sviluppato per trattare fanghi digeriti, ricchi di ammoniaca
-  Ossidazione parziale $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ in ambiente alternato (SBR) aerobico/anossico
-  Il successivo stadio ossidativo $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ viene inibito tenendo alta la temperatura del processo, favorendo i *Nitrosomonas* rispetto ai *Nitrobacter*

⇒ **ANAMMOX** (Anaerobic Ammonia Oxidation)

-  Sono stati isolati speciali microrganismi in grado di ossidare l'ammonio in condizioni anossiche usando nitrito come accettore di elettroni
-  In opportune condizioni (SBR) NH_4^+ e NO_2^- vengono convertiti in N_2

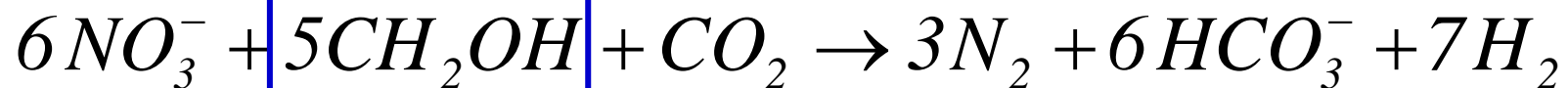
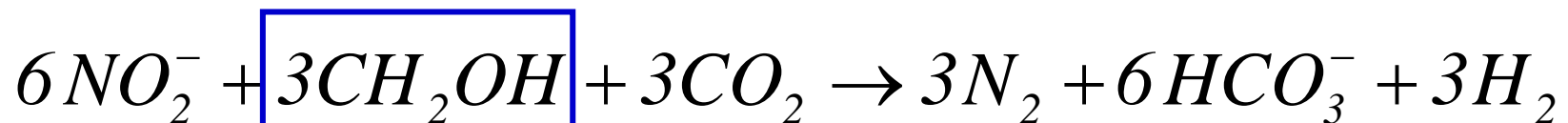
Nitro/Denitro su Nitrito

Nitrificazione su nitrito



→ 25% di Ossigeno risparmiato

Denitrificazione su nitrito



→ 40% di C_{org} risparmiato

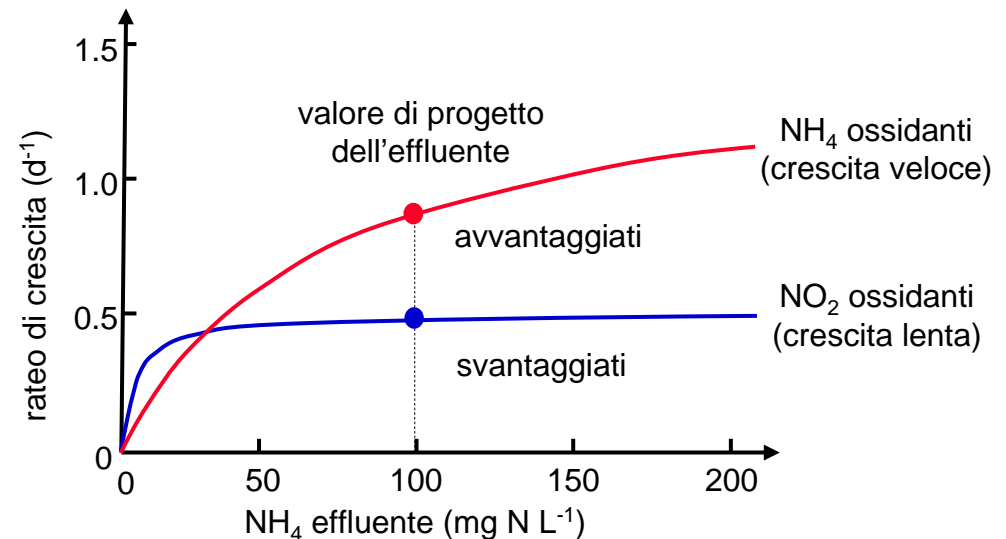
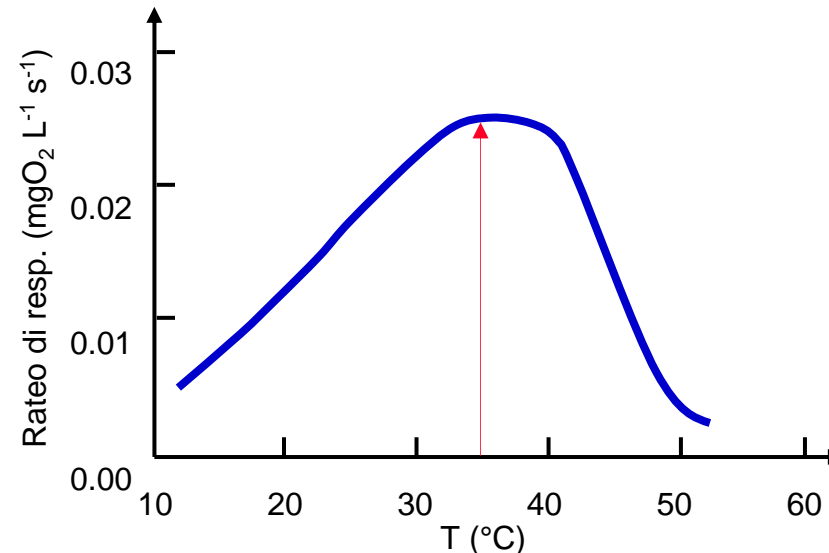
Il processo SHARON

- ☞ Si tratta di un processo per la nitrificazione biologica che avviene in un singolo reattore ad alti pH e temperatura (30 – 40 °C)
- ☞ Il processo SHARON opera senza ritenzione dei fanghi (SRT = 1 d) e l'ossidazione dell'ammonio si ferma a nitriti, con notevoli risparmi che possono arrivare al 50% rispetto ai processi convenzionali
- ☞ La Denitrificazione viene usata come mezzo economico di controllo del pH
- ☞ In normali condizioni non è necessario alcun riscaldamento, bastando il calore prodotto dalla reazione
- ☞ Quando il processo SHARON è usato per preparare l'effluente da trattare in ANAMMOX, solo il 50% dell'ammonio deve essere convertito a nitrito



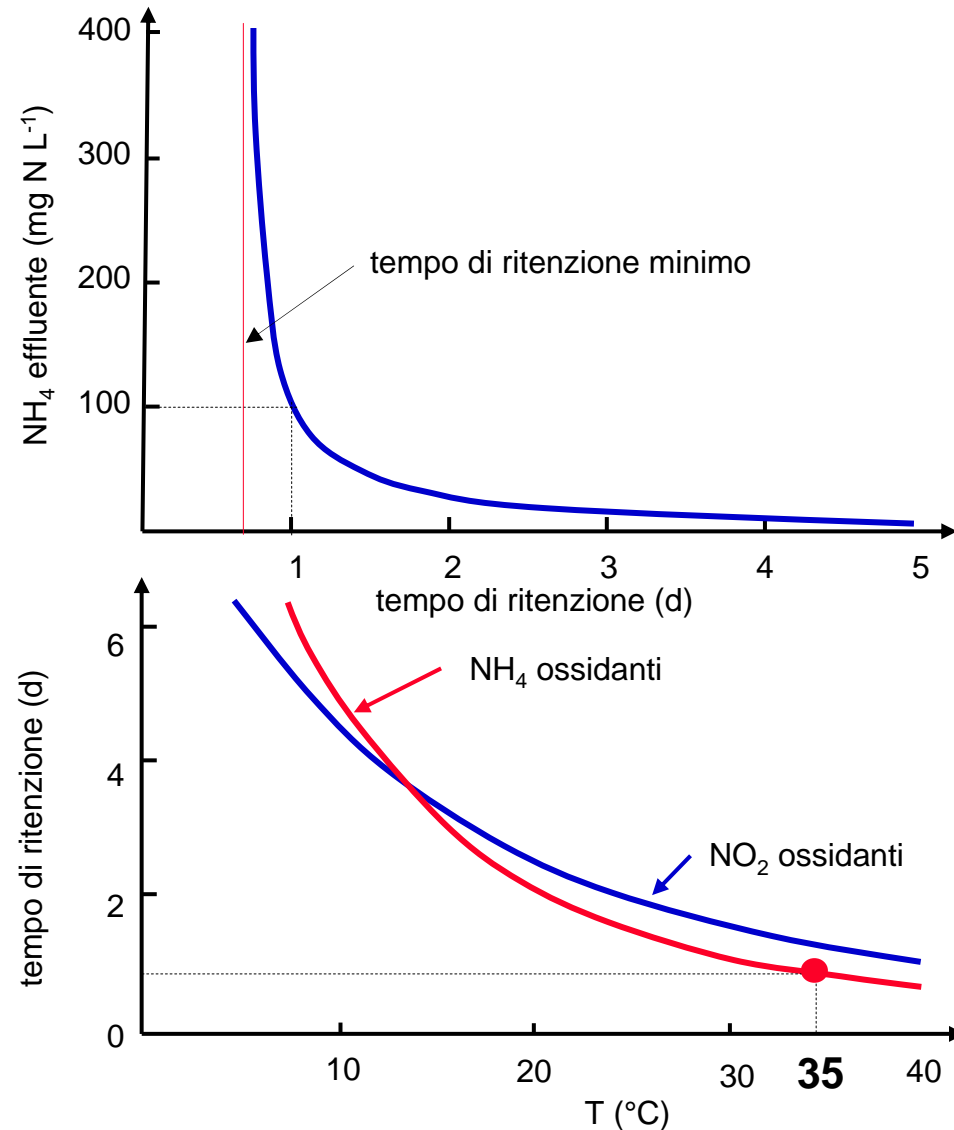
SHARON si basa sulla selezione batterica

- ☞ La chiave del processo è la dipendenza della crescita dei batteri ammonio-ossidanti dalla temperatura
- ☞ A circa 35 °C gli ammonio-ossidanti hanno un rateo di crescita molto superiore ai nitrito-ossidanti
- ☞ In un sistema senza ricircolo, essi possono sopravvivere a tempi di ritenzione più bassi
- ☞ I nitrito-ossidanti, svantaggiati, vengono lavati via (wash-out)



Tempi di ritenzione

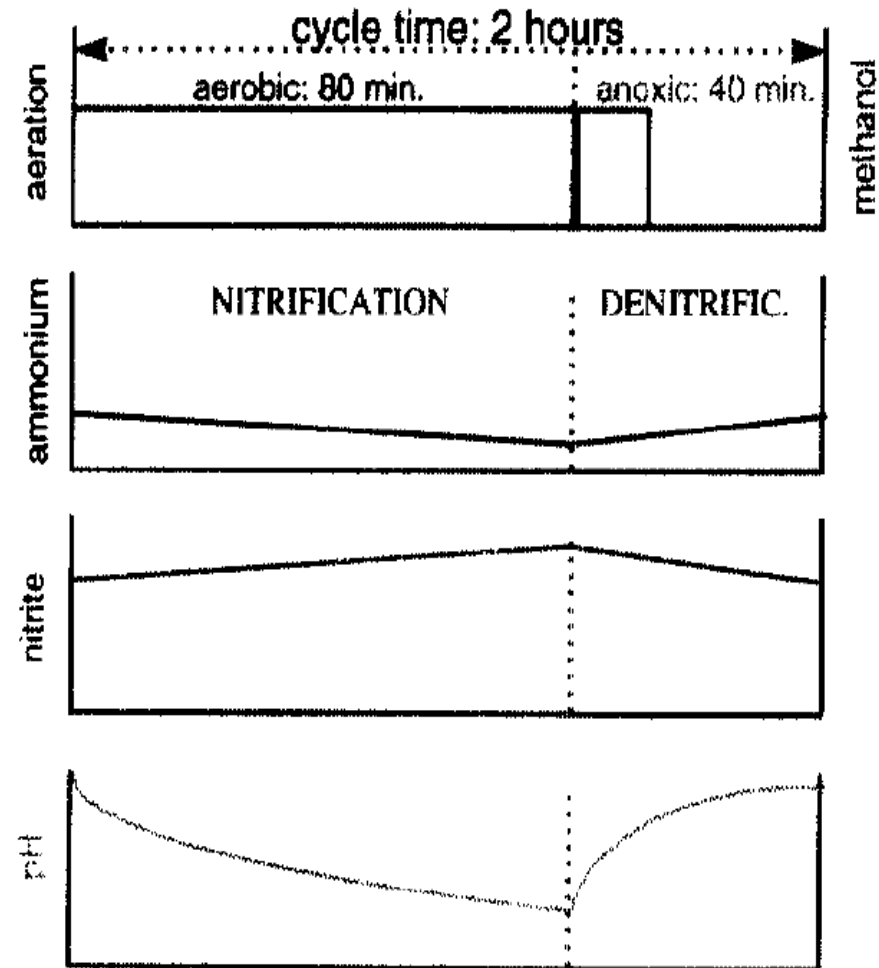
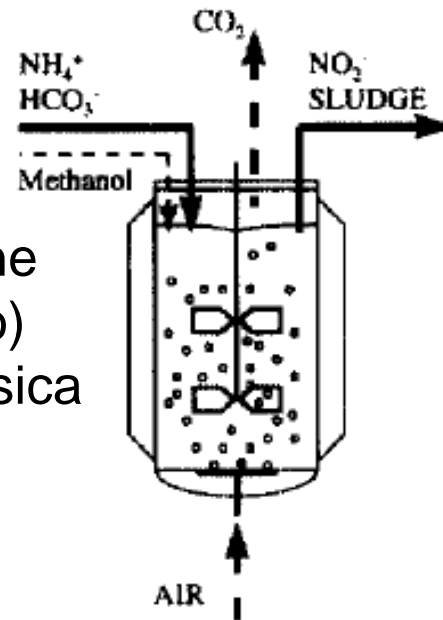
- ☞ Si fissa il tempo di ritenzione per avere una data concentrazione in uscita (es. 100 mg N/L)
- ☞ Ad alte temperature gli ammonio-ossidanti sono avvantaggiati perché hanno maggiore rateo di crescita e possono sopravvivere a tempi di ritenzione inferiori, mentre a basse temperature è vero il contrario
- ☞ Perciò in queste condizioni l'ossidazione dell'ammonio si ferma a nitrito



Condizioni di processo SHARON

Il processo avviene in un singolo reattore che opera con una sequenza di fasi alternate (Sequencing Batch Reactor = SBR)

Nella fase con aerazione si ha nitrificazione (parziale a nitrito) e in quella anossica denitrificazione (su nitrito)

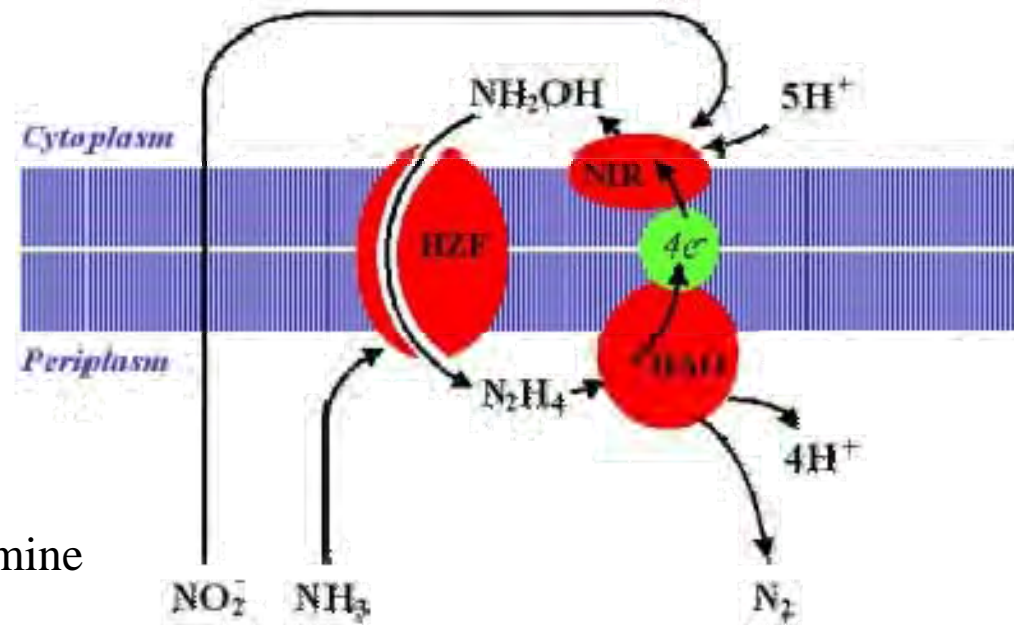


Biochimica del processo ANAMMOX

- 👉 L'ossidazione anaerobica obbligata (Anammox) è catalizzata da batteri specializzati come il *Brocadia anammoxidans* o *Scalindua sorokinii*, che hanno un organo specifico (anammoxosoma).
- 👉 L'ammonio è ossidato ad azoto molecolare usando il nitrito come accettore di elettroni. La reazione è eso-ergonica e produce sufficiente energia per la crescita.

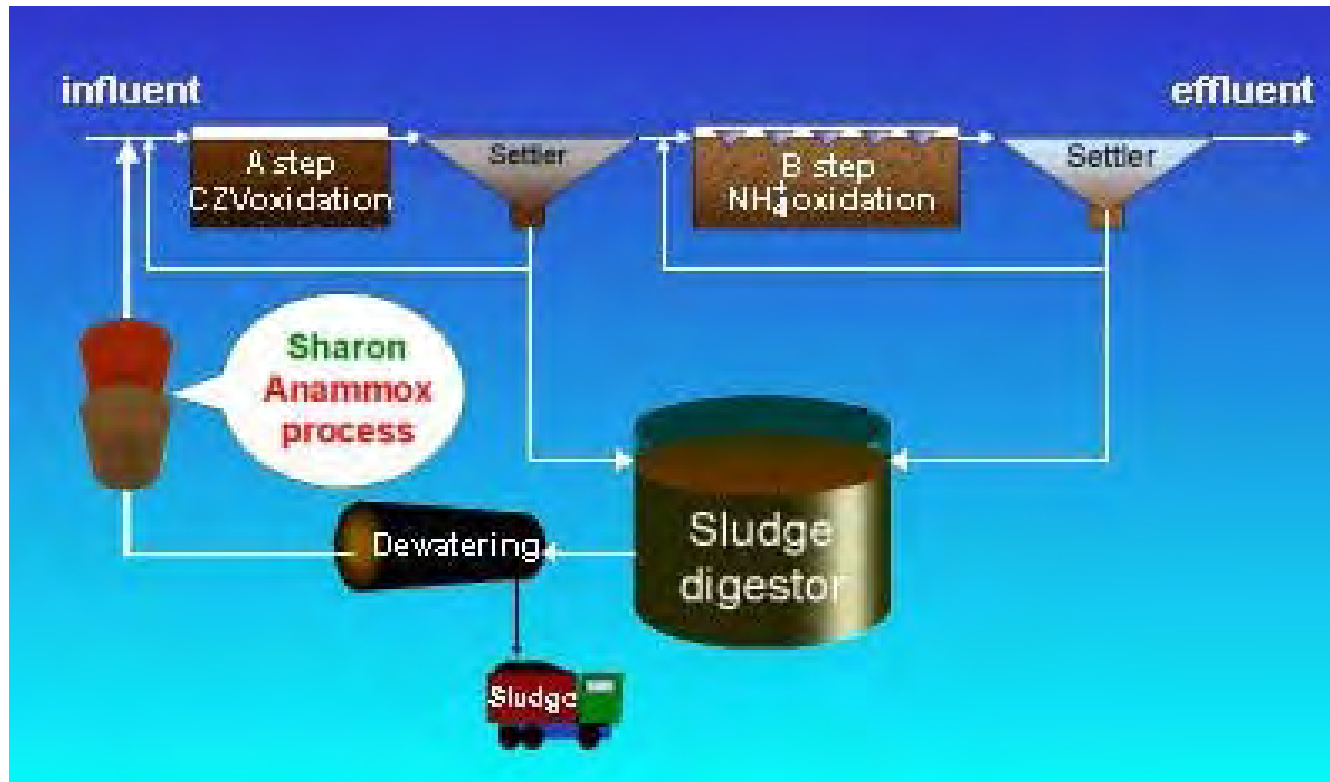


- 👉 Il processo Anammox è strettamente autotrofo anaerobico con idrossilamina (NH_2OH) come intermedio di passaggio.
- 👉 L'ammonio con idrossilamina è convertito in idrazina (N_2H_4). Successivamente questa è ossidata a N_2 generando 4 elettroni, che possono essere nuovamente usati per la riduzione di NO_2^- a idrossilamina.

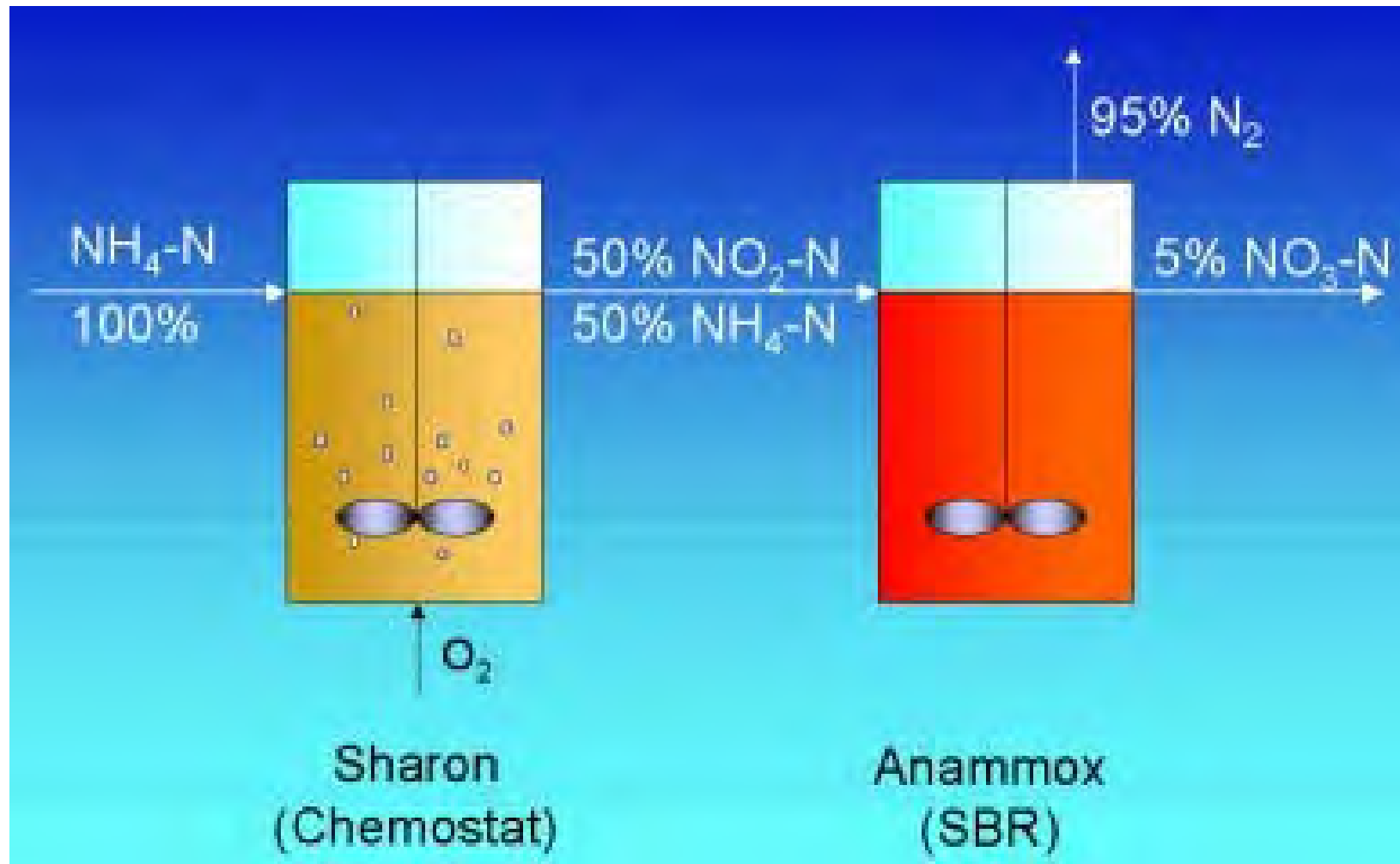


Combinazione SHARON/ANAMMOX

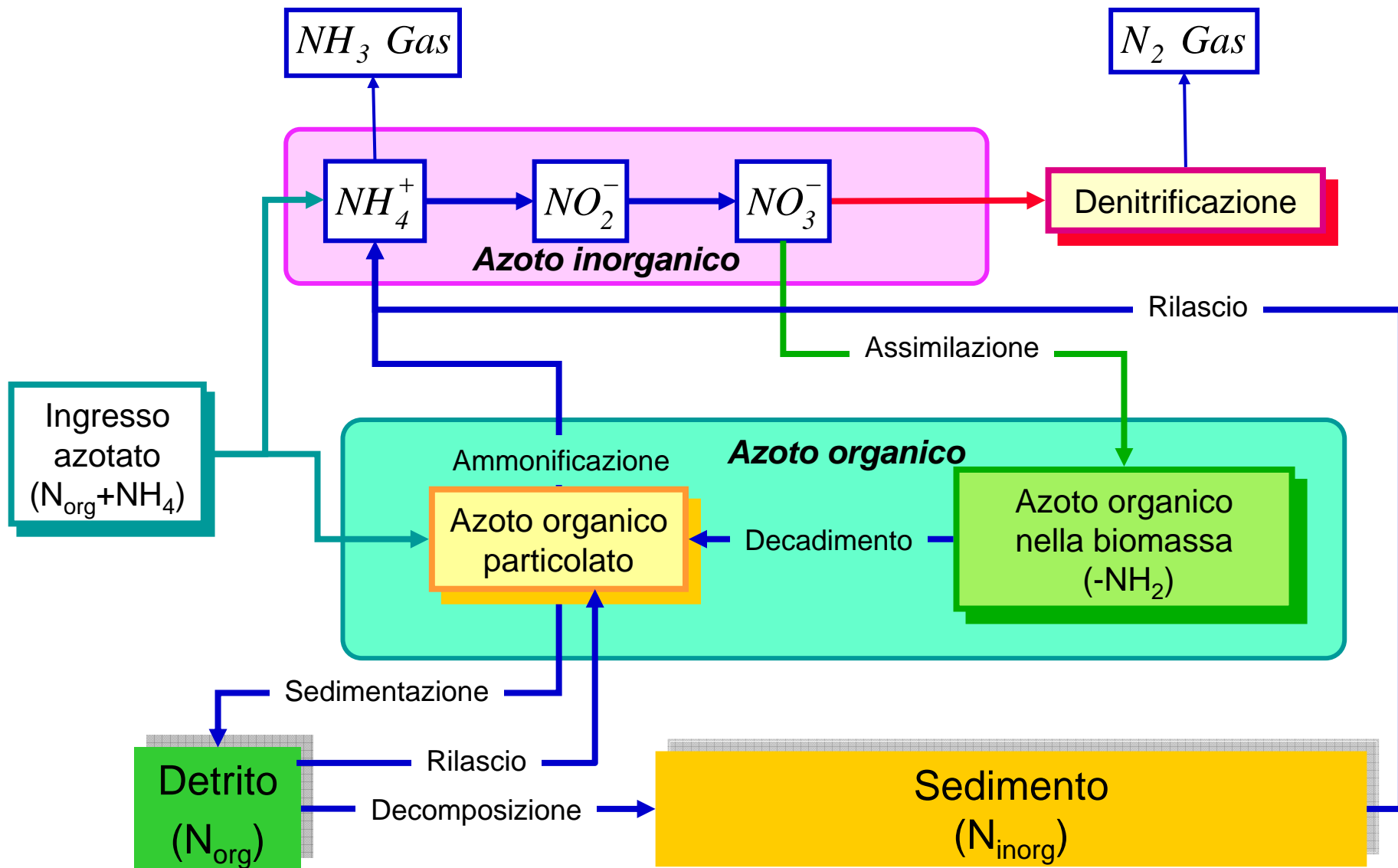
- 👉 Questi processi sono stati brevettati dall'Università di Delft
- 👉 Sono stati realizzati in via sperimentale in Olanda e Belgio
- 👉 Il processo combinato SHARON/ANAMMOX sembra il più promettente dato che i due processi sono complementari



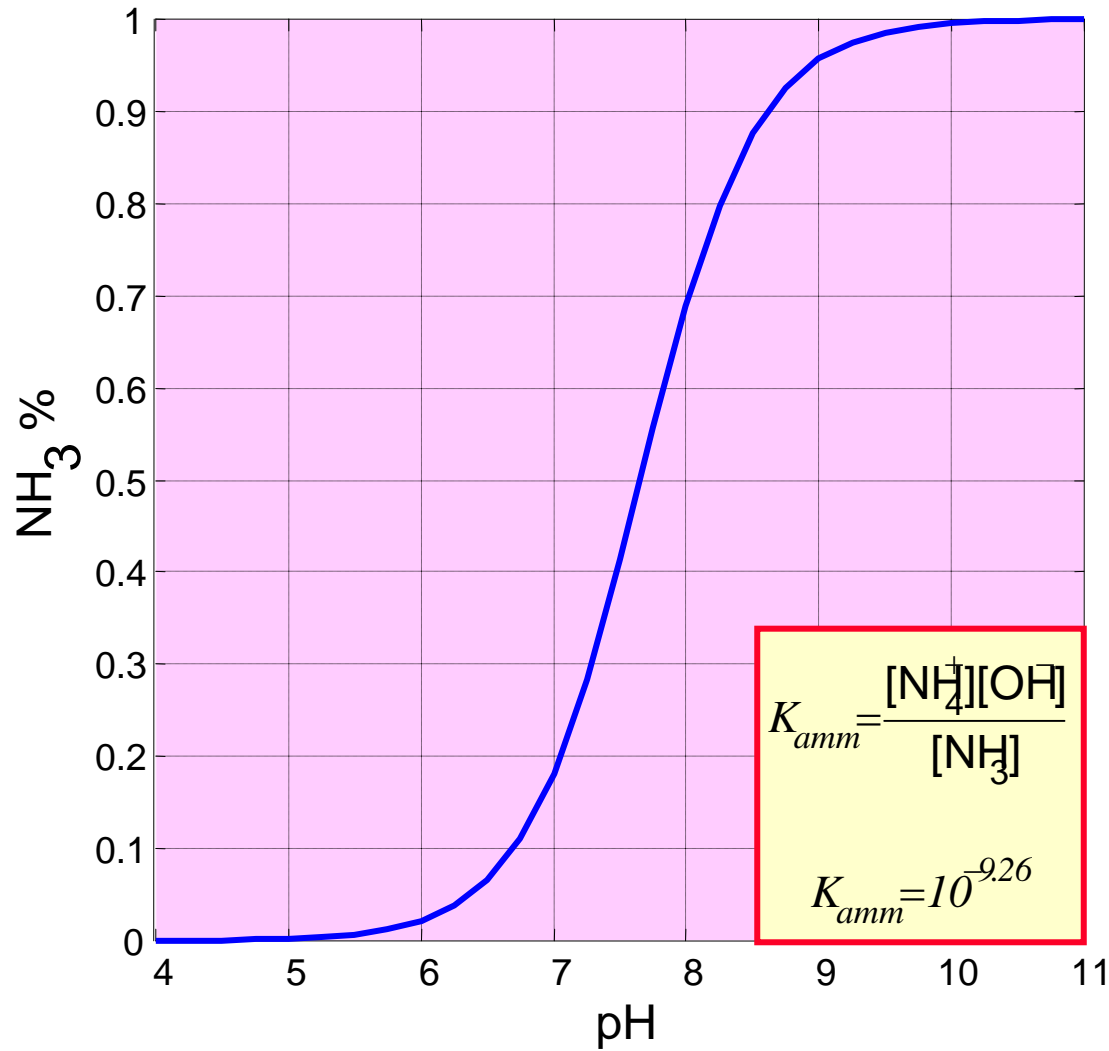
Uso combinato di SHARON/ANAMMOX



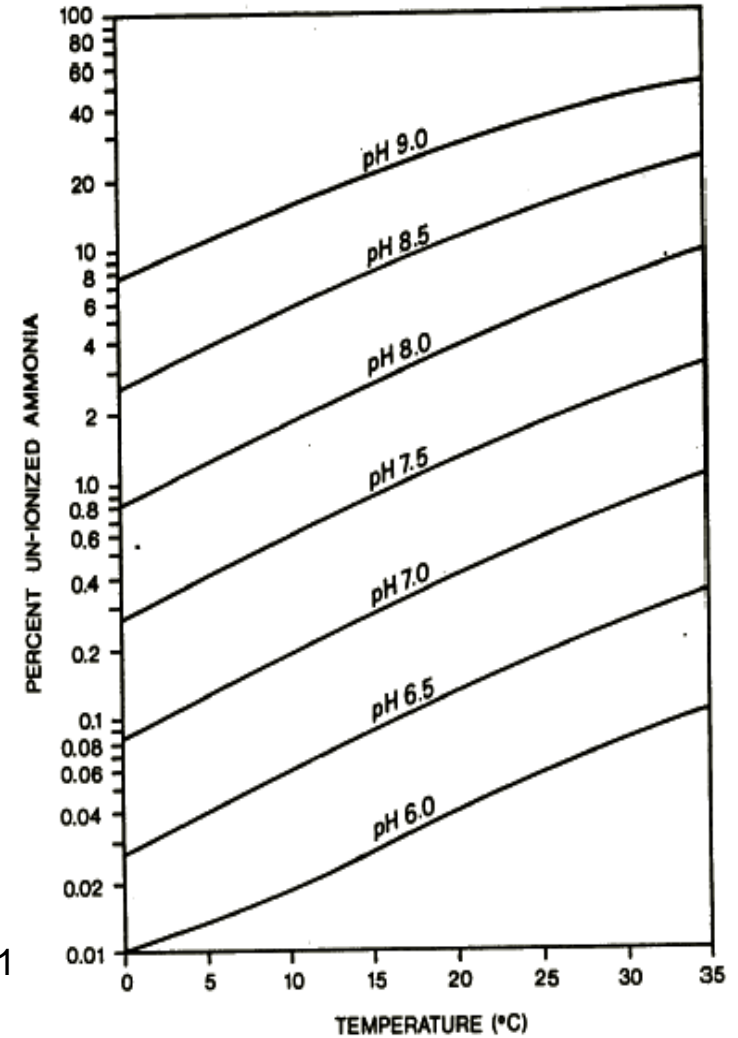
Ciclo dell'Azoto nel sistema acquatico



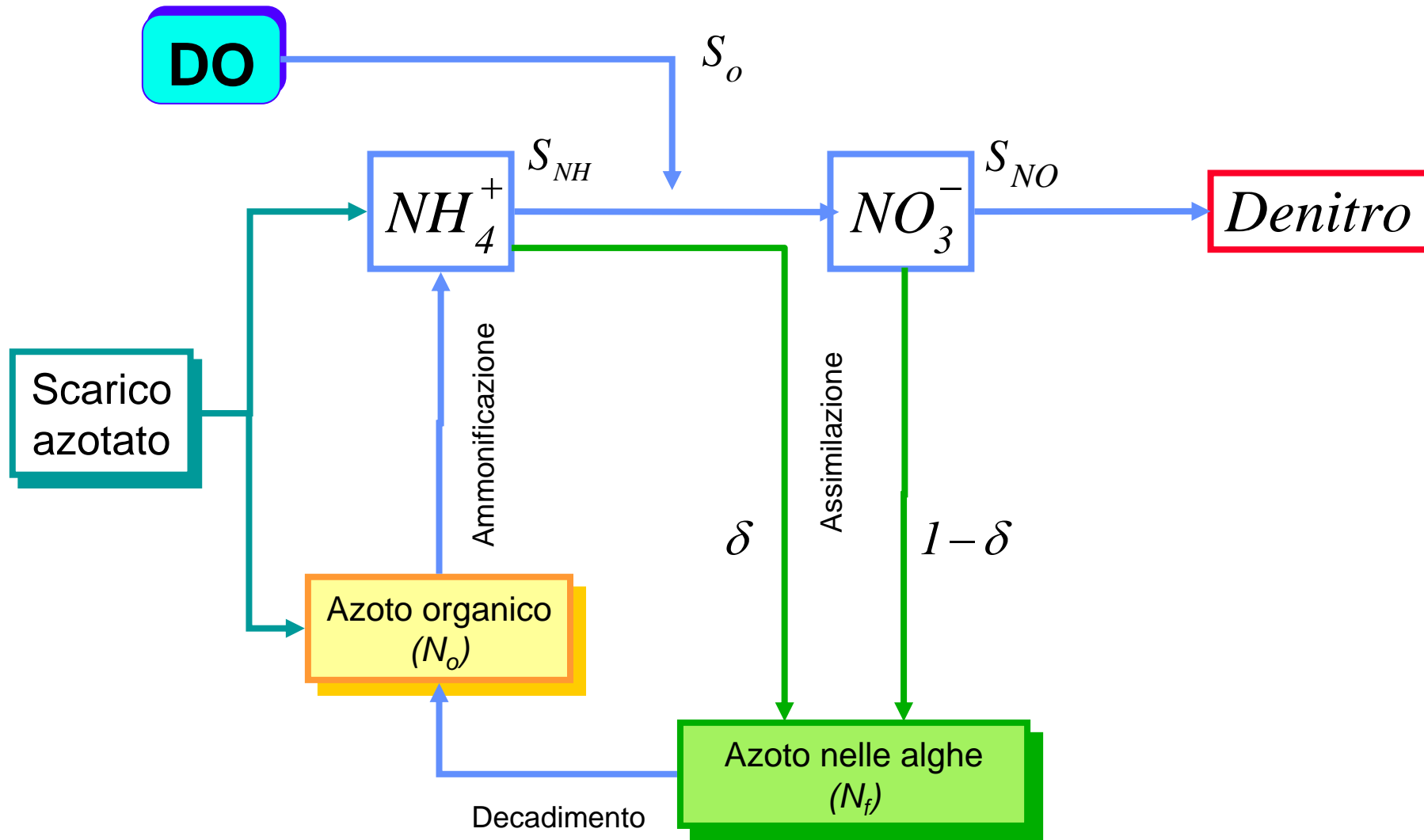
Ammoniaca indissociata



Variazione con la temperatura



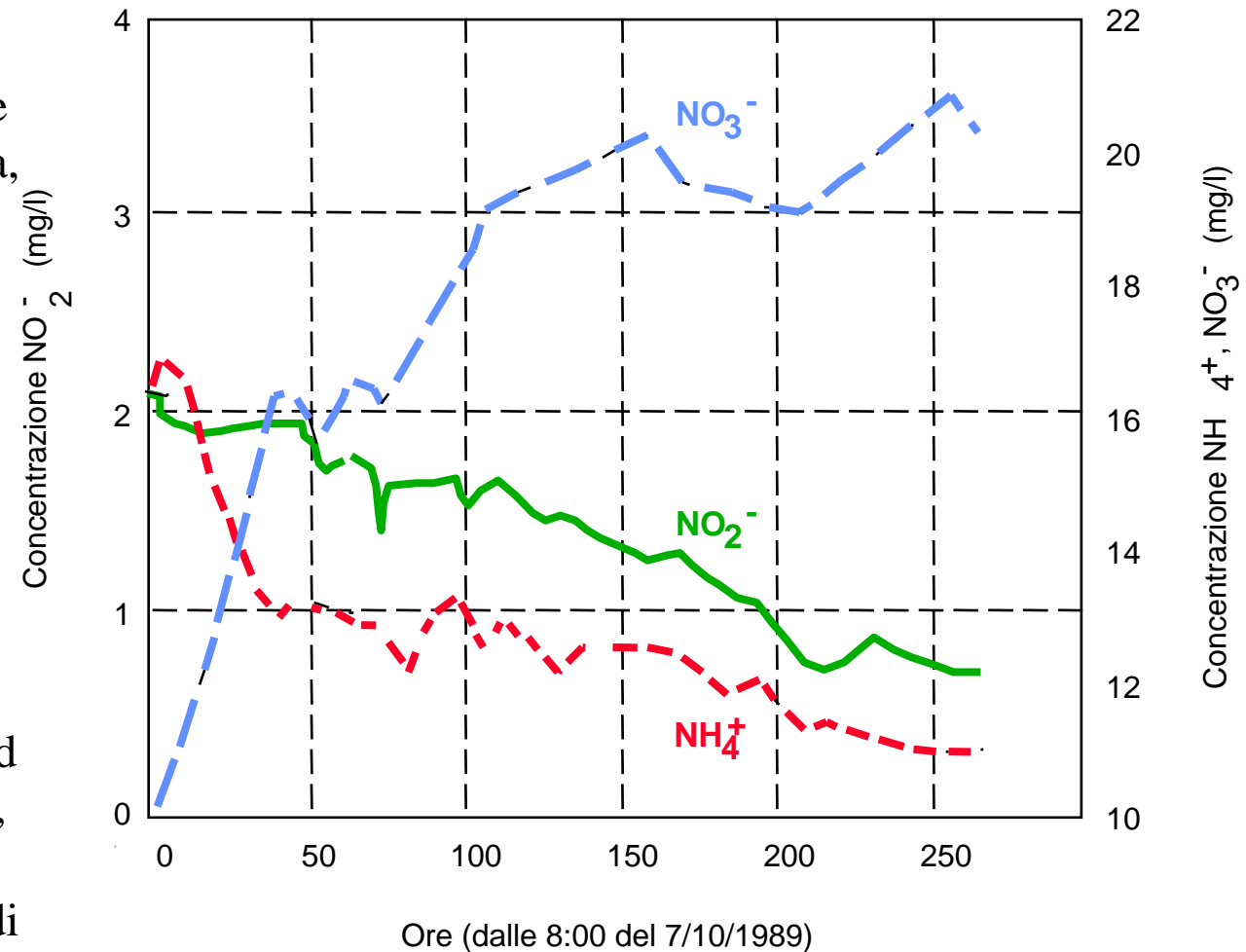
Ciclo semplificato nel sistema acquatico











Episodio di inquinamento da ammoniaca

A seguito di un'operazione di dragaggio delle dighe di Levane e La Penna, venne sollevata una grande quantità di sedimento, contenente materiali organici in decomposizione, (sorgente di ammoniaca).

Essa fu trasportata a valle dalla corrente ed all'altezza di Firenze, nel fiume si innescò un intenso processo di nitrificazione.



Bibliografia

-  Barnes D., Bliss P.J., *Biological control of nitrogen in wastewater treatment*, E. & F.N. Spon, (1983)
-   Orhon D., Artan N., *Modelling of Activated Sludge Systems*, Technomic Publ. Co., (1994)
-  Henze M., Gujer W., Mino T., Matsuo T., Wentzel M.C., Marais G.v.R. *Activated Sudge Model n. 2*, IAWQ Scientific and Technical Report n. 3, (1995)
-   Cloete T.E. and Muyima N.Y.O. (eds.) *Microbial Community Analysis*, IAWQ Scientific and Technical Report n. 5, Cap. 2, (1997)
-   Wanner J., *Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment Plants*, IAWQ Scientific and Technical Report n. 5, Cap. 3, (1997)