Användning av Anammox för en förbättrad kväveavskiljning vid avloppsverk

Elzbieta Plaza Frank Persson Britt-Marie Wilén Razia Sultana



Svenskt Vatten Utveckling

Svenskt Vatten Utveckling

Svenskt Vatten Utveckling (SVU) är kommunernas eget FoU-program om kommunal VA-teknik. Programmet finansieras i sin helhet av kommunerna. Programmet lägger tonvikten på tillämpad forskning och utveckling inom det kommunala VA-området. Projekt bedrivs inom hela det VA-tekniska fältet under huvudrubrikerna:

Dricksvatten Rörnät & Klimat Avlopp & Miljö Management

SVU styrs av en kommitté, som utses av styrelsen för Svenskt Vatten AB. För närvarande har kommittén följande sammansättning:

Anna Linusson, ordförande Daniel Hellström, utvecklingsledare Per Ericsson Tove Göthner Tage Hägerman Stefan Johansson Kristina Laurell Annika Malm Lisa Osterman Kenneth M. Persson Carl-Olof Zetterman Svenskt Vatten Svenskt Vatten Norrvatten Sveriges Kommuner och Landsting Smedjebacken Skellefteå kommun Formas Kretslopp och vatten, Göteborgs Stad Örebro kommun Sydvatten AB SYVAB

Författarna är ensamma ansvariga för rapportens innehåll, varför detta ej kan åberopas såsom representerande Svenskt Vattens ståndpunkt.

Svenskt Vatten Utveckling Svenskt Vatten AB Box 14057 167 14 BROMMA Tfn 08 506 002 00 Fax 08 506 002 10 svensktvatten@svensktvatten.se www.svensktvatten.se Svenskt Vatten AB är servicebolag till föreningen Svenskt Vatten.

Svenskt Vatten Utveckling	Bibliografiska uppgifter för nr	2015-18
Rapportens titel:	Användning av Anammox för en förbättrad kväveavskiljning v	id avloppsverk
Title of the report:	Application of anammox for improved nitrogen removal at wa treatment plant	astewater
Författare:	Elzbieta Plaza, Kungliga Tekniska Högskola; Frank Persson, Cl Britt-Marie Wilén, Chalmers; Razia Sultana, Kungliga Tekniska	halmers; Högskola
Rapportnummer:	2015-18	
Antal sidor:	64	
Sammandrag:	Försöken har utförts vid Hammarby Sjöstadsverket för att stur avskiljning med deammonifikation (partiell nitritation + anam temperaturer och låga kvävehalter, typiska för huvudströmen rening. Specifikt studerades hur olika grupper av bakterier sa etablerar sig i biofilmen.	dera kväve- nox) vid låga vid avlopps- mverkar och
Abstract:	The experiments were performed at Hammarby Sjöstadsverk gen removal with deammonification (partial nitritation + anan temperatures and low nitrogen concentrations, typical for the wastewater. Especially establishment and interaction betweer microbial populations were studied.	to study nitro- nmox) at low mainstream different
Sökord:	Anammox, avloppsvattenrening, deammonifikation, kväveavs nitritation	kiljning,
Keywords:	Anammox, deammonification, nitritation, nitrogen removal, w treatment	/astewater
Målgrupper:	Personal på avloppsreningsverk, forskare och konsulter med i för avloppsvattenrenings nya processer	ntresse
Omslagsbild:	Biofilm från MBBR med nitritation/anammox. Foto: Frank Per	sson, Chalmers
Rapport:	Finns att hämta hem som PDF-fil från Svenskt Vattens hemsid www.svensktvatten.se	a
Utgivningsår:	2015	
Utgivare:	Svenskt Vatten AB © Svenskt Vatten AB	
Om projektet Projektnummer:	10-105	
Projektets namn:	Användning av Anammox för en förbättrad kväveavskiljning v	id avloppsverk
Projektets finansiering:	Svenskt Vatten Utveckling, Formas, KTH, Chalmers, IVL Svenska Miljöinstitutet	

Layout: Charlotta Lindgren grafisk produktion.

Förord

Denna rapport beskriver forskningen som utförts inom projektet "Användning av Anammox för en förbättrad kväveavskiljning vid avloppsverk". Projektet har finansierats av Svenskt Vatten Utveckling (projektnummer 10-105 samt genom VA-Kluster Mälardalen) tillsammans med FORMAS (projektnummer 211-2010-140) under perioden 2010-05-01 till 2014-09-30 och tillkommande finansiering med medel från Institutionen för Bygg- och Miljöteknik genom en särskild satsning på forskarassistenter samt medel från Stiftelsen IVL. Stort tack för finansieringen som möjliggjort detta projekt!

Projektet har drivits av:

- Från KTH på Institutionen för Hållbar utveckling, miljövetenskap och teknik: professor Elzbieta Plaza (projektledare), Razia Sultana (doktorand), Jozef Trela (forskare), Karol Trojanowicz (postdoc).
- Från Chalmers på Institutionen för Bygg- och Miljöteknik: forskarassistent Frank Persson, biträdande professor Britt-Marie Wilén.

Andra medverkande inom projektet:

- Från Göteborgs universitet på Institutionen för Kemi och Molekylärbiologi: Carolina Suarez (doktorand), professor Malte Hermansson.
- Från KTH på Institutionen för Hållbar utveckling, miljövetenskap och teknik: docent Erik Levlin, Mariusz Rajkowski och Kamil Maloszewski (examensarbetare).

Ytterligare rådgivande inom projektet:

- Från Göteborgs universitet på Institutionen för Kemi och Molekylärbiologi: Docent Fred Sörensson.
- Från Chalmers på Institutionen för Bygg- och Miljöteknik och Gryaab AB: adjungerad professor och utvecklingschef Ann Matsson.

Vi vill tacka personalen vid Hammarby Sjöstadsverket för gott samarbete.

Vi vill också tacka personalen vid Genomics Core Facility och Center for Cellular Imaging vid Sahlgrenska Akademin, Göteborgs universitet för tillgång till apparatur och stöd.

Denna rapport presenterar resultat från genomförda experiment och är en sammanfattning av flera artiklar och konferensbidrag av författarna samt av en licentiatavhandling vid KTH av Razia Sultana. Lista med publicerade arbeten redovisas i bilaga 1.

Elzbieta Plaza med författare

Innehåll

Före	ord	3
Sam	nmanfattning	6
Sum	ımary	7
1	Introduktion	8
1.1	Behov av kväverening	8
1.2	Beskrivning av anammox	9
1.3	Fördelar med anammox	11
1.4	Anammox för kväverening	11
2	Projektets målsättning	13
3	Översikt över andra studier med nitritation-anamme vid låga temperaturer och låga kvävehalter	ox 14
3.1	Det gäller att bibehålla biomassan	
~ ~	och aktiviteten vid läga temperaturer	14
3.2	Konkurrensen mellan olika grupper av mikroorganismer avgör driftsstrategierna	15
3.3	Nya möjliga systemlösningar för anammoxprocesser	
4	Forskningsplan	20
4.1	Steg I. Lägre temperaturer	
4.2	Steg II. Minskade kvävehalter	20
5	Metoder	22
5.1	Pilotanläggningen vid Hammarby Sjöstadsverket	
5.2	Kemiska analyser	
5.3	Kontinuerliga mätningar	
5.4	Mätningar av mikrobiell aktivitet	
5.5	Beräkningar	24
5.6	Mikrobiologiska analyser	25
6	Resultat och diskussion	27
6.1	Steg I. Minskande temperaturer	
6.2	Steg II. Minskande kvävehalter	39
7	Kväverening med anammox i huvudströmmen i framtiden?	49
Slut	satser	50
Refe	erenser	52
Bila	ga 1	
	Publikationer/SVU projekt 10-105	60

Sammanfattning

Man kan få stor energibesparing och minskad klimatpåverkan om deammonifikation kan användas för att avskilja kväve ur huvudströmmen vid kommunala avloppsreningsverk. Processen sker utan oxidation av organiskt material vilket ger möjlighet till ökad biogasproduktion.

Deammonifikation består av biokemiska reaktioner i två steg: 1) partiell nitritation (då hälften av inkommande ammoniummängd oxideras till nitrit med hjälp av aeroba ammoniakoxiderande bakterier, AOB) och 2) anammox (då resten av ammonium och den bildade nitriten övergår till kvävgas med hjälp av anammoxbakterier). Syre behövs bara till steg 1, och ingen extern kolkälla behöver tillföras.

I dag används deammonifikation för rening av varmt och kväverikt rejektvatten från slamavvattning, där det går att hålla hög hastighet på processen och undvika oxidation av nitrit till nitrat av nitritoxiderande bakterier (NOB). I reningsverkets huvudström med relativt kallt och kvävefattigt vatten är utmaningarna dels att behålla tillräcklig biomassa eftersom AOB och anammoxbakterier tillväxer långsamt, dels att undvika nitritoxidation av NOB som konkurrerar med AOB om syre.

Forskare vid kth och chalmers har gjort pilotförsök vid Hammarby Sjöstadsverket i en reaktor på 2001 med biofilmsbärare (MBBR). Försöken drevs som en enstegsprocess med partiell nitritation och anammox i samma reaktor. Först studerades effekten av en gradvis sänkning av temperaturen från 19 till 10 °C, och därefter effekten av sänkt ammoniumhalt i inkommande avloppsvatten från 500 till 45 mg/l vid konstant låg temperatur (13 °C). Kväveföreningarnas koncentration mättes i inflöde och utflöde. Aktiviteten hos bakteriegrupperna mättes med tester av deras syreupptagning och kväveupptagning samt förmåga att bilda kvävgas. Den mikrobiella sammansättningen studerades.

Resultaten visade att mellan 19 och 16 °C var kväveavskiljningen hög (>70 procent). Vid 13 °C var kväveavskiljningen lägre (55 %) och vid 10 °C blev processen instabil med mycket låg avskiljningsgrad (<20 %). Temperatursänkningen påverkade bakteriesammansättningen marginellt. Anammoxbakterierna dominerade biomassan, AOB utgjorde en lägre men stabil andel ytterst i biofilmen och NOB en mycket låg men stabil andel.

Vid sänkningen av kvävehalten i avloppsvattnet vid låg temperatur (13°C) var avskiljningsgraden måttlig (<47%). Oavsett syrehalten oxiderade NOB stora delar av all nitrit till nitrat. Det visar att det är svårt att undvika oönskad nitritoxidation enbart med styrning av syrehalten i en MBBR vid låga temperaturer och låga kvävehalter. Sänkt kvävehalt hade liten påverkan på den mikrobiella sammansättningen. Det var mikroorganismernas aktivitet snarare än antal och sammansättning som förändrades.

Försöken visade att bärarna effektivt kvarhåller långsamväxande biomassa även i kalla och kvävefattiga vatten. För framtida tillämpning av deammonifikation av huvudströmsvatten måste betydelsen av NOB minska, något som kräver forskning och nya strategier.

Summary

Substantial savings in energy and climate impact can be achieved if deammonification can be used for nitrogen removal at municipal wastewater treatment plants. Since the process does not require oxidation of organic carbon, increased biogas production is possible. The nitrogen is transformed in two steps: aerobic ammonia oxidizing bacteria (AOB) oxidize half of the ammonia to nitrite (partial nitritation) and anammox bacteria oxidize remaining ammonia with nitrite to nitrogen gas (anammox). Today, deammonification is used for concentrated warm streams of nitrogen (supernatant) where high process rates can be attained and oxidation of nitrite to nitrate by nitrite oxidizing bacteria (NOB) is avoided. At main stream condition with relatively cold and diluted wastewater, the challenges are to maintain enough biomass, since AOB and anammox bacteria are slow growing, and to avoid unwanted nitrite oxidation by NOB, who compete with AOB for oxygen.

Experiments in pilot scale at Hammarby Sjöstadsverket in a 200 l moving bed biofilm reactor (MBBR) were conducted as one-stage process, with nitritation and anammox in the same reactor. First the effects of a stepwise decrease in temperature, from 19 to 10 °C, were studied and thereafter the effect of stepwise decreasing the nitrogen concentrations, from 500 to 45 mg/l, at a temperature of 13 °C. The process performance was followed by measurements of nitrogen species in the influent and effluent. The activities of different bacterial groups were measured by tests of capacity for oxygen uptake, nitrogen uptake and nitrogen gas production. The microbial community was studied by molecular microbiology tools such as qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), sequencing and FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization) together with confocal microscopy.

The results showed that nitrogen removal was high (>70%) between 19 and 16°C. At 13°C the nitrogen removal was lower (55%) and at 10°C, the process became unstable with very low removal grade (<20%). Decreasing the temperature had little effect on the microbial community; anammox bacteria dominated the biomass, with fewer AOB located in the outermost layers of the biofilm and NOB as a low but stable fraction.

When decreasing the nitrogen concentrations to 13 °C, nitrogen removal was moderate (<47%). Independent of oxygen content, NOB oxidized large fraction of all nitrite to nitrate. Avoidance of nitrite oxidation in an MBBR at low temperatures and low concentrations of nitrogen is hard to achieve by control of DO concentrations. The microbial composition was not affected by lowered nitrogen concentrations. It was the activity, rather than numbers and composition of the microorganisms, which changed.

The studies showed that the biofilm carriers were efficient in maintaining slow growing biomass also in cold and diluted water. For future use of deammonification for treatment of main stream wastewater, the impact of NOB has to decrease, which requires research and new strategies.

1 Introduktion

1.1 Behov av kväverening

Utsläpp av orenat avloppsvatten kan orsaka syrebrist i recipienten eftersom näringsämnen, framförallt kväve och fosfor, orsakar övergödning (eutrofiering) genom att stimulera algtillväxten. När alger och andra växter så småningom bryts ner av mikroorganismer förbrukas syre vilket i sin tur leder till syrebrist. Dessutom kan vissa mikroskopiska alger bilda toxiner som kan skada faunan i hav och vattendrag. Blågröna alger (Cyanobakterier) producerar ett gift som angriper levern. I svenska vatten anses övergödning vara huvudorsaken till algblomning (Granéli, 2004). Det var tidigt känt att fosfor är begränsande för algtillväxt i sjöar och åar. På 1970-talet skedde en stor utbyggnad av avloppsreningen i Sverige med biologisk rening av organiskt material samt kemisk fällning av fosfor. Senare kom man till fram till att det är både fosfor och kväve som orsakar eutrofiering i hav och kustvatten (Boesch et al., 2005; Boesch et al., 2008). Samtidigt stiftades ett antal direktiv från EU som berör vatten och där Direktivet om rening av avloppsvatten från tätbebyggelse (91/271/EEG) reglerar reningen av avloppsvatten. Utsläppskravet för (I) reningsverk >100000 personekvivalenter (pe) och (II) som släpper ut till känsliga kustområden, angavs till maximalt 10 mg/l för totalkväve (TN) och till 1 mg/l för totalfosfor (TP). Under 1990talet började därför kustnära avloppsreningsverk större än 10000 pe från Norrtälje till norska gränsen byggas ut för kväverening, där kravet var minst 70% avskiljning (Naturvårdsverket, 1994). Reningsverken byggdes ut med nitrifikation och denitrifikation vilket kräver stora bassängvolymer på grund av behovet av högre slamåldrar, ökade kostnader för luftning och i vissa fall extern koldosering. Senare antog Riksdagen ett antal miljömål där Ingen övergödning, Levande sjöar och vattendrag, Hav i balans samt Levande kust och skärgård har direkt koppling till avloppsrening. Trots utbyggnaden av reningsverken för kväverening lider Östersjön fortfarande av övergödning och Skagerrak i Nordsjön är hotade med områden med syrebrist. För att ytterligare skydda det känsliga ekosystemet i Östersjön tog Helsingforskommissionen fram Baltic Sea Action Plan (Naturvårdsverket, 2009) där krav ställdes på Sverige att minska utsläppen av kväve med 20800 ton för att 2021 nå en eutrofieringsnivå motsvarande 1950-talet. På senare år har det även uppmärksammats att inflödet av kväve till reningsverk i Sverige har fått en ökad mängd kväve per anslutna personekvivalenter som ett resultat av förändrade konsumtionsmönster med ökad konsumtion av kött (Tumlin & Mattsson, 2013). En utökad biologisk rening av kväve med konventionella metoder kräver mycket energi och ökade kostnader i form av extern kolkälla och ökar därför det så kallade carbon footprint (Gustavsson & Tumlin, 2013). Detta har medfört intresse för att hitta nya mer effektiva och resurssnåla metoder för kväverening.

1.2 Beskrivning av anammox

Upptäckten av bakterier som kan utföra anaerob ammoniumoxidation (anammox) förändrade kunskapen om den globala kvävecykeln radikalt. Det var i slutet på 1980-talet som man upptäckte att kväve försvann på ett oförklarligt sätt från en pilotanläggning för avloppsrening vid jästfabriken Gist-Brocades i Delft i Nederländerna, men upptäckten publicerades inte förrän några år senare (Mulder *et al.*, 1995). Processen patenterades även (Mulder, 1989). Genom forskningssamarbete med universitetet i Delft lyckades man få en anammoxkultur att växa i en laboratoriereaktor och bakterierna kunde även identifieras för första gången (Strous *et al.*, 1995). Anammoxbakterier har sedan upptäckten i avloppsvatten även hittats i sötvatten, grundvatten och i haven där det står för så mycket som 30–50% av den globala kvävgasproduktionen (Devol, 2003). Det var dock först 2011 som de fullständiga reaktionsvägarna och dess intermediärer kunde beskrivas (Kartal *et al.*, 2011).

Anammoxbakterier kan oxidera ammonium med nitrit som elektronmottagare direkt till kvävgas med koldioxid som kolkälla (autotrof tillväxt) och på så sätt kortsluta kvävecykeln (figur 1-1). Omvandlingsprocessen beskrivs tillsammans med ekvation andra viktiga kväveomsättningsvägar i tabell 1-1.



Figur 1-1 Översikt över kvävecykeln med avseende på relevanta steg för kväverening. AOB = aeroba ammoniakoxiderande bakterier, NOB = aeroba nitritoxiderande bakterier.

Anammoxbakterier kännetecknas av en mycket långsam tillväxthastighet med uppmätta fördubblingstider på 7–11 dagar vid gynnsamt höga temperaturer på 33–40 °C (Strous *et al.*, 1998; van der Star *et al.*, 2008; Oshiki *et al.*, 2011). Det här gör att det är viktigt att undvika utspolning av anammoxbakterierna. Anammoxprocesser drivs därför ofta i reaktorer med anammoxbakterierna i biofilmer, antigen på rörliga biobärare i en så kalllad MBBR (*Moving Bed Biofilm Reactor*) (Ødegaard *et al.*, 1994), eller som suspenderade biofilmer, så kallade granuler (van der Star *et al.*, 2007). Även i satsvisa reaktorer (SBR) som inte optimeras för granulbildning, förekommer anammoxbakterierna i granuler (Wett et al., 2012). Med anammoxbakterierna i granuler är det relativt lätt att hålla kvar biomassan i systemet. Både MBBR- och granulsystem gör det möjligt att åstadkomma en mycket hög koncentration biomassa per reaktorvolym, något som är mycket viktigt då tillväxthastigheten för anammoxbakterierna är så låg. Omvandlingshastigheterna beror på hur snabbt substraten kan diffundera in genom biofilmen, alternativt granulerna, och den specifika ytan per volym reaktor är därför avgörande för att få en snabbt och effektiv avskiljning av kväve. Med granuler kan man uppnå en specifik yta i reaktorn på upp till 3000 m²/m³ och med biobärare ca 200-600 m²/m³ beroende på typ av biobärare och fyllnadsgrad (McQuarrie & Boltz, 2011). Fördelen med granuler är att mer biomassa per reaktorvolym samt att större specifik yta kan uppnås, men granulerna kräver att biomassan kan avskiljas i något avskiljningssystem såsom sedimentering. Biobärare är mer stabila än granuler och kvarhållandet av biomassan blir därför enklare (Lackner & Horn, 2013).

Tabell 1-1	Kväveomsättning och metabolism för AOB (nitritation),	
	anammoxbakterier, NOB (nitratation) och denitrifikationsbakterie	er.

Nitritation (aerob ammoniumoxidation)	Anammox
Huvudsaklig kväveomsättning:	Huvudsaklig kväveomsättning:
$NH_4^+ + 1,5 O_2^- \rightarrow 2 H^+ + NO_2^- + H_2O$	$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2^- + 2H_2O$
Metabolism:	Metabolism:
80,7 NH ₄ ⁺ + 114,55 O ₂ + 160,4 HCO ₃ ⁻ → C ₅ H ₇ NO ₂ + 79,7 NO ₂ ⁻ + 82,7 H ₂ O + 155,4 H ₂ CO ₃	NH ₄ ⁺ + 1,32 NO ₂ ⁻ + 0,066 HCO ₃ ⁻ + 0,13 H ⁺ → 1,02 N ₂ + 0,26 NO ₃ ⁻ + 0,066 CH ₂ O _{0.5} N _{0.15} + 2,03 H ₂ O
(Henze <i>et al.</i> , 2002)	(Strous et al., 1998)
Nitratation (nitritoxidation)	Denitrifikation
Huvudsaklig kväveomsättning:	Huvudsaklig kväveomsättning:
$NO_2^{-} + 0.5 O_2^{-} \rightarrow NO_3^{-}$	14 NO ₃ ⁻ + C ₁₈ H ₁₉ O ₉ N + 14 H ⁺ → 7 N ₂ + 17 CO ₂ + HCO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺ + 14 H ₂ O
Metabolism:	Metabolism:
134,5 NO ₂ ⁻ + NH ₄ ⁺ + 62,25 O ₂ + HCO3 ⁻ + 4 H ₂ CO ₃ → C ₅ H ₇ NO ₂ + 134,5 NO ₃ ⁻ + 3 H ₂ O	3,73 NO ₃ ⁻ + 0,57 C ₁₈ H ₁₉ O ₉ N + 3,73 H ⁺ → C ₅ H ₇ NO ₂ + 1,65 N ₂ + 5,26 CO ₂ + 3,8 H ₂ O
(Henze <i>et al.</i> , 2002)	(Henze <i>et al.</i> , 2002)

Deammonifikationsprocessen sker i två steg; först måste hälften av ammoniumet (NH_4^+) i avloppsvattnet oxideras till nitrit (NO_2^-) vilket är första steget i nitrifikationsprocessen och kallas nitritation eller partiell nitrifikation (figur 1-1). Detta görs av ammoniakoxiderande bakterier (AOB). I det andra steget oxideras resten av ammoniumet med nitrit som elektronmottagare till kvävgas (N_2) med hjälp av anammoxbakterier. Till skillnad från den konventionella metoden att ta bort kväve genom nitrifikation och denitrifikation krävs inget organiskt kol. Syrehalten styr oxidationen av nitrit till nitrat som utförs av nitritoxiderande bakterier (NOB), vars närvaro är ogynnsam för deammonifikationsprocessen. En stor svårighet med att få en stabil och effektiv process är att hålla konkurrensen mellan AOB, NOB och anammoxbakterierna i balans.

1.3 Fördelar med anammox

Viktiga fördelar med kväverening med anammox, jämfört med konventionell nitrifikation-denitrifikation, är att (I) endast partiell nitritation behövs vilket leder till ca 60 % lägre behov av luftning i detta steg; (II) att organiskt kol inte behövs för kvävereningen vilket medför ökade möjligheter att istället använda det organiska materialet för biogasproduktion; (III) ett minskat syrebehov för oxidation av organiskt material; (IV) ingen extern kolkälla behöver tillsättas (Siegrist et al., 2008) (tabell 1-1). Anammoxprocessen kan drivas som antingen en tvåstegsprocess eller som en enstegsprocess. I tvåstegsprocessen sker nitritationen i den första reaktorn medan anammoxreaktionen äger rum i den andra reaktorn. I en enstegsprocess sker båda reaktionerna i samma reaktor. Nitritationen kontrolleras i enstegsprocessen genom att begränsa tillförseln av syre. Genom att göra det så oxideras inte nitriten vidare till nitrat, även kallat nitratation, och endast hälften av ammoniumet oxideras. Enstegsprocessen har en lägre investeringskostnad eftersom endast en reaktorvolym krävs (Lackner et al., 2014). Fördelen med tvåstegsprocessen är att varje steg kan optimeras var för sig (Ma et al., 2011) medan enstegsprocessen kräver mindre luftning och avger mindre växthusgaser såsom lustgas (N_2O) (Cho *et al.*, 2011). Det är inte helt klarlagt vilka processförhållanden som ger utsläpp av lustgas men riskparametrar är låga syrehalter samt höga nitrithalter (Kampschreur et al., 2009). Såvitt man känner till bildar inte anammoxbakterierna lustgas (Kartal et al., 2011). Dessutom bildar anammoxbaserade processer väldigt lite slam eftersom de växer långsamt och är autotrofa (Mulder, 2003).

1.4 Anammox för kväverening

Anammoxprocessen tillämpas i fullskala endast för varma (>25 °C) avloppsvatten med hög halt av ammonium (>100 mg NH₄⁺-N/l) samt låg halt av organiskt material (COD/N-kvot <0,5 g/g) vilket är typiskt för rejektvatten från avvattning av rötat slam på kommunala avloppsreningsverk och olika typer av industriellt avloppsvatten. Anammox är mycket fördelaktig för denna typ av avloppsvatten eftersom anammoxbakterierna inte behöver konkurrera med heterotrofa bakterier om det organiska kolet. Det finns idag närmare 100 anammoxanläggningar i bland annat Nederländerna, Osterrike, Schweiz, Sverige, Kina, Japan och USA (Lackner et al., 2014) och processen kan därför anses vara en etablerad teknik. Det nederländska företaget Paques BV i samarbete med universitetet i Delft började utveckla anammoxteknologin och redan 2001 utvecklades SHARON-processen i kombination med anammox (van Dongen et al., 2001) i en tvåstegsprocess. SHARON-processen bygger på en process utan slamåterföring där den hydrauliska uppehållstiden styr uppehållstiden för slammet och därmed tillväxthastigheten hos bakterierna. Då temperaturen är över 25 °C växer AOB snabbare än NOB. Genom att justera den hydrauliska uppehållstiden kan oönskade NOB sköljas ut ur systemet och på så sätt produceras ett utflöde med ammonium och nitrit i relationen 1:1 vilket lämpar sig som inflöde till en anammoxprocess. Senare utvecklades CANON (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite)-processen, där AOB samverkar med anammoxbakterier i en enstegsprocess, som även den används för avloppsvatten med låg halt organiskt material och hög halt ammonium (Sliekers *et al.*, 2003). CANON-processen bygger på granulerat slam i en uppströmsreaktor. Balansen mellan AOB och NOB regleras genom att begränsa syrehalten. De processer som hittills utvecklats baseras antingen på granuler, med eller utan flockulerat slam, eller på biofilmer. Reaktorer med granuler är byggda som SBR (Sequencing Batch Reactor) (Wett, 2006) alternativt som UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) (Ahn & Choi, 2006). Biofilmssystemen bygger företrädelsevis på MBBR (Seyfried *et al.*, 2001). I Sverige startade man på Kungliga Tekniska Högskolan redan 2 000 med studier av en tvåstegsprocess med anammox på rörliga bärare (MBBR) och utvecklade sedan tekniken för en enstegsprocess som slutligen resulterade i en fullskaleanläggning vid Himmerfjärdsverket för behandling av rejektvatten (Plaza *et al.*, 2011; Trela *et al.*, 2005; Trela *et al.*, 2014).

Att införa anammoxbaserade processer på huvudströmsvatten i ett avloppsreningsverk är en mycket större utmaning. Anammoxbakterier växer långsamt och deras aktivitet är starkt temperaturberoende (Siegrist *et al.*, 2008). Konkurrensförhållandena mellan AOB, NOB och anammoxbakterier är annorlunda vid de låga temperaturerna och låga halterna. Dessutom varierar koncentrationen av kväve i vattnet ner till mycket låga värden vid exempelvis kraftiga regn. Studier i labb- och pilotskala har dock visat att kväverening från huvudströmmen är möjlig med anammoxbaserade processer. Kunskapsläget sammanfattas i kapitel 3.

2 Projektets målsättning

Målet med det här projektet var att studera deammonifikationsprocessen vid förhållanden som är typiska för huvudströmmen av avloppsvatten vid kommunala avloppsreningsverk. Specifikt var syftet:

- att studera deammonifikationsprocessen vid låga temperaturer och måttliga till låga inkommande kvävekoncentrationer
- att undersöka långsiktig processprestanda och strategier för att nå stabila driftsförhållanden
- att identifiera, kvantifiera och lokalisera de mikroorganismer som är huvudansvariga för kväveomsättningen i reaktorn (MBBR)
- att utvärdera inverkan av olika miljöfaktorer på etablering och samverkan mellan olika mikrobiella populationer och hur detta påverkar deras aktivitet.

3 Översikt över andra studier med nitritation-anammox vid låga temperaturer och låga kvävehalter

Ett antal studier har på sistone visat att kväverening med nitritationanammox är möjlig vid låga temperaturer och/eller låga halter typiska för huvudströmmen av avloppsvatten (tabell 3-1). Skillnaderna är stora mellan dessa studier med avseende på till exempel kväveavskiljning då processerna, reaktortyperna, typen av avloppsvatten och målsättningen med studierna varit olika. Men tillsammans visar de på en potential att använda anammoxprocesser för framtida kväverening från huvudströmmen av avloppsvatten vid kommunala avloppsreningsverk. De typiska utmaningarna för denna tillämpning är de låga temperaturerna, de låga substrathalterna i det inkommande avloppsvattnet, organiskt material i inkommande avloppsvatten som leder till ogynnsamt höga C/N kvoter, samt de höga kraven på låga utgående kvävehalter.

Tabell 3-1	Studier med nitritation-anammox vid låga temperaturer
	och/eller låga kvävehalter.

Reaktor	Avloppsvatten	Koncentration	Temp.	Belastning	Avskiljning	Referens
		(mg-N I'')	(°C)	(kg-N m ^{-s} d ⁻⁺)	(kg-N m ^{-s} d ⁻⁺)	
RBC ¹	Syntetiskt	31–66	25	0,85	0,38–0,44	(De Clippeleir <i>et al.</i> , 2011)
RBC	Syntetiskt	50–60	15	1,3	0,53	(De Clippeleir et al., 2013)
SBR, granuler	Utspätt rejektvatten	200–350	15	0,7	0,2	(Vazquez-Padin <i>et al.</i> , 2011)
SBR, granuler	Syntetiskt	70	12	0,028	0,025	(Hu et al., 2013)
SBR, granuler	Syntetiskt	60–160	15	0,55	0,4	(Lotti <i>et al.</i> , 2014a)
			10	0,27–0,43	0,09–0,21	
Granuler, kontinuerligt flöde	Avloppsvatten	27	19	0,41–0,58	0,16–0,19	(Lotti <i>et al.</i> , 2014d)
MBBR	Rejektvatten	670–930	16 13	0,21 0,2	0,16 0,11	(Persson <i>et al.</i> , 2013)
MBBR	Utspätt rejektvatten	45–85	13	0,06	0,01–0,02	(Sultana <i>et al.,</i> 2014)
MBBR	Syntetiskt	50	10	0,017	0,011	(Gilbert <i>et al.</i> , 2014b)
MBBR	Avloppsvatten	35	14–20	0,15–0,17	0,07–0,09	(Gustavsson et al., 2014)

¹ Rotating biological contactor, sv. Biorotor.

3.1 Det gäller att bibehålla biomassan och aktiviteten vid låga temperaturer

Eftersom anammoxbakterier tillväxer väldigt långsamt har främst processer som möjliggör stor retention av biomassa undersökts för nitritation-anammox vid låga temperaturer och låga substrathalter. Processerna kan vara av typen med biofilmer på bärare (MBBR), som använts inom detta SVU-projekt, med biofilm på en biorotor (rotating biological contactor, RBC) eller baserade på granulerat slam i satsvisa reaktorer (SBR). Samtliga dessa processalternativ har visat sig effektivt kvarhålla anammoxbakterierna i reaktorerna vid låga temperaturer och vid låga substrathalter (De Clippeleir *et al.*, 2013; Gilbert *et al.*, 2014b; Hu *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013; Persson *et al.*, 2014). Anammoxbakterier har också påvisats tillväxa från en liten tillsatt ymp till en fungerande biomassa i reaktorer med låga substrathalter (<100 mg-N/l) och måttliga (20 °C) till kalla (10 °C) temperaturer (Hendrickx *et al.*, 2012; Hendrickx *et al.*, 2014; Lotti *et al.*, 2014b). För att försäkra sig om att erhålla aktiv anammoxbiomassa i huvudströmmen har granuler från en rejektvattenreaktor anrikats i en hydrocyklon och kontinuerligt ympats till reaktorn i huvudströmmen vid en fullskaleanläggning i Strass, Österrike (Wett *et al.*, 2012). Ett snarlikt tillvägagångssätt med överföring av bärare mellan MBBR-reaktorer för rejektvatten och huvudström i en stor pilotanläggning vid Sjölunda avloppsreningsverk i Malmö, har också nyligen presenterats (Gustavsson *et al.*, 2014).

Temperaturen har stor påverkan inte bara på den bakteriella tillväxten utan också på processhastigheten. Samtliga kvävesomsättande bakteriers hastighet sjunker med sjunkande temperatur. Speciellt anammoxbakteriernas omsättningshastighet har visat sig sjunka brant i temperaturintervallet mellan 20 °C och 10 °C (Isaka et al., 2008; Lotti et al., 2014c), medan AOB inte visar fullt så stort temperaturberoende (Lotti et al., 2014c). En sänkning av temperaturen från 20 °C till 10 °C har visat sig medföra en minskning av hastigheten med ca 80% för anammoxbakterier och ca 60% för AOB (Lotti et al., 2014c). Anammoxbakterier och AOB har i vissa studier också skiftat till lägre optimala omsättningstemperaturer efter att ha utsatts för kalla vatten under längre tid (Dosta et al., 2008; Hu et al., 2013), vilket tyder på en avsevärd anpassningsförmåga hos en redan etablerad biomassa i reaktorn. De långtidsförsök som hittills ägt rum har dock inte selekterat fram specifika anammoxbakterier med egenskaper speciellt lämpade för kalla utspädda vatten, utan det är i stort sett samma typer (arter) av anammoxbakterier som förekommer i alla sorters reaktorer, varma som kalla med koncentrerade såväl som utspädda vatten (Gilbert et al., 2014b; Hu et al., 2013; Persson et al., 2014).

3.2 Konkurrensen mellan olika grupper av mikroorganismer avgör driftsstrategierna

För en stabil process med nitritation-anammox behöver samspelet mellan AOB och anammoxbakterier främjas så att så mycket som möjligt av den nitrit som produceras av AOB används som elektronacceptor av anammoxbakterierna och därmed avskiljs till kvävgas (figur 3-1).

NOB konkurrerar med anammoxbakterierna om nitrit och med AOB om syre. För en effektiv process måste reaktorn styras för att undvika nitritoxidation av NOB, genom att skapa svåra konkurrensförhållanden för dem. Detta anses idag vara den största utmaningen för att få till en välfungerande process med nitritation-anammox för huvudströmmen av avloppsvatten. Även heterotrofa bakterier kan påverka processen vid närvaro av förhöjda halter organiskt material. De huvudsakliga konkurrensförhållandena mellan bakterierna i en reaktor med nitritation-anammox är sammanfattade nedan (figur 3-2).



Figur 3-1 Mikroskopibild på en biofilm från en MBBR med nitritationanammox där man genom fluorescerande in situ hybridisering (FISH) kan se de olika grupperna av bakterier. De önskade omsättningsvägarna är utritade.



Figur 3-2 Huvudsakliga konkurrensförhållanden mellan olika grupper av bakterier vid nitritation-anammox.

Temperaturen är en faktor som styr konkurrensförhållandena mellan olika kväveomsättande mikroorganismer. Vid förhöjda temperaturer (25–37 °C) har NOB i allmänhet lägre tillväxthastighet än AOB, vilket gör att NOB relativt enkelt kan selekteras bort från reaktorn (Hellinga *et al.*, 1998). Vid lägre temperaturer har NOB vanligen högre tillväxthastighet än AOB och kan därmed inte selekteras bort lika enkelt. NOB kan då effektivt konkurrera med AOB om syre och med anammoxbakterier om nitrit. Vid låga temperaturer har syrehalterna ofta använts som en styrningsparameter för att reglera konkurrensförhållandena mellan AOB och NOB. Väldigt låga syrehalter (<0,05 mg/l) har framgångsrikt tillämpats för nitritation-anammox i en SBR med granuler i labbskala, där de låga syrehalterna har förhindrat NOB från att etablera sig i granulerna, samtidigt som syrehalterna varit tillräckliga för AOB för att oxidera ammonium till nitrit (Hu *et al.*, 2013). Så låga syrehalter medför dock också låga processhastigheter, vilket avspeglas av att den ganska låga belastningen (0,028 g/m³×d) och därmed låga kväveavskiljningen (0,025 kg/m³×d) i denna studie (tabell 3-1). I försök med RBC vid temperaturer kring 15 °C har reglering av syrehalterna inte räckt till för att hämma NOB från att etablera sig i biofilmen och oxidera en avsevärd andel av allt nitrit som producerats (De Clippeleir *et al.*, 2013). Likaså har NOB etablerats i MBBR processer med kalla vatten och har där periodvis oxiderat betydande andelar av allt nitrit som producerats (Gilbert *et al.*, 2014b; Persson *et al.*, 2014). Även i SBR-studier med granuler har NOB periodvis haft stor påverkan på kväveomsättningen vid låga kvävehalter i kalla vatten (Lotti *et al.*, 2014a).

Intermittent luftning är en driftsstrategi som på sistone förts fram som en möjlighet att mer effektivt reglera NOB i system med nitritation-anammox (Wett et al., 2012). Principen bygger på snabba skiften mellan anoxiska och oxiska perioder. Under den anoxiska perioden kan anammoxbakterierna tillgodogöra sig nitrit utan konkurrens med NOB, som behöver syre. Under den påföljande oxiska perioden svarar NOB långsammare än AOB på det tillförda syret vilket minskar deras påverkan på processen (Gilbert et al., 2014a; Regmi et al., 2014). Den långsammare responsen tros bero på en lagfas för produktion av enzym, temporär brist på nitrit, samt eventuell uppkomst av hämmande intermediära produkter (t.ex. kvävemonooxid) när luften slås av och på (Wett et al., 2012). Det är dock ännu oklart om det går att erhålla tillräckligt snabba skiften i syrehalt i tjocka biofilmer såsom i en MBBR för att använda intermittent luftning även där för att missgynna NOB (Malovanyy et al., 2014b). För att konkurrera ut NOB är det också viktigt att ha tillräckliga ammoniumhalter i reaktorn för att på så vis undvika situationer där AOB lider av substratbrist och därmed inte kan konkurrera effektivt med NOB om syret (Perez et al., 2014).

NOB består av flera obesläktade grupper av bakterier med olika fysiologi. Inom avloppsrening är det framför allt Nitrobacter och Nitrospira som är vanligt förekommande (Kim & Kim, 2006). Nitrobacter har avsevärt högre maximal tillväxthastighet och lägre affinitet för syre än Nitrospira (Kim & Kim, 2006) vilket reglerar deras förekomst i olika processer. Vid nitrifikation i huvudströmmen av avloppsvatten i kommunala reningsverk är oftast Nitrospira den mest förekommande nitritoxideraren, vilket förklaras av att de gynnas av de måttliga substrathalterna (Daims et al., 2006). I processer med nitritation-anammox vid låga substrathalter och/eller låga temperaturer har såväl Nitrobacter som Nitrospira förekommit i vissa reaktorer (Liu et al., 2012; Persson et al., 2014), medan andra dominerats av Nitrospira (De Clippeleir et al., 2013; Gilbert et al., 2014b). Eftersom Nitrobacter och Nitrospira konkurrerar olika väl med AOB om syre vid olika syrehalter, beroende på deras olika affinitet, kan typen av NOB vara avgörande för driftsstrategi för att minimera deras påverkan på kväveomsättningen. Detta exemplifierades tydligt när en höjning av syrehalten från 0,5 mg/l till 1,5 mg/l visade sig leda till att NOB inom *Nitrospira* kunde konkurreras ut i en reaktor med nitritation-anammox (Wett et al., 2012).

Anammoxbakterier kan omsätta organiskt material som oxideras till koldioxid med nitrat och/eller nitrit som elektronacceptor (Guven *et al.*, 2005; Kartal *et al.*, 2007). Denna egenskap kan eventuellt utnyttjas för att minska nitrathalterna i avloppsvattnet. Vid C/N kvoter <1 g/g kan de långsamma anammoxbakterierna konkurrera framgångsrikt med de mer snabbväxande denitrifikationsbakterierna, medan de vid högre C/N kvoter förlorar i konkurrensen (Guven *et al.*, 2005). Denna egenskap spelar roll eftersom C/N kvoterna i avloppsvatten varierar. Samexistens mellan denitrifikationsbakterier och anammoxbakterier vid C/N på 2,2 tyder dock på en viss tolerans för organiskt material även i förhöjda halter (Desloover *et al.*, 2011). Förhöjda C/N kvoter leder också till att AOB utsätts för konkurrens om syret med snabbväxande heterotrofa bakterier, som visat sig konkurrera ut AOB vid C/N >2 g/g (Ballinger *et al.*, 2002).

3.3 Nya möjliga systemlösningar för anammoxprocesser

Ett antal olika systemlösningar med deammonifikation har testats i olika forskningsprojekt världen över. Nedan presenteras i huvudsak forskning om systemlösningar som ägt rum i Sverige.

Ett alternativ till att anpassa deammonifikationen till de låga av kvävehalterna i huvudströmmen kan vara att koncentrera upp kvävehalterna. En nyutvecklad teknik baseras på uppkoncentration av ammonium från kommunalt avloppsvatten genom jonbyte, följt av biologisk avskiljning av ammonium genom nitritation-anammox (figur 3-3A-B). I försök i pilotskala vid Hammarby Sjöstadsverket testades kolonner med en packad bädd av de fyra vanligaste jonbytarmaterialen; starka och svaga sura katjonbyteshartser samt naturliga och syntetiska zeoliter. Experiment med syntetiskt avloppsvatten och med kommunalt avloppsvatten visade att starkt sur katjonharts är den mest lämpliga för uppkoncentrering av ammonium från kommunalt avloppsvatten, på grund av dess höga utbyteskapacitet och snabba regenerering (Malovanyy, 2014; Malovanyy *et al.*, 2014a).

I andra systemlösningar som testats vid Hammarby Sjöstadsverket (Malovanyy *et al.*, 2014b; Malovanyy *et al.*, 2014c) följer nitritation-anammox för kväveavskiljning efter anaerob avskiljning av organiskt material i en UASB reaktor (figur 3-3C). Nitritation-anammox kan även kombineras med slamrecirkulation (hybrid MBBR, IFAS [Veuillet *et al.*, 2014; figur 3-3D]).

Kombinationer med nitritation-anammox i huvudströmmen efter avskiljning av organiskt material med högbelastat aktivt slam studeras vid Sjölunda avloppsreningsverk (figur 3-3E). Här används MBBR med nitritation-anammox för huvudströmsbehandling, men också för separat rejektvattenbehandling med överföring av bärare mellan de två behandlingsstegen för att erhålla hög aktivitet i huvudströmmen (Gustavsson *et al.*, 2014). Även i detta fall skulle slamrecirkulation kunna tillämpas (figur 3-3F). En något likartad processkombination består av korttids slambehandling i ett så kallat A-steg följt av kväveavskiljning i ett så kallat B-steg, med slam som kontinuerligt ympas med anammoxgranuler från rejektvattenbehandling (Wett *et al.*, 2012).

Oberoende av system är de huvudsakliga utmaningarna: låga temperaturer, högt flöde, belastningsvariationer av COD och SS, låga kvävehalter, behov av hög kväveavskiljning, konkurrens från nitritoxiderande bakterier och emissioner av N₂O.



Figur 3-3 Systemlösningar baserade på anammoxprocessen för huvudflödet vid avloppsverk.

SCRGrovrensgallerGCSandfångSFSandfilterIEJonbytarePSPrimärsedimenteringSSSekundärsedimenteringFSSlutlig sedimenteringUASBAnaerob UASB-reaktorPN/APartiell nitritation/AnammoxABAktivslamreaktor

4 Forskningsplan

4.1 Steg I. Lägre temperaturer

Driftsstrategin var att undersöka nitritation-anammox i en MBBR (pilotskala) vid stegvis minskade temperaturen 19 till 10 °C (med 3 °C i varje steg). Pilotanläggningen hade innan försöken med temperatursänkning varit i drift vid 25 °C under en period av 125 dagar och sedan vid 22 °C under 63 dagar med stabila driftsförhållanden. Kvävebelastningen var 3–3,5 gN/ m² × d med en avskiljning på 2,7 gN/m² × d vid försökens start och sänktes sedan gradvis under period I till 1 gN/m² × d. Reaktorn drevs vid 19 °C (period I), 16 °C (period II), 13 °C (period III) och 10 °C (period IV) i sammanlagt 14 månader. Varaktigheten för varje period varierade beroende på processens stabilitet, prestanda och effektivitet. Reaktorn matades kontinuerligt med rejektvatten från slamavvattningen efter rötning från det kommunala avloppsreningsverket i Bromma, Stockholm. Kvävebelastningen var jämförelsevis hög vid 19 °C (2,7 g N/m² × d), och hölls konstant på 1 g N/ m² × d när reaktorn drevs vid 16, 13 och 10 °C. En översikt av driftsbetingelserna och utförda undersökningar visas i tabell 4-1.

Dag	Temp	Uppföljning	Uppföljning	Korta intensiva	Mikrobio	ologiska tester	
_	(°C)	pilot	batch-tester	batch-tester	qPCR	Sekvensering	FISH-CLSM
1–146	19	Ja	Ja	(6 SAA-test)	Ja	Ja	Ja
147–298	16	Ja	Ja	(15 SAA-test)	Ja	-	Ja
299–396	13	Ja	Ja	(25 SAA-test)	Ja	-	Ja
397–431	10	Ja	Ja	(15 SAA-test)	Ja	Ja	Ja

Tabell 4-1 Driftstrategier för MBBR-reaktorn vid olika temperaturer.

4.2 Steg II. Minskade kvävehalter

Vid försöken med förändring av kvävekoncentrationen från måttlig till låga halter tillfördes MBBR-reaktorn utspätt rejektvatten. Under hela driftsperioden hölls temperaturen i reaktorn vid 13 °C. Rejektvattnet kom från slamavvattningen vid Himmerfjärdens avloppsreningsverk, Grödinge, och kranvatten användes som utspädningsmedel. Reaktorn drevs i tio månader som delades in i sex perioder. Koncentrationen under perioden I, period II och period III var 500 mg/l, 250 mg/l respektive 125 mg/l. Senare observerades dock att en mindre gradvis minskning var nödvändig för att uppnå processtabilitet. Därför sattes koncentrationen under period IV till 125 mg/l och i period V till 80 mg/l. Under period VI var målet att uppnå kvävehalter i den storleksordning som råder i huvudströmmen, varför koncentrationen sattes till 45 mg/l. En översikt av driftsplanen och utförda undersökningar visas i tabell 4-2.

Tabell 4-2 Driftstrategier för MBBR-reaktorn vid olika inkommande kvävekoncentrationer vid 13 °C.

Period	Dag	Inkommande kväve (mg/l)	Uppföljning pilot	Uppföljning batch-tester	Mikrobiologiska qPCR	a tester NGS
Period I	1–58	500	Ja	Ja	Ja	Ja
Period II	59–100	250	Ja	Ja	Ja	-
Period III	101–133	175	Ja	Ja	Ja	Ja
Period IV	134–190	125	Ja	Ja	Ja	-
Period V	191–259	80	Ja	Ja	Ja	Ja
Period VI	260–303	45	Ja	Ja	Ja	Ja

5 Metoder

5.1 Pilotanläggningen vid Hammarby Sjöstadsverket

Studien genomfördes med enstegs deammonifikationsprocess i en MBBR i pilotskala vid Hammarby Sjöstadsverkets forskningsstation. Reaktorn arbetsvolym var 200 liter och 40 % av volymen var fylld med Kaldnesbärare typ K1[®] (figur 5-1a). Den specifika ytan för bärarna var 500 m²/m³. Både värmare och kylare användes för att kontrollera och hålla temperaturen i reaktorn (Julabo AB, Sverige). God omblandning erhölls av en omrörare (50 varv per minut) med tvåbladig propeller och luft tillfördes med två bars lufttryck från botten av reaktorn.



Figur 5-1 A) MBBR med enstegs deammonifikation i pilotskala vid Hammarby Sjöstadsverket. B) Typisk bärare med en hög biomassa, C) Kontroll och övervakningspanel.

5.2 Kemiska analyser

För övervakning av processprestanda togs prover från både inkommande och utgående vatten en eller två gånger i veckan, beroende på den hydrauliska uppehållstiden. Före analys filtrerades alla vattenprover genom 0,45 µm filter. De olika formerna av kväveföreningar (NO_2^{-} -N, NH_4^{+} -N och NO_3^{-} -N), totalkväve (TN), alkalinitet och COD analyseras med hjälp av Dr Langes provkyvetter och en XION 500 spektrofotometer (företag, ort). Mätning av biofilmbiomassan som totalt och flyktigt suspenderat material (TSS och VSS) utfördes enligt standardförfaranden (APHA, 1998) med användning av Whatman grad 40 filterpapper (porstorlek 1,6 µm).

5.3 Kontinuerliga mätningar

Under försöken registrerades olika fysiska parametrar såsom redoxpotential, pH och löst syre (DO) i reaktorn kontinuerligt med online-sensorer (figur 5-1b). DO i reaktorn kontrollerades med en PID-regulator (Cerlic AB, Sverige). Temperaturen övervakades kontinuerligt och styrdes med en kompakt styrenhet (JUMO GmbH & Co KG, Tyskland).

5.4 Mätningar av mikrobiell aktivitet

5.4.1 Specifik anammoxaktivitet (SAA)

För att utvärdera driften av pilotanläggningen, utfördes tester på den specifika anammoxaktiviteten (SAA) i triplikat varje vecka på bärarna. Testerna var baserade på tryckmätning av kvävgas enligt den metod som beskrivs av Dapena-Mora *et al.* (2007). Temperaturen vid SAA-testerna var 25 °C.

För att studera de kortsiktiga effekterna av temperaturen på biomassans anammoxaktivitet, utfördes en serie SAA-tester (kortsiktiga SAA-tester) i triplikat vid olika temperaturer från 25 till 5 °C (5 °C stegvis förändring). För varje serie av kortsiktiga SAA-tester togs prover från reaktorns biofilmbärare för varje studerad temperatur (tabell 4-1).

5.4.2 Syreförbrukningshastighet (OUR)

För att mäta aktiviteten hos olika grupper av bakterier, utfördes tester av syreupptagningshastigheten (OUR) med den metod som beskrevs av Surmacz-Górska *et al.* (1996) och modifierades av Gut *et al.* (2005). I detta test fylldes en trehalsad flaska, med en total volym av 1,56 l, med utspätt rejektvatten (kranvatten användes som spädningsmedel) för att få en NH₄-N-koncentration av 100 mg/l. Två hämmare användes vid OUR-testerna. Natriumklorat (NaClO₃, 17 mM) för att inhibera nitritoxidation av NOB och allylthiourea (ATU, 43 μ M) för att inhibera ammoniumoxidation med AOB. Natriumklorat och ATU doserades efter fem respektive tio minuter sedan testets början. För att registrera förändringar av syrekoncentrationen användes en datalogger TESTO® 251 ansluten till en löst syreelektrod. Testerna utfördes i triplikat vid 25 °C för att få det genomsnittliga värdet för syre som förbrukas av olika grupper av bakterier varvid syreförbrukningen mättes som g O₂/m² × d.

5.4.3 Nitratförbrukningshastighet (NUR)

För att utvärdera aktiviteten av heterotrofa denitrifikationsbakterier utfördes NUR-tester genom att mäta det maximala nitratutnyttjandet, enligt beskrivning av Yang (2012). En behållare (1,5 l) fylldes med utspätt rejektvatten (spätt med destillerat vatten) och 10 ml NaNO₃ stamlösning doserades för att få en initial NO₃-N koncentration av 100 mg/l. Kvävgas spolades kontinuerligt genom behållaren för att uppnå en syrekoncentration av 0,5 mg O₂/l. Därefter förseglades behållaren och hölls i vattenbad för att behålla en temperatur av 25 °C. Testet utfördes under fyra timmar. Från starttiden till slutet av testet togs fem prover, en för varje timme, för att mäta NO₃-N-koncentration nen. Beräkningen baserades på nitratförbrukning som en funktion av tiden.

5.5 Beräkningar

Kväveavskiljningen av anammoxbakterier och AOB beräknades som $gN/m^2 \times d$ baserat på kvävebalanser över reaktorn samt stökiometri för anammoxreaktioner (Strous et al, 1998). I reaktionerna betyder HRT = hydraulic retention time (hydraulisk uppehållstid), RSS = reactor specific surface (reaktorns specifika biofilmsyta).

$$\Delta N = [NH_4^{+} N_{inflöde}] - ([NH_4^{+} N_{utflöde}] + [NO_2^{-} N_{inflöde}] + [NO_3^{-} N_{utflöde}])$$
(ekv. 1)

Kväveavskiljningshastighet, NRR (anammox) =
$$\frac{\Delta N}{HRT \times RSS}$$
 (ekv. 2)

Aerob ammonium (AOB) (ekv. 3)
$$= \frac{[NH_4^+ - N_{inflöde}] - [NH_4^+ - N_{utflöde}] - \frac{\Delta N}{2,04}}{2,04}$$

Nitritoxidationshastighet (under antagande att det inte finns någon denitrifikation eller nitrat i inflödet):

NOR
$$(gN/m^2 \times d) = \frac{[NO_3^- - N_{inflide}] - \frac{0.26 \times \Delta N}{2.04}}{SSR} \times Q$$
 (ekv. 4)

$$\text{COD-avskiljning, } \Delta COD = \frac{[\text{COD}_{\text{inflöde}}] - [\text{COD}_{\text{utflöde}}]}{\text{SSR}} \times Q \qquad (\text{ekv. 5})$$

Denitrifikation (baserat på 4,2 g COD förbrukat per g av kväve) (ekv. 6) $(gN/m^2 \times d) = \frac{\Delta COD}{4,2}$

Beräkning av potentiell kväveomsättning för AOB (gN/m²×d) (ekv. 7)
=
$$\frac{AOB \text{ aktivitet vid OUR}}{3,43}$$

Beräkning av potentiell kväveomsättning för NOB (gN/m²×d) (ekv. 8) = <u>NOB aktivitet vid OUR</u>

Fri ammoniak (FA) and fri salpetersyra (free nitrous acid, FNA) beräknades enligt Anthonisen *et al.*, (1976):

$$FA = \frac{10^{pH}}{e^{\frac{6344}{T}} + 10^{pH}} \times NH_{4}^{+} - N_{utflöde}$$
(ekv. 9)

$$FNA = \frac{1}{e^{\frac{-2300}{T}} \times 10^{pH}} \times NO_{2} - N_{utflöde}$$
(ekv. 10)

5.6 Mikrobiologiska analyser

De huvudsakliga rent mikrobiologiska frågorna som ställts i detta projekt är:

- (I) Vilka mikroorganismer i biofilmen på bärarna är inblandade i omsättningen av kväve?
- (II) Hur många är de och hur förändras dynamiken över tid?
- (III) Var i biofilmen befinner de sig?

Följande metoder har använts för att besvara dessa frågor:

5.6.1 Sekvensering av klonbibliotek

För att svara på frågan om vilka mikroorganismer som medverkar i kväveavskiljningen sekvenserades anammoxbakterier och AOB genom att konstruera klonbibliotek för planktomyces-specifika gener för ribosomalt RNA (16S rRNA, anammox) och gener för enzymet ammoniumoxidas A (amoA, AOB). De erhållna sekvenserna användes för att undersöka diversiteten och utgjorde basen för urval av primers och prober för qPCR och FISH. Dessa analyser utfördes i delprojektet med sjunkande temperaturer.

5.6.2 Next Generation Sequencing (NGS)

En mer djupgående sekvensering utfördes inom delprojektet med sjunkande kvävehalter, där partiella gener för16S rRNA har sekvenserats med Illumina MiSeq-plattformen. Med denna metod erhålls väldigt många sekvenser (>10000) per prov, vilket ger ett gott statistiskt underlag (Caporaso *et al.*, 2012). Primerdesign, indexering, PCR och annan uppströms provbearbetning följde nyligen publicerade rekommendationer (Kozich *et al.*, 2013). För att hantera den stora mängden sekvenser användes den öppna mjukvaran för bioinformatik inom projektet Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Detektion av förmodat felaktiga sekvenser, alignment, sekvensklassificering och sekvensgruppering följde en pipeline inom Mothur som nyligen presenterats (Kozich *et al.*, 2013).

5.6.3 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

qPCR svarar på frågan om hur många specifika mikroorganismer som finns i ett prov. Först extraheras DNA från proverna som ska undersökas. Därefter mäts koncentrationen i DNA-extraktet och en specifik mängd DNA tillsätts till PCR-reaktionen. PCR (Sv. polymeraskedjereaktion) bygger på principen att en specifik gen i ett prov kopieras i en cykelreaktion där varje cykel leder till en kopiering. Den specifika genen kopieras genom att primers (korta DNA-molekyler) fäster vid komplementära regioner på genen och att ett DNA polymeras använder dessa primers som startpunkt för kopieringen. Antalet kopior av den specifika genen kommer att fördubblas vid varje cykel. Genom att detektera kopieantalet i realtid under PCR reaktionen med hjälp av fluorescens och jämföra med en standardserie av kända antal kopior av den specifika genen kan man mäta hur många kopior av en specifik gen som finns i ett prov. Denna kvantitativa metod benämns qPCR. Inom vårt projekt uppmättes förekomsten av anammoxbakterier, AOB, NOB inom *Nitrospira*, NOB inom *Nitrobacter*, samt den totala förekomsten av bakterier. För AOB användes gener för amoA som målmolekyler, för övriga bakteriegrupper användes gener för 16S rRNA. En stor fördel med qPCR är möjligheten att mäta många prov i samma omgång, vilket möjliggör replikering och mätningar i tidsserier. Eftersom man mäter antalet kopior av en specifik gen och inte förekomsten av en specifik bakterie, måste man vara noggrann i sin tolkning av resultaten, då vissa bakterier till exempel kan ha multipla genkopior. I allmänhet anses qPCR vara en metod med hög känslighet och vara robust för att detektera skillnader mellan prov (Smith & Osborn, 2009).

5.6.4 Fluorescence in situ hybridization (FISH) och Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Dessa metoder svarar på frågan var i biofilmen en specifik mikroorganism befinner sig. Genom att använda specifika prober för olika grupper av anammoxbakterier, baserat på sekvenseringarna (se ovan), har också metoden använts för att detektera skillnader i lokalisering av olika ekotyper. Biofilm på bärarna fixerades, bäddades in i et bindemedel (OCT) och infrystes (-70 °C). Därefter skivades den frusna biofilmen upp i tunna snitt (20–50 µm) i en cryotom. Dessa snitt av biofilmen användes för FISH. På så vis bevarades mikroorganismernas position i biofilmen (figur 5-2). FISH bygger på principen att prober (korta DNA-molekyler) tillåts hybridisera med (fästa vid) ribosomalt RNA (rRNA). Genom att noggrant styra processen kommer enbart prober med exakt komplementär sekvens till rRNA att hybridisera. Genom att ha fäst en fluorescerande molekyl vid proberna kommer de mikroorganismer som har komplementärt rRNA bli fluorescerande. Dessa kan visualiseras med ett konfokalmikroskop (CLSM), med vilket de fluorescerande bakterierna på olika djup i den snittade biofilmen kan detekteras. Genom statistisk digital bildbehandling (mjukvara: Daime) kan man erhålla tillförlitliga data om lokaliseringen av de olika specifika mikroorganismerna (Almstrand et al., 2013).



Figur 5-2 Tillvägagångssätt för att undersöka biofilmens struktur: 1) Bärarna i en MBBR. 2) Bärare bäddas in i OCT och fryses in vid -70 °C.
3) Intakt biofilm från ett hålrum i bärarna tas ut och förbereds för cryosnittning. 4) Den intakta biofilmen bäddas in i ytterligare OCT.
5) Biofilmen skivas upp längdleds eller tvärleds med en cryotom i 20-50 μm tjock snitt som placeras på speciella objektsglas. Objektsglasen med snitt av biofilm används sedan för FISH.

6 Resultat och diskussion

6.1 Steg I. Minskande temperaturer

6.1.1 Kväveomsättning

I den här studien studerades effekten av allt lägre temperaturer, från 19 till 10 °C, på processeffektiviteten i en enstegs-MBBR i pilotskala. Försöken kördes under en lång tid, 14 månader, med en gradvis sänkning av temperaturen. Att försöken kördes så länge beror på att förändringar i den mikrobiella sammansättningen förväntades vara långsamma på grund av de långsamväxande anammoxbakterierna. Innan en ytterligare sänkning i temperatur gjordes var målet att processen skulle ha uppnått stabila förhållanden under en längre tid (> en månad). Studien delades in i fyra perioder där temperaturen sattes till 19, 16, 13 och 10 °C där längden på de olika perioderna varierade beroende på hur snabbt stabila processbetingelser kunde uppnås. Driftsförhållandena för reaktorn sammanfattas i tabell 6-1.

Försöken startade med biofilmer som hade körts vid 25 °C och en kvävebelastning på 2,7±0,2 gN/m²×d i 125 dagar och därefter vid 22 °C och en kvävebelastning på 2,6±0,1 gN/m²×d i 63 dagar (Yang, 2012) med en kvävereduktionsgrad på 86 respektive 76% (Yang, 2012).

Antal dagar	Period I 146 (1–146)	Period II 152 (147–298)	Period III 97 (299–396)	Period IV 35 (397–431)			
Driftsförhållanden							
Temperatur (°C)	19,6±1,2	16,4±0,5	13,3±0,0	10,1±0,5			
HRT (d)	1,7±0,4	3,7±0,5	4,1±0,2	3,7±0,3			
DO (mg/l)	1,4±0,3	1,2±0,4	1,2±0,1	1,7±0,2			
рН	7,6±0,5	7,2±0,3	7,7±0,5	8,2±0,3			
Kvävebelastning (gN/m²×d)	2,2±0,5	1,0±0,3	1,0±0,0	1,0±0,0			
Kvävereduktion							
Totalt N (gN/m ² × d)	1,6±0,4	0,9±0,1	0,5±0,1	0,2±0,1			
Totalt N (%)	72±0,1	76±9	53±14	16±9			
NH ₄ -N (%)	87±12	94±6	64±16	26±10			
Processprestanda							
NH ₄ -N (in) (mg/l)	772±52	807±70	840±45	735±52			
NH ₄ -N (ut) (mg/l)	122±82	45±53	302±142	540±44			
NO ₂ -N (ut) (mg/l)	11±5	18±13	9±3	19±20			
NO ₃ -N (ut) (mg/l)	110±45	131±55	87±47	55±34			
FA (ut) (mg/l)	2,5±3,4	0,3±0,5	3,9±3,3	19,7±11,4			
Total N genom denitrifikation (%)	4,0	1,3	4,3	5,8			
NO ₃ -N (ut)/NH ₄ - N (borttaget)	0,20	0,22	0,19	0,50			

Tabell 6-1 Driftförhållanden och processprestanda för MBBR-reaktorn. Medelvärde ± standardavvikelse.

Vid 19 °C bibehölls först kvävebelastningen på samma nivå som under drift vid 25 och 22 °C för att sedan sänkas gradvis till ca 2 gN/m²×d vid 19 °C under en period av 6 månader innan försöken med temperatursänkning påbörjades i period I (tabell 6-1, figur 6-1a). Under period II (16°C), III (13°C) och IV (10°C) hölls kvävebelastningen konstant på 1 g N/m²×d för att kunna jämföra kvävereduktionen vid de lägre temperaturerna. Under period I (19°C) var kväveavskiljningen stabil med en avskiljningsgrad på 72% (figur 6-1a).

När period II startade sänktes kvävebelastningen gradvis ner till 1 gN/ $m^2 \times d$ under en period av 20 dagar. Syrehalten varierade något runt 1 mg/l. Under den senare delen av perioden uppstod problem med syremätaren som registrerade något felaktiga värden vilket gjorde att syrehalten gick upp något i reaktorn. Som följd av detta ökade nitrathalten, troligen som följd av en ökad aktivitet hos NOB vilket gjorde att kväveavskiljningen minskade (figur 6-1b). Samtidigt ökade den fria halten av ammonium (FA) till 2,7 mg N/l (figur 6-1.c).

Vid en ytterligare sänkning till 13°C (Period III) sjönk kväveavskiljningen till i genomsnitt 53 % för totalkväve och 64 % för ammonium (tabell 6-1). Under period III testades effekten av luftningsintensitet. Syrehalten sattes till 1 mg/l mellan dag 299 till 327 samt 359 till 370 (figur 6-1d). Vid dessa förhållanden gick avskiljningen av kväve gradvis neråt. Mellan dag 328 och 358 samt mellan dag 374 och 396 sattes syrehalten till 1,2–1,3 mg O₂/l. Under dessa dagar ökade kväveavskiljningen vilket visar att det är viktigt att hålla en viss syrehalt för att AOB-aktiviteten skall öka. Ammoniumhalten sjönk gradvis då syrehalten ökade samtidigt som nitrathalten ökade (figur 6-1b). När syrehalten var lägre ledde det sänkta luftflödet till att pH höjdes på grund av att AOB var mindre aktiva. Det förhöjda pH-värdet gav dessutom upphov till ökade halter av FA vilket kan ha inhiberat aktiviteten hos både AOB och anammoxbakterier (Li et al, 2012)(figur 6-1d). Under den senare delen av period III med 13 °C var halten av nitrat förhöjd trots den relativt höga halten av FA vilket tyder på NOB-aktivitet. Både anammoxbakterier och NOB är mer känsliga för FA än AOB men uppgifter finns i litteraturen visar att NOB kan acklimatisera sig till förhöjda halter av FA i enstegs-anammoxprocesser (Li et al, 2012).

När temperaturen sänktes till 10 °C (Period IV) blev processen instabil med en gradvis sänkning i kväveavskiljning till bara några få procent. I ett försök att öka aktiviteten hos AOB höjdes syrehalten till 1,7 mg/l (figur 6-1d). Detta ledde dock inte till någon sänkning av ammonium-halten (figur 6-1b). Den höga halten av ammonium i kombination med ett höjt pH ledde till ökande halter av FA upp till 35 mg/l (figur 6-1c). Nitrathalten i reaktorn sjönk samtidigt som nitrithalten gick upp under den senare delen av period IV. Detta tyder på att både NOB och anammoxbakteriernas aktivitet gått ner.

Enligt stökiometrin för nitritation-anammox-reaktionen bildas det 0,11 mol nitrat per mol ammonium som tas bort (tabell 1-1). Då reaktorns drevs vid 25 och 22 °C bildades det 0,11 respektive 0,13 mol nitrat per mol borttaget ammonium, vilket är nära det teoretiska värdet. Detta visade att ingen eller lite nitritoxidation av NOB ägde rum vid 22–25 °C. Vid en ytterligare sänkning av temperaturen till 19, 16 och 13 °C ökade nitratbildningen till 0,19–0,22 mol nitrat per mol ammonium borttagen (tabell 6-1). En dramatisk ökning till 0,5 mol nitrat bildat per mol ammonium borttagen observerades vid 10 °C. Detta tyder på att det är svårt att konkurrera ut NOB vid lägre temperaturer och vid en syrehalt på 1,2 till 2,4 mg/l.



Denitrifierande bakterier finns förmodligen också i nitritation-anammoxbiofilmer. Under antagande att det endast är denitrifierarna som förbrukar det organiska materialet i reaktorn kan deras möjliga bidrag till kvävereduktionen beräknas stökiometriskt till 4,2 g COD/gN (ekv. 6) (Carrera *et al.*, 2004). Kväveavskiljningen genom denitrifikation visade sig vara begränsad i vår studie till 1–6% av den totala kväveavskiljningen (tabell 6-1). Studier har även visat att anammoxbakterier kan reducera nitrat genom oxidation av organiskt kol samt att denna process kan konkurrera ut heterotrofa denitrifierare vid COD/N-kvoter runt 0,5 g/g (Kartal *et al.*, 2007; Winkler *et al.*, 2012). Denna kvot kan jämföras med 0,6–0,8 g/g i den här studien.

6.1.2 Mikrobiell aktivitet

Interaktion för olika grupperna av mikroorganismer

Den potentiella aktiviteten hos de syreförbrukande grupperna av mikroorganismer, mätt med OUR, visade att AOB hade högre aktivitet än heterotrofa bakterier och NOB under i stort sett hela driftsperioden (figur 6-2). Lägre temperaturen påverkade alltså inte den dominerande rollen för AOB bland syrekonsumenterna. De heterotrofa bakterierna minskade sin potentiella aktivitet med sjunkande temperaturer. AOB och NOB visade däremot inte en tydligt minskad aktivitet med förändrade reaktortemperaturer från 19 till 10 °C.

Anammoxbakterierna spelade en dominerande roll för kvävavskiljningen i reaktorn medan denitrifikationsbakterierna bidrog i mycket liten grad. Likaså var den uppmätta potentiella aktiviteten hos anammoxbakterierna mycket högre än hos denitrifikationsbakterierna (figur 6-3). Anammoxbakterierna minskade något i potentiell aktivitet med sjunkande temperatur och minskande belastning i reaktorn, till skillnad från övriga kväveomsättande bakteriergrupper som inte uppvisade någon tydlig trend (tabell 6-2).



Figur 6-2 Potentiell aktivitet för olika grupper av syreförbrukande mikroorganismer mätt som OUR vid drift av MBBR-reaktorn vid olika temperaturer. Felstaplar visar standardavvikelse.



Figur 6-3 Potentiell aktivitet för anammoxbakterierna (SAA) och denitrifikationsbakterierna (NUR) vid drift av MBBR-reaktorn vid olika temperaturer. Felstaplar visar standardavvikelse (SAA).

Kväveomvandlingen var mycket lägre i reaktorn i jämförelse med baserat på de potentiella aktiviteterna för samtliga grupper av bakterier (tabell 6-2). Detta beror främst på att det är den potentiella aktiviteten var uppmätt vid 25 °C, medan reaktorns temperaturer var avsevärt lägre. En ytterligare bidragande anledning kan vara att halterna av fri ammoniak (FA) under vissa perioder hämmade den aeroba ammoniumoxidationen (AOB) i reaktorn, medan halterna av FA vid aktivitetstesterna var försumbara.

Temperatur i reaktorn (°C)	Kväveomvandling vid aktivitetstestet (g N/m²×d)				Kväveomvandling i reaktorn (g N/m²×d)			
	AOB	NOB	Anammox	Denitrifikation	AOB	NOB	Anammox	Denitrifikation
19	0,81	0,70	2,21	0,44	1,13	0,03	1,67	0,07
16	0,60	0,75	1,77	0,31	0,60	0,05	0,81	0,01
13	0,78	0,51	1,83	0,44	0,40	0,03	0,55	0,02
10	0,81	1,03	1,57	0,34	0,18	0,05	0,17	0,01

Tabell 6-2 Kväveomvandling mätt i aktivitetstestet och i MBBR-reaktorn vid olika temperaturer.

Den genomsnittliga kväveomvandlingshastigheten per cell var högre vid 16 °C än vid 13 °C för både AOB och anammoxbakterier (för data, se Persson *et al.*, 2013). Den genomsnittliga kväveomvandlingshastigheten per cell var också mycket högre för AOB än för anammoxbakterierna. AOB befann sig i ett tunt lager ytterst i biofilmen, medan anammoxbakterierna var rikligt förkommande i den tjocka anoxiska delen av biofilmen (se figur 6-9, nedan). Tidigare studier har visat att bakterier som finns i olika lager av biofilmen inte är lika aktiva, beroende på variationen i tillgången på substrat och elektronacceptorer (Gieseke *et al.*, 2005). AOB som var nära vattenfasen i vår studie påverkades högst sannolikt i mindre grad av masstransport och substratbegräsningar än anammoxbakterierna i den tjocka anoxiska regionen.

Effekt av temperatursänkning på anammoxaktiviteten – kortsiktiga SAA tester Kortsiktiga SAA-tester utfördes för att undersöka inverkan av temperaturen på anammoxaktiviteten. För varje temperaturnivå i reaktorn, visade SAAtester att anammoxaktiviteten gradvis minskade med temperaturen från 25 °C till 5 °C (figur 6-4). Aktiviteten hos anammoxbakterierna var jämförbar mellan temperaturnivåerna 13, 16 och 19 °C i reaktorn, och detta syns speciellt tydligt vid kortsiktiga SAA-tester vid 20, 15 och 10 °C. Liknande studier utfördes av (Dosta *et al.*, 2008) som med kortsiktiga aktivitetstester observerade en adaptation av biomassa till låga temperaturer vid drift av en SBR. När MBBR-reaktorn drevs vid 10 °C visade de kortsiktiga SAAtesterna en betydande nedgång av anammoxaktiviteten, vilket förklaras av att de instabila driftsförhållandena vid denna temperatur ledde till en tydlig påverkan på biomassans fysiologiska status.



Figur 6-4 Inverkan av temperaturen mätt i satsvisa aktivitetstester vid 5 till 25 °C på SAA av biomassa från reaktorn vid temperaturerna 19, 16, 13 och 10 °C. Felstaplar visar standardavvikelse (n = 3).

Aktiveringsenergin var 50 kJ/mol för biomassa anpassad till 16 °C och 61 kJ/mol för 13 °C baserat på riktningskoefficienterna i Arrheniusdiagrammen (figur 6-5), beräknade enligt (Lotti *et al.*, 2014c). Dessa resultat är jämförbara med resultat för anammoxbiomassa i reaktorer för kväverening (63 kJ/mol) (Dosta *et al.*, 2008) och för marina anammoxbakterier (51 kJ/mol) (Rysgaard *et al.*, 2004). Avsevärt högre aktiveringsenergi (94 kJ/mol) har dock uppmätts för biomassa i reaktorer med låga temperaturer (6 till 22 °C). Dessa skillnader beror sannolikt på lägre grad av adaptation (anpassning) till de lägre temperaturerna i den senare studien (Isaka *et al.*, 2008), där biomassan exponerades för låga temperaturer i ett fåtal dagar och inte i många veckor, som inom detta SVU-projekt. Det är sammantaget viktigt att notera att anammoxbakterierna uppvisade en mycket kraftig respons på temperaturminskningar och att anammoxaktivitet intressant nog uppmättes även vid mycket låg temperatur (5 °C) vid dessa test.



Figur 6-5 Förhållande mellan SAA och temperatur i kortsiktiga SAA-tester (Arrheniusdiagram) för temperaturer i MBBR-reaktorn på a: 16 °C och b: 13 °C.

6.1.3 Mikrobiell samhällsstruktur vid sjunkande temperaturer

Vilka bakterier utförde nitritation-anammox i biofilmen?

För att undersöka sammansättningen av AOB och anammoxbakterier i biofilmen på bärarna konstruerades klonbibliotek baserade på gener för amoA (AOB) och 16S rRNA (anammoxbakterier). Proverna på biofilm från 19°C och 10°C användes för dessa undersökningar för att täcka in det studerade temperaturintervallet.

Klonbiblioteken för AOB från såväl 19°C som10°C dominerades av amoA-sekvenser som var identiska med *Nitrosomonas* sp. I4 inom *Nitrosomonas eutropha/europaea* klustret (figur 6-6). AOB inom detta kluster är utpräglade ekologiska r-strateger, det vill säga de har en hög tillväxthastighet och låg substrataffinitet och är därmed typiska i miljöer med höga halter av ammonium (Bollmann *et al.*, 2002), såsom rejektvatten som använts i denna studie. AOB inom detta kluster har varit vanligt förekommande också i andra reaktorer för nitritation-anammox med rejektvatten (Park *et*



Figur 6-6 Fylogenetiskt träd (Neighbour joining) baserat på amoA sekvenser för AOB. Sekvenserna från denna studie visas i fetstil med antalet sekvenser inom samma sekvensgrupp inom klamrar. KTH11 betyder att proverna kommer ifrån 2011 vid 19 °C. KTH12 från 2012 vid 10 °C. Fyllda cirklar anger bootstrap-värden >90 %, tomma cirklar >50 % (1000 iterationer).

al., 2010; Vlaeminck *et al.*, 2010), där de höga kvävehalterna förklarar deras relativa dominans.

Klonbiblioteken för planktomyceter baserat på 16S rRNA-sekvenser visade att samtliga anammoxbakterier tillhörde *Brocadia* där de allra flesta hade en stor likhet med *Brocadia* sp.40 (figur 6-7) – en grupp inom *Brocadia* som tidigare också hittats i rejektvattenreaktorer (Park *et al.*, 2010; van der Star *et al.*, 2008). Precis som för AOB tyder anammoxbakteriernas identitet inom *Brocadia* sp. på att de var typiska r-strateger anpassade för höga substrathalter (van der Star *et al.*, 2008). Det fanns dock också ett litet antal anammoxsekvenser som saknade likhet (\leq 96%) med någon känd art inom *Brocadia* sp. Dessa sekvenser hade dock stor likhet (>99%) med anammoxsekvenser från andra reaktorer med höga kvävehalter vilket tyder på att nya ännu inte definierade arter och/eller ekotyper av anammoxbakterier förekommer i dessa miljöer.





Hur många var de olika kväveomsättande bakterierna i biofilmen?

Genom qPCR kunde vi undersöka antalet anammoxbakterier, AOB och NOB (Nitrobacter och Nitrospira) i biofilmen från reaktorn (figur 6-8). Resultaten visar att anammoxbakterierna utgjorde en stor och dominerande del av biomassan. En stegvis sänkning av temperaturen från 19°C till 10°C påverkade inte den totala mängden bakterier, mätt med universella primers, eller mängden anammoxbakterier. AOB utgjorde en avsevärt mindre del av den totala biomassan än anammoxbakterierna och sjönk signifikant i antal från 19°C till 16°C (ANOVA, p<0,01), men var därefter ganska konstanta i förekomst. NOB inom Nitrobacter och Nitrospira hade båda en låg relativ förekomst i biofilmen. Nitrospira var signifikant högre i förekomst vid 13-16°C (p<0,01, ANOVA), vilket tyder på att dessa bakterier konkurrerade bäst vid dessa temperaturer. Intressant nog har en nylig studie visat att Nitrospira har en temperaturgräns (12°C) under vilken de konkurrerar dåligt, vilket bekräftar observationerna från qPCR mätningarna (Gilbert et al., 2014b). Nitrobacter uppvisade däremot ingen skillnad i förekomst vid de olika temperaturerna.



Figur 6-8 Förekomst av samtliga bakterier (Uni), anammoxbakterier, AOB, Nitrobacter och Nitrospira mätt med qPCR. Figuren visar kopieantalet per m² av biofilm av de gener som anges under respektive bakteriegrupp, vid 19 °C (n=3), 16 °C (n=12), 13 °C (n=9) och 10 °C (n=9). Felstaplar visar konfidensintervall (95%).

Var i biofilmen befann sig de kväveomsättande bakterierna?

Resultaten med FISH stämde väl överens med sekvenseringarna (ovan). AOB träffades av en probe för *N. europaea/eutropha* klustret (Nse1472) och de flesta anammoxbakterierna träffades med en probe avsedd för *Brocadia anammoxidans* och *Brocadia* sp.40 (Ban162). Genom att utveckla en så kalllad kompetetiv hämmare kunde även den mindre och ännu inte klassificerade subpopulationen av anammoxbakterier detekteras med en annan probe (Bfu613) avsedd för *B. fulgida*. Det bör dock tilläggas att denna mindre subpopulation hade en ganska låg likhet med *B. fulgida* (96%), vilket gör att man måste dra slutsatsen att de var av en annan, ännu inte beskriven art.

Biofilmen hade tillväxt på bärarna till en tjocklek där de i stort sett fyllde hela hålrummen i bärarna, med en kanal i mitten och en struktur liknande ett "lock" mot det omgivande vattnet (figur 5-1b). Genom att använda FISH på tvärsnitt av hela biofilmen från bärarna, kunde den totala fördelningen av AOB, anammoxbakterier och NOB undersökas (se material och metoder för en översikt av metodiken). Anammoxbakterierna stod för merparten av alla bakterier genom hela biofilmen, bortsett från de yttersta skikten nära det omgivande vattnet (figur 6-9). AOB befann sig i ett yttersta tunt skikt i det så kallade "locket", där man kan förvänta sig syresatta förhållanden (figur 6-9C) och i kanalerna genom biofilmen, nära vattenfasen (figur 6-9B). NOB inom *Nitrospira* kunde också detekteras med FISH och var liksom AOB främst lokaliserade nära den yttre vattenfasen (figur 6-9D).





Bakterierna i biofilmen hade avsevärt lägre täthet i de mittre regionerna, med gott om små hålrum mellan bakterierna (figur 6-9). Detta tyder på en lägre aktivitet i dessa regioner, jämfört med den täta biofilmen nära den yttre fasgränsen mot det omgivande vattnet. Detta mönster säkerställdes också genom statistisk digital bildanalys av ett större antal bilder (figur 6-10) där bakterietätheten minskade signifikant (p<0,001, ANOVA) med ökat djup i biofilmen.



Figur 6-10 Täckningsgrad av bakterier i biofilmen, mätt från den yttre fasgränsen mot omgivande vatten och drygt 1 mm in i biofilmen. Data från FISH-CLSM med proberna EUBI-IV för att täcka in samtliga bakterier i biofilmen. Felstaplar visar konfidensintervall (95%, n=17).





Den mindre subpopulationen av anammoxbakterier (Bfu613-positiva) hade en annorlunda fördelning inom biofilmen än den större subpopulationen av typen *Brocadia* sp.40 (Ban162-positiva). De Bfu613-positiva anammoxbakterierna minskade i relativ förekomst med ökat djup i biofilmen (ANOVA, p<0,001) (figur 6-11). Detta tyder på två olika ekotyper av anammoxbakterier inom biofilmen. Då den Bfu613-positiva ekotypen främst förekom nära fasgränsen mot omgivande vatten, nära AOB som förser anammoxbakterierna med nitrit, kan man dra slutsatsen att denna subpopulation hade en betydande inverkan på kväveomsättningen i reaktorn, även om de bara utgjorde en liten del av det totala antalet anammoxbakterier.

Om man summerar resultaten på den mikrobiella samhällsstrukturen kan man säga att det mikrobiella samhället dominerades av anammoxbakterier som utgjorde en hög andel av den totala biomassan i biofilmen, medan AOB var avsevärt färre. De många anammoxbakterierna i biofilmens mittregioner hade dock förmodligen liten påverkan på kväveomsättningen då de befann sig långt ifrån AOB som utgör källan till nitrit. Detta bekräftades av den låga bakterietätheten i dessa regioner som tyder på substratfattiga förhållanden. En mindre och en större subpopulation av anammoxbakterier visar på en diversitet, där lokaliseringen av dem inom biofilmen också antyder att de har olika ekofysiologi. En sänkning av temperaturen hade liten påverkan på vilka bakterier som fanns där, på deras antal och lokalisering i biofilmen. Detta tyder på att biofilmen på bärare i en MBBR erbjuder en väl skyddad miljö för bakterierna. NOB var få i antal, men vi vet att de hade en viss påverkan på kväveomsättningen framför allt vid de lägre temperaturerna. Nitrospira var också lokaliserade nära AOB vilket möjliggjorde överföring av nitrit från AOB i dessa biofilmsregioner.

6.2 Steg II. Minskande kvävehalter

6.2.1 Kväveomsättning

I den här delen av studien studerades deammonifikationsprocessen vid kvävehalter från 500 ner till 45 mg NH₄-N/l vid 13 °C för att stegvis närma sig förhållandena vid rening av huvudströmsvatten. Försöket delades in i sex olika perioder (tabell 6-3 och 6-4). Vid en sänkning av kvävehalten i inkommande avloppsvatten kan kvävebelastningen i reaktorn hållas konstant genom att öka flödet och därmed sänka den hydrauliska uppehållstiden. Alternativt kan kvävebelastningen sänkas genom att hålla en konstant hydraulisk uppehållstid. Kvävebelastningen sänktes gradvis från 0,76±0,03 till 0,28±0,02 gN/m²×d under period I till III. Samtidigt hölls den hydrauliska upphållstiden relativt konstant på ca 3 dagar. Under period IV till VI hölls en konstant kvävebelastning samtidigt som den hydrauliska uppehållstiden sjönk från 3,23±0,00 till 0,85±0,03 dagar. Tanken var att det vid de lägre koncentrationerna av ammonium i inkommande avloppsvatten, som också är mer lika ett huvudströmsvatten, är enklare att jämföra processeffektiviteten om belastningen hålls konstant. Dessutom är lägre hydrauliska uppehållstider en förutsättning för att kunna tillämpa nitritation-anammox för huvudströmmen i fullskala. Den hydrauliska uppehållstiden har liten påverkan på kvarhållandet av biomassan i biofilmsreaktorer, vilket är en av de principiella fördelarna med MBBR-tekniken.

Tabell 6-3 Driftsparametrar under de olika försöksperioderna. NLR=kvävebelastning, NRR=kväveavskiljning, DO=halten löst syre, HRT=hydraulisk uppehållstid.

	Dag	NLR (gN/m²×d)	NRR (gN/m²×d)	N-avskiljn. (%)	рН	DO (mg/l)	Kond. (mS/cm)	HRT (d)
Period I	1–58	0,76±0,03	0,13±0,06	16,6±8	7,9±0,11	0,93±0,08	3,33±0,36	3,26±0,13
Period II	59–100	0,41±0,07	0,11±0,03	28,6±9	7,7±0,06	0,66±0,04	1,61±0,11	3,14±0,16
Period III	101–133	0,28±0,03	0,07±0,02	25,7±6	7,9±0,08	0,64±0,07	1,42±0,09	3,23±0,00
Period IV	134–190	0,28±0,02	0,09±0,04	32,0±13	7,48±0,20	0,82±0,24	0,92±0,15	2,29±0,14
Period V	191–259	0,28±0,02	0,1±0,04	36,4±11	7,15±0,07	0,49±0,06	0,66±0,06	1,59±0,09
Period VI	260–303	0,26±0,02	0,04±0,03	16,8±10	7,04±0,05	0,41±0,04	0,55±0,03	0,85±0,03

Tabell 6-4 Inkommande och utgående koncentrationer av kväveföreningar vid pilotanläggningen.

	Inflöde NH₄-N (mg/l)	NH,-N (mg/l)	Utflöde NO ₂ -N (mg/l)	NO ₂ -N (mg/l)
Period I	496±33	307±69	13±5,7	99±40
Period II	251±13	148±45	6,8±6,0	44±37
Period III	177±6,6	123±13	2,6±2,0	10±8,1
Period IV	128±12	60±22	2,7±1,6	17±14
Period V	86±8,2	32±10	1,6±0,7	22±8,5
Period VI	45±7,9	27±6	1,9±0,3	12±6,5

I början av studien (Period I) var processen instabil och kväveavskiljningsgraden var endast $17\pm8\%$ (0,13 gN/m²×d) (tabell 6-3, figur 6-12). Nitrathalten var hög i reaktorn (99±40 mg/l) vilket tyder på att NOB-aktiviteten var omfattande. Den förhållandevis höga syrehalten på 0,93 mg/l ledde till en hög aerob ammoniumoxidation (AOB) och en hög nitritoxidation (NOB), vilket syns tydligt i figur 6-13 för period I. Under dessa förhållanden kunde följaktligen inte anammoxbakterierna konkurrera framgångsrikt med NOB om den nitrit som producerades av AOB, trots att en del nitrit uppenbarligen inte omsattes då halterna i reaktorn uppgick till 13±5,7 mg/l (figur 6-12).

Under period II sänktes både kvävebelastningen och syrehalten (0,66 mg/l) vilket resulterade i en ökad kväveavskiljningsgrad till 29±9% (tabell 6-3). Den sänkta syrehalten medförde minskad aerob ammoniumoxidation av AOB och minskad nitritoxidation av NOB (figur 6-13). Eftersom anammoxbakterierna kunde konkurrera bättre med NOB om den nitrit som producerades blev processen stabilare och nitrathalten gick ned (figur 6-12b). Kvävebelastningen var dock relativt låg, 0,41±0,07 gN/m²×d, vilket medförde att endast 0,11±0,03 gN/m²×d avskildes. Under period III sänktes kvävebelastningen ned till 0,28±0,02 gN/m²×d med bibehållen syrehalt i reaktorn och kväveavskiljningen sjönk ned till 0,07±0,02 gN/m²×d med en låg nitratproduktion i reaktorn. Under period IV höjdes syrehalten något från 0,64±0,07 till 0,82±0,24 mg/l för att öka AOB-aktiviteten, vilket lyckades, men detta medförde också ökad nitritoxidation av NOB (figur 6-13) och något ökade nitrathalter (figur 6-12b). Under denna period var kväveavskiljningen stabil runt 0,1 gN/m²×d.

Syrehalten sänktes åter under period V för att anpassa den till den lägre koncentrationen ammonium i inkommande avloppsvatten. Kväveavskiljningen var stabil runt 0,1 gN/m²×d trots att den hydrauliska uppehållstiden sänktes från 2,29 till 1,59 dagar, med bibehållen belastning på 0,28 gN/m²×d. Den högsta kväveavskiljningsgraden observerades under denna period; 36±11 % i genomsnitt och 68 % för ett enskilt mättillfälle. En ytterligare sänkning i ammoniumhalten till 45 mg/l med bibehållen belastning (0,26 gN/m²×d) under period VI ledde till en försämring i kväveavskiljningen till endast 0,04±0,03 gN/m²×d (17±10%). Under den här perioden sänktes även den hydrauliska uppehållstiden till 0,85 dagar vilket kan ha bidragit till den minskade kväveavskiljningsgraden. Syrehalten sänktes ytterligare under den här perioden till 0,41±0,04 mg/l vilket medförde sänkt aerob ammoniumoxidation (AOB) såväl som sänkt nitritoxidation (NOB) (figur 6-13). Även om de faktiska mängderna avskilt kväve var låga under period V och VI uppvisade processen en god stabilitet utan stora fluktuationer i koncentrationen av de olika kväveföreningarna (figur 6-12b).

Ett par övergripande observationer kunde göras. I) Nitrit ackumulerades inte under hela försöksperioden (figur 6-12b). Detta visar att allt nitrit som producerades av AOB omhändertogs effektivt av anammoxbakterier, NOB och möjligen också denitrifikationsbakterier. II) Kväveavskiljningen var i stort sett lika stor under period II till V (figur 6-12a), medan den aeroba ammoniakoxidationen (AOB) och nitritoxidationen (NOB) varierade avsevärt mellan dessa perioder med sjunkande kvävehalter och olika syrehalter i reaktorn (figur 6-13). Mätningarna av den potentiella anammoxaktiviteten (SAA) vid 25 °C visade också på små förändringar mellan perioderna och omsättningshastigheter kring 0,3–0,4 gN/m²×d (figur 6-16). Medräknat det stora temperaturberoende som visats för anammoxbakteriernas akti-



Figur 6-12 A) NH₄-N belastning (NLR) och kväveavskiljningshastighet (NRR) vid olika perioder. B) Kvävekoncentration i utflödet från MBBR vid olika perioder.

vitet (en minskning med 2,5 gånger mellan 25 och 13 °C, se figur 6-4) medför detta att den potentiella omsättningshastigheten vid 13 °C låg kring 0,12–0,17 gN/m²×d, vilket var nära de uppmätta avskiljningshastigheterna i reaktorn (figur 6-12). Detta tyder på att anammoxbakterierna var nära sin maximala omsättningshastighet vid de rådande betingelserna i reaktorn under dessa perioder.

Denitrifikationen i reaktorn kunde inte mätas direkt, men den potentiella denitrifikationen, baserat på COD-avskiljningen, kunde uppskattas utifrån antagandet att allt COD används för denitrifikation. Detta är såklart en överskattning eftersom COD också omsätts av aeroba heterotrofa bakterier som vi vet är aktiva i reaktorn (figur 6-15). Baserat på denna skattning



Figur 6-13 Kväveomvandling genom aerob ammoniumoxidation (AOB) och nitritoxidation (NOB) samt potentiell denitrifikation vid olika perioder.



Figur 6-14 Linjärt förhållande mellan konduktivitet och NH_4 -N koncentration i utflödet av reaktorn.

kan vi inte utesluta att denitrifikation periodvis kan ha stått för en del av kväveavskiljningen i reaktorn vid försöken med sänkta halter (figur 6-13), till skillnad från vid försöken med sänkta temperaturer, där motsvarande skattning visade att denitrifikationen var i stort sett försumbar (se tabell 6-1).

Konduktiviteten mättes i reaktorn kontinuerligt med en online-sensor. Ammoniumhalten i utflödet kunde relateras till mätningar av konduktivitet med hög korrelation (figur 6-14), vilket medförde att konduktivitetsmätningarna kunde användas som ett enkelt redskap för processövervakning.

6.2.2 Mikrobiell aktivitet

Aktivitet hos olika grupper av mikroorganismer

OUR-resultaten visade att AOB var de dominerande syrekonsumenterna bland de olika grupperna av syreförbrukande mikroorganismer (figur 6-15). Den genomsnittliga potentiella AOB aktiviteten under hela driftsstudien var 2,7±0,8 g O_2/m^2 d. Den maximala AOB aktiviteten mätt som OUR på biofilmbärarna var 3,9 g O_2/m^2 d under period II. OUR resultaten visade också att NOB under alla perioder var etablerade i biofilmen, med en tendens till ökande potentiell aktivitet under period II till VI.



Figur 6-15 Potentiell aktivitet för olika grupper av syreförbrukande mikroorganismer mätt som OUR för bärarna i reaktorn. Felstaplar visar standardavvikelse.

Biofilmens biomassa i MBBR-reaktorn var cirka 7±0,6 g/l (VSS) under hela försöket. Detta värde var mycket högre än det värde som rapporterats av (Gut et al., 2006), som var 2,3 g/l. Däremot var den genomsnittliga potentiella aktiviteten hos anammoxbakterierna (SAA) förhållandevis låg (0,3 g N/m2d). Den potentiella anammoxaktiviteten minskade markant under period I för att sedan vara stabil med en liten minskning under de påföljande perioderna (figur 6-16). Den lägsta medelaktiviteten observerades i period VI (0,25 g N/m²d) då substrathalterna var lägst (45 mg/l). Orsaken till den kraftigt minskade aktiviteten i period I är ännu inte klarlagd. Mängden anammoxbakterier var i stort sett oförändrad i biofilmen från period I till period VI (figur 6-19), vilket tyder på att det var anammoxbakteriernas fysiologiska status, snarare än antal som förändrades. Under period I var reaktorhalterna av ammonium höga (figur 6-12b). AOB-aktiviteten i reaktorn var uppenbarligen otillräcklig för att oxidera mer ammonium. Den aeroba oxidationen av ammonium sänker också pH (tabell 1-1). Den otillräckliga AOB oxidationen av ammonium ledde därmed till förhållandevis högt pH i reaktorn (7,9-8,2) under period I. Tillsammans ledde de förhöjda pH värdena och de höga ammoniumhalterna till höga halter fri ammoniak (FA). Under de första 20 dagarna var halterna FA 8–15 mg/l för att under de resterande dagarna i period I ligga på 3–7 mg/l. Halter av FA kring 10 mg/l kan leda till kraftigt minskad anammoxaktivitet (Jaroszynski *et al.*, 2012) och halter motsvarande 16 mg/l har lett till systemförsämringar i reaktorer med nitritation-anammox (Li *et al.*, 2012). Det är därför inte orimligt att anta att halterna av FA hämmade anammoxbakterierna vilket ledde till en bestående minskning i SAA.

Den potentiella syreförbrukningen av AOB, mätt med aktivitetstest, var förhållandevis låg under period I (figur 6-15), vilket förmodligen medverkade till svårigheterna att oxidera tillräckligt med ammonium under perioden. Det är i retrospektiv oklart om högre syrehalter i reaktorn hade varit att föredra. Även om halterna ammonium i reaktorn skulle kunna ha minskats av AOB och därmed sänkt halterna FA, hade man också riskerat förhöjda syrehalter i biofilmen vilket också hämmar anammoxbakterierna. Hämningar av anammoxbakterier via en sänkt syreförbrukningskapacitet för AOB har tidigare visats för biomassa i reaktorer med nitritation-anammox (Joss *et al.*, 2011).



Figur 6-16 Potentiell aktivitet för anammoxbakterier (SAA) och denitrifikationsbakterier (NUR) för bärarna i reaktorn. Felstaplar visar standardavvikelse (SAA).

Vid användning av MBBR vid låg temperatur är en av strategierna att skapa förutsättningar för selektion av AOB framför NOB. Detta var den största utmananingen vid dessa försök. Beroende på tillväxttakten kan NOB konkurrera ut AOB under 15 °C (Hellinga *et al.*, 1998). Ett sätt att undertrycka NOB kan vara att begränsa syrekoncentrationen (se kapitel 3.2). En uppskattning av den potentiella kväveomsättningen baserad på aktivitetstester (ekv. 7 & 8) visade att NOB-aktiviteten ökade gradvis och var åtminstone lika hög som AOB-aktiviteten från period III till period VI (figur 6-17). Uppenbarligen kunde inte syrehalterna i reaktorn, under 1 mg/l för alla perioder, undertrycka NOB. Inte ens vid de mycket låga syrehalterna i period VI på 0,4 mg O_2/l kunde NOB-aktiviteten undertryckas i tillräcklig utsträckning. Den potentiella kväveomsättningen av NOB var snarare som högst vid dessa betingelser. Detta tyder på att de aktiva NOB tillhörde *Nitrospira* sp. som visats konkurrera framgångsrikt med AOB om syre vid låga syrehalter genom sin höga affinitet för syre (Wett *et al.*, 2012). Sammantaget visade dessa aktivitetsförsök och driftsdata att låga syrehalter i reaktorn vid låga temperaturer (13 °C) inte räckte till för att undertrycka NOB i denna MBBR. För att lyckas med detta krävs förmodligen andra tillvägagångssätt som till exempel intermittenta luftningsstrategier (Regmi *et al.*, 2014; Wett *et al.*, 2012), och/eller uppdelning av reaktorns biomassa med aeroba mikroorganismer i suspenderad fas och anoxiska mikroorganismer i bärarnas biofilm (Malovanyy *et al.*, 2014b; Veuillet *et al.*, 2014). Försök med dessa strategier pågår vid KTHs pilotanläggningar i Hammarby Sjöstadsverket.



Figur 6-17 Bedömning av potentiell kväveomsättning för AOB, NOB, anammoxbakterier och denitrifikationsbakterier baserat på mätningar av potentiell aktivitet (OUR, SAA, NUR).

6.2.3 Mikrobiell samhällsstruktur vid sjunkande halter

Vilka var bakterierna?

Under denna delstudie användes ett annat tillvägagångssätt än vid studien av sjunkande temperaturer. Istället för att konstruera klonbibliotek och sekvensera gener specifika för AOB och anammoxbakterier användes Next Generation Sequencing (NGS) baserat på plattformen för Illumina MiSeq på gener för 16S rRNA. Detta möjliggjorde mätningar av den total diversiteten i proverna med ett stort djup (högt antal sekvenser) per prov. På så vis kan man eliminera den slumpfaktor som spelar in när man plockar kloner för sekvensering och få ett säkert underlag. Totalt erhölls 22 000–51 000 sekvenser per prov, efter att ha filtrerat bort potentiellt felaktiga sekvenser enligt ett nyligen publicerat protokoll (Kozich *et al.*, 2013).



Figur 6-18 Fördelningen av övergripande släktmässiga grupper (fyla) av bakterier i biofilmen baserat på NGS (Illumina MiSeq). Fyla med en relativ sekvensförekomst >1% visas. Prover är från perioderna I, III, V och VI för att täcka in de olika halterna av kväve i reaktorns tillflöde.

Resultaten baserade på fylum (den mest övergripande släktmässiga grupperingen av bakterier) visade att *Planctomycetes* var dominerande (60–63%), med höga andelar sekvenser inom *Chloroflexi* (12–14%) och *Proteobacteria* (11–12%). Övriga fylum hade lägre relativ sekvensförekomst (<5%) (figur 6-18).

Inom Planctomycetes var anammoxbakterierna inom Brocadia helt dominerande. NGS med Illumina MiSeq kunde dock inte påvisa någon diversitet inom Brocadia sp. där en sekvenstyp (med 97 % likhet) var helt dominerande i samtliga prov och utgjorde 50-57% av samtliga sekvenser. Att Brocadia dominerar i samtliga prov är intressant då denna grupp anses vara en ekologisk r-strateg med konkurrensmässiga fördelar vid höga substrathalter (van der Star et al., 2008). Trots de stegvis sjunkande halterna av ammonium från 500 till 45 mg N/l, var uppenbarligen bakterier inom Brocadia tillräckligt konkurrenskraftiga för att helt dominera populationen av anammoxbakterier. Kanske har denna bakteriegrupp en bredare ekofysiologi än vad som tidigare antagits. Det faktum att Brocadia också dominerat anammoxpopulationen i en annan nyligen publicerad studie på nitritation-anammox vid låga kvävehalter och låga temperaturer (Gilbert et al., 2014b) tyder på att så kan vara fallet. En alternativ förklaringsmodell skulle bygga på att reaktorförhållandena med låga temperaturer och låga substrathalter inte medgav möjligheter för tillväxt av anammoxbakterier. Detta skulle leda till att enbart de anammoxbakterier som sedan tidigare etablerat sig i biofilmen förblev där, då de befann sig i en skyddad miljö en bit in i bärarnas biofilm.

Bakterier inom *Chloroflexi* har ofta detekterats tillsammans med anammoxbakterier och AOB i system med nitritation-anammox (Cho *et al.*, 2010). Deras roll i dessa system är ännu inte klarlagd. Många *Chloroflexi* är filamentösa och kan ha en viktig funktion för att strukturellt hålla ihop biofilm och granuler (Cho *et al.*, 2010). Filamentösa *Chloroflexi* har även föreslagits leva i symbios med anammoxbakterierna, där de hjälper till att skapa anaeroba förhållanden (Zhang *et al.*, 2012). Studier har också visat att filamentösa *Chloroflexi* kan tillgodogöra sig metaboliska biprodukter från AOB (Okabe *et al.*, 2005) och anammoxbakterier (Kindaichi *et al.*, 2012).

Inom *Proteobacteria* återfanns en framför allt sekvenser inom *Beta-Proteobacteria* (4–5%), *Alfa-Proteobacteria* (2–3%) och *Gamma-Proteobacteria* (2–3%). AOB inom *Beta-Proteobacteria* utgjorde en liten andel (0,2–0,3%) av alla sekvenser. En viss diversitet inom AOB, med totalt fyra sekvenstyper (baserade på 97% likhet) kunde urskiljas, men precis som för anammoxbakterierna var en sekvenstyp helt dominerande i alla fyra prov. Sekvenserna tillhörande *Nitrobacter* inom *Alfa-Proteobacteria* var väldig få (0,02–0,03%).

NOB inom *Nitrospira* var också få och utgjorde 0,1–0,2% av samtliga sekvenser där tre sekvenstyper kunde urskiljas. Det var dock oklart om alla dessa sekvenstyper kom från bakterier inom *Nitrospira* som kunde oxidera nitrit under rådande förhållanden.

Hur många var de kväveomsättande mikroorganismerna?

Även om NGS ger en god överblick över den totala sammansättningen av bakterier i proverna, ger metoden inte precisa kvantitativa resultat. Därför användes qPCR för att följa dynamiken av de olika kväveomsättande bakterierna i biofilmen vid sjunkande kvävehalter i rektorns tillflöde (figur 6-19).

Anammoxbakterierna, AOB och NOB inom *Nitrobacter* och *Nitrospira* visar på liknande relativa förekomster av genkopior vid alla studerade perioder, Detta tyder på att de minskande kvävehalterna i reaktorns tillflöde hade liten påverkan på konkurrensförhållandena mellan dessa olika kväveomsättande bakterier. Precis som i den föregående studien med låga temperaturer dominerade anammoxbakterierna biomassan med avsevärt färre AOB och ännu färre NOB. De observerade variationerna i kväveomsättning i reaktorn, till exempel aerob ammoniumoxidation och nitritoxidation (figur



Figur 6-19 Förekomst av samtliga bakterier (Uni), anammoxbakterier, AOB, Nitrobacter och Nitrospira mätt med qPCR. Figuren visar kopieantalet per m² av biofilm av de gener som anges under respektive bakteriegrupp. De streckade linjerna avgränsar de olika perioderna I-VI. Felstaplar visar konfidensintervall (95%).

6-13) avspeglade sig inte i tydliga skillnader i förekomst av AOB och NOB. Liknande observationer av stabila förekomster av AOB och NOB men stora variationer i deras påverkan på kväveomsättningen har tidigare gjorts i andra biofilmsystem (De Clippeleir *et al.*, 2013). En tolkning av dessa resultat är att biofilmer erbjuder miljöer där även temporärt passiva bakterierna är väl skyddade, till skillnad från slambaserade system där de spolas ut från reaktorn om de inte tillväxer. Detta är en egenskap som å ena sidan är önskvärd för att behålla de långsamväxande anammoxbakterierna och AOB i reaktorn även vid ogynnsamma förhållanden, men som å andra sidan gör det svårt att bli av med oönskade NOB från reaktorn när de väl etablerat sig i biofilmen. För att förhindra oönskad nitritoxidation blir det därmed helt avgörande att hitta driftsförhållanden där NOB-aktiviteten kontinuerligt kan hållas nere, snarare än att sträva efter förhållanden där NOB kan sköljas ur systemet, vilket baserat på resonemangen ovan blir svårt att åstadkomma.

7 Kväverening med anammox i huvudströmmen i framtiden?

Kväverening med anammox har potential att lösa de samtidiga behoven av ökad kväverening och minskad klimatpåverkan och energiförbrukning vid avloppsreningsverk. Jämfört med konventionell kväverening möjliggör nitritation-anammox också ökat omhändertagande av organiskt material för biogasproduktion (eller andra produkter) och minskade ekonomiska driftskostnader. För behandling av rejektvatten är anammoxprocesser idag en etablerad process där det finns ett gott underlag för dimensionering och styrning. De stora potentiella vinsterna erhålls dock vid behandling av huvudströmmen. Sedan uppstarten av detta SVU-projekt 2011 har intensiv forskningen bedrivits inom projektet och världen över kring anammox vid huvudströmsförhållanden på avloppsreningsverk. Detta har fört processen mycket längre mot en framgångsrik tillämpning. Man vet idag att det går att behålla biomassan med långsamväxande autotrofa anammoxbakterier och AOB i kalla och substratfattiga vatten i reaktorer baserade på granuler eller bärare (MBBR). Man vet också att måttliga, men rimliga avskiljningshastigheter kan uppnås vid låga temperaturer. En summering av forskningen pekar på att enstegsprocesser med AOB och anammoxbakterier i samma reaktor verkar vara att föredra. Den kanske största utmaningen består i att styra processen för att undvika aerob nitritoxidation av NOB. Här ligger idag mycket av forskningsfokus. Genom ökad ekofysiologisk kunskap om olika NOB, AOB och anammoxbakterier pågår en kontinuerlig utveckling av förståelsen kring vid vilka driftbetingelser en optimal nitritation-anammox process kan bedrivas. Nya lösningar baserade på on-line styrning med bl.a. intermittent luftning och noggrann kontroll av reaktorns halter av ammonium och nitrit/nitrat har lanserats och i vissa fall testats med framgångsrika resultat. Likaså har kombinationen av AOB i suspenderad biomassa och anammoxbakterier i biofilm visat lovande resultat med avseende på bland annat möjligheterna att undvika aerob nitritoxidation.

Antalet studier med riktigt avloppsvatten är dock ännu mycket få. Man vet lite om hur processen påverkas av de årliga variationerna i sammansättning och temperatur. En ytterligare faktor att ta med i beräkningarna är hur driftsbetingelserna påverkar emissioner av växthusgaser (fr.a. lustgas). Anammoxbakterier släpper i princip inte ut lustgas och enstegsprocesser med nitritation-anammox för rejektvattenbehandling har uppvisat låga till måttliga emissioner. Ännu vet man dock inte mycket om hur de annorlunda förhållandena vid huvudströmsbehandling påverkar dessa emissioner.

Sammantaget är det idag för tidigt att ge underlag för dimensionering och styrning av en välfungerande anläggning för nitritation-anammox i huvudströmmen. Men med tanke på de stora forskningsframsteg som skett de senaste åren och de nationella och internationella satsningar som sker idag kan man räkna med att fullskaleanläggningar kommer att byggas inom en snar framtid.

Slutsatser

Stabil kväveavskiljning med deammonifikation i en MBBR kan uppnås även vid låga temperaturer och låga inkommande kvävekoncentrationer, med bibehållen biomassa. Men för att få betydande kväveavskiljning är undertryckande av nitritoxiderande bakterier (NOB) fortfarande en utmaning. Här spelar konkurrensen mellan AOB och NOB om syre en avgörande roll.

Särskilt följande slutsatser kan härledas från studierna med minskade temperaturer:

- Stabil kväveavskiljning kunde erhållas vid låga temperaturer (19–13 °C) och höga inkommande ammoniumkoncentrationer (850–1000 mg/l). Vid 19 °C (belastning 2–3 g N/m² × d) var avskiljningsgraden 72 %. Vid 16 och 13 °C (belastning 1 g N/m² × d) var avskiljningsgraden 76 respektive 53 %.
- En ytterligare sänkning av temperaturen till 10 °C (belastning 1 g N/m²×d) ledde till en instabil process med låg avskiljningsgrad (16%). Förhöjda halter av nitrit och fri ammoniak i reaktorn hämmande processen vid de förhållandevis höga kvävehalterna i rejektvattnet.
- Anammoxbakterier spelade en dominerande roll för kväveavskiljningen under hela driftsstudien. Medelaktiviteten hos anammoxbakterierna minskade från 2,3 g N/m² × d vid 19 °C till 1,5 g N/m² × d vid 10 °C. Den genomsnittliga potentiella anammoxaktivitet var därmed jämförelsevis hög under hela försöket med minskade temperaturer.
- Minskad temperatur påverkade inte den dominerande rollen för AOB bland syrekonsumenter. Ökad NOB-aktivitet observerades vid vissa tillfällen, men den genomsnittliga potentiella NOB-aktiviteten förändrades inte med sjunkande temperatur.
- Utvärderingen av anammoxbakteriernas aktivitet vid olika temperaturer visade en kraftigt minskad aktivitet med sänkt temperatur enligt ett linjärt förhållande mellan 25 °C och 5 °C.
- Det mikrobiella samhället i biofilmen dominerades av anammoxbakterier som utgjorde en hög andel av den totala biomassan i biofilmen. Minst två populationer av anammoxbakterier kunde detekteras, där den mindre populationen hade en annan lokalisering i biofilmen, vilket tydde på olika ekofysiologi.
- AOB var avsevärt färre än anammoxbakterierna och främst lokaliserade till tunna skikt nära biofilmens fasgräns mot omgivande vatten där man kan förvänta syresatta förhållanden.
- NOB inom såväl *Nitrospira* som *Nitrobacter* hade etablerat sig i biofilmen, men var relativt få. De hade trots detta periodvis viss påverkan på kväveomsättningen i reaktorn.
- Sänkningarna av temperaturen hade liten inverkan på den mikrobiella samhällsstrukturen, vilket tyder på att bärarna i en MBBR erbjuder väl skyddade förhållanden för bakterierna i biofilmen.

• En stabil kväveavskiljning kunde uppnås vid 13–16°C genom att noggrant anpassa syrehalten så att aktiviteten hos AOB, anammoxbakterier och NOB hölls i balans. Vid den lägsta temperaturen (10°C) räckte styrningen av syrehalten däremot inte till för att balansera processen.

Särskilt följande slutsatser kan härledas från studier med minskade kvävehalter:

- Kväveavskiljningen var låg, men stabil vid de stegvis sänkta inkommande kvävekoncentrationerna och den låga temperaturen (13 °C).
- Kväveavskiljningen i reaktorn var nära anammoxbakteriernas potentiella avskiljning, baserat på aktivitetstest, vilket gjorde det svårt att öka avskiljningshastigheten.
- NOB stod för en stor del av kväveomsättning i reaktorn.
- Genom att styra syrehalterna i reaktorn kunde aktiviteten av AOB och NOB regleras. Men de låga syrehalterna i reaktorn (0,4 mg/l som lägst) var inte tillräckliga för att minska aktiviteten för NOB och förhindra en avsevärd nitritoxidation.
- Anammoxbakterierna dominerade det mikrobiella samhället i antal, med avsevärt färre AOB. NOB inom såväl *Nitrospira* som *Nitrobacter* förekom i samtliga biofilmsprov, men utgjorde en liten andel av biomassan. Trots detta hade de stor påverkar på kväveomsättningen.
- Bakterier inom *Chloroflexi* var alltid närvarande i biofilmen i hög relativ förekomst. Deras betydelse för de kväveomsättande mikroorganismerna är ännu oklar, men deras höga förekomst i dessa och flera andra studier med nitritation-anammox tyder på att de har definierade funktioner i dessa samhällen.
- Den stegvisa sänkningen av kvävehalter hade liten påverkan på biofilmens mikrobiella samhällsstruktur, vilket återigen visade att bärarna i en MBBR erbjuder välskyddade miljöer för bakterierna i biofilmen.

Referenser

Ahn, Y.H. & Choi, H.C. 2006. Autotrophic nitrogen removal from sludge digester liquids in upflow sludge bed reactor with external aeration. *Process Biochem*, 41(9), 1945–1950.

Almstrand, R., Daims, H., Persson, F., Sörensson, F. & Hermansson, M. 2013. New methods for analysis of spatial distribution and coaggregation of microbial populations in complex biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 79(19), 5978–5987.

Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B. & Srinath, E.G. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed*, 48(5), 835–852.

Ballinger, S.J., Head, I.M., Curtis, T.P. & Godley, A.R. 2002. The effect of C/N ratio on ammonia oxidising bacteria community structure in a laboratory nitrification-denitrification reactor. Water Sci Technol, 46(1–2), 543–550.

Boesch, D., Hecky, R., O'Melia, C., Schindler, D. & Seitzinger, S. 2005. *Expert evaluation of the eutrophication of the seas surrounding Sweden*. Naturvårdsverket.

Boesch, D.F., Carstensen, J., Paerl, H.W., Skjoldal, H.R. & Voss, M. 2008. Eutrophication of the Seas along Sweden's West Coast. Naturvårds-verket.

Bollmann, A., Bar-Gilissen, M.J. & Laanbroek, H.J. 2002. Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 68(10), 4751–4757.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J.A., Smith, G. & Knight, R. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J*, Mar 8, 1–4.

Carrera, J., Vicent, T. & Lafuente, J. 2004. Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochem*, 39(12), 2035–2041.

Cho, S., Fujii, N., Lee, T. & Okabe, S. 2011. Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor. *Bioresource Technol*, 102(2), 652–659.

Cho, S., Takahashi, Y., Fujii, N., Yamada, Y., Satoh, H. & Okabe, S. 2010. Nitrogen removal performance and microbial community analysis of an anaerobic up-flow granular bed anammox reactor. *Chemosphere*, 78(9), 1129–1135.

Daims, H., Maixner, F., Lucker, S., Stoecker, K., Hace, K. & Wagner, M. 2006. Ecophysiology and niche differentiation of Nitrospira-like bacteria, the key nitrite oxidizers in wastewater treatment plants. *Water Sci Technol*, 54(1), 21–27.

Dapena-Mora, A., Fernandez, I., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Mendez, R. & Jetten, M.S.M. 2007. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme Microb Technol*, 40(4), 859–865.

De Clippeleir, H., Vlaeminck, S.E., De Wilde, F., Daeninck, K., Mosquera, M., Boeckx, P., Verstraete, W. & Boon, N. 2013. One-stage partial nitritation/anammox at 15 degrees C on pretreated sewage: feasibility demonstration at lab-scale. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(23), 10199– 10210.

De Clippeleir, H., Yan, X.G., Verstraete, W. & Vlaeminck, S.E. 2011. OLAND is feasible to treat sewage-like nitrogen concentrations at low hydraulic residence times. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90(4), 1537–1545.

Desloover, J., De Clippeleir, H., Boeckx, P., Du Laing, G., Colsen, J., Verstraete, W. & Vlaeminck, S.E. 2011. Floc-based sequential partial nitritation and anammox at full scale with contrasting N(2)O emissions. *Water Res*, 45(9), 2811–2821.

Devol, A.H. 2003. Nitrogen cycle: Solution to a marine mystery. *Nature*, 422(6932), 575–576.

Dosta, J., Fernandez, I., Vazquez-Padin, J.R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Mata-Alvarez, J. & Mendez, R. 2008. Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *J Hazard Mater*, 154(1– 3), 688–693.

Gieseke, A., Nielsen, J.L., Amann, R., Nielsen, P.H. & de Beer, D. 2005. In situ substrate conversion and assimilation by nitrifying bacteria in a model biofilm. *Environ Microbiol*, 7(9), 1392–1404.

Gilbert, E.M., Agrawal, S., Brunner, F., Schwartz, T., Horn, H. & Lackner, S. 2014a. Response of different nitrospira species to anoxic periods depends on operational do. *Environ Sci Technol*, 48(5), 2934–2941.

Gilbert, E.M., Agrawal, S., Karst, S.M., Horn, H., Nielsen, P.H. & Lackner, S. 2014b. Low Temperature Partial Nitritation/Anammox in a Moving Bed Biofilm Reactor Treating Low Strength Wastewater. *Environ Sci Technol*, 48(15), 8784–8792.

Granéli, E. 2004. Giftiga alger-ett globalt problem. Havsutsikt, 2, 12–13.

Gustavsson, D.J., Persson, F. & Jansen, J.L. 2014. Manammox – mainstream anammox at Sjölunda WWTP. *IWA World Water Congress and Exhibition*, September 21–26, 2014, Lisbon, Portugal.

Gustavsson, D.J.I., Tumlin, S. 2013. Carbon footprints of Scandinavian wastewater treatment plants. *Water Sci Technol*, 68(4), 887–893.

Gut, L., Plaza, E., Trela, J., Hultman, B. & Bosander, J. 2006. Combined partial nitritation/Anammox system for treatment of digester supernatant. *Water Sci Technol*, 53(12), 149–159.

Guven, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M.C., Maas, B., van de Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M. & Schmidt, I. 2005. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 71(2), 1066–1071.

Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M. & Heijnen, J.J. 1998. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci Technol*, 37(9), 135–142.

Hendrickx, T.L., Wang, Y., Kampman, C., Zeeman, G., Temmink, H. & Buisman, C.J. 2012. Autotrophic nitrogen removal from low strength waste water at low temperature. *Water Res*, 46(7), 2187–2193.

Hendrickx, T.L.G., Kampman, C., Zeeman, G., Temmink, H., Hu, Z., Kartal, B. & Buisman, C.J.N. 2014. High specific activity for anammox bacteria enriched from activated sludge at 10 °C. *Bioresource Technol*, 163, 214–221.

Henze, M., Harremoes, P., La Cour Jansen, J. & Arvin, E. 2002. *Waste-water treatment: biological and chemical processes. . 3rd ed.* Springer Verlag, Berlin, Germany.

Hu, Z.Y., Lotti, T., de Kreuk, M., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M., Kruit, J., Jetten, M.S.M. & Kartal, B. 2013. Nitrogen Removal by a Nitritation-Anammox Bioreactor at Low Temperature. *Appl Environ Microbiol*, 79(8), 2807–2812.

Isaka, K., Date, Y., Kimura, Y., Sumino, T. & Tsuneda, S. 2008. Nitrogen removal performance using anaerobic ammonium oxidation at low temperatures. *FEMS Microbiol Lett*, 282(1), 32–38.

Jaroszynski, L.W., Cicek, N., Sparling, R. & Oleszkiewicz, J.A. 2012. Impact of free ammonia on anammox rates (anoxic ammonium oxidation) in a moving bed biofilm reactor. *Chemosphere*, 88(2), 188–195.

Joss, A., Derlon, N., Cyprien, C., Burger, S., Szivak, I., Traber, J., Siegrist, H. & Morgenroth, E. 2011. Combined nitritation-anammox: advances in understanding process stability. *Environ Sci Technol*, 45(22), 9735–9742.

Kampschreur, M.J., Temmink, H., Kleerebezem, R., Jetten, M.S.M. & Mark Loosdrecht, C.M.v. 2009. Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Res*, 43(17), 4093–4103.

Kartal, B., Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Schalk, J., den Camp, H.J.M.O., Jetten, M.S.M. & Strous, M. 2007. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ Microbiol*, 9(3), 635–642.

Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., Op den Camp, H.J.M., Harhangi, H.R., Janssen-Megens,

E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H.G., Keltjens, J.T., Jetten, M.S.M. & Strous, M. 2011. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, 479(7371), 127–130.

Kim, D.J. & Kim, S.H. 2006. Effect of nitrite concentration on the distribution and competition of nitrite-oxidizing bacteria in nitratation reactor systems and their kinetic characteristics. *Water Res*, 40(5), 887–894.

Kindaichi, T., Yuri, S., Ozaki, N. & Ohashi, A. 2012. Ecophysiological role and function of uncultured Chloroflexi in an anammox reactor. *Water Sci Technol*, 66(12), 2556–2561.

Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. & Schloss, P.D. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*, 79(17), 5112–5120.

Lackner, S., Gilbert, E.M., Vlaeminck, S.E., Joss, A., Horn, H. & van Loosdrecht, M.C. 2014. Full-scale partial nitritation/anammox experiences--an application survey. *Water Res*, 55, 292–303.

Lackner, S. & Horn, H. 2013. Comparing the performance and operation stability of an SBR and MBBR for single-stage nitritation-anammox treating wastewater with high organic load. *Environ Technol*, 34(9–12), 1319–1328.

Li, S., Chen, Y.P., Li, C., Guo, J.S., Fang, F. & Gao, X. 2012. Influence of free ammonia on completely autotrophic nitrogen removal over nitrite (CANON) process. *Appl Biochem Biotechnol*, 167(4), 694–704.

Liu, T., Li, D., Zeng, H., Li, X., Zeng, T., Chang, X., Cai, Y. & Zhang, J. 2012. Biodiversity and quantification of functional bacteria in completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite (CANON) process. *Bioresour Technol*, 118, 399–406.

Lotti, T., Kleerebezem, R., Hu, Z., Kartal, B., Jetten, M.S. & van Loosdrecht, M.C. 2014a. Simultaneous partial nitritation and anammox at low temperature with granular sludge. *Water Res*, 66C, 111–121.

Lotti, T., Kleerebezem, R., van Erp Taalman Kip, C., Hendrickx, T.L., Kruit, J., Hoekstra, M. & van Loosdrecht, M.C. 2014b. Anammox growth on pretreated municipal wastewater. *Environ Sci Technol*, 48(14), 7874–7880.

Lotti, T., Kleerebezem, R. & van Loosdrecht, M.C. 2014c. Effect of temperature change on anammox activity. *Biotechnol Bioeng*, 112(1), 98–103.

Lotti, T., Kleerebezem, R., Hu, Z., Kartal, B., de Kreuk, M.K., van Erp Taalman Kip, C., Kruit, J., Hendrickx, T.L. & van Loosdrecht, M.C. 2014d. Pilot-scale evaluation of anammox-based mainstream nitrogen removal from municipal wastewater. *Environ Technol*, DOI:10.1080/0959 3330.2014.982722.

Ma, B., Peng, Y., Zhang, S., Wang, J., Gan, Y., Chang, J., Wang, S., Wang, S. & Zhu, G. 2013. Performance of anammox UASB reactor treating

low strength wastewater under moderate and low temperatures. *Bioresour Technol*, 129, 606–611.

Ma, B., Zhang, S., Zhang, L., Yi, P., Wang, J., Wang, S. & Peng, Y. 2011. The feasibility of using a two-stage autotrophic nitrogen removal process to treat sewage. *Bioresource Technol*, 102(17), 8331–8334.

Malovanyy, A. 2014. Ammonium removal from municipal wastewater with application of ion exchange and partial nitritation/Anammox process. Licenciate Thesis, TRITA-LWR LIC-2014:01, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.

Malovanyy, A., Plaza, E., Trela, J. & Malovanyy, M. 2014a. Combination of ion exchange and partial nitritation/Anammox process for ammonium removal from mainstream municipal wastewater. *Water Sci Technol*, 70(1), 144–151.

Malovanyy, A., Trela, J. & Plaza, E. 2014b. Competition between AOB and NOB in deammonification MBBR treating mainstream wastewater. *IWA Specialist Conference, Global Challenges: Sustainable Wastewater Treatment and Resource Recovery*, October 26–30, 2014, Katmandu,Nepal.

Malovanyy, A., Yang, J., Trela, J. & Plaza, E. 2014c. Combination of UASB reactor and partial nitritation/Anammox MBBR for municipal wastewater treatment. Accepted for publication in *Bioresource Technol*.

McQuarrie, J.P. & Boltz, J.P. 2011. Moving bed biofilm reactor technology: process applications, design, and performance. *Water Environ Res*, 83(6), 560–575.

Mulder, A. 1989. Anoxic ammonium oxidation of wastewater, (Ed.) N. Gist-Brocades N.V. Netherlands, pp. 11.

Mulder, A. 2003. The quest for sustainable nitrogen removal technologies. *Water Sci Technol*, 48(1), 67–75.

Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A. & Kuenen, J.G. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol*, 16(3), 177–183.

Naturvårdsverket. 1994. Kungörelse med föreskrifter om rening av avloppsvatten från tätbebyggelse.

Naturvårdsverket. 2009. Sveriges åtanganden i Baltic Sea Action Plan - förslag till nationell åtgärdsplan. 5985.

Okabe, S., Kindaichi, T. & Ito, T. 2005. Fate of 14C-labeled microbial products derived from nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying bio-films. *Appl Environ Microbiol*, 71(7), 3987–3994.

Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H. & Okabe, S. 2011. Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium *'Candidatus* Brocadia sinica'. *Microbiology*, 157, 1706–1713.

Park, H., Rosenthal, A., Jezek, R., Ramalingam, K., Fillos, J. & Chandran, K. 2010. Impact of inocula and growth mode on the molecular microbial

ecology of anaerobic ammonia oxidation (anammox) bioreactor communities. *Water Res*, 44(17), 5005–5013.

Perez, J., Lotti, T., Kleerebezem, R., Picioreanu, C. & van Loosdrecht, M.C. 2014. Outcompeting nitrite-oxidizing bacteria in single-stage nitrogen removal in sewage treatment plants: A model-based study. *Water Res*, 66C, 208–218.

Persson, F., Sultana, R., Suarez, M., Hermansson, M., Plaza, E. & Wilén, B.M. 2014. Structure and composition of biofilm communities in a moving bed biofilm reactor for nitritation-anammox at low temperatures. *Bioresour Technol*, 154, 267–273.

Persson, F., Sultana, R., Wilén, B.-M., Hermansson, M., Sörensson, F., Matsson, A. & Plaza, E. 2013. One-stage nitritation - anaerobic ammonium oxidation at low temperatures in a moving bed biofilm reactor. *IWA Holistic Sludge Management conference*, 2013 May 6–8 Västerås, Sweden.

Plaza, E., Stridh, S., Örnmark, J., Kanders, L. & Trela, J. 2011. Swedish experinces of the deammonification process in a biofilm system. *Proceedings of the WEF-IWA Conference on Nutrient Recovery and Management,* Miami, USA, January 9–19.

Regmi, P., Miller, M.W., Holgate, B., Bunce, R., Park, H., Chandran, K., Wett, B., Murthy, S. & Bott, C.B. 2014. Control of aeration, aerobic SRT and COD input for mainstream nitritation/denitritation. *Water Res*, 57, 162–171.

Rysgaard, S., Glud, R.N., Risgaard-Petersen, N. & Dalsgaard, T. 2004. Denitrification and anammox activity in Arctic marine sediments. *Limnol Oceanogr*, 49(5), 1493–1502.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. & Weber, C.F. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75(23), 7537–7541.

Seyfried, C.F., Hippen, A., Helmer, C., Kunst, S. & Rosenwinkel, K.H. 2001. One-stage deammonification: nitrogen elimination at low costs. *Water Sci Technol: Water Supply* 1(1), 71–80.

Siegrist, H., Salzgeber, D., Eugster, J. & Joss, A. 2008. Anammox brings WWTP closer to energy autarky due to increased biogas production and reduced aeration energy for N-removal. *Water Sci Technol*, 57(3), 383–388.

Sliekers, A.O., Third, K.A., Abma, W., Kuenen, J.G. & Jetten, M.S.M. 2003. CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiol Lett*, 218(2), 339–344.

Smith, C.J. & Osborn, A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 67(1), 6–20. Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G. & Jetten, M.S.M. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400(6743), 446–449.

Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. & Jetten, M.S.M. 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50(5), 589–596.

Sultana, R., Plaza, E., Persson, F. & Wilen, B.M. 2014. Partial nitritation/ anammox with moderate to low nitrogen concentrations at 13 °C. *Manuscript*.

Surmacz-Górska, J., Gernaey, K., Demuynck, C., Vanrolleghem, P. & Verstreate, W. 1996. Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Res*, 30, 1228–1236.

Trela, J., Plaza, E., Gut, L., Szatkowska, B., Hultman, B. & Bosander, J. 2005. Deammonifikation, en ny process för behandling av avloppsströmmar med hög kvävehalt. VA-Forsk rapport. 2005-14.

Trela, J., Malovanyy, A., Yang, J., Plaza, E., Trojanowicz, K., Sultana, R., Wilén, B-M., Persson, F. & Baresel, C. 2014. Deammonification Synthesis report 2014. Nr B2210, Oct 2014, Swedish Environmental Research Institute (IVL).

Tumlin, S. & Mattsson, A. 2013. Influent loads-observed trends at large wastewater treatment plants in Sweden. *NORDIWA, the 13th Nordic Was-tewater Conference*, October 8–10, 2013, Malmö, Sweden.

van der Star, W.R.L., Abma, W.R., Blommers, D., Mulder, J.W., Tokutomi, T., Strous, M., Picioreanu, C. & van Loosdrecht, M.C.M. 2007. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res.*, 41(18), 4149–4163.

van der Star, W.R., Miclea, A.I., van Dongen, U.G., Muyzer, G., Picioreanu, C. & van Loosdrecht, M.C. 2008. The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnol Bioeng*, 101(2), 286–294.

van Dongen, U., Jetten, M.S.M. & van Loosdrecht, M. 2001. The SHARON-anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci Technol*, 44(1), 153–160.

van de Graaf, A.A., Mulder, A., Debruijn, P., Jetten, M.S.M., Robertson, L.A. & Kuenen, J.G. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol*, 61(4), 1246–1251.

Vazquez-Padin, J.R., Fernandez, I., Morales, N., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A. & Mendez, R. 2011. Autotrophic nitrogen removal at low temperature. *Water Sci Technol*, 63(6), 1282–1288.

Wett, B. 2006. Solved upscaling problems for implementing deammonification of rejection water. *Water Sci Technol*, 53(12), 121–128. Wett, B., Omari, A., Podmirseg, S.M., Han, M., Akintayo, O., Gómez Brandón, M., Murthy, S., Bott, C., Hell, M., Takács, I., Nyhuis, G. & O'Shaughnessy, M. 2012. Going for mainstream deammonification from bench- to full-scale for maximized resource efficiency. *IWA World Water Congress and Exhibition*, 16–21 September 2012, Busan, Korea.

Veuillet, F., Lacroix, S., Bausseron, A., Gonidec, E., Ochoa, J., Christensson, M. & Lemaire, R. 2014. Integrated fixed-film activated sludge ANI-TAMox process--a new perspective for advanced nitrogen removal. *Water Sci Technol*, 69(5), 915–922.

Winkler, M.K.H., Yang, J., Kleerebezem, R., Plaza, E., Trela, J., Hultman, B. & van Loosdrecht, M.C.M. 2012. Nitrate reduction by organotrophic Anammox bacteria in a nitritation/anammox granular sludge and a moving bed biofilm reactor. *Bioresource Technol*, 114, 217–223.

Vlaeminck, S.E., Terada, A., Smets, B.F., De Clippeleir, H., Schaubroeck, T., Bolca, S., Demeestere, L., Mast, J., Boon, N., Carballa, M. & Verstraete, W. 2010. Aggregate Size and Architecture Determine Microbial Activity Balance for One-Stage Partial Nitritation and Anammox. *Appl Environ Microbiol*, 76(3), 900–909.

Yang, J. 2012. Controlling and monitoring of deammonification process in moving bed biofilm reactor. Licenciate thesis, TRITA-LWR LIC-2065, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.

Zhang, J.X., Zhang, Y.B., Li, Y., Zhang, L., Qiao, S., Yang, F.L. & Quan, X. 2012. Enhancement of nitrogen removal in a novel anammox reactor packed with Fe electrode. *Bioresource Technol*, 114, 102–108.

Ødegaard, H., Rusten, B. & Westrum, T. 1994. A new moving-bed biofilm reactor - applications and results. *Water Sci Technol*, 29(10-11), 157–165.

Bilaga 1 Publikationer/SVU projekt 10-105

Licentiatavhandling

Sultana, R. (2014) Partial Nitritation/Anammox process in a moving bed biofilm reactor operated at low temperatures. Licentiate thesis, TRITA-LWR LIC-2014:05, 33p. Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.

Refereegranskade artiklar

Persson, P., Sultana, R., Suarez, M., Hermansson, M., Plaza, E. & Wilén, B.-M. (2014) Structure and composition of biofilm communities in a moving bed biofilm reactor for nitritation-anammox at low temperatures, *Bioresource Technol*, 154, 267–273.

Refereegranskade konferensbidrag

Persson, F., Sultana, R., Wilén, B.-M., Hermansson, M., Sörensson, F., Matsson, A. & Plaza, E. (2013) One-stage nitritation – anaerobic ammonium oxidation at low temperatures in a moving bed biofilm reactor. *Oral presentation at the IWA holistic sludge conference 6–8 may, 2013, Västerås, Sweden.*

Sultana, R., Yang, J., Trela, J. & Plaza, E. (2013) Deammonification process performance and efficiency at different temperatures. *Oral presentation at the IWA holistic sludge conference 6–8 may, 2013, Västerås, Sweden.*

Sultana, R., Plaza, E. & Wilén, B.-M. (2014) Influence of dissolved oxygen concentration on one stage deammonification operated at different temperatures, Oral presentation at the IWA Specialist Conference on Global Challenges for Sustainable Wastewater Treatment and Resource Recovery, Kathmandu, Nepal, 26–30 October 2014.

Manuskript

Sultana, R., Yang, J., Trela, J., Plaza, E., Wilén, B.-M. & Persson F. (2014) Deammonification process performance and efficiency at moderate to low temperatures.

Sultana, R., Plaza, E., Persson, F. & Wilén, B.-M. (2014) Partial nitritation/anammox with moderate to low nitrogen concentrations at 13 °C.

Examensarbeten

Maloszewski, K. (2013) Application of on-line measurements and activity tests for the controlling and monitoring of the Nitritation/Anammox process. KTH TRITA-LWR Degree Project 13:41.

Rajkowski, M. (2012) Evaluation of the deammonification process operated at low temperatures. KTH TRITA LWR Degree Project 12:26.



Box 14057, 167 14 Bromma Tel 08 506 002 00 Fax 08 506 002 10 E-post svensktvatten@svensktvatten.se www.svensktvatten.se