

Nitrifierande biofilmer för biologisk kväverening i avloppsreningsverk

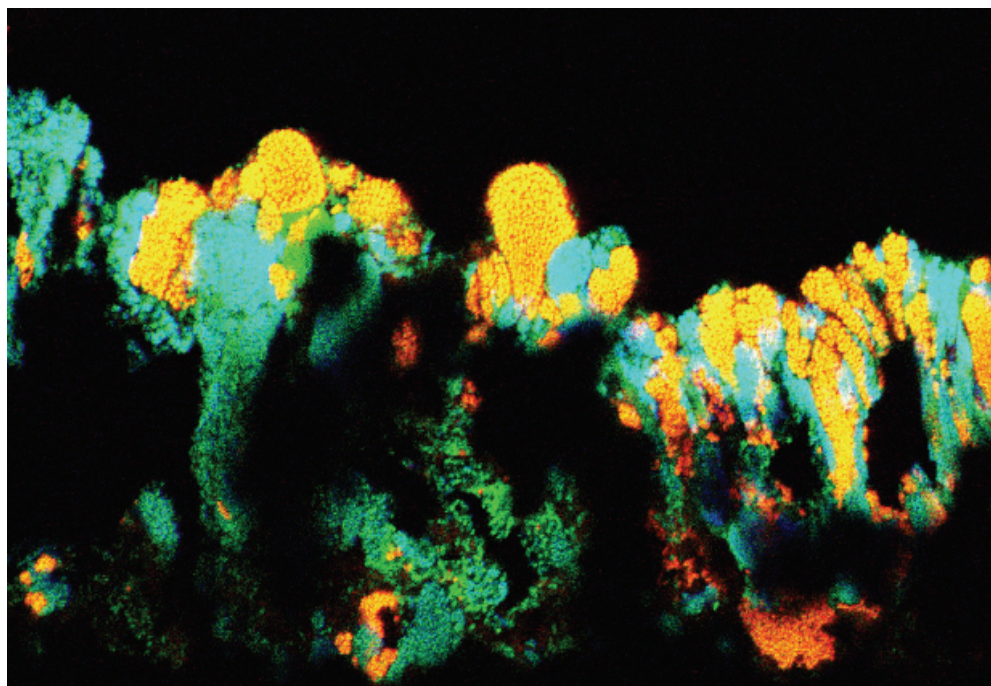
Malte Hermansson

Fred Sörensson

Per-Eric Lindgren

Ann Mattsson

Torsten Wik



VA-Forsk

VA-Forsk är kommunernas eget FoU-program om kommunal VA-teknik. Programmet finansieras i sin helhet av kommunerna, vilket är unikt på så sätt att statliga medel tidigare alltid använts för denna typ av verksamhet. FoU-avgiften är för närvarande 1,05 kronor per kommuninnevånare och år. Avgiften är obligatorisk. Nästan alla kommuner är med i programmet, vilket innebär att budgeten årligen omfattar drygt åtta miljoner kronor.

VA-Forsk initierades gemensamt av Svenska Kommunförbundet och Svenskt Vatten. Verksamheten påbörjades år 1990. Programmet lägger tonvikten på tillämpad forskning och utveckling inom det kommunala VA-området. Projekt bedrivs inom hela det VA-tekniska fältet under huvudrubrikerna:

Dricksvatten
Ledningsnät
Avloppsvattenrening
Ekonomi och organisation
Utbildning och information

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

Anders Lago, ordförande	Södertälje
Olof Bergstedt	Göteborgs VA-verk
Roger Bergström	Svenskt Vatten AB
Daniel Hellström	Stockholm Vatten AB
Stefan Marklund	Luleå
Mikael Medelberg	Roslagsvatten AB
Anders Moritz	Linköping
Peter Stahre	VA-verket Malmö
Jan Söderström	Sv Kommunförbundet
Göran Tägtström	Borlänge
Agneta Åkerberg	Falkenberg
Steinar Nybruket, adjungerad	NORVAR, Norge
Thomas Hellström, sekreterare	Svenskt Vatten AB

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

VA-Forsk
Svenskt Vatten AB
Box 47607
117 94 Stockholm
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.

Rapportens titel:	Nitrifierande biofilmer för biologisk kväverening i avloppsreningsverk
Title of the report:	Nitrifying biofilms in nitrogen removal in wastewater treatment plants
Rapportens beteckning Nr i VA-Forsk-serien:	2006-18
Författare:	Malte Hermansson, Fred Sörensson, Inst. för cell och molekylärbiologi, mikrobiologi, Göteborgs universitet; Per-Eric Lindgren, Avd. för medicinsk mikrobiologi, Inst. för molekylär och klinisk medicin (IMK) Hälsouniversitetet, Linköping; Ann Mattsson, Ryaverket, Göteborg (Gryaab); Torsten Wik, Signaler och system, Reglerteknik och automation, Chalmers Tekniska Högskola
VA-Forsk-projektnr:	21-126
Projektets namn:	Försöksanläggning för studier av nitrifierande biofilmer i avloppsreningsverk
Projektets finansiering:	VA-Forsk (FORMAS, VR)
Rapportens omfattning Sidantal: Format:	35 A4
Sökord:	Nitrifikation, kväverening, biofilmer, bakterier
Keywords:	Nitrification, nitrogen removal, biofilms, bacteria
Sammandrag:	Biologisk kvävereningen byggs ut på många svenska reningsverk och biofilmsprocesser används ofta för nitrifikationssteget. Vi har, med olika DNA baserade metoder, analyserat populationsförändringar och aktivitet hos nitrifierande biofilmer och olika driftstrategier för dessa i en pilotanläggning.
Abstract:	Biological nitrogen removal is implemented in Swedish wastewater treatment plants, often using biofilm processes for nitrification. Using DNA based methods we analyzed population dynamics and activity of nitrifying biofilms, and have tested different running strategies in a pilot plant with controlled ammonium concentrations.
Målgrupper:	FoU personal på reningsverk, myndigheter, forskare
Omslagsbild:	Mikroskopbild på ett tvärsnitt genom en ungefär 100µm tjock nitrifierande biofilm i biobädden i fullskaleanläggningen på Ryaverket, Göteborg. Bilden visar att biofilmen har hålrum och kanaler. Olika nitrifierande bakterier kan identifieras direkt under mikroskopet med hjälp av DNA-baserade metoder. Fotograf: Pär Lydmark
Rapporten beställs från:	Finns att hämta hem som pdf-fil från Svenskt Vattens hemsida www.svensktvatten.se
Utgivningsår:	2006
Utgivare:	Svenskt Vatten AB © Svenskt Vatten AB

Förord

Övergödning, eller eutrofiering, är ett ökande miljöproblem i många områden. För att motverka problemet har många svenska reningsverk byggts ut för kväverening. Biofilmsprocesser blir mer vanliga i Svenska avloppsreningsverk. Med anledning av detta har vi undersökt nitrifierande biofilmer med avseende på ett antal olika aspekter. Vi har studerat populationssammansättningen och nitrifikationsaktiviteten i biofilmer i biobäddar fullskalanläggningen på Ryaverket (Gryaab) i Göteborg och jämfört med aktivt slamnläggningen på Henriksdal i Stockholm. Vi har också haft möjlighet att bygga en pilotanläggning på Ryaverket, där vi har testat hur nitrifikationsbiofilmerna i biobäddar och på rörliga bärare reagerar på olika ammoniumhalter. Denna typ av experiment är ovanliga så till vida att vi har kunnat studera bakterierna under realistiska förhållanden, i avloppsvatten, men med kontrollerade ammoniumhalter. Bland annat har vi intressanta resultat från test av olika driftsstrategier.

Projektet är ett samarbete mellan Göteborgs universitet (GU), Gryaab, Linköpings universitet (LiU) och Chalmers tekniska högskola (CTH).

Vi vill rikta ett stort tack till alla som bidragit till projektet. Ett flertal personer på Ryaverket i Göteborg har varit behjälpliga med provtagning, provanalyser och vid byggandet, och inte minst underhållet och driften av pilotanläggningen. Utan denna hjälp hade vi inte kunnat driva projektet. Vid GU har Pär Lydmark och Robert Brunström utfört karakteriseringar av nitrifikationspopulationerna och analyserat och sammanställt data, Magnus Lind gjorde snitten för mikroskopering. Vid LiU har Kristina Samuelsson, Stefan Kokalj och Jenny Stendahl deltagit med populationsanalyser och dataanalyser. Sara Hallin och Åsa Jarvis, båda Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Ultuna, deltog i den första delstudien vid Henriksdalsverket. Projektet har finansierats framförallt av VA-Forsk, men också av VR och FORMAS.

Göteborg i juli 2006

Malte Hermansson
Fred Sörensson
Per-Eric Lindgren
Ann Mattsson
Torsten Wik

Innehåll

Förord	3
Sammanfattning	7
Summary	8
1 Bakgrund	9
1.1 Introduktion	9
1.2 Kväverening är en biologisk process	9
1.2.1 Nitrifikation	9
1.2.2 Anammox	10
1.2.3 Denitrifikation	10
1.3 Beskrivning av processkonfigurationer för kväverening i avloppsreningsverk	11
1.3.1 Nitrifikation/denitrifikation	11
1.3.2 Biofilmssystem	12
1.4 Tidigare undersökningar av nitrifikationen vid Ryaverket	12
2 Syfte och prioriteringar, nytta för reningsverken	12
3 Metoder	14
3.1 Analysmetoder	14
3.1.1 Fluorescent in situ hybridisering (FISH)	14
3.1.2 Avancerad mikroskopi (CSLM)	14
3.1.3 Polymerase chain reaction (PCR) och Denaturerande gradient- gelelektrofores (DGGE)	15
3.1.4 Realtids-PCR	15
3.1.4 Modeller	15
3.2 Pilotanläggningen	15
4 Resultat och diskussion	17
4.1 Nitrifierande populationer i undersökta avloppsreningsverk 1999–2005, generella observationer	17
4.2 Populationsdynamik hos nitrifierare i biofilmen i en substratgradient	20
4.2.1 <i>Nitrosomonas europaea</i> -gruppen	20
4.2.2 <i>Nitrosomonas oligotropha</i> -gruppen	20
4.2.3 <i>Nitrosomonas communis</i> -gruppen	22
4.2.4 NOB	22
4.2.5 Ammoniumoxiderare inom <i>Archaea</i>	23
4.2.6 Anammox	23
4.3 Biofilmsstruktur i en gradient	23
4.4 Nitrifikationsaktivitet	24
4.5 Nitrifikation vid olika driftstrategier	26
5 Sammanfattande diskussion	27

Referenser.....	29
Bilaga A: Vetenskaplig rapportering från projektet	34

Sammanfattning

Eutrofierung, eller övergödning, är ett ökande miljöproblem. Eutrofieringsproblemet har identifierats av riksdagen som har angivit ”Ingen övergödning” som ett av sina 16 miljömål. Som ett led i att minska kvävetillförseln till ekosystemen har många svenska reningsverk byggts ut för kväverening. Vi har i detta projekt undersökt nitrifikationssteget i kvävereningen.

Kvävereningen är en helt biologisk process. Nyckeln till en god processkonfiguration (och driftstrategi) är därför en god kunskap om de biologiska processer som skall styras. Om det saknas kunskap om bakteriernas egenskaper och potential vet vi inte mot vilka mål vi kan eller bör styra.

Biofilmsprocesser har blivit ett allt vanligare sätt att genomföra nitrifikationen, den första delen av kvävereningen. Syftet med projektet var att undersöka biologiska processer och bakteriella populationer i nitrifierande biofilmer.

För att detektera nitrifierare måste moderna molekylärbiologiska metoder användas. De klassiska mikrobiologiska metoderna som odling av bakterier på agarplattor och anrikningskulturer har mycket begränsad användning vid undersökning av prover från reningsverk och fungerar särskilt dåligt för långsamväxande autotrofa organismer, som nitrifierare.

Deskriptiva studier är viktiga för att förstå hur nitrifikationen fungerar i avloppsreningen. Men i fullskaleanläggningar är av naturliga skäl möjligheterna till experimentellt arbete mycket begränsat. För att experimentellt manipulera koncentrationen av ammonium, som är den viktigaste faktorn som styr nitrifierarnas populationsdynamik och aktivitet byggdes en pilotanläggning.

Resultaten redogörs för i sex olika rapporter och en doktorsavhandling. I korthet har vi undersökt:

Populationssammansättning hos ammoniumoxiderare (AOB) och nitritoxiderare (NOB) i aktivt slamanläggningen vid Henriksdalsverket undersöktes. Resultaten jämfördes sedan med biofilmssystem.

Den nitrifierande biobädden vid fullskaleanläggningen vid Ryaverket, Göteborg, undersöktes med avseende på AOB och NOB på olika djup i bädden, även nitrifikationsaktiviteten per cell för både AOB och NOB redovisas, liksom strukturen på biofilmen. Både AOB och NOB minskar med djupet i bädden, vilket är förväntat eftersom ammoniumhalten minskar med djupet. Men också populationsammansättningen ändras, vilket betyder att bakterier med olika egenskaper förekommer i en ammoniumgradient.

Vi kvantifierade AOB och NOB på bärarmaterial suspenderat i olika ammoniumhalter i pilotanläggningen och kunde beräkna nitrifikationsaktivitet per cell. Något överraskande var aktiviteten per cell högre i biofilmerna i de lägre jämfört med de högsta ammoniumhalterna.

Biofilmer som flyttades mellan olika ammoniumkoncentrationer förändrar sin populationssammansättning, men relativt sakta, medan den potentiella nitrifikationshastigheten ändras snabbare. Genom att variera ammoniumkoncentrationen under olika dagar i veckan under en längre period, kunde vi visa hur olika driftsstrategier kan utnyttjas för att få en högre nitrifikationspotential.

Summary

Eutrophication is an increasing environmental problem and has been identified by the Swedish parliament as one of the 16 major environmental issues that are prioritized. Many Swedish wastewater treatment plants (WWTP) have implemented nitrogen removal. In this project we have studied the nitrification step of the removal process.

Nitrogen removal relies totally on biological processes. The key to a successful treatment is therefore knowledge about the biology; lacking this we cannot expect to have efficient running strategies or process configurations.

Biofilms are increasingly used for the nitrification process. The aim of this project was to study the biological processes, such as population dynamics and activity of nitrifiers in different biofilm systems.

To detect nitrifiers or, in fact, any bacteria in wastewater, we must use modern molecular methods. Classical microbiology, using standard agar media are of very limited relevance.

Descriptive studies of full-scale plants are necessary to understand how the processes are working. However, full-scale plants cannot, for obvious reasons, easily be used for experimental manipulations. As part of the project a pilot plant was therefore built at Rya WWTP. Here we could control the ammonium concentrations by allowing nitrification biofilms to develop on biofilm carriers in aerated tanks connected in series. The ammonium concentration decreased through the tanks with highest concentration in tank 1 and lowest in tank 4 and we could expose biofilms to different ammonium concentrations in a controlled fashion.

The results are reported in six papers and one PhD thesis, and are briefly summarized here:

Ammonium oxidizer (AOB) and nitrite oxidizer (NOB) population structure in active sludge were determined at Henriksdals WWPT and were compared with the biofilm systems at Rya WWTP.

The nitrifying trickling filter (NTF) at Rya WWTP was investigated in the ammonium gradient formed in the NTF with respect to AOB and NOB relative numbers, absolute numbers, specific nitrification rates (per cell) and biofilm structure. Both AOB and NOB decrease with depth, which is expected since the ammonium decrease downwards. The AOB community structure change with depth, showing that nitrifiers with different properties establish in the gradient.

AOB and NOB was quantified on suspended carriers in the pilot plant, specific nitrification rates were, somewhat surprisingly, higher in the lower than the highest ammonium concentration.

Biofilms that were moved between tanks with different ammonium concentrations changed their population structure relatively slowly, whereas the potential nitrification rates shifted rather quickly after moving between tanks. By changing the ammonium concentrations on a day to day basis, the nitrification potential could be maintained on a high level. This indicates that the running strategies can be designed to develop and maintain bacterial communities with elevated nitrification potentials.

1 Bakgrund

1.1 Introduktion

Eutrofiering, eller övergödning, är ett ökande miljöproblem. Eutrofiering innebär att ekosystem som sjöar, floder eller kustområden får ett så stort tillskott av näringsämnen att produktionen av planktonalger i vattnet ökar mycket kraftigt. Algerna sjunker så småningom till botten. När bakterier på botten i sin tur bryter ner den stora sedimenterade algbio-massan krävs så mycket syre att det blir syrefritt i bottenvattnet. I dessa områden finns en stor aktivitet av bakterier, men de syrefria förhållandena gör däremot att djur och växter inte kan leva här, därav det något felaktiga begreppet ”döda bottenar”. Vidare finns risken att stora algbloomningar orsakar toxinproduktion vilket leder till bekymmer i många områden.

Allvaret med eutrofieringsproblemet har identifierats av riksdagen som har angivit ”Ingen övergödning” som ett av sina 16 miljömål. Riksdagen har dessutom angivit delmål för miljö kvalitetsmålet: *”Senast år 2010 ska de svenska vattenburna utsläppen av kväveföreningar från mänsklig verksamhet till haven söder om Ålands hav ha minskat med minst 30 % från 1995 års nivå.”* (<http://www.naturvardsverket.se/>).

Algproduktion begränsas oftast av antingen kväve eller fosfor, mer sällan av kisel eller järn (Pitois *et al.* 2001). En expertgrupp gjorde nyligen, på uppdrag av Naturvårdsverket, en stor genomgång av eutrofieringsläget i Sverige (Boesch *et al.* 2005). Bland annat konstateras att i Västerhavet är kväve det begränsande näringsämnet för algproduktionen och vikten av att minska utsläppen från punktkällor betonas, samtidigt som de diffusa utsläppen måste minskas.

Många avloppsreningsverk i Sverige har infört kväverening för att minska utsläppen. Kraven på kväverening av avloppsvatten har ökat under senare år och kan antas komma att skärpas ytterligare under kommande år. Kvävereningen baserar sig helt på biologiska processer. Det blir vanligare att biofilmssystem används i avloppsrening, d.v.s. där mikroorganismer

växer och utför en process fastsittande på en yta, t.ex. i en biobädd eller på ett speciellt bärrmaterial i vatten. Vid skärpta krav och/eller platsbrist är det troligt att biofilmprocesser övervägs som komplement eller alternativ till kväverening i aktivslamsystem, som idag är den vanligaste reningsmetoden. Kunskapen om de speciella förutsättningarna som finns i mikrobiologiska biofilmer är fortfarande relativt dålig. För att utnyttja biofilmsprocesser maximalt och få en så effektiv rening som möjligt är det viktigt att vi får en bred och god kunskap om hur dessa processer skall drivas.

1.2 Kväverening är en biologisk process

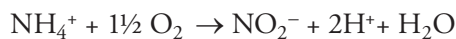
Medan fosforeringen vid avloppsrening i Sverige oftast genomförs på kemisk väg (fällning med järn eller aluminium) sker kvävereningen nästan uteslutande med biologiska processer.

Kväve förekommer naturligt i oxidationsformer från $-III$ (ammonium, NH_4^+) till $+V$ (nitrat, NO_3^-). Kvävgas är den vanligaste formen av kväve på jorden, medan NH_4^+ , NO_2^- (nitrit) och NO_3^- är de former av kväve som används som kvävekälla av de flesta organismer. Medan alla organismer behöver kväve för sin uppbyggnad, bland annat i proteiner och DNA, kan en del bakterier använda olika kväveföreningar i sin energiomsättning, antingen som energikälla (nitrifikation) eller som slutlig elektron-acceptor i respirationskedjan (denitrifikation). Genom dessa två kopplade biologiska processer med två bakterietyper som utför helt olika processer, nitrifikation och denitrifikation, omvandlas ammoniumkvävet i avloppsvattnet till kvävgas.

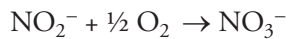
1.2.1 Nitrifikation

Nitrifikation sker genom två processer, först oxidation av ammonium till nitrit och sedan vidare oxidation av nitrit till nitrat. Processerna utförs av två olika typer av specialiserade mikroorganismer så kallade nitrifikationsbakterier. De två reaktionerna är intimt kopplade, och de två olika bakterietyperna som utför dessa processer lever tätt tillsammans. Den första av reaktionerna är oxidation av ammonium till nitrit, vilken utförs av ammoniumoxiderande bakterier (AOB).

Den förenklade reaktionsformeln för detta steg är:



Nästa steg i nitrifikationen är oxidation av den bildade nitriten till nitrat:



Detta utförs av nitritoxiderande bakterier (NOB). ΔG° för ammoniumoxidationen är -235 kJ mol^{-1} , medan för nitritoxidationen är energivinsten mycket mindre ($\Delta G^\circ = -54 \text{ kJ mol}^{-1}$). Detta betyder att NOB får ut betydligt mindre energi än AOB per mol oxiderad kväve.

Nitrit i högre koncentrationer är giftigt för alla organismer, även för nitrifierare. Därför är det viktigt att nitrit inte ackumuleras i systemet. Detta tillsammans med det faktum att NOB är beroende av vad AOB producerar är en viktig anledning till att de två bakterietyperna normalt lever i tät kontakt med varandra (Lydmark *et al.* 2006c).

Både AOB och NOB kräver mycket energi för att tillväxa och detta tillsammans med att energiutbytet är relativt dåligt gör att nitrifierare växer mycket långsamt jämfört med andra bakterier, speciellt heterotroferna som kan utnyttja den energi som finns i organiskt material. Generationstiden för nitrifierare är även under optimala förhållanden i laboratorier så lång som 7–10 timmar. Detta kan jämföras med *E. coli* som kan ha en generationstid på 20 minuter. I reningsverk har generationstider för nitrifierare uppmätts till dagar eller till och med veckor (Bock & Wagner 2001).

Nitrifikationsbakterier är också notoriskt känsliga för störningar i form av olika gifter. I konkurrens om ammonium med heterotrofa bakterier kommer AOB till korta. Däremot använder nitrifierare CO_2 som kolkälla, medan heterotroferna är helt beroende av organiskt material både som energi- och kolkälla. Vill man gynna nitrifierare vid avloppsreningen krävs hög syrehalt och ammoniumhalt, men låg halt av organiskt material så att inte konkurrensen från heterotroferna blir för stor.

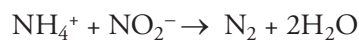
Taxonomiskt återfinns AOB och NOB inom grupper som *Proteobacteria* och *Nitrospira*. Alla AOB har namn som börjar på *Nitroso-* och alla NOB börjar på *Nitro-*. De flesta AOB finns inom *beta-Proteobacteria* (*Nitrosomonas*, *Nitrosospiras*, *Nitrosolobus* och *Nitrosovibrio*), endast *Nitrosococcus*

finns i *gamma-Proteobacteria*. Nästan alla AOB inom *beta-Proteobacteria* har hittats i avloppsreningsverk (Wagner *et al.* 2002). AOB inom *gamma-Proteobacteria* har bara isolerats eller hittats i marina miljöer och i saltsjöar (Koops *et al.* 2003).

NOB finns inom *alfa-Proteobacteria* (*Nitrobacter*) och inom det egna fylumet *Nitrospira*. *Nitrobacter* är anpassad för höga nitrithalter och växer relativt snabbt (för att vara nitrifikationsbakterier) medan *Nitrospira* är bättre anpassad till låga nitrithalter och växer sakta. Följaktligen hittas *Nitrobacter* endast i avloppsreningsverk med (åtminstone tidvis) höga nitrithalter, medan *Nitrospira* konkurrerar bättre vid låga nitrithalter (Schramm *et al.* 1999, Schramm *et al.* 1996).

1.2.2 Anammox

Den vanliga nitrifikationen som beskrivs under 1.2.1 ovan är en rent aerob process, d.v.s. syre är ett absolut krav. Det finns också en anaerob ammoniumoxidation (anammox) där anaeroba bakterier oxiderar ammonium men där nitrit, och inte syre används som elektronacceptor:



Eftersom det här bildas kvävgas direkt i ett steg och bara en bakteriegrupp är inblandad är detta en mycket intressant process för kväverening i avloppsreningsverk. Anammoxbakterier växer dock mycket långsamt och de processer de utför är svårstyrda och därmed inte helt enkla att utnyttja. Anammoxbakterierna beskrevs så sent som i början av 1990-talet (Mulder *et al.* 1995), även om Broda redan 1977 föreslog att det borde finnas en bakterie med denna fysiologi (Broda 1977). Anammoxprocessen är patenterad (Mulder 1992)

1.2.3 Denitrifikation

Denitrifikation är den process där bakterier använder nitrat som slutlig elektronacceptor i andningskedjan under bildning av kvävgas (N_2). Denitrifierande bakterier kan sägas "andas nitrat" på samma sätt som vi andas syre. Denitrifierarna använder mest olika organiska molekyler som energikälla. Därför behövs organiskt material för att kvävereningen skall fungera. Denitrifierarna kan oftast använda andra elektron-

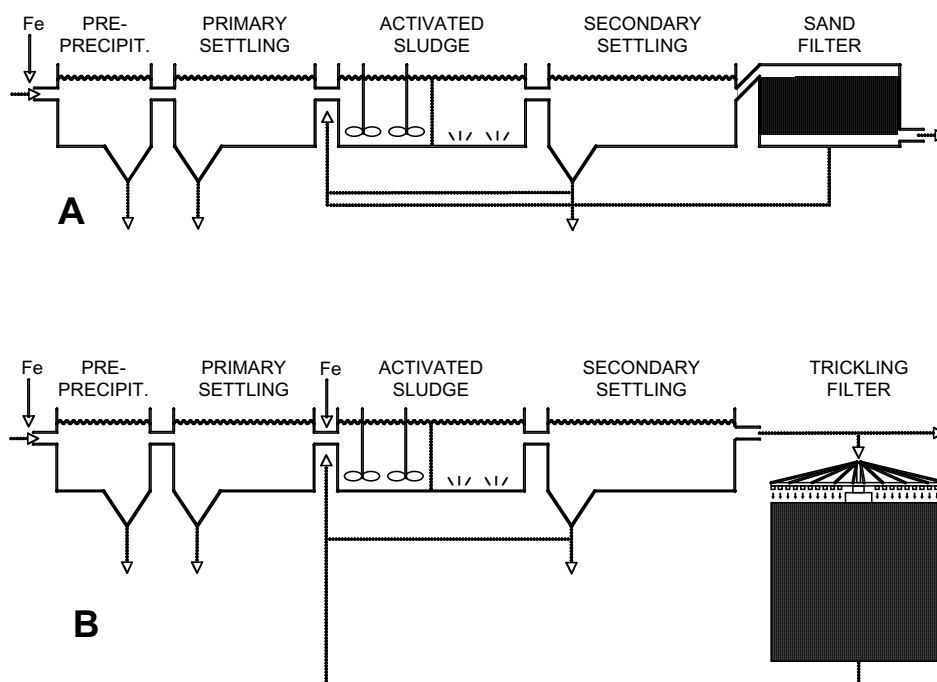
acceptorer än nitrat, t.ex. syre. I själva verket är syre en bättre elektronacceptor än nitrat eftersom cellerna får ut mer energi genom att använda syre. Det är orsaken till att om syre finns tillgängligt väljer bakterierna det. Denitrifikationsprocessen är därför beroende av att det inte finns syre i den del av reningsverket där denitrifikationen skall ske. Nitrifikationen är däremot helt beroende av att det finns syre, dessa helt motsatta krav på syremiljön ställer krav på process-konfigureringen av ett reningsverk med kväverening (se nedan för vidare diskussion). Denitrifikation kan utföras av medlemmar av ett stort antal helt olika bakteriesläkten. Detta i motsats till nitrifikation, som bara utförs av en relativt begränsad grupp av bakterier som är nära släkt med varandra. Som vi skall se har detta betydelse för vilka metoder som kan användas för att studera de olika grupperna.

1.3 Beskrivning av process-konfigurationer för kväverening i avloppsreningsverk

1.3.1 Nitrifikation/denitrifikation

Principen för kväverening med hjälp av nitrifikation/denitrifikation är att avloppsvattnet måste recirkuleras

inom verket om inte stora mängder organiskt material skall tillföras till avloppsvattnet. Detta krävs eftersom de bakterier som utför processerna har specifika krav på sin miljö för att växa och vara aktiva. Inkommande avloppsvatten är rikt på organiskt material, och i denna miljö har nitrifierare svårt att konkurrera med heterotrofer, alltså måste nitrifikationsteget ligga sent i processen där halten organiskt material är låg. Samtidigt kräver nitrifikationen syre vilket t.ex. kan lösas genom att låta vatten rinna över en yta (biobädd) eller genom att blåsa in luft i tankar med rörliga biofilmsbärare. I vattnet från nitrifikationen är ammonium omvandlat till nitrat, men för att det skall bildas kvävgas måste denitrifikationsbakterierna ha organiskt material och dessutom syrefria förhållanden. Antingen måste stora mängder organiskt material tillsättas till vattnet för att stimulera denitrifikationen eller så kan vattnet recirkuleras till början av reningsverket där det organiska materialet inte är nedbrutet. **Figur 1.3.1-1A** visar en principskiss över Henriksdals reningsverk i Stockholm. Här används aktivt slam och återcirkulation av vatten från sedimenteringsbassänger/sandfilter tillbaka till anoxiska bassänger (utan lufttillförsel) där denitrifikationen sker. I **figur 1.3.1-1B** visas Ryaverket i Göteborg, där ungefär hälften av vattnet efter sedimentering rinner över en biobädd för nitrifikation. Det nitrifierade vattnet recirkuleras tillbaka till anoxiska bassänger i början av aktivslamsteget för denitrifikation. För att kunna



Figur 1.3.1-1. Schematiska bilder över Henriksdals avloppsreningsverk (A) och Ryaverket (GRYYAB) (B) (modifierad efter Lydmark 2006).

designa ett väl fungerande effektivt reningsverk och sedan driva det optimalt behövs alltså kunskap om de biologiska processer som skall styras.

1.3.2 Biofilmssystem

Det finns ett antal processtekniska lösningar på kväverening, som generellt kan delas in i **aktivslamprocesser** och **biofilmsprocesser**. I anläggningar som använder nitrifikation i aktivt slam måste slamåldern (solids retention time, SRT) hållas lång nog för att de långsamt växande nitrifierarna skall hinna dela sig innan de försvinner ut ur systemet. I biofilmsbaserade processer däremot växer nitrifierarna på en fast yta av något slag och hålls därmed mycket effektivare kvar i systemet. I biofilmssystem används ett antal olika reaktortyper. Ett av dessa är biobäddar, ”trickling filter”, bestående av plastmaterial med stor yta över vilken avloppsvattnet får rinna, vilket används bl.a. på Ryaverket. En annan princip är att ha rörliga biofilms bärare, oftast av plastmaterial, i suspension i avloppsvattnet. Det finns ett antal olika typer av bärare, t.ex. ”K1” och ”Biofilm-chip M” tillverkade av AnoxKaldnes, Lund.

Många reningsverk använder biofilmsprocesser och det kan antas att det kommer att bli vanligare i framtiden. Biofilmsprocesser är ofta utrymmessparande och effektiva. För att kunna effektivisera och verkligen utnyttja de mikrobiologiska biofilmsprocesserna optimalt måste mer detaljerad kunskap tas fram genom forskning, vidareförädlas och slutligen överföras till branschen.

1.4 Tidigare undersökningar av nitrifikationen vid Ryaverket

Ett antal undersökningar har genomförts vid Ryaverket i Göteborg för att förbättra kunskapsläget och ge ett underlag för förbättringar. Här refereras endast till de som har speciell relevans för detta projekt. Vi har tidigare, Persson *et al.* (2002) undersökt AOB populationer i verkets biobäddar och jämfört experimentella data med simulerade värden från en modell som utvecklats tidigare (Wik 1999, 2000). Slutsatserna från dessa tidigare undersökningar visade:

- att det var en relativt låg diversitet bland AOB
- att simuleringarna av andelen AOB stämde relativt väl överens med experimentella data
- att simulerade och mätta data båda visade att den potentiella nitrifikationen sjönk med djupet i biobädden
- att den uppmätta nitrifikationshastigheten per torr vikt biofilm var relativt konstant på olika djup i biobädden, vilket innebär att biofilmen var lika effektiv med avseende på nitrifikation oavsett tjocklek eller position i biobädden.

Undersökningen gav en första bild av nitrifierarnas diversitet och fördelning i biobädden. Emellertid utvecklades under tiden ett antal nya prober för identifiering av AOB och NOB (se vidare 3.1.1 för diskussion av prober och identifieringsmetoder) som borde ge utförligare information om diversiteten hos nitrifierarna som vi misstänkte var högre. Denna undersökning gav en deskriptiv bild av biobädden men vi hade ingen möjlighet att experimentellt testa dynamiken hos AOB och NOB populationerna.

2 Syfte och prioriteringar, nytta för reningsverken

Varför är det viktigt att mäta populationsförändringar? Nyckeln till en god processkonfiguration (och driftstrategi) är en god kunskap om de biologiska processer som skall styras. Om det saknas kunskap om bakteriernas egenskaper och potential vet vi inte mot vilka mål vi kan eller bör styra.

Med de moderna molekylärbiologiska metoder som finns tillgängliga kan bakterier detekteras utan att behöva odlas, och därigenom kan vi få en relativt god bild av de bakteriepopulationer som finns i ett prov. Målet med arbetet att identifiera och framförallt att kvantifiera olika bakteriegrupper, är inte att sätta namn på så många bakterier som möjligt. Genom att identifiera bakterierna som ”gör jobbet” i reningsverket kan vi koppla ”namnet” till kända egenskaper hos bakterierna. Det är denna koppling

till aktivitet och den potential som cellerna har inom kväveomvandlingen, som är en viktig orsak till identifieringsarbetet. Genom att studera t.ex. vilka av de olika AOB som växer i olika delar av en biobädd kan vi förstå hur förhållandena påverkar bakterierna. Genom att systematiskt undersöka populationsdynamiken (hur t.ex. olika AOB grupper växer till eller dör ut) kan vi också få en bild av hur bakteriesamhället (d.v.s. alla populationer tillsammans) ser ut under vissa driftsbetingelser och sedan jämföra denna bild med hur det ser ut under andra förhållanden. Detta ger en möjlighet att kunna förutsäga vilka bakterier man kan förväntas få under olika driftsförhållanden och vilka egenskaper bakterierna har, vilket ger möjligheter att styra processen så att bakterier med vissa egenskaper kan selekteras. Det kan t.ex. vara fördelaktigt att gynna och försöka hålla kvar bakterier som har hög nitrifikationshastighet vid höga ammoniumhalter för att ha en beredskap vid plötsliga toppar, alternativt kan det vara fördelaktigt att gynna populationer som har en god överlevnadsförmåga vid låga ammoniumhalter och som kan utnyttja även mycket låga substrathalter.

Syftet med projektet var därför att undersöka biologiska processer och bakteriella populationer i nitrifierande biofilmer. Vidare ville vi använda dessa data för att verifiera, och om möjligt förbättra, existerande matematiska modeller för nitrifierande biofilmer. Den tidigare studien (Persson *et al.* 2002) pekade på nya frågor och även om överensstämmelsen mellan simuleringar och uppmätta data var relativt god var det klart att för att förbättra den matematiska modellen, behövdes betydligt bättre kunskap om relativt basala biologiska processer, i första hand populationsdynamiken hos nitrifierarna vid olika ammoniumkoncentrationer. I litteraturen finns få, om ens några, undersökningar där relevanta förhållanden (d.v.s. naturligt avloppsvatten i fullskalanläggningar) har manipulerats. En pilotanläggning där ammoniumhalten kunde kontrolleras samtidigt som vi använde avloppsvatten från fullskalanläggningen för att få relevanta mätningar byggdes därför upp för att vi skulle nå vårt mål. Parallellt med det experimentella arbete som möjliggjordes med pilotanläggningen, ingick också i planen att undersöka fullskalanläggningens nitrifierande biofilmer.

Prioriteringar som gjordes i början av projektet (definierade av de givna ekonomiska ramarna) syftade

till att i första hand säkerställa att pilotanläggningen kunde byggas, och dels att vi kunde satsa på att undersöka de biologiska processerna som bedömdes som det område där kunskapsbristen i särklass var störst. Resultaten visar klart på brister i existerande matematiska modeller som inte var kända tidigare, och med detta har vi skapat en god grund för att fortsätta utvecklingen av bättre modeller.

Kunskapsuppbyggnad om kväverening är, och kommer att bli, **viktig för reningsverk i Sverige** i framtiden. Det är också viktigt att dessa resultat inte är specifika för ett reningsverk utan är av karaktären generellt tillämpbar biologisk kunskap.

Resultaten publiceras i internationella tidskrifter och kan användas för att förbättra avloppsreningen inte bara nationellt. Genom att kunskapen är generell kan biologisk rening, inte minst inom Sveriges närområde inom EU, på sikt förbättras. Det är också viktigt att visa att branschen satsar på avancerad forskning inom avloppsreningsområdet, som utgör en av de viktigaste biotekniska processerna i ett ut hålligt samhälle. Vi står i början av denna bioteknikutveckling, och kan inte förvänta oss att redan ha alla svar. Metoderna har inte funnits tillgängliga så länge, och det tar tid att anpassa metoder och skapa intresse för dessa och de resultat som kan uppnås i avloppsrening. Det är därför mycket glädjande att VA-Forsk har satsat på detta projekt. Vi hoppas att branschen skall visa ett fortsatt intresse av att ta fram, och se möjligheterna med avancerad biologi, för att förbättra sina biologiska processer.

Syftet med undersökningarna och olika prioriteringar resulterade i följande detaljplan och motiv för det experimentella arbetet:

- Mätningar av populationssammansättning hos ammoniumoxiderare (AOB) och nitritoxiderare (NOB) i aktivtslamanläggning och i biofilmssystem för att undersöka vilka bakterier, och därmed vilken potential för nitrifikation, som finns i olika delar av processen.
- Mätningar av relativa andelen och absoluta antalet av AOB och NOB i en koncentrationsgradient av ammonium i biobädd i fullskalanläggning, för att kunna räkna ut hur stor andel av biofilmen som kan nitrifiera och den specifika nitrifikationshastigheten (per cell).
- Mätningar av specifika nitrifikationsaktiviteten (per cell) i fullskala och i pilotanläggning, för att

undersöka under vilka förhållanden biofilmens bakterier är effektivast.

- Undersökning av biofilmsstruktur i en koncentrationsgradient av ammonium i biobädd i fullskalanläggning, detta kan i sin tur hjälpa till att förklara effektiviteten i olika biofilmer utsatta för olika ammoniumhalt.
- Mätningar av populationsdynamik vid kontrollerade ammoniumhalter (höga och låga halter och ”upp- och ”nerskift”) i avloppsvatten under längre tider (5 månader), för att undersöka hur de olika nitrifikationsbakterierna växer till eller avdödas/försvinner.
- Mätningar av potentiell nitrifikationshastighet under kontrollerade ammoniumhalter i avloppsvatten (höga och låga halter; varierande med olika dagar höga och låga halter) för att testa olika driftsstrategier och för att jämföra aktivitetsförändringar (troligen snabba) med förändringar i populationerna (troligen långsamma).

3 Metoder

3.1 Analysmetoder

För att kunna detektera AOB och NOB i biofilmer måste moderna molekylärbiologiska metoder användas. De klassiska mikrobiologiska metoderna som odling av bakterier på agarplattor och anrikningskulturer har visat sig ha mycket begränsad användning vid undersökning av prover från reningsverk; endast ungefär en procent av alla bakterier växer exempelvis på agarplattor med standardmedier. De bakterier som kan odlas i laboratoriet är trots detta viktiga därför att dessa kan användas för att undersöka fysiologi och genetik hos olika grupper, men det är svårt att från dessa undersökningar dra slutsatser om hur bakterierna fungerar i sin naturliga miljö. De DNA baserade metoderna har öppnat helt nya möjligheter att göra relevanta mikrobiologiska undersökningar av avloppsvatten som inte fanns för bara 10 år sedan. Nedan beskrivs kortfattat de viktigaste av dessa metoder som används inom detta projekt.

3.1.1 Fluorescent in situ hybridisering (FISH)

Fluorescent in situ hybridisering (FISH) är en metod där bakterier kan identifieras direkt under mikroskop, utan att man behöver odla bakterierna. Genom att använda avancerade mikroskop (se 3.1.2) kan FISH också användas för att kvantifiera specifika bakteriearter eller bakteriegrupper i ett prov.

I FISH används en kort DNA kedja (ung. 20 baspar, kallas probe) som också märks med en fluorescerande molekyl i ena änden. DNA sekvensen anpassas så att den binder specifikt till vissa bakteriers ribosomala RNA (rRNA). Eftersom det finns tusentals ribosomer i en cell ökar detta signalstyrkan och gör det lätt att detektera enskilda celler i ett fluorescensmikroskop. Sekvensen hos bakteriers ribosomer är dels mycket konserverad i en del av ribosomen men samtidigt variabel i andra regioner. DNA proberna designas så att de blir specifika för en viss del av ribosomen; om proben görs specifik för en konserverad del kommer den att träffa och markera många olika bakterier, om däremot proben riktar mot en av de mer specifika ribosomsekvenserna träffas och markeras bara en liten snäv grupp av bakterier. På så sätt kan prober med olika specificitet användas för att detektera och även kvantifiera alla bakterier, olika grupper av bakterier, t.ex. nästan alla AOB, eller enskilda arter.

Metoden kräver kännedom om DNA sekvenserna hos de bakterier man vill detektera. Det finns nu en stor databas med rRNA sekvenser där sekvensinformation kan hämtas. Databasen uppdateras kontinuerligt med nya sekvenser, inte minst därför att en stor del av bakteriesystematiken numera baseras på sekvensen hos bakteriernas rRNA. I de olika undersökningarna har vi använt 24 olika prober för att karaktärisera AOB (13 prober), NOB (8 prober) och anammox bakterier (1 prob), förutom ett antal prober för större grupper som *Eubacteria*, *Archaea* och olika grupper av *Proteobacteria*. En mer detaljerad beskrivning av metoden finns i (Hallin *et al.* 2005).

3.1.2 Avancerad mikroskopi (CSLM)

För biofilmer används numera nästan alltid FISH tillsammans med avancerad mikroskopi (confocal scanning laser microscope, CSLM) där man optiskt

kan dissekera bilden inte bara i sidled utan också i djupled. Genom att mikroskopet kan särskilja signaler från olika djup i 0,2 μm steg kan även aggregat av bakterier undersökas. Traditionella fluorescensmikroskop har inte denna möjlighet och ljus från olika nivåer ger en mycket oklar bild av ett aggregat. Eftersom biofilmsprov i praktiken består av aggregat och mikrokolonier av bakterier är användningen av CSLM numera ett standardinstrument i biofilmsforskning.

Vi har utvecklat en ny metod för att kvantifiera bakterier med FISH och CSLM, (Hallin *et al.* 2005).

Genom att frysa och sedan snitta biofilmer direkt från biobädden kan vi också få en rumslig uppfattning om hur bakterierna fördelat sig i djupled i biofilmen. Snitten är ungefär 5 μm tunna och efter analys i CSLM kan vi beräkna hur olika bakterier; AOB och NOB fördelar sig biofilmen. Detta har gett helt ny information om biofilmens struktur, se vidare 4.3. och (Lydmark *et al.* 2006c).

3.1.3 Polymerase chain reaction (PCR) och Denaturerande gradientgelelektrofores (DGGE)

På samma sätt som vi med FISH använder prober för att specifikt känna igen olika bakterieceller, kan man med metoden Polymerase Chain Reaction (PCR) få en stor mängd DNA-kopior från just den DNA-sekvens man vill studera. DNA:t som kopierats finns nu i så stor mängd att man kan analysera det med olika metoder.

Ett sätt som det kopierade DNA:t kan analyseras på är "Denaturerande gradientgelelektrofores" (DGGE). Normalt kan gelelektrofores skilja på DNA-sekvenser med olika längd. Alla PCR-produkterna från olika bakterier har emellertid i detta fall samma längd, och med DGGE, – en mer detaljerad separation – kan man separera och analysera sekvenser från olika bakterier. Detta görs i DGGE genom att separera DNA-fragment med avseende på den interna sekvensen inom ett fragment. Till exempel kan man skilja på sekvenser där skillnaden mellan dem bara är ett baspar.

Vi har använt DGGE för att analysera ribosomala gener hos AOB och även för att analysera genen för ett nyckelenzym hos AOB. DGGE-resultaten ger en bild av mångfalden hos ett bakteriesamhälle.

Genom att sekvensbestämma olika separerade DNA-fragment kan vi också få exakt information om de bakterier som finns i biofilmen. För mer detaljerad beskrivning av DGGE se (Lydmark 2006; Lydmark *et al.* 2006b).

3.1.4 Realtids-PCR

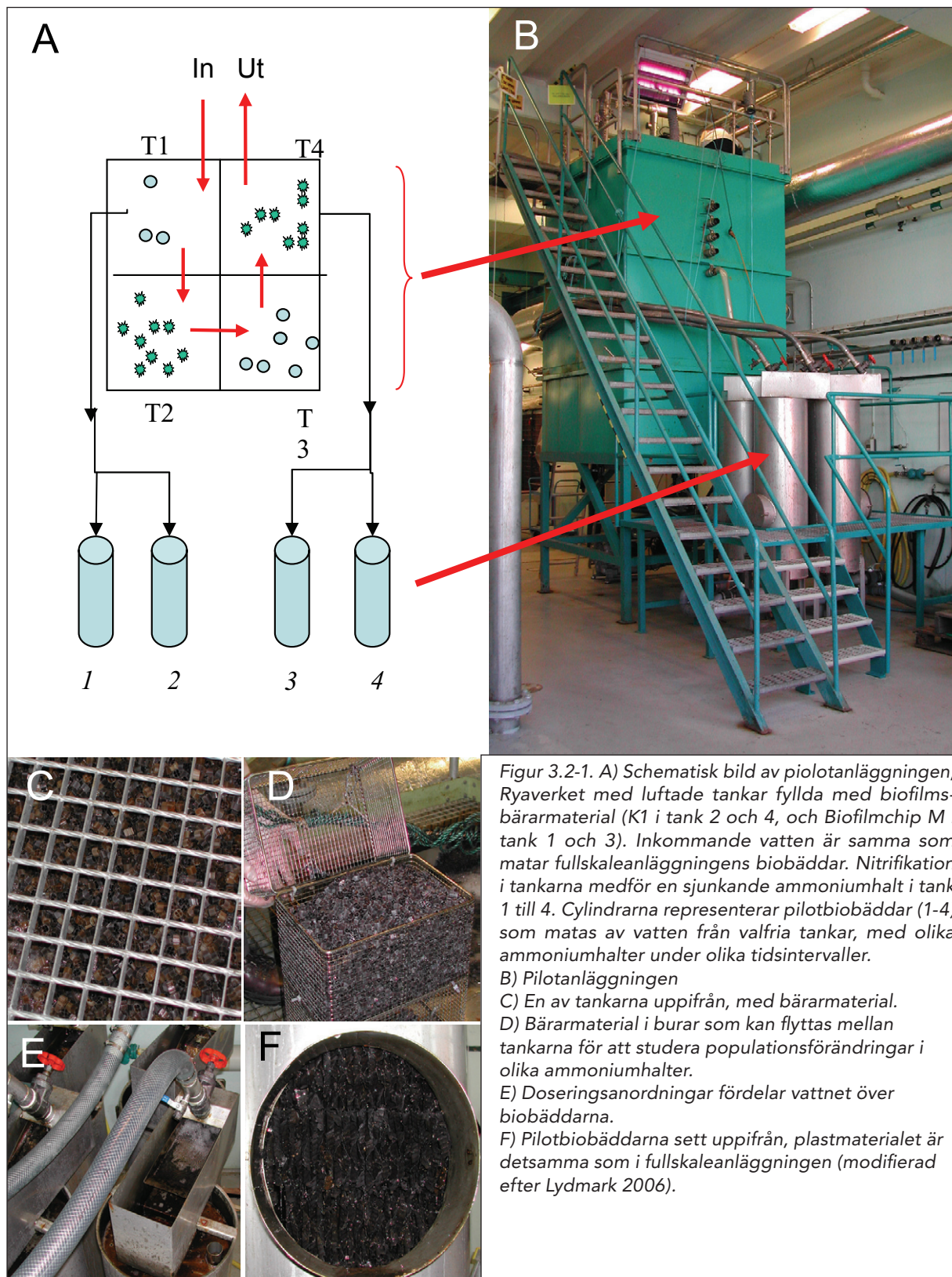
PCR används normalt för att amplifiera en specifik DNA sekvens från en blandning av många olika DNA sekvenser. I så kallad realtids-PCR kan man få en kvantitativ uppskattning av hur mycket av den eftersökta sekvensen som fanns från början i provet och vi kan sedan beräkna t.ex. hur många AOB celler som fanns. Realtids-PCR är alltså en alternativ metod till kvantitativ FISH och vi har använd metoden för att mäta antal AOB i fullskalebiobädden (Lydmark *et al.* 2006b). För mer detaljer se (Lydmark 2006; Lydmark *et al.* 2006b).

3.1.4 Modeller

Den matematiska modell som har använts här har utvecklats tidigare (Wik 1999, 2000) och använder temperatur, ammonium- och nitritkoncentrationer, flöden och alkalinitet som indatavariabler. Modellen ger simulerade värden på bl. a. nitrifierande bakteriers biomassa, nitratkoncentrationer i utgående vatten och biofilmens tjocklek. För mer detaljerad beskrivning se (Wik 1999, 2000).

3.2 Pilotanläggningen

Deskriptiva studier är viktiga för att förstå hur nitrifikationen fungerar i avloppsreningen. Men i fullskleanläggningar är av praktiska skäl möjligheterna till experimentellt arbete mycket begränsat. En pilotanläggning byggdes därför för att dels kunna följa upp tidigare undersökningar och dels experimentellt manipulera koncentrationen av ammonium, som genom att vara energikälla för AOB (och som källa för nitrit även helt avgörande för NOB) är den viktigaste faktorn som styr nitrifierarnas populationsdynamik. I **figur 3.2-1 (nedan)** visas pilotanläggningen på Ryaverket. I pilotanläggningens tankar



Figur 3.2-1. A) Schematisk bild av pilotanläggningen, Ryaverket med luftade tankar fyllda med biofilmsbärarmaterial (K1 i tank 2 och 4, och Biofilmchip M i tank 1 och 3). Inkommande vatten är samma som matar fullskaleanläggningens biobäddar. Nitrifikation i tankarna medför en sjunkande ammoniumhalt i tank 1 till 4. Cylindrarna representerar pilotbiobäddar (1-4) som matas av vatten från valfria tankar, med olika ammoniumhalter under olika tidsintervaller.

B) Pilotanläggningen

C) En av tankarna uppifrån, med bärarmaterial.

D) Bärarmaterial i burar som kan flyttas mellan tankarna för att studera populationsförändringar i olika ammoniumhalter.

E) Doseringsanordningar fördelar vattnet över biobäddarna.

F) Pilotbiobäddarna sett uppifrån, plastmaterialet är detsamma som i fullskaleanläggningen (modifierad efter Lydmark 2006).

finns biofilmsbärarmaterial på vilket det utvecklas en biofilm, eftersom vattnet innehåller hög halt ammonium och luftas ger detta goda förutsättningar för nitrifikation. I tank 1 till 4 minskar successivt ammoniumhalten, samtidigt som det ändå är samma vatten som det som matar fullskalebiobäddarna.

Vi har utnyttjat detta och tagit prover på biofilmerna i de olika tankarna. Vi har också låtit flytta över en del av biofilmsmaterialet från en tank till en annan för att studera hur snabbt bakterierna kan ändra sin populationssammansättning. Vi har förutom tankarna även anslutit pilotbiobäddar med samma

biobäddsmaterial som i fullskalanläggningen. Dessa biobäddar kan anslutas till olika tankar så att de matas med vatten av olika ammoniumhalt. Genom att ge biobäddarna olika ammoniumhalt under olika bestämda tidsperioder kan vi testa olika driftsstrategier. **Figur 3.2-2** visar ett diagram med ammoniumhalter i de olika tankarna, samt i inflödet till tank 1. I tank 4 är genomgående ammoniumhalten mycket låg. Detta ger alltså möjligheter att testa hur bakterierna påverkas av "svält" i ett vatten som är relevant.

4 Resultat och diskussion

Först ges en mycket kortfattad överblick av de vetenskapliga delarbeten som ingår i projektet. Resultaten redovisas sedan under rubriker som relaterar till de biologiska frågeställningarna snarare än till de olika tekniska systemen.

I Hallin *et al.* (2005) redovisas metodutveckling av kvantitativ FISH med hjälp av CSLM och undersökningar av förekomst av AOB och NOB i en aktivt-slammanläggning. Metodutvecklingen gav ett förbättrat verktyg för analys av nitrifierarna och data från aktivt-slammanläggningen gav intressanta jämförelser med de biofilmssystem vi sedan undersökte.

I Lydmark *et al.* (2006b) undersöktes fullskalanläggningens nitrifierande biobädd med avseende på AOB och NOB på olika djup i bädden, även

nitrifikationsaktiviteten per cell för både AOB och NOB redovisas.

I Lydmark *et al.* (2006c) fullföljde vi undersökningen av fullskalanläggningens biobädd genom att studera biofilmsstruktur och även AOB och NOB populationerna på olika djup i biobädden.

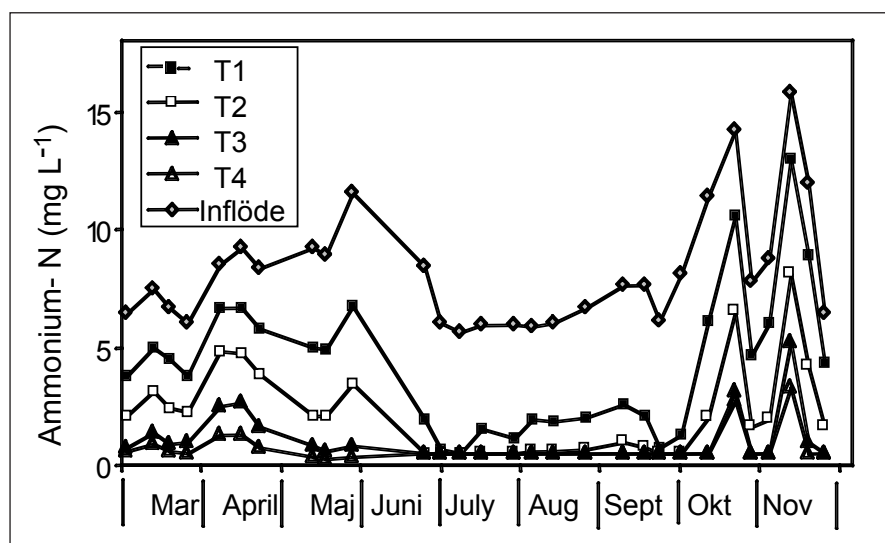
I Lydmark *et al.* (2006d) kvantifierades AOB och NOB på bärrmaterial suspenderat i olika ammoniumhalter i pilotanläggningen. Nitrifikationsaktivitet per cell redovisas.

I Lydmark *et al.* (2006a) undersöktes experimentellt hur de två AOB populationer som visade tydligaste ändringarna i de olika tankarna i pilotanläggningen (Lydmark *et al.* 2006d), förändrades när de flyttades mellan olika ammoniumhalter.

I Brunström *et al.* 2006 undersöktes hur nitrifikationspotentialen hos biobäddar i pilotanläggningen förändrades vid olika driftstrategier.

4.1 Nitrifierande populationer i undersökta avloppsreningsverk 1999–2005, generella observationer

Ett stort antal FISH-prober använts för att karaktärisera AOB och NOB populationerna. Genom att korstesta olika prober har vi kunnat påvisa ett antal olika AOB populationer. En sammanfattning av dessa resultat ges i **tabell 4.1-1 (nedan)**. Genom att matcha de olika sekvenser som proverna representerar mot



Figur 3.2-2. Ammoniumkoncentrationer i tankarna 1–4 i pilotanläggningen på Ryaverket, mars till november 2004 (modifierad efter Lydmark *et al.* 2006d).

Tabell 4.1-1 visar en del av de olika prober som använts. +/- visar om proben träffar cellerna som testats. Samma prov har testats med olika prober för att undersöka om cellerna träffas av flera prober. Kombinationen av olika prober som träffar, eller inte träffar, en cell ger en uppfattning om vilken art/grupp cellen tillhör. Denna art/grupp syns i kolumnen "Sekvensspecificitet". Populationsbeteckningarna (t.ex. IIIa) anges så som den betecknas i referensen, observera att samma beteckning kan betyda olika typer av organismer i olika referenser. "Träffar" betyder det antal träffar som den speciella sekvensen (som definieras av probkombinationen) får i databasen (Modifierad efter Lydmark 2006).

Population		Prober										Träffar	Sekvens-specificitet
		Nso1225	Nso190	Nsm156	Neu	Nse1472	NmV	NmII	C6a192	Noli191	Nmo218		
Hallin et al. 2006	Ia	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	8 ^a	<i>N. europaea</i> spp.*
	Ib	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	62	<i>Nitrosomonas/Nitrospira</i> spp
	IIa	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	19	<i>N. oligotropha</i>
	IIb	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	75	<i>Nitrosomonas</i> spp.
Lydmark et al. 2006b	I	ej [§]	ej	-	-	+	-	-	-	-	-	23	<i>N. europaea/eutropha</i> spp.
	II	ej	ej	+	-	-	-	+	-	-	-	5	<i>N. communis/nitrosa</i> spp.
	IIIa	ej	ej	+	-	-	-	-	+	+	-	7	<i>Nitrosomonas</i> spp.
	IIIb	ej	ej	-	+	-	-	-	+	+	-	5	Uncultured AOB
	IIIc	ej	ej	-	-	-	-	-	+	+	-	7	Uncultured AOB
Lydmark et al. 2006c	I	+	+	+	-	-	-	-	ej	+	+	7	<i>N. oligotropha/urea</i> spp.*
	II	+	+	+	+	-	-	-	ej	+	+	1	<i>N. oligotropha/urea</i> spp.*
	III	+	+	+	-	+	-	-	ej	-	-	8	<i>N. europaea</i> spp.*
	IV	+	+	+	-	-	-	+	ej	-	-	5	<i>N. communis/nitrosa</i> spp.*
Lydmark et al. 2006d	I	ej	ej	ej	-	-	-	-	+	+	+	60	<i>N. oligotropha/urea</i> spp.
	II	ej	ej	ej	-	-	-	-	+	+	-	16	<i>Nitrosomonas</i> spp.
	III	ej	ej	ej	-	-	-	+	-	-	-	5	<i>N. communis/nitrosa</i> spp
	IV	ej	ej	ej	-	+	-	-	-	-	-	23	<i>N. europaea/eutropha</i> spp.
	V	ej	ej	ej	+	-	-	-	-	-	-	87	<i>Nitrosomonas</i> spp.

* Sekvensen matchar denna organism om ett baspar tillåts ha "mismatch".

§ ej = proben inte testad.

^a Passar också Neu. Det finns några sekvenser som har en "mismatch" med Nso190 och som inte passar med Neu.

^b Passar Nso190 om en "mismatch" tillåts, annars inga sekvenser som passar.

^c Passar Neu om en "mismatch" tillåts, annars inga sekvenser som passar.

alla kända sekvenser i RNA databaserna kan de tro-
liga kandidaterna som träffas av en viss kombination
av prober bestämmas. På så sätt får vi mer information
från en hel serie prober än genom att bara förlita oss

på ett fåtal helt olika prober. Vi har också kunnat de-
finiera undergrupper av bakterier, som verkar ha olika
fysiologi, inom en och samma större grupp. Detta till-
för intressant information genom att nya populationer

med nya eko-fysiologiska egenskaper kan identifieras (se vidare resultat i sektion 4.2.2 och 4.3).

De nitrifierande populationerna i Ryaverkets biobädd har undersökts sedan 1999 (Persson *et al.* 2002) och senare i olika undersökningar 2002 och 2003 (Lydmark *et al.* 2006b; Lydmark *et al.* 2006c), dessutom har nitrifierarna i pilotanläggningen undersökts 2004–2005 (Brunström *et al.* 2006; Lydmark *et al.* 2006a). Detta ger en möjlighet att följa eventuella långtidsändringar i nitrifierarpopulationerna (**tabell 4.1-2**). Eftersom de procentuella värdena på olika AOB populationerna i tabell 4.1-2 är beräknade på olika sätt kan de inte direkt jämföras med varandra, men det går ändå att urskilja några trender. Den relativt låga andelen AOB och NOB i aktivt slam jämfört med biofilmssystemen är uppenbar. Detta är naturligt eftersom aktivt slamflockarna utsätts för en mycket varierad miljö under processen och eftersom mängden tillgängligt organiskt material tidvis är mycket högt, vilket gynnar heterotrofa bakteriers tillväxt på bekostnad av nitrifierarnas. Biofilmssystemen är i vårt fall designade att selektera för nitrifierare vilket också syns i den höga andelen av dessa bakterier. Mångfalden är relativt låg i det aktivt slamsystem vi undersökt, men detta är inte en generell trend i andra undersökningar (Daims *et al.* 2001; Limpiyakorn *et al.* 2005).

I undersökningen från 1999 träffades inga celler med proben Nse1472 (Tabell 4.1-2) medan den gav positiva resultat i alla undersökningar senare. Denna prob är specifik för AOB *Nitrosomonas europaea*. *N. europaea* har ett relativt högt K_s värde för ammonium (d.v.s. den tar inte upp ammonium så effektivt vid låga halter) och avloppsvattnet vid Ryaverket kan därför (tidvis) ha för låg ammoniumhalt för att *N. europaea* skall konkurrera framgångsrikt med andra AOB. Strax före den period 1999 när *N. europaea* inte kunde detekteras hade ammoniumrikt rejeatvatten från slamavvattning börjat tillföras biobäddarna, men möjligen hade inte detta hunnit påverka nitrifierarna i biobäddarna än. Resultatet visar att nitrifierarsamhället är dynamiskt och kan ändras även över en längre period. Förändringar inom en grupp kan också ses över tiden. *N. europaea*-gruppens medlemmar varierar mellan 2002 och 2003; ingen av de tre *N. oligotropha*-populationerna i fullskalans biobädd från 2002 (Lydmark *et al.* 2006b) återfinns 2003 (Lydmark *et al.* 2006c), däremot finns det mer likheter mellan *N. europaea*-populationerna i fullskalanläggningen och pilotanläggningen 2004.

Tabell 4.1-2 visar relativa fraktionen av AOB och NOB jämfört med totala antalet bakterier i olika delar av Ryaverket och i Henriksdalsverket under perioden 1999–2005. Eftersom antalet totala bakterier är mätt med olika färgningsmetoder och dessa ger olika resultat är värdena endast att betrakta som trender.

Process	År	Metod för totalantal	AOB								NOB	
			Total AOB	Nso190	Neu	Nse1472	NmII	Nmo218	Noli191	C6a192	Nrs1156	Ntspa712
A. slam ¹	2001	SYTO9	3–5	2–4	0	1–3	0	0	0	9–2	–	5–7
Biobädd ²	1999	Eub388	16–45	0	16–45	0	–	–	–	–	0	–
Biobädd ³	2002	SYTO9	8–25	4–14	2–7	9–4	2–5	0	6–20	6–20	–	11–13
Biobädd ⁴	2003	Eub prob mix	20–45	20–45	2–10	0–3	0–11	10–28	9–26	–	–	23–36
SBB ⁵	2004	Eub prob mix	28–31	14–30	3–5	0–4	8–10	5–12	13–20	12–17	2–5	33–52
SBB ⁶	2005	Eub prob mix	–	–	–	0–8	–	1–12	–	–	–	–

¹ Aktivt slamplanläggning, Henriksdal (Hallin *et al.* 2005).

² Biobäddar i fullskalanläggningen, Ryaverket (Persson *et al.* 2002).

³ Biobäddar i fullskalanläggningen, Ryaverket (Lydmark *et al.* 2006b).

⁴ Biobäddar i fullskalanläggningen, Ryaverket (Lydmark *et al.* 2006c).

⁵ Suspenderade biofilmsbärare i pilotanläggningen, Ryaverket (Lydmark *et al.* 2006d).

⁶ Suspenderade biofilmsbärare i pilotanläggningen, Ryaverket (Lydmark *et al.* 2006a).

4.2 Populationsdynamik hos nitrifierare i biofilmen i en substratgradient

I biobäddarna sker en i det närmaste fullständig nitrifikation, d.v.s. all ammonium omvandlas till nitrat. Genom detta utvecklas en stark koncentrationsgradient av ammonium med djupet i biobädden. Syre tillförs från botten av biobädden och syrehalten kan antas vara hög genom hela bädden. Den viktigaste faktorn som påverkar AOB och NOB populationerna är således ammoniumgradienten. Ett genomgående tema i våra undersökningar har varit att undersöka hur en gradient av ammonium styr nitrifierarpopulationerna i fullskalebiobädden och genom att manipulera avloppsvattnet i pilotanläggningen har vi där efterliknat de olika ammoniumkoncentrationerna. Vi har i flera undersökningar studerat nitrifikationspopulationerna i dessa gradienter.

Generellt minskar fraktionen AOB av alla bakterier med biobäddsdjupet (Lydmark *et al.* 2006b, Persson *et al.* 2002) medan NOB utgör en mer konstant fraktion av bakteriesamhället (Lydmark *et al.* 2006b; Persson *et al.* 2002). Detta kan förklaras av att för AOB är energikällan (ammonium) helt extern och tillförs biobädden utifrån och minskar konstant med djupet. Energitkällan för NOB (nitrit) produceras av AOB vilket sker lokalt i biofilmen, varför tillgången på nitrit för NOB blir mer jämt fördelad genom biobädden.

Av AOB är det främst tre grupper som är intressanta. Dessa representeras av *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosomonas oligotropha* och *Nitrosomonas communis*. Även om de nämnda arterna är representanter för sina grupper innehåller dessa grupper många arter som troligen kan vara ganska olika med avseende på viktiga egenskaper (se vidare nedan).

De olika bakteriegrupperna och deras populationsdynamik i de olika undersökningarna presenteras var för sig för att få ett bättre sammanhang genom de olika deskriptiva och experimentella undersökningarna.

4.2.1 *Nitrosomonas europaea*-gruppen

N. europaea har hittats i många avloppsreningsverk (Gieseke *et al.* 2001; Okabe *et al.* 2004; Park & Noguera 2004) och är en av de mest studerade AOB,

dess genom är sekvenserat och mycket av dess fysiologi är klarlagd (Arp *et al.* 2002; Chain *et al.* 2003; Poughon *et al.* 2001). Som tidigare nämnts (sektion 4.1) är *N. europaea* anpassad till en hög ammoniumkoncentration, t.ex. har de ett högt K_s för ammonium. *N. europaea* förekommer i de översta delarna i biobädden både i undersökningarna 2002 (Lydmark *et al.* 2006b) och 2003 (Lydmark *et al.* 2006c). De försvinner nästan helt redan på tre meters djup i biobädden. Det kan vara så att *N. europaea* ligger på gränsen till sin förmåga att tillväxa i Ryaverket och kan vara en "indikatorbakterie" för hög ammoniumkoncentration.

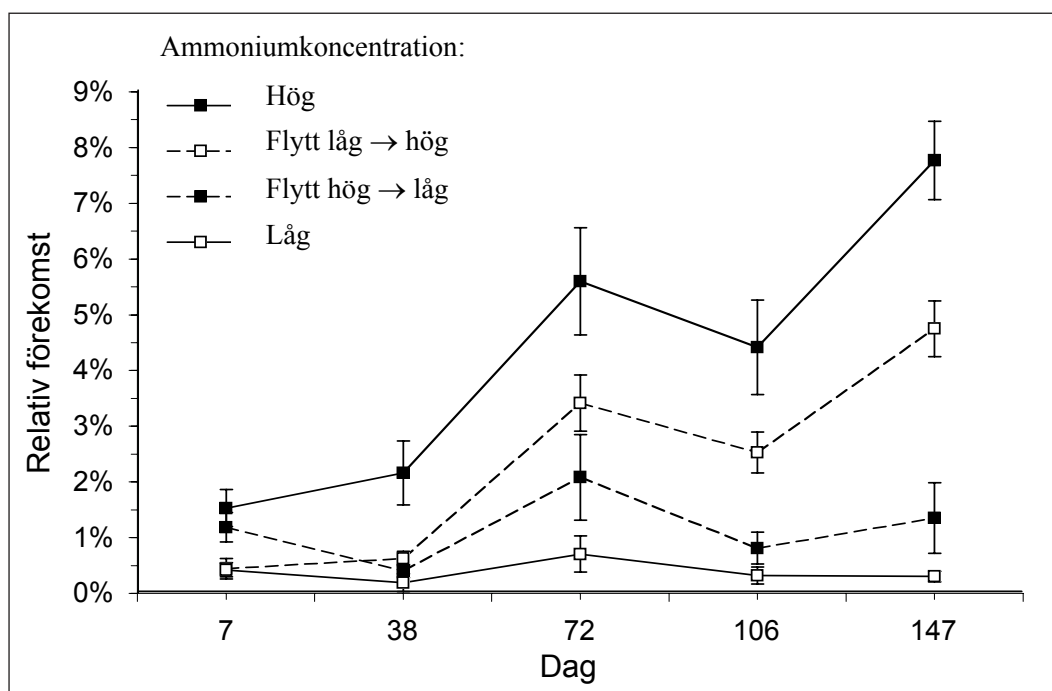
I pilotanläggningen detekterades *N. europaea* utslutande i tank 1 (med högsta ammoniumkoncentrationen) vilket visar att pilotanläggningens tankar kan användas som experimentssystem för fullskalanläggningen (Lydmark *et al.* 2006a). Det visar också att bakteriekulturernas fördelning i en biobädd väl kan jämföras med fördelningen i ett system av seriekopplade tankar med rörliga bärare. Detta är fördelaktigt då de senare är betydligt enklare att hantera experimentellt.

För att experimentellt verifiera hur *N. europaea* reagerar på olika ammoniumkoncentrationer användes pilotanläggningens tankar med rörliga bärare. Biofilmsbärare som varit i tank 4 (lägsta ammoniumkoncentration) flyttades till tank 1 (hög ammoniumkoncentration) där de hölls avskiljda från övriga bärare i en stålbur, och jämfördes med kontrollbiofilmer som var kvar i respektive tank (Lydmark *et al.* 2006a). Resultaten visar att *N. europaea* reagerar som förväntat och jämfört med kontrollerna som är kvar i respektive tank så ökar de sin relativa andel av totalantalet bakterier när de flyttas till tank 1 medan andelen inte förändras så mycket när de flyttas till tank 4 (**figur 4.2.1.-1**).

N. europaea överlever alltså "svårt" relativt väl. Resultaten visar också att populationsförändringarna tar relativt lång tid; en ökning från 0,5 % till ungefär 4,5 % tar 150 dagar och under de första 30 dagarna sker ingen relativ ökning, detta skall jämföras med de relativt mycket snabbare förändringarna i nitrifikationsaktivitet som visas i sektion 4.4.

4.2.2 *Nitrosomonas oligotropha*-gruppen

I alla förhållanden, både i biobädden i fullskalanläggningen och i pilotanläggningens olika tankar, var



Figur 4.2.1-1 visar relativa andelen *N. europaea* på suspenderade biofilmsbärare i olika tankar i pilotanläggningen. "Hög" och "Låg" betecknar bärare i tank 1 respektive tank 4. "Flytt låg → hög" betecknar bärare som flyttats från tank 4 till tank 1 och "Flytt hög → låg" betecknar bärare som flyttats från tank 1 till 4 (modifierad efter Lydmark et al. 2006d).

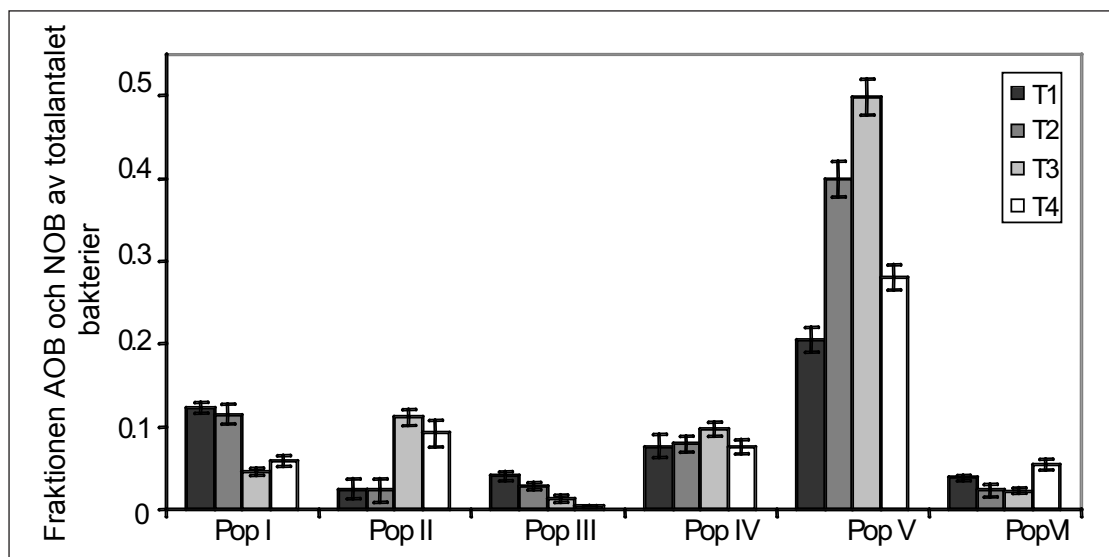
N. oligotropha den största AOB-gruppen (Lydmark 2006). Som namnet antyder är *N. oligotropha* anpassad till låga ammoniumkoncentrationer (Koops et al. 2003). *N. oligotropha* har detekterats i många avloppsreningsverk, speciellt sådana där ammoniumhalten är relativt låga (Daims et al. 2001; Limpiyakorn et al. 2005; Dionisi et al. 2002; Gieseke et al. 2003; Harms et al. 2003). Gruppens framgång är emellertid troligen beroende på att det inom *N. oligotropha* finns många organismer med olika egenskaper. Minst sex olika populationer inom *N. oligotropha* gruppen detekterades under två-tre år men inte alla samtidigt (Lydmark 2006). Detta är intressant och indikerar att trots att bakterierna är nära släkt har de olika fysiologi och krav på ammonium, syre, känslighet för nitrit och andra viktiga faktorer (Daims et al. 2001; Limpiyakorn et al. 2005; Bollmann & Laanbroek 2002) (se även sektion 4.3 och (Lydmark et al. 2006c).

De *N. oligotropha*-populationer från fullskalebiobädden som kallas IIIa och IIIb i (Lydmark et al. 2006b) visade relativt likartad och jämn fördelning med djupet i biobädden i mätningen 2002. Population IIIc däremot var bara 3 % av alla AOB vid toppen av biobädden men 17 % i botten. Population IIIc identifieras med samma FISH-prober som den *N. oligotropha*-population i pilotanläggningen som kallas II i (Lydmark et al. 2006d). Pilotanläggningens

population II har också samma fördelning i relation till ammoniumkoncentrationen som IIIc med högre andel celler i tank 3 och 4 där ammoniumhalten är låg i pilotanläggningen. Det tyder på att likadana eller mycket snarlika populationer utvecklas under likartade förhållanden i både biobädden och pilotanläggningen, även med flera år mellan mätningarna.

Även om detta är ett förväntat resultat är det intressant att pilotanläggningar med rörliga bärare uppenbarligen ger en god bild av hur fullskaleanläggningen kan fungera även med avseende på relativt komplicerade processer.

Det visar sig alltså att *N. oligotropha*-gruppen dominerar under alla olika förhållanden, men att det är olika populationer som tar över. I pilotanläggningen fördelades (som diskuterats ovan) de två *N. oligotropha* populationerna I och II så att I var störst i tank 1 och 2 och II var störst i tank 3 och 4 (Lydmark et al. 2006d) (**figur 4.2.2-1, nedan**). Fördelningen kunde bero på skillnader i ammoniumkoncentrationen mellan tankarna, men skillnaden i ammoniumhalt i tank 2 och 3 var inte så stor. En faktor som möjligen kan bidra till att förklara resultaten är att nitritkänsligheten är olika för de två *N. oligotropha*-populationerna, eftersom nitrithalten (som mättes oregelbundet) var högre i tank 1 och 2 än i tank 3 och 4 under mätningarna i Lydmark et al. (2006d). Däremot var nitrihalterna låga genomgående i alla



Figur 4.2.2-1. Fraktionen AOB (population I–IV) och NOB (population V–VI) av totalantalet bakterier i de olika tankarna 1–4 i pilotanläggningen. proverna är tagna i november 2004 (modifierade efter Lydmark *et al.* 2006d).

tankar under tiden för experimenten som redovisas i Lydmark *et al.* (2006a) och där var också populationerna lika i alla tankar. Det är intressant att de olika *N. oligotropha* populationerna verkar konkurrera mest med varandra med påföljd att olika *N. oligotropha*-populationer tar över vid olika förhållanden. Däremot tycks inte andra AOB, som *N. europaea* eller *Nitrosomonas communis* (se vidare nedan), verka bli utkonkurrerade av *N. oligotropha*. Det kan vara den stora skillnaden i affinitet och anpassning till olika ammoniumkoncentrationer som styr den mer storskalig fördelningen av AOB-populationer, medan "intern konkurrens" inom *N. oligotropha*-gruppen styrs delvis av andra faktorer. Vi har alltså kunnat detektera denna "interna konkurrens", men vi har bara i ett fall lyckats få mer detaljerad information om skillnaderna mellan de olika *N. oligotropha*-populationerna, se sektion 4.3 och (Lydmark *et al.* 2006c).

4.2.3 *Nitrosomonas communis*-gruppen

De *N. communis*-stammar som studerats på laboratorier är anpassade till en relativt hög koncentration av ammonium (Koops & Pommerening-Röser 2001). Vi har hittat *N. communis* i alla biofilmsprover men inte i aktivt slam med proven NmII (tabell 4.1-2). Trots anpassningen till höga ammoniumkoncentrationer hos odlade *N. communis* är andelen av dessa AOB som vi hittar antingen oberoende av, eller ökande med ammoniumkoncentrationen (Lydmark 2006). Av de odlade *N. communis* kommer ingen

från avloppsvatten och det kan vara som med *N. oligotropha* att det finns olika eko-fysiologiska populationer inom gruppen. I Japan har det nyligen hittats *N. communis* som anpassat sig till låga eller fluktuerande syrehalter (Limpiyakorn *et al.* 2004). Detta tycks inte vara fallet med *N. communis* i våra undersökningar eftersom de dels finns även i de översta lagren av biofilmen där syrediffusionen inte är ett problem (Lydmark *et al.* 2006c) och det fanns heller inga celler som träffades av NmII i det delvis anoxiska aktiva slammet i Henriksdal (Hallin *et al.* 2005).

4.2.4 NOB

De dominerande NOB i Ryaverket och i aktivt slam i Henriksdal är bakterier från det egna fylumet *Nitrospira*. Dessa NOB är anpassade till låga nitrithalter och har visats vara helt dominerande i många avloppsreningsverk (Daims *et al.* 2000; Dionisi *et al.* 2002; Robinson *et al.* 2003; Schramm *et al.* 1999). Tidigare ansågs *Nitrobacter* vara typisk i avloppsreningsverk, men den finns egentligen bara i reningsverk med mycket höga nitrithalter (Coskuner & Curtis 2002; Schramm *et al.* 1998). *Nitrospira* är relativt okänd, och inga odlingsbara stammar har hittills hittats (Lydmark 2006). Två olika *Nitrospira*-typer har i andra studier kunnat urskiljas där grupp I är bättre anpassad till högre halter av nitrit än grupp II (Daims *et al.* 2006). Specifika prover skilde i våra studier ut en liten population av NOB. De två populationerna visade en svag tendens att reagera på nitrithalten på motsatt sätt; population V ökade med

ökande nitrithalt, medan population VI minskade (figur 4.2.2-1). Denna trend är osäker på grund av få och oregelbundna nitritmätningar, men är dock intressant eftersom det finns få undersökningar som beskriver förekomst och speciellt eko-fysiologin hos NOB. Antalet NOB i grupp V kan eventuellt vara överskattat eftersom denna identifierats med en FISH-probe med relativt stor målgrupp, som även innefattar vissa icke nitritoxiderande bakterier.

4.2.5 Ammoniumoxiderare inom *Archaea*

Tidigare antogs att organismer från domänen *Archaea* bara var specialiserade för extrema miljöer, men *Archaea* har nu hittats i relativt stora antal i marina miljöer (Battin *et al.* 2001). De första indikationerna på att det finns ammoniumoxiderande *Archaea* (AOA) kom för två år sedan (Venter *et al.* 2004) och den första AOA isolerades nyligen (Könneke *et al.* 2005). Det är intressant om det finns *Archaea* i reningsverk och väl värt att undersöka vidare.

4.2.6 Anammox

Anammox processen är strikt anaerob och fungerar inte i närvaro av syre (Egli *et al.* 2001). Därför var det överraskande och intressant att vi hittade celler som träffades av en anammox prob i den aeroba miljön i biobädden (Lydmark *et al.* 2006c). Om det förekommer mer syrefattiga mikromiljöer i biofilmen där dessa bakterier kan vara aktiva eller om det finns mer syretåliga anammoxbakterier är i nuläget bara intressanta spekulationer.

4.3 Biofilmsstruktur i en gradient

Tidigare antogs biofilmer vara enkla ansamlingar av celler på en yta, men med bättre mikroskop (CSLM) kunde det visas att biofilmer som växer på i princip alla ytor i kontakt med vatten, har en tredimensionell komplex struktur. Biofilmen består av en matris av extracellulärt material vari celler och mikrokolonier växer. Biofilmen består också av hålrum och kanaler vilket gör att vatten kan strömma inne i biofilmen och transportera näring och avfallsprodukter. Det är

fastslaget att bakterier kan utnyttja cell-cell signaler som kan koordinera genuttryck hos många celler på en gång (Wimpenny *et al.* 2000; Wuertz *et al.* 2004). Det har också visats att den struktur som biofilmen uppvisar är styrt av biologiska faktorer där signalering mellan cellerna är viktig (Davies *et al.* 1998). Det är också klart att en cell som befinner sig i en biofilm har en helt annan miljö än en cell som är frilevande i vattenfasen och exempelvis har frilevande och fastsittande celler olika proteiner i sitt cellmaskineri (Otto *et al.* 2001).

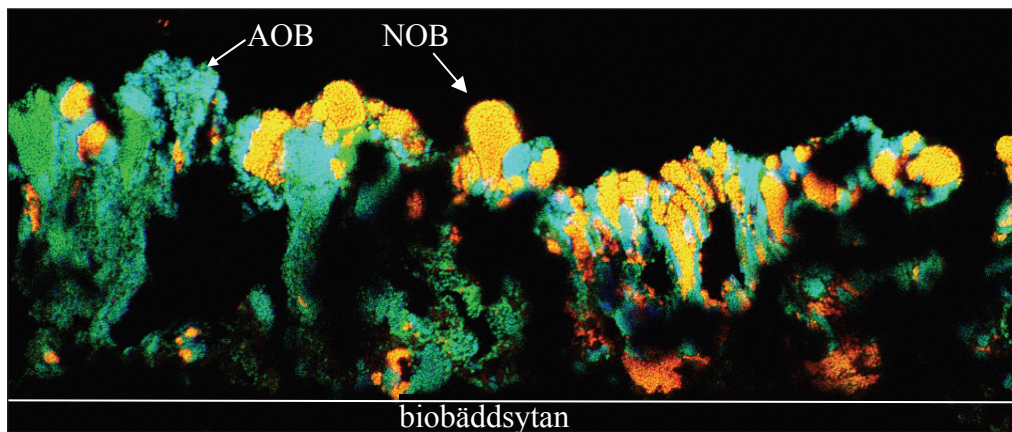
Biofilmen är inte homogent utspridd över ytan på bärarmaterialet, utan växer fläckvis. Biofilmen utsätts för fysiska krafter som gör att större eller mindre delar slits bort, och dessutom är biofilmen utsatt för predation från organismer som äter bakterier. Även fem år efter starten av biobädden på Ryaverket syns en heterogen fördelning av biofilm på plastytan med tomma ytor omväxlande med ytor med mycket biofilm.

I en mindre skala kan vi också se att biofilmen är heterogen. Genom att snitta biofilmen som sitter på biobäddsmaterialet kan vi studera strukturen hos biofilmen. **Figur 4.3-1 (nedan)** från biobäddens översta del visar att AOB och NOB växer tätt tillsammans, men i separata mikrokolonier. Vi ser också vattenkanaler och hålrum, vilket visar en numera klassisk bild av en biofilm.

Tjockleken på biofilmen är en viktig parameter för nitrifikationshastigheten. Tunna biofilmer med hög porositet har visats ge högre nitrifikationshastigheter (Wijeyekoon *et al.* 2004). Detta kan bero på mindre problem med diffusionshinder till de inre delarna av biofilmen (Thörn *et al.* 1996). Generellt är också en tunn biofilm ett tecken på att "nedbrytande" faktorer som predation och ett vattenflöde river bort biofilmsdelar. Nedbrytningen av biofilmen ger naturligtvis en mindre biomassa, men kan samtidigt innebära att de bakterier som finns kvar får en större aktivitet och högre tillväxthastighet (Lee 1996).

Medeltjockleken på biofilmen i biobädden på Ryaverket är 40–80 μm . Biofilmen blir betydligt tunnare med djupet i biobädden (Lydmark *et al.* 2006c). I litteraturen finns rapporter om betydligt tjockare biofilmer i andra verk (Egli *et al.* 2003; Gieseke *et al.* 2003; Okabe *et al.* 1999).

Ett av våra viktigaste resultat var att vi kunde visa att olika populationer av AOB, och i mindre grad NOB, fördelade sig ojämnt vertikalt i biofilmen



Figur 4.3-1 visar ett tvärsnitt genom en nitrifierande biofilm i fullskalanläggningens biobädd på den översta nivån (0,5 m). FISH har använts för att detektera de olika bakterierna; AOB syns i turkos/blå färg och NOB i gulffärg medan grön färg betecknar celler som inte träffas av vare sig AOB eller NOB proborna. Tjockleken på biofilmen är ungefär 100 μm (Lydmark 2006).

(Lydmark *et al.* 2006c). Population I av de två *N. oligotropha*-populationerna i biobädden återfanns högre upp i biofilmen, närmare ytan. Population II visade däremot inte någon preferens för något biofilmsdjup. Detta visar att de två populationerna har olika ekofysiologi trots att de är nära släkt. Detta är ett av de första bevisen för att de olika *N. oligotropha*-populationernas egenskaper påverkar den nitrifierande biofilmen. Det fanns en trend att NOB generellt var överrepresenterad i de inre delarna av biofilmen, men detta är inte statistiskt säkerställt. Det är intressant att de relativt tunna biofilmerna på Ryaverket ändå inducerar miljöförhållanden som är olika i olika delar av biofilmen, och att dessa förhållanden är så starka att bakterierna blir påverkade, samt att de erbjuder så olika förhållanden att fyra olika AOB-populationer samtidigt kan etableras i biofilmen och överleva sida vid sida. Om vi spekulerar om orsakerna till dessa resultat, kan det vara rimligt att AOB som får sin energi från ammonium i vattenfasen, är mer frekvent i de övre delarna av biofilmen, närmare vattenfasen, medan NOB som får sitt substrat från "lokalt" producerad nitrit är överrepresenterad i de inre delarna. AOB har också generellt en högre tillväxthastighet än NOB och kan kanske genom detta bättre stå emot ett predationstryck, som troligen är större på ytan av biofilmen än längre ner. I de djupare delarna av biobädden var biofilmerna betydligt tunnare, och den generella strukturen mer porös och biofilmen innehöll också mindre biomassa (Lydmark *et al.* 2006c).

4.4 Nitrifikationsaktivitet

Genom att vi har kunnat kvantifiera olika AOB och även NOB populationer kan vi beräkna specifika nitrifikationsaktiviteten per cell. Detta är naturligtvis ett viktigt mått på hur effektivt anläggningen fungerar. Målet med reningsprocesserna är att aktiviteten per cell är så hög som möjligt och samtidigt naturligtvis så uthållig som möjlig, med buffert mot höga toppar av inkommande ammonium och stabilitet mot störningar av olika slag.

Den beräknade specifika aktiviteten i fullskalanläggningens biobädd var 5,1 $\text{fmol N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ för AOB, medan motsvarande siffra var 11,4 för NOB (Lydmark *et al.* 2006b). På de rörliga bärarna i pilotanläggningen varierade AOB aktiviteten mellan 2–16 $\text{fmol N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$, och för NOB var aktiviteten 2–12 i de olika tankarna (Lydmark *et al.* 2006d). I aktivslamanläggningen var motsvarande siffror mellan 3–15 $\text{fmol N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ för AOB (Hallin *et al.* 2005).

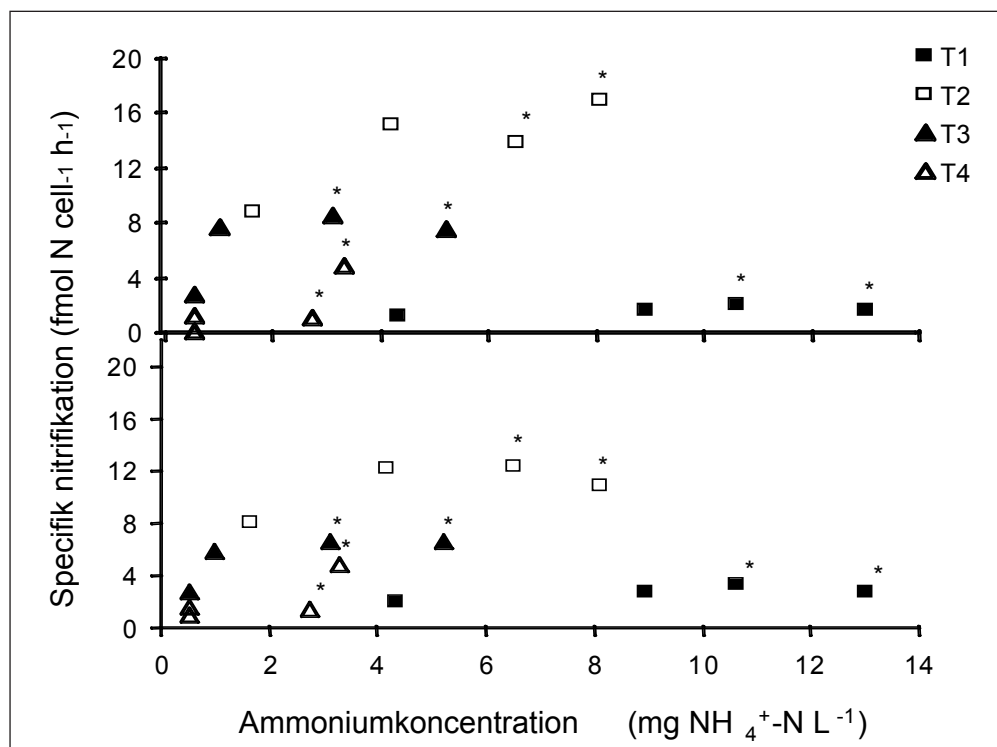
I laboratoriekulturer har AOB aktiviteten mätts till mellan 1,2–23 $\text{fmol N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$, medan i avloppsvatten varierar siffrorna av naturliga skäl mer, här ligger aktiviteten mellan 0,03–56 $\text{fmol N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ (se sammanställning och referenser i (Lydmark 2006). Våra beräknade värden på specifik aktivitet för AOB ligger alltså inom intervallet för både laboratoriestudier och mätningar i avloppsreningsverk. För NOB visar laboratorieresultat mellan 1,2–2,7 $\text{fmol N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ för *Nitrospira* i sötvattensediment, medan de få data som kommer från andra avloppsreningsverk är betydligt lägre; 0,01–0,025 $\text{fmol N cell}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Gieseke *et al.* 2005; Schramm *et al.* 1998). Dessa

sistnämnda är från "fluidized-bed reactors" och "Sequencing Batch Biofilm Reactors" vilka kan vara relativt olika jämfört med de system vi undersökt. Våra uppmätta aktiviteter är alltså höga för att komma från avloppsreningsverk, och om vi över-skattat antalet NOB (se tidigare) så blir aktiviteten per cell ännu högre.

På de rörliga bärarna i de olika tankarna i pilot-anläggningen beräknades specifika nitrifikationen vid olika ammoniumhalter i inkommande vatten (**figur 4.4-1**). Resultaten visar något överraskande att cellaktiviteten för AOB i tank 1 (högst ammoniumkoncentration) är lägre än i de övriga tankarna, och speciellt intressant är att denna inte ökar vid mycket höga belastningar av ammonium utan är konstant lägst av alla tankar. Högst aktivitet återfanns i tank 2. Den högre biomassan i tank 1 (fyra gånger högre än i de andra tankarna) kan göra att det uppstår diffusionsbegränsningar i biofilmen, kanske av syre som visade lägre värden i tank 1 än i de andra tankarna. När det gäller NOB återfanns den högsta specifika aktiviteten i tank 2, vilket kan bero på att AOBs nitritproduktion ger effekt något senare i systemet. Resultaten visar att de olika populationerna i tankarna har olika förmåga att ta hand om toppar i ammoniumbelastningen.

I de jämförelser som tidigare gjorts mellan mät-data och simulerade data från en modell för nitrifierande biofilmer i biobädden var slutsatsen att experimentella och uppmätta data stämde relativt bra överens (Persson *et al.* 2002). Speciellt visade båda likartade trender med djupet på biobädden. Genom att vi nu har utvecklat metoder så att vi kan kvantifiera AOB och NOB i biofilmen kan vi göra andra jämförelser. Modellen och mätta data ger relativt likartade trender när det gäller den relativa andelen av AOB och NOB i biofilmen. Där emot visar modellen ungefär hundra gånger större biomassa än mätningarna med FISH och Realtids-PCR.

Eftersom också mätningarna av tjockleken på biofilmen ger lägre värden än de simulerade, och de specifika aktivitetsmätningarna ligger inom de gränser som andra undersökningar kommit fram till, i alla fall för AOB, så verkar modellen överskatta biomassan. De nya resultaten ger en möjlighet att genom vidare arbete förbättra modellen.



Figur 4.4-1 visar specifika nitrifikationshastigheten per cell i de olika tankarna 1–4 i pilotanläggningen. Övre diagrammet visar AOB aktiviteten och nedre diagrammet visar NOB aktiviteten. Notera att vid en del av mätningarna (*) är ammoniumhalten relativt hög även i tank 4 (3–4 mg NH₄⁺-N per liter). Detta gör att dessa mätningar kan ses mer som potentialmätningar (modifierad efter Lydmark *et al.* 2006d).

4.5 Nitrifikation vid olika driftstrategier

Genom att utnyttja pilotanläggningen kunde vi undersöka hur olika driftstrategier kan påverka nitrifikationspotentialen (Brunström *et al.* 2006). Nitrifikationspotentialen är här nitrifikationshastigheten när biobädden under en kort tid förses med hög ammoniumhalt (från inkommande vatten, före tank 1) så att inte all ammonium kunde nitrifieras över biobäddarna. Förändringar i ammoniumhalterna gjordes genom att pilotanläggningens fyra biobäddar, som består av samma material som används i fullskalanläggningen, fick vatten antingen från tank 1 eller från tank 4 (**figur 4.5-1**).

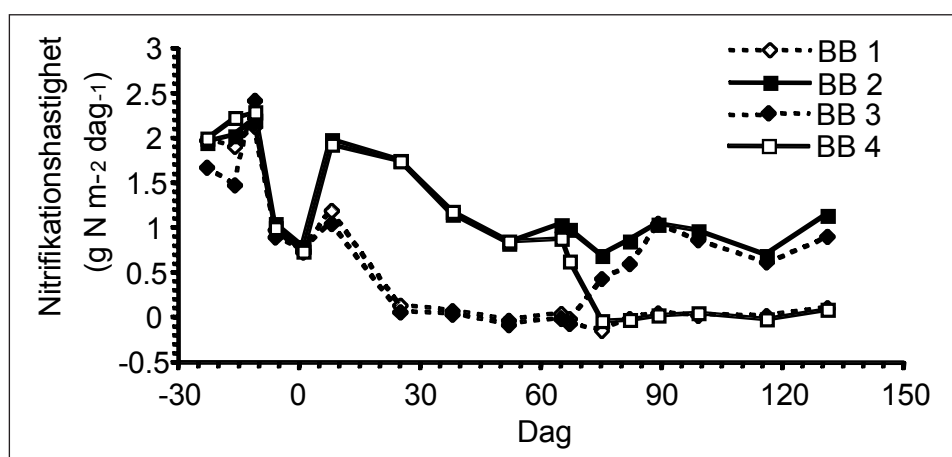
Största skillnaden på vattnet är att ammoniumhalten är hög i vatten från tank 1 och låg i vatten från tank 4. Efter en inledande period där alla biobäddar fick samma vatten (tank 1) var nitrifikationspotentialen lika hög i alla biobäddarna. Därefter fick biobädd 1 och 3 låg och 2 och 4 hög ammoniumhalt. Nitrifikationspotentialen för 1 och 3 sjönk snabbt ner till låga värden, medan de var ungefär konstanta i biobädd 2 och 4. Nedgången i 1 och 3 var stor redan under de första 25 dagarna. Detta kan jämföras med populationsförändringarna där de biofilmer som flyttats från tank 1 till tank 4 inte förändrades speciellt mycket (se figur 4.2.1-1).

Efter 60 dagar ändrades ammoniumhalterna igen; biobädd 3 fick hög halt och biobädd 4 fick låg halt, medan 2 och 1 låg kvar på hög, respektive låg halt. Även här förändrades nitrifikationspotentialen som

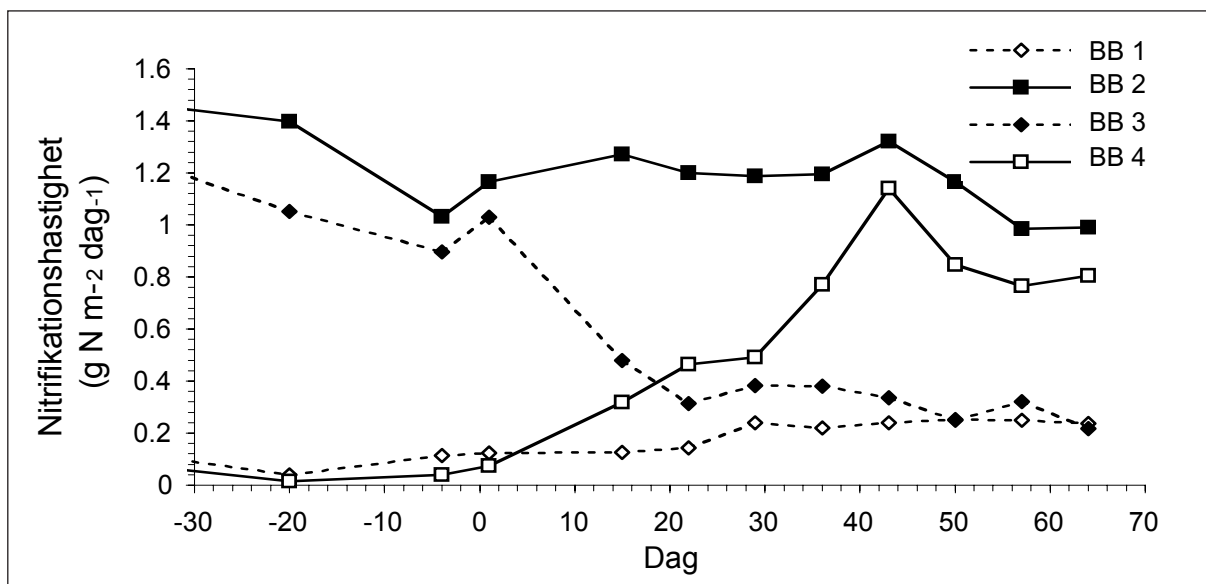
förväntat och biobädd 4 sjönk ner till en låg potential medan 3 ökade upp till kontrollen.

Efter att bäddarna hade stabiliserats på sina respektive nivåer gjordes ett nytt försök (**figur 4.5-2**) där biobädd 1 varje vecka under tiden försöket pågick fick vatten från tank 4 under sex dagar och från tank 1 under en dag (d.v.s. hög ammoniumhalt 1 dag, och låg 6 dagar). Biobädd 4 fick varje vecka vatten från tank 4 under fyra dagar och från tank 1 under tre dagar (d.v.s. hög ammoniumhalt 3 dagar, låg under 4 dagar). Biobädd 2 fick kontinuerligt hög halt och biobädd 3 skiftades ner till en låg halt vid försökets början som en låg kontroll. Resultaten visade att biobädd 4 (med 3/4 schemat) efter 60 dagar hade en nästan lika hög nitrifikationspotential som biobädd 2, men att biobädd 1 (med 1/6 schema) under samma tid inte ökade sin potential alls utan låg kvar på de låga nitrifikationspotentialer som biobädd 3 fick.

Resultaten visar att periodvisa ändringar i ammoniumhalten kan förändra potentialen för att ta hand om plötsliga toppar i ammoniumkoncentrationer, om perioden då ammoniumhalten är hög är tillräckligt lång. Förändringarna i aktivitet är mycket snabbare än de populationsändringar som mättes tidigare (se figur 4.2.1-1), vilket antyder att varje cell har en förmåga att ändra sin metabolism.



Figur 4.5-1 visar nitrifikationspotential (baserat på ammoniumkoncentrationer) i biobäddarna (BB) i pilotanläggningen. BB får vatten från olika tankar i pilotanläggningen och därmed olika ammoniumkoncentrationer. Initialt får alla BB samma höga ammoniumkoncentration. Dag 0 får BB1 och 3 låg halt och BB2 och 4 hög halt, vid dag 60 skiftas BB3 upp till hög halt och BB4 skiftas ner till låg halt medan BB2 och BB1 fortsätter på hög, respektive låg halt (se texten för vidare förklaring). Modifierad efter Brunström *et al.* 2006.



Figur 4.5-2 visar nitrifikationspotential (baserat på ammoniumkoncentrationer) i biobäddarna (BB) i pilotanläggningen. BB får vatten från olika tankar i pilotanläggningen och därmed olika ammoniumkoncentrationer. Skillnaden från figur 3.5-1 är att från dagen 0 fick BB 1 och 4 vatten med omväxlande höga och låga ammoniumkoncentrationer under olika dagar de veckor försöket pågick (se texten för vidare förklaring). Modifierad efter Brunström *et al.* 2006.

5 Sammanfattande diskussion

Pilotanläggningen, både serien av tankar med rörliga bärare och pilotbiobäddarna, representerade på ett bra sätt de olika nivåerna i fullskaleanläggningens biobädd, och vi kunde experimentellt studera processerna och fick fram resultat som varit omöjligt att ta fram på annat sätt.

En tydlig slutsats från alla försöken är att populationerna representerar en basnivå som bestämmer de yttre ramarna för processen, men eftersom det var tydligt att aktiviteten ändrades mycket snabbare än populationssammansättningen kan varje cell ha ett förvånansvärt stort intervall inom vilket de kan förändra sin metabolism för att anpassa sig till föränderliga miljöförhållanden. Detta var tydligt både i biofilmsystemen på Ryaverket och i aktivslamanläggningen på Henriksdal. Denna anpassning av metabolismen till nya förhållanden klarades av på 30–40 dagar medan skiftningen av populationer tog i storleksordningen 40–60 dagar.

Det är tydligt att det går att åstadkomma en hög nitrifikationskapacitet i en biofilmsanläggning trots periodvis låg belastning genom att kontrollera ammoniumbelastningen. Denna högre nitrifikationskapacitet är inte nödvändigtvis bara ett resultat av

en populationsförskjutning utan tycks också vara ett resultat av att metabolismen hos nitrifierarna i biofilmsanläggningen hålls på en högre nivå. Men eftersom vi inte har ett heltäckande batteri av prover så kan vi inte med säkerhet veta hur alla nitrifierares dynamik ser ut. En intressant fråga här är t.ex. om det i en fluktuerande ammoniumhalt selekteras fram speciella populationer som vi inte har detekterat än.

Kartläggning av populationer över tiden tillsammans med en koppling till driftdata ger ett verktyg att arbeta med för kända igen situationer med bra eller dålig effektivitet, och för att styra processen mot ett mål baserat på kunskap. Här behöver vi koppla ingående kunskap om driftsparametrar till avancerade biologiska metoder.

Vi kommer att gå vidare med ett antal delprojekt för att följa upp detta projekt. Fortfarande är det så att det krävs betydligt mer biologiska kunskaper för att modellerna skall bli riktigt värdefulla som verktyg. Detta bör inte hindra oss från att bygga in det vi redan vet på ett bättre sätt i nuvarande modeller, inte minst för att det kan vara ett bra sätt att definiera nya frågor och att få in kunskapen i ett gripbart system. Här kan de nya metoder och angreppssätt som växer fram inom forskningsområdet "Systembiologi" vara en hjälp. I denna relativt unga gren av biologin används matematiska modeller för att simulera fysiologiska processer inom en cell. Modellerna kan i framtiden förbättras genom att bygga på bättre biologiska data om t.ex. strukturen

på biofilmen inklusive var i biofilmen olika bakterier växer, bakteriell tillväxt, men också överlevnad av celler. Det senare skulle alltså betyda att vi inte bara gav en tillväxtkonstant för alla AOB utan en för varje av de olika populationer som finns i biofilmen och dessutom gav information om hur olika populationer överlever under suboptimala- eller svältförhållanden.

En fråga som vi inte kunde ställa i detta projekt men som också är viktigt för framtiden är hur mycket av populationsförändringarna som är slump och hur mycket som beror på selektion. Hur mycket är sammansättningen av biofilmens bakterier styrt

av vad som kommer till avloppsreningsverket under olika tider och hur mycket beror på att själva förhållandena i reningsverket ger en så stark selektion att speciella kombinationer av populationer byggs upp? Få undersökningar har studerat detta, men det är centralt för frågan om vad som kan styras och hur man skall styra processerna.

Att använda pilotanläggningen för att testa praktiska driftsstrategier gav mycket intressanta resultat som skulle kunna (efter fler tester) omsättas i praktiken.

Referenser

Arp, D. J., Sayavedra-Soto, L. A. & Hommes, N. G. (2002) Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol*, 178, 250–5.

Battin, T. J., Wille, A., Sattler, B. & Psenner, R. (2001) Phylogenetic and Functional Heterogeneity of Sediment Biofilms along Environmental Gradients in a Glacial Stream. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 799–807.

Bock, E. & Wagner, M. (2001) Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. In Dworkin *et al.*, H. (Ed.) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition, release 3.7. New York, Springer-Verlag.

Boesch, D., Hecky, R., O'Melia, C., Schindler, D. & Seitzinger, S. (2005) Eutrophication of Swedish Seas. Stockholm, Sweden, Naturvårdsverket.

Bollmann, A. & Laanbroek, H. J. (2002) Influence of oxygen partial pressure and salinity on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the Schelde estuary. *Aquat Microb Ecol*, 28, 239–247.

Broda, E. (1977) Two kinds of lithotrophs missing in nature. . *Z Allg Mikrobiol* 17, 491–493.

Brunström, R., Lydmark, P., Lindgren, P.-E., Sörensson, F. & Hermansson, M. (2006) Changes in nitrifying capacity due to different ammonium loading in nitrifying trickling filters of a wastewater treatment pilot plant. *Manuscript to be published*.

Chain, P., Lamerdin, J., Larimer, F., Regala, W., Lao, V., Land, M., Hauser, L., Hooper, A., Klotz, M., Norton, J., Sayavedra-Soto, L., Arciero, D., Hommes, N., Whittaker, M. & Arp, D. (2003) Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol*, 185, 2759–73.

Coskuner, G. & Curtis, T. P. (2002) In situ characterization of nitrifiers in an activated sludge plant: detection of *Nitrobacter* spp. *J Appl Microbiol*, 93, 431–7.

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

- Daims, H., Nielsen, P. H., Nielsen, J. L., Juretschko, S. & Wagner, M. (2000) Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water Science and Technology*, 41, 85–90.
- Daims, H., Purkhold, U., Bjerrum, L., Arnold, E., Wilderer, P. A. & Wagner, M. (2001) Nitrification in sequencing biofilm batch reactors: lessons from molecular approaches. *Water Sci Technol*, 43, 9–18.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280, 295–298.
- Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G., Gregory, I. R., Robinson, K. G. & Sayler, G. S. (2002) Quantification of Nitrosomonas oligotropha-like ammonia-oxidizing bacteria and Nitrospira spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Appl Environ Microbiol*, 68, 245–53.
- Egli, K., Bosshard, F., Werlen, C., Lais, P., Siegrist, H., Zehnder, A. J. & van der Meer, J. R. (2003) Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microb Ecol*, 45, 419–32.
- Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P. J. J., Siegrist, H., van der Meer, J. R. & Zehnder, A. J. B. (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch Microbiol*, 175, 198–207.
- Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M. & Amann, R. (2003) Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environ Microbiol*, 5, 355–69.
- 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, 1392–404.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R. & Schramm, A. (2001) Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl Environ Microbiol*, 67, 1351–62.
- Hallin, S., Lydmark, P., Kokalj, S., Hermansson, M., Sorensen, F., Jarvis, A. & Lindgren, P. E. (2005) Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 629–640.
- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. & Sayler, G. S. (2003) Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science & Technology*, 37, 343–351.

Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B. & Stahl, D. A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437, 543–546.

Koops, H.-P. & Pommerening-Röser, A. (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology Ecology*, 37, 1–9.

Koops, H. P., Purkhold, U., Pommerening-Röser, A., Timmermann, G. & Wagner, M. (2003) The lithoautotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In Dworkin *et al.*, H. (Ed.) *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3rd edition, release 3.13. New York, Springer-Verlag.

Lee, N. M. (1996) Parameters affecting microorganisms and the process performance in biological wastewater treatment. *Department of Biotechnology, Center for Chemistry and Chemical Engineering*. Lund, Sweden, Lund University.

Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F. & Yagi, O. (2004) Distribution of ammonia-oxidizing bacteria in sewage activated sludge: analysis based on 16S rDNA sequence. *Water Science and Technology*, 50, 9–14.

Limpiyakorn, T., Shinohara, Y., Kurisu, F. & Yagi, O. (2005) Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. *FEMS Microbiol Ecol*, 54, 205–17.

Lydmark, P. (2006) Population dynamics of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment. *PhD Thesis, Department of Cell- and Molecular Biology, Microbiology*. Göteborg, Göteborg University.

Lydmark, P., Brunström, R., Samuelsson, K., Lindgren, P.-E., Sörensson, F. & Hermansson, M. (2006a) Responses in population dynamics of nitrifying bacterial communities to shifts in environmental conditions – experiments in a pilot wastewater treatment plant. *Manuscript to be published*.

Lydmark, P., Kokalj, S., Stendahl, J., Sörensson, F., Hermansson, M. & Lindgren, P.-E. (2006b) Distribution and quantification of nitrifying populations in a full-scale trickling filter biofilm as determined by 16S rRNA analysis. *Submitted for publ.*

Lydmark, P., Lind, M., Sörensson, F. & Hermansson, M. (2006c) Vertical distribution of nitrifying populations in bacterial biofilms from a fullscale nitrifying trickling filter *Environ. Microbiol*, doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01085.x.

Lydmark, P., Samuelsson, K., Brunström, R., Mattsson, A., Sörensson, F., Hermansson, M. & Lindgren, P.-E. (2006d) Effects of different ammonium concentrations on the nitrifying population dynamics in a pilot wastewater treatment plant. *Submitted for publication*.

Mulder, A. (1992) Anoxic ammonium oxidation, US patent 427849 (5078884). USA.

- Mulder, A., Graaf, A. A., Robertson, L. A. & Kuenen, J. G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16, 177–184.
- Okabe, S., Kindaichi, T., Ito, T. & Satoh, H. (2004) Analysis of size distribution and areal cell density of ammonia-oxidizing bacterial microcolonies in relation to substrate microprofiles in biofilms. *Biotechnol Bioeng*, 85, 86–95.
- Okabe, S., Satoh, H. & Watanabe, Y. (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3182–91.
- Otto, K., Norbeck, J., Larsson, T., Karlsson, K.-A. & Hermansson, M. (2001) Adhesion of Type 1-Fimbriated *Escherichia coli* to Abiotic Surfaces Leads to Altered Composition of Outer Membrane Proteins. *J. Bacteriol.*, 183, 2445–2453.
- Park, H. D. & Noguera, D. R. (2004) Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Res*, 38, 3275–86.
- Persson, F., Wik, T., Sörensson, F. & Hermansson, M. (2002) Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter. *Water Res*, 36, 1439–48.
- Pitois, S., Jackson, M. H. & Wood, B. J. B. (2001) Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae: An overview. *J. of Environ. Health*, 64, 25.
- Poughon, L., Dussap, C. G. & Gros, J. B. (2001) Energy model and metabolic flux analysis for autotrophic nitrifiers. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 416–433.
- Robinson, K. G., Dionisi, H. M., Harms, G., Layton, A. C., Gregory, I. R. & Sayler, G. S. (2003) Molecular assessment of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 48, 119–126.
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J. C., Ottengraf, S. & Amann, R. (1999) Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3690–6.
- Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M. & Amann, R. (1998) Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3480–5.
- Schramm, A., Larsen, L. K., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R. & Schleifer, K.-H. (1996) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4641–4647.

- Thörn, M., Mattsson, A. & Sörensson, F. (1996) Biofilm development in a nitrifying trickling filter. *Wat Sci Technol*, 34, 83–89.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H. & Smith, H. O. (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304, 66–74.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N. & Daims, H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 665–680.
- Wijeyekoon, S., Mino, T., Satoh, H. & Matsuo, T. (2004) Effects of substrate loading rate on biofilm structure. *Water Res*, 38, 2479–88.
- Wik, T. (1999) On modeling the dynamics of fixed biofilm reactors. *PhD thesis*, Chalmers University of Technology, Goteborg, Sweden. ISBN 91-7197-797-X (<http://www.s2.chalmers.se/publications>).
- Wik, T. (2000) Strategies to improve the efficiency of tertiary nitrifying trickling filters. *Water Science and Technology*, 41, 477–485.
- Wimpenny, J., Manz, W. & Szewzyk, U. (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev*, 24, 661–71.
- Wuertz, S., Okabe, S. & Hausner, M. (2004) Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. *Water Sci Technol*, 49, 327–36.

Bilaga A: Vetenskaplig rapportering från projektet

Mini-symposier :

Mini-symposium on Nitrification and Wastewater treatment Söderköping, 7–9 maj 2003. Ett 20-tal medverkande från bl.a. University of Tokyo, universiteten i Linköping, Göteborg, Aalborg, Sveriges Lantbruksuniversitet samt ANOX AB.

Microbial ecosystems in wastewater processes and medicine, Vadstena, 14–15 april 2005, Ett 20-tal medverkande bl.a. från universiteten i Linköping, Göteborg, Lund.

Posterpresentationer vid internationella vetenskapliga symposier och konferenser:

Kokalj, S., P. Lydmark, M. Hermansson, F. Sörensson & P.-E. Lindgren. Investigation of the ammonia-oxidizing bacterial community in a full-scale trickling filter as determined by 16S rRNA analysis. Biofilms in Industry, Medicine & Environmental Biotechnology, Galway, Ireland, 9th–14th August 2003. Poster

Samuelsson K, P. Lydmark, L. Toftgård, M. Hermansson, F. Sörensson & P.-E. Lindgren. Comparison of PCR/DGGE primer-pairs for determination of population diversity of ammonia-oxidizing bacteria in a pilot wastewater treatment plant. 8th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO), Lyon, France, 26–29th June 2005. Poster

Lydmark P, Samuelsson K, Brunström, R, Sörensson F, Hermansson M & Lindgren P-E. Nitrification in a pilot wastewater treatment plant – effects of substrate conditions on the population dynamics of ammonia-oxidizing bacteria. FEMS Congress, Madrid, Spain. July 2006.

Brunström, R. Lydmark, P. Sörensson, F. Hermansson, M. Responses in nitrification potential and population dynamics of nitrifying biofilms due to shifted ammonium levels. 11th International Symposium on Microbial Ecology. Vienna, August 20–25, 2006.

Artiklar i internationella vetenskapliga tidskrifter:

Brunström, R., Lydmark, P., Lindgren, P.-E., Sörensson, F. & Hermansson, M. (2006) Changes in nitrifying capacity due to different ammonium loading in nitrifying trickling filters of a wastewater treatment pilot plant. *Manuscript, to be publ.*

Hallin, S., Lydmark, P., Kokalj, S., Hermansson, M., Sörensson, F., Jarvis, A. & Lindgren, P. E. (2005) Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 629–640.

(En av CSLM bilderna på AOB från artikeln blev utvald som omslagsbild på tidskriften *J. Appl. Microbiology*)

Lydmark, P., Brunström, R., Samuelsson, K., Lindgren, P.-E., Sörensson, F. & Hermansson, M. (2006a) Responses in population dynamics of nitrifying bacterial

communities to shifts in environmental conditions – experiments in a pilot wastewater treatment plant. *Manuscript, to be publ.*

Lydmark, P., Kokalj, S., Stendahl, J., Sörensson, F., Hermansson, M. & Lindgren, P.-E. (2006b) Distribution and quantification of nitrifying populations in a full-scale trickling filter biofilm as determined by 16S rRNA analysis. *Submitted for publ.*

Lydmark, P., Lind, M., Sörensson, F. & Hermansson, M. (2006c) Vertical distribution of nitrifying populations in bacterial biofilms from a fullscale nitrifying trickling filter *Environ. Microbiol*, doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01085.x.

Lydmark, P., Samuelsson, K., Brunström, R., Mattson, A., Sörensson, F., Hermansson, M. & Lindgren, P.-E. (2006d) Effects of different ammonium concentrations on the nitrifying population dynamics in a pilot wastewater treatment plant. *Submitted for publication.*

Avhandlingar:

Lydmark, P. (2006) Population dynamics of nitrifying bacteria in biological wastewater treatment. PhD. Thesis, *Department of Cell- and Molecular Biology, Microbiology*. Göteborg, Göteborg University.



Box 47607 117 94 Stockholm

Tfn 08 506 002 00

Fax 08 506 002 10

E-post svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se