



UPPSALA  
UNIVERSITET

UPTEC W 13021

Examensarbete 30 hp  
Juni 2013

# Metoder för aktivitetstest av anammox och ammoniakoxiderande bakterier på bärarmaterial

Methods for activity tests of anammox and  
ammonia oxidizing bacteria on carrier material

---

Ida Gustafsson



## REFERAT

### **Metoder för aktivitetstest av anammox och ammoniakoxiderande bakterier på bärarmaterial**

*Ida Gustafsson*

I och med övergödningsproblematiken i Östersjön och Sveriges åtaganden i samband med Baltic Sea Action Plan kommer det i framtiden ställas högre krav på rening av kväve från de större avloppsreningsverken i Sverige.

Anammox är processen där ammonium oxideras till kvävgas med nitrit som elektronacceptor. Anammox har under den senare tiden implementerats för rejektvattenbehandling i avloppsreningsverk runt om i världen. När anammox används för att rena ammonium krävs att ca hälften av inkommande ammonium oxideras till nitrit genom nitrifikation. Detta steg utförs av ammoniakoxiderande bakterier (AOB) vilka kräver en aerob miljö. Den kombinerade processen med anammox och nitrifikation kallas deammonifikation. På Sjölunda avloppsreningsverk i Malmö har en pilotstudie, i samarbete med VA-teknik på Lunds Tekniska Högskola, startats för att undersöka potentialen i att implementera deammonifikation i huvudströmmen på reningsverket. Detta examensarbete har syftat till att utarbeta metoder för aktivitetstest av anammox och AOB på bärarmaterial från pilotanläggningen. Med de utarbetade metoderna studerades sedan anammoxbakteriernas aktivitet vid förändrad temperatur.

Eftersom anammox producerar kvävgas kunde en metod som baseras på tryckmätning utarbetas för att bestämma anammoxaktiviteten. Metoden visade sig vara tidseffektiv och enkel att utföra. I examensarbetet framkom resultat som visar på att anammoxaktiviteten är beroende av startkoncentrationen av nitrit vid startkoncentrationer under 75 milligram kväve per liter (mg N/l). Beroendet följer av diffusionsbegränsningar i biofilmen vid lägre koncentrationer. Vid startkoncentrationer i intervallet 75-150 mg N/l var aktiviteten oberoende av startkoncentrationen. Vid koncentrationer över 150 mg N/l konstaterades en aktivitetsminskning som troligtvis beror på nitritinhibering.

Metoden som arbetades fram för aktivitetstest av AOB baserades på att mäta syrerpirationen innan och efter tillsats av ammonium i en alternerande syresatt reaktor. I metoden skulle en inhibitor för nitritoxiderande bakterier,  $\text{NaClO}_3$ , tillsättas vid slutet av försöket för att säkerställa att dessa bakterier inte konsumerar syre och därmed påverkar resultatet. Vid tillsats av inhibitorn uppstod en orimligt stor aktivitetsförlust som tyder på att denna även inhiberar AOB.

Anammoxaktivitetens temperaturberoende analyserades genom aktivitetmätning vid fyra temperaturer, i intervallet 11,1-24,9 °C. Försöken visade att förhållandet var exponentiellt och att vid en temperatursänkning från 24,9 °C till 11,1 °C förloras 93 % av aktiviteten.

Nyckelord: Anammox, AOB, Aktivitetstest, Temperaturberoende, Kväverening.

*Vattenförsörjnings- och avloppsteknik, Institutionen för Kemiteknik, Box 124, SE- 221 00 Lund, Sverige*

## **ABSTRACT**

### **Methods for Activity Tests of Anammox and Ammonia Oxidizing Bacteria on Carrier Material**

Ida Gustafsson

Given the problem with eutrophication in the Baltic Sea and Sweden's obligations in the Baltic Sea Action Plan, a higher requirement on the removal of nitrogen from the major wastewater treatment plants is expected to be set in the future.

Anammox is the process where ammonium is oxidized to nitrogen gas with nitrite as electron acceptor. Anammox has been implemented for treatment of the sludge liquor in wastewater treatment plants around the world. When anammox is used to reduce ammonium, the process requires about half the incoming ammonium to be oxidized into nitrite. This is conducted by ammonia oxidizing bacteria (AOB) that require an aerobic environment. The combined process with anammox and nitrification is called deammonification. A pilot study is taking place at Sjölanda Wastewater Treatment Plant in Malmö in collaboration with Water and Environmental Engineering, Department of Chemical Engineering, Lund University. The aim of the pilot study is to explore the potential of implementing deammonification in the main stream at the wastewater treatment plant. The aim of this Master Thesis is to develop methods for activity tests of Anammox and AOB on carrier material. The elaborated methods were then supposed to be used to study the change in activity with decreasing temperature.

Since anammox produces nitrogen gas a method based on pressure measurements was developed to determine the anammox activity. The results in this thesis showed that the anammox activity was dependent of the initial concentration of nitrite at concentrations below 75 mg N / L. This dependence is a result of the limitations of the diffusion in the biofilm at low concentrations. When the initial concentration of nitrite was within the range of 75 to 150 mg N / L the activity was independent of the initial concentration. At concentrations above 150 mg N / L there was a decrease in activity which probably occurred as a result of nitrite inhibition.

To determine the activity of AOB a method based on the oxygen consumption rate was developed. The aeration switched between being turned on and off every five minutes and after some rounds of aeration, ammonium was added. The AOB activity was determined by calculating the difference between the oxygen consumption before and after the addition of ammonium. To ensure that nitrite-oxidizing bacteria (NOB) were not consuming any oxygen, NaClO<sub>3</sub> was added at the end of the experiment. The resulting decrease in activity was too excessive to only represent the activity loss from only NOB which may suggest that NaClO<sub>3</sub> also inhibits AOB.

The temperature dependence of anammox activity was analyzed in activity tests at four temperatures in the range of 11.1 to 24.0°C. The experiments concluded that the relationship was exponential and by a drop in temperature from 24.9 °C to 11.1 °C 93% of the activity was lost.

**Keywords:** Anammox, AOB, Activity test, Temperature dependence, Nitrogen removal.

*Water and Environmental Engineering, Department of Chemical Engineering, Lund University, Box 124, SE- 221 00 Lund, Sweden*

## FÖRORD

Med detta examensarbete avslutar jag mina fem års studier på Civilingenjörsprogrammet i miljö- och vattenteknik på Uppsala universitet. Examensarbetet omfattar 30 högskolepoäng och har utförts under våren 2013. Examinator för examensarbetet var Fritjof Fagerlund. Examensarbetet har varit en del av ett pilotprojekt i samarbete mellan VA SYD och VA-teknik, institutionen för kemiteknik på Lunds Tekniska Högskola. Handledare för examensarbetet var David Gustavsson, utredningsingenjör process på avloppsvattenavdeningen, VA SYD. Ämnesgranskare var professor Jes la Cour Jansen, VA-teknik på institutionen för kemiteknik på Lunds Tekniska Högskola.

Jag vill rikta ett varmt tack till min handledare David Gustavsson och min ämnesgranskare Jes la Cour Jansen. Ert engagemang inom VA är mycket inspirerande och jag är väldigt tacksam över att jag har fått chansen att arbeta med er under våren. Ett stort tack riktar jag även till Salar Haghghatafshar och Gertrud Persson på VA-teknik, LTH för all hjälp på lab och för att ni ställt upp när jag har haft frågor och funderingar. Ytterligare ett tack riktas till alla på institutionen för kemiteknik som gjort min vistelse LTH till ett trevligt minne samt till Katharina och Emelie för hjälp med korrekturläsning.

Avslutningsvis vill jag rikta ett hjärtligt tack till min familj och mina vänner, jag kan inte sätta ord på hur mycket jag uppskattar ert stöd.

Ida Gustafsson

Lund, juni 2013

## POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Övergödning av hav, sjöar och vattendrag har varit ett uppmärksammat miljöproblem under en lång tid. Övergödning uppstår när för mycket näringsämnen, speciellt kväve och fosfor, släpps ut till recipienten. För mycket näringsämnen bidrar till en ökad tillväxt av syreförbrukande organismer som växtplankton och alger vilket leder till en ökad syrekonsumtion och därmed syrebrist på havsbotten. Syrebristen resulterar i en minskad biologisk mångfald på botten då de organismer som lever där är beroende av syre. Östersjön är, trots insatser för att minska utsläppen av näringsämnen, fortfarande övergödd. Sverige har i och med Helsingforskommissionens Baltic Sea Action Plan åtagit sig att minska sina utsläpp av näringsämnen.

När det gäller avloppsreningsverk kommer reningskraven för kväve och fosfor öka i framtiden. Kväve i avloppsvatten har sitt ursprung från mänsklig konsumtion av proteinhaltig föda som lämnar kroppen som urinämnen. På väg till reningsverket omvandlas urinämnen till ammonium. I reningsverket avlägsnas ammoniumet med hjälp av mikroorganismer. Mikroorganismerna använder syre och kol för att omvandla ammoniumet till kvävgas som avgår till atmosfären. De konventionella metoderna kräver alltså syresättning av vattnet och även tillsats av kolkälla, ofta i form av metanol. En högre reningsgrad än vad som finns idag kan uppnås men då krävs mer luftning och mer kolkälla, något som kräver energi och förbrukar fossila råvaror.

Då utvecklingen går mot strängare reningskrav undersöks nya lösningar för kväverening. Under mitten på 1980-talet påvisades bakterier som kan rena ammonium utan att förbruka syre vilket är attraktivt då syresättning av bassänger kräver stora mängder energi. Bakterierna namngavs anammox (anaerobic ammonium oxidation) och använder nitrit istället för syre då de omvandlar ammoniumet till kvävgas. I de reningslösningar som finns för anammox omvandlas hälften av inkommande ammonium till nitrit av ammoniakoxiderande bakterier (AOB). Dessa bakterier kräver syre så en visst luftningsbehov finns. Den gemensamma processen där AOB omvandlar hälften av inkommande ammonium till nitrit vilket sedan används för att bilda kvävgas av resterande ammonium med anammoxbakterier kallas deammonifikation. Deammonifikation kan åstadkommas i en reaktor genom att låta mikroorganismerna växa på bärrmaterial, som är små plastcylinderskal där bakterierna växer på insidan. På bärrmaterialet växer anammox närmast väggarna och utanför växer AOB. På så vis kan reaktorn luftas måttligt så att bara AOB får tillgång till syre samtidigt som anammoxbakterierna lever i en syrefri miljö.

I dagsläget har deammonifikation främst implementerats i avloppsreningsverk för att behandla det varma och ammoniumrika rejektivattnet. På Sjölanda avloppsreningsverk i Malmö har pilotstudier startats, i samarbete med VA-teknik på LTH, för att undersöka potentialen i att använda deammonifikation för att rena kväve i huvudströmmen på verket. Detta examensarbete hade syftet att arbeta fram metoder för att mäta aktiviteten för anammoxbakterier och AOB så att dessa kan följas i pilotstudien. Genom att kunna mäta aktiviteten kan utvecklingen i pilotanläggningen följas i framtiden.

Då anammoxbakterier bildar kvävgas utarbetades en metod där dess aktivitet bestämdes genom att mäta tryckförändringen i en sluten behållare. Metoden baseras på att en viss mängd nitrit och ammonium tillsätts till en förslutningsbar behållare med ett bestämt antal bärare i en bestämd mängd kranvatten. Trycket mäts sedan i 50 minuter och tryckökningshastigheten i tidsintervallet 40-50 minuter används för att bestämma aktiviteten genom ideala gaslagen. Hur mängden tillsatt ammonium och nitrit påverkade aktiviteten undersöktes noggrant, i metoden önskades startkoncentrationer som inte

medförde en hämning av aktiviteten. Genom studien framkom att startkoncentrationer under 75 mg N/l påverkade aktiviteten medan koncentrationer i intervallet 75-150 mg N/l inte gjorde det. Startkoncentrationer över 150 mg N/l medförde en aktivitetsminskning. Anledningen till att aktiviteten påverkas vid låga koncentrationer är att nitriten och ammoniumet då inte når alla bakterier i biofilmen.

För att studera AOBs aktivitet valdes en metod som baseras på att mäta hur mycket syre bakterierna förbrukar. Detta görs genom att alternera mellan att lufta och att inte lufta en reaktor med känd mängd bärare och känd mängd kranvatten och samtidigt mäta syrehalten. När reaktorn luftas ökar syrehalten och när syretillförseln stoppas minskar den. Genom att först låta syret alternera några gånger och sedan tillsätta ammonium och låta alterneringen fortsätta kan aktiviteten fås som den förändrade hastigheten med vilken syrehalten avtar när reaktorn inte luftas. I takt med att AOB förbrukar ammoniumet bildas nitrit. Det finns en risk för att det finns nitritoxiderande bakterier (NOB) i biofilmen som använder nitritet för att bilda nitrat. Denna omvandling förbrukar också syre vilket alltså också syns i syremätningen. För att ta bort NOBs bidrag till syreförbrukningen användes natriumklorat vilket hämmar NOB. Resultaten som erhöles från försöken tyder dock på att natriumkloratet även inhiberade AOB då mestadel av aktiviteten i reaktorn försvinner vid tillsats. Den grundläggande metodiken anses fungera bra dock drogs slutsatsen att natriumklorat inte fungerar som hämmare för NOB i denna försöksserie.

Ett ytterligare syfte i examensarbetet var att studera aktiviteten för anammox och AOB vid lägre temperaturer. Eftersom metoden för aktivitetstest för AOB inte fungerade utfördes endast temperaturstudien för anammox. Studien genererade ett exponentiellt samband mellan anammoxaktivitet och temperaturen. Resultaten visade att en viss aktivitet kvarstår vid temperaturer ner mot 10 °C, dock minskade aktiviteten med 93 % vid en temperatursänkning från 24,9 °C till 11,1 °C.

## FÖRKORTNINGAR

Anammox	Anaerob ammoniumoxidation
AOA	Ammoniakoxiderande arkeer
AOB	Ammoniakoxiderande bakterier
AUR	Test för att mäta hur fort bakterier avlägsnar ammonium (Ammonium utilization rate)
BOD	Biokemisk syreförbrukning
Manammox	Anammox i huvudströmmen (Mainstream anammox)
MBBR	Reaktor med rörligt bärrmaterial (Moving Bed Biofilm Reactor)
NOB	Nitritoxiderande bakterier
NUR	Test för att mäta hur fort bakterier avlägsnar nitrit (Nitrite utilization rate)
OUR	Syrerespirationshastighet (Oxygen uptake rate)
SAA	Specifik anammoxaktivitet



# INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1.	INLEDNING .....	1
2.	SYFTE.....	2
2.1	ARBETSGÅNG.....	2
3.	BAKGRUND .....	3
3.1	SJÖLUNDA AVLOPPSRENINGSVERK.....	3
3.1.1	Manammox – pilotstudie på Sjölundas avloppsreningsverk.....	3
4.	TEORI .....	5
4.1	KVÄVE OCH DESS KRETSLOPP .....	5
4.2	KONVENTIONELL KVÄVERENING .....	5
4.2.1	Nitrifikation .....	6
4.2.2	Denitrifikation .....	6
4.3	ANAMMOX – ANAEROB AMMONIUMOXIDATION.....	7
4.3.1	Deammonifikationsprocessen.....	7
4.3.2	Faktorer som påverkar anammox och deammonifikationsprocessen.....	8
4.4	MBBR – REAKTORER MED RÖRLIGT BÄRARMATERIAL .....	9
4.4.1	Biofilmskinetik .....	10
4.5	METODER FÖR AKTIVITETSTEST .....	11
4.5.1	Tryckmätning som mått på biologisk aktivitet .....	11
4.5.2	Genererad värmeenergi som mått på anammoxaktivitet .....	12
4.5.3	Analytiska mätningar av kväveföreningar.....	13
4.5.4	Oxygen Uptake Rate (OUR).....	13
4.5.5	Ammonium Utilization Rate (AUR) .....	13
4.5.6	Nitrate Utilization Rate (NUR).....	14
5.	MATERIAL OCH METODER.....	15
5.1	PROVTAGNING OCH BEREDNING AV PROVER .....	15
5.2	FÖRSÖKSUPPSTÄLLNINGAR OCH ANALYSMETODER .....	15
5.2.1	Tryckmätning .....	15
5.2.2	OUR.....	16
5.2.3	Analys med HACH-LANGE kyvett-tester.....	17
5.3	TILLREDNING AV KEMIKALIER .....	17
5.4	METODUTVECKLING .....	18
5.4.1	Anammoxaktivitet .....	18
5.4.2	AOB-aktivitet .....	22

5.5	ANAMMOXAKTIVITETENS TEMPERATURBEROENDE .....	23
5.6	BEARBETNING AV DATA .....	23
5.6.1	Mätdata från aktivitetstest av anammox .....	23
5.6.2	Mätdata från aktivitetstest genom OUR .....	23
5.7	BERÄKNINGAR .....	24
6.	RESULTAT.....	25
6.1	METODUTVECKLING .....	25
6.1.1	Anammoxaktivitet .....	25
6.1.2	AOB-aktivitet .....	31
6.2	ANAMMOXAKTIVITETENS TEMPERATURBEROENDE .....	36
7.	DISKUSSION .....	37
7.1	VAL AV METODER .....	37
7.2	SVÅRIGHETER VID ANALYS AV BIOLOGISKA PROVER .....	37
7.3	TRYCKMÄTNING SOM METOD FÖR ATT BESTÄMMA ANAMMOXAKTIVITET.....	37
7.3.1	Diffusionsbegränsningar och startkoncentrationer .....	38
7.4	OUR SOM METOD FÖR ATT BESTÄMMA AOB-AKTIVITET .....	38
7.5	BEHOV AV KOMPLEMENTERANDE METODER FÖR ATT MÄTA AKTIVITET FÖR ANDRA BAKTERIEGRUPPER .....	39
7.6	ANAMMOXAKTIVITETENS TEMPERATURBEROENDE .....	39
8.	SLUTSATSER .....	41
8.1	FÖRSLAG FÖR VIDARE ARBETE.....	41
9.	KÄLLOR.....	42
9.1	ICKE PUBLICERADE KÄLLOR .....	45
	BILAGA A – METOD FÖR BESTÄMNING AV ANAMMOXAKTIVITET.....	46
	BILAGA B – METOD FÖR BESTÄMNING AV AOB-AKTIVITET .....	47
	BILAGA C – REFERENSMETOD .....	48
	BILAGA D – LÖSLIGHET AV KVÄVGAS I VATTEN VID ÖKAT TRYCK.....	49

## 1. INLEDNING

Kväve och fosfor är essentiella näringsämnen för alla levande organismer. Utsläpp av dessa näringsämnen till hav och vattendrag kan dock orsaka eutrofiering och syrefria bottenar. Eutrofiering rubbar den biologiska mångfalden då vissa arter gynnas av ökad näringsstillgång medan andra missgynnas. Utsläpp av kväve till recipienten härstammar främst från läckage från jordbruk, skogsbruk, enskilda avlopp och avloppsreningsverk. I Sverige har åtgärder för att reducera kväveutsläpp med avloppsvatten genomförts sedan 1990-talet men problemen med övergödningen av Östersjön kvarstår.

Sverige ska enligt Helsingforskommissionens Baltic Sea Action Plan minska sina utsläpp av kväve med 20 800 ton. Reduktionskraven har fördelats mellan de branscher som bidrar mest till utsläppen och Sveriges avloppsreningsverk har fått krav på en minskad belastning till Östersjön med 3 000 ton kväve. Som följd av kravet på minskad belastning av kväve till Östersjön föreslår Naturvårdsverket (2012) ett certifikatsystem för alla tillståndspliktiga avloppsreningsverk. Certifieringssystemet ska fungera som ekonomiskt incitament för ökad reduktion av kväve och föreslås införas i januari 2016.

En ökad reduktion av kväve kan uppnås i den utformning som de kommunala reningsverken har idag men detta till priset av ett ökat luftningsbehov och ökad användning av extern kolkälla. Ett ökat luftbehov innebär ett ökat behov av energi och den externa kolkällan är ofta framställd av fossila bränslen vilket tillsammans medför en ökande klimatpåverkan från avloppsreningsverken vid högre kvävereduktion.

Under mitten av 1980-talet påvisades bakterier som kan oxidera ammonium under anaeroba förhållanden med nitrit som elektronacceptor (van de Graaf m.fl., 1990; Mulder m.fl., 1995). Processen namngavs anammox, en förkortning av ANaerobic AMMonium OXidation (Mulder m.fl., 1995). När anammox introduceras i avloppsreningsverk för rening av ammonium krävs att något mer än hälften av ammoniumet oxideras till nitrit. Den kombinerade processen med nitritation och anammox kallas deammonifikation. Deammonifikation har hittills framförallt introducerats på avloppsreningsverk för behandling av det varma och ammoniumrika rejektvattnet från avvattningen av rötat avloppsslam (Gustavsson m.fl., 2012).

Då anammox renar under anoxiska förhållanden minskar luftningsbehovet och dessutom är anammoxbakterierna autotrofa vilket medför att processen inte beroende av extern kolkälla. Deammonifikationsprocessen är därför en attraktiv lösning för kväverening i framtiden. Det finns dock utmaningar i att introducera anammox i avloppsreningsverkens huvudström då denna har betydligt lägre temperatur än rejektvattnet som metoden idag används på. Huvudströmmen har även betydligt lägre ammoniumkoncentrationer.

VA SYD har startat pilotstudier för att försöka implementera deammonifikationsprocessen i huvudströmmen på Sjölunda avloppsreningsverk i Malmö. För att utvärdera potentialen i att implementera anammox på Sjölunda avloppsreningsverk krävs metoder för att följa hur bakteriegruppernas aktivitet utvecklas under driften och även att bedöma hur bakterierna påverkas av förändringar i temperatur och avloppsvattensammansättning.

## **2. SYFTE**

Examensarbetet syftar till att:

- Utarbeta metoder för aktivitetstest av anammox och ammoniakoxiderande bakterier (AOB) på rörligt bärrmaterial utifrån befintliga metoder och metoder som beskrivs i litteraturen. Metoderna ska vara enkla, snabba och ska kunna användas för kontinuerlig uppföljning av aktiviteten i deammonifikationsprocessen på Sjölanda avloppsreningsverk.
- Utvärdera de utarbetade metoderna.
- Utifrån de framarbetade metoderna studera aktiviteternas temperaturberoende.

### **2.1 ARBETSGÅNG**

Examensarbetet har genomförts med teoretiska och praktiska studier. En inledande litteraturstudie genererade den teoretiska delen av rapporten samt gav en kunskapsgrund för att utföra examensarbetets praktiska del. Den praktiska delen utgjordes av laborationer på VA-teknik på institutionen för Kemiteknik på Lunds Tekniska Högskola.

## **3. BAKGRUND**

### **3.1 SJÖLUNDA AVLOPPSRENINGSVERK**

Sjölunda avloppsreningsverk är ett av Sveriges större avloppsreningsverk och är beläget i Malmö. Verket drivs av kommunalförbundet VA SYD och har cirka 300 000 personekvivalenter (pe) anslutna men har en kapacitet på 550 000 pe. Sjölunda avloppsreningsverk byggdes 1963 och har efter det uppgraderats år 1970, 1979 och 1998. Idag har verket en högbelastad aktivslamanläggning för reducering av biokemisk syreförbrukning (BOD). Aktivslamanläggningens första del (25 %) syresätts inte med syfte att nitrit från behandlat rejektvatten och nitrat från de nitrifierande biobäddarna ska denitrifieras (Hanner m.fl., 2003). Fosfor förfälls med järnsulfat som fällningskemikalie och nitrifiering av kväve sker i fyra parallella biologiska bäddar. Anläggningen är byggd med en efterdenitrifikation där denitrifikationen sker i sex parallella linjer med reaktorer med rörligt bärrmaterial (MBBR = Moving Bed Biofilm Reactor). Varje MBBR-linje består av två reaktorer. Denitrifikationen kräver tillsatts av extern kolkälla. På Sjölunda avloppsreningsverk doseras metanol. Efter anläggningen för efterdenitrifikation avlägsnas suspenderat material från vattnet genom flotation (Hanner m.fl., 2003).

#### **3.1.1 Manamnox – pilotstudie på Sjölunda avloppsreningsverk**

VA SYD påbörjade under hösten 2011, i samarbete med VA-teknik på Lunds Tekniska Högskola, ett projekt med syfte att få kunskap om hur deammonifikationsprocessen skulle kunna implementeras i huvudströmmen på Sjölunda avloppsreningsverk. Under en projekttid på två år ska två pilotströmmar byggas, en där deammonifikation används för att behandla rejektvatten och en där deammonifikation används för att behandla avloppsvatten från huvudströmmen, så kallad manamnox (mainstream anammox). Deammonifikationspiloterna kommer bestå av reaktorer med rörligt bärrmaterial, MBBR (Gustavsson m.fl., 2012).

Försöksplanen för pilotstudien baseras på att rejektvattenpiloten startas initialt och körs till dess att god kontroll och kännedom om processen uppnåtts. Till rejektvattenpiloten används bärare med aktiv biofilm hämtade från Himmerfjärdsverket i Grödinge. När rejektvattenpiloten är stabil startas manamnoxpiloten, även denna med bärare från Himmerfjärdsverket. Det kommer ske ett kontinuerligt utbyte av bärrmaterial mellan den varma och ammoniumrika rejektvattenpiloten och den kallare och ammoniumfattigare manamnoxpiloten. När manamnoxpiloten uppnått stabila förhållanden utan inblandning av rejektvatten kommer drift utan utbyte av bärare testas (Gustavsson, 2011).

Vid starten av detta examensarbete var endast rejektvattenpiloten i drift. Under de sista månaderna av arbetet startades manamnoxpiloten upp, dock kördes den med rejektvatten för att ta bort nitritoxiderande bakterier som fanns i biofilmen då de hämtades från Himmerfjärdsverket. Den praktiska delen av examensarbetet utfördes till största del på prover från rejektvattenpiloten. De från examensarbetet framarbetade metoderna förväntas användas för att följa aktivitetsutvecklingen i pilotstudien efter avslutat arbete.

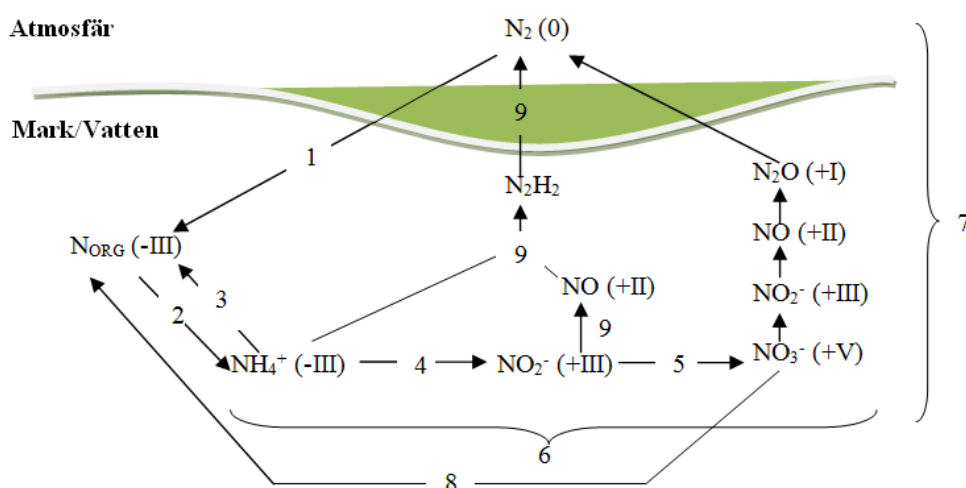


## 4. TEORI

### 4.1 KVÄVE OCH DESS KRETSLOPP

Kväve är essentiellt för alla levande organismer och är bland annat beståndsdel i proteiner, aminosyror och DNA. Kväve är ett grundämne med fem elektroner i sitt yttersta skal. I sin grundform befinner sig kväve som kvävgas vilket utgör den största beståndsdel i atmosfären med cirka 78 %. De två kväveatomerna binds med en trippelbindning vilket medför att gasen är kemiskt trögreakterad.

Kväve förekommer naturligt i en rad oxidationsformer. Som näringskälla används nitrit, nitrat och ammonium av de flesta levande organismer. I Figur 1 illustreras de biologiska processerna i kvävet kretslopp.



**Figur 1.** Biologiska processer i kvävet kretslopp. 1-Kvävefixering, 2-Ammonifikation/Kvävefixering, 3-Assimilation, 4-Nitritation, 5-Nitration, 6-Nitrifikation, 7-Denitrifikation, 8-Assimilation, 9-Anammox. Oxidationstal visas inom parentes.

### 4.2 KONVENTIONELL KVÄVERENING

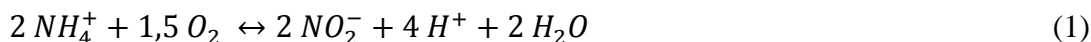
I avloppsreningsverk rensas kväveföreningar från avloppsvattnet till största del biologiskt. Kvävet i avloppsvattnet härstammar främst från människors konsumtion av proteinhaltig föda, i kroppen bryts proteiner ned till urinämnen. I ledningssystemet på väg mot avloppsreningsverket omvandlas en del av urinämnena till ammoniumkväve. När avloppsvattnet når reningsverket assimileras en del kväve avloppsreningsverkets olika biologiska steg. Utan speciell kväverening kan 10-30 % av inkommande kväve avlägsnas genom assimilering av mikroorganismer (Svenskt Vatten, 2010).

För att uppnå en högre avskiljningsgrad används kvävet olika oxidationsstadier för biologisk kväveavskiljning. Kväveföreningarna i avloppsvattnet omvandlas genom nitrifikation och denitrifikation till kvävgas vilken avgår till atmosfären.

Vid biologisk kväveavskiljning krävs tre delmoment, kväve assimileras vid reduktion av organiskt material, ammonium oxideras under aeroba förhållanden till nitrat samt denitrifikation under anoxiska förhållanden. Detta kan i praktiken göras på ett flertal sätt med ett flertal reaktorkonfigurationer.

### 4.2.1 Nitrifikation

Nitrifikation är processen där ammonium oxideras till nitrat under aeroba förhållanden i två steg, reaktionerna illustreras i ekvation 1 och 2.



Det första steget i nitrifikationen (1) där ammonium oxideras till nitrit utförs av ammoniakoxiderande bakterier (AOB). AOB är autotrofer och använder kalvin-cykeln för att binda koldioxid med hjälp av den adenosintrifosfat (ATP) som bildas vid oxidationen av ammonium (Ward, 2008). AOBs autotrofa livsstil medför en långsam tillväxthastighet då mycket energi åtgår när koldioxiden binds till biomassan. Tillväxthastigheten för AOB påverkas positivt av högre temperatur, högre syrehalt och högre koncentration ammonium. Det ideala pH-värdet för AOB är i intervallet 7,5–8,6 (Svenskt Vatten, 2010).

Under början av 2000-talet isolerade Könneke m.fl. (2005) arkeer som även de kan oxidera ammonium till nitrit. Tidigare var uppfattningen att arkeer var extremofiler dvs. organismer som lever under extrema livsförhållanden. De funna arkeerna är kemolitoautotrofer (Könneke m.fl., 2005) och benämns som ammoniakoxiderande arkeer (AOA).

Nitrifikationens andra steg utförs av nitritoxiderande bakterier (NOB). NOB innefattar ett flertal släkter och de mest välkända är kemolitoautotrofer, precis som AOB. De två bakteriegrupperna skiljer sig genom att NOB använder nitrit som energikälla istället för ammonium. NOB kan använda organiskt kol för att komplettera sin tillväxt trots att de har begränsad metabolisk kapacitet för upptag och nedbrytning av organiska molekyler. NOB kan till och med, då vissa organiska substrat finns tillgängliga, växa då nitrit inte finns tillgängligt (Ward, 2008).

### 4.2.2 Denitrifikation

Genom denitrifikationen reduceras nitrat och nitrit till kväve i gasform ( $\text{N}_2\text{O}$  eller  $\text{N}_2$ ). Reduktionen sker under anoxiska förhållanden. Den fullständiga denitrifikationen genererar kvävgas och beskrivs i ekvation 3, redoxbalansen för denitrifikationen återges i ekvation 4 (Zumft, 1997).



Denitrifikationen utförs främst av heterotrofer. Antalet heterotrofer som kan denitrifiera är stort och de är effektiva både i mark- och i vattenmiljöer. De flesta denitrifierare använder ursprungligen syre som elektronacceptor men kan vid syrefattiga förhållanden ändra till anaerob respiration och använda nitrat eller nitrit istället, vilket är fallet vid denitrifikation (Zumft, 1997).

Även AOB kan denitrifiera om de befinner sig under syrestress. När AOB utför denitrifikationen benämns denna som nitrifierar-denitrifikation. Först oxiderar bakterierna ammonium till hydroxylamin varefter oxidationen fortsätter och nitrit bildas. Vid syrebrist reduceras sedan nitritet till kväve lustgas, den fullständiga reaktionen beskrivs i ekvation 5 (Ritchie & Nicholas, 1972; Poth & Focht, 1985).

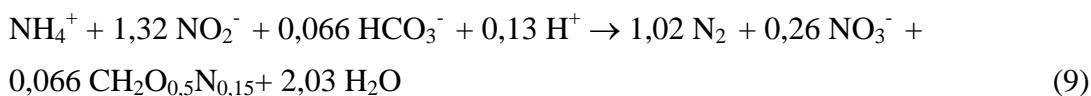
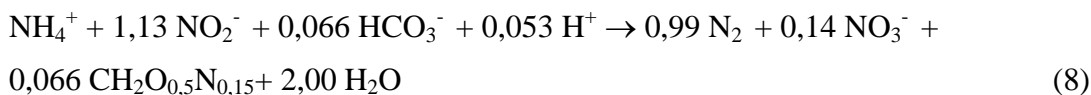




### 4.3 ANAMMOX – ANAEROB AMMONIUMOXIDATION

Under slutet av 1970-talet förutsåg Broda (1977) att ammonium kan oxideras under anaeroba förhållanden med nitrat eller nitrit som elektronacceptor, baserat på termodynamiska och evolutionära grunder. Anammox observerades för första gången i mitten av 1980-talet (van de Graaf m.fl., 1990; Mulder, 1995) och cirka 10 år senare identifierades nitrit som elektronacceptor (van de Graaf m.fl., 1996). Strous m.fl. (1999b) var de första som beskrev bakterierna som utför anammox och de presenterade att anammoxbakterierna tillhör ordningen *Planctomycetales*.

De huvudsakliga substraten i anammoxprocessen är ammonium, nitrit och vätekarbonat (Mulder m.fl., 1995; van de Graaf m.fl., 1996). Anammoxbakterierna är autotrofer och använder vätekarbonat som kolkälla. För denna process krävs elektroner vilka fås genom att nitrit oxideras till nitrat. Den fullständiga processen för detta kan ses i ekvation 6. Kväveomsättningen utförd av anammoxbakterier beskrivs i ekvation 7. Om ekvation 6 och 7 kombineras fås reaktionen som visas i ekvation 8. Strous m.fl. (1998) fann experimentellt att metabolismen för anammoxbakterier kan uttryckas enligt stökiometrin som presenteras i ekvation 9. Hydrazin bildas som intermediärer i processen (Kartal m.fl., 2011).



Tillväxthastigheten för anammox är låg med en fördubblingstid på cirka 11 dagar vid 32-33 °C. Autotrof tillväxt är energikrävande jämfört med heterotrof vilket generellt medför en långsammare tillväxt. Den extremt långsamma tillväxten för anammox kan dock inte förklaras endast med bakteriernas autotrofa livsstil (Strous m.fl., 1998). Strous m.fl. (1998) menar att den långsamma tillväxten måste bero på att anammoxbakterierna konsumerar ammonium väldigt långsamt.

#### 4.3.1 Deammonifikationsprocessen

Deammonifikation är ett samlingsnamn för nitrations-anammoxprocessen. När anammox används för rening av kväve i avloppsvatten måste först cirka 50 % av ammoniet oxideras till nitrit av AOB eller AOA, vilket kräver en syresättning av vattnet. Anammox använder sedan den bildade nitriten som elektronacceptor för att oxidera resterande ammonium till kvävgas. Det kan uppstå konkurrens om nitriten med NOB och denitrifikare.

Deammonifikation som processlösning för att rena ammonium i avloppsvatten har fördelar i form minskat luftningsbehov, låg slamproduktion och ingen tillsats av extern kolkälla, vilket sänker driftkostnaderna. Dessutom minskar de direkta koldioxidutsläppen som följd av anammoxbakteriernas autotrofa livsstil (van der Star, 2008).

För rening av ammonium med deammonifikation finns två möjliga reaktorkonfigurationer, en med två seriella reaktorer och en med endast en reaktor. I konfigurationen med två reaktorer sker en partiell nitrations av ammonium till nitrit i

den första reaktorn vilken är luftad. I den andra reaktorn, som har anaeroba förhållanden, sker anammoxreaktionen (van Dongen m.fl., 2001). Fördelen med att ha två reaktorer är att det med denna konfiguration är lättare att skapa gynnsamma förhållanden för AOB och anammox.

I konfigurationen med en reaktor är luftningen begränsad och innehåller granuler eller bärarmaterial. Granulerna eller bärarmaterialet ger en aerob miljö för nitrifikation på det yttre lagret medan anammox kan ta vid i de anoxa miljöerna längre in i biofilmen (van der Star, 2008). Vid processlösningar med endast en reaktor finns fördelar i minskad energiåtgång vid luftning (Cho m.fl., 2011).

### **4.3.2 Faktorer som påverkar anammox och deammonifikationsprocessen**

#### ***Temperatur***

Strous m.fl. (1999a) undersökte fysiologin för anammoxbakterier och fann dess optimala temperaturintervall mellan 20°C och 37°C. De fastställde även att aktiveringsenergin för anammox är 70 kJ/mol. Dosta m.fl. (2008) fann att aktiviteten hos anammoxbakterierna var som högst i temperaturintervallet 35-40°C samt att aktiviteten förloras vid temperaturer över 45°C. Denna aktivitetsförlust var irreversibel som följd av att celldöd inträffar i biomassan. Jetten m.fl. (1999) fann att aktiviteten för anammox hade sitt optimum vid 40°C.

Tillväxthastigheten för AOB och NOB är också viktig att ta i beaktande. Enligt Hunik m.fl. (1994) är tillväxthastigheten för nitritoxiderande bakterier högre än för de som oxiderar ammonium vid temperaturer som understiger 20°C, och vice versa vid högre temperaturer.

En del studier har utförts där anammoxaktiviteten studerats vid lägre temperaturer. Dessa har funnit stabila anammoxprocesser vid temperaturer i intervallet mellan 15-20°C (Dosta m.fl., 2008; Hendrickx m.fl., 2012; Isaka m.fl., 2008; Vázquez-Padín m.fl., 2011). Isaka m.fl. (2008) utförde aktivitetstester vid så låg temperatur som 6,3 °C varvid en viss aktivitet fortfarande kvarstod. Vid denna låga temperatur var aktiviteten 0,36 kg N/(m<sup>3</sup>\*d) vilket kan jämföras med aktiviteten 6,2 kg N/(m<sup>3</sup>\*d) vid 32 °C i samma studie.

#### ***pH***

Strous m.fl. (1999a) undersökte pH-värdets inverkan på anammoxbakteriernas aktivitet genom att mäta den specifika substratombindningen vid förändrat pH. De fann att anammox hade sitt fysiologiska pH-intervall mellan 6,7 och 8,3. Det finns dock andra studier där anammox har varit aktivt vid pH-värden i intervallet 9-9,5 (Egli m.fl., 2001; Ahn m.fl., 2004), skillnaderna mellan studierna kan bero på olika anammoxbakterier, olika reaktorer eller olika substratbelastning (Vázquez-Padín m.fl., 2009).

#### ***Syrehalt***

De bakterier som utför anammox är beroende av en syrefri miljö (Strous m.fl., 1997). Strous m.fl. (1997) visade att den inhibering som uppstår när anammox kommer i kontakt med syre är reversibel.

I processutformningar som baseras på en luftad reaktor med bärarmaterial eller granuler befinner sig anammoxbakterierna längst in i biofilmen medan aeroba bakterier befinner sig längre ut, närmast vattnet (Tsushima m.fl., 2007). I deammonifikationsprocessen är anammoxbakterierna beroende av närliggande AOB som förbrukar syret. Skulle AOB

förlora aktivitet drabbas även anammox då denna inte längre kommer att skyddas från syre.

AOB konkurrerar om syre med NOB och vid låga syrehalter gynnas AOB (Hanaki m.fl., 1990). I processer med anammox är det inte bra att ha NOB närvarande då de konkurrerar med anammoxbakterierna om nitrit varvid det är av betydelse att hålla en för NOB missgynnsam syrehalt.

### ***Nitritkoncentration***

I en studie av Strous m.fl. (1999a) visas att nitrit vid höga koncentrationer (100 mg N/l) kan verka inhiberande för aggregerade anammoxbakterier. Även Lotti m.fl. (2012) har visat att nitrit är inhiberande för anammoxbakterier, i studien visas detta på biomassa på granuler. Den inhibering som uppstod framkom dock vid högre koncentrationer än i Strous m.fl. (1999a) studie. Båda studierna ovan visade att inhiberingen som uppstår av höga koncentrationer nitrit är reversibel. Koncentrationerna vid vilka nitrit blir inhiberande skiljer sig åt mellan olika studier. Det finns studier som visar på inhibering vid betydligt lägre nitritkoncentrationer, Wett (2007) visade på inhibering vid 5 mg N/l för anammoxbakterier i slam och Fux & Siegrist (2003) fann inhibering vid 40 mg N/l, även dessa på anammoxbakterier i slam.

## **4.4 MBBR – REAKTORER MED RÖRLIGT BÄRARMATERIAL**

Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR) är reaktorer där mikroorganismer växer på rörligt bärarmaterial. Reaktorerna kan antingen vara aeroba, anaeroba eller anoxiska. I aeroba lösningar hålls bärarmaterialet flytande genom tillförsel av luft medan detta åstadkomms med omrörare i anaeroba och anoxiska lösningar. Bärarmaterialet är ofta utformade som små cylinderskal och består av polyetylen med hög densitet (Ødegaard, 1999).

Ett exempel på bärarmaterial är Kaldnes<sup>TM</sup> K1 (Figur 2) vilka är 7 mm höga och har en diameter på 10 mm. Bärarnas utsida är räfflad och i cylindern finns ett kors som delar insidan i fyra zoner. Kaldnes<sup>TM</sup> K1-bärare har en effektiv yta på 490 mm<sup>2</sup>/bärare eller 500 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> (Ødegaard m.fl., 2000). Den effektiva ytan är den ytan där biomassan växer d.v.s insidan av cylinderskalen. Majoriteten av biomassan som växer på bärarmaterialet växer på insidan av bäraren. På ytterväggarna av bärarmaterialet är tillväxten av biomassa låg som följd av nötning när bärarna kolliderar med varandra. Mängden bärarmaterial i reaktorn anpassas efter reningsbehovet men fyllnadsgraden bör ej överstiga 70 %. Om gränsen överskrids kommer bärarna inte kunna röra sig fritt (Ødegaard, 1999).



**Figur 2.** Bärarmaterial av typen Kaldnes K1. Bärarnas fyra zoner är fyllda av biomassa.

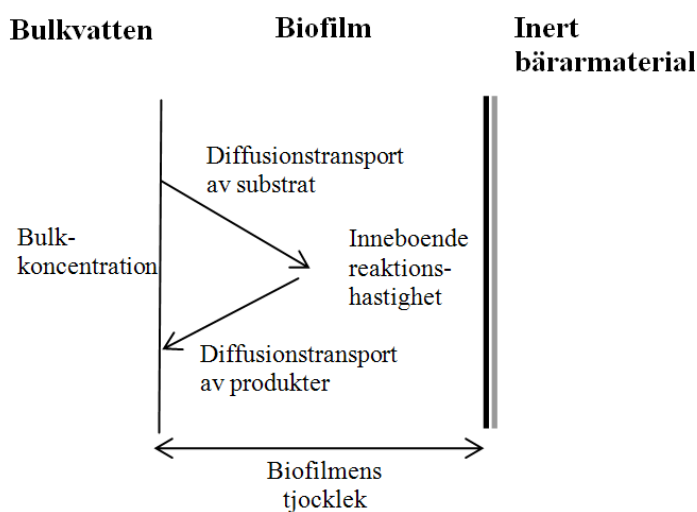
I biofilmsprocesser är diffusionen av ämnen till och i biofilmen av stor betydelse för effektiviteten i reningen. Diffusionen delas upp i vätskediffusion och biofilmsdiffusion. Den begränsning som uppstår när substrat förflyttas från bulkfasen till ytan av biofilmen kallas vätskefilmsdiffusion (Henze m.fl., 1997).

Eftersom diffusionen i biofilmen påverkar reningen är även tjockleken på biofilmen av betydelse. Det optimala är att ha en tunn och jämt fördelad biofilm. Hur biofilmen växer till och i vilken grad substrat transporteras till biofilmen styrs i stor mån av turbulensen i reaktorn. Mer biomassa än önskat kan rota sig i bärrarmaterialets hålrum om turbulensen i MBBR är för låg, detta som följd av för låga skjuvkrafter (Ødegaard, 1999). Om för mycket biomassa växer till i bärrarmaterialet hindras transporten av vatten och substrat genom bäraren, vilket leder till en minskad aktivitet.

MBBR-tekniken är tänkt att bevara fördelarna med aktivt slamassänger och biobäddar samtidigt som problematiken med dessa två lösningarna undviks. Till skillnad från biobäddar används hela reaktorn för biomassstillväxt, vilket också stämmer för aktivt slamreaktorer. Dock kräver aktivt slamreaktorer en slamåterföring vilket undviks med MBBR. Andra fördelar med MBBR är att det är en platseffektiv lösning och att biomassan blir mer specialiserad då slammet inte recirkuleras (Ødegaard, 1999).

#### 4.4.1 Biofilmskinetik

Substrat och produkter transporteras genom biofilmer i reaktorlösningar med bärrarmaterial. En illustration av transporter och processer i biofilm kan ses i Figur 3. Transporten av såväl substrat som produkter kan beskrivas med Fickisk diffusion (la Cour Jansen & Harremoës, 1984).



**Figur 3.** Modell för avlägsning av lösta substrat i biofilm (la Cour Jansen & Harremoës, 1984).

la Cour Jansen & Harremoës (1984) beskriver att genom att veta hur ämnen transporteras genom biofilmen kan förändringen i vattenfasen utanför biofilmen beskrivas. Diffusionen medför en bulkprocess som kan beskrivas genom antingen halva- eller nollte ordningens kinetik med avseende på koncentrationen i bulken. När substratet penetrerar biofilmen fullt blir bulkprocessen oberoende av substratkoncentrationen, dvs av nollte ordningen, detta beskrivs i ekvation 10. Om bulkkoncentrationen är lägre, så att biofilmen endast blir partiellt penetrerad, blir

bulkreaktionen beroende av substratkoncentrationen i bulken och reaktionen blir av en halv ordning, se ekvation 11.

$$r_a = k_{0a} = k_{0f} \cdot L \quad \text{gäller för } \beta = \sqrt{\frac{2 \cdot D \cdot C^*}{k_{0f} \cdot L^2}} \geq 1 \quad (10)$$

$$r_a = k_{\frac{1}{2}a} \cdot C^{*\frac{1}{2}} = \sqrt{2 \cdot D \cdot k_{0f} \cdot C^*} \quad \text{gäller för } \beta < 1 \quad (11)$$

där

$r_a$  är avlägsningshastigheten per areaenhet biofilmsyta [ $\text{g}/\text{m}^2/\text{s}$ ]

$k_{0a}$  är nollte ordningens avlägsningshastighet per areaenhet [ $\text{g}/\text{m}^2/\text{s}$ ]

$k_{1/2a}$  är halvordningens hastighetskonstant per areaenhet [ $\text{g}^{1/2}/\text{m}^{1/2}/\text{s}$ ]

$k_{0f}$  är den inneboende nollte ordningens avlägsningshastighet i biofilmen [ $\text{g}/\text{m}^3/\text{s}$ ]

$L$  är biofilmens tjocklek [ $\text{m}$ ]

$D$  är koefficienten för molekylär diffusion i biomassan [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]

$C^*$  är bulkkoncentrationen vid ytan av biofilmen [ $\text{g}/\text{m}^3$ ]

$\beta$  är en dimensionslös konstant.

Vid redoxprocesser är elektronacceptorn eller -donatorn hastighetsbegränsande. Om biofilmen endast blir partiellt penetrerad, dvs. följer ekvation 11, kan beräkning av vilken av acceptorn eller donatorn som blir hastighetsbegränsande med ekvation 12. Det begränsande substratet är det som bestämmer den fullständiga reaktionshastigheten (la Cour Jansen & Harremoës, 1984).

$$\frac{C_d^*}{C_a^*} = \frac{D_a \cdot k_{0fd}}{D_d \cdot k_{0fa}} = \frac{D_a}{D_d} \cdot M \quad (12)$$

där

$C_d^*$  och  $C_a^*$  är bulkkoncentrationen av elektrondonator och elektronacceptor [ $\text{g}/\text{m}^3$ ]

$D_d$  och  $D_a$  är koefficienten för molekylär diffusion för elektrondonator och acceptor [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]

$k_{0fd}$  och  $k_{0fa}$  är den inneboende avlägsningshastigheten för donatorn och acceptorn [ $\text{g}/\text{m}^3/\text{s}$ ]

$M$  är det stökiometriska förhållandet mellan donator och acceptor [ $\text{g}/\text{g}$ ]

## 4.5 METODER FÖR AKTIVITETSTEST

Huvudsyftet med litteraturstudien var att undersöka tillgängliga metoder för aktivitetstest av anammox, AOB och andra bakteriegrupper. Studien ligger som grund till valen av metoder för de laborativa studierna som utförts.

### 4.5.1 Tryckmätning som mått på biologisk aktivitet

För att bestämma aktiviteten för bakterier som producerar gas kan hastigheten vid vilken gasen bildas mätas genom att övervaka den resulterande tryckökningen som uppstår när reaktionen sker i en sluten miljö. Genom ideala gaslagen (ekvation 13) kan sedan tryckförändringen översättas till mängd producerad gas och genom att mäta tryckförändringen över tiden fås aktiviteten.

$$p \cdot V_G = n \cdot R \cdot T \quad (13)$$

där

$p$  är gasens tryck [ $\text{N}/\text{m}^2$ ],  $V_G$  är gasens volym [ $\text{m}^3$ ],  $n$  är substansmängd [ $\text{mol}$ ],  $R$  är gaskonstanten [ $\text{J}/\text{mol}/\text{K}$ ] och  $T$  är temperaturen [ $\text{K}$ ].

Tryckmätning som ett mått på biologisk aktivitet är ett väl beprövat koncept och det används bland annat vid rötningsprocesser och heterotrof aerob nedbrytning. Metoden går att applicera på processer som genererar icke-lösliga gaser. Dapena-Mora m.fl. (2006) presenterade en metodik för tryckmätning för att bestämma aktiviteten för anammoxbakterier. Metodiken baserades på att beräkna den specifika anammoxaktiviteten (SAA) genom att använda den maximala lutningen som fås när trycket ökar i provflaskan med tiden (ekvation 14).

$$\frac{dN^2}{dt} = \alpha \cdot \frac{V_G}{R \cdot T} \quad (14)$$

där  $\frac{dN^2}{dt}$  är gasproduktionshastigheten [mol N<sub>2</sub>/min] och  $\alpha$  är tryckförändringen som funktion av tiden försökstiden [N/m<sup>2</sup>/min].

Den specifika anammoxaktiviteten, SAA [g·N<sub>2</sub>-N/(g VSS\*d)] kan sedan beräknas om koncentrationen biomassa är känd, se ekvation 15.

$$SAA = \frac{dN_2/dt}{X \cdot V_L} \cdot M_{N_2} \cdot 1440 \quad (15)$$

Där X är koncentrationen biomassa [g VSS/l], V<sub>L</sub> är volymen i flytande fas [l], M<sub>N<sub>2</sub></sub> är molmassan för kvävgas [g/mol] och 1440 är antalet minuter per dygn.

Tryckmätning för att mäta biologisk aktivitet har utförts vid ett antal studier tidigare, se Tabell 1.

**Tabell 1.** Tidigare försök med tryckmätning

Källa	Biomassa	Vätske- volym (ml)	Tillsatt NH <sub>4</sub> och NO <sub>2</sub> (mg N/l)	Tid (min eller h)	Tryck- intervall (mbar)	Temperatur (°C)
Buys m.fl., 2000 *	Slam	110	100**	4 h	0 - 46	37
Dapena- Mora m.fl., 2006	Slam	25	70	350 min	10 - 160	30
Dosta m.fl., 2007	Slam	24	70	-	-	10-45
Scaglione m.fl., 2009	Slam	1000	10	4 h	-	35
Bettazzi m.fl., 2010	Slam	-	30-40 (NH <sub>4</sub> ) 8,5-20 (NO <sub>2</sub> )	100 h	0-400	35
Lotti m.fl., 2012	Granuler	340	50	150 min	0 - 90	30

\*- Denitrifikationstest \*\*-Koncentration NO<sub>3</sub>-N (mg/l)

#### 4.5.2 Genererad värmeenergi som mått på anammoxaktivitet

Anammoxaktivitet kan bestämmas genom batchtester där utvecklad värmeenergi mäts (Scaglione m.fl., 2009). Metoden baseras på teorin om att värmeutbytet från en bioreaktion vid konstant temperatur och tryck är ekvivalent med variationen i entalpi. Värmeutbytet är främst beroende av bioreaktionens kataboliska aktivitet. Det värmeutbytet som bioreaktionens anaboliska aktivitet bidrar med kan generellt försummas (Aulenta m.fl., 2002). Värmeeffekten (Q<sub>r</sub>) som genereras genom en bioreaktion kan mätas med en mikrokolorimeter och mäts i enheten mW. Relationen mellan värmeeffekt och nedbrytningshastigheten av substrat beskrivs i ekvation 16.

Energien som genereras av en enhet nedbrutet substrat är vid konstant tryck och temperatur ekvivalent med reaktionsentalpin ( $\Delta H$ ). Reaktionsentalpin kan beräknas i enighet med ekvation 17 (Scaglione m.fl., 2009).

$$Q_r = Y_{q/s} \cdot \frac{dS}{dt} \cdot V_s \quad (16)$$

där  $S$  är koncentrationen substrat (mg/L),  $Y_{q/s}$  är genererad energi för en enhet nedbrutet substrat (mJ/mg) och  $V_s$  är den volym där reaktionen tar plats (l).

$$\Delta H = \int_{t_0}^{t_1} Q_r \cdot dt \quad (17)$$

Reaktionsentalpin kan genom en omskrivning av ekvationerna 16 och 17 skrivas enligt ekvation 18.

$$\Delta H = \int_{t_0}^{t_1} Y_{q/s} \cdot \frac{dS}{dt} \cdot V_s dt = Y_{q/s} \cdot V_s \cdot \Delta S \quad (18)$$

När det gäller anammox kan den huvudsakliga entalpivariationen beräknas genom att anta en standardentalpi på -91 kJ/mol för biomassan och resulterar i  $\Delta H = -321,4$  J/mmol<sub>NH<sub>4</sub></sub> genom att använda stökiometrin i ekvation 9. Detta värde ligger relativt nära den specifika reaktionsentalpin för nitrifikationen för vilken mikrokolorimetri har använts (Scaglione m.fl., 2009). Scaglione m.fl., (2009) kom fram till att mikrokolorimetri är ett bra alternativ för att mäta aktiviteten för Anammox.

#### 4.5.3 Analytiska mätningar av kväveföreningar

Aktiviteten för anammox kan bestämmas genom att följa koncentrationsförändringen av nitrit, nitrat och ammonium. Metoden har använts av bland annat Strous m.fl. (1999a) och Sliemers m.fl. (2002) och baseras på att mäta koncentrationen av de tre ämnena med jämna tidsintervall. Om koncentrationerna plottas mot tiden kan aktiviteten bestämmas, detta görs genom att använda den maximala lutningen på kurvan.

#### 4.5.4 Oxygen Uptake Rate (OUR)

Oxygen Uptake Rate (OUR), mätning av syreresepirationen, kan användas för att bestämma aktiviteten i aeroba processer. Metoden är enkel och bygger på att mäta syrekonsumtionen under en specifik tidsperiod. Om koncentrationen syre plottas mot tiden fås OUR som lutningen i grafen. Mätningen av koncentrationen syre kan utföras på ett flertal sätt och metoderna är väl beskrivna i litteraturen (Hagman & la Cour Jansen, 2007).

Syrerespirationen kan mätas kontinuerligt genom att alternera mellan att lufta och inte lufta provet. Om kontinuerliga mätningar görs kan ett så kallat respirogram skapas, där OUR plottas mot tiden. Om inget substrat finns tillgängligt visar OUR den endogena respirationen (Hagman & la Cour Jansen, 2007).

#### 4.5.5 Ammonium Utilization Rate (AUR)

Ammonium Utilization Rate (AUR) test används för att mäta nitrifierande bakteriers aktivitet. Metoden för försöket baseras på att tillsätta en känd mängd ammoniumkväve till en försöksuppställning med en känd mängd biomassa och mäta hur mycket nitrit+nitrat som bildas med jämna tidsintervall. AUR fås genom att läsa av lutningen på kurvan då koncentrationen nitrit+nitrat plottas mot tiden (Holm Kristensen m.fl., 1992). AUR är en metod som kan användas för att identifiera inhiberande effekter på nitrifierare från avloppsvatten (Holm Kristensen m.fl., 1992).

#### **4.5.6 Nitrate Utilization Rate (NUR)**

Denitrifierares aktivitet kan mätas genom Nitrate Utilization Rate (NUR) vilket är ett mått på hur nitrat tas upp av biomassan. Metoden innebär att en känd mängd nitrat tillsätts en sluten behållare med känd mängd biomassa. Denitrifierare oxiderar substratet till kvävgas och därmed kan aktiviteten följas genom att mäta minskningen av nitrat i bågaren med jämna tidsintervall. NUR fås genom att bestämma lutningen på kurvan då koncentrationen nitrat plottas mot tiden (Holm Kristensen m.fl., 1992).



## 5. MATERIAL OCH METODER

I detta kapitel presenteras de metoder som framarbetades och användes för att mäta aktiviteten för de två bakteriegrupperna. För aktivitetstest av anammox valdes metoden med tryckmätning (Avsnitt 4.5.1), dvs. att aktiviteten bestäms genom att mäta den tryckökning som uppstår när anammoxbakterierna producerar kvävgas vid tillsats av nitrit och ammonium.

För att bestämma aktiviteten för AOB användes OUR (Avsnitt 4.5.4), i deammonifikationsprocessen använder AOB ammonium som substrat varvid detta användes i metoden. För att inhibera eventuellt förekommande NOB som också förbrukar syre i takt med att AOB bildar nitrit användes natriumklorat ( $\text{NaClO}_3$ ) som inhibitor. Natriumklorat som inhibitor för NOB har tidigare använts av bland annat Surmacz-Gorska m.fl. (1995) och Tallec m.fl. (2008).

### 5.1 PROVTAGNING OCH BEREDNING AV PROVER

Samtliga experiment har utförts på bärare tagna från rejektvattenpiloten på Sjölanda avloppsreningsverk. Proverna togs genom att sänka ner en hink i pilotreaktorn varefter bärarna fördes till en plastflaska med lock tillsammans med vatten från pilotreaktorn. Proverna transporterades sedan så snart som möjligt från Sjölanda avloppsreningsverk till Lunds Tekniska Högskola där alla laborationer utfördes. Då inget annat anges utfördes experimenten samma dag som provtagning och proverna förvarades i rumstemperatur fram till experimentet startades. Förvaring i rumstemperatur föredrogs framför i kyl då rumstemperatur ligger närmast temperaturen i rejektvattenpiloten (ca 28°C).

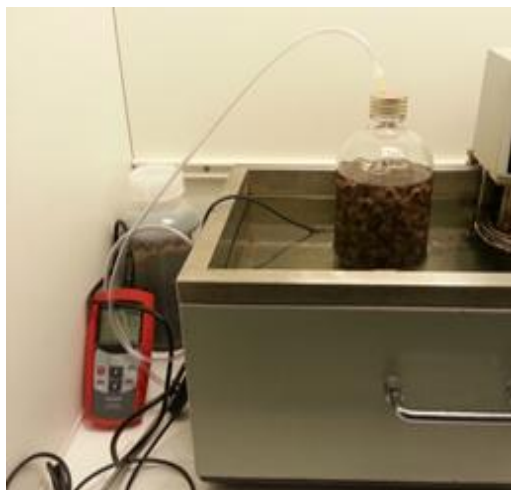
Då inget annat anges användes 480 stycken bärare i en testreaktor med 1,5 liter vatten i experimenten. Detta medförde en fyllnadsgrad av bärare i vatten på 32 %, i pilortreaktorerna på Sjölanda reningsverk är fyllnadsgraden 40 %. Valet av fyllnadsgrad i testmetoderna grundade sig på den fyllnadsgrad som används i den metod som används för att bestämma aktiviteten i dagsläget. Vid samtliga experiment räknades bärarna för hand och sköljdes sedan försiktigt med ljummet kranvatten i ett durkslag för att avlägsna överflödiga biomassa och partikulära föroreningar.

### 5.2 FÖRSÖKSUPPSTÄLLNINGAR OCH ANALYSMETODER

#### 5.2.1 Tryckmätning

I Figur 4 illustreras försöksuppställningen för de experiment där den biologiska aktiviteten analyserades med tryckmätning. I experimenten användes en reaktor med volymen 2 liter vilken gick att försluta med septum och kork. Temperaturen reglerades med vattenbad och omrörning åstadkoms med magnetomrörare. Trycket i reaktorn mättes med en tryckmätare med loggerfunktion, GMH 5150 från Greisinger electronic GmbH (Regenstauf, Tyskland). Loggern var i samtliga experiment inställd på att logga ett värde i minuten. Till tryckmätaren var en trycksensor GMSD 350MR, även den från Greisinger electronic GmbH, kopplad. Trycksensorn mäter relativt tryck och har ett mätintervall på -199 - 350 mbar. Trycksensorn kopplades till reaktorn genom en slang med nål vilken stacks genom septumet. Tryckmätare, trycksensor, slang och nål ses i

Figur 5. Sensorn mätte differenstryck mot atmosfären.



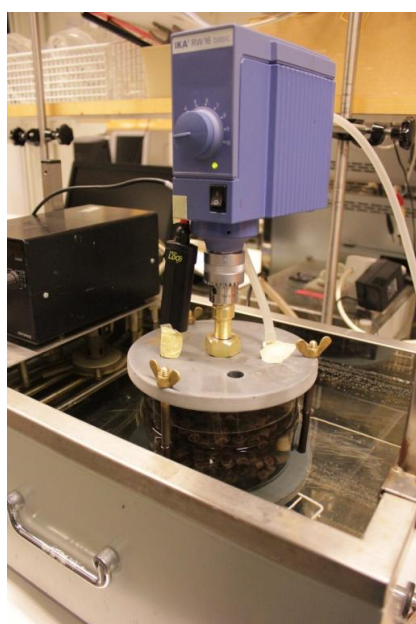
**Figur 4.** Försöksupställningen för aktivitetstest av anammox med tryckmätning.



**Figur 5.** Tryckmätare (1) ihopkopplad med trycksensor (2). Från trycksensorn går en PVC-slang till en nål (3).

### 5.2.2 OUR

Försöksupställningen för OUR-test redovisas i Figur 6. Reaktorn var placerad i ett vattenbad och bestod av en 2 liters bägare med lock och omrörarblad. Omrörarbladet kopplades till en motor för att ge kontinuerlig omrörning. Genom hål i locket på reaktorn placerades en sensor kopplad till en multimeter med loggerfunktion för mätning av löst syre (Figur 7). Multimetern var en *HQ40d Portable pH, Conductivity, Optical Dissolved Oxygen (DO), ORP, and ISE Multi-Parameter Meter* från HACH (Loveland, Colorado, USA) och sensorn hade produktnamnet *IntelliCAL™ LDO101 Standard Luminescent/Optical Dissolved Oxygen (LDO) Probe*.

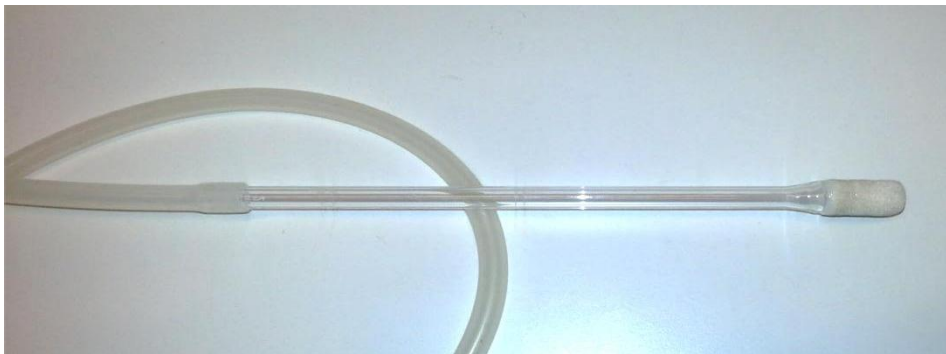


**Figur 6.** Försöksupställning för OUR-test.



**Figur 7.** Multimeter som användes för mätning av syrehalt.

Reaktorn luftades genom en sten som finfördelar gas i vätska (Figur 8) som också tillfördes reaktorn genom ett hål i locket. Stenen syftade till att finfördela luft i vattenfasen genom att skapa små bubblor. Stenen var kopplad via en gummislang till en akvariepump. Akvariepumpen kunde kopplas till en timer vilken kunde stänga av/starta lufttillförseln med önskat tidsintervall.



**Figur 8.** Stenen som används för att finfördela gas i vätska.

### 5.2.3 Analys med HACH-LANGE kyvett-tester

I några experiment analyserades ammoniumkvävehalt och nitritkvävehalt på prover tagna under aktivitetstest. Både ammoniumkväve och nitritkväve analyserades med HACH-LANGE (Sköndal, Sverige) kyvett-tester. Analysen utfördes med kyvetter som innehåller reagenslösning och som efter tillsats av prov analyseras i en fotometer. Ammoniumkväve analyserades med LCK 303 som är en kyvett med analysintervallet 2,0- 47,0 mg/l  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Nitritkväve analyserades med LCK 342-kyvetter som har ett analysintervall mellan 0,6- 6,0 mg/l  $\text{NO}_2\text{-N}$ .

## 5.3 TILLREDNING AV KEMIKALIER

En 1 M fosfatbuffertlösning för pH-reglering användes i samtliga försök. Fosfatbufferten tillreddes genom att blanda 65,11 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  och 2,84 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  i en 200 ml mätkolv. Mätkolven fylldes upp till 200 ml med destillerat vatten och ställdes sedan på magnetomrörare med uppvärmning (ca  $50^\circ\text{C}$ ). Lösningen fick stå på omröraren med värme i ca två timmar tills dess att allt löst sig. Fosfatbuffertlösningen förvarades efter tillredning ovanpå en ugn som var något varmare än rumstemperatur för att inte utfällning av kemikalier skulle uppstå.

Ammoniumlösning med koncentrationen 5 mg  $\text{NH}_4\text{-N/ml}$  tillreddes genom att tillsätta 11,8 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i en 500 ml mätkolv och fylla upp med destillerat vatten. Mätkolven placerades sedan en kort stund på magnetomrörare för att saltet skulle lösa sig. Ammoniumlösningen förvarades i kylskåp efter tillredning.

En nitritlösning med koncentrationen 5 mg  $\text{NO}_2\text{-N/ml}$  tillreddes genom att blanda 12,42 g  $\text{NaNO}_2$  med destillerat vatten i en 500 ml mätkolv. Mätkolven placerades sedan en kort stund på magnetomrörare för att saltet skulle lösa sig. Även nitritlösningen förvarades i kylskåp efter tillredning.

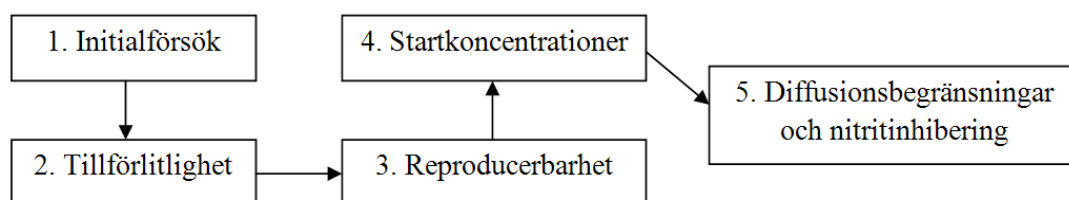
Natriumklorat som användes som inhibitor för NOB tillreddes till koncentrationen 1 M genom att sätta 53,22 g  $\text{NaClO}_3$  i en 500 ml mätkolv och fylla upp med destillerat vatten. Mätkolven placerades på magnetomrörare tills lösningen var helt klar och placerades sedan i kylskåp för förvaring.

## 5.4 METODUTVECKLING

Metodutveckling var det primära syftet i detta examensarbete. Högst prioritet låg i att utveckla en snabb och enkel metod för aktivitetstest av anammox. Metoden för bestämning av anammoxaktiviteten utvecklades genom fem experiment (Experiment 1-5) och metoden för bestämning av aktiviteten för AOB utvecklades genom tre experiment (Experiment 6-8).

### 5.4.1 Anammoxaktivitet

Utvecklingen av metoden för att bestämma aktiviteten för anammox genom tryckmätning utfördes genom experiment 1-5. Målsättningen var att utveckla en säker och stabil metod som ska kunna användas för kontinuerlig uppföljning av den specifika anammoxaktiviteten på Sjölanda avloppsreningsverk. Metoden skulle vara lätt att utföra, kräva låg arbetsinsats och inte förbruka mycket material. I Figur 9 illustreras arbetsgången i metodutvecklingen. Den slutgiltiga metoden som framarbetats finns i Bilaga A. Observera att det i metodbeskrivningen för experimenten i metodutvecklingen endast anges avvikelser från den slutgiltiga metodiken och inte hela utförandet.



**Figur 9.** Metodutvecklingens arbetsgång för utarbetning av metod för bestämning av den specifika anammoxaktiviteten.

#### *Experiment 1 – Initialförsök tryckmätning*

Det primära syftet med det initiala experimentet var att bekräfta att den tryckökning som uppstår låg inom trycksensorns mätintervall samt att tillsatt mängd buffertlösning var tillräcklig för att pH-värdet i reaktorn skulle hållas konstant. Dessutom syftade experimentet till att generera värden så att programvaran för mätutrustningen kunde testas.

Det initiala experimentet förväntades ge en förståelse för metoden och utrustningen samt belysa praktiska svårigheter i den teoretiska metodiken. En tryckökning förväntades baserat på beräkningar som utfördes i samband med inköp av tryckmätare samt teoretiska beräkningar utifrån tillsatt mängd nitrit och ammonium, gasvolym och mängden bärare.

Försöket utfördes enligt metodiken som presenteras i Bilaga A med följande avvikelser: Försöket utfördes i rumstemperatur och temperaturen reglerades därmed inte med vattenbad. Startkoncentrationen av nitrit- och ammoniumkväve var 46,7 mg N/l. Gasfasen i reaktorn spolades med kvävgas genom en nål i septumet i stället för med gasfördelningssten i vätskefasen. Ammonium och nitrit tillsattes med nål genom septumet.

## Experiment 2 – Metodens tillförlitlighet

Experimenten i denna del av metodutvecklingen hade syftet att säkerställa metodens tillförlitlighet genom att jämföra resultaten från tryckmätningar med mätningar på hur mycket nitrit- och ammoniumkväve som åtgått under mätperioden. I detta experiment utfördes även ett parallellt experiment med metodiken i avsnitt 4.5.3, härnäst kallad för referensförsöket, för att jämföra resultaten från de två metodikerna.

### Del 1

Den första delen av experimentet bestod av fyra försök. Den enda avvikelserna i metodiken från Bilaga A var startkoncentrationerna av nitrit- och ammoniumkväve, startkoncentrationerna för de fyra försöken presenteras i Tabell 2. För varje försök togs ett 10 ml prov precis innan tryckmätningen startade och ett precis efter den avslutats som sedan analyserades med kyvett-tester från HACH-LANGE för att bestämma koncentrationen nitrit- och ammoniumkväve.

Från tryckökningen som uppstod mellan provtagningarna beräknades mängd producerad kvävgas genom att använda allmänna gaslagen. Från analyserna med kyvett-tester beräknades potentiell kvävgasbildning utifrån både förbrukad nitrit och förbrukad ammonium. Den potentiella tryckökningen jämfördes sedan med den uppmätta för att undersöka om allt substrat som förbrukas går genom anammoxprocessen.

<b>Tabell</b>	<b>2.</b>	Startkoncentrationer		i	försök	2.1-2.4
<b>Försöks- nummer</b>	<b>Startkoncentration (mg/l)</b>	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N</b>	<b>Startkoncentration (mg/l)</b>			<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N</b>
<b>2.1</b>	100		100			
<b>2.2</b>	75		75			
<b>2.3</b>	50		50			
<b>2.4</b>	25		25			

### Del 2

I den andra delen av experiment 2 jämfördes tryckmätningssmetoden (försök 2.5) med metoden i avsnitt 4.5.3 (försök 2.6). De två försöken utfördes med bärarmaterial från samma provtagningstillfälle. I det försök 2.5 analyserades anammoxaktiviteten med tryckmätning enligt metodiken i Bilaga A med en avvikelse. Startkoncentrationerna av nitrit- och ammoniumkväve var 50 mg N/l respektive 150 mg N/l. Anledningen till att koncentrationerna skiljde sig från metodiken var att dessa används i referensmetoden.

I referensförsöket analyserades anammoxaktiviteten genom att ta prover var 15:e minut som sedan analyserades för nitrit- och ammoniumkväve, metodiken finns beskriven i detalj i Bilaga C. I referensmetoden (Försök 2.6) användes samma mängd kranvatten, bärare, ammonium, nitrit och buffertlösning som metoden med tryckmätning men reaktorn var inte den samma. Eftersom provtagning gjordes kontinuerligt kunde inte reaktorn vara tät. Istället användes en reaktor med hål i locket där anaeroba förhållanden uppnåddes genom att spola vätskefasen med kvävgas genom en gasfördelningssten under hela försöket. Efter tillsatsen av nitrit- och ammoniumkväve fortgick experimentet i 120 minuter och var 15:e minut gjordes en provtagning (ca 10 ml). Proverna filterades och analyserades sedan med kyvetter från HACH-LANGE för att bestämma koncentrationen nitrit- och ammoniumkväve.

De båda metoderna jämfördes genom att beräkna aktiviteten i tidsintervallet 45-75 minuter. För försök 2.5 gjordes detta enligt metodiken i Bilaga A med enda skillnad att tidsintervallet var ett annat. Från försök 2.6 plottades koncentrationen nitrit- och ammoniumkväve mot tiden och lutningen ( $mg\ NO_2-N/min$  respektive  $mg\ NH_4-N/min$ ) i tidsintervallet 45-75 minuter bestämdes. Lutningen omvandlades till enheterna  $g\ NO_2-N/m^2/dag$  samt  $g\ NH_4-N/m^2/dag$  för nitrit respektive ammonium. Dessa omvandlades sedan till  $g\ N_2-N/m^2/dag$  genom stökiometrin för anammoxprocessen och jämfördes därefter med resultatet i försök 2.5.

### ***Experiment 3 – Metodens reproducerbarhet***

Experiment tre bestod av en följd av försök som syftade till att upprepa bestämningen av anammoxaktiviteten genom tryckmätning under lika förhållanden för att undersöka säkerheten i resultaten och metodens reproducerbarhet. Försöksserien syftade även till att ge en indikation på om förvaringstiden för bärarna innan experimentet påverkar resultaten.

Experiment 3 bestod av fyra delförsök. Försöken utfördes enligt metoden i Bilaga A med följande förändringar. Startkoncentrationen av nitrit och ammonium var vid samtliga försök 47 mg N/l. Istället för att spola med kvävgas genom gasfördelningssten spolades kvävgas in under septummet genom en slang. Provtagning av bärare gjordes vid två separata tillfällen. I Tabell 3 presenteras förvaringstider för s´de olika försöken.

**Tabell 3.** Provtagning och förvaring i experiment 3

<b>Försöks-nummer</b>	<b>Provtagningstillfälle</b>	<b>Förvaring i kylrum (dagar)</b>	<b>Förvaring i rumstemperatur (dagar)</b>
<b>3.1</b>	1	4	1
<b>3.2</b>	1	4	1
<b>3.3</b>	2	0	0
<b>3.4</b>	2	0	1

### ***Experiment 4 – Startkoncentrationens inverkan på aktiviteten***

Denna serie experiment syftade till att undersöka hur mängden tillsatt ammoniumkväve och nitritkväve påverkar den specifika anammoxaktiviteten. Efter försöksserien förväntades en uppfattning om vid vilka startkoncentrationer aktiviteten hämmas eller är beroende av startkoncentrationen. Försöksserien syftar även till att undersöka ifall startkoncentrationen påverkar varaktigheten på den initiala lag-fasen. Utifrån denna studie skulle ett tidsintervall för bestämning av maximala tryckförändringen fastställas, vilken används vid beräkning av SAA.

Vid för låga koncentrationer förväntades den specifika anammoxaktiviteten minska på grund av att diffusionen i biofilmen minskar. Denna minskning resulterar i att ammoniumet och nitriten inte kan penetrera biofilmen helt och att vissa bakterier därmed inte får tillgång till näringsämnen. För höga halter av nitrit kan vara inhiberande för anammoxbakterierna. Försöksserien förväntas även ge ett tidsintervall där tryckökningen är i försöken är konstant. I tidigare utförda försök har en lag-fas på cirka 40 minuter uppstått i början av tryckmätningen. En undersökning av varför lag-fasen var så lång önskades. Experimentserien bestod av nio försök med varierande startkoncentrationer av nitrit- och ammoniumkväve. Detaljerna för försöken redovisas i

Tabell 4. Försök 4.1-4.7 utfördes enligt metodiken i Bilaga A med undantag för mängden substrat och att kvävgas spolades genom att lyfta septummet och föra in en

slang med kvävgas istället för att använda gasfördelningssten. I försök 4.8 och 4.9 användes gasfördelningssten på samma vis som för metodiken i Bilaga A.

I försök 4.3 användes 1 l kranvatten och 330 stycken bärare (32 % fyllnadsgrad). Detta gjordes för att tryckökningen vid höga startkoncentrationer av nitrit och ammonium är väldigt stor. Detta medförde att trycksensorn når sin maximala mätgräns snabbt. Genom att minska mängden vatten+bärare i reaktorn ökar gasvolymen i reaktorn vilket i sin tur ger en långsammare tryckökning.

**Tabell 4.** Försöksspecifikationer experiment 4

Försöks- nummer	Provtagning (dagar)	Volym vatten (l)	Antal bärare (st)	Tillsatt NH <sub>4</sub> - N (mg/l)	Tillsatt NO <sub>2</sub> -N (mg/l)	Tillsatt buffert (ml)
4.1	0	1,5	480	200	200	45
4.2	1	1,5	480	70	70	45
4.3	1	1	330	200	200	30
4.4	1	1,5	480	100	100	45
4.5	1	1,5	480	150	150	45
4.6	2	1,5	480	150	100	45
4.7	2	1,5	480	100	150	45
4.8	1	1,5	480	200	200	45
4.9	1	1,5	480	50	150	45

Enligt stökiometrin för anammoxprocessen åtgår mer nitritkväve än ammoniumkväve vid bildning av kvävgas. Vid bestämning av initiala koncentrationer är det relevant att undersöka vid vilken kvot av de båda startkoncentrationerna det begränsande substratet byts från nitrit till ammonium. Detta gjordes genom att jämföra kvoten mellan tillsatt ammonium och tillstätt nitrit med den beräknade kvoten i avsnitt 5.7.

#### ***Experiment 5 – Diffusionsbegränsning och nitritinhibering***

I den metod som utvecklades önskades startkoncentrationen ligga i intervallet för nollte ordningens reaktion dvs. då aktiviteten är oberoende av startkoncentrationen. För att få ett säkrare resultat för sambandet än vad som framkom i experiment 4 utfördes ytterligare en serie aktivitetstester med olika startkoncentrationer. Skillnaden från experiment 4 var att samtliga försök gjordes på bärare från samma provtagningstillfälle för att ge ett klarare samband. Samtliga försök i experiment 5 utfördes under samma dag.

Försöken utfördes med metodiken i Bilaga A, med initialkoncentrationer som enda avvikelser. Tryckmätningar utfördes för startkoncentrationerna som presenteras i Tabell 5.

**Tabell 5.** Startkoncentrationer för försöken i experiment 5

Försöks- nummer	Startkoncentration NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg/l)	Startkoncentration NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/l)
5.1	25	25
5.2	50	50
5.3	75	75
5.4	100	100
5.5	150	150
5.6	200	200
5.7	250	250

Experimentet förväntades ge en graf där SAA plottas mot startkoncentrationen i vilken det tydligt syns vid vilken koncentration aktiviteten övergår till att vara oberoende av koncentrationen i bulkfasen.

#### 5.4.2 AOB-aktivitet

För att bestämma aktiviteten för AOB användes metodiken där syrerrespirationen (OUR) mäts. Målsättningen var även för AOB att utveckla en säker och stabil metod som ska kunna användas för kontinuerlig uppföljning av AOB-aktiviteten i deammonifikationsprocessen på Sjölanda avloppsreningsverk. Metoden för att mäta aktiviteten för AOB baseras på att mäta syrerrespirationen när ammonium tillsätts. Eftersom det finns en risk att även NOB, vilka förbrukar syre, finns i biofilmen användes NaClO<sub>3</sub> som inhibitor för dessa. Den slutgiltiga framarbetade metoden för bestämning av AOB:s aktivitet presenteras i Bilaga B. Metodutvecklingen delades upp i tre delsteg, experiment 6-8, vilka beskrivs nedan.

##### *Experiment 6 – Initialförsök OUR*

Experimenten hade som syfte att prova utrustningen för OUR-test samt att gå igenom metoden och säkerställa att denna fungerar i praktiken.

Försöket utfördes enligt metodiken i Bilaga B, med undantag för tidsintervallen mellan tillsats av kemikalier. När loggningen av syrehalten startades fick timern alternera i 30 minuter varefter (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tillsattes. Därefter fick timern alternera i ytterligare 30 minuter innan NaClO<sub>3</sub> tillsattes. 30 minuter efter tillsatt NaClO<sub>3</sub> avslutades försöket.

##### *Experiment 7 – Alterneringstidens inverkan på resultatet*

Detta experiment bestod av två försök där tidsintervallet för luftningen varierades. Syftet var att undersöka om fem minuter var ett för kort luftningsintervall för att få upp syrehalten i reaktorn innan syresättningen stängdes av igen. Metodiken som användes var densamma som den presenterade i Bilaga B med undantag för alterneringstiderna och tiderna mellan tillsats av kemikalier.

I det första försöket, 7.1, användes en alterneringstid på 10 minuter dvs. skiftade timern mellan att lufta till att inte lufta var tionde minut. Eftersom alterneringstiden utökades pågick försöket under en längre tid. Då försöket hade startats fick luftningen alternera i 80 minuter innan ammonium tillsattes. Därefter fick den alternera i ytterligare 80 minuter innan tillsats av inhibitor för NOB. Försöket avslutades när luften fått alternera ytterligare 60 minuter.



I det andra försöket, 7.2, luftades reaktorn i 10 minuter varefter luftningen stängdes av i 5 minuter. Här fick luftningen alternera i 90 minuter innan ammonium tillsattes varefter alterneringen fortsatte i 100 minuter innan NaClO<sub>3</sub> tillsattes. Efter tillsatsen fortgick försöket i ytterligare 105 minuter.

### **Experiment 8 – Försök med extra tillsats av ammonium**

Då det fanns en oro att det tillsatta ammoniumet skulle ta slut under försökets gång utfördes ett experiment där ytterligare ammonium tillsattes tillsammans med inhibitorn för NOB. Syftet var alltså att se om syrerespitationen förändrades vid ytterligare tillsats av ammonium.

I försöket användes metodiken som presenteras i Bilaga B. Det enda undantaget från metoden var att vid tillsatsen av NaClO<sub>3</sub> tillsattes även 15 ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## **5.5 ANAMMOXAKTIVITETENS TEMPERATURBEROENDE**

Anammoxaktivitetens temperaturberoende bestämdes genom att utföra fyra försök enligt metodiken i Bilaga A med enda förändring att temperaturen i reaktorn varierades. Aktiviteten mättes på temperaturerna som presenteras i Tabell 6. Två typer av vattenbad användes i försöket, ett med värmande- och ett med kylande effekt.

**Tabell 6.** Temperaturer och typ av vattenbad för försök 9.1-9.4

<b>Försöksnummer</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Typ av vattenbad</b>
<b>9.1</b>	10	Kylande
<b>9.2</b>	15	Kylande
<b>9.3</b>	20	Värmande
<b>9.4</b>	25	Värmande

## **5.6 BEARBETNING AV DATA**

### **5.6.1 Mätdata från aktivitetstest av anammox**

Tryckmätaren kopplades till dator via en USB sladd (USB 5100 från Greisinger electronic GmbH). För att kunna använda sladden krävs att drivrutiner för denna installeras på datorn. Till tryckmätaren finns en mjukvara för överföring av mätdata till dator. Mjukvaran heter GSOFT 3050 och även denna kommer från Greisinger electronic GmbH. Genom mjukvaran kunde mätdata exporteras till Microsoft Excel var all bearbetning av data har utförts.

En mall för beräkning av SAA skapades. I mallen klistrades mätvärden för trycket i reaktorn in. I mallen fördes även temperaturer, pH-värden, vikter och antalet bärare in. I mallen plottas trycket under minutrarna 40-50 min, på denna plott lades en trendlinje och lutningen  $dp/dt$  användes tillsammans med beräknad gasvolym och temperaturen i flaskan för att beräkna SAA.

### **5.6.2 Mätdata från aktivitetstest genom OUR**

Mätdata från syremätningssystemet loggas under mätning direkt på ett USB-minne. I USB-minnet lagras data som en textfil vilken kunde öppnas i Excel. Syremätaren har två sensorer och mätdata från den sensorn som inte användes rensades bort. Syrehalten plottades sedan mot tiden. OUR fås genom att plotta och beräkna lutningen under de tidsintervall då syretillförseln var avstängd. Uppsökningen av dessa

intervall gjordes manuellt baserat på vetenskapen om luftningsintervall. För varje period då luftningen var avstängd togs OUR fram och dessa plottades sedan mot tiden.

## 5.7 BERÄKNINGAR

SAA beräknades enligt ekvation 19 och 20.

$$\frac{dN_2}{dt} = \frac{\alpha_{40-50} \cdot V_G}{R \cdot T} \left[ \frac{gN_2}{min} \right] \quad (19)$$

$$SAA = \frac{\frac{dN_2}{dt} \cdot 1440 \cdot M_{N_2}}{X \cdot 0,00049} \left[ \frac{g N}{m^2 dag} \right] \quad (20)$$

Där  $\alpha_{40-50}$  är lutningen på tryckkurvan under tidsintervallet 40-50 minuter [mbar/min],  $V_G$  är volymen för gasfasen i reaktorn [ $m^3$ ],  $R$  är allmänna gaskonstanten [(mbar ·  $m^3$ )/K],  $T$  är temperaturen [K],  $M_{N_2}$  är molmassan för kvävgas [g/mol] och  $X$  är antalet bärare i försöket. Siffran 0,00049 är den effektiva ytan per bärare [ $m^2$ ] och 1440 är antalet minuter per dag.

Vilket substrat som begränsar diffusionen i biofilmen beräknas på genom ekvation 12 i avsnitt 4.4.1.

$$\frac{C_{NH_4}^*}{C_{NO_2}^*} = \frac{D_{NO_2} \cdot k_{ofNH_4}}{D_{NH_4} \cdot k_{ofNO_2}} = \frac{D_{NO_2}}{D_{NH_4}} M = \frac{0,9 \cdot 10^{-4}}{1,7 \cdot 10^{-4}} \cdot \frac{1}{1,32} = 0,40$$

där  $D_{NH_4} = 1,7 \cdot 10^{-4}$  ( $m^2/d$ ) och  $D_{NO_2} = 0,9 \cdot 10^{-4}$  ( $m^2/d$ ) vid 25°C i rent vatten (Henze m.fl., 1997 s. 152).

Detta resulterar i att när kvoten  $\frac{C_{NH_4}^*}{C_{NO_2}^*} > 0,4$  begränsar nitrit nedbrytningshastigheten och när  $\frac{C_{NH_4}^*}{C_{NO_2}^*} < 0,4$  begränsar ammonium.

## 6. RESULTAT

### 6.1 METODUTVECKLING

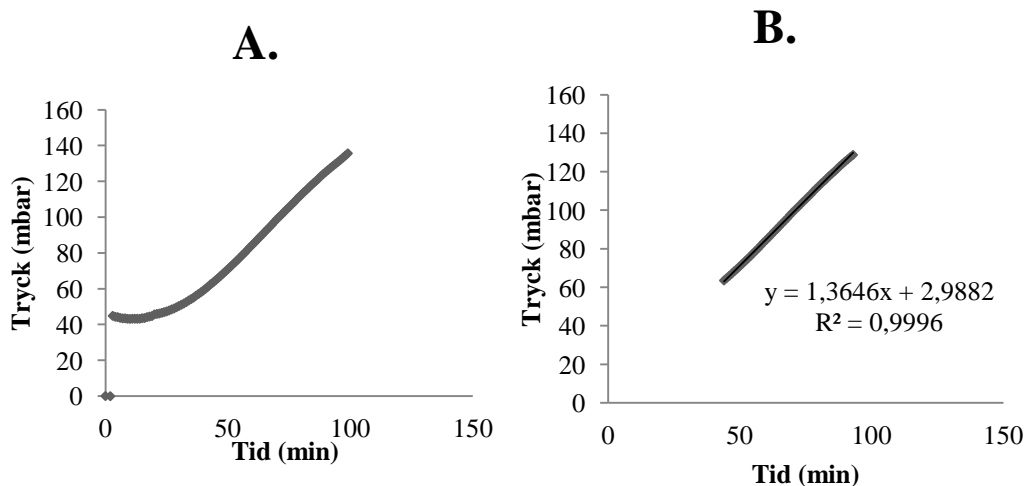
#### 6.1.1 Anammoxaktivitet

##### *Experiment 1 – Initialförsök tryckmätning*

Vid bestämning av gasvolymen gjordes ett fel så att volymen inte kunde bestämmas, den uppskattades vid beräkning av aktiviteten till 0,3 l.

I Figur 10A illustreras tryckförändringen i reaktorn under gällande experiment. Några mätvärden loggades innan substratet tillsattes. Vid tillsatts av substrat ökade trycket i flaskan med ca 40 mbar vilket är ett resultat av minskad gasvolym då vätskevolymen i flaskan ökade. I figuren ses en lag-fas under de första 40 minuterna varefter tryckökningen får en linjär karaktär. I de sista mätpunkterna ses en svag avtagning i lutningen. När försöket fortlöper och substratet i bulkfasen börjar avta kommer aktiviteten bli beroende av koncentrationen i bulken enligt teorin i avsnitt 4.4.1. När detta inträffar börjar kurvan vika av tills dess att allt substrat är slut och trycket i bägaren blir konstant. I detta experiment pågår tryckmätningen inte tillräckligt länge för att detta ska synas tydligt, en liten avtagning i lutning kan dock uppfattas i Figur 10A.

Det initiala pH-värdet i försöket var 7,62 och efter avslutat försök var det 7,59. Då förändringen var väldigt liten och värdet låg inom anammox fysiologiska pH-intervall drogs slutsatsen att mängden buffertlösning var tillräcklig. Under försöket reglerades inte temperaturen utan försöket gjordes i rumstemperatur. Initialt var temperaturen 24,0 °C och efter avslutat experiment var temperaturen 21,3 °C, den förändrade temperaturen berodde på att det vatten som tillsattes flaskan var något varmare än rumstemperatur.



**Figur 10.** Tryckförändring under experiment 1 (A) samt lineariteten under de sista 50 minuterna (B).

Resultaten från tryckförsöket skalades och resultaten från 50-93 minuter användes för att bestämma  $dp/dt$ , se Figur 10B. Från trendlinjen erhöles  $dp/dt = 1,36$  mbar/min. För att beräkna SAA enligt teorin i avsnitt 4.5.1 krävs volymen för gasfasen. På grund av felvägningar under experimentet kunde inte denna volym bestämmas men den uppskattades till 300 ml vilket resulterade i  $SAA = 2,87$  g N/(m<sup>2</sup>\*d).

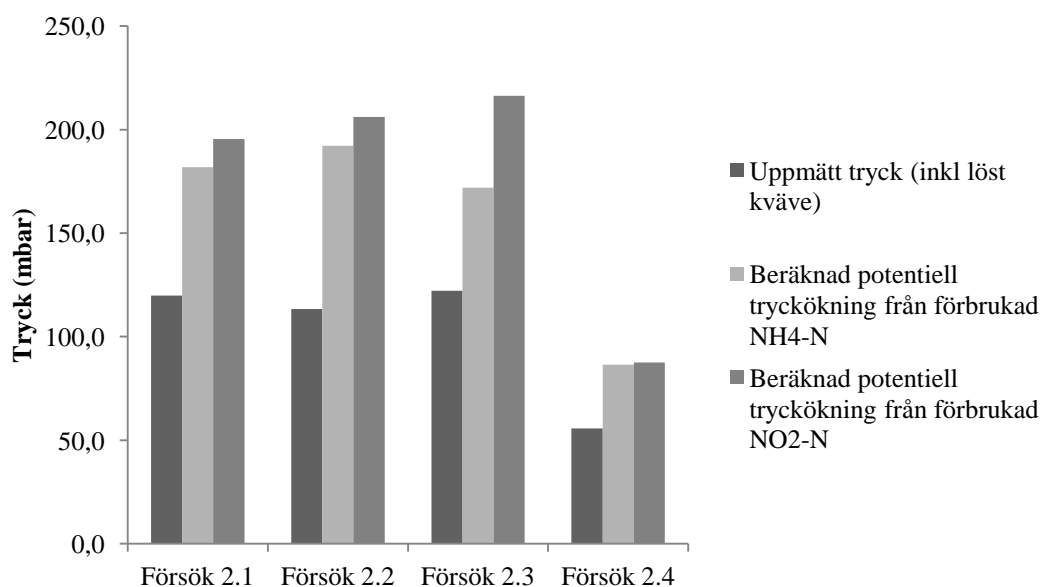
Följande förändringar gjordes i metoden efter analys av resultaten från experiment 1:

- Temperaturen hålls konstant genom vattenbad.
- För att säkerställa att inget syre ska finnas tillgängligt spolas vattenfasen med kvävgas antingen genom en diffusersten eller genom att stoppa ner en slang med kvävgas i gasfasen av reaktorn. Båda metoderna bör undersökas.
- Bestämning av gasfasens volym görs på följande vis:
  1. Väg reaktorn efter försöket.
  2. Fyll därefter upp reaktorn helt med vatten (när bärarna fortfarande är kvar) och väg igen.
  3. Volymen kan sedan beräknas genom densiteten på vatten.
- Tryckmätningens varaktighet utökas till minst 120 minuter för att generera ett diagram som visar hur tryckökningen sjunker i takt med att substratet tar slut i reaktorn.

### *Experiment 2 – Metodens tillförlitlighet*

#### Del 1

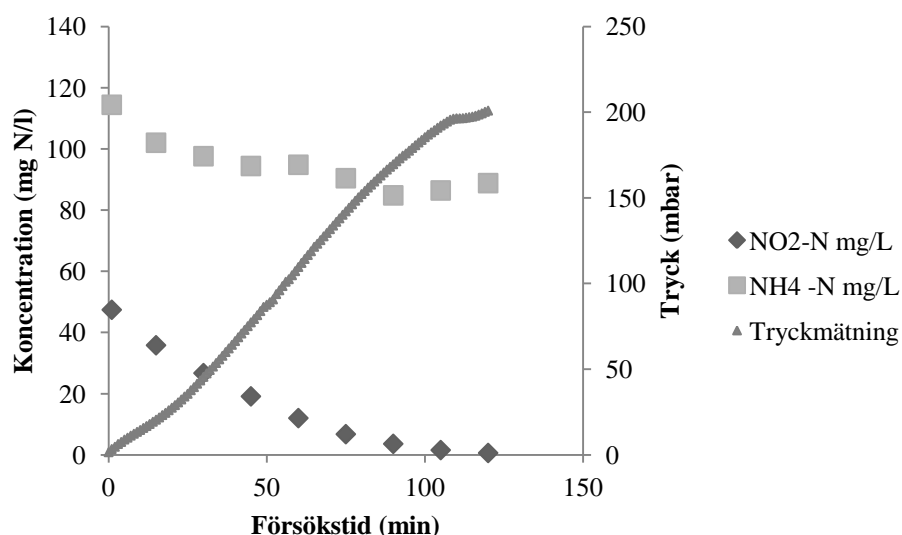
Den potentiella tryckökningen som beräknats från mängden förbrukad nitrit och ammonium var i alla fyra försök betydligt högre än den uppmätta, se Figur 11. I samtliga försök var den potentiella tryckökningen högre när den beräknades från nitrit än från ammonium.



**Figur 11.** Resultat försök 2.1 - 2.4.

#### Del 2

I Figur 12 presenteras tryckkurvan från försök 2.5 tillsammans med de uppmätta koncentrationerna från försök 2.6. Aktiviteterna från försök 2.5 och 2.6 presenteras i Tabell 7. Aktiviteten som beräknats från referensmetoden är något högre, både när beräkning gjorts från nitrit och ammonium. Trots ett något lägre resultat i tryckmätningssmetoden dras slutsatsen att denna metod är tillförlitlig.



**Figur 12.** Tryckkurva från försök 2.5 tillsammans med uppmätt koncentration nitrit och ammonium under försök 2.6.

**Tabell 7.** Resultat försök 2.5 och 2.6

Försök	Aktivitet (g N <sub>2</sub> -N/m <sup>2</sup> dag)	Tryck (mbar)
2.5 - Tryckmätning	4,6	216
2.6 – Beräknat från nitritkurvan	4,9	318,3
2.6 – Beräknat från ammoniumkurvan	5,2	229,8

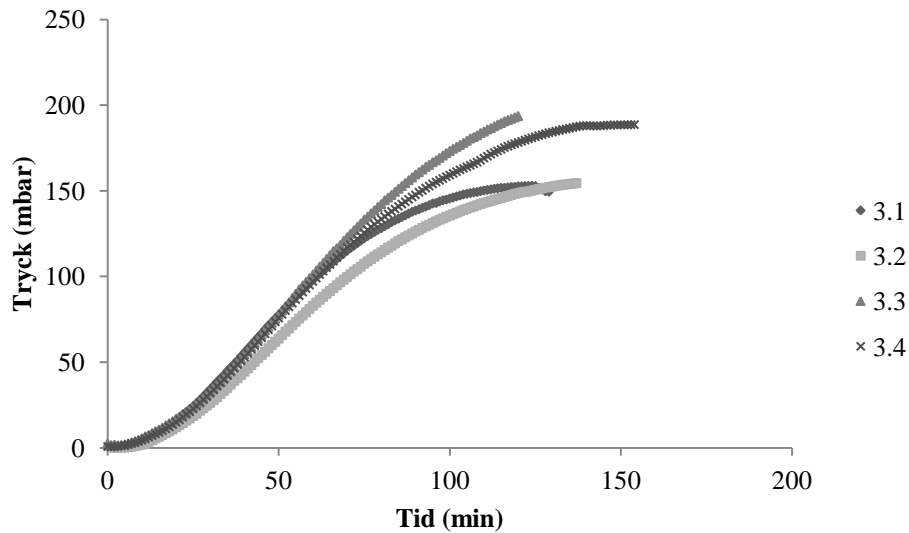
Precis som i del 1 ses att den beräknade tryckökningen blir högre än den uppmätta och att det verkar försvinna mer nitrit än ammonium.

### *Experiment 3 – Metodens reproducerbarhet*

Det uppmätta trycket i de fyra reaktorerna redovisas i Figur 13. I Tabell 8 visas antal förvaringsdagar, temperatur vid försöket och SAA för de fyra försöken.

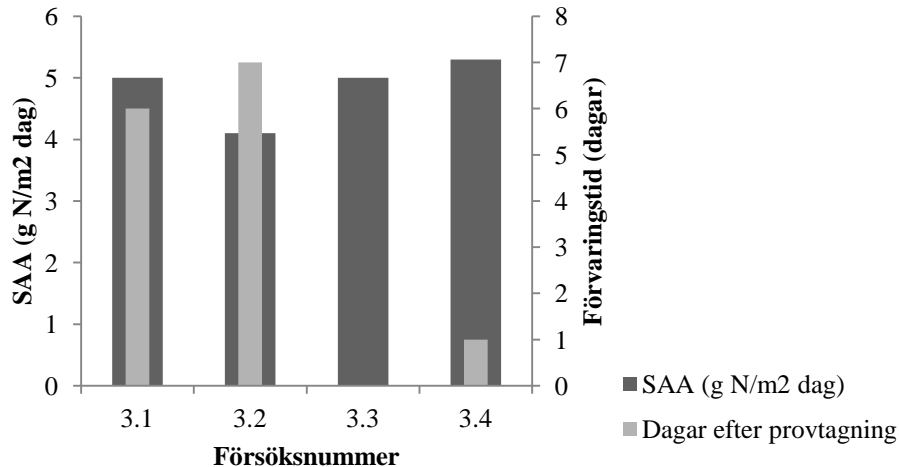
**Tabell 8.** Resultat för försök 3.1 - 3.4

Experiment	3.1	3.2	3.3	3.4
Antal dagar förvaring	6	7	0	1
Temperatur vid försök (°C)	27,0	27,0	27,7	27,9
SAA (g N/m <sup>2</sup> dag)	5,0	4,1	5,0	5,3



**Figur 13.** Tryck i reaktorerna i försök 3.1-3.4

I Figur 14 visas SAA för samtliga experiment tillsammans med antal dagar efter provtagning som experimentet utfördes. Det är generellt svårt att jämföra prover från olika provtagningstillfällen då biomassan ständigt förändras och därmed aktiviteten. Det är dock värt att påpeka att provet med längst förvaringstid hade lägst aktivitet. Utifrån resultaten i experiment 2 drogs slutsatsen att metoden bör göras med så färsk bärare som möjligt för att säkerställa att aktiviteten inte avtar som följd av långvarig förvaring.



**Figur 14.** SAA för de fyra försöken tillsammans med antalet dagar efter provtagning som experimentet utfördes.

Vad gäller reproducerbarheten i metoden så dras slutsatsen att metoden visar på en bra reproducerbarhet utifrån resultaten i försök 3.3 och 3.4.

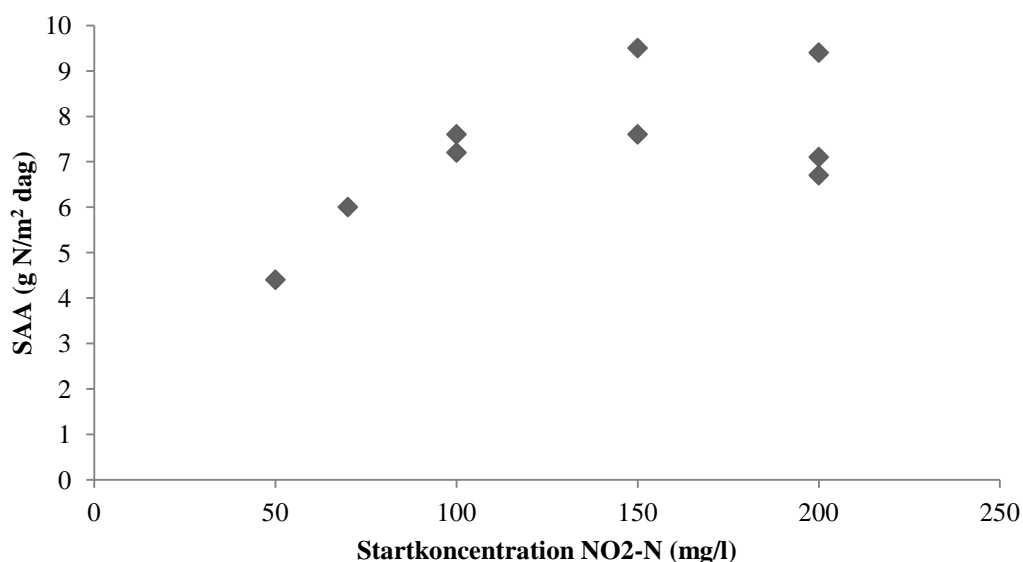
#### Experiment 4 - Startkoncentrationer

Resultaten för försök 4.1 - 4.9 redovisas tillsammans med startkoncentrationerna i Tabell 9.

**Tabell 9.** Resultat för försök 4.1 - 4.9

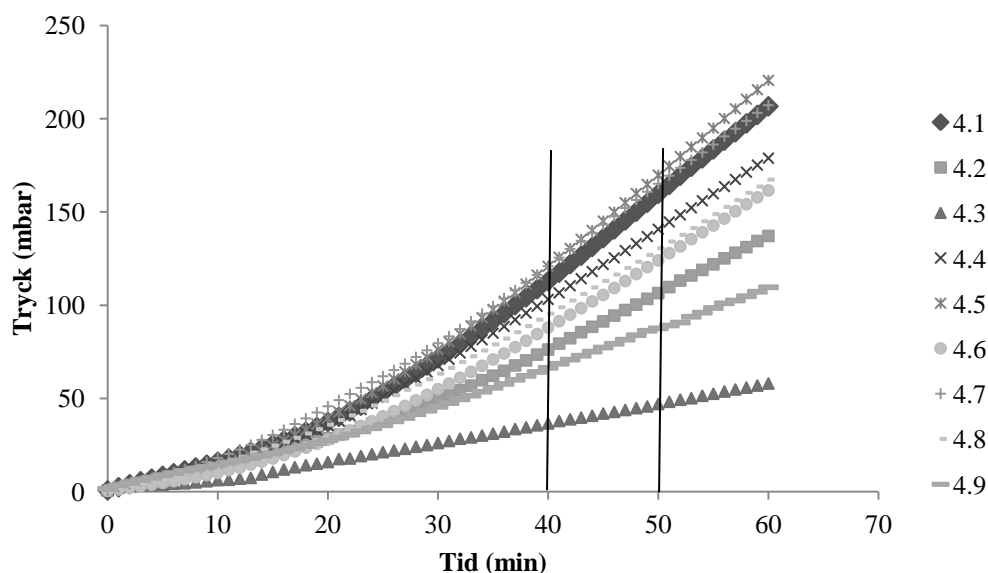
Försöksnummer	Tillsatt (mg/l)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	Tillsatt (mg/l)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	SAA (g N/(m <sup>2</sup> dag))	Kvot NH <sub>4</sub> /NO <sub>2</sub>
4.1	200	200	200		7,1	1
4.2	70	70	70		6,0	1
4.3	200	200	200		9,4	1
4.4	100	100	100		7,6	1
4.5	150	150	150		9,5	1
4.6	100	150	150		7,2	1,5
4.7	150	100	100		7,6	0,67
4.8	200	200	200		6,7	1
4.9	50	150	150		4,4	3

I samtliga fall är kvoten mellan startkoncentrationerna av ammonium och nitrit större än 0,4 vilket medför att nitrit begränsar nedbrytningshastigheten. Genom att studera Figur 15, när SAA plottas mot startkoncentrationen nitrit syns indikationer för hur aktiviteten påverkas av koncentrationen för nitrit. Resultaten i figuren indikerar på att förhållandet mellan startkoncentration och aktivitet övergår från halv ordningens reaktion till nollte ordningens reaktion runt koncentrationen 100 mg NO<sub>2</sub>-N/l. De två punkterna som har en aktivitet runt 9 (g N/(m<sup>2</sup> dag)) representerar försök där vätskefasen inte spolades med kvävgas genom gasfördelningssten utan endast genom att stoppa ner en slang med kvävgas. Detta medför att det finns en risk för att det finns syre kvar i vätskefasen vilket kan resultera i den högre aktiviteten.



**Figur 15.** SAA vid olika startkoncentrationer nitritkväve.

Trycket under de första 60 minutrarna för samtliga experiment redovisas i Figur 16. Från figuren kan ses att efter 40 minuter har samtliga experiment kommit ur sin lag-fas och tryckökningen är linjär. Från detta resultat beslutades att lutningen ( $dp/dt$ ) bestäms i tidsintervallet 40-50 minuter. Intervallet hålls kort och i starten av den linjära perioden då aktiviteten kommer att avta i takt med att substratet förbrukas.



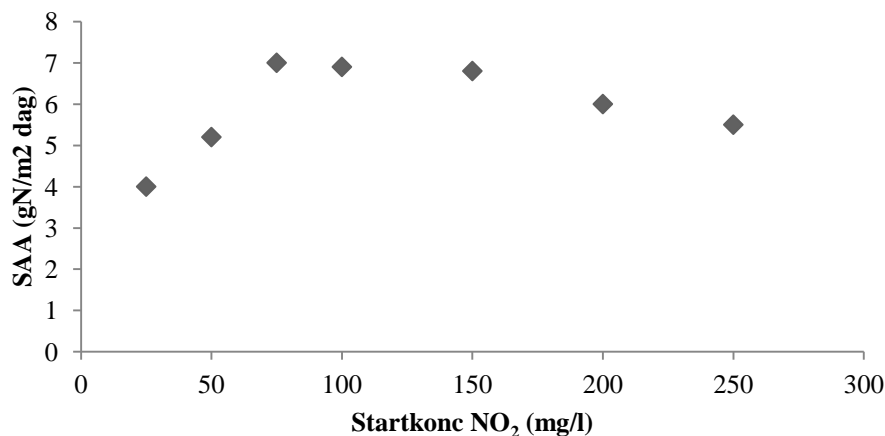
**Figur 16.** Tryckutvecklingen under de första 60 minutrarna i försök 4.1-4.9.

I försök 4.1 undersöktes ifall lag-fasen berodde på att kvävgas löste sig i vattnet i takt med att trycket i behållaren ökar. Detta var inte fallet och resultaten redovisas i Bilaga D.

#### **Experiment 5 - Diffusionsbegränsning och nitritinhibering**

Resultatet för initialkoncentrationens inverkan på den specifika anammoxaktiviteten redovisas i Figur 17. I figuren ses att mellan 75 mg N/l och 150 mg N/l tycks reaktionen vara av nollte ordningen och att under 75 mg N/l är aktiviteten beroende av startkoncentrationen. När startkoncentrationen överstiger 150 mg N/l minskar aktiviteten. I litteraturen finns studier som visar att nitrit i höga koncentrationer kan inhibera anammox (Strous m.fl., 1999a; Lotti m.fl., 2012; Wett, 2007; Fux & Siegrist, 2003), vilket stämmer bra in på resultaten i denna studie.





**Figur 17.** SAA vid olika startkoncentrationer av nitritkväve för bärare provtagna vid samma tillfälle.

Utifrån resultaten i Figur 17 skulle en startkoncentration för nitritkväve och ammoniumkväve bestämmas. Startkoncentrationen önskas ligga i intervallet för nollte ordningens reaktion. Om biofilmen på bärarna skulle växa till och bli tjockare kommer intervallet med halv ordningsreaktion utökas till högre koncentrationer varvid en startkoncentration i den högre delen av nollte ordningens reaktion bör väljas. Utifrån föregående resonemang valdes startkoncentrationen för metoden till 125 mg N/l för både nitrit och ammonium.

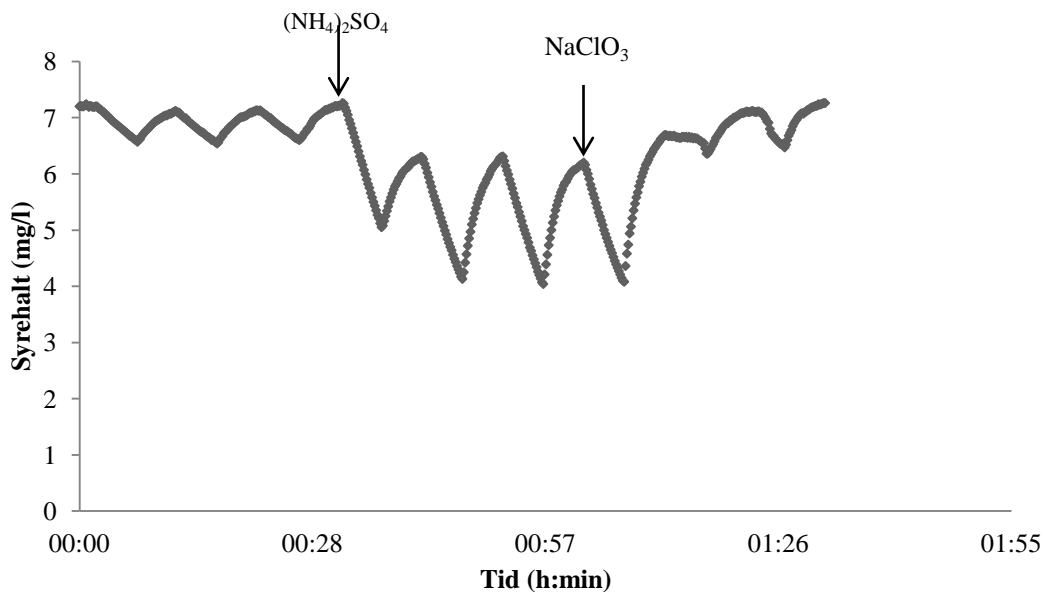
### 6.1.2 AOB-aktivitet

#### *Experiment 6 – Initialförsök OUR*

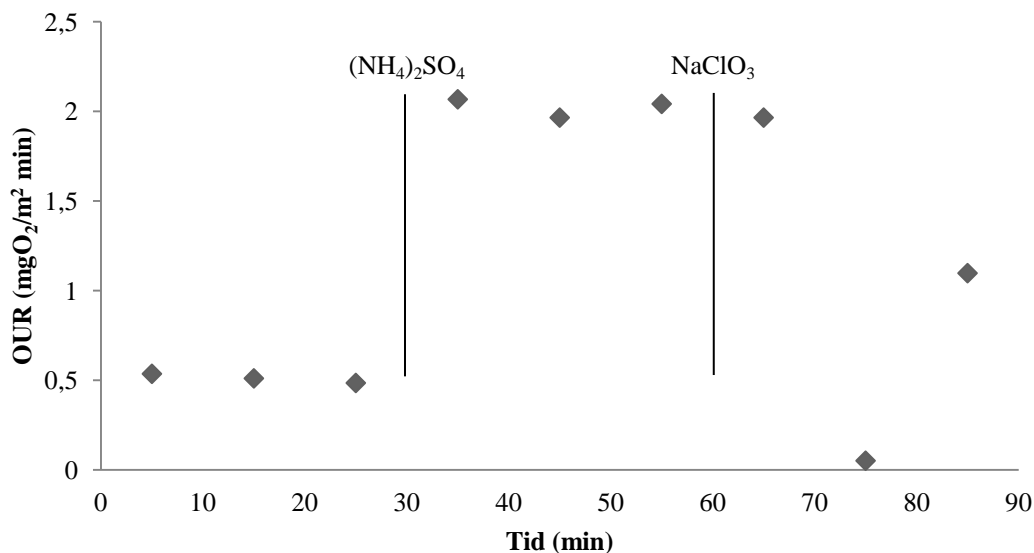
Syrehaltens förändring i OUR-reaktorn med tiden illustreras i Figur 18. I figuren ses hur luftningens alterneringar resulterar i syresättning respektive syreförluster i reaktorn. OUR motsvarar alla negativa lutningar i figuren, dvs. i vilken hastighet syrehalten sjunker när syretillförseln är avstängd. De första lutningarna innan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tillsattes motsvarar den endogena respirationen. När  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tillsätts oxiderar AOB ammoniumet till nitrit vilket förbrukar syre och respirationshastigheten höjs därmed. I takt med att AOB bildar nitrit kommer NOB, om de finns i biomassan, kunna oxidera nitriten till nitrat. Även NOB förbrukar syre varför en inhibitor för dessa tillsätts. Hur OUR förändras med tiden illustreras i

Figur 19.

Utifrån resultatet i detta försök uppstod tveksamheter i hur inhibitorn verkar. I försök utförda utanför denna studie har det tidigare konstaterats att det knappt finns några NOB närvarande i biomassan från den aktuella pilotanläggningen. När  $\text{NaClO}_3$  tillsätts i försöket sjunker OUR med ca 45 %, denna förändring är för stor för att förklaras av enbart NOBs respiration. För att utreda detta ytterligare önskades en något längre försökstid efter tillsats av inhibitor för att kontrollera hur OUR ställer in sig.



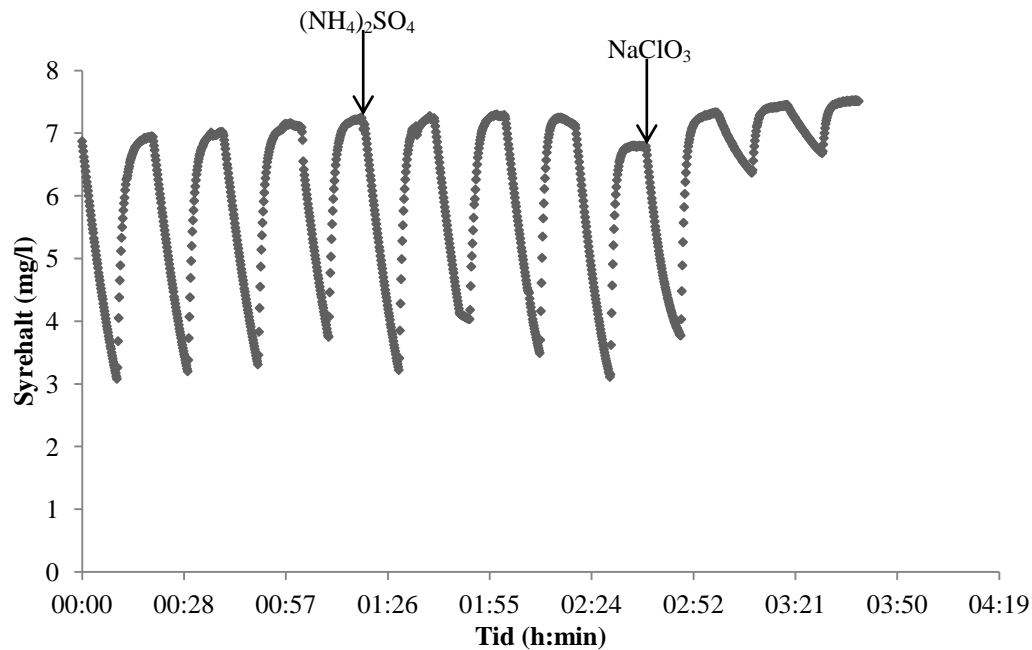
**Figur 18.** Syrehaltens förändring med tiden. Kemikalietillsatser illustreras med pilar.



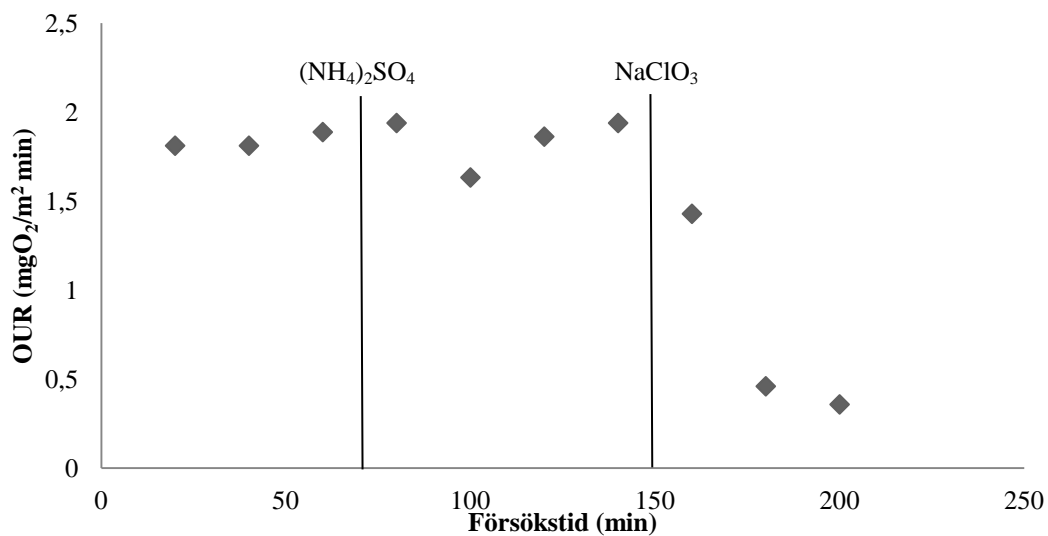
**Figur 19.** Syrererpirationshastighetens (OUR) förändring med tiden. Kemikalietillsatser illustreras med streck.

### **Experiment 7 - Alterneringstidens inverkan på resultatet**

I Figur 20 kan syrehaltens variation under försöket ses. Alterneringstiden var 10 minuter i försöket, om topparna i figuren studeras ses att de sista minutrarna av luftning inte genererar en förhöjd syrehalt. Den oförändrade syrehalten visar på att vattnet är syremättat. Eftersom luften var avstängd så länge hann mycket syre förbrukas i reaktorn redan i starten av försöket. När ammonium tillsattes påverkades syrererpirationen i reaktorn inte nämnvärt, se förändringen i OUR vid tillsats av ammonium i Figur 21. Trots att syrererpirationen inte påverkas av att ammonium tillsätts så reagerar den på tillsats av NaClO<sub>3</sub>, då syreförbrukningshastigheten tydligt sjunker. Tillsatsen av natriumklorat har en betydelsefull effekt på syrererpirationen, något som inte stämmer överens med att den bara ska inhibera NOB (Surmacz-Gorska m.fl., 1995; Tallec m.fl., 2008).

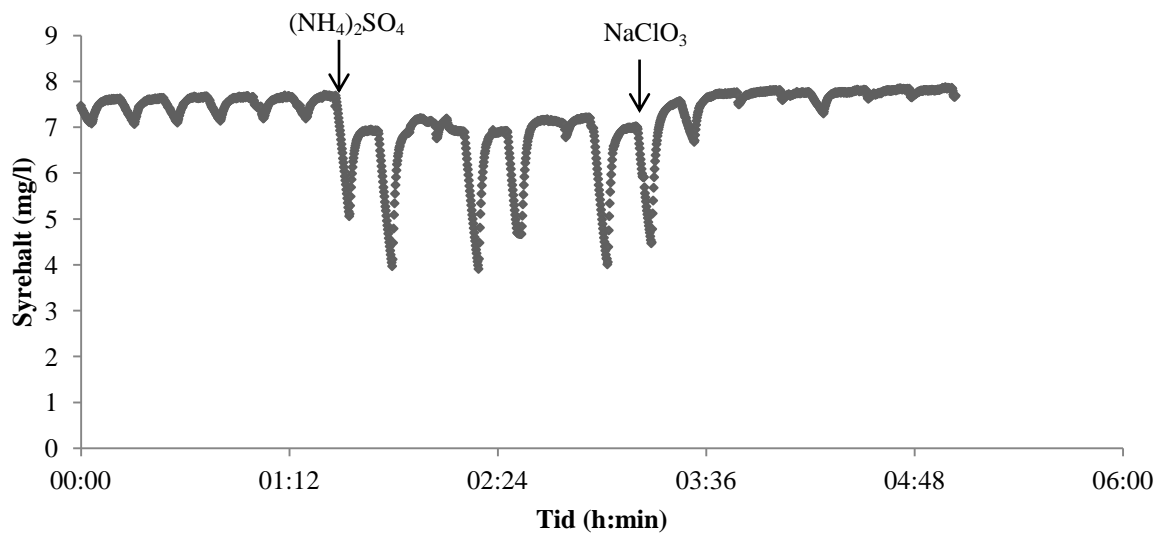


**Figur 20.** Syrehaltens variation under försökstiden i experiment 7.1. Kemikalietillsatser illustreras med pilar.

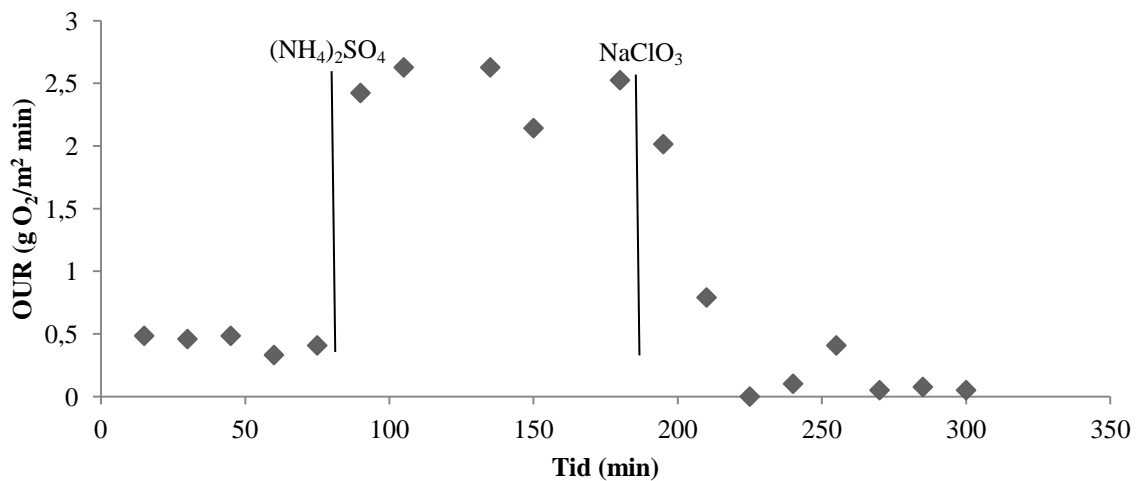


**Figur 21.** OUR för försök 7.1. Kemikalietillsatser illustreras med streck.

I Figur 22 och Figur 23 visas resultaten försök 7.2 där timern tillät luftning i 10 minuter och utan luftning i fem minuter. I detta försök syns den endogena respirationen tydligare än i försök 7.1 och vid tillsats av ammonium reagerar respirationen och hastigheten för syrerrespirationen ökar. Det finns två avvikelser i mätserien mellan tillsatsen av  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  och tillsatsen av  $\text{NaClO}_3$  där syrehalten knappt sjunker trots att luftningen är avstängd. Under försöket stannade omrörningen vid två tillfällen, tidpunkten för dessa är dock oklar. När omrörningen stannar samlas bärmaterialet på botten av reaktorn och bakterierna kommer inte i kontakt med substratet på samma vis som vid omrörning. Utifrån detta görs antagandet att de två avvikande partierna i mätserien beror på avstannad omrörning.



**Figur 22.** Syrehaltens variation under försökstiden i experiment 7.2. Kemikalietillsatser illustreras med pilar.



**Figur 23.** OUR för försök 7.2. Kemikalietillsatser illustreras med streck.

Efter att ha jämfört resultaten i experiment 7 med det från experiment 6 drogs slutsatsen att ett luftningsintervall på fem minuter (som i experiment 6) är tillräckligt för experimentet. Slutsatsen drogs främst utifrån resultaten i försök 7.2 där det tydligt ses i Figur 22 att syrehalten står konstant under de sista minutrarna med luftning. Att syrehalten är konstant ett tag innan lufttillförseln stryps är inget negativt men det tjänar heller inte något syfte. Eftersom metoder som är så snabba som möjligt efterfrågas är ett luftningsintervall på 5 minuter det bästa alternativet, detta baseras främst på resultaten i försök 7.2 och experiment 6 då försök 7.1 gav svårtolkade resultat.

#### **Experiment 8 – Försök med extra tillsats av ammonium**

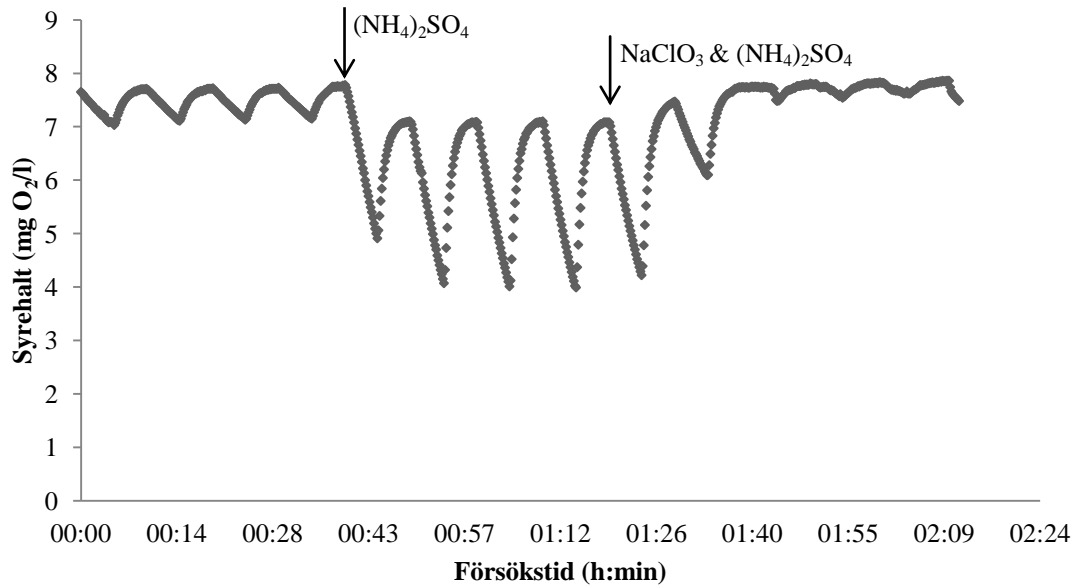
Syrehaltens förändring med tiden i reaktorn presenteras i Figur 24 och OUR för experimentet visas i

Figur 25. Dessa resultat jämförs med resultaten i experiment 6, vilket utfördes med precis samma metod fast utan tillsats av ammonium tillsammans med inhibitorn för

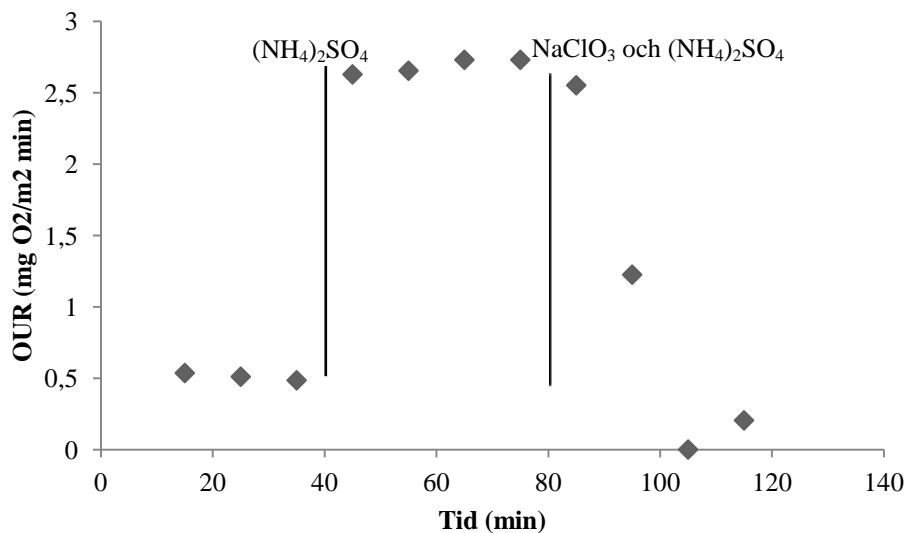
NOB. I experiment 6 pågick försöket något för kort tid efter tillsatsen av inhibitor och endast ett representativt värde för OUR efter tillsatsen finns att tillgå. I experiment 6 (

Figur 19) minskar OUR från 2,04 (vid 55 min) till 1,1 (vid 85 min) efter tillsats av inhibitor vilket medför en minskning med ca 45 %. När inhibitor och ammonium tillsats i experiment 8 (

Figur 25) minskar OUR från 2,73 (65 min) till 0,20 (105 min) vilket innebär en minskning i OUR med ca 90 %. Denna minskning innebär att tillsatsen genererade en syrerespitation som var lägre än den endogena respirationen i början av försöket. Resultatet bekräftar hypotesen om att natriumkloratet gör mer än att inhibera NOB.



**Figur 24.** Syrehaltens förändring under försökstiden i experiment 8. Kemikalietillsatser illustreras med pilar.



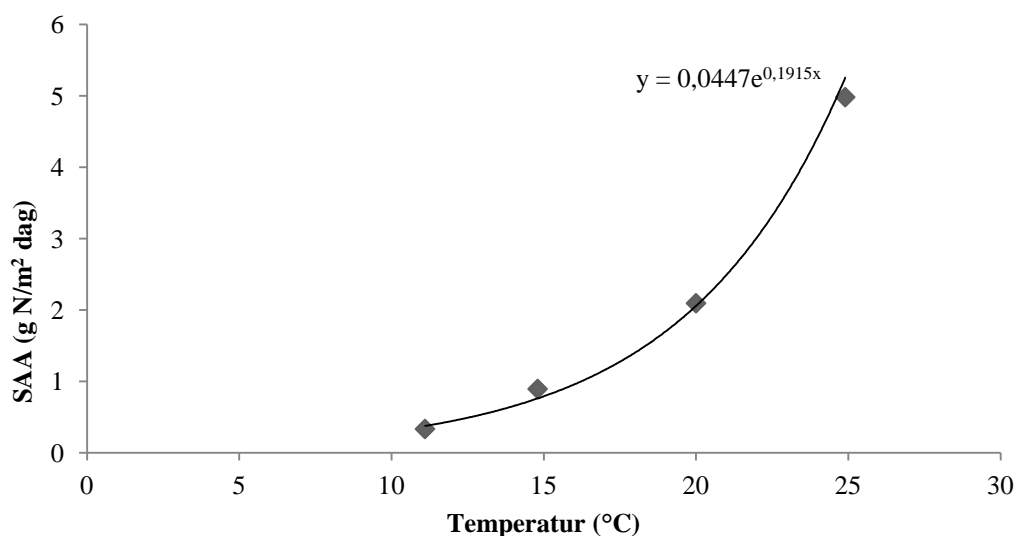
**Figur 25.** OUR för experiment 8. Kemikalietillsatser illustreras med streck.

## 6.2 ANAMMOXAKTIVITETENS TEMPERATURBEROENDE

Utifrån den framtagna metoden för bestämning av anammoxaktiviteten undersöktes temperaturberoendet för anammoxbakteriernas aktivitet. Resultatet blev ett exponentiellt samband (Figur 26), i Tabell 10 presenteras aktiviteten under de undersökta temperaturerna.

**Tabell 10.** Anammoxaktivitet vid undersökta temperaturer

Temperatur (°C)	SAA (g N/m <sup>2</sup> /dag)
11,1	0,33
14,8	0,89
20	2,09
24,9	4,98



**Figur 26.** Anammoxaktivitetens temperaturberoende.

Som ses i figuren är sambandet mellan temperatur och anammoxaktivitet exponentiellt och kurvan kan anpassas till ekvation 21. Mellan den lägsta och den högsta undersökta temperaturen ökar aktiviteten med 93 %.

$$y = 0,0477 \cdot e^{0,1915 \cdot x} \quad (21)$$

Utifrån ekvation 21 kan den isolerade aktivitetsförändringen som följer från ett byte av inkommande vatten i pilotanläggningen på Sjölunda avloppsvattenreningsverk beräknas. En temperatursänkning i pilotanläggningen från 25°C till 10°C skulle vid försökstillfället medföra en aktivitets-sänkning med 94,3 %. Det bör uppmärksammas att en aktivitet, om än låg, kvarstår vid 11,1°C.

## **7. DISKUSSION**

### **7.1 VAL AV METODER**

Valet av tryckmätning som metod för att mäta aktiviteten hos anammoxbakterier grundade sig främst i att utrustningen var relativt billig samt att arbetsbelastningen i metoden är låg. När mätningen av trycket är startad krävs ingen arbetsinsats tills dess att den avslutas. Metoden har tidigare använts för att bestämma aktiviteten för denitrifierande bakterier och även en del studier med metoden för anammox har genomförts tidigare, dock inte i så stora analysvolymmer som i denna studie.

OUR som metod för bestämning av aktiviteten för AOB valdes för att även denna kräver en låg arbetsinsats under analysstiden. Metoden öppnar även för parallell analys av andra syrerespicerande mikroorganismer så som NOB. OUR har tidigare använts för att analysera aktiviteten för AOB och NOB. I projektets litteraturstudie hittades inga studier där aktiviteten för AOB på bärarmaterial analyseras med OUR under alternerande luftning.

### **7.2 SVÅRIGHETER VID ANALYS AV BIOLOGISKA PROVER**

En av svårigheterna med att utveckla metoder för mikrobiologiska processer är att den mikrobiologiska sammansättningen i bärarmaterialet ständigt förändras. Prover som tas vid olika tidpunkter kan inte jämföras med varandra eftersom tillväxtförhållandena ständigt förändras i reaktorerna. Som följd av detta finns en begränsning i hur många analyser som kan genomföras i metodutvecklingens olika delsteg då proverna ska tas vid samma tillfälle och det används relativt många bärare per försök.

### **7.3 TRYCKMÄTNING SOM METOD FÖR ATT BESTÄMMA ANAMMOXAKTIVITET**

Den metod som utvecklats i projektet är funktionsduglig och genererar aktiviteten i reaktorn. I den andra delen av experimentet 2 när tryckmätningssmetoden jämfördes med en referensmetod gav ett resultat som visar att metoderna genererar resultat i samma storleksordning (differensen är mindre än 10 %). Tryckmätningssmetoden gav en något lägre aktivitet än vad referensmetoden gjorde. Den första delen av experiment 2 tjänar inget syfte i att utvärdera hur noggrann metoden med tryckmätning är för att bestämma aktiviteten för anammox. Detta då aktiviteten bestäms ur den maximala lutningen på tryckkurvan och inte tryckförändringen under hela försöket. Det försöksserien däremot visar på är att det pågår andra biologiska processer i reaktorn som förbrukar nitrit och ammonium.

Det finns några osäkerheter i metoden som kan påverka säkerheten i resultaten. Det var under samtliga försök svårt att upprätthålla en jämn omrörning i reaktorn då dess botten var något buktad. Magneterna för omrörning åkte lätt till sidan vilket stoppade omrörningen. Det krävdes en del justeringar för att få en kontinuerlig omrörning vilket resulterade i att omrörningen inte hade samma hastighet under samtliga experiment. Det kan i framtiden vara intressant att studera hur omrörningen påverkar aktiviteten. Omrörningen påverkar resultatet genom att begränsa hur mycket vätskefilmdiffusion som uppstår. En hög hastighet minskar vätskefilmdiffusionen och ökar därmed aktiviteten eftersom koncentrationen av substrat som kan penetrera biofilmen blir högre.

Om metoden för tryckmätning används kan det vara av värde att med jämna mellanrum plotta hela tryckmätningsskurvan för att kontrollera att lag-fasen i början av mätningen inte förlängs. Om lag-fasen förlängs finns en risk för att SAA bestäms i ett intervall där

tryckökningen är påverkad av diffusion och därmed inte är konstant. Samtliga tryckmättningsförsök i detta examensarbete har utförts under ca sex veckor och under denna tid har ingen skillnad i lag-fas observerats. Det som skulle kunna påverka lag-fasen är en tjockare biofilm.

Den föreslagna metoden för aktivitetstest av anammox bör kompletteras med en analys av aktiviteten av denitrifierare i biofilmen. Om det finns denitrifierare aktiva i biofilmen kan dessa använda den tillsatta nitriten för att bilda kvävgas, något som den utvecklade metoden inte tar hänsyn till. Ett förslag är att även mäta aktiviteten för denitrifierarna med tryckmätning. Detta kan göras med nitrat som substrat men kräver även tillsats av kolkälla, acetat är vanligt för detta.

### **7.3.1 Diffusionsbegränsningar och startkoncentrationer**

I den litteraturstudie som genomförts i projektet hittades inga tidigare studier där diffusionsbegränsningar i biofilmer tagits i beaktande vid aktivitetstester för anammox på bärrmaterial. Efter ett antal variationer av startkoncentrationen av nitrit- och ammoniumkväve i experiment 4 gavs starka indikationer på att diffusionsbegränsningar syns på den resulterande aktiviteten. Experiment 5 utfördes för att visa ett klart samband för startkoncentrationens inverkan på den specifika anammoxaktiviteten. Resultatet (Figur 17) blev lyckat och övergången mellan halvordningens reaktion och nollte ordningens reaktion syntes tydligt. Utifrån resultaten i experiment 4 och experiment 5 konstateras att det finns diffusionsbegränsningar vid lägre startkoncentrationer av nitrit- och ammoniumkväve. Försöken indikerar även en inhibering vid höga startkoncentrationer. I litteraturstudien observerades ett antal tidigare utförda försök där högre halter nitrit har inhiberat anammoxbakterier. Då detta examensarbete syftar till att utarbeta en metod för aktivitetstest och inte att undersöka vad som inhiberar anammoxbakterier har inga ytterligare undersökningar för nitritinhibering utförts.

Som startkoncentration för nitritkväve och ammoniumkväve valdes 125 mg N/l. Denna koncentration ligger i övre delen av intervallet för nollte ordningens reaktion. Om den analysmetod som presenteras i detta arbete används i framtiden bör startkoncentrationens inverkan på den specifika anammoxaktiviteten undersökas på samma vis som i experiment 5 med jämna tidsintervall. Om biofilmen växer till och blir tjockare kommer kurvan (Figur 17) att förskjutas uppåt i y-led. Detta innebär att brytpunkten mellan halvordningens reaktion till nollte ordningens reaktion kommer förskjutas mot en högre startkoncentration. Det finns alltså en risk att vid en tjockare biofilm kan 125 mg N/l som startkoncentration hamna i intervallet för halvordningens reaktion. Dock bör det poängteras att de biofilmer som användes i experiment 5 var relativt tjocka.

## **7.4 OUR SOM METOD FÖR ATT BESTÄMMA AOB-AKTIVITET**

Den metod som arbetats fram för bestämning av aktiviteten för AOB genom att analysera syrerrespirationen fungerar inte optimalt. Försöksuppställningen och altemneringen av luftningen ger en bra grundstomme i metoden, dock medför inhibitorn för NOB ett frågetecken. Det krävs en djupare analys av hur inhibitorn fungerar, förslagsvis kan den testas på aktivslam där erfarenheten av OUR-tester är större. Eftersom inhibitorn inte beter sig som väntat blir resultaten i metoden osäkra.

Ett alternativ till metoden kan vara att istället för att tillsätta inhibitor för NOB tillsätta inhibitor för AOB några altemneringar efter tillsatsen av ammonium. En välanvänd



inhibitor för AOB är kemikalien allylthiourea (ATU). Genom att studera skillnaden i OUR innan och efter tillsats av ATU kan aktiviteten för AOB bestämmas.

## **7.5 BEHOV AV KOMPLEMENTERANDE METODER FÖR ATT MÄTA AKTIVITET FÖR ANDRA BAKTERIEGRUPPER**

Även om det bara är AOB och anammox som är aktiva i deammonifikationsprocessen kommer det alltid finnas andra mikroorganismer i biofilmen. Vad för bakterier som finns i biofilmen kan inte på ett enkelt sätt analyseras vilket medför att det även finns osäkerheter i vad som händer i biofilmen. Det finns en risk att dessa oidentifierade mikroorganismer påverkar resultaten i de aktivitetsmätningar som presenteras i denna rapport. Det kan därför vara av nytta att samtidigt som aktiviteten för AOB och anammox studeras även studera aktiviteten för andra tänkbara mikroorganismer som livnär sig på samma substrat som anammox och AOB. Exempelvis bör aktivitetstesterna kompletteras med aktivitetstester för NOB och denitrifierande mikroorganismer. Förutom att visa på om dessa finns kan aktiviteten hos dessa ge värdefull information om förhållandena i processen. Om dessa oönskade mikroorganismer plötsligt ökar i aktivitet kan det användas som indikator för att förändringar i förhållandena i reaktorn bör göras.

Denitrifierande organismer kan undersökas med NUR eller genom tryckmätning. Då metoden för tryckmätning har visat sig enkel för anammoxbakterier bör denna undersökas även för denitrifierande bakterier. Metoden för detta skulle kunna vara densamma som för anammox med enda skillnaden att nitrat och kolkälla tillsätts istället för nitrit och ammonium. Aktiviteten för denitrifierare skulle också kunna analyseras med NUR. Dock kräver denna metod mer arbete än metoden med tryckmätning då provtagning ska göras i reaktorn med ett visst tidsintervall. Efter avslutad provtagning ska sedan proverna analyseras med HACH-LANGE kyvetter vilket kan bli kostsamt i längden.

Om problematiken med inhibitorer i OUR-metoden utreds kan NOB analyseras samtidigt som AOB. Istället för att bara tillsätta ammonium kan dessutom nitrit tillsättas. Sedan kan inhibitor för en bakteriegrupp i taget tillsättas med ett jämt tidsintervall (ATU för AOB och  $\text{NaClO}_3$  för NOB). NOB skulle även kunna analyseras genom att ha bärare i en luftad reaktor, tillsätta nitrit och buffertlösning och sedan ta prover exempelvis var 15:e minut. Proverna kan sedan analyseras för nitrithalt med HACH-LANGE kyvetter, denna metod används i pilotstudien idag men den är både tidskrävande och dessutom resurskrävande med avseende på kyvett-testerna.

## **7.6 ANAMMOXAKTIVITETENS TEMPERATURBEROENDE**

Det samband som tagits fram för anammoxaktivitetens temperaturberoende baseras endast på en försöksserie med bärarmaterial provtagna vid ett tillfälle. Metoden är dock välutvecklad så resultatet anses ge en bra ögonblicksbild på hur den på försöksdagen aktuella anammoxkulturen reagerar på temperaturförändringar. Försöksserien ger en bra bild över den isolerade aktivitetsminskningen som resulteras av en temperaturförändring i den aktuella pilotanläggningen. I försöken observerades, om än låg, aktivitet vid en så låg temperatur som 11°C. Trots att aktiviteten sänks med 94,3 % vid temperatursänkning från 25°C till 10°C kvarstår en aktivitet vilket bådär gott för framtida temperatursänkningar i pilotanläggningen på Sjölunda avloppsreningsverk.



## 8. SLUTSATSER

- Den framarbetade metoden för bestämning av anammoxaktiviteten med tryckmätning fungerar väl. Metoden är tillförlitlig samtidigt som den är enkel att använda, går snabbt och förbrukar inte mycket material.
- Anammoxaktiviteten är beroende av startkoncentrationen nitrit vid koncentrationer under 75 mg N/l. I intervallet 75-150 mg N/l är aktiviteten oberoende av nitritkoncentrationen och vid koncentrationer över 150 mg N/l uppstår nitritinhibering.
- Den metod som tagits fram för aktivitetstest av AOB med OUR fungerar väl för att analysera syrerespiration men NaClO<sub>3</sub> som inhibitor för NOB fungerade ej i denna studie. Resultaten i studien indikerar att NaClO<sub>3</sub> även inhiberar AOB.
- Anammoxaktivitetens temperaturberoende är exponentiellt och en temperatursänkning från 25°C till 10°C medför en aktivitetstförlust på 94,3 % i bärarna från pilotanläggningen på Sjölanda avloppsreningsverk.

### 8.1 FÖRSLAG FÖR VIDARE ARBETE

En av de mest tidskrävande delarna i de båda utvecklade metoderna är räkning av bärare till försöken. I detta examensarbete utfördes ett antal försök där bärarna tillfördes diverse bägare och provrör för att bestämma antalet men samtliga metoder var för osäkra, detta bör undersökas ytterligare.

Indikationer om att omrörningen påverkar aktiviteten har uppkommit under examensarbetet. Det kan vara värt att kvantifiera inverkan av omrörningen på resultaten och vid vilken omrörning som de båda metoderna bör genomföras.

För att få en fullständig metod för bestämning av aktiviteten för AOB bör inhibitor för NOB undersökas ytterligare. Alternativt bör metoden förändras så att inhibitor för AOB tillsätts istället för att inhibera NOB.

## 9. KÄLLOR

- Ahn, Y.H., Hwang, I.S., Min, K.S. (2004). ANAMMOX and partial denitrification in anaerobic nitrogen removal from piggery waste. *Water Science and Technology*, 49 (5-6), s 145 – 153.
- Aulenta, F., Bassani, C., Ligthart, J., Majone, M. & Tilche, A. (2002). Calorimetry: a tool for assessing microbial activity under aerobic and anoxic conditions. *Water Research*, 36 (5) s 1297–1305.
- Broda, E. (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature *Z. Allg. Mikrobiol.*, 17 s 491–493.
- Buys, B.R., Mosquera-Coral, A., Sánchez, M., Méndez, R. (2000). Development and application of a denitrification test based on gas production. *Water Science and Technology*, 41 (12), s 113-120.
- Cho, S., Fujii, N., Lee, T., Okabe, S. (2011). Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor. *Bioresource Technology*, 102 (2), s 652-659.
- Dapena-Mora, A., Fernández, I., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., Jetten, M.S.M. (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 s 859-865.
- Dosta, J., Fernández, I., Vázquez-Padín, J.R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Mata-Álvarez, J., Méndez, R. (2008). Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *Journal of Hazardous Materials*, 154 s 688–693.
- Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P., Siegrist, H., van der Meer, J., Zehnder, A.J.B. (2001). Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology*, 175(3) s 198-207.
- Fux, C., Siegrist, H. (2004). Nitrogen removal from sludge digester liquids by nitrification/denitrification or partial nitrification/ anammox: environmental and economical considerations. *Water Science and Technology*, 50 (10), s 19-26.
- Gustavsson, D., Persson, F., Aspgren, H., Stålhandske, L., la Cour Jensen, J. (2012). Anammox i huvudströmmen – Vad är problemet?. *VATTEN – Journal of Water Management*, 68 s 195-208.
- Hagman, M., la Cour Jansen, J. (2007). Oxygen uptake rate measurements for application at wastewater treatment plants. *Vatten*, 63 s 131-138.
- Hanaki, K., Wantawin, C., Ohgaki, S. (1990) Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Water Research*, 24(3) p 297–302.
- Hanner, N., Aspegren, H., Nyberg, U., Andersson, B. (2003). Upgrading the Sjölanda WWTP according to a novel process concept. *Water Science and Technology*, 47 (12) s 1-7.
- Hendrickx, T.L.G., Wang, Y., Kampman, C., Zeeman, G., Temmink, H., Buisman, C.J.N. (2012). Autotrophic nitrogen removal from low strength waste water at low temperature. *Water Research*, 46 (7) s 2187–2193.

- Henze, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J., Arvin, E. (1997). *Water treatment – Biological and Chemical Processes*. 2a uppl. Springer-Verlag, Berlin.
- Holm Kristensen, G., Elberg Jörgensen, P., Henze, M. (1992). Characterization of functional microorganism groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR. *Water Science and Technology*, 25 (6) s 43-57.
- Hunik, J.H., Tramper, J., Wijffels, R.H. (1994). A strategy to scale up nitrification processes with immobilized cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Engineering*, 11 (2) s 73–82.
- Isaka, K., Date, Y., Kimura, Y., Sumino, T., Tsuneda, S. (2008). Nitrogen removal performance using anaerobic ammonium oxidation at low temperatures. *FEMS Microbiology Letters*, 282 (1) s 32–38.
- Jetten, M.S.M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., van Dongen, U.G.J.M., van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen J.G. (1999). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Rev*, 22 s 421–437.
- Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., den Camp, H.J.M.O., Harhangi, H.R., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K-J., Stunnenberg, H.G., Keltjens, J.T., Jetten, M.S.M., Strous, M. (2011). Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, 479 s 127-130.
- 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 s 543-546.
- la Cour Jansen, J. & Harremoës, P. (1984). Removal of soluble substrates in fixed films. *Water Science and Technology*, 17 s 1-14.
- Lotti, T., van de Star, W.R.L., Kleerebezem, R., Lubello, C., van Loosdrecht, M.C.M. (2012). The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Research*, 46 s 2559-2569.
- Mulder, A., van de Graaf, A. A., Robertson, L. A. & Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16 s 177-184.
- Naturvårdsverket (2012) *Styrmedel för ökad rening vid kommunala reningsverk - Genomförande av aktionsplanen för Östersjön och av miljö kvalitetsnormer för kväve och fosfor*. Rapport 6521. ISBN 978-91-620-6521-8.
- Plaza, E., Stridh, S., Örnmark, J., Kanders, L., Trela, J. (2011). Swedish Experience of the Deammonification Process in a Biofilm System. *Nutrient Recovery and Management*, s 1067-1079.
- Poth, M., Focht, D.D. (1985). N kinetic analysis of N<sub>2</sub>O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Applied & Environmental Microbiology*, 49 s 1134 -1141.
- Ritchie, G.A.F., Nicholas, D.J.D. (1972). Identification of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. *Biochemical Journal*, 126 s 1181 -1191.

- Scaglione, D., Buttiglieri, G., Ficara, E., Caffaz, S., Lubello, C., Malpei, F. (2009). Microcalorimetric and manometric tests to assess anammox activity. *Water Science & Technology* 60 (10) s 2705-2711.
- Sliekers, A.O., Derwort, N., Campos, J.L., Strous, M., Kuenen, J.M., Jetten, M.S.M. (2002). Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Research*, 36 s 2475–82.
- Skiba, U. (2008). Denitrification. *Elsevier B.V.*, s 866-867.
- Straus, M., van Gerven, E., Kuenen, J.G., & Jetten, M. (1997). Effects of Aerobic and Microaerobic Conditions on Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Sludge. *Applied and environmental microbiology*, s 2446-2448.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. & Jetten, M. S. M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiological Biotechnology*, 50 s 589-596.
- Strous, M., Kuenen, J. G., Jetten, M.S.M. (1999a). Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Applied And Environmental Microbiology*, s 3248-3250.
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G. & Jetten, M.S.M. (1999b). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400 s 446–449.
- Surmacz-Gorska, J., Gernaey, K., Demuynck, C., Vanrolleghem, P., Verstraete, W. (1995). Nitrification Process Control in Activated Sludge Using Oxygen Uptake Rate Measurements. *Environmental Technology*, 16 (6) s 569-577.
- Svenskt Vatten (2010). Avloppsteknik 2 Reningsprocessen. *Svenskt Vatten Publikation U2*.
- Tallec, G., Garnier, J., Billen, G., Gossais, M. (2008) Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation. *Bioresource Technology* 99 (7) s 2200-2209.
- Tsushima, I., Ogasawara, Y., Kindaichi, T., Satoh, H., Okabe, S. (2007). Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactors. *Water research*, 41 s 1623–1634.
- Van de Graaf, A.A., Mulder, A., Slijkhuis, H., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1990). Anoxic Ammonium Oxidation. *5th European Congress on Biotechnology, Copenhagen, July 8-13, 1990, proceedings. Vol.1*, s 388-391.
- Van de Graaf, AA., De Bruijn, P., Robertson, LA., Jetten, M.S.M., & Kuenen J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142 s 2187-21 96.
- Van der Star. (2008). *Growth and Metabolism of Anammox Bacteria*. Sieca Repro, Delft NL.
- Van Dongen, U., Jetten, M.S.M., van Loosdrecht, M.C.M. (2001). The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology*, 44 (1) s 153-160.
- Vázquez-Padín, J.R., Fernández, I., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R. (2009). *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*. IWA Publishing, London.

Vázquez-Pádín, J.R., Fernández, I., Morales, N., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R. (2011). Autotrophic nitrogen removal at low temperature. *Water Science and Technology*, 63 (6) s 1282–1288.

Ward, B.B. (2008). Nitrification. *Elsevier B.V*, s 2511-2513.

Wett, B. (2007). Development and implementation of a robust deammonification process. *Water Science and Technology*, 56 (7) s 81-88.

Zumft W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (4) s 533-616.

Ødegaard, H. (1999). The Moving Bed Biofilm Reactor. *Water Environmental Engineering and Reuse of Water*, Hokkaido Press, s 250-305.

Ødegaard, H., Gisvold, G. & Strickland, J. (2000). The influence of carrier size and shape in the moving bed biofilm process. *Water Science and Technology*, 41 (4-5) s 383-391.

## **9.1 ICKE PUBLICERADE KÄLLOR**

Gustavsson, D. (2011). Manammox - Deammonifikation i huvudströmmen – Pilotstudier på Sjölunda ARV.

## BILAGA A – METOD FÖR BESTÄMNING AV ANAMMOXAKTIVITET

- 1) Räkna 480 st bärare och skölj dem varsamt under ljummet vatten i durkslag.
- 2) Lägg bärarna i en 2 l reaktor som kan göras tät med septum och kork tillsammans med 1500 ml kranvatten.
- 3) Ställ reaktorn på magnetorrörare i ett vattenbad som håller temperaturen 28 °C och tillsätt en magnet i reaktorn. Ställ in magnetorröraren på 400 rpm.
- 4) Spola vätskefasen med kvävgas genom en gasfördelningssten under tiden för uppvärmning.
- 5) När reaktorn uppnått rätt temperatur, tillsätt 45 ml 1M fosfatbuffertlösning
- 6) Mät pH och temperatur och notera detta.
- 7) Medan gasfördelningsstenen fortfarande spolar vätskefasen med kvävgas, tillsätt 37,5 ml av NaNO<sub>2</sub>-lösningen (5 mg NO<sub>2</sub>-N/ml) och 37,5 ml av (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-lösningen (5 mg NH<sub>4</sub>-N/ml) vilket ger en koncentration av 125 mg N/l för både nitrit och ammonium.
- 8) Direkt efter substrattillsatsen, tag bort gasfördelningsstenen och förslut reaktorn med kork och septum.
- 9) Koppla direkt in tryckmätaren och starta loggning med mätintervallet 1 minut.
- 10) Låt tryckmätningen pågå i 50 minuter.
- 11) När mätningen är slutförd, ta av septum och kork, mät temperatur och pH.
- 12) Väg reaktorn.
- 13) Fyll upp reaktorn helt med kranvatten och väg igen.

pH start	
Temperatur start (°C)	
pH stopp	
Temperatur stopp (°C)	
Vikt efter tryckmätning (g)	
Vikt uppfyllld reaktor (g)	



## BILAGA B – METOD FÖR BESTÄMNING AV AOB-AKTIVITET

- 1) Räkna 480 st bärare och skölj dem varsamt under ljummet vatten.
- 2) Placera bärarna tillsammans med 1500 ml kranvatten i en 2-liters reaktor med lock och omrörarblad.
- 3) Placera reaktorn i vattenbad som håller temperaturen 28 °C och koppla omrörarbladet till motor. Starta omrörningen.
- 4) Koppla en gasfördelningssten till en akvariepump och starta pumpen. Stick ner gasfördelningsstenen i reaktorn genom ett av hålen i locket.
- 5) Starta syremätaren och sänk ner en av sensorerna genom ett av hålen i reaktorns lock.
- 6) Vänta till temperaturen har ställt in sig och syrehalten i reaktorn är mellan 7 och 8 mgO<sub>2</sub>/l. Notera startvärdena.
- 7) Koppla akvariepumpen till en timer som alternerar akvaiepumpen mellan att lufta och vara avstängd var femte minut.
- 8) Starta loggning av syrehalten direkt.
- 9) Låt akvariepumpen alternera i ca 40 minuter, så att den går från att lufta till att inte lufta tre gånger.
- 10) Fjärde gången timern slår om från att lufta till att inte lufta, tillsätt 45 ml fosfatbuffert och 45 ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> till reaktorn.
- 11) Låt akvariepumpen alternera i 40 minuter till.
- 12) När timern slår om från luftning till icke luftning efter 40 minuter tillsätt 25,5 ml av 1M NaClO<sub>3</sub>.
- 13) Låt akvariepumpen alternera i 50 minuter till och stoppa sedan loggningen av syrehalten.

pH start	
Temperatur start (°C)	
Tidpunkt start	
Tidpunkt tillsatts av ammonium	
Tidpunkt tillsats av inhibitor	
Tidpunkt stopp	
pH stopp	
Temperatur stopp (°C)	

## BILAGA C – REFERENSMETOD

- 1.) Räkna 480 bärare och skölj dem varsamt under ljummet vatten.
- 2.) Placera bärarna tillsammans med 1500 ml kranvatten i en reaktor med lock
- 3.) Placera reaktorn i vattenbad som håller temperaturen 28 °C.
- 4.) Kvävgas tillsätts i reaktorn genom gasfördelningssten för att skapa anaeroba förhållanden. Mät syrehalten, pH och temperatur i reaktorn under hela försöket
- 5.) Tillsätt 45 ml av fosfatsbuffertlösningen
- 6.) Tillsätt 45 ml av ammoniumlösningen vilket ger 150 mg/l NH<sub>4</sub>-N
- 7.) 15 ml av nitritlösningen vilket ger 50 mg/l NO<sub>2</sub>-N
- 8.) Provtag ca 10 ml enligt tidschemat nedan. Proverna ska filtreras genom Munktell-filter
- 9.) Proven analyseras med HACH-LANGE kyvett-tester för nitrit- och ammoniumkväve.

<b>TID min</b>	<b>pH</b>	<b>Temp. °C</b>	<b>Syrehalt O<sub>2</sub> mg/l</b>	<b>Konc. NH<sub>4</sub>-N mg/l</b>	<b>Konc. NO<sub>2</sub>-N mg/l</b>
1					
15					
30					
45					
60					
75					
90					
105					
120					

## BILAGA D – LÖSLIGHET AV KVÄVGAS I VATTEN VID ÖKAT TRYCK

Hur gaser löser sig i vatten beskrivs med Henry's lag och för kvävgas vid en viss temperatur, T, kan denna skrivas enligt

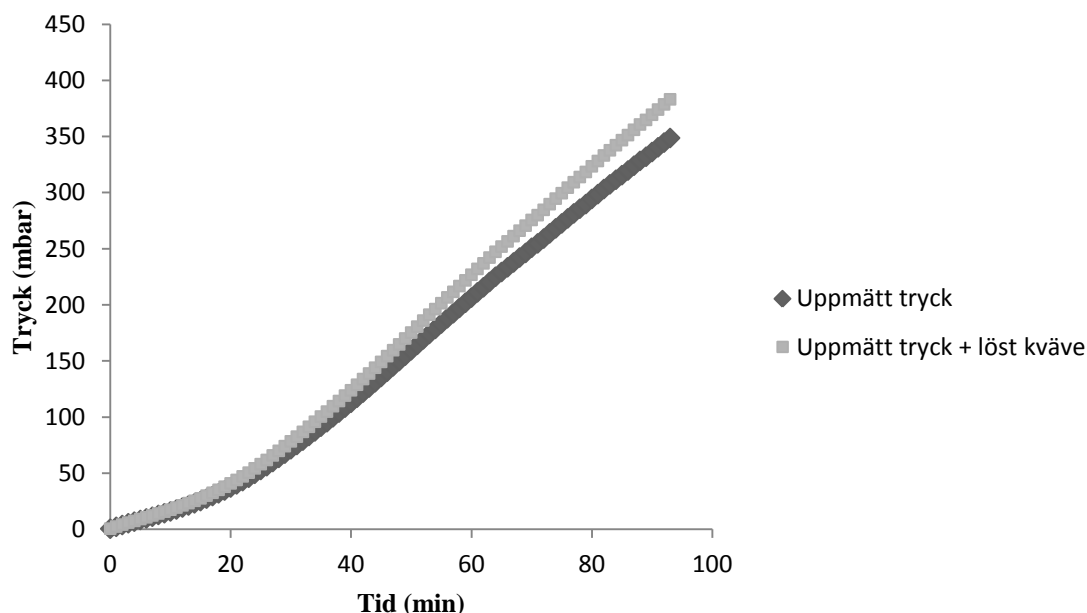
$$C_{T, N_2} = K_{H, cp} \times P = 6,1 \times 10^{-4} \cdot e^{1300 \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{298,15} \right)} \times P$$

Där C är mängden kvävgas som kan lösa sig [mol/l] och  $K_{H, cp}$  är Henrys konstant och P är aktuellt tryck.

För att beräkna hur mycket potentiellt tryck som löst sig i vätskefasen vid kombinerats Henrys lag med ideala gaslagen:

$$P_{\text{löst}} = C_{T, N_2} \times V_l \times R \times T / V_g$$

Vid varje tryckmätningpunkt kan ovanstående läggas till den uppmätta tryckkurvan. Ovanstående beräknades i varje mätningpunkt i försök 4.1 och resultatet redovisas tillsammans med tryckkurvan nedan.



Som ses i grafen påverkar inte den lösta gasen lag-fasens varaktighet.