



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ - ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»**

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ
ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΜΜΩΝΙΑΣ
(ΑΝΑΜΜΟΧ) ΣΕ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ.**

Ποθουλάκη Δέσποινα

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ &
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΥΔΑΤΙΚΩΝ
ΠΟΡΩΝ»**

Αθήνα, Φεβρουάριος 2011

Επιβλέπων: Δ. Μαμάης, Επίκουρος Καθηγητής

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μαμάη Δανιήλ, ο οποίος υπήρξε και ο επιβλέπων καθηγητής της παρούσας εργασίας. Χωρίς την εμπιστοσύνη, τη βοήθεια, τις επισημάνσεις και τις διορθώσεις του δεν θα ήταν δυνατή η συγγραφή της εργασίας αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Κουτσογιάννη Δημήτριο και τον Λέκτορα κ. Νουτσόπουλο Κώστα για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.

Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου από την Α' κατεύθυνση για τη συνεργασία, τη φιλία και τις πολύωρες (όχι μόνο επιστημονικού ενδιαφέροντος) συζητήσεις μας.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους και ιδιαίτερα τους γονείς μου που με στηρίζουν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου -και από ότι φαίνεται θα συνεχίσουν να το κάνουν.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	i
Περιεχόμενα	ii
Περίληψη.....	iv
Extended abstract	v
1. Εισαγωγή	1
1.1 Αντικείμενο της εργασίας	1
1.2 Διάρθρωση της εργασίας	2
2. Ιστορία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας.....	3
2.1 Ο αναθεωρημένος κύκλος του αζώτου	3
2.2 Πρόβλεψη, ανακάλυψη και επαλήθευση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας.....	5
3. Φυσιολογία και μεταβολισμός των ANAMMOX βακτηρίων	9
3.1 Φυσιολογία.....	9
3.2 Μεταβολισμός.....	13
4. Μέθοδοι ανίχνευσης των ANAMMOX βακτηρίων και εντοπισμός στο περιβάλλον.....	15
4.1 Ανίχνευση του ANAMMOX βακτηρίου και της δραστηριότητάς του.....	15
4.2 Αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας στο περιβάλλον.....	18
5. Παράγοντες που επηρεάζουν τη διεξαγωγή και την εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας.....	22
5.1 Εισαγωγή	22
5.2 Θερμοκρασία.....	23
5.3 pH.....	27
5.4 Διαλυμένο οξυγόνο και αλκαλικότητα.....	32
5.5 Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο.....	35

5.6 Σουλφοναμίδια.....	39
5.7 Ανόργανος άνθρακας.....	45
5.8 Αλατότητα	50
6. Εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων	55
6.1 Οι πλέον σημαντικές τεχνολογίες για τον μετασχηματισμό του αζώτου.....	55
6.1.1 Συμβατική μέθοδος νιτροποίησης-απονιτροποίησης.....	57
6.1.2 Αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας.....	57
6.1.2.1 Συστήματα δύο αντιδραστήρων.....	58
6.1.2.2 Συστήματα ενός αντιδραστήρα.....	59
6.1.3 SHARON (Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite)..	62
6.1.4 CANON (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite).....	62
6.1.5 OLAND (Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification).....	63
6.1.6 Ποιοτική και ποσοτική σύγκριση μεταξύ των τεχνολογιών απομάκρυνσης αζώτου.....	63
6.2 Εφαρμογές μεγάλης κλίμακας και πιλοτικές εφαρμογές της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας.....	65
6.2.1 Πρώτη μεγάλης κλίμακας εφαρμογή στο Rotterdam (Ολλανδία).....	65
6.2.2 Μεγάλης κλίμακας εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε SBR.....	70
6.2.3 Η πιλοτική μονάδα αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε δύο στάδια, στο Himmerfjärden της Στοκχόλμης.....	78
6.2.4 Πιλοτική εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε δύο στάδια, Ζυρίχη.....	80
6.2.5 Πιλοτικής κλίμακας εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας με εμβολιασμό κοκκώδους βιομάζας ANAMMOX.....	83
7. Συμπεράσματα και προτάσεις	86
Βιβλιογραφία	88

Περίληψη

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο τη βιβλιογραφική επισκόπηση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (Anaerobic Ammonium Oxidation, ANAMMOX), μιας πρωτοποριακής μεθόδου βιολογικής απομάκρυνσης του αζώτου. Η διεργασία αυτή, ανακαλύφθηκε και επιβεβαιώθηκε πειραματικά μόλις το 1995, από τους Mulder et al., και έκτοτε όπως ήταν αναμενόμενο, προκάλεσε το έντονο ενδιαφέρον των ερευνητών.

Παρατίθενται λοιπόν όλα τα ιστορικά στοιχεία για την ανακάλυψη και την πρόοδο της γνώσης γύρω από την αντίδραση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας. Παράλληλα, απαριθμούνται τα ενδιαιτήματα στα οποία έχει καταγραφεί η ύπαρξη των ANAMMOX βακτηρίων στο φυσικό περιβάλλον, όπως και η συνεισφορά της διεργασίας στην συνολική απομάκρυνση αζώτου στη φύση.

Επίσης, προκειμένου να αποκτηθεί η δυνατότητα καλύτερης εποπτείας της μεθόδου, ήταν απαραίτητη η παρουσίαση μιας σφαιρικής εικόνας της φυσιολογίας και τη δραστηριότητας των βακτηρίων, του μεταβολισμού, του ρυθμού ανάπτυξής τους καθώς και των συνθηκών που εξασφαλίζουν την επιβίωση και την ανάπτυξή τους.

Στη συνέχεια εξετάζονται οι παράγοντες και οι συνθήκες που επιδρούν στη δραστηριότητα των βακτηρίων και επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την απόδοση της διεργασίας, όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία, το pH, το διαλυμένο οξυγόνο κλπ.

Επιπροσθέτως καταγράφονται οι βασικότερες τεχνολογίες βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου, συμπεριλαμβανομένης και της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, συνοδευόμενες από μία ενδεικτική ποιοτική και ποσοτική σύγκριση.

Τέλος, αναλύονται οι πλέον σημαντικές πιλοτικές και μεγάλης κλίμακας εφαρμογές της μεθόδου, ενώ εξάγονται και κάποια συμπεράσματα σχετικά με τις αναγκαίες βελτιώσεις που θα πρέπει να γίνουν όσον αφορά στην εφαρμογή της μεθόδου, προκειμένου να εξασφαλιστεί η εγγυημένη απόδοση και κατ' επέκταση η απαραίτητη αξιοπιστία.

Extended abstract

Introduction

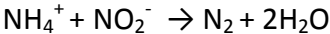
Operation and investment cost of wastewater treatment plant can be decreased by using innovative technologies based on new biological conversion methods. Due to negative environmental aspects of nitrogen discharge to recipients and increasingly stringent effluent standards, the effective nitrogen removal is necessary. Biological removal of high nitrogen concentrations from wastewater is very expensive when there is a lack of biodegradable organic carbon. Increasing requirements concerning nitrogen concentration in treated wastewater and increasing cost of the treatment exert a necessity of development a new method for biological nitrogen removal. Recently, Anammox process was developed and proposed as a new technology for treating streams containing high concentration of ammonia nitrogen. The aim of this postgraduate thesis is a detailed literature overview of Anaerobic Ammonium Oxidation, as a new and promising nitrogen elimination technique.

History of Anaerobic Ammonium Oxidation (ANAMMOX)

In nature inorganic nitrogen atoms can exist in different oxidation states from -3 (NH_4^+) to +5 (NO_3^-). Most of the nitrogen compounds representing these oxidation states can be converted to each other through microbial activity (Kartal, 2008). The turnover of nitrogen in biosphere is known as the nitrogen cycle. Nitrogen oxidation state is changed by different microorganisms, that carry out catabolic reactions (nitrification, denitrification, dissimilatory nitrate reduction and Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox), anabolic reactions (ammonium uptake, assimilatory nitrate reduction and nitrogen fixation), and ammonification (Dapena Mora, 2007).

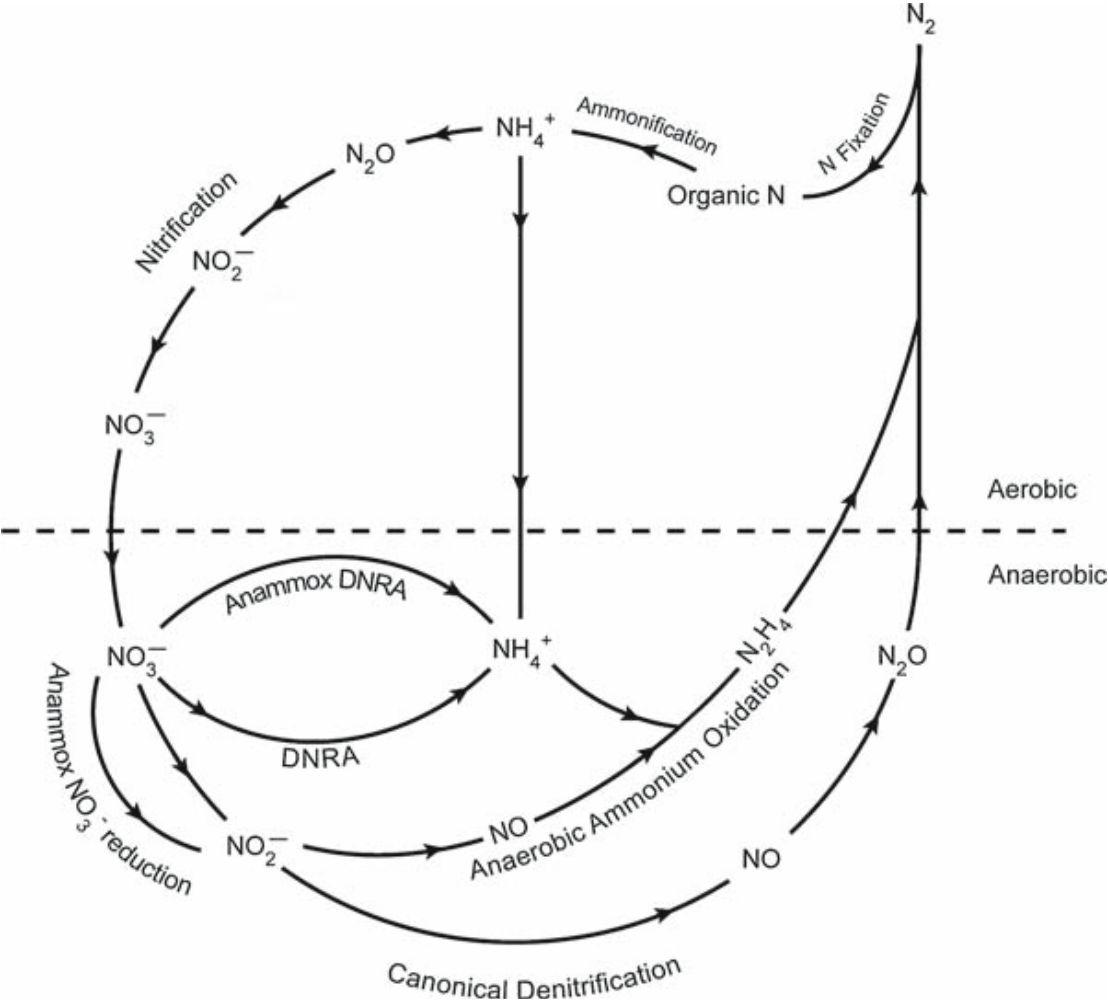
The anammox reaction is anaerobic oxidation of ammonium coupled with nitrite reduction under anoxic conditions. This alternative nitrogen removal pathway was first proposed by Richards (1965), following observations of ammonium deficits in anoxic marine basins. Throughout most of the 20th century, ammonium was believed to be inert under anoxic conditions. Canonical denitrification liberates ammonium from organic matter during respiration, resulting in net accumulation in the sediment/soil profile. The proposed 'anammox' pathway allows for the removal of ammonium under purely anoxic conditions. Early evidence for the presence of this reaction was provided by marine sediment porewater profiles where the simultaneous disappearance of nitrite and ammonium was observed (Codispoti and Richards 1976; Cline and Richards 1972). Broda (1977) soon proposed a new type of bacteria responsible for these observations, a "chemosynthetic bacteria that oxidizes ammonia to nitrogen with O_2 or nitrate as an oxidant", which was coined one of two "lithotrophs missing in nature". It was not until 1995 that the anammox process was confirmed in a fluidized bed

reactor treating wastewater effluent (Mulder et al. 1995). The anammox reaction is a chemolithotrophic process in which 1 mol of ammonium is oxidized by 1 mol of nitrite to produce N₂ gas in the absence of oxygen (Strous et al. 1999a, b):



Compared to denitrification, this process produces twice the amount of N₂ per mol of nitrite consumed and increases N₂ production in sediments where nitrification is limited. The bacteria responsible for this process were later identified as a deep-branching planctomycete with a peculiar morphology (Strous et al. 1999a, b).

In the beginning of the 20th century, most of reactions depicted in the N-cycle were already known for a long time, and the N-cycle was assumed to be complete. In this complete N-cycle, there was no reaction accounting for the possibility of the anaerobic oxidation of ammonium (Kartal, 2008). However, after the confirmation of the anammox reaction, the nitrogen cycle was reassessed.



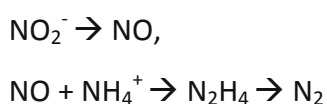
Anaerobic ammonium oxidation pathway of nitrogen removal in context of the current nitrogen cycle. C.R. Penton.

Anammox Physiology and Metabolism

All currently known bacteria capable of anaerobic ammonium oxidization belong to a deep-branching lineage of the order *Planctomycetales* with high genus level diversity (Freitag and Prosser 2003; Schmid et al. 2003). The evolutionary distance among the anammox genera is large (<85% 16S rRNA gene nucleotide identity), though they share the same basic anammox metabolism and cell structure. There are currently four *Candidatus* genera whose grouping is largely based on 16S rRNA sequences: the “freshwater” *Kuenenia* (*K. stuttgartiensis*; Schmid et al. 2000) and *Brocadia* (*B. anammoxidans* (5) and *B. fulgida* (22)), and the “marine” anammox *Scalindua* (*S. sorokinii*, *S. brodae*, and *S. wagneri*; Schmid et al. 2003). The fourth *Candidatus* genus has one member, *Anammoxoglobus propionicus* (Kartal et al. 2007b), which exhibits an alternative metabolism.

Anammox bacteria are characterized by a membrane-bound organelle called the anammoxosome that comprises more than 30% of the cell volume. This intracytoplasmic compartment is surrounded by unique lipids, called ladderanes (Sinninghe Damste et al. 2002) that are unique to the anammox bacteria. As a special organelle in the cell, anammoxosome was considered to have three functions: (1) providing a place for catabolism; (2) generating energy for ATP synthesis through proton motive force across the anammoxosome membrane; (3) protecting the bacteria from the proton diffusion and intermediate toxicity due to their impermeable membranes (Zhang *et al.*, 2007). Ladderane lipids, due to their unique characteristics, have also been used as a biomarker for the presence of anammox bacteria (Kuypers et al. 2003).

Evidence from the genome of *Candidatus K. stuttgartiensis* (Strous et al. 2006) indicates that the anammox reaction proceeds via the following steps:



The anammox hydroxylamine oxidoreductase (HAO) enzyme is responsible for the oxidation of hydrazine to N_2 gas and is located exclusively within the anammoxosome (Lindsay et al. 2001), a possible target for future molecular studies. The highly reactive hydrazine intermediate is stored inside the anammoxosome (Sinninghe Damste et al. 2002), which is especially important considering the slow enzymatic turnover, resulting in a doubling time of 9 days in optimal conditions for the “freshwater” anammox (Strous et al. 1999a, b). Anammox are reversibly inhibited by O_2 , and reaction rates are the same after as before aeration (Jetten et al. 1999).

Anammox bacteria have been found to be metabolically flexible, exhibiting alternative metabolic pathways. For instance, anammox can subsequently reduce nitrate to nitrite to ammonium, followed by the conversion of ammonium and nitrite to N_2 through the anammox pathway, allowing anammox bacteria to overcome ammonium limitation. Anammox bacteria are also a potential source of N_2O production by nitric oxide detoxification (Kartal et al.

2007a). Another alternative pathway is carried out by *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*, which has been shown to co-oxidize propionate and ammonium, and out-compete denitrifiers and other anammox bacteria in the process (Kartal et al. 2007b). This supports the niche differentiation of anammox in which different “ecotypes” dominate specific habitats, and may be the reason why two different anammox species are not commonly found in the same sample. Lastly, iron and manganese oxides have also been found to be respired with formate as an electron donor (Strous et al. 2006), further expanding the metabolic diversity of the anammox bacteria.

Detection of the Anammox Bacteria and Activity

The isotope pairing technique (IPT) has been used as the standard measure of anammox activity, most commonly using homogenized sediments (Thamdrup and Dalsgaard 2002). Molecular methods have been extensively utilized to identify the presence of anammox bacteria in environmental and wastewater samples. Fluorescence in situ hybridization (FISH) targeting the 16S rRNA gene has been used extensively, and is described in detail by Schmid et al. (2005). Anammox bacteria have also been identified using PCR, using a variety of primers, often based on FISH probes, targeting the group as a whole or specific members (Schmid et al. 2005; Penton and Tiedje 2006). The unique ladderane lipids that constitute the anammoxosome have also been used as biomarkers for relative quantification (Kuypers et al. 2003), while distinctive hopanoid lipids may be useful in assessing relative anammox abundance in the sedimentary record (Sinninghe Damste et al. 2004). Quantitative PCR (q-PCR) has been used for direct quantification of all known anammox-like bacteria in water columns (Hamersley et al. 2007), in wastewater enrichment cultures (Tsushima et al. 2007), and for the specific enumeration of *Candidatus Scalindua* “marine” anammox in sediments.

The linkage of anammox activity with the removal of fixed inorganic nitrogen in natural systems was first confirmed in the Black Sea suboxic water column (Kuypers et al. 2003). Since then, anammox has been shown to be a significant contributor to nitrogen losses in a variety of environments, responsible for 19–35% of the nitrogen loss in an anoxic coastal bay (Dalsgaard et al. 2003) and the majority of N removal in one of the most productive regions of the world’s oceans, the Benguela upwelling oxygen minimal zone (Kuypers et al. 2005). These sites exhibit characteristics of oxygen minimum zones, which are thought to be responsible for 30–50% of global N removal (Brandes and Devol 2002). Evidence for the anammox reaction in sediments or soils is generally first determined by the porewater N profile. Anoxic zones where there is a concomitant reduction in both nitrite/nitrate and ammonium represent the initial conditions necessary for anammox activity. The maximum reported contribution of anammox is 67–79%, occurring in sediments at a depth of 700 m (Engstrom et al. 2005), which led to the hypothesis that relative anammox contributions increase with depth. However, current evidence suggests that anammox accounts for between 13 and 51% of total N₂ production in deep ocean sediments (ca. 3,000 m).

Schubert et al. (2006) reported an anammox contribution of 13% in the largest freshwater anoxic lake in the world, Lake Tanganyika. Anammox 16S rRNA gene sequences with > 96% sequence identity to *Candidatus Scalindua brodae* were identified in the anoxic water column, and anammox cells were enumerated using FISH. Molecular analysis was used to assess the diversity of the anammox population in the Xinyi River (China) (Zhang et al. 2007). Sequences, obtained by targeted PCR, exhibited 16S nucleotide identities of 95% to *Candidatus Brocadia anammoxidans* and 95% to the *Candidatus Scalindua* species, including the sequence obtained from the Lake Tanganyika study. These findings suggest that more diverse anammox communities may exist in freshwater habitats, compared to the multitude of marine studies that indicate a single, dominant anammox ecotype.

Rysgaard and Glud (2004) found that anammox was responsible for up to 19% of total N₂ production in a Greenland Sea ice floe, but was not detectable in annual sea ice, perhaps due to increased stability. Both aerobic and anaerobic processes in microzones were found to occur simultaneously in brine pockets. This raises the possibility that anammox contributes to N₂ removal in permafrost soils.

Factors affecting the conduct and application of anaerobic oxidation of ammonium.

The application of the Anammox process has been usually focused on the treatment of wastewater with temperatures around 30 °C in order to operate under optimum conditions. Several authors (Strous et al. 1999, K. Egli et al. 2001, Y. Yang et al. 2006, S.K. Toh et al. 2002) found that the optimum temperature for the operation of the Anammox process was around 30–40° C. Perhaps for this reason, most of the works where this process was applied were carried out at temperature values higher than 30 °C (U. Van Dongen et al. 2001, M. Strous et al. 1997, M. Strous et al.1998, U. Imajo et al. 2004). However, recently, Cema et al. 2007 proved that a rotating biological contactor (RBC) with the established Anammox process could be successfully operated at temperatures around 20 °C. Similar results were reported by Isaka et al. 2007, who operated an anaerobic biological filtrated (ABF) reactor which treated 8.1g N (Ld)⁻¹. Moreover, J. Dosta et al. 2007 proved that nitrite (the limiting substrate) was totally depleted until the operating temperature decreased from 18 to 15°C. Last but not least, Yang et al.2010 obtained stable nitrogen removal rates (NRR) of 17.5 kg-N m⁻³ d⁻¹, at operating temperatures of 23 ± 2 °C, which seems to be the highest reported NRR at ambient temperatures.

Additionally, feed alkalinity along with dissolved oxygen (DO) concentrations are critical controlling parameters in a single-stage biological process for nitrogen removal. Therefore, the control of alkalinity and DO concentrations in feed to maintain an alkalinity to ammonia ratio of less than 8 and DO loading of less than 0.06 mg O/(mg N day), respectively, is considered to be necessary for inhibiting nitrification and enhancing partial nitrification and ANAMMOX (Bagchi et al. 2010).

The pH is another important control parameter during the operation of Anammox bioreactors. The effect of pH on Anammox process has been tested by Strous et al. 1997 by using batch experiments. Results showed that the specific Anammox activity at pH of 9 was only 1/5 of that at of pH 8. In a later study by Tang et al. 2009, effluent pH values ranged from 8.7 to 9.1, which resulted from applying NLR of more than $1,200 \text{ mg l}^{-1} \text{ day}^{-1}$; such values surpassed the optimum pH range for Anammox bacteria 6.7–8.3 which is obtained by Strous et al. 1997. Under high pH, operational conditions were not suitable for the growth and metabolism of Anammox bacteria. Performance failure of Anammox reactors may occur when reactors are operated under such high pH for a longer time.

Significant positive effects of inorganic carbon on nitrogen removal performance in the Anammox process were demonstrated in several studies. For example, in a study by Yang et al. 2010, after the addition of sufficient IC, the NRR sharply increased from $5.2 \text{ to } 11.8 \text{ kg-N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ within only 32 days of operation.

The effects of high salinity conditions on the efficiency and activity of the Anammox process have also been studied. Dapena-Mora et al. 2010 investigated the performance of the process. Batch assays carried out with non-adapted and adapted Anammox biomass at different salt concentrations indicated a stimulatory effect on the SAA at concentrations up to 6 and 15 g NaCl L^{-1} while higher salt concentrations caused a decrease in the activity. A stable nitrogen removal rate of $4.5 \pm 0.1 \text{ kg N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ was also obtained at a NaCl concentration of 30 g/L , by Yang et al. 2010.

Finally, other factors influencing the anaerobic ammonium oxidation, like chemical oxygen demand (COD) as well as chemical substances contained in wastewater such as sulphonamides are overviewed.

Application of the anaerobic oxidation of ammonium in wastewater treatment plants.

At a municipal WWTP, the influent ammonium is mainly the product of breaking down proteins. There are many different chemical and biochemical routes for the nitrogen transformation to nitrogen gas. Discoveries of other metabolic paths of aerobic and anaerobic ammonia oxidizers are now used in the environmental biotechnology. A short outline of the processes is included in this thesis.

Moreover, the most important full scale as well as pilot scale applications are overviewed. First of all, the first full-scale anammox reactor in the world was started in Rotterdam (NL). The reactor was scaled-up directly from laboratory-scale to full-scale and treats up to 750 kg-N/d . The experience gained during this first startup in combination with the availability of seed sludge from this reactor, will lead to a faster startup of anammox reactors in the future (Van der Star et al. 2007).

Additionally, Joss et al. 2009 presented partial nitritation and anammox in a single suspended-growth sequencing batch (SBR) reactor by describing a pilot plant and the full-scale startup at three municipal plants in Switzerland (five reactors in total). Ammonium oxidation rates of up to $500 \text{ g N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ with conversion to N_2 of over 90 % were achieved in a full-scale plant, but pilot results indicated that significantly higher rates are feasible.

A pilot plant was also constructed at the Himmerfjärden WWTP (SYVAB AB), (Luisa Gut 2006). The system that was preceded by a buffer tank (0.8 m^3) consisted of two reactors in series (2.1 m^3 each), followed by settling tanks (0.125 m^3 each). The pilot plant was designed as a Moving Bed™ Biofilm Reactor (MBBR) and filled up to 45-50% with Kaldnes carriers. The first reactor was operated to obtain a partial nitritation process whereas in the second one an Anammox process was established. The system was therefore named the two-step partial nitritation/Anammox. The highest influent load was calculated as $1.2 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and corresponded to the high-est system capacity $0.9 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$.

Fux et al. investigated the feasibility of nitrogen removal from digester effluents from two different wastewater treatment plants (WWTPs) with the combined partial nitritation/anammox process in a pilot plant. Nitritation was performed in a continuously stirred tank reactor ($V=2.0 \text{ m}^3$) without sludge retention. Some 58% of the ammonium in the supernatant was converted to nitrite. The anaerobic ammonium oxidation was carried out in a sequencing batch reactor (SBR, $V= 1.6 \text{ m}^3$) with a nitrogen elimination rate of $2.4 \text{ kg N m}^{-3} \text{ reactor d}^{-1}$ during the nitrite-containing periods of the SBR cycle. Over 90% of the inlet nitrogen load to the anammox reactor was removed and the sludge production was negligible. The nitritation efficiency of the first reactor limited the overall maximum rate of nitrogen elimination.

Finally, Ni et al. 2010, evaluated the possibility to introduce the exotic anammox sludge to seed the pilot-scale anammox granular reactor and its fast start-up for treating high nitrogen concentration wastewater. The reactor was started up successfully in two weeks; in addition, high nitrogen removal was achieved for a long period. Stoichiometry molar ratios of nitrite conversion and nitrate production to ammonium conversion were calculated to be $1.26 \pm 0.02:1$ and $0.26 \pm 0.01:1$, respectively. The granular anammox reactor possessed high nitrogen removal potential of $27.8 \text{ kg/m}^3/\text{d}$.

Conclusions and suggestions

Obtained values of nitrogen removal rates showed that one-step simultaneous partial nitritation / Anammox process is a better option than two-step system irrespective of kind of wastewater, as the obtained nitrogen removal rates were higher in the one-step system, which was additionally less complicated in operation and there was no need for nitrite-to ammonium control in the influent.

Moreover the process can be successfully applied at temperatures much lower than the optimum value. The oxygen concentration in the bulk liquid and the nitrite production rates

seem to be the rate-limiting step for the Anammox reaction in a single reactor. Faster startup of the reactors, has now become possible through seeding with anammox biomass.

However, there are still problems which need to be solved. The slow growth rate of the Anammox organisms is one of the most important factors that need to be investigated in order to speed up the start up phase.

The Anammox process is sensitive to high oxygen and nitrite concentrations. In case of loss of the bacteria activity a long period of time is needed for process recovery, so there is a need to draw up a monitoring system for the process.

Furthermore, the feasibility of the process should be examined in the case of different types of wastewater.

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Αντικείμενο της εργασίας

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η βιβλιογραφική επισκόπηση της αναερόβιας οξειδωσης της αμμωνίας (Anaerobic Ammonium Oxidation, ANAMMOX) ως νέα μέθοδο βιολογικής επεξεργασίας του αζώτου. Η διεργασία αυτή, ανακαλύφθηκε και επιβεβαιώθηκε πειραματικά μόλις το 1995, από τους Mulder et al. (1995), χωρίς μάλιστα να αποσαφηνιστεί ορθά και πλήρως η ακριβής αντίδραση.

Η διεργασία αυτή, όπως ήταν αναμενόμενο, προκάλεσε το έντονο ενδιαφέρον των ερευνητών και ακολούθησαν πολλές ερευνητικές μελέτες, με αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε κάποιες περιπτώσεις, όσον αφορά στην εφαρμογή της στον τομέα της επεξεργασίας λυμάτων. Στο πλαίσιο αυτό εξετάστηκαν, σε πειραματική κλίμακα, διαφόρων τύπων λύματα (π.χ. αστικά λύματα, λύματα με αυξημένες συγκεντρώσεις αζώτου, αμμωνίου) καθώς και διαφόρων ειδών αντιδραστήρες π.χ. αντιδραστήρες διακοπτόμενου έργου (Sequencing Batch Reactors), αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας (Up flow Anaerobic Sludge Blanket reactors) κλπ.

Παράλληλα, προκειμένου να αποκτηθεί η δυνατότητα καλύτερης εποπτείας της μεθόδου, ήταν απαραίτητη η σφαιρική εικόνα της δομής και τη δραστηριότητας των βακτηρίων, του μεταβολισμού, του ρυθμού ανάπτυξής τους καθώς και των συνθηκών που εξασφαλίζουν την επιβίωση και την ανάπτυξή τους. Και σε αυτήν την κατεύθυνση λυσιπρόσωπα στράφηκαν πολλοί ερευνητές και παρουσίασαν ιδιαίτερα σημαντικές και χρήσιμες διαπιστώσεις.

Με όλες τις προαναφερόμενες πληροφορίες στη διάθεση τους πλέον, κάποιοι ερευνητές προχώρησαν στην πιλοτική αλλά και στην μεγάλης κλίμακας εφαρμογή της μεθόδου, η οποία και αποτελεί το κύριο ζητούμενο.

Η παρούσα εργασία συνοψίζει όλα τα προαναφερόμενα σημεία, με βάση τις δημοσιεύσεις ερευνητών, και θα μπορούσε να χωριστεί σε τρία σκέλη. Στο πρώτο σκέλος παρατίθενται όλα τα ιστορικά στοιχεία για την ανακάλυψη και την πρόοδο της γνώσης γύρω από την διεργασία της αναερόβιας οξειδωσης της αμμωνίας, καθώς και στοιχεία για τη φυσιολογία και το μεταβολισμό των ANAMMOX βακτηρίων. Επίσης απαριθμούνται τα ενδιαφέροντα στα οποία έχει καταγραφεί η ύπαρξή τους στο φυσικό περιβάλλον, όπως και η συνεισφορά της διεργασίας στην απομάκρυνση αζώτου. Στο δεύτερο σκέλος εξετάζονται οι παράγοντες και οι συνθήκες που επιδρούν στη δραστηριότητα των βακτηρίων και επηρεάζουν την απόδοση της διεργασίας, όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία, το pH κλπ. Στο τρίτο σκέλος καταγράφονται οι βασικότερες τεχνολογίες βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου, συμπεριλαμβανομένης και της αναερόβιας οξειδωσης της αμμωνίας, συνοδευόμενες με μία ενδεικτική ποιοτική και ποσοτική σύγκριση. Τέλος, αναλύονται οι πλέον σημαντικές πιλοτικές και μεγάλης κλίμακας εφαρμογές της μεθόδου, ενώ εξάγονται και κάποια συμπεράσματα.

1.2 Διάρθρωση της εργασίας

Η εργασία περιλαμβάνει συνολικά επτά κεφάλαια, συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας εισαγωγής (κεφάλαιο 1).

Στο δεύτερο κεφάλαιο παρατίθενται στοιχεία σχετικά με τον αναθεωρημένο πια κύκλο του αζώτου καθώς και την ιστορία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, από την πρόβλεψη της, έως την πειραματική επιβεβαίωση.

Το τρίτο κεφάλαιο αφορά στην φυσιολογία των ANAMMOX βακτηρίων, με τις ιδιαιτερότητες που εμφανίζει, και το μεταβολισμό τους, ο οποίος και παρουσιάζει ενδιαφέρον για την πλήρη κατανόηση της διεργασίας.

Στο τέταρτο κεφάλαιο παρατίθενται οι κυρίαρχες μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των ANAMMOX βακτηρίων και της δραστηριότητάς τους, για την επιβεβαίωση της ύπαρξής τους στο φυσικό περιβάλλον αλλά και σε εργαστηριακές μελέτες. Επίσης συνοψίζεται το σύνολο των ενδιαιτημάτων στα οποία έχουν ανιχνευτεί τα εν λόγω βακτήρια.

Στο πέμπτο κεφάλαιο επιχειρείται η αναλυτική καταγραφή των κυριότερων παραγόντων που επηρεάζουν τη διεξαγωγή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, και κατά συνέπεια την εφαρμογή της στον τομέα της επεξεργασίας λυμάτων.

Στο έκτο κεφάλαιο, αρχικά συνοψίζονται οι κυριότερες τεχνολογίες βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου, συμπεριλαμβανομένης και της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί μια ενδεικτική σύγκριση μεταξύ των τεχνολογιών αυτών (ποιοτική και ποσοτική), καθώς και μια ενδεικτική οικονομική σύγκριση μεταξύ της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας και της συμβατικής νιτροποίησης-απονιτροποίησης. Στη συνέχεια ακολουθεί η αναλυτική καταγραφή των κυριότερων, μεγάλης κλίμακας και πιλοτικών, εφαρμογών της μεθόδου.

Τέλος, στο έβδομο κεφάλαιο εξάγονται κάποια συμπεράσματα που προέκυψαν από τη βιβλιογραφική επισκόπηση για τις δυνατότητες της αποδοτικής εφαρμογής της μεθόδου στην επεξεργασία λυμάτων, ενώ γίνονται και προτάσεις για μελλοντική έρευνα.

Κεφάλαιο 2: Ιστορία της Αναερόβιας Οξειδωσης της Αμμωνίας

2.1 Ο αναθεωρημένος κύκλος του αζώτου

Οι ενώσεις του αζώτου βρίσκονται ανάμεσα στους πιο σημαντικούς ρυπαντές των υγρών αποβλήτων εξαιτίας του ρόλου που διαδραματίζουν στο φαινόμενο του ευτροφισμού, στην επίδρασή τους στο περιεχόμενο οξυγόνου του υδάτινου αποδέκτη και τέλος της τοξικής τους δράσης στα ασπόνδυλα και σπονδυλωτά είδη, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Ωστόσο αυτές οι ενώσεις προκαλούν επίσης το ενδιαφέρον λόγω της ωφέλιμης δράσης τους στην ανάπτυξη των φυτών με επακόλουθο την αύξηση της παραγωγή της πανίδας (Kadlec and Knight, 1996).

Στη φύση, άτομα ανόργανου αζώτου μπορούν να εμφανιστούν σε διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις: από -3 (NH_4^+) έως $+5$ (NO_3^-). Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις αζώτου που αντιπροσωπεύουν τις παραπάνω οξειδωτικές καταστάσεις μπορούν να μετατραπούν σε άλλες μορφές μέσω της μικροβιακής δραστηριότητας (Kartal et al. 2008). Η εναλλαγή-μετατροπή του αζώτου στη βιόσφαιρα είναι γνωστή ως κύκλος του αζώτου. Η οξειδωτική κατάσταση του αζώτου μεταβάλλεται από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι πραγματοποιούν καταβολικές αντιδράσεις (νιτρωδοποίηση, νιτροποίηση, απονιτροποίηση, αμμωνιοποίηση νιτρικών και αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας), αναβολικές αντιδράσεις (αζωτοδέσμευση, πρόσληψη αμμωνίου, αφομοιωτική αναγωγή νιτρικών) και αμμωνιοποίηση (Dapena-Mora et al. 2007).

Για πολλά χρόνια, παραδοσιακή μέθοδο για την απομάκρυνση του αζώτου από τα υγρά απόβλητα έχει αποτελέσει ο συνδυασμός των διεργασιών νιτροποίησης - απονιτροποίησης. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι η έλλειψη απαραίτητων εκτάσεων ή διάφοροι οικονομικοί περιορισμοί, όπως η ανάγκη εξοικονόμησης ενέργειας, δεν επιτρέπουν την αύξηση της δυναμικότητας των υπάρχοντων εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, ιδιαίτερα στην περίπτωση που αυτά εμφανίζουν μεγάλα φορτία αμμωνίου. Τη λύση σε αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να δώσει η ανακάλυψη της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, η οποία δίνει νέες δυνατότητες και εναλλακτικές.

Υπάρχουν πολύ περίπλοκες αλληλοσυσχετίσεις ανάμεσα στις διαφορετικές μορφές αζώτου (π.χ. αμμωνία, νιτρικά και νιτρώδη ανάμεσα στις άλλες) καθώς και διαφορετικοί μηχανισμοί μετασχηματισμών. Το οργανικό άζωτο δημιουργείται από μια ποικιλία από ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των αμινοξέων, των αμινοσακχάρων, της ουρίας, του ουρικού οξέος, των πουρινών και των πυραμιδινών (R. H. Kadlec and Knight, 1996). Μέσω της υδρόλυσης και της ανοργανοποίησης το οργανικό άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνιακό άζωτο. Η αμμωνία είναι μια από τις πλέον σημαντικές ενώσεις αζώτου στα επιφανειακά νερά και άλλα οικοσυστήματα κυρίως για τρεις λόγους:

- i. Είναι το προτιμώμενο θρεπτικό για τα περισσότερα είδη φυτών και αυτοτροφικών βακτηρίων

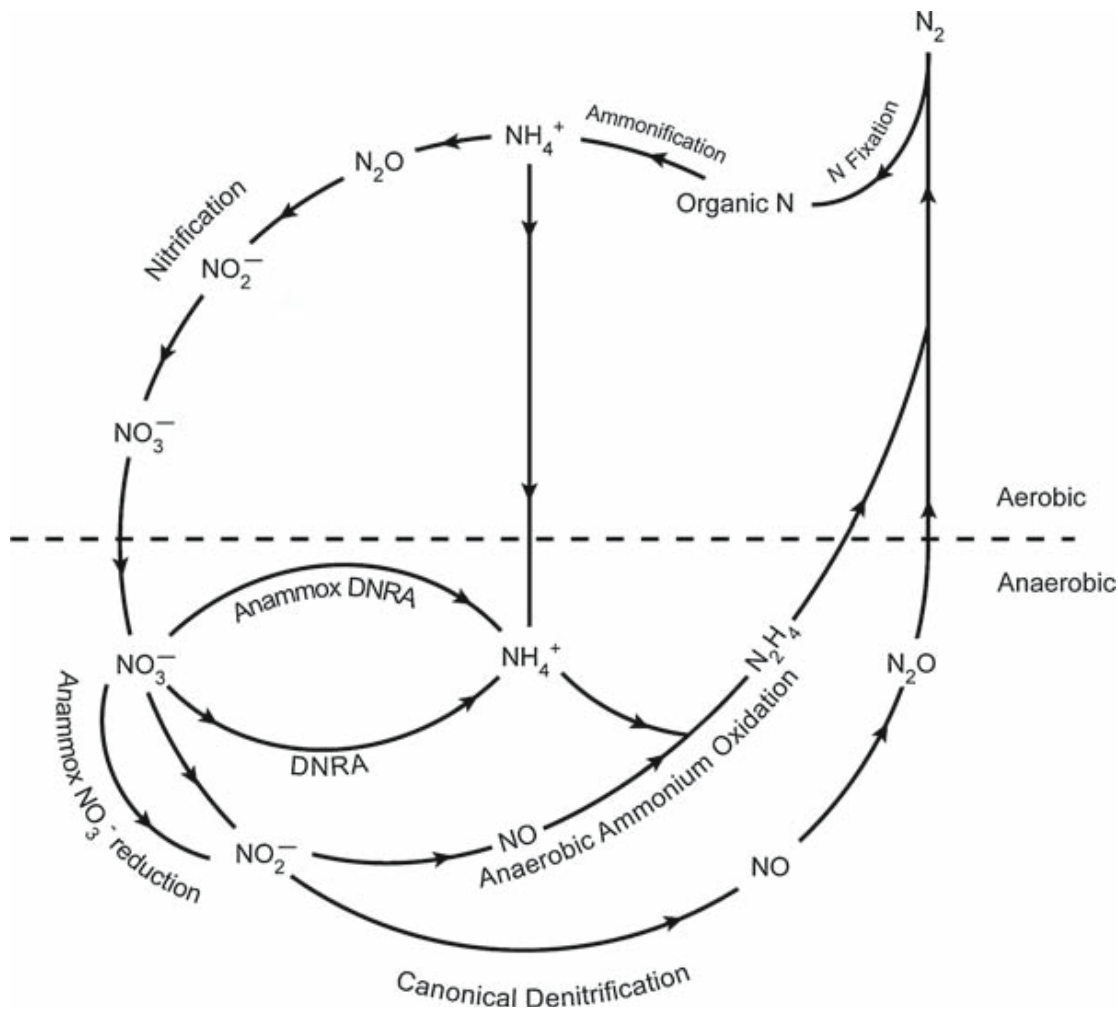
- ii. Μπορεί να αναχθεί χημικά και επομένως μπορεί εύκολα να οξειδωθεί στα φυσικά νερά, οδηγώντας στην κατανάλωση και μείωση του διαλυμένου οξυγόνου και
- iii. Η ελεύθερη αμμωνία είναι τοξική σε πολλές μορφές της υδάτινης ζωής ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις(>0.2mg/L) (R. H. Kadlec and Knight, 1996).

Η μετατροπή ανάμεσα στην ελεύθερη αμμωνία και στα αμμωνιακά ιόντα εξαρτάται κυρίως από το pH και τη θερμοκρασία (A. C. Anthonisen et al,1976). Σε χαμηλότερα pH και θερμοκρασίες η μετατροπή μειώνεται σημαντικά. Για κανονικές συνθήκες 25°C και pH 7 η ελεύθερη αμμωνία εμφανίζεται σε ποσοστό 0.6% της συνολικής αμμωνίας. Ωστόσο στους 30°C και pH ίσο με 9.5, το ποσοστό της αυξάνεται στο 72%.

Σε αερόβιες συνθήκες η αμμωνία οξειδώνεται σε νιτρικά, με ενδιάμεσο προϊόν τα νιτρώδη. Δύο διαφορετικά είδη βακτηρίων παίζουν ρόλο στο στάδιο της νιτροποίησης, τα βακτήρια οξείδωσης της αμμωνίας και τα βακτήρια οξείδωσης των νιτρωδών. Στην οξείδωση της αμμωνίας τα νιτρώδη επίσης εμφανίζονται ως ενδιάμεσο προϊόν. Θεωρείται ότι τα νιτρώδη σπάνια εμφανίζουν συσσώρευση σε χερσαία ή υδατικά οικοσυστήματα, αν και σε κάποιες αναφορές υποδεικνύεται ότι αυτό μπορεί να συμβεί. Μάλιστα έχει αναφερθεί συσσώρευση νιτρωδών στο έδαφος σε περιπτώσεις με υψηλή συγκέντρωση ουρίας, είτε λόγω προσθήκης λιπασμάτων είτε λόγω ούρων στο έδαφος (J. M. Bremner,1995).

Συγκέντρωση νιτρωδών έχει επίσης παρατηρηθεί στο νερό των πόρων ιζημάτων ποταμού καθώς και σε κάποιες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων εργαστηριακής κλίμακας (K. Hanaki et al,1990 , W. Helder and R. T. P. de Vries, 1983), γεγονός που αποδίδεται στη μικρότερη έλξη οξυγόνου από τα βακτήρια οξείδωσης νιτρωδών (nitrite oxidizers) σε σχέση με τα βακτήρια οξείδωσης αμμωνίας (ammonium oxidizers) (H. J. Laanbroek and S. Gerards,1993). Αν και η απονιτροποίηση των νιτρωδών, με δότες ηλεκτρονίου όπως ο οργανικός άνθρακας, η αμμωνία, H₂S κλπ, είναι πιθανή σε αυτό το στάδιο οξείδωσης, σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας συνήθως παρατηρείται μια πλήρης οξείδωση σε νιτρικά. Με τον οργανικό άνθρακα, τα απονιτροποιητικά βακτήρια ανάγουν τα νιτρικά μέσω των νιτρωδών σε αέριο άζωτο.

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, οι περισσότερες από τις αντιδράσεις που απεικονίζονται στον κύκλο του αζώτου ήταν ήδη γνωστές για μεγάλο χρονικό διάστημα και ο κύκλος αζώτου θεωρείτο πλήρης. Σε αυτόν τον κύκλο δεν συμπεριλαμβανόταν η πιθανότητα ύπαρξης της αντίδρασης της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (Kartal et al. 2008). Ωστόσο, μετά την πρόβλεψη και την πειραματική επαλήθευση της αντίδρασης αυτής ο κύκλος του αζώτου αναθεωρήθηκε, όπως ήταν φυσικό.



Σχήμα 2.1: Η διεργασία της Αναερόβιας Οξειδωσης της Αμμωνίας στο πλαίσιο του αναθεωρημένου κύκλου του αζώτου (Ryan Penton , Anaerobic Ammonium Oxidation, 2009).

2.2 Πρόβλεψη, ανακάλυψη και επαλήθευση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας

Τα Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria (ANAMMOX) βακτήρια προβλέφθηκαν για πρώτη φορά μέσω της απουσίας συγκέντρωσης αμμωνίας στις ενεργές ζώνες απονιτροποίησης στον ωκεανό. Η αντίδραση ANAMMOX αποτελεί την αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου σε συνδυασμό με αναγωγή στα νιτρώδη, υπό αναερόβιες συνθήκες. Αυτή η εναλλακτική οδός απομάκρυνσης αζώτου προτάθηκε πρωτίστως από τον Richards (1965), ο οποίος βασίστηκε σε παρατηρήσεις έλλειψης αμμωνίου σε αναερόβιες θαλάσσιες ζώνες.

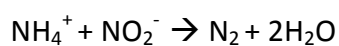
Εκτός από την απονιτροποίηση, η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας θα μπορούσε να αποτελεί μία από τις σημαντικότερες πηγές ανόργανου αζώτου. Βιοχημικά η αμμωνία είναι σχετικά δύσκολο να ενεργοποιηθεί. Επιπροσθέτως ο εμπλουτισμός ή η ανίχνευση οργανισμών, ικανών να αναπτυχθούν μέσω της αμμωνίας υπό αναερόβιες συνθήκες, στάθηκε ανεπιτυχής για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Το γεγονός αυτό έκανε τους

μικροβιολόγους να πιστεύουν, κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, ότι η αμμωνία παραμένει αδρανής σε αναερόβιες συνθήκες (Jetten M. 2008).

Η προτεινόμενη οδός της αναερόβιας οξείδωσης επιτρέπει την απομάκρυνση του αμμωνίου κάτω από συνθήκες πλήρους έλλειψης οξυγόνου. Τα πρώιμα στοιχεία για την ύπαρξη αυτής της αντίδρασης προήλθαν από το προφίλ του περιεχόμενου νερού στο πορώδες θαλάσσιων ιζημάτων, όπου παρατηρήθηκε ταυτόχρονη εξάλειψη αμμωνίου και νιτρικών (Codispoti and Richards 1976, Cline and Richards 1972). Ο Broda (1977) σύντομα πρότεινε ένα νέο τύπο βακτηρίων υπεύθυνο για αυτές τις παρατηρήσεις ένα "χημικοσυνθετικό βακτήριο που οξειδώνει την αμμωνία σε άζωτο με νιτρώδη ή οξυγόνο ως οξειδωτικό μέσο", το οποίο θεωρήθηκε ως ένας από τους δύο "λιθότροφους μικροοργανισμούς που λείπουν από τη φύση".

Μετά από κάποιους ανεξήγητα υψηλούς ρυθμούς απομάκρυνσης αζώτου σε μονάδες νιτροποίησης-απονιτροποίησης, με μικρές συγκεντρώσεις οξυγόνου και οργανικής ύλης, οι Mulder et al., 1995, περιέγραψαν την πρώτη πειραματική επιβεβαίωση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, σε αντιδραστήρα ενεργού κλίσης κατά την επεξεργασία υγρών αποβλήτων. Τα ANAMMOX βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιούν τα νιτρώδη ως δέκτη ηλεκτρονίου και να μετατρέπουν αναερόβια την αμμωνία και τα νιτρώδη σε αέριο άζωτο. Σε αντίθεση με τη συμβατική μέθοδο νιτροποίησης-απονιτροποίησης, η αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου είναι μια αυτότροφη διεργασία. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα δισανθρακικά ως πηγή άνθρακα.

Πιο συγκεκριμένα κατά τη διεργασία αυτή 1 mol αμμωνίου οξειδώνεται με 1 mol νιτρώδη για την παραγωγή αερίου αζώτου N₂, με απουσία οξυγόνου (Strous et al. 1999a, b):



Σε σύγκριση με την απονιτροποίηση, αυτή η μέθοδος παράγει διπλάσια ποσότητα N₂ ανά mol νιτρικών που καταναλώνονται, ενώ αυξάνει την παραγωγή N₂ σε περιπτώσεις όπου η νιτροποίηση είναι περιορισμένη. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι ένα στα δύο μόρια αζώτου στην ατμόσφαιρα έχει παραχθεί μέσω της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (Jetten M. 2008).

Η υδροξυλαμίνη και η υδραζίνη ταυτοποιήθηκαν ως σημαντικά ενδιάμεσα προϊόντα (Jetten et al., 1999), ενώ τα πειράματα έδειξαν ένα πολύ χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης των ANAMMOX βακτηρίων (χρόνος διπλασιασμού 11 ημερών) (Strous et al., 1998 και Strous et al., 1999).

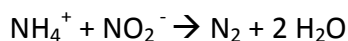
Επομένως, οι αντιδραστήρες που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για αυτή την νέα μέθοδο επεξεργασίας θα έπρεπε να εμφανίζουν επαρκή χρόνο παραμονής της βιομάζας καθώς και μια αργή περίοδο εκκίνησης της διεργασίας.

Οι Strous et al., 1998 και Strous et al., 1999 χρησιμοποίησαν ένα αντιδραστήρα εναλλασσόμενων φάσεων διαλείποντος έργου (SBR) και κατάφεραν να καλλιεργήσουν αρκετή βιομάζα ώστε να προσδιορίσουν τις κύριες φυσιολογικές παραμέτρους των

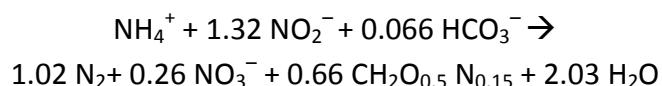
ANAMMOX βακτηρίων. Αυτοί οι λιθότροφοι μικροοργανισμοί ταυτοποιήθηκαν ως ένα νέο αυτότροφο μέλος της τάξης των Planctomycetes (Strous et al.,1999).

Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας πραγματοποιείται από Planctomycetes του γένους *Candidatus "Brocadia anammoxidans"* και "*Kuenenia stuttgartiensis*", από κάποια είδη του γένους "*Scalindua*" (Schmid et al.,2003) καθώς και από το μέλος, "*Anammoxoglobus propionicus*" (Kartal et al. 2007b). Λόγω του ότι είναι αυτότροφοι μικροοργανισμοί, μία πλήρης μετατροπή του αμμωνίου σε αέριο άζωτο μπορεί να λάβει χώρα χωρίς την προσθήκη οργανικής ύλης (Jetten et al., 2002 και L. Van Dongen et al., 2001). Τα ANAMMOX βακτήρια δεν καταναλώνουν αμμωνία και νιτρώδη σε αναλογία 1:1 όπως θα ήταν αναμενόμενο από τον καταβολισμό τους αλλά σε αναλογία 1:1.3 , όπως φαίνεται και από τις παρακάτω σχέσεις (L. Van Dongen et al., 2002):

Anammox (without cell synthesis)



Anammox (with cell synthesis)



Η περίσσεια του 0.3 mol νιτρωδών οξειδώνεται αναερόβια σε νιτρικά (A. A. van de Graaf et al., 1996).

Αυτά τα βακτήρια είναι πολύ ευαίσθητα στην παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων οξυγόνου και νιτρωδών. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις οξυγόνου υψηλότερες από 0.06 mg/L, νιτρωδών μεταξύ 230 mg/L και 920 mg/L καθώς και φωσφορικών αλάτων υψηλότερες από 180 mg/L αναστέλλουν τη λειτουργία της αναερόβιας οξείδωσης του αμμωνίου αντιστρεπτά (Jetten et al., 2001 και Jetten et al.,1999).

Επίσης, τα ANAMMOX βακτήρια είναι πολύ ευαίσθητα στην παρουσία κάποιων πηγών οργανικής ύλης, όπως για παράδειγμα στις αλκοόλες και ειδικά στη μεθανόλη. Ακόμα δηλαδή και μία πολύ μικρή συγκέντρωση μεθανόλης, ίση με 40 mg/L, οδήγησε σε άμεση, πλήρη και μη αντιστρέψιμη αναστολή της αναερόβιας οξείδωσης του αμμωνίου (Paredes et al.,2007). Το γεγονός αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη διότι η μεθανόλη χρησιμοποιείται συχνά για την απομάκρυνση των νιτρικών στο στάδιο που έπεται της απονιτροποίησης, είτε για την εξισορρόπηση της μείωσης του pH στους αντιδραστήρες μερικής νιτροποίησης (partial nitrification reactors).

Ο σχηματισμός φορμαλδεΐδης από το ANAMMOX ένζυμο υδροξυλαμίνη οξειδοαναγωγή (hydroxylamine oxidoreductase) ταυτοποιήθηκε ως η πιθανή αιτία της αναστολής που προκαλεί η μεθανόλη. Αντιθέτως, τα οργανικά οξέα φαίνεται να αξιοποιούνται καθώς στο προπιονικό οξύ (propionate) και πιθανώς το οξικό οξύ (acetate) φαίνεται να αποτελούν υπόστρωμα για τα ANAMMOX βακτήρια. Το προπιονικό οξύ οξειδώθηκε από τα βακτήρια με τα νιτρικά και/ή τα νιτρώδη ως δέκτη ηλεκτρονίου, ενώ ταυτόχρονα έλαβε χώρα η

αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου. Σε μια καλλιέργεια εμπλουτισμού ANAMMOX βακτηρίων, η οποία τροφοδοτήθηκε με προπιονικό οξύ για 150 ημέρες, η ποσότητα των ANAMMOX κυττάρων και απονιτροποιητικών βακτηρίων δεν άλλαξε σημαντικά με το χρόνο, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα ANAMMOX βακτήρια μπορούν να ανταγωνιστούν επιτυχώς τα ετερότροφα απονιτροποιητικά βακτήρια για το προπιονικό οξύ (D. Güven et al., 2005).

Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας χαρακτηρίζεται όχι μόνο από τον αργό ρυθμό ανάπτυξης αλλά και από την αλληλεπίδραση με άλλα βακτήρια. Τα ANAMMOX βακτήρια εξαρτώνται από μια κοντινή πηγή νιτρωδών. Στο πλαίσιο αυτό, υπάρχουν δύο τρόποι για την επίτευξη υψηλών ρυθμών απομάκρυνσης μέσω της αναερόβιας οξείδωσης:

α. δύο αντιδραστήρες σε σειρά, με πρώτο στάδιο τον αντιδραστήρα της μερικής νιτροποίησης και δεύτερο στάδιο τη μονάδα της αναερόβιας οξείδωσης του αμμωνίου- με αυτήν τη διάταξη οι δύο βιολογικές διεργασίες μπορούν να ελεγχθούν ξεχωριστά (L. Van Dongen et al., 2001 και Fux and Siegrist 2004).

β. η χρήση συστημάτων με βιοφιλμ όπου η κλασική νιτροποίηση αναπτύσσεται στα εξωτερικά αερόβια στρώματα και η αναερόβια οξείδωση λαμβάνει χώρα στις ενδότερες ζώνες του βιοφιλμ, από τα ANAMMOX βακτήρια. Επομένως, οι συγκεντρώσεις οξυγόνου αποτελούν παράμετρο ελέγχου-κλειδί για την εφαρμογή αυτή (Egli et al., 2003 και C. Helmer-Madhoc et al., 2002).

Αυτή η διεργασία μελετήθηκε από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες και της έχουν αποδοθεί διαφορετικά ονόματα: "Aerobic/Anoxic Deammonification" στο Πανεπιστήμιο του Hanover (Γερμανία), "Onland" στο Ghent University (Βέλγιο) και "Canon" στο Delft University (Ολλανδία) Fux and Siegrist 2004). Μια παραλλαγή της ANAMMOX διεργασίας εξετάστηκε πρόσφατα σε εργαστηριακή κλίμακα και ονομάστηκε DEAMOX (Denitrifying AMmonium OXidation). Αυτή η μέθοδος βασίζεται στο συνδυασμό της αντίδρασης ANAMMOX κάτω από αυτοτροφικές απονιτροποιητικές συνθήκες, με τη χρήση σουλφιδίου σαν δέκτη ηλεκτρονίου για την παραγωγή νιτρωδών από νιτρικά μέσα σε ένα αναερόβιο βιοφιλμ (S. Kalyuzhnyi et al., 2006).

Κεφάλαιο 3: Φυσιολογία και Μεταβολισμός

3.1 Φυσιολογία

Τα κοκκώδη ANAMMOX βακτήρια εμφανίζουν διάμετρο συνήθως μικρότερη από 1μm και χρόνο πολλαπλασιασμού από 10 έως 30 ημέρες. Όλα τα προσφάτως γνωστά ικανά για αναερόβια οξειδωση του αμμωνίου βακτήρια ανήκουν στην τάξη *Planctomycetales* με μεγάλη διαφοροποίηση στο γένος (Freitag and Prosser 2003; Schmid et al. 2003). Η εξελικτική διαφοροποίηση ανάμεσα στα γένη είναι σημαντική (<85% 16S rRNA gene nucleotide identity), παρόλο που μοιράζονται ίδιο βασικό μεταβολισμό και κυταρική δομή. Επί του παρόντος υπάρχουν τέσσερα *Candidatus* γένη τα οποία ομαδοποιούνται με βάση τις συχνότητες 16S rRNA: τα “γλυκού νερού” *Kuenenia* (*K. stuttgartiensis*; Schmid et al. 2000) και *Brocadia* (*B. anammoxidans* (5) and *B. fulgida* (22)), και τα “θαλασσινά” βακτήρια *Scalindua* (*S. sorokinii*, *S. brodae*, και *S. Wagneri*”, Schmid et al. 2003). Το τέταρτο *Candidatus* γένος έχει ένα μέλος, *Anammoxoglobus propionicus* (Kartal et al. 2007b), το οποίο εμφανίζει εναλλακτικό μεταβολισμό. Επιπλέον, όλα τα είδη μοιράζονται παρόμοια φυσιολογικά χαρακτηριστικά (Jetten et al. 2003, Kartal et al. 2007).

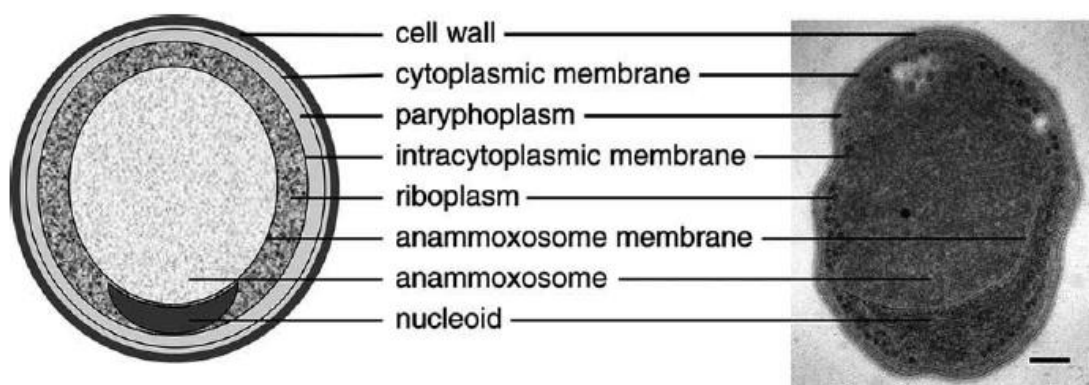
Όσον αφορά λοιπόν στη δομή των ANAMMOX βακτηρίων, όπως και όλα τα είδη που ανήκουν στην τάξη *Planctomycetes*, θα μπορούσε να χαρακτηριστεί παράτυπη για βακτήριο, με διαχωρισμένο σε τμήματα κυτταρόπλασμα και φαινομενικά καθόλου περιπλασματικό χώρο (periplasmic space). Το κυτταρόπλασμα διαχωρίζεται σε τρία ξεχωριστά τμήματα που οριοθετούνται από ξεχωριστές μεμβράνες διπλής στρώσης.

Το τρίτο και εξώτερο τμήμα του κυτταροπλάσματος, το *peryphoplasm*, οριοθετείται εξωτερικά από την κυτταρική μεμβράνη, ενώ το δεύτερο τμήμα, το ριβόπλασμα, περιέχει ριβοσώματα και την περιοχή του πυρήνα (nucleoid). Μεταξύ τους, τα δύο αυτά τμήματα διαχωρίζονται από μια εσωτερική κυτταρική μεμβράνη.

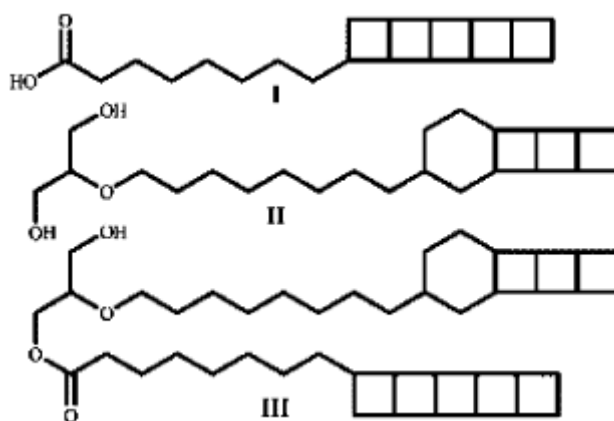
Το ενδότερο και πλέον ενδιαφέρον τμήμα του κυτταροπλάσματος, το αναμμοξειώσωμα, το οποίο οριοθετείται από τη μεμβράνη του αναμμοξειώσματος, περιέχει σωματίδια σιδήρου και σωληνοειδείς δομές, ενώ καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του όγκου του κυττάρου-στην περίπτωση του *K. Stuttgartiensis* μάλιστα φτάνει το 60% (van Niftrik et al. 2008). Η λειτουργία του αναμμοξειώσματος θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει την παραγωγή ενέργειας, ανάλογα με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Huston et al. 2007).

Η μεμβράνη του αναμμοξειώσματος αποτελείται από μοναδικά λιπίδια που ονομάζονται *ladderanes* (Sinninghe Damste et al. 2002) και εντοπίζονται μόνο στα συγκεκριμένα βακτήρια. Εξαιτίας μιας πολύ πυκνής διάταξης των ατόμων του άνθρακα, τα λιπίδια αυτά λειτουργούν ως φραγμός διάχυσης (Sinninghe Damste et al. 2002), και πιθανότατα ως μέσο προστασίας του βακτηρίου από τα ενδιάμεσα τοξικά προϊόντα της αντίδρασης: υδροξυλαμίνη και υδραζίνη (Jetten et al. 2003), αφού η υδραζίνη για παράδειγμα μπορεί να διεισδύσει εύκολα στις λιγότερο πυκνές βακτηριακές μεμβράνες (Sinninghe Damsté et al.

2002). Επίσης, λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών τους έχουν χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης για την παρουσία βακτηρίων ANAMMOX (Kuypers et al. 2003).



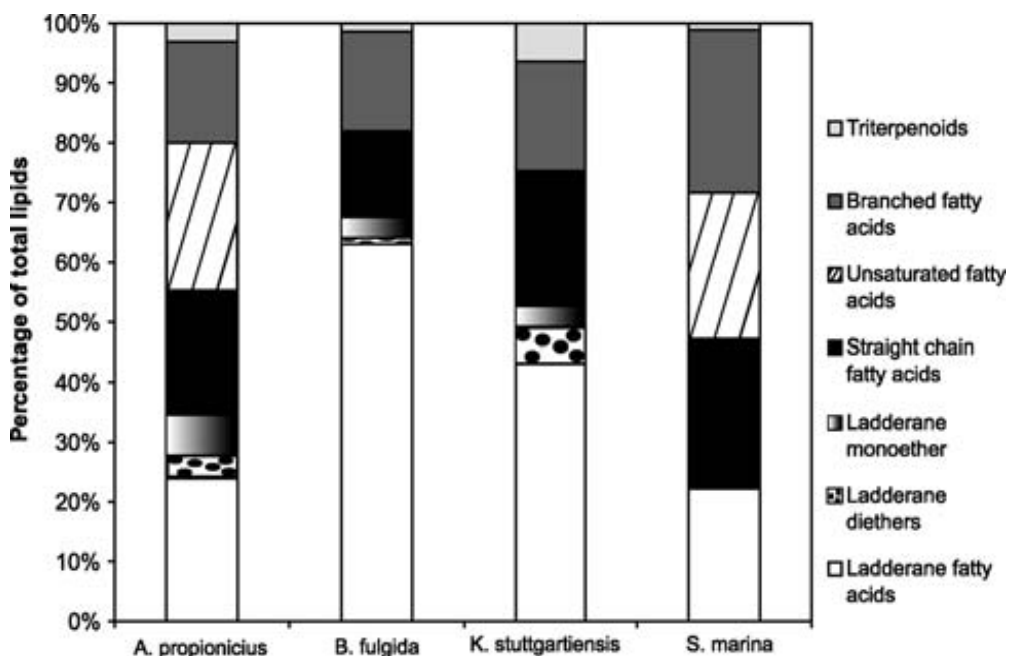
Σχήμα 3.1: Αριστερά: σχηματική απεικόνιση ενός ANAMMOX βακτηρίου. Δεξιά: φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (transmission electron microscopy), Candidatus “Brocadia anammoxidans” (van Niftrik et al., 2004).



Σχήμα 3.2: Τρία παραδείγματα χημικής δομής των ladderane λιπιδίων (Brandes et al, 2007)

Ελλείψει μιας λεπτομερούς ανάλυσης και σύγκρισης μεταξύ της σύνθεσης των λιπιδίων ανάμεσα στα διαφορετικά γένη των ANAMMOX βακτηρίων, οι Rattray et al. (2008) προχώρησαν στην ανάλυση του πυρήνα των λιπιδίων και των φωσφολιπιδίων βακτηρίων προερχόμενων από καλλιέργειες τεσσάρων ειδών, αντιπροσωπευτικών για κάθε γένος. Πραγματοποιήθηκε με αυτό τον τρόπο σύγκριση μεταξύ της σύνθεσης των λιπιδίων κάθε είδους και ερμηνεύτηκαν τα αποτελέσματα με βάση τη φυλογενετική των ANAMMOX βακτηρίων και τις συνθήκες καλλιέργειας στους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου εναλλασσόμενων φάσεων που χρησιμοποιήθηκαν.

Η ανάλυση έδειξε λοιπόν ότι η τα κυρίαρχα λιπίδια των καλλιέργειών ήταν τα ladderane λιπίδια, ευθείας αλυσίδας λιπαρά οξέα, διακλαδισμένης αλυσίδας λιπαρά οξέα, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και τριτερπενοειδή. Οι υπολογισμοί των ποσοστών βάρους έδειξαν ότι τα ladderane λιπαρά οξέα συνιστούν το μεγαλύτερο κλάσμα λιπιδίων σε ότι αφορά στις καλλιέργειες "*Candidatus B. Fulgida*" (63%) και "*Candidatus K. Stuttgartiensis*" (45%), ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα δεν εμφάνισαν σημαντικό ποσοστό. Αντίθετα, όσον αφορά στα "*Candidatus A. propionicus*" και "*Candidatus Scalindua*" τα ποσοστά των ladderane λιπιδίων ήταν 24 και 25% αντίστοιχα, και όμοια με τα ποσοστά των ακόρεστων λιπαρών οξέων και των λιπιδίων ευθείας αλυσίδας. Τα λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας ήταν ο τύπος που εμφάνισε τη μεγαλύτερη αφθονία (29%) στην καλλιέργεια του γένους "*Candidatus Scalindua*". Όλα τα είδη εμφάνισαν επίσης πολύ μικρές ποσότητες τριτερπενοειδών (<6% ολικά λιπίδια). Η σύνθεση των τύπων των λιπιδίων σε σχέση με το βάρος τους, σε κάθε είδος, απεικονίζεται στο σχήμα 3.3.



Σχήμα 3.3: Σύνθεση με βάση τα ποσοστά βάρους των διαφορετικών τύπων λιπιδίων που εμφανίστηκαν για κάθε είδος ANAMMOX βακτηρίων. (Ratray et al. 2008)

Περαιτέρω αναλύσεις σε GC και GC/MS οι οποίες επικεντρώθηκαν στα ladderane λιπίδια έδειξαν ότι το κυρίαρχο ladderane λιπαρό οξύ στην καλλιέργεια των "*Candidatus A. propionicus*" και "*Candidatus B. Fulgida*" ήταν το C₂₀ [5], ενώ στην περίπτωση των "*Candidatus Scalindua*" και "*Candidatus K. Stuttgartiensis*" ήταν το C₂₀.

Πίνακας 3.1: Συγκεντρώσεις ladderane λιπιδίων ($\mu\text{g g}^{-1}$ ξηρό βάρος βιομάζας) στις καλλιέργειες ANAMMOX, μετά από ανάλυση σε GC και GC/MS (Ratray et al. 2008).

	Anammoxoglobus propionicus	Brocadia fulgida	Kuenenia stuttgartiensis	Scalindua ^{a, b}
Ladderane fatty acids				
C20[3] fatty acid (a)	130 ± 68	1,000 ± 210	1,000 ± 86	42
C20[5] fatty acid (b)	150 ± 77	1,200 ± 260	980 ± 170	27
C18[3] fatty acid (c)	ND	ND	ND	17
C18[5] fatty acid (d)	16 ± 7	65 ± 8	28 ± 12	0.5

Τα ladderane λιπίδια αναλύθηκαν επιπροσθέτως με τη βοήθεια HPLC/APCI –MS/MS, για την αποφυγή των θερμικών μεταβολών που ενέχονται στην αέρια χρωματογραφία, καθώς τα λιπίδια αυτά παρουσιάζουν ασταθή συμπεριφορά στη θερμότητα. Σε αυτήν την περίπτωση ως κυρίαρχος τύπος εμφανίστηκε το C₂₀ [5] για “*Candidatus A. propionicus*” και το “*Candidatus B. Fulgida*”, ενώ για το “*Candidatus Scalindua*” C₂₀ [3], ομοίως με την προηγούμενη μέθοδο. Ωστόσο υπήρξε διαφοροποίηση για το “*Candidatus K. Stuttgartiensis*”, το οποίο εμφάνισε ως κυρίαρχο ladderane λιπαρό οξύ το C₂₀ [5], όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Συγκεντρώσεις ladderane λιπιδίων ($\mu\text{g g}^{-1}$ ξηρό βάρος βιομάζας) στις καλλιέργειες ANAMMOX, μετά από ανάλυση σε HPLC/APCI –MS/MS, (Ratray et al. 2008).

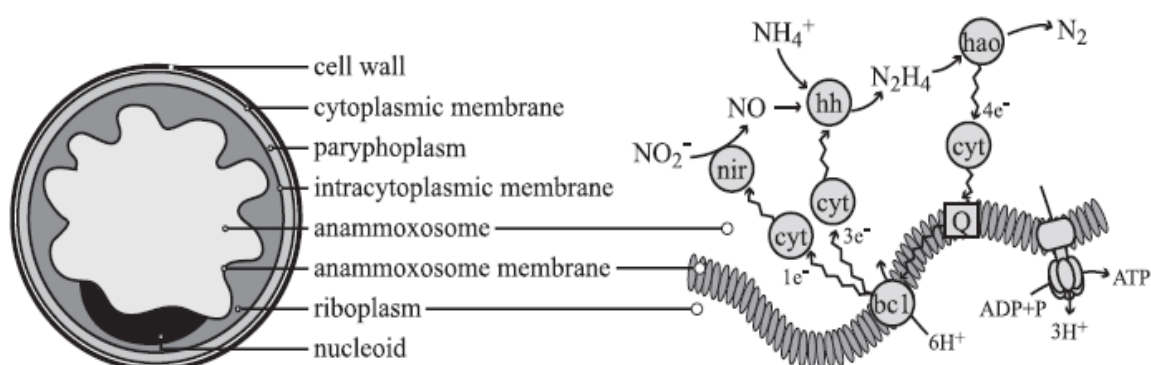
	Anammoxoglobus propionicus	Brocadia fulgida	Kuenenia stuttgartiensis	Scalindua ^a
Ladderane fatty acids				
C20[3] fatty acid a	290 ± 58	580 ± 280	1,400 ± 340	92
C20[5] fatty acid b	450 ± 140	880 ± 400	1,700 ± 310	75
C18[3] fatty acid c	100 ± 120	22 ± 9	650 ± 340	59
C18[5] fatty acid d	48 ± 18	93 ± 41	230 ± 36	27

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις ladderane λιπιδίων στην καλλιέργεια του γένους “*Candidatus Scalindua*”, υπήρξαν σημαντικά μικρότερες σε σχέση με εκείνες που παρατηρήθηκαν στις άλλες καλλιέργειες. Αυτό κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην παρουσία του αλατιού που προστέθηκε στον αντιδραστήρα προκειμένου να προσομοιωθούν οι θαλάσσιες συνθήκες. Η ανάλυση ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) έδειξε ότι η βιομάζα των “*Candidatus B. fulgida*”, “*Candidatus A. propionicus*” and “*Candidatus K. stuttgartiensis*” κυρίως χαρακτηριζόταν από τιμές οργανικού άνθρακα μεταξύ 19 και 30%. Αντιθέτως, η βιομάζα “*Candidatus Scalindua*” είχε μόλις 3% TOC, εξαιτίας των πολύ υψηλών ποσοτήτων ανόργανης ύλης. Όταν οι συγκεντρώσεις υπολογιστούν με βάση το περιεχόμενο οργανικού άνθρακα και όχι με βάση το ξηρό βάρος βιομάζας, οι συγκεντρώσεις των

ladderane λιπιδίων του γένους “*Candidatus Scalindua*” είναι όμοιες σε τάξη μεγέθους με τα υπόλοιπα γένη των ANAMMOX βακτηρίων (Rattray et al. 2008).

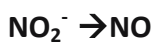
3.2 Μεταβολισμός

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το αναμμοξείσωμα είναι αυτό που εκτελεί το έργο της παραγωγής ενέργειας, ενώ η ενέργεια από την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας χρησιμοποιείται με τη μορφή της κινητήριας δύναμης πρωτονίων PMF, για τη μεταφορά εκτός μεμβράνης. Η διεργασία αυτή καταλύεται από αρκετές πρωτεΐνες κυτόχρωμα *c*-. Με βάση αυτό το μοντέλο τα νιτρώδη ανάγονται αρχικά σε μονοξείδιο του αζώτου μέσω ενός κυτοχρώματος *c*- και κυτοχρώματος *d*₁ – που περιέχει αναγωγάση νιτρωδών (nitrite reductase). Το μονοξείδιο του αζώτου και το αμμώνιο στη συνέχεια σχηματίζουν την υδραζίνη μέσω της hydrazine-hydrolase. Τέλος η υδραζίνη οξειδώνεται σε αέριο άζωτο με τη συνεισφορά της hydrazine/hydroxylamine oxidoreductase, ενός octaheme κυτοχρώματος *c*- (Schalk et al.2000, Shimamura et al.2007). Τα τέσσερα ηλεκτρόνια που προέρχονται από αυτή την οξείδωση μεταφέρονται πρώτα με διαλυτά κυτοχρώματα *c*- μέσα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Huston et al. 2007, Cirpus et al. 2005) και στη συνέχεια στην ουβικινόνη (ubiquinone), ακολουθούμενα από το κυτόχρωμα *bc*₁, άλλα κυτοχρώματα *c*- μέσα και τέλος στις nitrite reductase και hydrazine-hydrolase (van Niftrik et al. 2008).



Σχήμα 3.4: Σχηματική απεικόνιση (αριστερά) που αναπαριστά τη δομή των ANAMMOX βακτηρίων και η αντιστοίχιση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας στη μεμβράνη του αναμμοξεισώματος (δεξιά) για την συγκέντρωση της κινητήριας δύναμης πρωτονίου και επακόλουθα τη σύνθεση της ATP. Nir: nitrite reductase (cytochrome *cd*1), hh: hydrazine hydrolase, hao: hydrazine/hydroxylamine oxidoreductase (octaheme cytochrome *c*), cyt: mono or diheme cytochrome *c* electron carriers, bc1: cytochrome *bc*1 complex (complex III), Q: coenzyme Q (ubiquinone). (van Niftrik et al. 2008)

Το παραπάνω μοντέλο σύμφωνα με τους ερευνητές φαίνεται να αντιπροσωπεύει όλα τα γένη των ANAMMOX βακτηρίων. Ήδη, από το 2006 στοιχεία από το είδος *Candidatus K. stuttgartiensis* (Strous et al. 2006) υποδεικνύουν ότι η αντίδραση ANAMMOX πραγματοποιείται μέσω των παρακάτω βημάτων:



Το γονιδίωμα των καλλιιεργειών *K. stuttgartiensis* έχει δείξει ότι το οξειδίο του αζώτου (NO) αποτελεί ένα σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν στο μεταβολισμό των ANAMMOX βακτηρίων και ότι τα βακτήρια έχουν ένα γονίδιο κατάλυσης της αναγωγής νιτρικών όμοιο σε δραστηριότητα με το *nirS* που ενεργοποιείται στην απονιτροποίηση. Η υδραζίνη hydrolase παράγει υδραζίνη (N₂H₄) μέσω του συνδυασμού NO και NH₄⁺. Η υδραζίνη στη συνέχεια οξειδώνεται σε αέριο άζωτο N₂ μέσω μιας hydrazine/hydroxylamine oxidoreductase-πρωτεΐνης (Olivia R. Dale, 2007), η οποία βρίσκεται αποκλειστικά μέσα στο αναμμοξείωμα (Lindsay et al. 2001). Η υδραζίνη αποθηκεύεται στο εσωτερικό του αναμμοξείωματος (Sinninghe Damste et al. 2002) και λόγω του αργού ενζυματικού κύκλου εργασιών έχει ως επακόλουθο ο χρόνος διπλασιασμού για τα βακτήρια του "γλυκού νερού" να ισούται με 9 μέρες, σε ιδανικές συνθήκες, (Strous et al. 1999a, b).

Έχει παρατηρηθεί ότι τα ANAMMOX βακτήρια είναι ευέλικτα όσον αφορά στο μεταβολισμό, εμφανίζοντας εναλλακτικές οδούς. Επίσης παρέχουν τη δυνατότητα παραγωγής N₂O μέσω του μονοξειδίου του αζώτου (Kartal et al. 2007a). Επιπροσθέτως, τα οξείδια του μαγνησίου και του σιδήρου μπορούν να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίου (Strous et al. 2006), επεκτείνοντας την ποικιλία μεταβολισμού των ANAMMOX βακτηρίων. Μία άλλη οδός ακολουθείται από το *Candidatus Anammoxoglobus propionicus*, το οποίο φαίνεται να συν-οξειδώνει προπιονικούς εστέρες και αμμώνιο με αποτέλεσμα να παραγκωνίζει απονιτροποιητικά βακτήρια και άλλα ANAMMOX βακτήρια (Kartal et al. 2007b).

Το γεγονός αυτό πιθανόν εξηγεί την σπάνια συνύπαρξη διαφορετικών ειδών ANAMMOX βακτηρίων και την κυριαρχία συγκεκριμένου είδους ανάλογα με τον τύπο του ενδιαιτήματος. Επιπροσθέτως, τα οξείδια του μαγνησίου και του σιδήρου μπορούν να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίου (Strous et al. 2006), επεκτείνοντας την ποικιλία μεταβολισμού των ANAMMOX βακτηρίων.

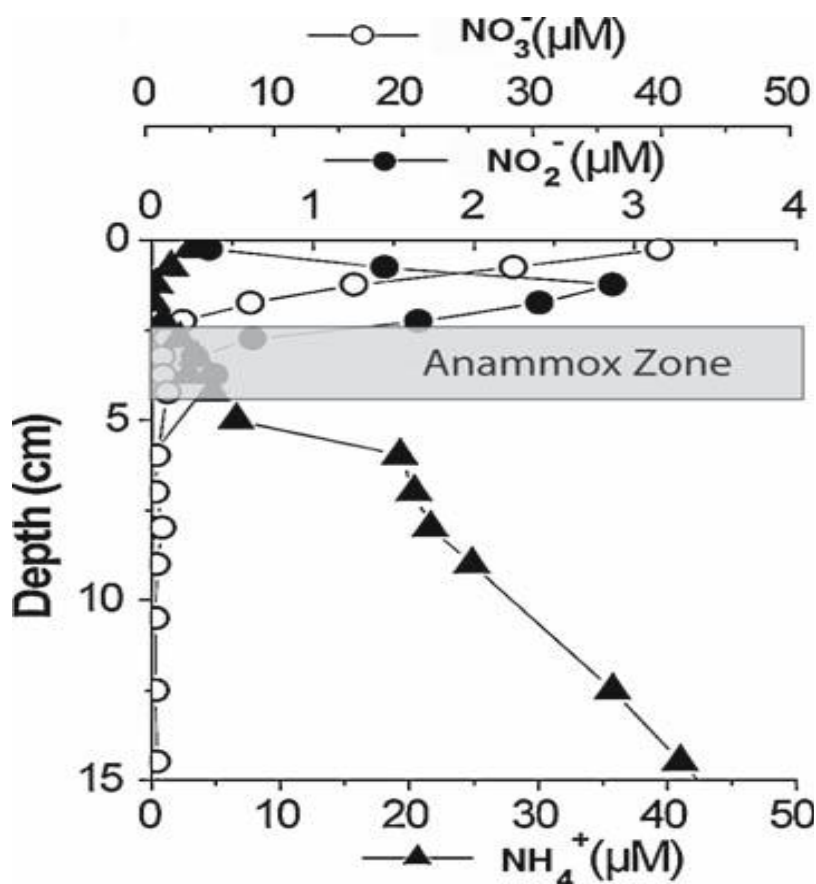
Η βέλτιστη θερμοκρασία για την απρόσκοπτη λειτουργία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας προσδιορίστηκε από ερευνητές για τα διαφορετικά ενδιαιτήματα. Στην περίπτωση επεξεργασίας υγρών λυμάτων εντοπίστηκε στους 37⁰C (Kuenen et al., 2001), ενώ στο φυσικό περιβάλλον σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Αξίζει να αναφερθεί ότι στο ίζημα του Young Sound, Greenland η θερμοκρασία που καταγράφηκε ήταν 12 °C (Rysgaard et al., 2004a) και στο Skagerrak 15 °C (Thamdrup and Dalsgaard, 2002). Επίσης, σημαντικός παράγοντας για τη δραστηριότητα των βακτηρίων αυτών είναι και το οξυγόνο καθώς, τα ANAMMOX βακτήρια αναστέλλουν τη λειτουργία τους στην περίπτωση παρουσίας οξυγόνου, με τρόπο αναστρέψιμο όμως, καθώς ο ρυθμός αντίδρασης επιστρέφει στα πρότερα του αερισμού επίπεδα όταν αυτός διακοπεί (Jetten et al. 1999).

Κεφάλαιο 4: Οι μέθοδοι ανίχνευσης των αναμμοξ βακτηρίων και ο εντοπισμός τους στο περιβάλλον.

4.1 Ανίχνευση του ANAMMOX Βακτηρίου και της δραστηριότητας του

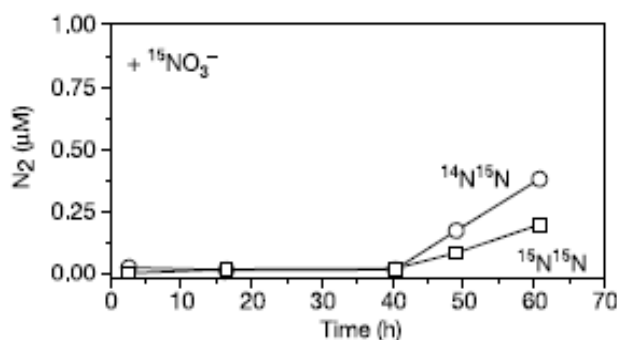
Η τεχνική αντιστοίχισης ισωτόπων, isotope pairing technique (IPT), αποτελεί την πλέον ενδεδειγμένη μέθοδο προσδιορισμού της δραστηριότητας ANAMMOX, συνηθέστερα στην περίπτωση ομογενοποιημένων ιζημάτων (Thamdrup and Dalsgaard, 2002). Πιο συγκεκριμένα, αρχικά προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις NH_4^+ , NO_3^- και NO_2^- , στη συνέχεια τα ιζήματα τοποθετούνται σε αεροστεγή δοχεία σφραγισμένα (septums), και το κενό συμπληρώνεται με ήλιο (He) για τουλάχιστον πέντε λεπτά ούτως ώστε να αντικατασταθεί το υπάρχον οξυγόνο (O_2). Συγκεντρώσεις παραμενόντων NO_x παρακολουθούνται έως ότου όλα τα διαθέσιμα οξείδια του αζώτου εξαλειφθούν από τις επώσεις.

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιούνται τρεις παράλληλες καλλιέργειες–επώσεις: (1) NH_4^+ , (2) NO_2^- και NH_4^+ σε συνδυασμό, και (3) NO_2^- . Οι αντιδράσεις σταματούν με την προσθήκη ZnCl_2 . Η πρώτη επώαση αποσκοπεί στον έλεγχο οποιασδήποτε οξειδωσης του αμμωνίου χωρίς προσθήκη νιτρικών. Η έλλειψη $^{29}\text{N}_2/^{30}\text{N}_2$ είναι ενδεικτική της έλλειψης οξειδωτικών στο τέλος της προ-επώασης. Κατά τη δεύτερη επεξεργασία εξετάζεται η δυνατότητα διεξαγωγής της δραστηριότητας ANAMMOX. Η παραγωγή $^{29}\text{N}_2$ σηματοδοτεί την ύπαρξη της δραστηριότητας αυτής μέσω της οξείδωσης του αμμωνίου με νιτρώδη. Ο συνδυασμός των δύο προαναφερθέντων επώασεων χρησιμοποιείται για την επαλήθευση-διαπίστωση της αναερόβιας οξείδωσης του αμμωνίου. Τέλος, στην τρίτη επώαση υπολογίζεται ο ρυθμός της αναερόβιας οξείδωσης και της απονιτροποίησης (σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1: Τυπικό προφίλ αζώτου στο νερό των πόρων ιζήματος από βαθύ ωκεανό, στο οποίο φαίνεται μια ζώνη αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (C. R. Penton, Anaerobic Ammonium Oxidation).

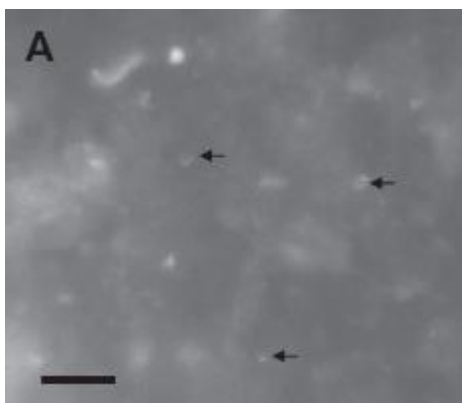
Η αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου παράγει $^{29}\text{N}_2$ κατά την οξείδωση του αμμωνίου με τα προστιθέμενα νιτρώδη, ενώ η απονιτροποίηση προσμετρείται από την παραγωγή $^{30}\text{N}_2$. Ωστόσο, στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου μπορεί επίσης να αναγάγει $^{15}\text{NO}_3^-$ σε $^{15}\text{NO}_2^-$ σε $^{15}\text{NH}_4^+$ (Kartal et al. 2007a), οδηγούν στην πιθανότητα η αντίδραση να μπορεί να συνδυάσει $^{15}\text{NO}_2^-$ με $^{15}\text{NH}_4^+$ και επομένως κάποιο ποσοστό από τη μετρημένη απονιτροποίηση να οφείλεται στην αναερόβια οξείδωση.



Σχήμα 4.2: Επώαση με $^{15}\text{NO}_3^-$. Οι συγκεντρώσεις $^{29}\text{N}_2$ και $^{30}\text{N}_2$ αυξάνουν με το χρόνο. (Dalsgaard et al., 2003).

Κάποιες τροποποιήσεις στο πρωτόκολλο αυτό θα μπορούσαν να επιφέρουν θετικά αποτελέσματα, και ιδιαίτερα η προσθήκη μετρήσεων του N₂O για τον ακριβέστερο προσδιορισμό της παραγωγής N₂, καθώς και η χρήση ανέπαφων πυρήνων των ιζημάτων (Trimmer et al. 2006).

Μοριακές μέθοδοι έχουν αξιοποιηθεί εκτεταμένα για τον εντοπισμό ANAMMOX βακτηρίων σε δείγματα υγρών αποβλήτων ή φυσικού περιβάλλοντος. Η επιτόπου μέθοδος υβριδοποίησης με φθορισμό (Fluorescence in situ hybridization FISH), η οποία στοχεύει στο 16S rRNA, έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον για τη συλλογή ποιοτικών και ποσοτικών δεδομένων. Περιγράφεται αναλυτικά από τους Schmid et al. (2005), όπου μάλιστα αναφέρεται ως ο χρυσός κανόνας για την ανίχνευση των οργανισμών ANAMMOX. Ο ανιχνευτής S-P-Planct-0046-a-A-18 θεωρείται καλή επιλογή για αρχικά πειράματα, ενώ επισημαίνεται ότι ο ανιχνευτής S-P-Planct-0886-a-A-19, ο οποίος κατασκευάστηκε για να ανιχνεύει μέλη των γενών: *Pirellula*, *Gemmata*, *Planctomyces* και *Isosphaera* δεν διασταυρώνεται με τα 16S rRNA των ANAMMOX βακτηρίων, κάτι που συμβαίνει και στην περίπτωση του S-D-Bact-0338-a-A-18. Παράλληλα, θα πρέπει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές οι ανιχνευτές μπορεί να έχουν διαφορετική αποτελεσματικότητα για κάθε γένος.



Σχήμα 4.3: Εντοπισμός ANAMMOX βακτηρίων in situ (σημαδεμένα με βέλη). Δείγμα από τα ιζήματα Gullmarsfjorden S3, 1-2 cm βάθος. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 5 mm. (Schmid et al., 2007).

Μάλιστα, για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας των ANAMMOX βακτηρίων αναπτύχθηκαν δύο προχωρημένες προσεγγίσεις της επιτόπου μέθοδος υβριδοποίησης με φθορισμό (FISH). Η πρώτη, η ISR-FISH, βασίζεται στην παρατήρηση ότι η αναλογία των ριβοσωμάτων δεν μειώνεται σημαντικά σε περιόδους αναστολής ή έλλειψης τροφής (Morgenroth et al. 2000, Schmid et al. 2001, Wagner et al. 1995). Οι συγκεντρώσεις του πρόδρομου rRNA λοιπόν αποτελούν άμεση μέτρηση του ρυθμού ανάπτυξης των ριβοσωμάτων των κυττάρων (Cangelosi et al. 1997) και κατ' επέκταση της δραστηριότητας τους. Η δεύτερη προσέγγιση, η FISH-MAR, σχετίζεται με την πρόσληψη μαρκαρισμένου με ραδιοϊσότοπα υποστρώματος. Αυτή μάλιστα η μέθοδος βοήθησε να αποδειχτεί ότι τα

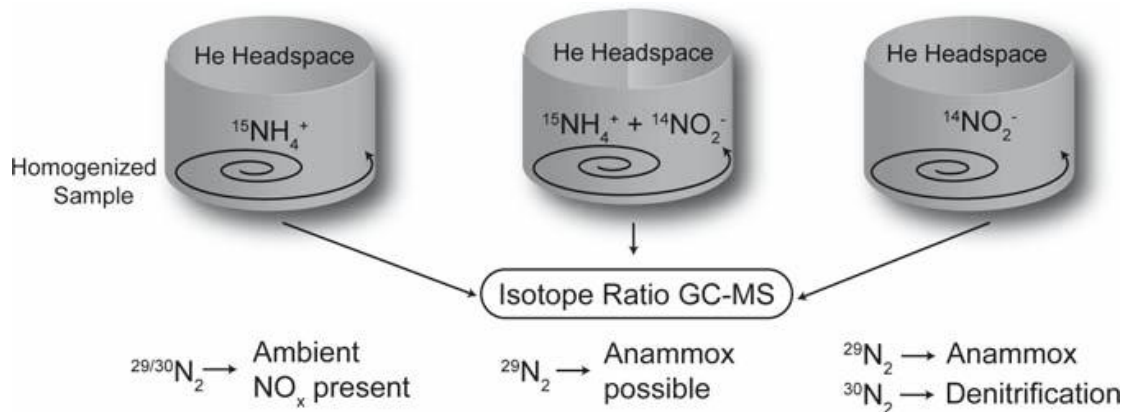
ANAMMOX βακτήρια είναι χημειολιθοαυτότροφα και η βασική τους πηγή άνθρακα είναι το διοξείδιο του άνθρακα (Jetten et al. 1998).

Παράλληλα, τα μοναδικά ladderane λιπίδια, που αποτελούν το αναμμοξείσωμα, έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτες για σχετική ποσοτικοποίηση (Κυργερς et al. 2003), ενώ τα διακριτά hopanoid μπορούν να φανούν χρήσιμα στην αξιολόγηση της σχετικής αφθονίας στο sedimentary record (Sinninghe Damste et al. 2004). Επιπροσθέτως, η δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων προκύπτει άμεσα από τη μέτρηση της κατανάλωσης αμμωνίας και νιτρωδών, σε αναερόβιες συνθήκες και για παρουσία επαρκούς πληθυσμού βακτηρίων (Mulder et al. 1995, Van de Graaf et al. 1995), ή από τη μέτρηση της πίεσης του αερίου αζώτου που παράγεται από την αντίδραση (Dapena–Mora et al. 2003).

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (q-PCR) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για άμεση ποσοτικοποίηση όλων των γνωστών ομοίων με τα ANAMMOX βακτήρια, σε στήλες νερού (Hamersley et al. 2007), σε καλλιέργειες υγρών αποβλήτων (Tsushima et al. 2007) καθώς και για την ακριβή απαρίθμηση του *Candidatus Scalindua* "θαλάσσιου" ANAMMOX βακτηρίου στα ιζήματα.

4.2 Αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας στο περιβάλλον

Η σύνδεση της δραστηριότητας της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας με την απομάκρυνση του εμμένοντος ανόργανου αζώτου στα φυσικά συστήματα επιβεβαιώθηκε πρωτίστως στην υποξική στήλη νερού της Μαύρης Θάλασσας (Κυργερς et al. 2003). Έκτοτε, η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας φαίνεται να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην κατανάλωση του αζώτου, σε μια πληθώρα περιβαλλοντικών συστημάτων, να ευθύνεται για το 19-35% της κατανάλωσης αζώτου σε έναν παραλιακό κόλπο (Dalsgaard et al. 2003) καθώς και για το μεγαλύτερο μέρος της απομάκρυνσης του αζώτου σε μια από τις πιο παραγωγικές ανά τον κόσμο ωκεάνιες περιοχές, τη ζώνη ανάβλυσης με ελάχιστο οξυγόνο Benguela (upwelling oxygen minimal zone) (Κυργερς et al. 2005). Αυτά τα πεδία εμφανίζουν χαρακτηριστικά ζωνών με ελάχιστο οξυγόνο, και φέρονται ως υπεύθυνες για το 30-50% της παγκόσμιας απομάκρυνσης αζώτου (Brandes and Devol 2002). Τα πρώτα στοιχεία για την ύπαρξη αναερόβιας οξείδωσης του αμμωνίου σε ιζήματα (sediments) ή εδάφη παρέχονται από το προφίλ αζώτου του νερού των πόρων. Οι ανοξικές ζώνες, όπου υπάρχει υποδεέστερη μείωση τόσο των νιτρικών/νιτρωδών όσο και του αμμωνίου, αντιπροσωπεύουν τις απαραίτητες αρχικές συνθήκες για τη δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων.



Σχήμα 4.4: Σχεδιάγραμμα της εφαρμογής της τεχνικής αντιστοίχισης ισωτόπων (isotope pairing technique), η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας ANAMMOX και της απονιτροποίησης (C.R. Penton Anaerobic Oxidaton of ammonium).

Το μέγιστο καταγεγραμμένο ποσοστό συνεισφοράς της αναερόβιας οξείδωσης του αμμωνίου είναι 67-79% και αναφέρεται σε ιζήματα βάθους 700m (Engstrom et al. 2005). Το ποσοστό αυτό οδήγησε μάλιστα στην υπόθεση ότι η συνεισφορά της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας αυξάνεται με το βάθος. Ωστόσο, πρόσφατα στοιχεία καταδεικνύουν ότι η αναερόβια οξείδωση ευθύνεται για το 13-51% της συνολικής παραγωγής N_2 σε ιζήματα μεγάλου βάθους ωκεανών (3000m) (C.R. Penton Anaerobic Oxidaton of ammonium).

Το αμμώνιο είναι συνήθως άφθονο σε ανοξικά συστήματα αφού προκύπτει από την οξείδωση της οργανικής ύλης. Η αναγωγή των νιτρικών καθώς και η δράση αερόβιων βακτηρίων (οξείδωση αμμωνίου) παρέχουν τα απαραίτητα νιτρώδη για την αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου. Επομένως, η διαθεσιμότητα οργανικής ύλης αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη συνεισφορά της αναερόβιας οξείδωσης στη συνολική παραγωγή N_2 . Μεγαλύτερη διαθεσιμότητα οργανικής ύλης δημιουργεί μεγαλύτερη απαίτηση για NO_2^- και NO_3^- από τα απονιτροποιητικά βακτήρια, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαθέσιμης ποσότητας NO_2^- για τα ANAMMOX βακτήρια.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα δραματικά μειωμένης συνεισφοράς του ANAMMOX αποτελούν πεδία όπως το υποτροπικό θαμνώδες rhizophora mangle με συνεισφορά 0-9% (Meyer et al. 2005), το δέλτα ποταμού με 8% (Trimmer et al. 2003), και παραλιακά ιζήματα σε κόλπους με ευτροφισμό <2% (Thamdrup and Dalsgaard 2002). Ωστόσο θα πρέπει να τονισθεί ότι δεν έχει αποδειχθεί καμία σταθερή σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της αναερόβιας οξείδωσης και της διαθεσιμότητας της οργανικής ύλης. Επιπροσθέτως, λόγω του αργού ρυθμού ανάπτυξης των ANAMMOX βακτηρίων και της παρεμπόδισης τους από χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 (αν το "θαλάσσιο" βακτήριο ανταποκρίνεται ομοίως με εκείνα του "γλυκού νερού") οι σταθερές συνθήκες του περιβάλλοντος μπορεί να αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για τη δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων (C.R. Penton Anaerobic Oxidaton of Ammonium).

Σχετικά λίγες μελέτες έχουν ερευνήσει την αναερόβια οξείδωση του αζώτου σε φυσικά συστήματα γλυκού νερού, αν και τα βακτήρια του “γλυκού νερού” είναι αυτά που έχουν μονοπωλήσει το ενδιαφέρον εξαιτίας της εφαρμογής τους σε βιοαντιδραστήρες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Αξίζει να αναφερθεί ενδεικτικά ότι τα είδη “*Candidatus Brocadia anammoxidans*”, “*Candidatus Brocadia fulgida*”, “*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*”, “*Candidatus Anammoxoglobus propionicus*”, “*Candidatus Scalindua brodae*” and “*Candidatus Scalindua wagneri*” έχουν ταυτοποιηθεί σε ιλύ ή σε εκροές προερχόμενες από εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Rattray et al. 2008).

Οι Schubert et al. (2006) κατέγραψαν μια συνεισφορά της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας της τάξης του 13%, στη μεγαλύτερη ανοξική λίμνη γλυκού νερού του κόσμου, τη λίμνη Tanganyika, όπου το βακτήριο που εντοπίστηκε ήταν το *Candidatus Scalindua brodae* (>96% sequence identity). Ομοίως, πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση στα νερά του Χινγι ποταμού στην Κίνα, (Zhang et al. 2007), όπου με τη χρήση PCR διαπιστώθηκε ύπαρξη τόσο του είδους *Candidatus Brocadia anammoxidans* (95%) όσο και του *Candidatus Scalindua* (95%) συμπεριλαμβανομένης και της συχνότητας της λίμνης Tanganyika.

Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ποικίλες κοινότητες *anammox* βακτηρίων μπορεί να συνυπάρχουν στα συστήματα γλυκού νερού, σε αντιδιαστολή με τα θαλάσσια συστήματα όπου, σύμφωνα με τις υπάρχουσες μελέτες, εμφανίζεται η επικράτηση ενός μόνο κυρίαρχου είδους (C.R. Penton Anaerobic Oxidation of ammonium). Το είδος “*Candidatus Scalindua sorokinii*” έχει ταυτοποιηθεί σε στήλη νερού προερχόμενη από τη Μαύρη Θάλασσα (Kuypers et al. 2003, Schmid et al. 2003). Από τότε, άλλα συγγενικά του “*Candidatus Scalindua*” έχουν εντοπισθεί σε νερά ωκεανών του υφάλου Namibian και της Περουβιανής Ακτής, τα οποία περιείχαν πάνω από 97% 16S rRNA gene sequence similarity με τα “*Candidatus Scalindua sorokinii*” και “*Candidatus Scalindua brodae*” (Kuypers et al. 2005, Hamersley et al. 2007, Woebken et al. 2007). Βακτήρια ANAMMOX έχουν επίσης ανιχνευθεί σε ιζήματα ποταμών (Risgaard-Petersen et al. 2004, Zhang et al. 2007, Rich et al. 2007) και σε λίμνες (Schubert et al. 2006), ενώ και σε αυτές τις περιπτώσεις το 16S rRNA gene sequence εμφάνισε μεγάλη ομοιότητα με το “*Candidatus Scalindua*”. Επομένως, μόνο στενά συγγενικά είδη με το “*Candidatus Scalindua*” έχει καταγραφεί ότι ζουν σε φυσικά περιβάλλοντα (Schmid et al. 2007).

Αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου στους παγετώνες

Παρόλο που η αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου δεν έχει διερευνηθεί σε παγετώδεις περιοχές, το “θαλάσσιο” *anammox* βακτήριο έχει ταυτοποιηθεί σε παγετώδη αλλουβιακά αμμώδη στρώματα της Μέσης Πλειστόκαινης Εποχής, 300.000-400.000 χρόνια πριν, στην τούνδρα Cape Svaytoi Nos και συγκεκριμένα στην ακτή Laptev Sea (Penton and Tiedje, 2006). Οι Rysgaard and Glud (2004) υπολόγισαν ότι η αναερόβια οξείδωση ήταν υπεύθυνη για το 19% της συνολικής παραγωγής N₂ στους παγετώνες της Θάλασσας της Γροιλανδίας, παρόλο που τα βακτήρια δεν ήταν ανιχνεύσιμα στον πάγο της θάλασσας καθ όλη τη διάρκεια του

έτους, πιθανώς λόγω αυξημένης σταθερότητας. Τόσο η αερόβια όσο και η αναερόβια διεργασία βρέθηκε να συμβαίνουν ταυτόχρονα σε κανάλια άλμης (brine rockets). Το γεγονός αυτό αυξάνει την πιθανότητα η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας να συνεισφέρει στην απομάκρυνση του N_2 σε παγετώδη εδάφη.

Εξαιτίας της χρήσης του N_2O ως σύνηθες μέτρο για την απονιτροποίηση και τη νιτροποίηση σε μόνιμα παγετώδη εδάφη, η συνεισφορά του $ANAMMOX$ στην απώλεια του αζώτου παραμένει αίνιγμα. Ο Ma και οι συνεργάτες του, το 2007, ανέφεραν ότι η μείωση των συγκεντρώσεων της αμμωνίας μπορεί να μην σχετίζονται με την παραγωγή του υποξειδίου του αζώτου στα μόνιμα παγετώδη εδάφη του Καναδά. Η πρόσληψη από τα φυτά καταγράφηκε ως πιθανή αιτία, παρόλο που σημειώθηκε ότι μια συνακόλουθη αναγωγή των νιτρικών δεν παρατηρήθηκε. Η διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης αποτελεί μια πιθανή εξήγηση για την απορρόφηση της αμμωνίας που δεν καταγράφεται στις εκπομπές του N_2O . Την παρουσία ενεργών νιτροποιητικών βακτηρίων σε χαμηλές αλλά μετρήσιμες συγκεντρώσεις O_2 στον πάγο του Vostok συμπέρανε ο Sowers το 2001, ενώ ένα νέο, προσαρμοσμένο σε χαμηλές θερμοκρασίες, βακτήριο ικανό να οξειδώνει νιτρικά ιόντα απομονώθηκε από δείγμα των πάγων της Σιβηρίας (Alawi et al, 2007). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, "μικροπεριοχές" με αναερόβιες συνθήκες και η αργή μεταφορά νερού, σε συνδυασμό με την μικρή διαθεσιμότητα οργανικής ύλης αποτελούν ιδανικές συνθήκες για τα $ANAMMOX$ βακτήρια ώστε να ανταγωνιστούν τα απονιτροποιητικά βακτήρια για τα διαθέσιμα NO_2^- στους πάγους. Εάν η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας όντως συμβάλλει στην απώλεια του αζώτου στα "κανάλια άλμης" του πάγου, τότε η ευστάθεια του συστήματος είναι ο καθοριστικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα σε μια ετήσια ή εκτεταμένη τάση υπερθέρμανσης.

Το λιώσιμο των πάγων αυξάνει την δραστηριότητα και την ανάμειξη του νερού, με αποτέλεσμα την αυξημένη διαθεσιμότητα O_2 η οποία και θεωρητικά θα πρέπει να επιδρά αρνητικά στη αναερόβια κοινότητα του $ANAMMOX$. Η "εκρηκτική αύξηση της μικροβιακής μάζας" που ακολουθεί το λιώσιμο των πάγων (Vorobyova et al. 1997), με υψηλή διαθέσιμη οργανική ύλη και χωρίς περιορισμούς στην ανοργανοποίηση (Uhlirva et al. 2007) θα μπορούσε να οδηγήσει στον ανταγωνισμό για διαθέσιμο NO_2^- από τα απονιτροποιητικά βακτήρια.

Ωστόσο η χρήση μεθόδων μέτρησης $15N$ isotopic, όπως παραλλαγές της τεχνικής αντιστοίχισης ισοτόπων (isotope pairing technique) και μοριακές μέθοδοι, είναι απαραίτητες για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας και ανταπόκρισης του $ANAMMOX$ καθώς και της κοινότητας του κύκλου του αζώτου ως ολότητα, στις αλλαγές του οικοσυστήματος.

Κεφάλαιο 5: Παράγοντες που επιδρούν στη λειτουργία του ANAMMOX

5.1 Εισαγωγή

Έγινε σαφές από όσα έχουν ήδη αναφερθεί ότι η διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας διαδραματίζει έναν περισσότερο ή λιγότερο σημαντικό ρόλο συγκριτικά με αυτόν της απονιτροποίησης. Βέβαια είναι αδύνατο να εξαχθεί ένας γενικός κανόνας για τη συνεισφορά του ANAMMOX σε διαφορετικά συστήματα, καθώς υπάρχουν λίγα στοιχεία προς το παρόν. Ωστόσο υπάρχουν ορισμένοι καθοριστικοί παράγοντες που επιδρούν στη λειτουργία και τη δράση των ANAMMOX βακτηρίων, οι οποίοι μπορούν να προσδιοριστούν.

Η ανοργανοποίηση της οργανικής ύλης αποτελεί την κύρια πηγή NO_2^- και επομένως το περιεχόμενο της οργανικής ύλης στα ιζήματα αποτελεί μείζονος σημασίας παράμετρο στην περίπτωση των υδατικών οικοσυστημάτων για τη διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας. Συνήθως η ποσότητα της οργανικής ύλης που φτάνει στα ιζήματα των συστημάτων αυτών μειώνεται με την αύξηση του βάθους και αυτό οφείλεται στην αργή καταβύθιση των σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη απόσταση διανύει η οργανική ύλη κατά την καταβύθισή της, τόσο περισσότερες είναι οι πιθανότητες της ανοργανοποίησής της προτού φτάσει στα στρώματα του πυθμένα (Martin Hertach 2008).

Τόσο η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας όσο και η απονιτροποίηση διεξάγονται από μικροοργανισμούς και επομένως εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Στο περιβάλλον όπως έχει προαναφερθεί, για τα ANAMMOX βακτήρια η βέλτιστη θερμοκρασία μπορεί να είναι αρκετά χαμηλή $12^\circ - 15^\circ \text{C}$, συγκριτικά με τα απονιτροποιητικά βακτήρια $25^\circ - 30^\circ \text{C}$ (Saad et al., 1993). Το γεγονός αυτό βοηθά ιδιαίτερα τα ANAMMOX βακτήρια ως προς τον ανταγωνισμό τους με τα απονιτροποιητικά, σε κρύο περιβάλλον. Αυτό μάλιστα θα μπορούσε να εξηγήσει και τα αυξημένα ποσοστά συνεισφοράς της απονιτροποίησης σε μεγάλα βάθη νερού, παρόλο που ο απόλυτος ρυθμός της αναερόβιας οξείδωσης μειώνεται. Αξίζει να αναφερθεί ο υπολογισμός των Dalsgaard et al. (2005) σύμφωνα με τον οποίο στην αναερόβια οξείδωση οφείλεται το 1/3 έως και το 1/2 της συνολικής θαλάσσιας απομάκρυνσης του αζώτου.

Πίνακας 5.1: Σύγκριση τριών δειγμάτων για την παρουσία και τη συνεισφορά της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, σε ιζήματα διαφορετικού βάθους, Thamdrup and Dalsgaard (2002)

τοποθεσία	Βάθος [m]	Σχετική συνεισφορά anammox [%]	Απόλυτος ρυθμός anammox [$\text{nmol cm}^{-3} \text{h}^{-1}$]
Coastal bay	16	2	2.2
Skagerrak S6	380	24	2.5
Skagerrak S9	695	67	1.0

Όσον αφορά στην παρουσία οξυγόνου, αυτή αποτελεί έναν ιδιαίτερα περιοριστικό παράγοντα για τη δράση των ANAMMOX βακτηρίων. Μάλιστα, σε οξικές συνθήκες το αμμώνιο οξειδώνεται από το οξυγόνο σε νιτρικά και παράλληλα η αναερόβια διεργασία αναστέλλεται πλήρως.

Οι κυριότεροι παράγοντες λοιπόν που έχουν μελετηθεί παρουσιάζονται στο κεφάλαιο αυτό με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από πειραματικές και πιλοτικές εφαρμογές της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας.

5.2 Θερμοκρασία

Αρκετά είδη υγρών αποβλήτων χαρακτηρίζονται από χαμηλή αναλογία άνθρακα/άζωτο και πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν τα υγρά απόβλητα που προέρχονται από τις βιομηχανίες λιπασμάτων, εκρηκτικών και φαρμάκων (Wiesmann , 1994).

Αρκετοί ερευνητές αναφέρουν πως το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας για την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας αντιστοιχεί στους 30-40° C (Strous et al. 1999, K. Egli et al. 2001, Y. Yang et al. 2006, S.K. Toh et al. 2002). Ίσως και αυτός είναι ο λόγος που οι περισσότερες πειραματικές εφαρμογές διεξήχθησαν σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 30° C (U. Van Dongen et al. 2001, M. Strous et al. 1997, M. Strous et al. 1998, U. Imajo et al. 2004). Ωστόσο οι Cema et al. 2007 απέδειξαν ότι ένας rotating biological contactor (RBC) με τη μέθοδο ANAMMOX θα μπορούσε να λειτουργήσει επιτυχώς σε θερμοκρασίες γύρω στους 20° C.

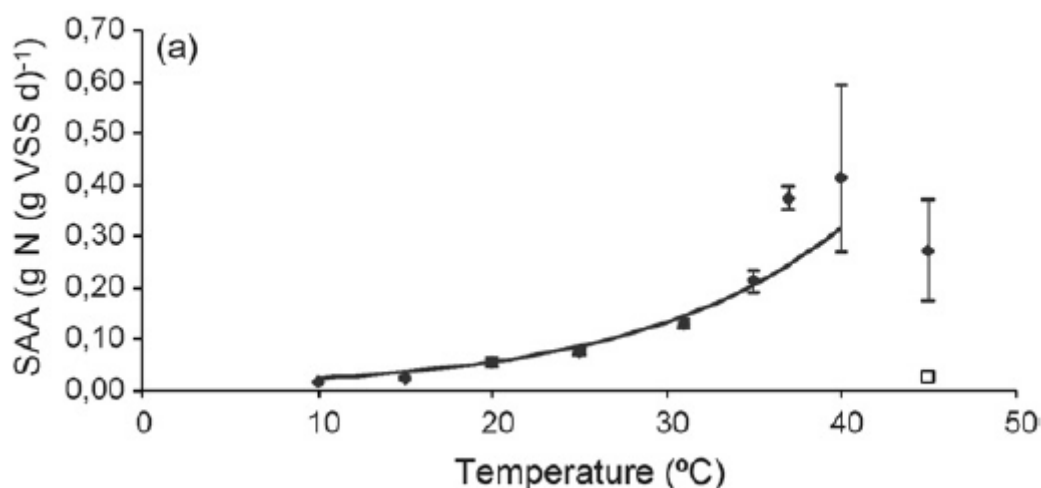
Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και από τους Isaka et al. 2007 οι οποίοι χειρίστηκαν ένα αναερόβιο βιολογικό φιλτραρισμένο αντιδραστήρα (ABF) με φορτίο 8.1 g N (Ld)⁻¹. Επιπλέον αρκετές μελέτες που πραγματεύτηκαν δείγματα με "θαλάσσια" ANAMMOX βακτήρια επέδειξαν μετρήσιμες δραστηριότητες σε χαμηλές θερμοκρασίες. Οι Rysgaard et al. 2004 εργάστηκαν με ιζήματα των ανατολικών και δυτικών ακτών της Γροιλανδίας και παρατήρησαν δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων σε θερμοκρασίες από -2 έως 30° C, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν οι 12° C. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και από τους Dalsgaard and Thamdrup 2002 , οι οποίοι ασχολήθηκαν με ιζήματα από το Skagerrak (Baltic-North Sea). Αυτά λοιπόν τα συμπεράσματα επιδεικνύουν ότι η εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας θα μπορούσε να μην περιορίζεται σε εκροές με θερμοκρασίες γύρω στους 30° C.

Οι J. Dosta et al. 2007 πραγματοποίησαν πειράματα σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου συνεχούς λειτουργίας χωρητικότητας 1L ώστε να καταγράψουν τις βραχυπρόθεσμες, καθώς και τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της θερμοκρασίας στη σταθερότητα της διεργασίας. Το pH ρυθμίστηκε και κυμάνθηκε μεταξύ 7 και 8 και ο αντιδραστήρας ρυθμίστηκε ώστε να λειτουργεί σε κύκλους των 6 ωρών διαχωρισμένους σε τέσσερις περιόδους, ενώ ο υδραυλικός χρόνος παραμονής ήταν μία ημέρα. Χρησιμοποιήθηκε συνθετικό μέσο και η αναλογία νιτρικών/αμμωνίας ήταν 1, ενώ το NLR ήταν σταθερό και ίσο με 0.3 g N (Ld)⁻¹. Η βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε βιοφίλμ καθώς και σε κοκκώδη μορφή και

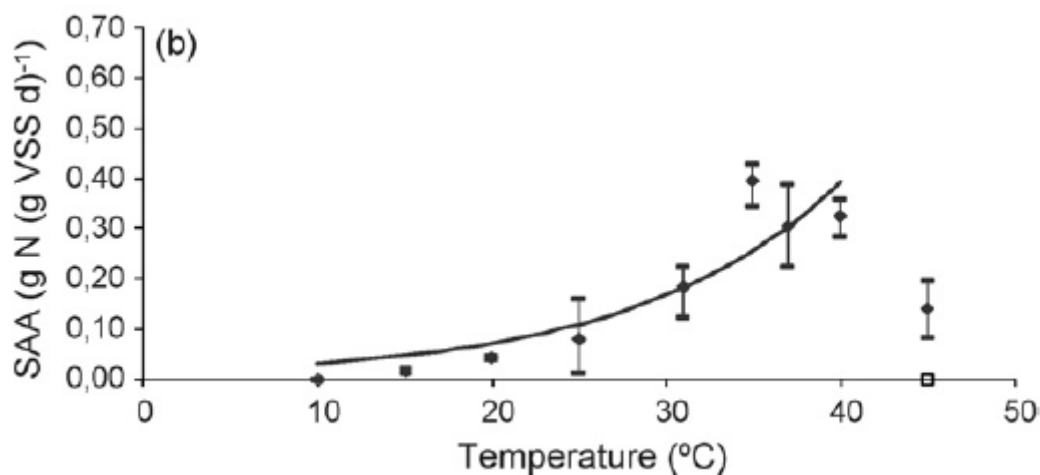
εμπλουτίστηκε με βακτήρια του είδους *Kuenenia stuttgartiensis*. Η θερμοκρασία του αντιδραστήρα μειώθηκε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος από 45 σε 10° C.

Για τον προσδιορισμό των βραχυπρόθεσμων επιπτώσεων της θερμοκρασίας στη βιομάζα και για τον έλεγχο της λειτουργίας του αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκαν Specific Anammox Activity (SAA) tests. Μια εκθετική αύξηση του SAA παρατηρήθηκε για τις θερμοκρασίες πάνω από 40° C, ενώ αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στους 45° C παρουσίασαν αρνητική επίπτωση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων.

Η ενέργεια ενεργοποίησης που υπολογίστηκε σύμφωνα με το τροποποιημένο μοντέλο Arrhenius ήταν 63 kJ mol⁻¹, τιμή που προσεγγίζει κατά πολύ την τιμή των Strous et al. 1999 (70 kJ mol⁻¹), στους 30° C. Οι αντίστοιχες τιμές για βιομάζα ANAMMOX από θαλάσσια ιζήματα, σύμφωνα με τα ευρήματα των Dalsgaard και Thamdrup 2002 καθώς και των Rysgaard et al. 2004 ήταν 61 και 51 kJ mol⁻¹ αντίστοιχα.



Σχήμα 5.1: Το προφίλ της Special Anammox Activity συναρτήσει της θερμοκρασίας για την κοκκώδη βιομάζα, J. Dosta et al. 2007.



Σχήμα 5.2: Το προφίλ της Special Anammox Activity συναρτήσει της θερμοκρασίας για την βιομάζα σε βιοφίλμ, J. Dosta et al. 2007.

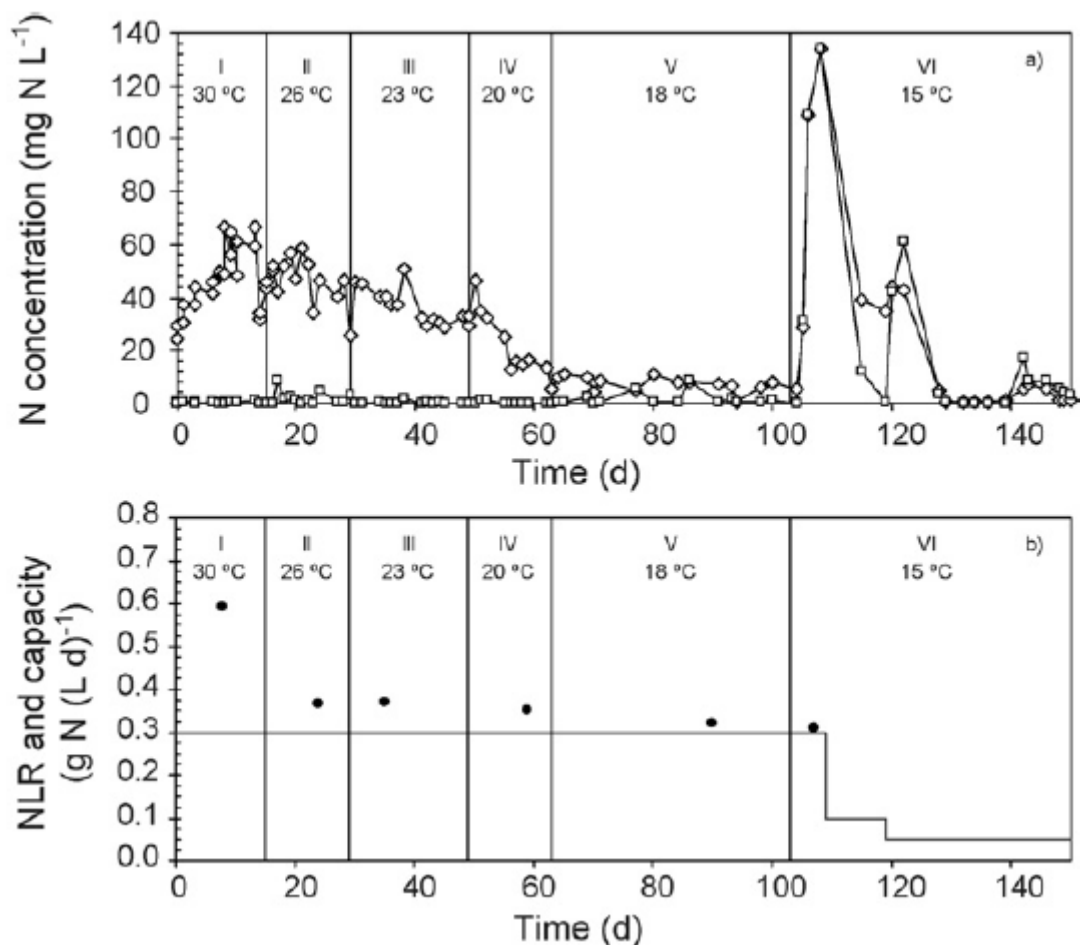
Αξίζει να σημειωθεί ότι στα πειράματα που έγιναν σε θερμοκρασία 45° C, η υγρή φάση απέκτησε ένα πορτοκαλί χρωματισμό, γεγονός που θα μπορούσε να σηματοδοτεί τη διάλυση της βιομάζας. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν μετά από ακόλουθη τροφοδότηση των βακτηρίων δεν καταγράφηκε καμία δραστηριότητα. Η αρνητική επίδραση της υψηλής θερμοκρασίας επίσης καταγράφηκε από τους Toh et al. 2002.

Όσον αφορά στις μακροπρόθεσμες επιδράσεις της θερμοκρασίας στη διεργασία, η βιομάζα προοδευτικά υποβλήθηκε σε χαμηλότερες θερμοκρασίες αφού η απότομη αλλαγή στις συνθήκες λειτουργίας θα οδηγούσε σε αποσταθεροποίηση του συστήματος (B. Szatkowska et al. 2006). Το παρακάτω διάγραμμα στο οποίο κατέληξαν οι J.Dosta et al. δείχνει τις συγκεντρώσεις NH_4^+ -N και NO_2^- -N στην εκροή. Τα νιτρώδη, τα οποία και αποτελούσαν την περιορισμένη ουσία υποστρώματος, φαίνεται να εξαντλούνται έως ότου η θερμοκρασία μειωθεί από 18 σε 15° C. Στους 15° C το σύστημα δεν κατάφερε να αφαιρέσει όλα τα νιτρώδη και έτσι ακολούθησε συσσώρευση.

Το γεγονός αυτό οδήγησε και στην πλήρη αστοχία του συστήματος αφού τα νιτρώδη ακόμα και σε μέτριες συγκεντρώσεις αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για τα ANAMMOX βακτήρια (C. Fux et al.2004, J.Y. Jung et al.2007). Για παράδειγμα, επαναλαμβανόμενη εισροή συγκεντρώσεων υψηλότερων από 30 mg NO_2^- -N / L οδήγησαν σε μείωση της δραστηριότητας των ANAMMOX βακτηρίων, ενώ συγκέντρωση 60 mg NO_2^- -N / L οδήγησε σε μείωση κατά 25% της μέγιστης δυνατότητας απομάκρυνσης αζώτου. Οι συγκεντρώσεις αυτές μάλιστα επέφεραν μη αναστρέψιμες επιπτώσεις στο σύστημα, αφού μετά την μείωση των συγκεντρώσεων δεν ήταν δυνατή η πλήρης ανάκαμψη (Bettazzi et al. 2009).

Το σύστημα απέκτησε εκ νέου μια πολύ μικρότερη ωστόσο δυνατότητα απομάκρυνσης αζώτου, της τάξης των 0.05 g N (Ld)⁻¹, όταν το NLR μειώθηκε. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να σηματοδοτεί την μη αναστρέψιμη απώλεια δραστηριότητας λόγω του συνδυασμού χαμηλής θερμοκρασίας και της παρουσίας αυξημένης συγκέντρωσης νιτρωδών.

Η συμπεριφορά του συστήματος απεικονίζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση των συγκεντρώσεων των NH_4^+ και NO_2^- , με την απότομη αλλαγή κλίσης της καμπύλης στο πρώτο διάγραμμα του σχήματος 5.3, κατά το πέρασμα στην VI φάση την 100^η ημέρα, όπου η θερμοκρασία μειώθηκε στους 15° C.

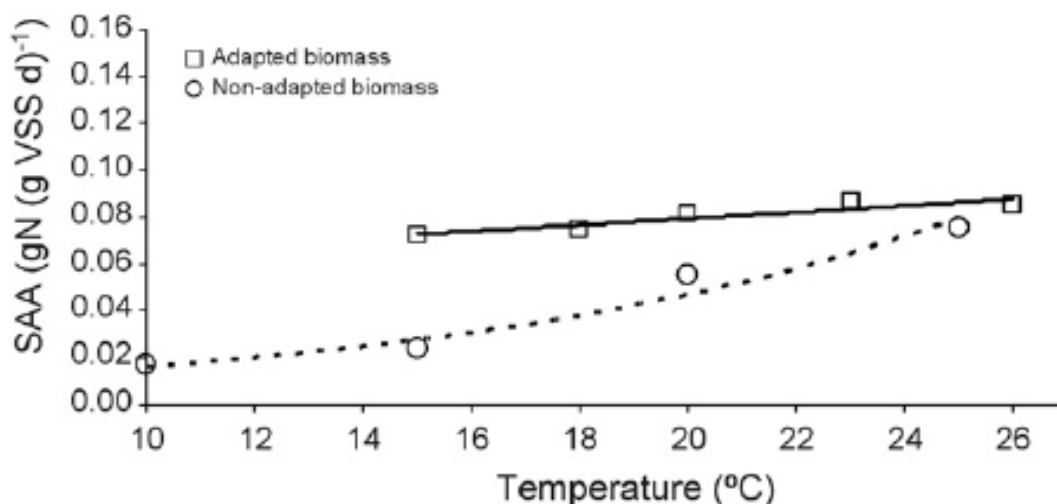


Σχήμα 5.3: Συγκεντρώσεις NH₄⁺-N (◊) και NO₂⁻-N (◻) στην εκροή , στο πρώτο διάγραμμα, και NLR (-) και μέγιστη δυνατότητα αφαίρεσης αζώτου (●) , J. Dosta et al. 2007.

Όπως φαίνεται από το δεύτερο διάγραμμα του σχήματος 5.3 (J.Dosta et al.2007), η μέγιστη δυναμικότητα του συστήματος μειώθηκε κατά την περίοδο διενέργειας του πειράματος, αν και η μείωση αυτή ήταν πολύ μικρή κατά τη μετάβαση από τους 20 στους 18° C.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν πάντα σταθερή, η δυναμικότητα του συστήματος είναι άμεσα συνδεδεμένη με την μείωση του SAA. Ο ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου στους 20° C ήταν αρκετά μικρότερος από τον αντίστοιχο ρυθμό που κατέγραψαν οι Isaka et al. 2007, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγηθεί από τη μεγάλη συγκέντρωση βιομάζας του συστήματός τους (20 g SS L⁻¹).

Το σχήμα 5.4 δείχνει τις τιμές για το SAA τόσο για την "μη-εγκλιματισμένη" βιομάζα βιοφίλμ σε διαφορετικές θερμοκρασίες καθώς και τις τιμές που προέκυψαν κατά τη λειτουργία του αντιδραστήρα. Παρατηρείται ότι όχι μόνο οι τιμές SAA για την προσαρμοσμένη βιομάζα είναι μεγαλύτερες, αλλά επίσης η φθίνουσα τάση είναι αρκετά πιο μικρή από ότι στην περίπτωση της "μη-εγκλιματισμένης" βιομάζας.



Σχήμα 5.4: SAA της μη-εγκλιματισμένης (○) και της εγκλιματισμένης (□) βιομάζας ANAMMOX σε βιοφίλμ, J. Dosta et al. 2007.

Επομένως η αργή προσαρμογή της λάσπης των ANAMMOX βακτηρίων φαίνεται να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για το χειρισμό του ANAMMOX αντιδραστήρα σε χαμηλές θερμοκρασίες.

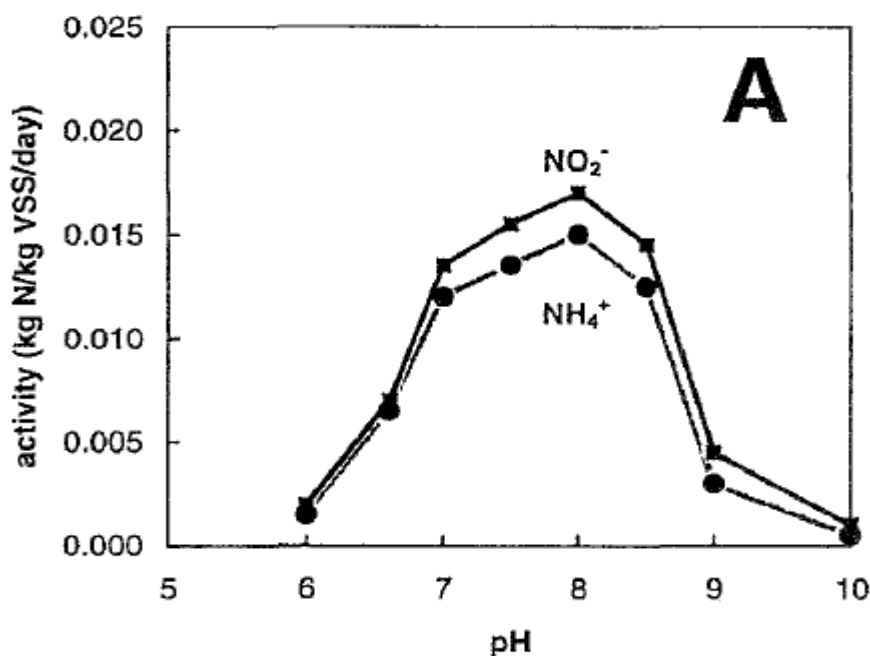
Λαμβάνοντας υπόψη τον πολύ αργό ρυθμό ανάπτυξης της βιομάζας ANAMMOX, η προτεινόμενη στρατηγική για την έναρξη της λειτουργίας συστήματος σε χαμηλές θερμοκρασίες περιλαμβάνει δύο βήματα, σύμφωνα πάντα με τους J.Dosta et al. Σε πρώτο στάδιο θα πρέπει να λάβει χώρα η παραγωγή της απαιτούμενης ποσότητας βιομάζας σε ξεχωριστό αντιδραστήρα και σε θερμοκρασία παραπλήσια της βέλτιστης. Σε δεύτερη φάση θα πρέπει να ακολουθήσει η αργή προσαρμογή της βιομάζας σε χαμηλές θερμοκρασίες, στον ίδιο αντιδραστήρα. Σε αυτό το σημείο λοιπόν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός του αντιδραστήρα χαμηλής θερμοκρασίας.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η αναλογία κατανάλωσης NO_2^- -N προς NH_4^+ -N ήταν 1.38 ± 0.10 αρχικά, ενώ στους 18°C μειώθηκε στο 1.05 ± 0.01 , γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί σε μια αλλαγή στο μεταβολισμό των ANAMMOX βακτηρίων λόγω των πιέσεων του περιβάλλοντος (B. Kartal et al. 2007, I. Fernandez et al. 2007, B. Kartal et al. 2006). Ωστόσο στην επιτόπου μέθοδος υβριδοποίησης με φθορισμό (FISH) ανάλυση δεν διαπιστώθηκαν ποιοτικές μεταβολές στους βακτηριακούς πληθυσμούς που υπήρχαν στη λάσπη κατά τη διάρκεια του πειράματος, ενώ παράλληλα τα φυσικά χαρακτηριστικά της βιομάζας ANAMMOX παρέμειναν σχεδόν σταθερά (SVI 58 mL / g VSS και μέση διάμετρος 1.35 mm).

5.3 pH

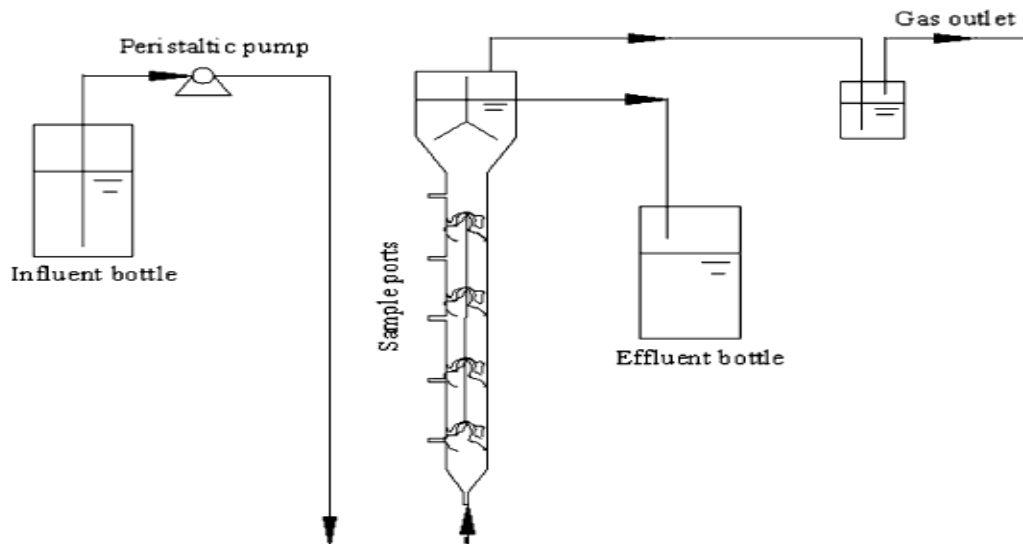
Το pH αποτελεί έναν ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα ελέγχου κατά τη διάρκεια λειτουργίας ενός βιοαντιδραστήρα ANAMMOX.

Η επίδραση του pH στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας μελετήθηκε αρχικά από τους Strous et al. 1997, μέσω πειραμάτων διαλείποντος έργου για την περίπτωση λυμάτων από την χώνευση λάσπης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η SAA σε pH 9 ήταν ίση με το 1/5 της αντίστοιχης τιμής για pH 8 όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.5 που ακολουθεί.



Σχήμα 5.5 ANAMMOX activity σε λύματα χώνευσης λάσπης συναρτήσεϊ του pH. Strous et al. 1997

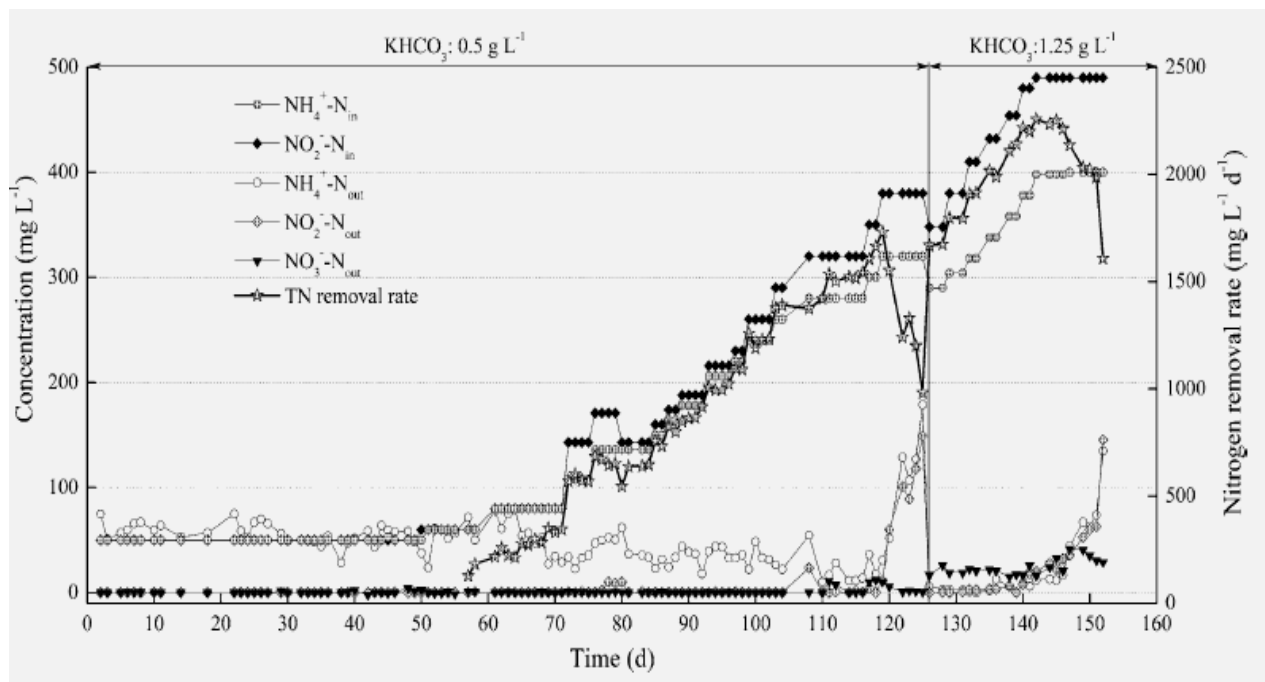
Το 2009 οι Chong-jian Tang et al. δημοσίευσαν τη μελέτη τους όπου εξετάστηκε η επίδραση του pH καθώς και της ελεύθερης αμμωνίας στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε αναερόβια ιλύς που περιείχε γένη της τάξης Planctomycete και η οποία είχε επίσης χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν επιτυχώς για την έναρξη λειτουργίας αντιδραστήρων ANAMMOX (Strous M et al. 1997, Schmidt JE et al. 2004, Rynaert K et al. 2004, Yang Q et al. 2007, Imajo U et al. 2004, Jianlong and Jing 2005). Ο αντιδραστήρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου αντιδραστήρα ανοδικής ροής με βιοφιλμ, (upflow biofilm reactor, UBF), όγκου 1.1 L και καλυπτόταν με μαύρο πανί κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος για την αποφυγή επίδρασης του φωτός. Το pH εισόδου ρυθμίστηκε στο εύρος 6.8-7.0, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής ορίστηκε στις 9.1 h και η θερμοκρασία στους $35 \pm 1^{\circ} \text{C}$.



Σχήμα 5.6: Σχηματική αναπαράσταση του ANAMMOX upflow biofilm reactor ,Chong-jian Tang et al. 2009

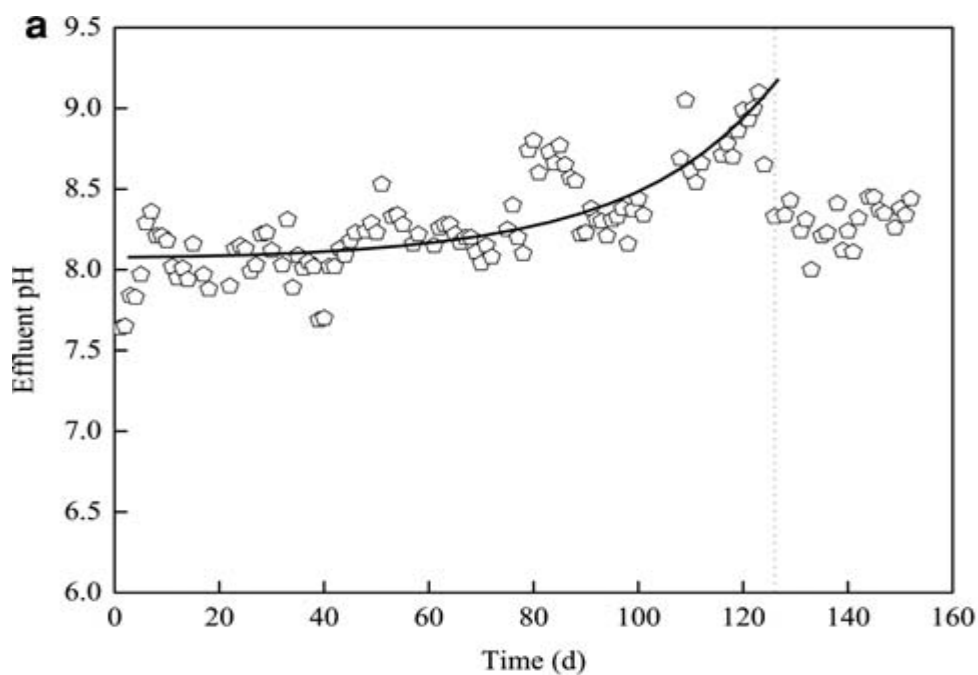
Μόλις καταγράφηκε ANAMMOX δραστηριότητα στο βιοαντιδραστήρα το φορτίο αζώτου, nitrogen loading rate (NLR), άρχισε να αυξάνεται με μοριακά ισοδύναμες ποσότητες NH_4^+ -N και NO_2^- -N, κάθε 2-4 ώρες. Το pH της εισροής ρυθμίστηκε αυστηρά στο 6.8 κατά την περίοδο έναρξης της λειτουργίας του αντιδραστήρα. Τις ημέρες που προηγήθηκαν της καταγραφής της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, το pH της εκροής κυμαινόταν 7.8 - 8.3, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην απονιτροποίηση. Στη συνέχεια όμως, όταν έλαβε χώρα η διεργασία ANAMMOX το pH της εκροής αυξήθηκε ανάλογα και με την αύξηση του NLR και του NRR.

Όπως απεικονίζεται και στο παρακάτω σχήμα 5.7, μια φάση αναστολής της λειτουργίας των ANAMMOX βακτηρίων παρουσιάζεται τις ημέρες 119-125 κατά τις οποίες η εισροή αυξήθηκε σε 320 και 380 mg l^{-1} για το NH_4^+ -N και NO_2^- -N αντίστοιχα. Η εκροή επίσης αυξήθηκε σε 179 και 149 mg l^{-1} καθώς τα ποσοστά απομάκρυνσης αμμωνιακών, νιτρικών και ολικού αζώτου καταγράφηκαν ίσα με 44, 61 και 53% αντίστοιχα.



Σχήμα 5.7 Προφίλ του ρυθμού απομάκρυνσης αζώτου κατά τη διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα.,Chong-jian Tang et al 2009.

Ταυτόχρονα, όπως διαπιστώνεται και από το διάγραμμα που ακολουθεί, σχήμα 5.8, το pH της εκροής κυμάνθηκε από 8.7 σε 9.1, γεγονός που προκλήθηκε από την εφαρμογή NLR μεγαλύτερου από $1200 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Οι τιμές αυτές υπερέβησαν το βέλτιστο για την ANAMMOX διεργασία εύρος (6.7-8.3) (Strous et al. 1999) και επομένως προκάλεσαν την αναστολή της λειτουργίας των βακτηρίων.

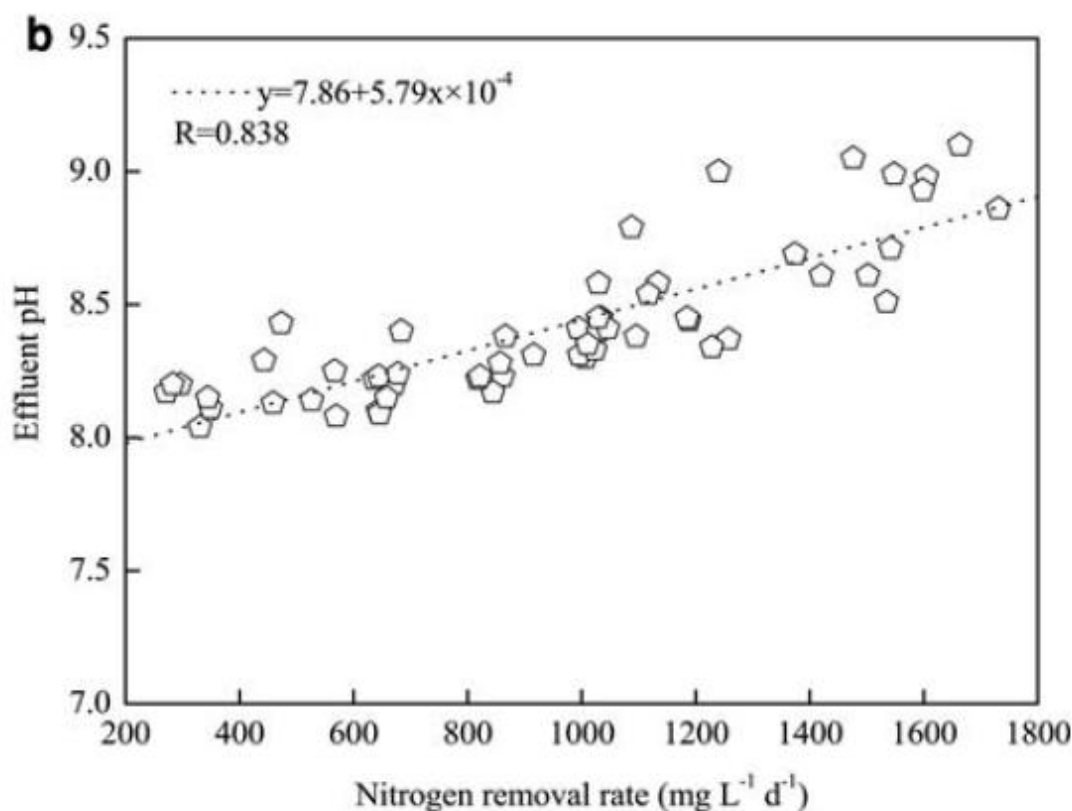


Σχήμα 5.8 Προφίλ του pH της εκροής κατά τη διάρκεια της λειτουργίας, Chong-jian Tang et al. 2009

Το φαινόμενο της σημαντικής αύξησης του pH στην εκροή των βιοαντιδραστήρων ANAMMOX έχει επίσης καταγραφεί από τους Liu et al. 2008. Μάλιστα οι Szatkowska et al. 2007 στήριξαν την υπόθεση ότι η διεργασία ANAMMOX μπορεί να αυξάνει το pH έως ένα σημείο λόγω της κυτταρικής σύνθεσης.

Ωστόσο οι Strous et al. 1998 ανέφεραν ότι η αύξηση του pH σε αντιδραστήρα διακοπτόμενου έργου (SBR) δεν ήταν μεγάλη ενώ οι Chamchoi and Nitisoranut 2007 έδειξαν ότι οι τιμές του pH της εκροής ήταν πάντα μεταξύ 7.7 και 8.4, εύρος λίγο μικρότερο από αυτό της εισροής.

Υπάρχουν αρκετοί λόγοι στους οποίους θα μπορούσε να αποδοθεί η αύξηση του pH στους αντιδραστήρες ANAMMOX (Chong-jian Tang et al. 2010). Πρώτον, λαμβάνοντας υπόψη την στοιχειομετρία της αντίδρασης ANAMMOX 0.13 mol H^+ καταναλώνονται όταν 1 mol αμμωνιακών μετατρέπεται. Οι Van de Graaf et al. 1996 προέβλεψαν ότι 0.09 mol OH^- παράγονται κατά την κατανάλωση 1 mol αμμωνιακών. Η κατανάλωση οξέων λοιπόν οδηγεί σε αύξηση του pH (Liu ST et al. 2008). Μάλιστα η γραμμική σχέση μεταξύ του pH της εκροής και του ρυθμού απομάκρυνσης αζώτου υποδεικνύει ότι αυτή η λειτουργία μπορεί να αποτελεί και τον κύριο λόγο αύξησης του pH στη διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας.



Σχήμα 5.9: Σχέση μεταξύ του pH και του ρυθμού απομάκρυνσης αζώτου, Chong-jian Tang et al. 2009

Παράλληλα όμως με την αύξηση του pH, οι Chong-jian Tang et al. 2009 κατέγραψαν και μια συνεπακόλουθα υψηλή συγκέντρωση ελεύθερης αμμωνίας, σύμφωνα και με την εξίσωση:

$$FA \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{17}{14} \times \frac{\sum NH_4^+ - N(\text{mgL}^{-1}) \times 10^3}{(k_b/k_w) + 10^{pH}}$$

όπου $k_b/k_w = e^{6344/(273+T(o C))}$, (Ganigue R. Et al. 2007).

Η ελεύθερη αμμωνία έχει τοξική δράση στις αναβολικές και καταβολικές διεργασίες των μικροοργανισμών (Vadivelu VM et al. 2006). Οι Waki et al. 2007 εκτίμησαν ότι η ελεύθερη αμμωνία σε συγκεντρώσεις 13-90 mg/L θα μπορούσε να έχει αρνητική επίδραση στην επίδοση των ANAMMOX βακτηρίων. Ο ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου ήταν όντως χαμηλότερος από το μισό του αντίστοιχου ρυθμού ενός αντιδραστήρα με ελεγχόμενη συγκέντρωση ελεύθερης αμμωνίας, όπου η τιμή της δεν υπερέβη τα 21mg/L.

Συμπερασματικά λοιπόν, οι Chong-jian Tang et al. 2009 κατέληξαν στην παρατήρηση ότι το υψηλό pH (8.7 - 9.1) και η συνεπακόλουθη υψηλή συγκέντρωση ελεύθερης αμμωνίας (64-73 mg/L) συνέβαλαν από κοινού στην επιδείνωση της επίδοσης της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στο στάδιο αυτό του πειράματος το pH και η ελεύθερη αμμωνία μειώθηκαν στις επιθυμητές τιμές με την προσθήκη $KHCO_3$, ωστόσο το σύστημα δεν ανέκαμψε πλήρως.

5.4 Διαλυμένο οξυγόνο και αλκαλικότητα

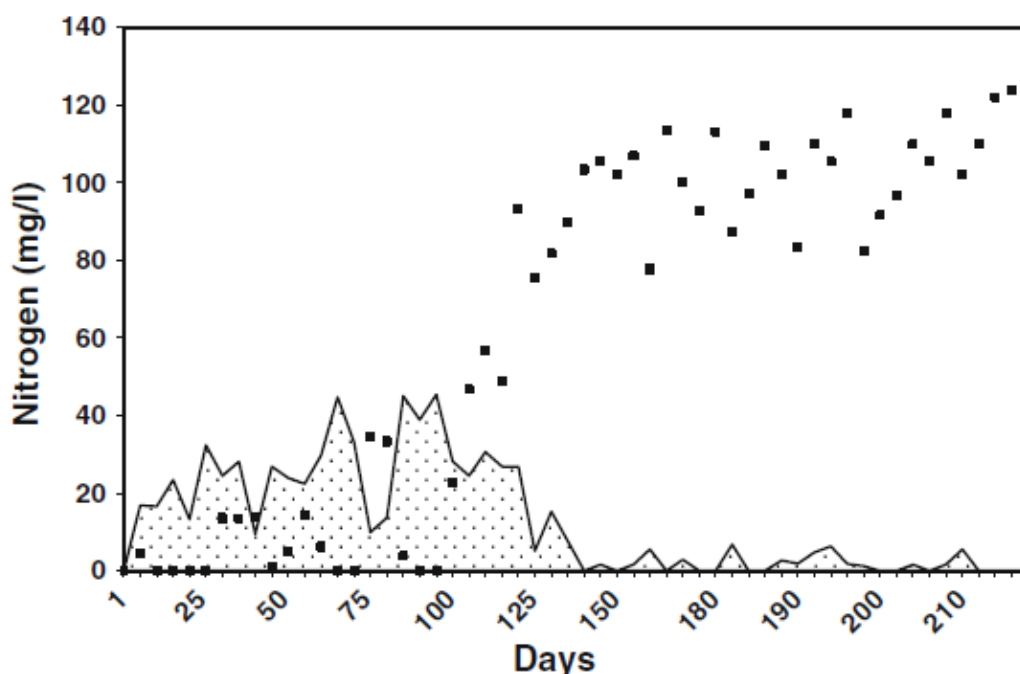
Στη διεργασία ANAMMOX απαιτείται ένας περίπλοκος έλεγχος των παραμέτρων λειτουργίας ώστε να διατηρηθεί η απαραίτητη ισορροπία ανάμεσα στις αερόβιες (ammonium oxidizing bacteria, AOB, και nitrite oxidizing bacteria, NOB) και στις αναερόβιες ομάδες βακτηρίων ammonia oxidizers (ANNAMOX bacteria) (Sliekers et al., 2005).

Για την επίτευξη της διεργασίας βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου σε ένα μόνο στάδιο (SBNR), η δραστηριότητα των NOB θα πρέπει να ανασταλεί, χωρίς ωστόσο να επηρεαστεί η δραστηριότητα των AOB και των ANAMMOX βακτηρίων. Αυτές οι τρεις κατηγορίες μικροοργανισμών είναι στενά συνδεδεμένες λόγω του γεγονότος ότι εμφανίζουν κοινούς δότες και δέκτες ηλεκτρονίων. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι μέσω του ελέγχου των συγκεντρώσεων του διαλυμένου οξυγόνου (DO) και των νιτρικών (NO_2^-) μπορεί να επιτευχθεί μερικός έλεγχος της δραστηριότητας των NOB (Gong Z et al. 2007, Bagchi S et al 2009, Paredes 2007 et al, Third et al 2001, Vlaeminck et al 2009).

Τα NOB ανταγωνίζονται τα AOB και τα ANAMMOX βακτήρια για το διαλυμένο οξυγόνο και τα νιτρικά, αντίστοιχα. Στην περίπτωση απουσίας νιτρικών στα υγρά απόβλητα, τα NOB εξαρτώνται άμεσα από τα AOB για την πηγή δότη ηλεκτρονίου. Μέσω του περιορισμού του διαλυμένου οξυγόνου, τα AOB καταναλώνουν το διαθέσιμο οξυγόνο για την παραγωγή νιτρικών. Επομένως, υπό αυτές τις συνθήκες, τα NOB αντιμετωπίζουν δύο ειδών

περιορισμούς: πρώτον, λόγω του δότη ηλεκτρονίου (νιτρώδη) και δεύτερον εξαιτίας του δέκτη ηλεκτρονίου (οξυγόνο) (Bagchi et al.,2010). Ομοίως και οι τρεις κατηγορίες αυτοτροφικών μικροοργανισμών επίσης απαιτούν πηγή ανόργανου άνθρακα για την ανάπτυξή τους (Kuai et al. 1998).

Μάλιστα σύμφωνα με τους Bagchi et al., μέσω του ελέγχου της όξινης ανθρακικής αλκαλικότητας, η διαδικασία της εξάλειψης των NOB μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω, με έναν "μηχανισμό ελέγχου τριών τρόπων". Οι προαναφερόμενοι ερευνητές στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν ένα βιοαντιδραστήρα fixed film, εργαστηριακής κλίμακας, για 214 ημέρες, με HRT = 4h και με αυξανόμενο NLR. Ο μέγιστος ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου καταγράφηκε ίσος με $0.7 \text{ kg NH}_4\text{-N} / (\text{m}^3 \text{ d})$, όταν το NLR ήταν στο υψηλότερο επίπεδο [$1.32 \text{ Kg NH}_4\text{-N} / (\text{m}^3 \text{ d})$]. Κατά τις πρώτες 100 ημέρες λειτουργίας του αντιδραστήρα το 62,5% της αμμωνίας, κατά μέσο όρο, οξειδώθηκε σε νιτρικά. Η παραγωγή νιτρικών μειώθηκε σε $0\text{-}6 \text{ mg NO}_3\text{-N/L}$ μετά από 150 ημέρες.



Σχήμα 5.10: Εξέλιξη της παραγωγής αέριου αζώτου κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα. Η περιοχή με τις τελείες αντιπροσωπεύει την παραγωγή νιτρικών και τα τετράγωνα την παραγωγή αζώτου. Bagchi et al.,2010

Η αναλογία παραγωγής νιτρικών προς την αμμωνία που οξειδώθηκε ήταν 0.81 ± 0.3 κατά το μέγιστο της παραγωγής νιτρικών (100 πρώτες ημέρες), γεγονός που υποδεικνύει λειτουργία νιτρικοποίησης. Κατά τη νιτρικοποίηση, 7.14 g αλκαλικότητας καταναλώνονται για κάθε γραμμάριο N που οξειδώνεται (Li B and Irvin S, 2007). Επομένως, μια αναλογία κατανάλωσης αλκαλικότητας προς αμμωνία, ίση με 7 ή περισσότερο, θεωρείται ως ενδεικτική για την παρουσία νιτροποίησης, κάτι που δεν είναι επιθυμητό στην μέθοδο ενός μόνο σταδίου βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου (single-stage biological nitrogen removal, SBNR). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεγαλύτερη τιμή απομάκρυνσης αμμωνίας $117.3 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$ σημειώθηκε

όταν ο λόγος της αλκαλικότητας προς την αμμωνία στην εισροή ήταν 3.4 . Η τιμή αυτή μάλιστα συμφωνεί και με τη θεωρητική κατανάλωση αλκαλικότητας $3.6 \text{ mg} / \text{mg NH}_4^+ \text{-N}$ που οξειδώνεται, κατά τη μέθοδο CANON (Sliekers et al. 2002) . Η μελέτη αυτή απέδειξε λοιπόν ότι διατηρώντας την αναλογία της αλκαλικότητας στην τροφοδοσία προς την αμμωνία μικρότερη από 8 η SBNR μέθοδος μπορεί να ευνοηθεί λόγω της αναστολής της δραστηριότητας των NOB.

Όσον αφορά τώρα στην παράμετρο του διαλυμένου οξυγόνου, προκειμένου να περιοριστεί η νιτροποίηση δεν προστέθηκε εξωτερικός αερισμός. Η παρουσία διαλυμένου οξυγόνου κυμάνθηκε από 4 έως 4.5 mg/L και αποτέλεσε τη μοναδική πηγή οξυγόνου στο σύστημα του αντιδραστήρα.

Όσον αφορά στη στοιχειομετρία της νιτροποίησης, για την οξείδωση $1 \text{ mg NH}_3\text{-N}$ σε $\text{NO}_3\text{-N}$, απαιτούνται 4.56 mg οξυγόνου (Paredes et al. 2007). Κατά την απουσία εξωτερικού αερισμού, δεν ήταν εξασφαλισμένη μια σταθερή συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου. Επομένως, μόνο 4.0-4.5 mg DO ήταν διαθέσιμα στην τροφοδοσία για την οξείδωση 29-200 mg $\text{NH}_3\text{-N}$. Καθώς η συγκέντρωση της τροφοδοτούμενης αμμωνία διαφοροποιούνταν, ομοίως μεταβαλλόταν το φορτίο διαλυμένου οξυγόνου ανά μονάδα συγκέντρωσης αμμωνίας. Τα δεδομένα της απόδοσης του συστήματος έδειξαν ότι η φόρτιση διαλυμένου οξυγόνου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.06 mg O/ (mg N day) ευνοούσε τη νιτροποίηση. Επομένως, οι Bagchi et al. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μία συγκέντρωση μικρότερη από 0.06 mg O/ (mg N day) στο εσωτερικό του αντιδραστήρα είναι επιθυμητή για τη μέθοδο SBNR.

Αντίστοιχα, για τη μέθοδο CANON, έχει καταγραφεί μια κατανάλωση διαλυμένου οξυγόνου 0.21-0.36 mg O/ mg N (Ahn YH and Choi HC 2006), τιμή μεγαλύτερη από αυτή των Bagchi et al. Η τιμή αυτή ωστόσο έρχεται να συμφωνήσει με προηγούμενες παρατηρήσεις των Bagchi et al. , όπου μερική νιτροποίηση είχε επιτευχθεί κάτω από συνθήκες περιορισμένων συγκεντρώσεων οξυγόνου (Bagchi et al. 2009). Για τον περιορισμό της δράσης των NOB οι Tong Zhang et al. 2010 επίσης μείωσαν τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου DO από 1mg/ L σε 0.5mg/ L όταν καταγράφηκε αυξημένη συγκέντρωση νιτρικών, κατά την μελέτη της μεθόδου CANON. Το αποτέλεσμα ήταν το επιθυμητό καθώς η δράση των NOB φάνηκε να αναστέλλεται και η συγκέντρωση των νιτρικών μειώθηκε.

Ομοίως, η αναλογία παραγωγής νιτρικών προς την αμμωνία που οξειδώνεται κατά την υπόλοιπη περίοδο λειτουργίας του αντιδραστήρα (174^{h} έως 214^{h} ημέρα) κυμάνθηκε από 0 έως 0.07, τιμή μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή της μεθόδου CANON (Gong et al. 2007, Third et al. 2001).

Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζονται ενδεικτικές απαιτήσεις οξυγόνου για διαφορετικές μεθόδους βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου, από διάφορους ερευνητές.

Πίνακας 5.2: Απαίτηση διαλυμένου οξυγόνου για διαφορετικές μεθόδους βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου.

Μέθοδος	Απαίτηση οξυγόνου (mg O/mg N)	Αναφορά
Νιτροποίηση-απονιτροποίηση	4.6	Paredes et al. 2007
Μερική νιτροποίηση	3.43	Third et al. 2001
SHARON-ANAMMOX	1.9	Vázquez-Padín et al. 2009
CANON	0.21-0.36	Ahn YH and Choi HC 2006
SBNR	0.06	Bagchi et al. 2010
ANAMMOX	0	Sliekers et al. 2003

5.5 Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD)

Το COD αποτελεί μια ακόμα παράμετρο που σύμφωνα με τους ερευνητές μπορεί να επηρεάσει τη διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας. Προκειμένου να διερευνηθεί λοιπόν ο βαθμός επίδρασης του, οι Jink Kang et al. 2006 πραγματοποίησαν πειράματα σε αντιδραστήρα Expanded Granular Sludge Bed (EGSB) εργαστηριακής κλίμακας, με συνθετικό νερό και συγκεντρώσεις COD που κυμάνθηκαν από 0 mg/L έως και 550 mg/L.

Η αναερόβια ιλύς που χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό προήλθε από εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων ζυθοποιίας και η συγκέντρωσή της στον αντιδραστήρα μετά τον εμβολιασμό ήταν 3.3 g/L. Ο υδραυλικός χρόνος παραμονής στον αντιδραστήρα ήταν 1.2 ημέρες, η θερμοκρασία 37° C, ενώ η απόδοση απομάκρυνσης αμμωνιακών, νιτρικών και νιτρικών ήταν 46.5%, 98.9% και 85.1% αντίστοιχα.

Με τη χρήση της λάσπης του EGSB πραγματοποιήθηκαν λοιπόν πειράματα στα οποία η συγκέντρωση αμμωνίας στην εισροή ήταν σταθερά ίση με 172.8 mg/L και το COD προσαρμόστηκε σε 0 mg/L, 200 mg/L, 350 mg/L και 550 mg/L σε τέσσερις αντιδραστήρες, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση κάθε συγκέντρωσης στην απόδοση της διεργασίας. Παρατηρήθηκε ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις COD είχαν σημαντική επίδραση στην απομάκρυνση του NH_4^+ -N ιδιαίτερα στην αρχή της αντίδρασης και πιο συγκεκριμένα, όσο μικρότερη ήταν η συγκέντρωση του COD τόσο μεγαλύτερη ήταν η ποσότητα NH_4^+ -N που απομακρύνθηκε στο αρχικό στάδιο.

Η διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας θεωρείται κατάλληλη για υγρά απόβλητα με χαμηλή αναλογία C:N. Στην περίπτωση που ο λόγος αυτός υπερβαίνει τη μονάδα τα ANAMMOX βακτήρια δεν είναι πλέον ικανά να ανταγωνιστούν επιτυχώς τα ετεροτροφικά απονιτροποιητικά βακτήρια (Guvén et al., 2005).

Το οργανικό φορτίο έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την απόδοση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, όμως τα ακριβή περιοριστικά επίπεδα παραμένουν ακόμα ανακριβή (Sabumon, 2007; Wang and Kang, 2005). Μάλιστα έχει βρεθεί ότι μια συγκέντρωση COD μεγαλύτερη από 300mg /L μπορεί να αδρανοποιήσει τις κοινότητες των ANAMMOX βακτηρίων σε UASB αντιδραστήρα στον οποίο χρησιμοποιούνταν ως πηγή οργανικής ύλης γάλα με λιπαρά (Chamchoi et al., 2008). Επίσης συγκεντρώσεις 50mM οξικού οξέος οδήγησαν σε 70% αναστολή της διεργασίας ANAMMOX (Dapena-Mora et al., 2007).

Η απομάκρυνση της αμμωνίας μέσω της διεργασίας ANAMMOX έχει αναπτυχθεί για την επεξεργασία διαφόρων ειδών υγρών αποβλήτων με χαμηλή συγκέντρωση οργανικής ύλης (λιγότερο από 1700 mg COD/L), όπως για παράδειγμα νερό από δευτεροβάθμια επεξεργασία αστικών υγρών αποβλήτων σε βιοφίλτρο καθοδικής ροής (Li et al., 2005), λύματα με υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών σε αντιδραστήρες διακοπτόμενου έργου (Jing-Ping et al., 2006) και στραγγίδια ΧΥΤΑ σε αντιδραστήρα συνεχούς ροής (Liang and Liu, 2008).

Το 2009 οι Molinuevo et al. δημοσίευσαν τη μελέτη τους με αντικείμενο την επίδραση του COD στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας, με χρήση αντιδραστήρα ανοδικής ροής προσκολλημένης βιομάζας (semi-continuous upflow anaerobic sludge blanket, UASB) και με τροφοδοσία οργανικής ύλης από προεπεξεργασμένα λύματα εκροής από την χώνευση κοπριάς γουρουνιών. Ο εμπλουτισμός της αναερόβιας ύλης έγινε με 40ml κοκκώδη ιλύ από το εργοστάσιο πατάτας Kruijning, της Ολλανδίας και 40ml αναμμοξ ιλύ εμβολιασμού από το Laboratory of Microbial Ecology, Ghent University, Βέλγιο). Η θερμοκρασία του αντιδραστήρα διατηρήθηκε στους 37° C και ο υδραυλικός χρόνος παραμονής ήταν 2.1 ημέρες. Η συγκέντρωση του COD ήταν 4.74 ± 1.05 στην πρώτη περίπτωση προεπεξεργασίας (UASB) και 2.42 ± 0.29 για τη δεύτερη (μερική οξείδωση).

Πίνακας 5.3: Χημικά χαρακτηριστικά των λυμάτων κατά την εισροή τους, Molinuevo et al., 2009

Parameters	Unit	Average value \pm SD* Effluent after UASB	Average value \pm SD Effluent after partial oxidation
TS	g L ⁻¹	nd**	nd
VS	g L ⁻¹	nd	nd
COD	g L ⁻¹	4.74 ± 1.05	2.42 ± 0.29
N-NH ₄ ⁺	g L ⁻¹	3.78 ± 0.46	0.67 ± 0.16
N-NO ₂	g L ⁻¹	1.7 ± 0.20	0.7 ± 0.24
N-NO ₃	g L ⁻¹	4.01 ± 0.40	1.65 ± 0.58

Η τροφοδοσία του αντιδραστήρα αποτελούνταν από συνθετικό νερό με προσθήκη των δύο τύπων λυμάτων σε αναλογία 2%, 3% και 5% για τον πρώτο τύπο και 5%, 7%, 10% και 12% για τον δεύτερο.

Για το λύμα μετά από χώνευση σε ανοδικής ροής προσκολλημένης βιομάζας (UASB) η απόδοση της απομάκρυνσης των αμμωνιακών ήταν $92 \pm 4.9\%$ για το δείγμα 2% και $80 \pm 7.8\%$ για το δείγμα 3%. Ωστόσο η απομάκρυνση της αμμωνίας έπεσε στο 0% όταν εισήχθη στον

αντιδραστήρα το δείγμα των 5%. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για την περίπτωση του λύματος μετά από μερική οξείδωση ήταν $98.5 \pm 0.8\%$ για το δείγμα με 5% (v/v), 83% για το δείγμα με 7% (v/v), 86% για το δείγμα με 10% (v/v) και 0% για το τελευταίο δείγμα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του δεύτερου δείγματος το μέγιστο ποσοστό απομάκρυνσης υπερέβη το αντίστοιχο ποσοστό του πρώτου δείγματος και αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η ελεύθερη αμμωνία αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας (Waki et al., 2007). Με την προεπεξεργασία της μερικής οξείδωσης λοιπόν της αμμωνίας σε νιτρώδη ευνοήθηκε η αντίδραση ANAMMOX.

Τα σχετικά με την απομάκρυνση των αμμωνιακών σε κάθε περίπτωση παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες 5.4, 5.5:

Πίνακας 5.4: Συμβολή διαφορετικών μεθόδων για την απομάκρυνση της αμμωνίας από τα λύματα μετά από χώνευση σε ανοδικής ροής προσκολλημένης βιομάζας (UASB) αντιδραστήρα, Molinuevo et al.2009.

% (v/v) of UASB-post-digested effluent added to SW	Effluent COD (mg L^{-1})	% Ammonia removal \pm SD*			
		Anammox	Denitrification	Nitrification	Other
0	0	48.20 ± 9.09	2.98 ± 0.02	5.56 ± 1.04	39.84 ± 11.28
2	95	19.98 ± 0.24	7.14 ± 0.21	3.18 ± 0.19	69.70 ± 0.64
3	142	11.32 ± 1.29	6.32 ± 0.96	3.36 ± 0.62	79.22 ± 2.22
5**	237	0.00	9.61	5.08	85.31

Πίνακας 5.5: Συμβολή διαφορετικών μεθόδων για την απομάκρυνση της αμμωνίας από τα λύματα μετά από μερική οξείδωση. Molinuevo et al.2009

% (v/v) of partially oxidized effluent added to SW	Effluent COD (mg L^{-1})	% Ammonia removal \pm SD*			
		Anammox	Denitrification	Nitrification	Other
5	121	33.23 ± 1.23	13.42 ± 4.68	5.74 ± 0.48	47.61 ± 6.39
7	170	41.75 ± 3.35	14.84 ± 2.73	7.13 ± 0.69	36.28 ± 6.77
10	242	29.97 ± 1.07	9.31 ± 0.32	6.24 ± 0.11	54.47 ± 1.5
12**	290	0.00	22.52	13.63	63.85

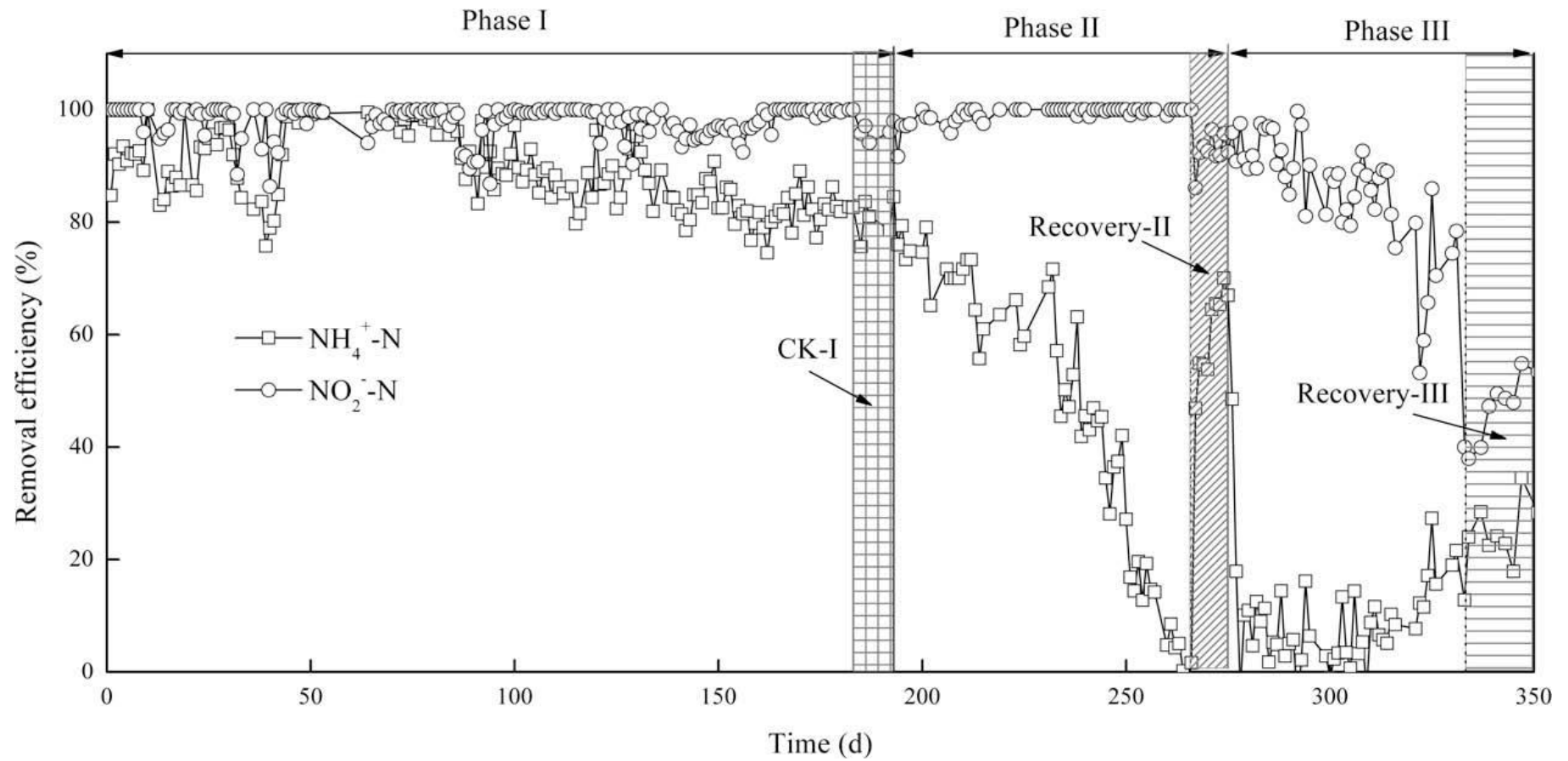
Όπως είναι εμφανές και από τους πίνακες 5.4 και 5.5, τα οργανικά φορτία επηρέασαν αρνητικά την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Οργανικά φορτία πάνω από $112 \text{ mg COD L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ($237 \text{ mg COD L}^{-1}$) για το λύμα που υπέστη προεπεξεργασία στον UASB αντιδραστήρα και πάνω από $136 \text{ mg COD L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ($290 \text{ mg COD L}^{-1}$) για το λύμα που υπέστη μερική οξείδωση, ανέστειλαν τη λειτουργία των ANAMMOX βακτηρίων και μείωσαν τον πληθυσμό τους εξαιτίας της ανταγωνιστικότητας των απονιτροποιητικών βακτηρίων. Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας και η απονιτροποίηση πάντα συνέβαιναν ταυτόχρονα,

υποδεικνύοντας ότι και οι δύο διεργασίες θα μπορούσαν να συνυπάρχουν στο ίδιο περιβάλλον, με τον έλεγχο βέβαια παραμέτρων όπως COD, νιτρώδη, νιτρικά, αμμωνιακά, θερμοκρασία και pH για την επίτευξη καλής ισορροπίας (Molinuevo et al., 2009).

Μια αντίστοιχη μελέτη δημοσιεύτηκε το 2009 από τους Chong-jian Tang et al. με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του οργανικού φορτίου στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας, σε upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor, με NLR $13.92 \text{ kg N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$ και HRT ίσο με 0.83 ώρες. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η απονιτροποίηση επικράτησε στον αντιδραστήρα όταν ο λόγος $\text{COD}/\text{NO}_2^- - \text{N}$ που εφαρμόστηκε έγινε ίσος με 2.92. Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους $35 \pm 1^\circ \text{ C}$, το pH 6.8-7.0 με τη βοήθεια υδροχλωρικού οξέος ενώ το πείραμα χωρίστηκε σε τρία στάδια:

1. Στάδιο 1^ο (ημέρες 1-193), λειτουργία του αντιδραστήρα χωρίς προσθήκη οργανικού φορτίου για την επίτευξη υψηλού ρυθμού απομάκρυνσης αμμωνίας ($9.5 \text{ kg N m}^{-3} \text{ day}^{-1}$). Η συγκέντρωση των νιτρωδών στην εισροή ήταν σταθερά ίση με 240 mg/L , λαμβάνοντας υπόψη την παρατήρηση ότι εισροή μεγαλύτερη από 280 mg/L αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη διεργασία ANAMMOX σε continuously-fed fixed bed reactor (Isaka et al., 2007)
2. Στάδιο 2^ο (ημέρες 194), διερεύνηση της επίδρασης του οργανικού φορτίου στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας με αυξανόμενη δόση COD, ξεκινώντας από συγκέντρωση 50 mg/L και σταματώντας όταν η απόδοση της μετατροπής του αμμωνίου έπεσε στο 5%.
3. Στάδιο 3^ο (ημέρες 276-351), διερεύνηση της δυνατότητας αποκατάστασης του αντιδραστήρα, με την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης COD και την τροφοδοσία νιτρωδών. Οι συγκεντρώσεις αμμωνιακών και COD στην τροφοδοσία ήταν 240 mg/L και 700 mg/L αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται και στο ακόλουθο διάγραμμα, στη φάση Ανάκαμψης II (Recovery II) παρατηρείται μια αρκετά ικανοποιητική αποκατάσταση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας και αυτό οφείλεται στην απομάκρυνση του οργανικού φορτίου από το σύστημα. Ωστόσο δεν επετεύχθη το ίδιο αποτέλεσμα στην περίπτωση του 3^{ου} σταδίου όπου εισήχθησαν αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρωδών. Πιο αναλυτικά, παρατηρήθηκε αρχικά μια αύξηση της απόδοσης της απομάκρυνσης της αμμωνίας, η οποία όμως στη συνέχεια μειώθηκε λόγω της περιοριστικής δράσης που έχει η αυξημένη συγκέντρωση νιτρωδών (μεγαλύτερη από 100 mg N/L Strous et al. 1999). Τέλος στη φάση Ανάκαμψης III Recovery III, μετά από αφαίρεση του οργανικού φορτίου πραγματοποιήθηκε η προσπάθεια επαναφοράς του συστήματος στην αρχική κατάσταση, χωρίς όμως τα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς οι αυξημένες συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου αποδείχθηκε ότι προκάλεσαν σοβαρές επιπτώσεις στην επίδοση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (Chong-jian Tang et al., 2009).



Σχήμα 5.11: Προφίλ της απόδοσης της απομάκρυνσης αμμωνιακών και νιτρωδών καθόλη τη διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα, (Chong-jian Tang et al., 2009).

Είναι εμφανές λοιπόν ότι τα ANAMMOX βακτήρια υπήρξαν λιγότερο ανταγωνιστικά συγκριτικά με τα απονιτροποιητικά ετερότροφα βακτήρια τόσο για το δέκτη ηλεκτρονίων όσο και για το χώρο διαβίωσης στο στάδιο εισαγωγής αυξημένης συγκέντρωσης οργανικού φορτίου με αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή της αναερόβιας οξειδωσης της αμμωνίας.

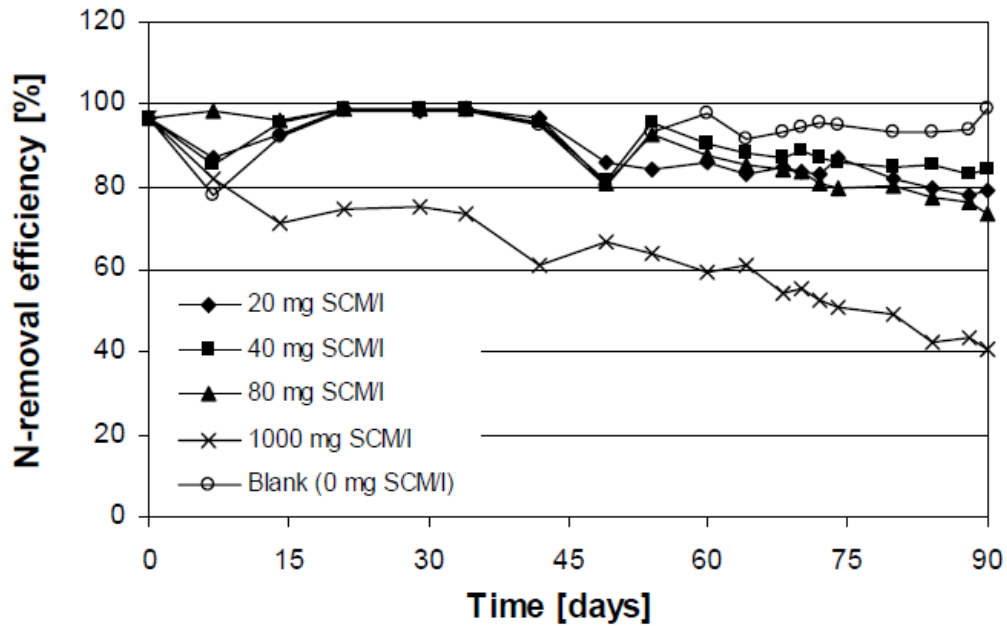
5.6 Σουλφοναμίδια (sulphonamides)

Τα υγρά απόβλητα πιθανόν να περιέχουν πολλές και διαφορετικές χημικές ενώσεις που θα μπορούσαν να αναστείλουν τη δράση των μικροοργανισμών και να προκαλέσουν προβλήματα κατά το στάδιο της βιολογικής επεξεργασίας. Αυτές οι επιβλαβείς ενώσεις, ανάλογα με τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες, μπορεί να μην είναι βιοαποδομήσιμες και να παραμένουν τοξικές καθ' όλη τη διάρκεια της διεργασίας επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων (Schalk et al., 1998; Halling-Sørensen et al., 2000). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών των ενώσεων αποτελούν διάφορες φαρμακευτικές ενώσεις όπως τα σουλφοναμίδια, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ανθρώπων και την επιστημονική διαχείριση φάρμακων. Τα σουλφοναμίδια εισέρχονται στο περιβάλλον ως εκροές της φαρμακευτικής βιομηχανίας, ως περιεχόμενα στα αστικά υγρά απόβλητα καθώς και ως εκροές εκτροφείων ψαριών. Τα σουλφοναμίδια βρέθηκαν σε εκροές εγκατάστασης επεξεργασίας και σε επιφανειακά νερά σε ποσότητες με εύρος από 10 έως 2000 ng/dm³ για τα διαφορετικά σουλφοναμίδια όπως sulphamethazine, sulphamethoxazole και sulphadiazine (Hartig et al., 1999; Hirsch et al., 1999). Αυτές οι ενώσεις δεν είναι εύκολα βιοαποδομήσιμες και εμφανίζουν μικρή δυνατότητα προσρόφησης τόσο στην εδαφική όσο και στην ενεργό ιλύ. (Ingerslev and Halling-Sørensen, 2000; Huang et al., 2001).

Οι Makush et al. διερεύνησαν την επίδραση που μπορεί να έχουν οι ενώσεις αυτές στη λειτουργία της αναερόβιας οξειδωσης της αμμωνίας και κατά πόσο θα ήταν δυνατή η προσαρμογή των ANAMMOX βακτηρίων στην παρουσία των σουλφοναμιδίων σε υγρά απόβλητα με υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων.

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά sulphanilamide (SA), sulphacetamide (SCM) καθώς και το p-toluenesulphonamide (p-TSA) το οποίο αποτελεί προϊόν μεταβολισμού του Chloramine T, που χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό κατά των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων.

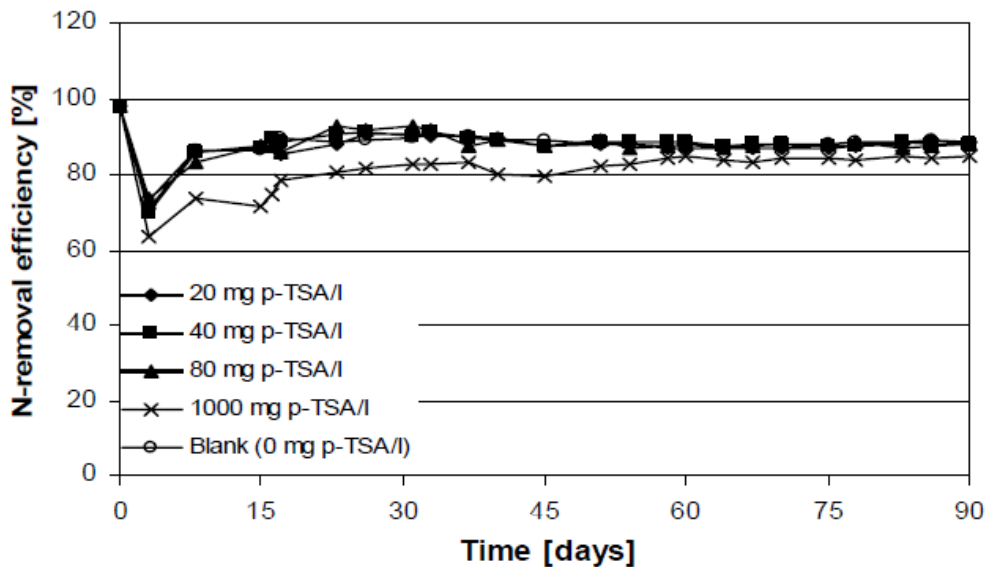
Στα πειράματα διαλείποντος έργου που πραγματοποιήθηκαν εφαρμόστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις σουλφοναμιδίων: 0, 10, 20, 40, 80, 100 και 1000 mg/L³. Οι συνθήκες λειτουργίας και οι παράμετροι διαλυμένου οξυγόνου, θερμοκρασίας, pH παρέμειναν σταθερά στα βέλτιστα επίπεδα (το DO ήταν 0.15 mg/dm³, το pH ήταν 7.8-8.3 και η θερμοκρασία 29-32° C). Μελετήθηκε τόσο η ανταπόκριση των ANAMMOX βακτηρίων σε μακροχρόνια έκθεση (90 ημέρες) όσο και σε βραχυχρόνια έκθεση (14 ώρες). Οι συγκεντρώσεις αμμωνιακών και νιτροδών διαμορφώθηκαν σε 150 mg NH₄⁺-N/dm³ και 195 NO₂⁻-N/L³ αντίστοιχα.



Σχήμα 5.12: Διάγραμμα απομάκρυνσης αζώτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις SCM, στην περίπτωση των πειραμάτων μακροχρόνιας έκθεσης, Makush et al.

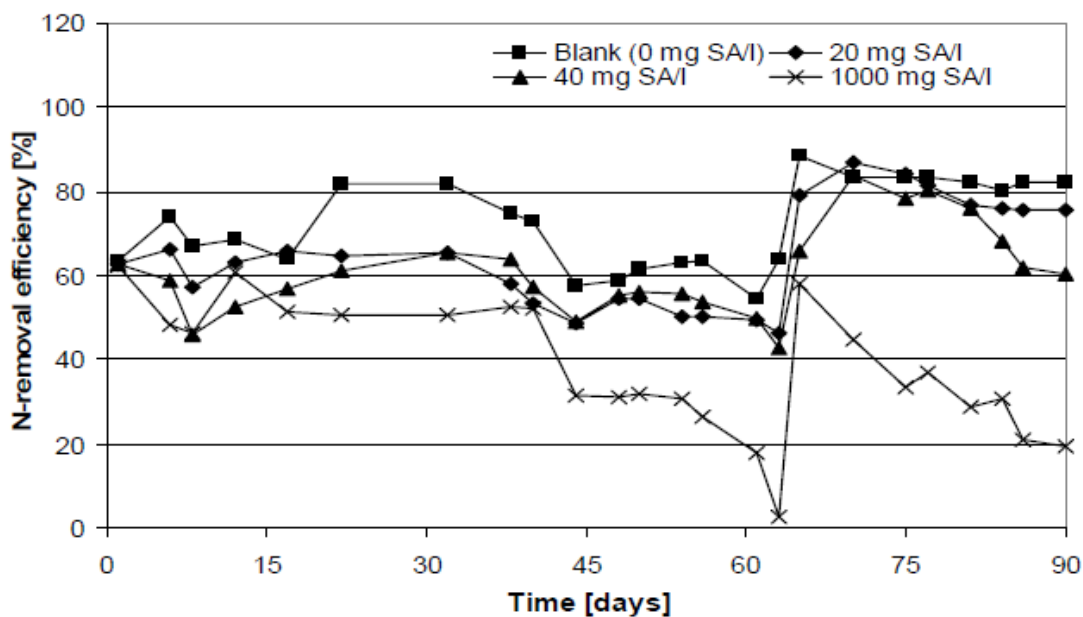
Όπως φαίνεται και από το σχήμα 5.12, η απόδοση της απομάκρυνσης αζώτου στους αντιδραστήρες με SCM στο αρχικό στάδιο ήταν 80-90%, ενώ μετά από 20 ημέρες σταθεροποιήθηκε στο 90-95%. Μονάχα στην περίπτωση των 1000mg/L³ ήταν αρκετά χαμηλότερη, γύρω στο 70%, ενώ μετά από 45 ημέρες έπεσε στο 40%. Στην περίπτωση των χαμηλότερων συγκεντρώσεων SCM, επίσης παρατηρήθηκε η πτώση της απόδοσης στο πέρας του πειράματος φτάνοντας σε τιμές 75-83%.

Αντίστοιχη εικόνα εμφανίζεται και στα πειράματα με p-TSA, σχήμα 5.13, όπου η αρχική απόδοση απομάκρυνσης αζώτου ήταν 65-70% και συνεχώς αυξανόταν έως το 85-90% στο τέλος του πειράματος. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, για την υψηλή συγκέντρωση p-TSA (1000 mg / dm³) η απόδοση ήταν χειρότερη (κατά 5 – 15 % περίπου) σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις p-TSA.



Σχήμα 5.13: Διάγραμμα απομάκρυνσης αζώτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις p-TSA, στην περίπτωση των πειραμάτων μακροχρόνιας έκθεσης, Makush et al.

Τέλος, στην περίπτωση της SA, σχήμα 5.14, τα αποτελέσματα των μακροχρόνιων πειραμάτων διαφοροποιούνται κατά πολύ σε σχέση με τα αντίστοιχα των άλλων δύο ενώσεων. Η μελέτη της SA χωρίστηκε σε δύο περιόδους: 1-65 ημέρες και 66-90 ημέρες. Οι αρχικές συγκεντρώσεις αμμωνιακών και νιτρωδών στην πρώτη περίοδο ήταν $100 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N/dm}^3$ και $130 \text{ NO}_2^- \text{-N/dm}^3$. Μετά από τις 65 ημέρες λειτουργίας της διεργασίας η αρχικές συγκεντρώσεις αυξήθηκαν σε $150 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N/dm}^3$ και $195 \text{ NO}_2^- \text{-N/dm}^3$. Η αλλαγή αυτή έγινε προκειμένου να ερευνηθεί η συμπεριφορά της διεργασίας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι οποίες και απαντώνται συχνά.



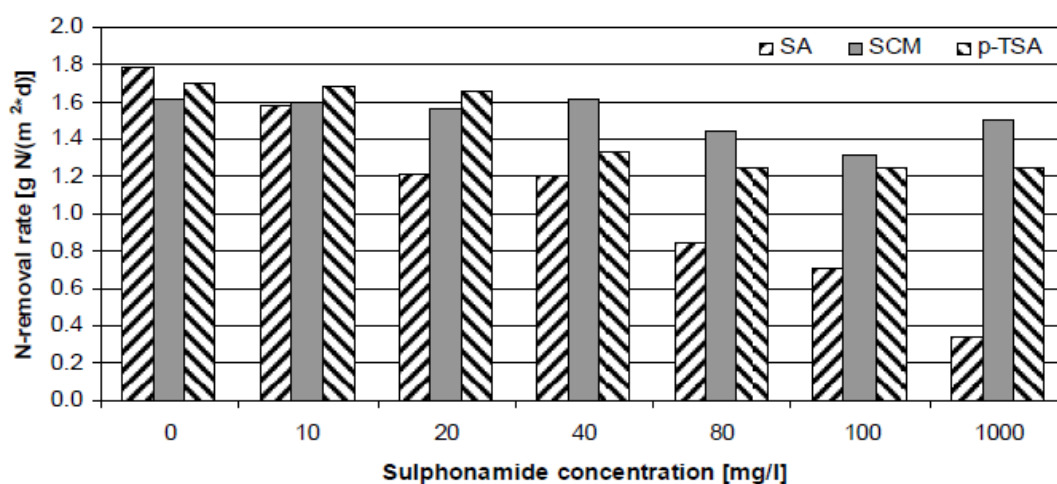
Σχήμα 5.14: Διάγραμμα απομάκρυνσης αζώτου στις διαφορετικές συγκεντρώσεις SA, στην περίπτωση των πειραμάτων μακροχρόνιας έκθεσης, Makush et al.

Κατά την πρώτη περίοδο η απόδοση της απομάκρυνσης αζώτου στους αντιδραστήρες με 20 και 40 mg SA/dm³ διακυμάνθηκε. Ωστόσο στον αντιδραστήρα με την υψηλή συγκέντρωση, 1000 mg SA/dm³, μειώθηκε ταχύτατα μετά την 40^η ημέρα. Η μέση απόδοση απομάκρυνσης αζώτου ήταν περίπου 67%, 56% and 38%, αντίστοιχα.

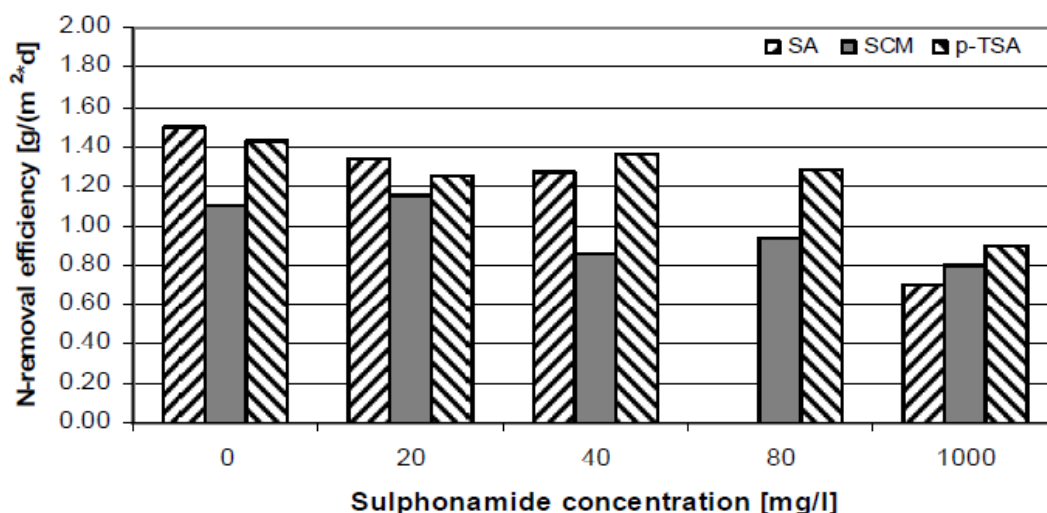
Μετά την αύξηση των συγκεντρώσεων των αμμωνιακών και των νιτρικών, η απόδοση απομάκρυνσης αζώτου αυξήθηκε άμεσα και στις τρεις περιπτώσεις. Η διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας παρέμεινε σταθερή και ελαφρά διαταραγμένη στον αντιδραστήρα με τη μικρότερη συγκέντρωση καθ' όλη τη διάρκεια της φάσης αυτής (ήταν κατά 14% περίπου χαμηλότερη σε σχέση με το τυφλό διάλυμα). Ωστόσο στην περίπτωση της μεγαλύτερης συγκέντρωσης, η αναερόβια οξείδωση συνοδευόταν και από τη διεργασία της νιτροποίησης (η παραγωγή νιτρικών κυμάνθηκε γύρω στο 22%).

Συμπερασματικά, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι η διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας παρέμεινε σταθερή στους αντιδραστήρες με p-TSA, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος των 90 ημερών, ενώ στους αντιδραστήρες με SCM εμφανίστηκε ελαφρά διαταραγμένη και ειδικά στην υψηλότερη συγκέντρωση. Σε αυτήν την περίπτωση εμφανίστηκε η διεργασία της νιτροποίησης καθώς αυξήθηκε η συγκέντρωση των νιτρικών (από 2.5 σε 24.4 mg NO₃⁻ N/ dm³ και μειώθηκε το pH (από 8.2 σε 7.3). Όμοια συμπεριφορά παρουσιάζεται και στην περίπτωση της SA.

Στη συνέχεια, οι Makush et al. πραγματοποίησαν πειράματα βραχυχρόνιας έκθεσης των ANAMMOX βακτηρίων στα σουλφοναμίδια, τόσο για καλλιέργειες ANAMMOX βακτηρίων που είχαν υποβληθεί σε μεγάλη περίοδο έκθεσης σε πειράματα όσο και για ανέπαφες καλλιέργειες βακτηρίων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα ακόλουθα σχήματα 5.15 και 5.16,:



Σχήμα 5.15: Ρυθμοί απομάκρυνσης αζώτου κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων 14 ωρών σε μη εγκλιματισμένες (non-acclimated) καλλιέργειες βακτηρίων, Makush et al.

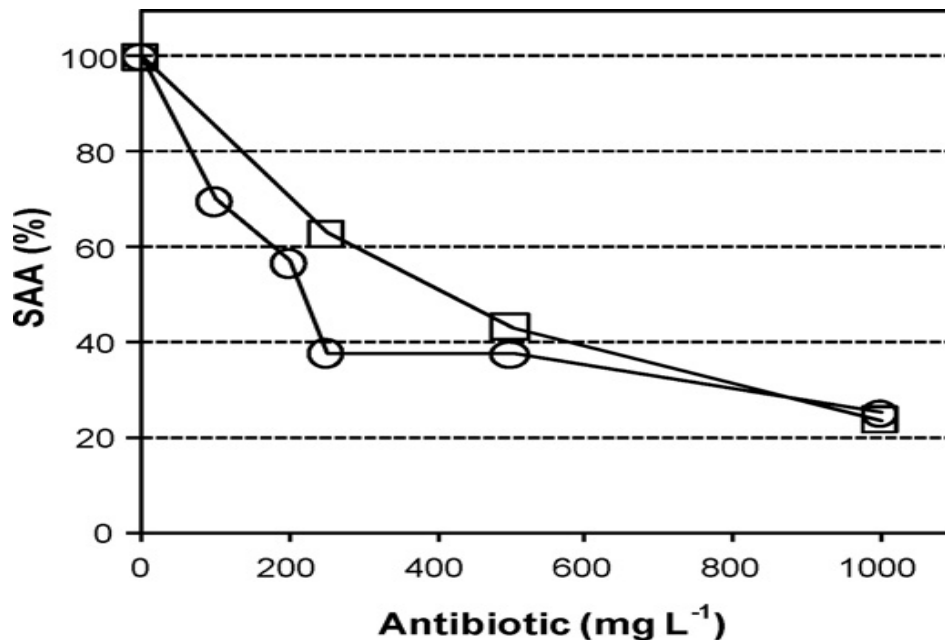


Σχήμα 5.16: Ρυθμοί απομάκρυνσης αζώτου κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων 14 ωρών σε εγκλιματισμένες (acclimated) καλλιέργειες βακτηρίων, Makush et al.

Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους παραπάνω πίνακες, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των σουλφοναμιδίων τόσο χαμηλότερη ήταν η απόδοση απομάκρυνσης αζώτου. Επίσης, η μακροχρόνια έκθεση των βακτηρίων δεν φαίνεται να οδηγεί σε προσαρμογή των βακτηρίων αφού σε αυτήν την περίπτωση τα επίπεδα απομάκρυνσης αζώτου δεν ήταν μεγαλύτερα. Μάλιστα, στην συγκέντρωση των 1000 mg SCM/dm³ και 1000 mg p-TSA/dm³, οι καλλιέργειες των μακροχρόνια εκτεθειμένων βακτηρίων ήταν περισσότερο ευαίσθητες από τις καλλιέργειες των μη εκτεθειμένων, με αποδόσεις κατά 24% και 13.5% χαμηλότερες.

Μια αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε από τους Fernandez et al. (2009) με αντικείμενο την επίδραση δύο αντιβιοτικών ευρείας χρήσεως (tetracycline hydrochloride και chloramphenicol) στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Οι συγκεντρώσεις που εφαρμόστηκαν ήταν από 100 έως 1000 mg/L για την tetracycline hydrochloride και 250 έως 1000 mg/L για την chloramphenicol.

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα που ακολουθεί, σχήμα 5.17, η tetracycline hydrochloride στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών εμφανίζει μεγαλύτερη περιοριστική για τα ANAMMOX βακτήρια δράση σε σχέση με την chloramphenicol. Ωστόσο, οι επιδράσεις και των δύο ενώσεων φαίνονται ίδιες για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 500 mg/L. Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις βιοτοξικότητας έδειξαν μια πιο δυνατή επίδραση για την περίπτωση της tetracycline hydrochloride. Οι ιδιαίτερα περιοριστικές επιδράσεις της ουσίας αυτής στα ANAMMOX βακτήρια μάλιστα φαίνεται να είναι όμοιες με τις αντίστοιχες σε άλλους μικροοργανισμούς. Για τα νιτροποιητικά βακτήρια έχει καταγραφεί αναστολή της λειτουργίας κατά 50% σε 250 mg/L oxytetracycline, ουσία όμοια στη δομή και στις ιδιότητες με την tetracycline hydrochloride (Campos et al., 2001). Ωστόσο οι Masse et al. (2000) υποστήριξαν ότι είναι δυνατή η αποδοτική λειτουργία ενός αναερόβιου χωνευτή με την παρουσία ορισμένων αντιβιοτικών.



Σχήμα 5.17: Επί τοις εκατό αναστολή στην SAA λόγω tetracycline hydrochloride (o) και chloramphenicol (□), Fernandez et al.,2009

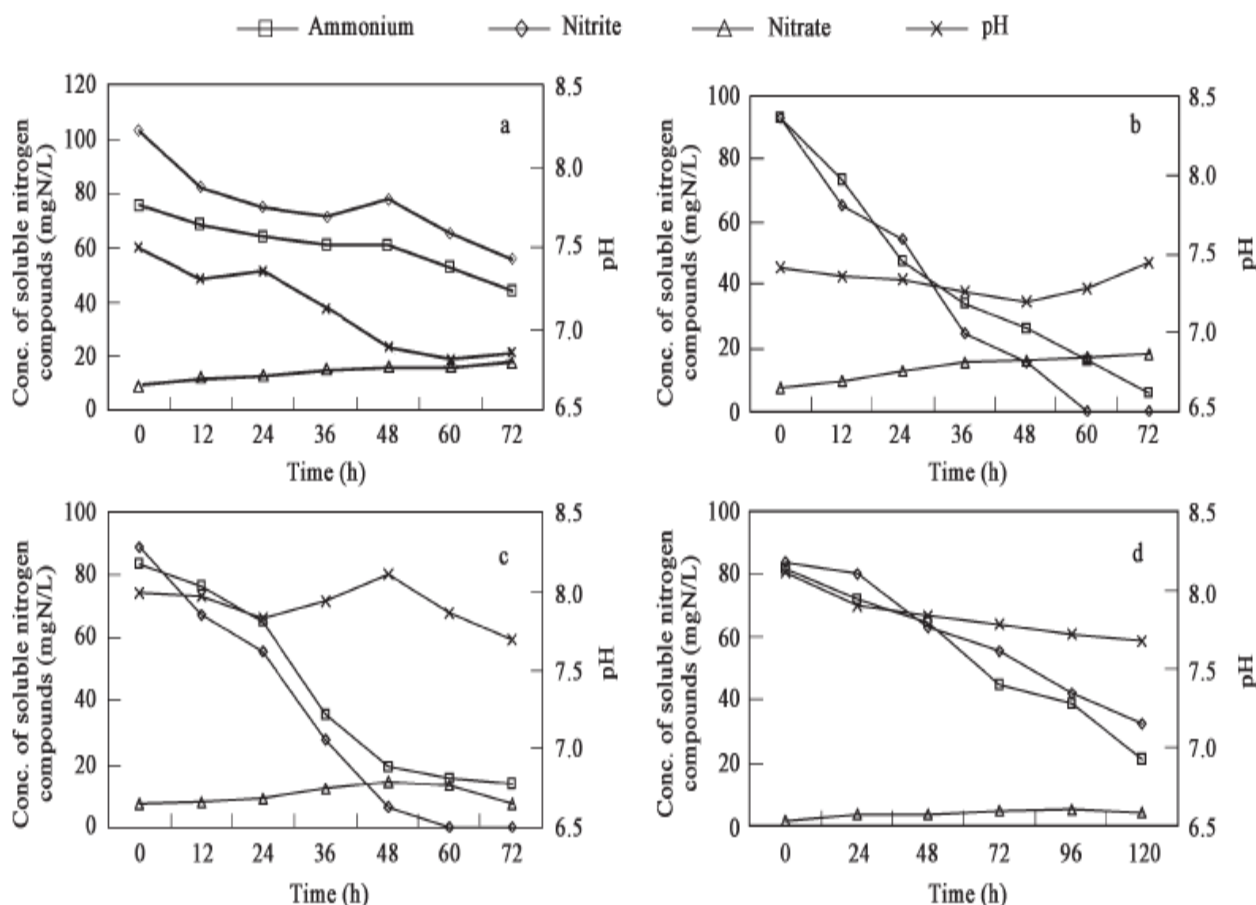
Όσον αφορά στη chloramphenicol, (van de Graaf et al. 1995) βρήκαν ότι 200mg/L αυτού του αντιβιοτικού μπορούν να προκαλέσουν περιορισμό της δραστηριότητας ANAMMOX κατά 68%, σε πειράματα διαλείποντος έργου. Ωστόσο, επίσης παρατήρησαν ότι το ποσοστό αναστολής ήταν συνάρτηση του βαθμού εμπλουτισμού της καλλιέργειας και της προσαρμογής τους. Τέλος αξίζει να αναφερθεί για λόγους σύγκρισης ότι οι Okrokwasili and Eleke (1997) παρατήρησαν την ολική αναστολή της δράσης των καλλιεργειών Nitrosomonas και Nitrobacter, σε συγκεντρώσεις 13.3 mg/L, επίσης σε πειράματα διαλείποντος έργου.

Συμπερασματικά θα μπορούσε να ειπωθεί ότι και οι δύο ενώσεις έχουν έντονα περιοριστικές επιδράσεις στην δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων. Η αναστολή λόγω της chloramphenicol ωστόσο είναι αναστρέψιμη και το σύστημα μπορεί να επανέλθει στην αρχική του απόδοση, ενώ η tetracycline hydrochloride προκαλεί μια απενεργοποίηση της βιομάζας και επομένως η μακροχρόνια έκθεση θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάγκη νέου εμπλουτισμού του αντιδραστήρα.

5.7 Ανόργανος άνθρακας

Οι Liao et al. (2008) μελέτησαν την επίδραση της προσθήκης πηγής ανόργανου άνθρακα σε ANAMMOX αντιδραστήρα διακοπτόμενου έργου (SBR), ορμώμενοι από την κοινή διαπίστωση ότι οι αυτοτροφικοί μικροοργανισμοί κυρίως χρησιμοποιούν τις ανόργανες μορφές άνθρακα, ως πηγή άνθρακα. Χρησιμοποίησαν αντιδραστήρα διακοπτόμενου έργου (SBR) προκειμένου να διερευνήσουν τη διεργασία ANAMMOX με την προσθήκη διτανθρακικού νατρίου, σε συγκεντρώσεις 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, και 2.0 g NaHCO₃/L σε διάρκεια 20 d. Ο HRT ρυθμίστηκε μεταξύ 3 και 5 d ανάλογα με την απόδοση της

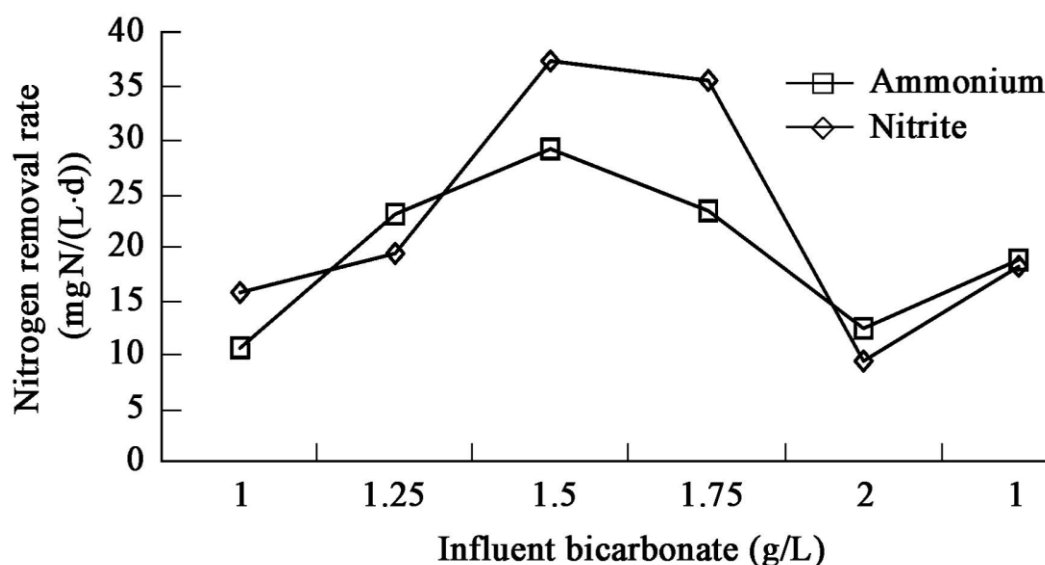
απομάκρυνσης αμμωνιακών και νιτρωδών. Οι συγκεντρώσεις $\text{NH}_4^+\text{-N}$ και $\text{NO}_2^-\text{-N}$ της εισροής παρέμειναν σταθερές κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος και ίσες με $80 \pm 10 \text{ mg/L}$. Ωστόσο, η συμπεριφορά της διεργασίας ANAMMOX ήταν διαφορετική για τις διαφορετικές εισροές δισανθρακικού νατρίου. Οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των αμμωνιακών, των νιτρωδών, και των νιτρικών καθώς και του pH φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα:



Σχήμα 5.18: Προφίλ συγκεντρώσεων των ενώσεων αζώτου και του pH του αντιδραστήρα στις διαφορετικές εισροές διτανθρακικών: (a) 1.0 g/L; (b) 1.5 g/L; (c) 1.75 g/L; (d) 2.0 g/L, Liao et al. 2008

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα, σχήμα 5.18, η απόδοση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας ήταν περιορισμένη, μόνο το 41.6% αμμωνιακών και 46.2% νιτρωδών αφαιρέθηκαν για υδραυλικό χρόνο παραμονής ίσο με 3 ημέρες, όταν η συγκέντρωση των διτανθρακικών ήταν 1.0 g/L. Ταυτόχρονα, σημειώθηκε μια μείωση στο pH από το 7.5 στο 6.8. όταν η εισροή των διτανθρακικών αυξήθηκε στο 1.5 g/L το pH διατηρήθηκε μεταξύ 7.6 και 8.1. η ανταπόκριση της διεργασίας υπήρξε άμεση και τα ποσοστά απομάκρυνσης των αμμωνιακών και των νιτρωδών έφτασε το 83.6% και 100% αντίστοιχα. Αντίστοιχη εικόνα εμφανίστηκε και για τη συγκέντρωση διτανθρακικών ίση με 1.75 g/L. Το ποσοστό της απομάκρυνσης ωστόσο μειώθηκε απότομα όταν η συγκέντρωση αυξήθηκε στα 2.0 g/L. Η δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων όμως αποκαταστάθηκε

με την μείωση της συγκέντρωσης των διτανθρακικών στο 1.0 g/L, καθώς η μετατροπή των αμμωνιακών και η παραγωγή των νιτρικών επανήλθαν σε κανονική στοιχειομετρία.



Σχήμα 5.19: Ποσοστά απομάκρυνσης αμμωνιακών και νιτρικών για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις διτανθρακικών, Liao et al. 2008.

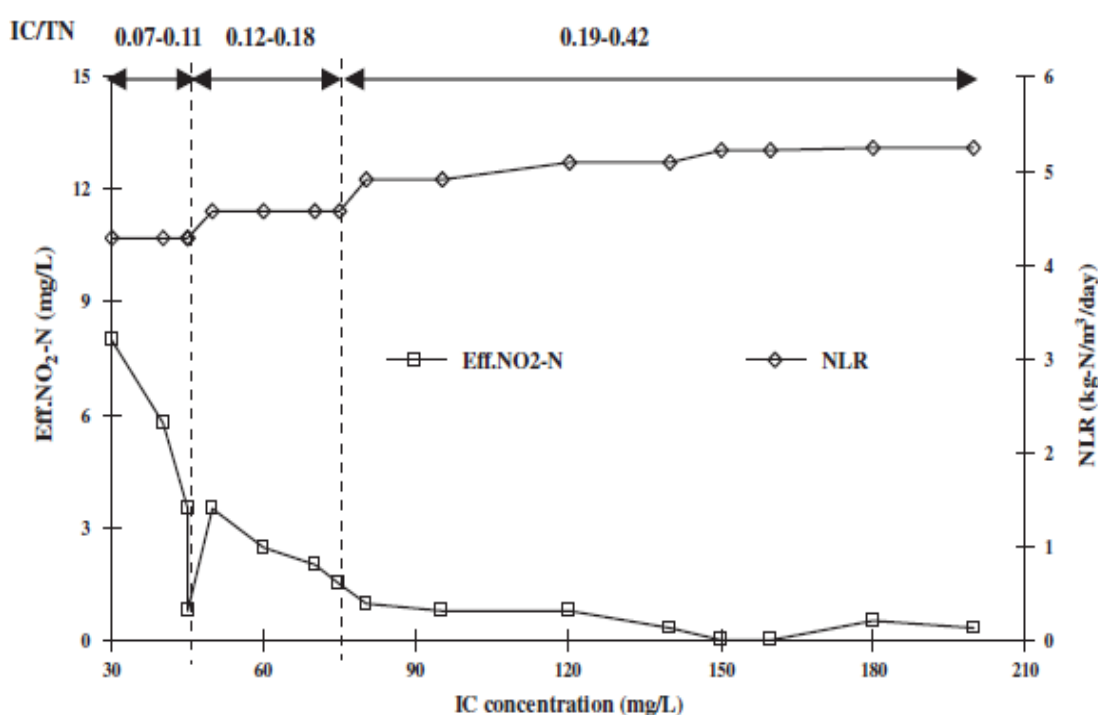
Ο ρυθμός απομάκρυνσης αμμωνιακών έφτασε στη μεγαλύτερή του τιμή 29.1 mg NH₄⁺ / (L d) όταν η συγκέντρωση των διτανθρακικών ήταν 1.5 g/L αλλά μειώθηκε στα 12.3 mg NH₄⁺ / (L d) για τα 2 g/L. Αντίστοιχα ο ρυθμός απομάκρυνσης νιτρικών αυξήθηκε από το 15.9 στο 37.3 mg NO₂⁻ / (L d) καθώς η συγκέντρωση των διτανθρακικών αυξήθηκε από το 1g/L στα 1.5 g/L και μειώθηκε απότομα στα 9.5 mg NO₂⁻ / (L d) σε 2.0 g/L διτανθρακικά. Όταν η εισροή των διτανθρακικών μειώθηκε σε 1.0 g/L η δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων αποκαταστάθηκε και τόσο ο ρυθμός απομάκρυνσης αμμωνιακών όσο και ο ρυθμός απομάκρυνσης νιτρικών αυξήθηκαν και έφτασαν το 18.7 mg NH₄⁺ / (L d) και 18.3 mg NO₂⁻ / (L d). Ως βέλτιστη δόση θα μπορούσε να θεωρηθεί η συγκέντρωση εισροής διτανθρακικών 1.5 g/L, όπου ο ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου έφτασε το 66.4 mg N / (L d).

Η μείωση της δραστηριότητας των ANAMMOX βακτηρίων που εμφανίστηκε κατά την εισροή συγκέντρωσης 2.0 g/L πιθανόν λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ελεύθερης αμμωνίας (NH₃). Η ελεύθερη αμμωνία σχετίζεται άμεσα με το pH, την συγκέντρωση των αμμωνιακών και τη θερμοκρασία (Liao et al. 2008). Το pH στον αντιδραστήρα έφτασε το 8.1 όταν η συγκέντρωση των διτανθρακικών έγινε ίση με 2.0 g/L. Η συγκέντρωση της ελεύθερης αμμωνίας αυξήθηκε από 3.3 σε 13.3 mg/L.

Μια αντίστοιχη μελέτη πραγματοποίησαν οι Yang et al. (2010), με σκοπό την επίδραση του ανόργανου άνθρακα στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Χρησιμοποίησαν έναν ανοδικής ροής αντιδραστήρα ANAMMOX (up-flow Anammox reactor), όγκου 5.8L, σε θερμοκρασία 33 ± 1 °C και pH 7.1 ± 0.2, ενώ η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου

διατηρήθηκε κάτω από 0.5 mg/L. Η διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος ήταν 110 ημέρες κατά τις οποίες η συγκέντρωση του ολικού αζώτου της εισροής αυξήθηκε από 100 σε 920 mg/L και ο χρόνος υδραυλικής παραμονής μειώθηκε από 10 σε 1.5 ώρες. Την 110^η ημέρα καταγράφηκε ρυθμός φόρτισης ολικού αζώτου ίσος με 14.8 kg-Nm⁻³ day⁻¹ και ο αντίστοιχος ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου ίσος με 11.8 kg-Nm⁻³ day⁻¹.

Την 51^η ημέρα εισήχθησαν διτανθρακικά στον αντιδραστήρα και συνέχισαν να εισάγονται με αυξανόμενες δόσεις από 60 σε 220 mg/L έως την ημέρα 77. Το NLR διατηρήθηκε σταθερό στο 5.0 ± 0.4 kg-Nm⁻³ day⁻¹ και ο ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου παρέμεινε πάνω από 80% με μέση εκροή NO₂⁻ N κάτω από 2.5 mg/L. Χρησιμοποιήθηκε υδροχλωρικό οξύ στην εισροή για τη διατήρηση του pH μεταξύ των τιμών 7 και 7.3.



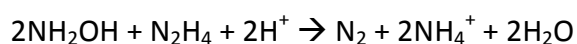
σχήμα 5.20: Επίδοση του ANAMMOX αντιδραστήρα υπό τις διαφορετικές συγκεντρώσεις δισανθρακικών, Yang et al., 2010.

Από την 51^η ημέρα έως την 55^η ο λόγος ανόργανου του άνθρακα προς το άζωτο αυξήθηκε από 0.07 σε 0.11 (η συγκέντρωση του ανόργανου άνθρακα αυξήθηκε από 30 σε 45 mg/L) και η συγκέντρωση των νιτρικών της εκροής μειώθηκε από 8 σε 0.8 mg/L. Ο ρυθμός φόρτισης αζώτου αυξήθηκε τότε κατά 0.4 kg, μειώνοντας τον υδραυλικό χρόνο παραμονής, και ο λόγος του ανόργανου άνθρακα προς το άζωτο επίσης αυξήθηκε από 0.12 σε 0.18 (η συγκέντρωση ανόργανου άνθρακα αυξήθηκε από 45 σε 75 mg/L) με την συγκέντρωση εκροής των νιτρικών να πέφτει από το 3.5 στο 1.5 mg/L, γεγονός που υποδεικνύει τη θετική επίδραση της προσθήκης ανόργανου άνθρακα στην απομάκρυνση του αζώτου. Από την ημέρα 63 έως την ημέρα 78 συνεχίστηκε η αύξηση του λόγου του ανόργανου άνθρακα προς το άζωτο στο 0.42, με την συγκέντρωση ανόργανου άνθρακα να φτάνει στα 200 mg/L.

Στην περίπτωση αυτή δεν παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ανόργανου άνθρακα, σε αντίθεση με αυτό που συνέβη στην περίπτωση των Liao et al. (2008). Ωστόσο λαμβάνοντας υπόψη τον παράγοντα του κόστους, η υψηλή συγκέντρωση ανόργανου άνθρακα θεωρείται αντιοικονομική για βιομηχανική εφαρμογή. Επομένως μία συγκέντρωση ανόργανου άνθρακα περίπου 150 mg/L εφαρμόστηκε κατά το υπόλοιπο της διεξαγωγής του πειράματος (έως την ημέρα 110). Ο λόγος ανόργανου άνθρακα προς άζωτο λοιπόν έπεσε στο 0.16 καθώς η συγκέντρωση αζώτου αυξήθηκε από 535 σε 920 mg/L κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, όπου η απόδοση της απομάκρυνσης αζώτου παρέμεινε πάνω από 80%. Από τα πειραματικά αποτελέσματα λοιπόν των Yang et al. (2010), προκύπτει ότι μια εισροή ανόργανου άνθρακα ίση με 150 mg/L φαίνεται να αποτελεί κατάλληλη δοσολογία για την αποδοτική απομάκρυνση αζώτου μέσω της διεργασίας της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας.

Οι συγγραφείς δίνουν πιθανές εξηγήσεις για την υψηλού ρυθμού απομάκρυνση αζώτου με την προσθήκη επαρκούς πηγής ανόργανου άνθρακα. Παλαιότερη αναφορά των Strous et al. (1999) αναδεικνύει ως βέλτιστο εύρος pH τιμές μεταξύ 6.7 και 8.3 για την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Το υψηλό pH στον αντιδραστήρα λόγω της κατανάλωσης H^+ από τη διεργασία και ειδικά κάτω από υψηλά φορτία αζώτου, μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητα των βακτηρίων. Μια εξήγηση λοιπόν είναι ότι μια επαρκής πηγή ανόργανου άνθρακα λειτουργεί ως ρυθμιστής του pH, παρέχοντας μία δικλείδα ασφαλείας για τα ANAMMOX βακτήρια, καθώς είναι γνωστό ότι όσο υψηλότερο το pH τόσο ισχυρότερη είναι η πτώση στη δραστηριότητα των βακτηρίων (Strous et al. 1998). Το pH στον αντιδραστήρα ANAMMOX αποτελεί τον κρισιμότερο παράγοντα για την επίτευξη υψηλότερης απόδοσης απομάκρυνσης αζώτου και δραστηριότητας των βακτηρίων. Αυτός λοιπόν είναι ένας πιθανός λόγος -ίσως όχι ο μοναδικός- για τον υψηλό ρυθμό απομάκρυνσης αζώτου μέσω της διεργασίας της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (Yang et al. 2010).

Μια άλλη εξήγηση είναι ότι ο ανόργανος άνθρακας μπορεί να διαδραματίζει ένα καταλυτικό ρόλο στην παραγωγή και την αποσύνθεση της υδροξυλαμίνης (NH_2OH) και της υδραζίνης (N_2H_4). Ένας νέος υποθετικός μηχανισμός πρόσφατα πρότεινε ότι η οξείδωση της υδραζίνης σε N_2 συνοδεύεται με αναγωγή της υδροξυλαμίνης σε NH_4^+ , όπως περιγράφεται και από την ακόλουθη εξίσωση (Van der Star et al., 2008):

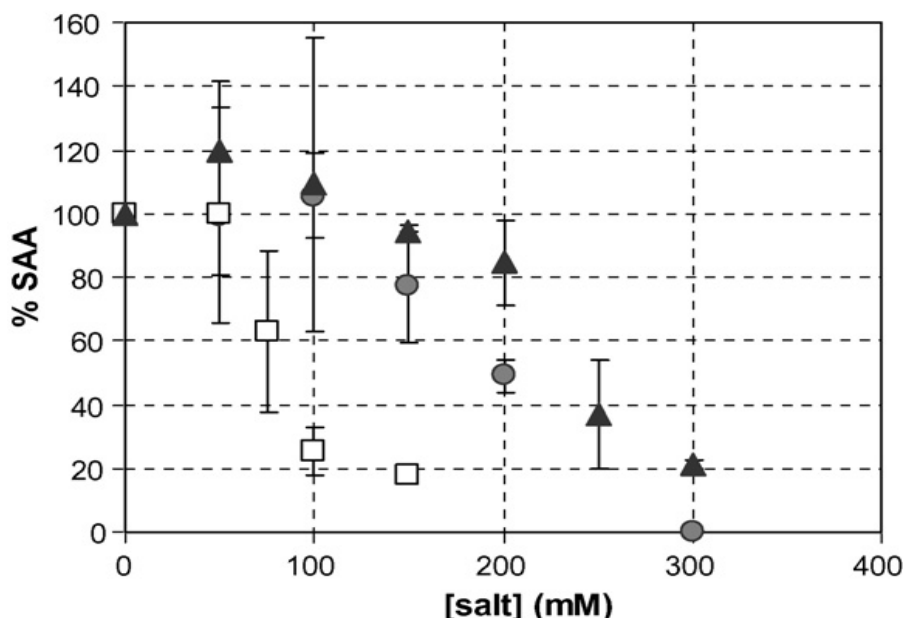


Η παραγωγή υδροξυλαμίνης και υδραζίνης είναι συνεχείς καθώς οι ενώσεις αυτές αποτελούν ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης ANAMMOX. Με βάση την υπόθεση αυτή λοιπόν, η μείωση στο ρυθμό αναγωγής της υδραζίνης, οδηγεί στη μείωση του ρυθμού οξείδωσης της υδραζίνης, με συνέπεια τη συσσώρευση της υδραζίνης (Van der Star et al., 2008). Η προσθήκη διαλυμένου ανόργανου άνθρακα είναι πολύ πιθανό να επιταχύνει το ρυθμό αποσύνθεσης της υδροξυλαμίνης, γεγονός που οδηγεί στη συσσώρευση της υδραζίνης. Η διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας θα μπορούσε επίσης να

μετατρέψει βιολογικά την υδραζίνη σε αέριο άζωτο. Κατά συνέπεια ο ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου μπορεί να αυξηθεί έως ένα συγκεκριμένο βαθμό με την επαρκή προσθήκη ανόργανου άνθρακα. Ωστόσο, περαιτέρω διερεύνηση θα έπρεπε να λάβει χώρα για αυτή την υπόθεση (Yang et al. 2010).

5.8 Αλατότητα

Μια άλλη παράμετρος η οποία έχει εξεταστεί ως προς την επίδρασή της στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας είναι η αλατότητα. Οι Darpena-Mora et al. 2007, στα πλαίσια της μελέτης διάφορων παραγόντων ως προς την επίδρασή τους στην ANAMMOX διεργασία, εξέτασαν και διάφορα άλατα. Πιο συγκεκριμένα, μελέτησαν την επίδραση των NaCl, KCl και Na₂SO₄ σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα ποσοστά της δραστηριότητας των ANAMMOX βακτηρίων που διατηρήθηκαν κατά την προσθήκη των συγκεντρώσεων των προαναφερόμενων αλάτων παρουσιάζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί (σχήμα 5.21).



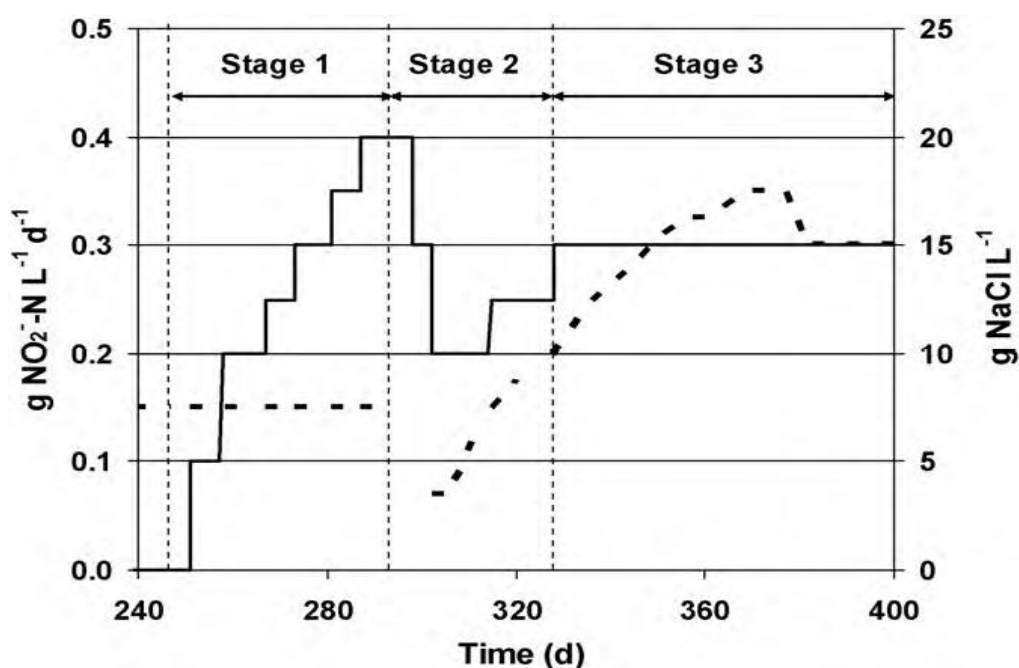
Σχήμα 5.21: Επίδραση των KCl (●), NaCl (▲) and Na₂SO₄ (□) στη μέγιστη SAA., Darpena- Mora et al. 2007.

Όπως είναι φανερό, οι συγκεντρώσεις NaCl κάτω από 150 mM δεν επηρέασαν τη δραστηριότητα των βακτηρίων, ενώ τα KCl και Na₂SO₄ εμφάνισαν επιπτώσεις μόνο για συγκεντρώσεις υψηλότερες από 100 και 50 mM, αντίστοιχα. Μάλιστα το IC₅₀ (η συγκέντρωση μιας ουσίας που προκαλεί 50% μείωση της διεργασίας) που καταγράφηκε για το Na₂SO₄ (80 mM) ήταν κατά πολύ μικρότερο σε σχέση με τα IC₅₀ των NaCl και KCl (230 and 200 mM, αντίστοιχα). Σύμφωνα με τους προαναφερόμενους ερευνητές, υπεύθυνα για τον περιορισμό της δραστηριότητας των βακτηρίων είναι τα ιόντα νατρίου που περιέχεται στα NaCl και Na₂SO₄.

Την αρνητική επίδραση των ιόντων νατρίου κατέγραψαν επίσης οι Soto et al.(1993) για τη μεθανογόνα δράση στην αναερόβια επεξεργασία λυμάτων από εκτροφείο μυδιών. Επίσης τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με αυτά των van de Graaf et al. (1996), οι οποίοι κατέγραψαν μηδαμινές επιδράσεις του KCl στη δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων σε συγκεντρώσεις 50 mM. Η μείωση στη δραστηριότητα κατά την παρουσία των αλάτων θα μπορούσε να αποδοθεί στην αύξηση της οσμωτικής πίεσης στο μέσο που περιβάλλει τα κύτταρα και επηρεάζει το σύστημα μεταφοράς διαμέσου της μεμβράνης.

Η ανθεκτικότητα της βιομάζας ANAMMOX που καταγράφηκε με τις αναλύσεις των Darpena-Mora et al. 2007 καθώς και το γεγονός ότι αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν βρεθεί σε διάφορα θαλάσσια περιβάλλοντα (Arrigo et al.,2005) οδηγεί στην πρόβλεψη ότι η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για την εφαρμογή σε εκροές με υψηλή αλατότητα.

Με μεταγενέστερη έρευνα, οι Darpena-Mora et al. 2010, εξέτασαν την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl στην δραστηριότητα των ANAMMOX βακτηρίων (SAA), κάτω από διαφορετικές συνθήκες για τη διαπίστωση των ικανών τιμών για την πρόβλεψη των δυνατοτήτων του συστήματος καθώς και για τη μελέτη της επίδρασης των αλάτων στις φτωκές ιδιότητες των βακτηρίων. Χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας SBR, όγκου 3 L, σε θερμοκρασία 35° C, εφοδιασμένος με μηχανικό αναδευτήρα, με ταχύτητα περιστροφής 100 rpm. Το pH κυμάνθηκε από 7.5 έως 8.0 και ο υδραυλικός χρόνος παραμονής καθορίστηκε στη 1 d. Ο εμπλουτισμός της βιομάζας έγινε με βακτήρια από το είδος *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"*. Η πειραματική διαδικασία διαχωρίστηκε σε τρία στάδια, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις εισροής των νιτρωδών και του άλατος, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα (σχήμα 5.22):



Σχήμα 5.22: Ρυθμός φόρτισης νιτρωδών (NiLR) (- - -) και συγκέντρωση εισροής του NaCl (-) στο σύστημα, κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, Darpena- Mora et al. 2010.

Για την εκτίμηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του NaCl στην περίπτωση της μη-προσαρμοσμένης βιομάζας εξετάστηκε δείγμα από τον αντιδραστήρα πριν την εισαγωγή αλάτων. Στη συνέχεια για την εκτίμηση της επίδρασης για την περίπτωση της προσαρμοσμένης βιομάζας, εξετάστηκαν δείγματα από κάθε στάδιο λειτουργίας του αντιδραστήρα.

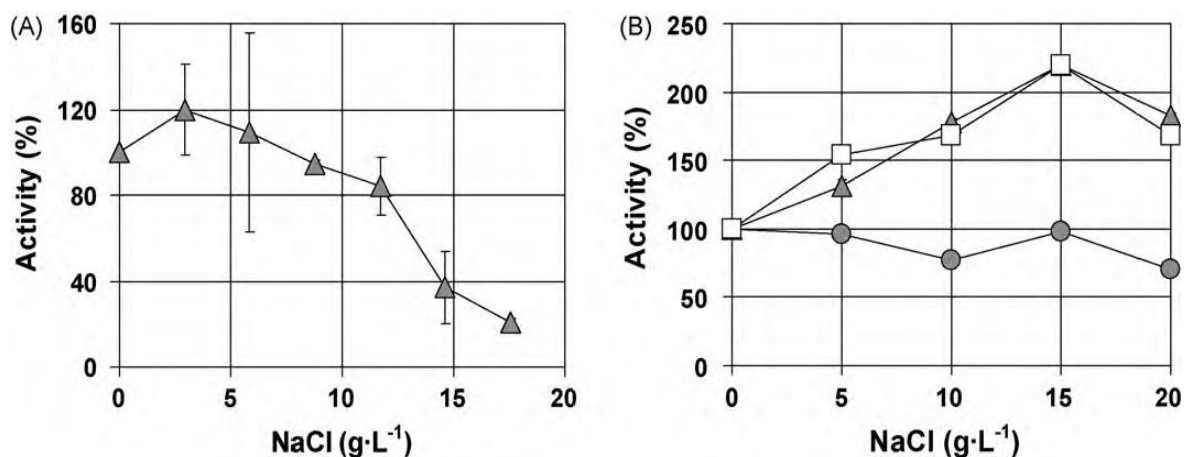
Η SAA της μη-προσαρμοσμένης βιομάζας μετρήθηκε $0.15 \text{ g NO}_2^- \text{N} / \text{g (VSS d)}$. Μία ευεργετική επίδραση στην SAA καταγράφηκε έως τη συγκέντρωση των 6 g/L NaCl , ενώ η IC_{50} , συγκέντρωση που προκάλεσε 50% μείωση της δραστηριότητας ANAMMOX, προσδιορίστηκε ίση με 13.5 g/L .

Τα αποτελέσματα των Darpena- Mora et al. (2010) συμφωνούν με εκείνα των Kartal et al. (2006) για πληθυσμό *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"*, αν και οι τελευταίοι παρατήρησαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη δική τους βιομάζα σε συνθήκες αλατότητας, καταγράφοντας ANAMMOX δραστηριότητα έως τη συγκέντρωση 90 g/L για το NaCl.

Στην περίπτωση της μελέτης της προσαρμοσμένης βιομάζας χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, ένα για κάθε στάδιο:

1. Ένα κοινό ρυθμιστικό διάλυμα (SB), που περιείχε $0.143 \text{ g KH}_2\text{PO}_4 / \text{L}$
2. Ένα κοινό ρυθμιστικό διάλυμα (SBS) με συγκέντρωση NaCl, ίδια με εκείνη του αντιδραστήρα
3. Το ίδιο υγρό μέσο του αντιδραστήρα στις αντίστοιχες συνθήκες.

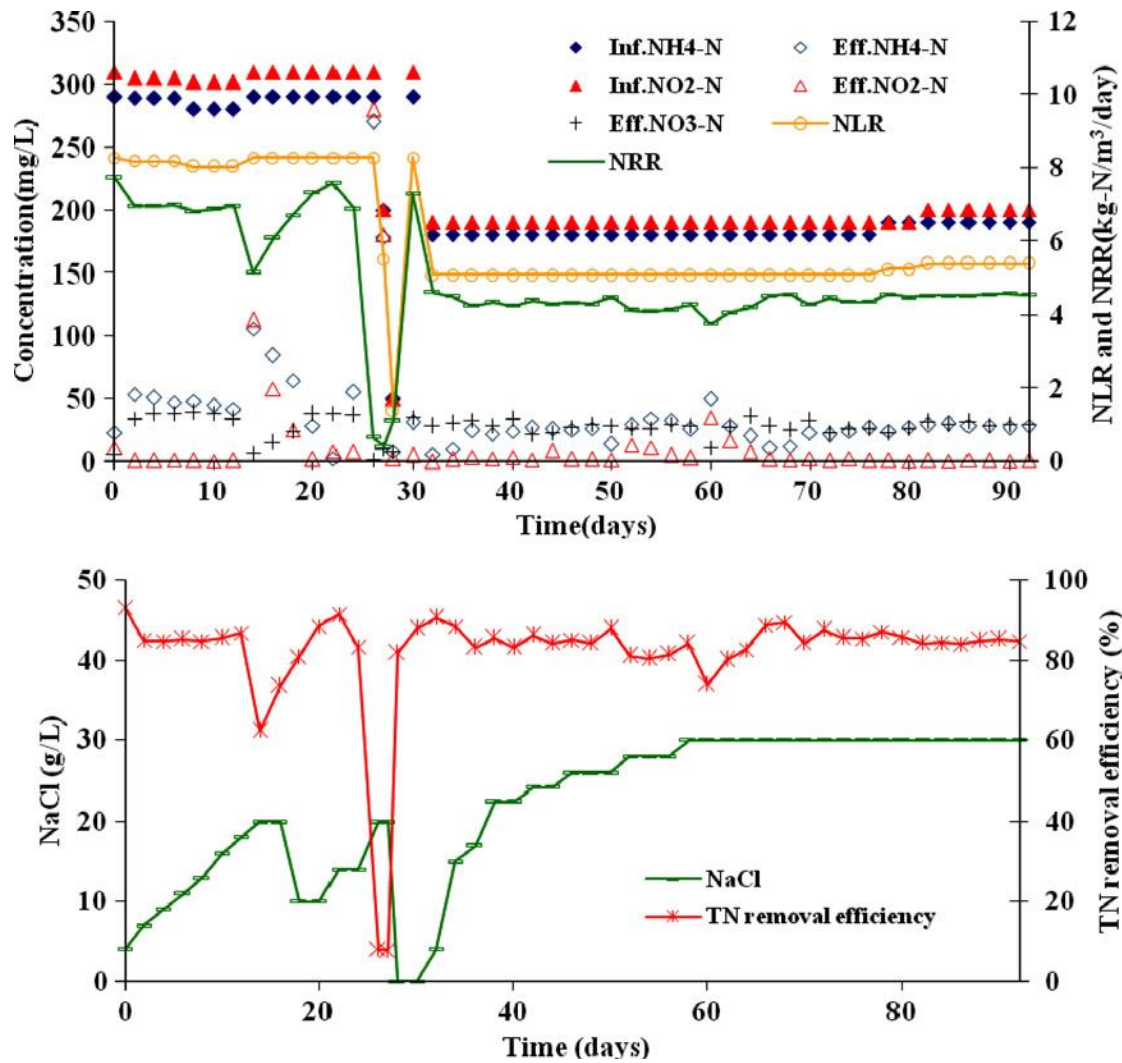
Όπως φαίνεται και από το παρακάτω διάγραμμα, τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα SB έδωσε σχεδόν σταθερές τιμές για την SAA για όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις NaCl ενώ μείωση καταγράφηκε μόνο όταν προστέθηκαν 20 g NaCl /L . Στα πειράματα με το SBS διάλυμα, η SAA της βιομάζας ήταν υψηλότερη από ότι στην προηγούμενη περίπτωση έως τη συγκέντρωση 15 g NaCl /L . Όταν εξετάστηκαν όμως τα 20 g NaCl /L , σημειώθηκε πτώση της SAA. Παρόμοια αποτελέσματα εξήγαγαν και οι Kartal et al. (2006), οι οποίοι παρατήρησαν αύξηση της SAA για την προσαρμοσμένη βιομάζα έως τη συγκέντρωση 30 g NaCl /L . Ωστόσο οι Windey et al. (2005), μελετώντας την συμπεριφορά της διεργασίας OLAND για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων υψηλής αλατότητας, παρατήρησαν ότι η δραστηριότητα της αυτό-προσαρμοσμένης ANAMMOX βιομάζας μειώθηκε κατά 59% σε 30 g NaCl/L .



Σχήμα 5.23: Οι τιμές της SAA για την μη-προσαρμοσμένη βιομάζα, με την παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (A), και οι τιμές της SAA για τη βιομάζα στον αντιδραστήρα που λειτουργούσε για την εξεταζόμενη συγκέντρωση NaCl (2B): πλύση της βιομάζας με κοινό ρυθμιστικό διάλυμα (SB) (●), πλύση της βιομάζας με ρυθμιστικό διάλυμα ίδιας συγκέντρωσης NaCl με αυτήν του αντιδραστήρα (SBS)(□), χωρίς την πλύση της βιομάζας (RB) (▲), Darpena- Mora et al. 2010

Φαίνεται ξεκάθαρα ότι η βιομάζα ANAMMOX είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στην παρουσία συγκέντρωσης NaCl. Το γεγονός αυτό δεν ήταν απρόσμενο, δεδομένου ότι πολλά ANAMMOX βακτήρια έχουν ταυτοποιηθεί σε θαλάσσια περιβάλλοντα (S. Liu et al. 2008, M. Schmid et al. 2003), όπου η συγκέντρωση αλάτων είναι ακόμα υψηλότερη από αυτές που εξετάστηκαν. Από την άλλη πλευρά, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι καθώς η ANAMMOX βιομάζα υποβάλλεται συνεχώς σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl, η ανθεκτικότητά της στο αλάτι αυξάνεται ξεκάθαρα, όπως έχει καταγραφεί και στο παρελθόν (Kartal et al. 2006, Windey et al. 2005).

Τέλος, η πιο πρόσφατη μελέτη για την επίδραση της αλατότητας στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας και σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος $23 \pm 2^\circ\text{C}$ έως $26 \pm 1^\circ\text{C}$, πραγματοποιήθηκε από τους Yang et al. 2010. Η πειραματική διαδικασία διήρκεσε 92 ημέρες, σε εργαστηριακής κλίμακας αντιδραστήρα στήλης, με τροφοδοσία συνθετικού ανόργανου υγρού λύματος, το οποίο περιείχε κυρίως $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ και $\text{NO}_2^- - \text{N}$. Το διαλυμένο οξυγόνο παρέμεινε κάτω από 0.5 mg/L. Ένας σταθερός ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου ίσος με $4.5 \pm 0.1 \text{ kg N} / (\text{m}^3 \text{ day})$ -περίπου 85%- καταγράφηκε για συγκεντρώσεις έως 30 g/L, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ANAMMOX βιομάζα προσαρμόστηκε άμεσα στις υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (σχήμα 5.24). Αυτός ο ρυθμός είναι ο υψηλότερος που έχει καταγραφεί σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων.



Σχήμα 5.24: Χρονική εξέλιξη των εισροών και εκροών αζώτου, NLR, NRR (A), συγκέντρωση NaCl και TNRR (B) του αντιδραστήρα, Yang et al. 2010.

Επιπροσθέτως, οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης επιβεβαιώνουν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων μπορούν να βελτιώσουν τις φυσικές ιδιότητες της βιομάζας του αντιδραστήρα.

6. Εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών λυμάτων

Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας πρωτίστως ανακαλύφθηκε σε εγκατάσταση επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (van de Graaf et al., 1990). Σε αυτόν τον τομέα λοιπόν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η εν λόγω διεργασία στο άμεσο μέλλον. Υπολογίζεται ότι η χρήση του ANAMMOX στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων θα μπορούσε θεωρητικά να μειώσει το κόστος λειτουργίας σε ιδιαίτερα υψηλό βαθμό (Jetten et al., 2005). Αυτή η πρόβλεψη βασίζεται κυρίως στο γεγονός ότι το απαιτούμενο οξυγόνο μειώνεται κατά το ήμισυ, συγκριτικά πάντα με τη συμβατική μέθοδο νιτροποίησης-απονιτροποίησης. Δευτερευόντως, δεν απαιτείται προσθήκη μεθανόλης ως πηγή άνθρακα, κάτι που συμβαίνει σε κάποιες περιπτώσεις λυμάτων.

Επιπροσθέτως, πέρα από τη μείωση του κόστους, σημαντικό πλεονέκτημα της εφαρμογής του ANAMMOX αποτελεί η αποφυγή της παραγωγής CO₂ κατά το στάδιο της απονιτροποίησης και μάλιστα η περαιτέρω κατανάλωσή του από τα βακτήρια (Paredes et al., 2007).

6.1 Οι πλέον σημαντικές τεχνολογίες για το μετασχηματισμό του αζώτου

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές χημικές και βιοχημικές διαδρομές για τη μετατροπή των ενώσεων του αζώτου σε αέριο άζωτο. Στον πίνακα που ακολουθεί απεικονίζονται οι πλέον σημαντικές διεργασίες για την επεξεργασία του φορτίου του αζώτου στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Ο απώτερος σκοπός είναι η μετατροπή του αμμωνίου σε αέριο άζωτο με τη μικρότερη δυνατή χρήση πόρων και χωρίς την παραγωγή αερίων του θερμοκηπίου όπως το υποξείδιο του αζώτου (N₂O). Η παραδοχή ότι ο μόνος τρόπος βιολογικής μετατροπής του αμμωνιακού αζώτου σε αέριο άζωτο είναι μέσω της αερόβιας μετατροπής του σε νιτρικά (νιτροποίηση) με ακόλουθη την απονιτροποίηση, έχει πλέον ανατραπεί. Η ανακάλυψη άλλων μεταβολικών διαδρομών, αερόβιων και αναερόβιων, έχει οδηγήσει στην εφαρμογή τους στην περιβαλλοντική βιοτεχνολογία.

Ανάλογα λοιπόν με τα χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων και την παράμετρο του κόστους, διαφορετικές τεχνολογίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση του αζώτου, συμπεριλαμβανομένων των συμβατικών βιολογικών συστημάτων απομάκρυνσης αζώτου και των φυσικών συστημάτων. Στον πίνακα που ακολουθεί (τροποποιημένος από L. Gut 2006) εμφανίζονται οι βιολογικές αντιδράσεις μεταξύ των μορφών του αζώτου, πίνακας 6.1, στις οποίες και βασίζονται η λειτουργία όλων των τεχνολογιών βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου.

Πίνακας 6.1: βασικές βιολογικές αντιδράσεις μεταξύ των μορφών αζώτου.

	Αντίδραση	Διεργασία	Μικροοργανισμοί	Αναφορές
1a	$C_5H_7O_2N+4H_2O \rightarrow 2.5CH_4+1.5CO_2+HCO_3^- + NH_4^+$	αμμωνιοποίηση (αναερόβια)	βακτήρια	Rittmann and McCarty (2001); Henze et al. (2002)
1b	$C_5H_7O_2N+5O_2 \rightarrow 4CO_2+HCO_3^- + NH_4^+ +H_2O$	αμμωνιοποίηση (αναερόβια)	βακτήρια	
2	$NH_4^+ + OH^- \rightarrow NH_3+H_2O$	Ισοζύγιο αμμωνίου/ αμμωνίας	Όχι, χημική απομάκρυνση	
3	$4CO_2+HCO_3^- +NH_4^++H_2O \rightarrow C_5H_7O_2N+5O_2$	Assimilation	βακτήρια, Αλγη (ανάπτυξη)	
4	$NH_4^++1.5O_2 + 2HCO_3^- \rightarrow NO_2^-+2CO_2+3H_2O$	Νιτρωδοποίηση (nitritation)	Nitrosomonas, e.g. N. eutropha, N. europea; Nitrosospira	
5	$NO_2^-+0.5O_2 \rightarrow NO_3^-$	Νιτρικοποίηση (nitrataion)	Nitrobacter, e. g. N. agilis, Nitrospira, Nitrococcus, Nitrosocystis	
4+5	$NH_4^++2O_2 + 2HCO_3^- \rightarrow NO_3^-+2CO_2+3H_2O$	Νιτροποίηση	Νιτροποιητικά βακτήρια	
6	$C+2NO_3^- \rightarrow 2NO_2^-+CO_2$	denitrataion	Απονιτροποιητικά ετερότροφα βακτήρια	
7	$3C+2H_2O+CO_2+ 4NO_2^- \rightarrow 2N_2+4HCO_3^-$	denitrataion	Απονιτροποιητικά ετερότροφα βακτήρια	
6+7	$5C+2H_2O+4NO_3^- \rightarrow 2N_2+4HCO_3^- +CO_2$	Απονιτροποίηση	Ετερότροφα: Pseudomonas, Bacillus, Alcaligenes	
8	$NH_4^++0.75O_2+ HCO_3^- \rightarrow 0.5NH_4^++ 0.5NO_2^-+CO_2+1.5H_2O$	Μερική νιτρωδοποίηση (Partial nitritation)	Ammonium-oxidizing bacteria	van Dongen et al. (2001a)
9a	$NH_4^++NO_2^- \rightarrow N_2+2H_2O$	Anammox (without cell synthesis)	Planctomycetales	
9b	$NH_4^++1.32NO_2^- + 0.066HCO_3^- \rightarrow 1.02N_2+0.26NO_3^- + 0.066CH_2O_{0.5}N_{0.15}+2.03H_2O$	Anammox (with cell synthesis)	Planctomycetales	
4+7	$4 NH_4^++6O_2+3C+ 4HCO_3^- \rightarrow 2N_2+7CO_2+10H_2O$	Modified nitrogen removal	Βακτήρια	Rittmann and McCarty (2001); Henze et al. (2002)
4+5+6+7	$4 NH_4^++8O_2+5C+4HCO_3^- \rightarrow 2N_2+9CO_2+10H_2O$	Traditional nitrogen removal	Βακτήρια	
4+9	$NH_3+0.85O_2 \rightarrow 0.11NO_3^- +0.44N_2+0.14H^+ + 1.43H_2O$	CANON	Νιτροποιητικά βακτήρια Planctomycetales	Sliekers et al. (2002)
10	$NH_4^++0.75O_2 \rightarrow 0.5N_2+H^++1.5H_2O$	OLAND	Nitrosomonas	Verstraete and Philips (1998)
11	$3NH_4^++3O_2+3[H] \rightarrow 1.5N_2+3H^++6H_2O$	NOx μέθοδος	Nitrosomonas	Schmidt et al. (2003)

6.1.1 Συμβατική μέθοδος νιτροποίησης-απονιτροποίησης

Η τεχνολογία αυτή είναι η πλέον ανεπτυγμένη και εφαρμοσμένη για την απομάκρυνση αζώτου ανά τον κόσμο. Μάλιστα, είναι διαθέσιμη σε πολλούς διαφορετικούς σχεδιασμούς (Henze et al., 2002 και M. van Loodstrecht and Salem, 2005). Με αυτή την μέθοδο η αμμωνία μετατρέπεται σε νιτρικά μέσω των νιτρωδών, κατά το πρώτο στάδιο (νιτροποίηση). Τα νιτρικά, σε δεύτερο στάδιο (απονιτροποίηση), ανάγονται σε αέριο άζωτο (N_2) μέσω πολυάριθμων ετεροτροφικών βακτηρίων σε τέσσερα αναγωγικά βήματα, χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα που περιέχεται στα υγρά απόβλητα ως δότες ηλεκτρονίων. Αυτά τα αναγωγικά βήματα περιλαμβάνουν την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη, οξείδιο του αζώτου, υποξείδιο του αζώτου και τέλος σε αέριο άζωτο.

Ο ολικός ρυθμός και η έκταση της απονιτροποίησης εξαρτάται κυρίως από τα χαρακτηριστικά της βιοδιασπαστικής ικανότητας του δότη ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται και από την τελική αναλογία N/COD στο βιοαντιδραστήρα. Για τους λόγους αυτούς, η απονιτροποίηση μπορεί να επαυξηθεί με την προσθήκη στα υγρά απόβλητα εύκολα βιοδιασπώμενων πηγών άνθρακα -όπως οξικό οξύ και μεθανόλη- ή πηγών άνθρακα με υψηλή αναλογία COD/N . Ωστόσο η προσθήκη αυτών των πηγών άνθρακα είναι ακριβή και αυξάνει το λειτουργικό κόστος της εγκατάστασης επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Paredes et al, 2007).

Σε γενικές γραμμές αυτή η τεχνολογία καταναλώνει μια καθόλου αμελητέα ποσότητα πόρων: 4.57 kg O_2 και 2-4 kg COD απαιτούνται ανά kg αμμωνίας. Αυτό συνεπάγεται λοιπόν την ανάγκη αερισμού του συστήματος για τη νιτροποίηση καθώς και την σε ορισμένες περιπτώσεις ανάγκη τροφοδοσίας με εξωτερική πηγή άνθρακα για την απονιτροποίηση. Επιπροσθέτως, εφόσον τα δύο αυτά στάδια θα πρέπει να αναπτυχθούν σε διαφορετικούς αντιδραστήρες, αυξάνονται σημαντικά τα κόστη κατασκευής, λειτουργίας και συντήρησης της εγκατάστασης (M. van Loodstrecht and Salem, 2005).

6.1.2 Αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας

Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας για την απομάκρυνση του αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του λειτουργικού κόστους έως και 90% καθώς και σε μείωση των εκπομπών N_2O (M. van Loodstrecht and Salem, 2005). Κατά κύριο λόγο απευθύνεται σε υγρά λύματα με υψηλά φορτία αμμωνίας και χαμηλά επίπεδα οργανικής ύλης. Αρκετά είδη αντιδραστήρων μεγάλης παραμονής βιομάζας έχουν εξεταστεί σε εργαστηριακή κλίμακα, συμπεριλαμβανομένων των αντιδραστήρων διακοπτόμενου έργου (Sequencing Batch Reactors), air/gas lift reactors, αντιδραστήρων προσκολλημένης βιομάζας (fixed bed reactors), περιστρεφόμενων βιολογικών δίσκων (rotating biological contactors), και αναερόβιων αντιδραστήρων ιλύος με κλίση ανοδικής ροής (upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors) (Jetten et al. 2001, A. Dapena-Mora et al. 2004, W. Jianlong and K. Jing 2005, J. E. Schmidt et al. 2004, Windey et al. 2005).

Οι δραστηριότητες που εντοπίστηκαν στις εφαρμογές αυτές μπορούν να διαχωριστούν σε δύο γενικές κατηγορίες σύμφωνα με τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα: συστήματα δύο αντιδραστήρων και συστήματα ενός αντιδραστήρα. Στα συστήματα δύο αντιδραστήρων η μερική νιτροποίηση λαμβάνει χώρα στον πρώτο αντιδραστήρα και η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας στο δεύτερο. Στα συστήματα ενός αντιδραστήρα και οι δύο διεργασίες συμβαίνουν στον ίδιο αντιδραστήρα (Paredes et al, 2007). Στις περισσότερες περιπτώσεις τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασίες 30° C ή και μεγαλύτερες καθώς οι θερμοκρασίες αυτές αποτελούν και τις βέλτιστες για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Ωστόσο υπάρχουν και περιπτώσεις, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, όπου επιχειρείται η διεξαγωγή των πειραμάτων σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, με αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

6.1.2.1 Συστήματα δύο αντιδραστήρων

Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας απαιτεί εισροή που θα περιέχει σχεδόν ίσες ποσότητες αμμωνίας και νιτρώδων. Επομένως απαιτείται ένα πρώτο στάδιο μερικής νιτροποίησης. Σε αυτό το στάδιο θα πρέπει να αποφευχθεί η ολική νιτροποίηση καθώς η εκροή, η οποία και θα τροφοδοτήσει στη συνέχεια τη δεύτερη μονάδα, θα πρέπει να περιέχει 50% αμμωνία και 50% νιτρώδη. Διαφορετική διαμόρφωση των αντιδραστήρων και διαφορετικές ποιότητες εκροής έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειραματική και πιλοτική κλίμακα, για διαφορετικά φορτία αζώτου (Sliekers et al.2003).

Τα συστήματα που έχουν χρησιμοποιηθεί εμφανίζουν μεγάλη και αποτελεσματική παραμονή βιομάζας ώστε να μειωθούν οι επιπτώσεις της αργής αναπαραγωγής των ANAMMOX βακτηρίων. Τα εφαρμοσμένα φορτία και οι ρυθμοί απομάκρυνσης αζώτου επιδεικνύουν μεγάλη διαφοροποίηση, ανάλογα με τον αντιδραστήρα, πίνακας 6.2. Ο υψηλότερος ρυθμός απομάκρυνσης (8.9 kg N/m³ d) καταγράφηκε από τους Sliekers et al.(2003) σε πειραματική και πιλοτική κλίμακα, με τη χρήση ενός αντιδραστήρα air/gas lift με κοκκώδη ιλύ.

Πίνακας 6.2: Πειραματικές εφαρμογές της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε συστήματα δύο αντιδραστήρων.

Τύπος αντιδραστήρα	Τύπος λύματος	Ρυθμός φόρτισης N (kg N/ m ³ d)	Ρυθμός απομάκρυνσης N (kg N/ m ³ d)	Βιβλιογραφική πηγή
Αντιδραστήρας προσκολλημένης βιομάζας	συνθετικό	1.3	1.1	M. Strous et al. 1997
	συνθετικό	0.07-0.55	0.35-0.38	C.Fux et al. 2004
	Στραγγίδια ιλύος	Δεν προσδιορίζεται	3.5	C.Fux et al. 2004
Αντιδραστήρας ρευστοποιημένης κλίνης	συνθετικό	0.2-2	1.8	M. Strous et al. 1997
	Στραγγίδια ιλύος	2.5	1.5	M. Strous et al. 1997
	Στραγγίδια ιλύος	0.48-2.63	2.5	M.S.M. Jetten et al. 1997

Αντιδραστήρας διακοπτόμενου έργου	Στραγγίδια ιλύος	1.0	0.75	L. G. J. M. van Dongen et al. 2001
	Στραγγίδια ιλύος	2.6	2.4	C.Fux et al. 2002
	συνθετικό	1.4	1.1	A.Dapena-Mora et al. 2004
Non-woven strips suspended reactor	συνθετικό	Δεν προσδιορίζεται	1.25	T. Fujii et al. 2002
Air/gas lift reactor	συνθετικό	2.3	2.0	A.Dapena-Mora et al. 2004
	συνθετικό	10.7	8.9	A.O.Sliekers et al. 2003
Αντιδραστήρας προσκολλημένης βιομάζας ανοδικής ροής	συνθετικό	0.52	0.51	J.E. Schmidt et al. 2004
	Λύματα χοιροστασίου	0.84-1.02	0.59-0.66	Y. H. Ahn et al. 2004
Αντιδραστήρας ανοδικής ροής	συνθετικό	Δεν προσδιορίζεται	2.9	U. Imajo et al. 2004
	συνθετικό	7.0	6.4	U. Imajo et al. 2004
Αντιδραστήρας διακοπτόμενου έργου	Στραγγίδια ιλύος	0.28	0.08	Vazquez-Padin et al. 2009
Αντιδραστήρας κινούμενης κλίνης	Στραγγίδια ΧΥΤΑ	0.07±0.01	0.06±0.01	Cema ,2007
Βιολογικοί περιστρεφόμενοι δίσκοι	Στραγγίδια ΧΥΤΑ	0.9±0.24	0.53±0.20	Cema ,2007
Αντιδραστήρας διακοπτόμενου έργου	Λύματα πλούσια σε αμμώνιο	2.65	2.4	Fux et al. 2006

6.1.2.2 Συστήματα ενός αντιδραστήρα

Θεωρητικά, ο συνδυασμός της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας και απονιτροποίησης μπορεί να παρατηρηθεί σε σύστημα βιοφίλμ, σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Για τις τυπικές μεθόδους απονιτροποίησης η πηγή οργανικού άνθρακα μπορεί να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα διότι ο δότης ηλεκτρονίου για την απονιτροποίηση οξειδώνεται πιο γρήγορα σε σχέση με την αμμωνία. Αν η αμμωνία είναι ο δότης ηλεκτρονίου τότε το πρόβλημα αυτό δεν υφίσταται (M. van Loodsrecht et al.,2004).

Στον πίνακα 6.3 φαίνονται κάποιες από τις πειραματικές εφαρμογές της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, με τη χρήση ενός μόνο αντιδραστήρα, διαφόρων τύπων. Οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων, το είδος του λύματος που εξετάστηκε, το είδος των ANAMMOX βακτηρίων, το φορτίο αζώτου της εισροής και διάφορα άλλα χαρακτηριστικά οδήγησαν στην εμφάνιση ενός εύρους απόδοσης της διεργασίας. Από ότι φαίνεται όμως, σε πειραματική κλίμακα, ο μεγαλύτερος ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου, $17.5 \text{ kg N/ m}^3 \text{ d}$, καταγράφηκε από τους Yang et al. 2010b, και μάλιστα σε θερμοκρασία $23 \pm 2^\circ \text{ C}$, με συγκέντρωση ANAMMOX λάσπης 22 g-MLSS L^{-1} , και χρόνο παραμονής 1.0-1.3 d.

Πίνακας 6.3: Πειραματικές εφαρμογές της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε συστήματα ενός αντιδραστήρα.

Τύπος αντιδραστήρα	Τύπος λύματος	Ρυθμός φόρτισης N ($\text{kg N/ m}^3 \text{ d}$)	Ρυθμός απομάκρυνσης N ($\text{kg N/ m}^3 \text{ d}$)	Βιβλιογραφική πηγή
Περιστρεφόμενοι βιολογικοί δίσκοι (RBC)	Στραγγίδια ΧΥΤΑ	1.4-3.2	0.4-1.2	H. Siegrist et al. 1998
	Στραγγίδια ΧΥΤΑ	1.5	0.9	A.Hippen et al. 2001
	συνθετικό	2.3	1.55	K.Pynaert et al. 2002
Αντιδραστήρας κινούμενης κλίνης	Στραγγίδια ιλύος	4.8	2.4	A.Hippen et al. 2001
	Στραγγίδια ιλύος	4-8	2.0	C.F.Seyfried et al. 2001
Αντιδραστήρας με μεμβράνη	Στραγγίδια ΧΥΤΑ	0.09	0.07	Cema ,2007
Αντιδραστήρας κινούμενης κλίνης	Στραγγίδια ΧΥΤΑ	0.6±0.1	0.34±0.08	Cema ,2007
περιστρεφόμενοι βιολογικοί δίσκοι	Στραγγίδια ΧΥΤΑ	1.12±0.23	0.83±0.32	Cema ,2007
Αντιδραστήρας ανοδικής ροής με βιοφίλτρο	συνθετικό	Δεν προσδιορίζεται	12	Zhiyong Tian et al. 2009
Αντιδραστήρας στήλης ανοδικής ροής	συνθετικό	14.8	11.8	Yang et al. 2010a
Αντιδραστήρας στήλης ανοδικής ροής	συνθετικό	19.2	17.5	Yang et al. 2010b
περιστρεφόμενοι βιολογικοί δίσκοι	Συνθετικό	Δεν προσδιορίζεται	3.4	Liu et al.
Αντιδραστήρας συνεχούς ανάδευσης	Συνθετικό	0.225	0.216	Samik Bagchi et al. 2010

Αντιδραστήρας συνεχούς ανάδευσης	Συνθετικό	0.662	0.582	Guven D et al. 2004
Gas lift reactor	Συνθετικό	10.7	8.9	Sliekers AO et al.
Gas lift reactor	Συνθετικό	2	1.78	Dapena-Mora A. et al. 2004
Αντιδραστήρας διακοπτόμενου έργου	Συνθετικό	0.60	0.59	Dapena-Mora A. et al. 2004
Αντιδραστήρας ανοδικής ροής προσκολλημένης βιομάζας	Συνθετικό	1.711	1.663	Tang et al. 2010
Αναερόβιος αντιδραστήρας ανοδικής ροής	Συνθετικό	36.2	14	Tsushima et al.2007
Αντιδραστήρας με φέρων μέσο (gel cubes)	συνθετικό	8	6	K.Isaka et al. 2007
Αντιδραστήρας διακοπτόμενου έργου	Συνθετικά στραγγίδια	1.6	1.59	Helio Lopez et al.2008
Αντιδραστήρας ανοδικής ροής προσκολλημένης βιομάζας	Συνθετικά στραγγίδια	13.92	11.7	Tang et al. 2009
Αντιδραστήρας διακοπτόμενου έργου	Συνθετικά στραγγίδια	0.74	100%	Fernandez et al. 2010
Αντιδραστήρας διακοπτόμενου έργου	συνθετικό	2.72	2.01	Ren-Cun Jin Et al. 2007
Αντιδραστήρας ανοδικής ροής προσκολλημένης βιομάζας	συνθετικό	2.5	1.98	Ren-Cun Jin Et al. 2007

Γενικά, υπάρχει η παραδοχή ότι τα συστήματα ενός αντιδραστήρα είναι περισσότερο κατάλληλα αλλά και περισσότερο περίπλοκα συγκριτικά με τα συστήματα δύο αντιδραστήρων. Κάποια μαθηματικά μοντέλα έχουν αναπτυχθεί για την κατανόηση και την πρόβλεψη της συμπεριφοράς του συστήματος για τις διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας και την επίπτωση του επιφανειακού φορτίου αμμωνίας (ASL).

Τα κύρια αποτελέσματα του μοντέλου έδειξαν ότι το ASL σχετίζεται με το πάχος του βιοφίλμ: ένα λεπτό βιοφίλμ έχει περιορισμένη χωρητικότητα-δυναμικότητα για τη δραστηριότητα της

αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας ενώ ο σταθερός σχηματισμός νιτρωδών αποτελεί τον περιοριστικό παράγοντα. Από την άλλη πλευρά, η διεργασία αυτή θα μπορούσε να λάβει χώρα σε συστήματα βιοφίλμ και ο καθοριστικός παράγοντας να είναι ο χρόνος, όχι το ASL. Για τα συστήματα αυτά είχε προβλεφθεί ότι πέντε έως δέκα χρόνια απαιτούνται για την επίτευξη του μέγιστου πληθυσμού ANAMMOX βακτηρίων (M. van Loodsrecht et al., 2004).

Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου αποτελεί επίσης έναν πολύ σημαντικό παράγοντα και συνδέεται με το πάχος του βιοφίλμ και την θερμοκρασία. Με ένα καθορισμένο ASL, σε χαμηλότερη θερμοκρασία απαιτείται πιο παχύ βιοφίλμ και κατ' επέκταση υψηλότερη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου. Ωστόσο μια μεγαλύτερη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, σε σχέση με την απαιτούμενη, θα προκαλούσε ολική νιτροποίηση και χαμηλότερο ποσοστό απομάκρυνσης αζώτου (Hao et al., 2002 και G. Koch et al., 2000).

6.1.3 SHARON (Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite)

Η μέθοδος SHARON (Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite) (αντίδραση 8) σχεδιάστηκε για την μείωση των υψηλών φορτίων αζώτου της εισροής (1 g NH_4^-N / L) σε μια μονάδα επεξεργασίας λυμάτων περισσότερο, παρά για την επίτευξη των επιθυμητών επιπέδων αζώτου στην εκροή. Οι συνθήκες που επικρατούν στον αντιδραστήρα ευνοούν τα οξειδωτικά βακτήρια του αμμωνίου με την έκπλυση των οξειδωτικών βακτηρίων των νιτρωδών μέσω του μικρού χρόνου παραμονής (περίπου 1 ημέρα) και της θερμοκρασίας πάνω από 30° C (van Dongen et al., 2001a). Σε ένα μόνο αντιδραστήρα επιβάλλεται διακοπτόμενος αερισμός για την επίτευξη μεγαλύτερων περιόδων αερόβιων συνθηκών και μικρότερων περιόδων αναερόβιων συνθηκών (Hellinga et al., 1998). Κατά την αναερόβια φάση προστίθεται μεθανόλη και λαμβάνει χώρα η απονιτροποίηση. Σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο νιτροποίησης απονιτροποίησης η απαίτηση σε οξυγόνο μειώνεται κατά 25% και ανέρχεται σε 3.43g O_2 /g N. Αντίστοιχα η εισαγωγή οργανικού υλικού μειώνεται κατά 40%, το οποίο ισοδυναμεί με 2.4 g COD/ g N (Mulder et al., 2001 και Hellinga et al., 1998). Η παραγωγή ιλύος είναι επίσης μικρότερη.

Έξι μεγάλης κλίμακας μονάδες SHARON έχουν κατασκευαστεί σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων στις πόλεις Rotterdam, Utrecht, Zwolle, Beverwijk, Garmer-wolde και Den Haag, στην Ολλανδία ενώ μια ακόμα βρίσκεται υπό κατασκευή στην Νέα Υόρκη, δυναμικότητας 3000000 ισοδύναμου πληθυσμού (van Loosrecht and Salem, 2005). Τα φορτία αζώτου που υποβάλλονται σε επεξεργασία στις μονάδες αυτές κυμαίνονται από 400 έως 2500kg N/ day. Το σύστημα αυτό έχει εφαρμοστεί σε αρκετές περιπτώσεις υγρών αποβλήτων, συμπεριλαμβανομένου του απορριπτόμενου νερού από χώνευση ιλύος, στραγγίσματα από χώρους υγειονομικής ταφής απορριμμάτων, λύματα από διεργασίες κομποστοποίησης και συμπυκνώματα από ξήρανση ιλύος.

6.1.4 CANON (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite)

Μια νέα μέθοδος που επιτρέπει το συνδυασμό νιτροποιητικών πληθυσμών και των βακτηρίων αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας ονομάστηκε Completely Autotrophic

Nitrogen removal Over Nitrite (CANON) (αντιδράσεις 4+9). Βασίζεται στο συλλογισμό της ταυτόχρονης νιτροποίησης-απονιτροποίησης, στον ίδιο αντιδραστήρα, σε σταθερές συνθήκες λειτουργίες (Keller et al., 1997; Surmacz-Górska et al., 1997; Helmer and Kunst, 1998; van Benthum et al., 1998; Yoo et al., 1999; van Loosdrecht et al., 2000; Third, 2003). Με την ανακάλυψη των ANAMMOX βακτηρίων προτάθηκε λοιπόν η εν λόγω μέθοδος, χρησιμοποιώντας τα ANAMMOX βακτήρια στη θέση των απονιτροποιητικών (Sliekers et al., 2002, 2003). Η περιορισμένη παρουσία είναι υποχρεωτική για την επίτευξη της συνεργασίας των δύο πληθυσμών. Η μέθοδος αυτή έχει δοκιμαστεί με επιτυχία σε πειραματικό επίπεδο σε αντιδραστήρες SBR (Third et al., 2001; Sliekers et al., 2002), σε βιοφίλμ, όπου τα νιτρώδη συγκεντρώνονται στο εξωτερικό αερόβιο τμήμα και η αντίδραση της αναερόβιας οξειδωσης λαμβάνει χώρα στα εσωτερικά αναερόβια τμήματα (Hao et al., 2002b; Hao and van Loosdrecht, 2003).

6.1.5 OLAND (Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification)

Δημοσιεύσεις που αφορούσαν στην ανεξήγητη απώλεια αζώτου κατά την απονιτροποίηση σε μεγάλης κλίμακας αντιδραστήρες με βιοφίλμ, οδήγησαν κάποιους ερευνητές στην ανάπτυξη της μεθόδου OLAND (Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification). Κατά τη μέθοδο αυτή τα βακτήρια οξειδωσης της αμμωνίας είναι σε θέση να οξειδώσουν το αμμώνιο σε αέριο άζωτο, σε έναν αντιδραστήρα, υπό αναερόβιες συνθήκες (Kuai and Verstraete 1980, Verstraete and Philips 1998, Rynaert et al. 2002). Τα είδη *Nitrosomonas* μπορούν να χρησιμοποιήσουν, ελλείψει δέκτη ηλεκτρονίου, τα νιτρώδη που παράγονται (αντίδραση 10). Η μέθοδος αυτή δεν εμφανίζει πολυπλοκότητα στη εφαρμογή της ωστόσο η απόδοσή της δεν θεωρείται επαρκής.

6.1.6 Ποιοτική και ποσοτική σύγκριση μεταξύ των τεχνολογιών απομάκρυνσης αζώτου

Είναι εμφανές λοιπόν ότι με την πρόοδο της τεχνολογίας ολοένα και περισσότερες επιλογές είναι διαθέσιμες όσον αφορά γενικότερα στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων και πιο συγκεκριμένα στην αφαίρεση του αζώτου από αυτά. Επομένως, ανάλογα με το είδος του λύματος και τα χαρακτηριστικά του αλλά και πολλούς άλλους παράγοντες που καταγράφονται παρακάτω θα μπορούσε κάποιος να συγκρίνει τις διαφορετικές τεχνολογίες και να καταλήξει στη βέλτιστη για κάθε περίπτωση.

Βασικό χαρακτηριστικό που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι ο τύπος του λύματος και τα χαρακτηριστικά του. Όπως φαίνεται και στον πίνακα, τα λύματα με υψηλές συγκεντρώσεις σε αμμωνιακά ιόντα δεν θεωρούνται κατάλληλα για την συμβατική μέθοδο νιτροποίησης-απονιτροποίησης. Ωστόσο, οι εναλλακτικές μέθοδοι επεξεργασίας και βέβαια η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας φαίνεται να ανταποκρίνονται με μεγάλη επιτυχία στις απαιτήσεις που παρουσιάζει η υψηλή συγκέντρωση αμμωνιακών. Σημαντική είναι και η υπεροχή της σε σχέση με τις άλλες τεχνολογίες όσον αφορά στους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η

κατανάλωση ενέργειας και πόρων, η παραγωγή ρύπων / αερίων του θερμοκηπίου, η απαίτηση χώρου, η παραγωγή λάσπης και γενικότερα οι επιπτώσεις στο περιβάλλον.

Ωστόσο, τομείς στους οποίους φαίνεται να υστερεί η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας είναι η αξιοπιστία και η αποδοχή από τον κόσμο, γεγονός που θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως αναμενόμενο εξαιτίας της πρόσφατης εμφάνισής της και της ελλιπούς εφαρμογής της συγκριτικά με την παραδοσιακή πλέον τεχνολογία της νιτροποίησης-απονιτροποίησης. Αντίθετα, οι ερευνητές και οι επιστήμονες φαίνεται να αποδέχονται πλήρως την διεργασία αυτή.

Τέλος, από άποψη κόστους, σε πρώτη φάση η τεχνολογία αυτή συνδυασμένη με την μερική νιτροποίηση φαίνεται να αποτελεί μια αρκετά πιο οικονομική επιλογή, όμως χρειάζεται να διερευνηθεί περισσότερο ο τομέας αυτός, για να εξαχθούν πιο συγκεκριμένα και σαφή στοιχεία.

Πίνακας 6.4: Αξιολόγηση της βιωσιμότητας των συστημάτων απομάκρυνσης αζώτου, L.Gut, 2006

Μεθοδος/ παράγοντας	Συμβατική νιτροποίηση- απονιτροποίηση	Μερική νιτροποίηση (SHARON)	ANAMMOX	CANON	OLAND
Καταλληλότητα για πλούσια σε αμμώνιο λύματα	●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●
Πιθανές περιβαλλοντικές επιπτώσεις	●●●●	●●●	●	●●	●●
Απαίτηση σε ενέργεια	●●●●	●●	●	●●	●●
Παραγωγή λάσπης	●●●●	●●	●	●	●
Απαίτηση επιφάνειας	●●●●	●●	●●	●	●
Κατανάλωση πόρων	●●●	καμία	καμία	καμία	καμία
Εκπομπές N ₂ O, CO ₂	●●●●	πιθανόν	καμία	πιθανόν	πιθανόν
Αξιοπιστία	●●●●	●●●●	●●	●●	●
Αποδοχή από το κόσμο	●●●●	●	●	●	●
Αποδοχή από τους ερευνητές	●●●●	●●●●	●●●●	●●●	●●
Εφαρμογή σε τοπικά συστήματα	●●	●●●	●●●●	●●●●	●●●●

Διαβάθμιση: υψηλή ●●●●, μεσαία ●●●, χαμηλή ●●, πολύ χαμηλή ●

Πίνακας 6.5: Εκτίμηση κόστους για την επεξεργασία λυμάτων (υπερκείμενων),
Fux et al. 2003.

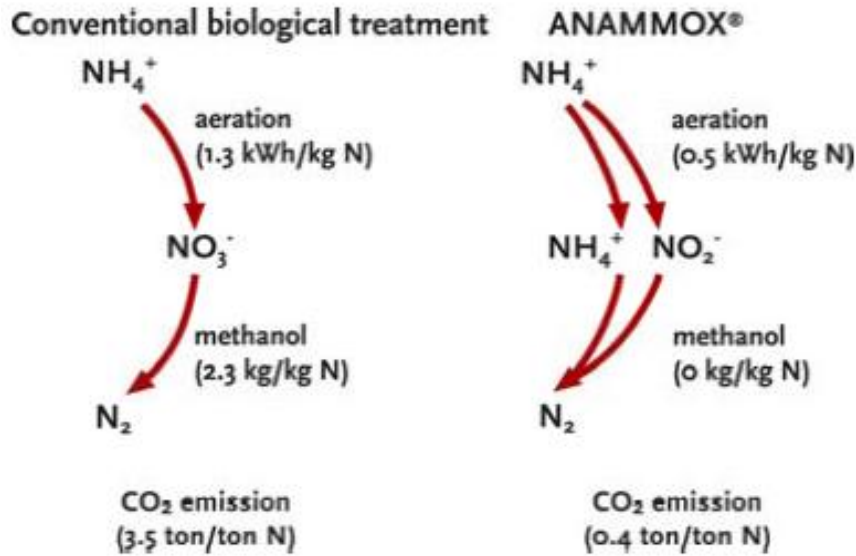
Καθοριστικοί παράγοντες για την εκτίμηση κόστους	Νιτροποίηση-απονιτροποίηση (Ευρώ / kg N)	Συνδυασμένη μερική νιτροποίηση-ANAMMOX (Ευρώ/ kg N)
επένδυση	1.35	1.30
Λειτουργία	(60% NH ₄ ⁺ σε NO ₂ ⁻)	
Ενέργεια	0.35	0.15
Συντήρηση	0.70	0.70
Έλεγχος- προσωπικό	0.30	0.30
Χημικά	0.50 (0.2 ευρώ /kg CH ₃ OH)	0.05 (0.2 ευρώ /kg HCl)
Διάθεση ιλύος	0.30	αμελητέο
Συνολικό κόστος	3.50	2.50

6.2. Εφαρμογές μεγάλης κλίμακας και πιλοτικές εφαρμογές

6.2.1 Πρώτη μεγάλης κλίμακας εφαρμογή στο Rotterdam (Ολλανδία)

Το 2006, οι W.R. Abma et al. , δημοσίευσαν τη μελέτη τους με θέμα την πρώτη μεγάλης κλίμακας εφαρμογή της ANAMMOX διεργασίας, κοκκώδους ιλύος. Επικεντρώθηκαν στο σχεδιασμό του αντιδραστήρα καθώς και στην επιτυχημένη περίοδο έναρξης της λειτουργίας του (start-up).

Όπως αναφέρουν στη δημοσίευσή τους η μετατροπή των αμμωνιακών σε αέριο άζωτο, με τη χρήση των νιτρωδών ως δότη ηλεκτρονίων, αποτελεί πολύ προνομιακή μέθοδο επεξεργασίας των αστικών υγρών αποβλήτων, έναντι της συμβατικής μεθόδου νιτροποίησης απονιτροποίησης. Την διαπίστωση αυτή τη στηρίζουν στο γεγονός ότι δεν απαιτείται προσθήκη πηγής δότη ηλεκτρονίων, ενώ μπορεί επίσης να εξοικονομηθεί το 60% της καταναλισκόμενης ενέργειας, με αποτέλεσμα την σημαντική μείωση δαπανών όσον αφορά στο κόστος λειτουργίας.



Σχήμα 6.1: Σύγκριση μεταξύ της συμβατικής μεθόδου απομάκρυνσης αζώτου και της διεργασίας ANAMMOX, W.R. Abma et al. 2006.

Ο ειδικός ρυθμός μετατροπής των βακτηρίων ANAMMOX είναι 1.4 kg N/ (kg VSS d) (Strous et al. 1999), ενώ στην περίπτωση των συστημάτων βιοφίλμ μπορούν να επιτευχθούν υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας και επομένως υψηλοί ρυθμοί φόρτισης. Είναι επομένως ιδιαίτερα ευνοϊκή η φυσική ικανότητα των βακτηρίων να σχηματίζουν βιοφίλμ. Το γεγονός αυτό εξοικονομεί τόσο χώρο όσο και κόστος επένδυσης ενώ η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει μεγαλύτερη βιωσιμότητα. Η ανάπτυξη της αναερόβια οξείδωσης της αμμωνίας ξεκίνησε με τον αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας διαλείποντος έργου, (Strous et al. 1998), ενώ στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν αρκετοί αντιδραστήρες βιοφίλμ με φέρον μέσο.

Στην περίπτωση της εφαρμογής μεγάλης κλίμακας των W.R. Abma et al. (2006), χρησιμοποιήθηκε βιοαντιδραστήρας κοκκώδους ιλύος. Ο λόγος που οδήγησε σε αυτή την επιλογή είναι τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει ο αντιδραστήρας κοκκώδους ιλύος έναντι στα συστήματα με βιοφίλμ. Αρχικά, μπορεί να εφαρμοστεί μεγαλύτερος ογκομετρικός ρυθμός φόρτισης. Ο ρυθμός μετατροπής του αντιδραστήρα προσδιορίζεται από τη διάχυση και επομένως την επιφάνεια της βιομάζας. Στην περίπτωση της κοκκώδους ιλύος αυτή η επιφάνεια είναι πολύ μεγαλύτερη συγκριτικά με το φέρον μέσο: τυπικά η τιμή για τους κόκκους είναι 3000 m²/m³ και για το φέρον μέσο 200 m²/m³. Ωστόσο απαιτείται κατάλληλη ρύθμιση του συστήματος για τη διατήρηση της βιομάζας. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα αυτού του είδους αντιδραστήρα είναι η καλύτερη ανάμιξη του περιεχομένου του καθώς το φέρον υλικό δεν παρεμβαίνει στην ανάμιξη και τη διασπορά της κοκκώδους βιομάζας. Η ανάμιξη του αντιδραστήρα ANAMMOX είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αποφυγή του περιορισμού στη δραστηριότητα των βακτηρίων που μπορεί να προκληθεί λόγω υψηλών επιπέδων των νιτροδών (Strous, 1999) ή τον σχηματισμό σουλφιδίων στις λεγόμενες νεκρές ζώνες.

Μια ζωτικής σημασίας παράμετρος, η οποία θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη κατά την εφαρμογή και λειτουργία ενός αντιδραστήρα κοκκώδους ιλύος, σύμφωνα με τους W.R.

Abma et al. (2006), είναι η εξακρίβωση της παραγωγής των κόκκων καθώς και η εξασφάλιση της σταθερότητας του συστήματος μέσω της κατάλληλης διατήρησης της βιομάζας.

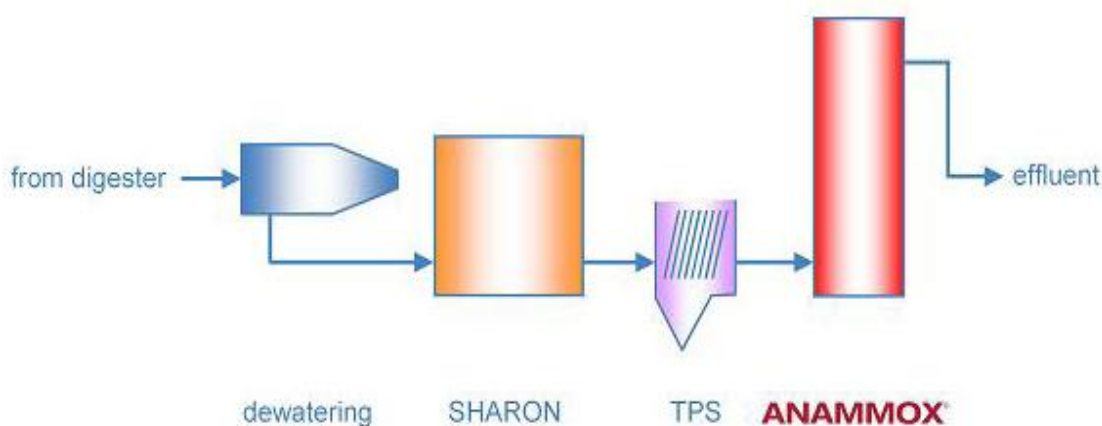
Ο ANAMMOX αντιδραστήρας στο Rotterdam (Ολλανδία), αποτελεί λοιπόν την πρώτη μεγάλης κλίμακας εφαρμογή στο είδος του. Κατασκευάστηκε στη μονάδα επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων της Waterboard Hollandse Delta (WHSD). Ο αντιδραστήρας αυτός αποτελεί το καταληκτικό επίτευγμα στην ανάπτυξη της τεχνολογίας ANAMMOX, η οποία εγκαινιάστηκε από το Πανεπιστήμιο του Delft, ενώ η μεγέθυνση της κλίμακας της έγινε από την εταιρεία Raques B.V.

Εικόνα 6.1: Ο πρώτος ANAMMOX αντιδραστήρας για την επεξεργασία υγρών λυμάτων, της Waterboard Hollandse Delta (WHSD), Rotterdam. (W.R. Abma et al. 2006).



Όπως φαίνεται από το διάγραμμα ροής που ακολουθεί, σχήμα 6.2, ο αντιδραστήρας ANAMMOX συνδέεται με τον προϋπάρχοντα αντιδραστήρα SHARON, μετά το στάδιο της καθίζησης της υπάρχουσας ιλύος στο σύστημα κεκλιμένων πλακών (Tilted Plate Settler). Η θερμοκρασία των λυμάτων κυμαίνεται στους 28° C και η συγκέντρωση των αμμωνιακών είναι ίση με 1000-1500 mg/L NH₄⁺ -N. Η μετατροπή των αμμωνιακών στον αντιδραστήρα SHARON μειώθηκε στο 50%, μετά την προσθήκη του αντιδραστήρα ANAMMOX, και η αναλογία αμμωνιακών προς νιτρώδη έγινε ίση με 1:1.

Πριν την εισροή τους στον ANAMMOX αντιδραστήρα, τα λύματα περνούν διαμέσου μιας παχιάς μεμβράνης διαχωρισμού, για την αφαίρεση παραμένουσας ιλύος και για την αποφυγή εισροής στερεών στον αντιδραστήρα, προκειμένου να διατηρηθεί ο χρόνος παραμονής της ιλύος.



Σχήμα 6.2: Διάγραμμα ροής των λυμάτων της μονάδας επεξεργασίας, (W.R.Abma et al. 2006)

Ο αντιδραστήρας ANAMMOX αποτελείται από δύο θαλάμους, τοποθετημένους τον ένα πάνω στον άλλον. Τα λύματα εισέρχονται από τη βάση του αντιδραστήρα και αναμιγνύονται με το περιεχόμενο του αντιδραστήρα. Το κατώτερο τμήμα περιέχει κλίση κοκκώδους ιλύος για τη μετατροπή της μεγαλύτερης ποσότητας αμμωνίας και νιτρωδών.

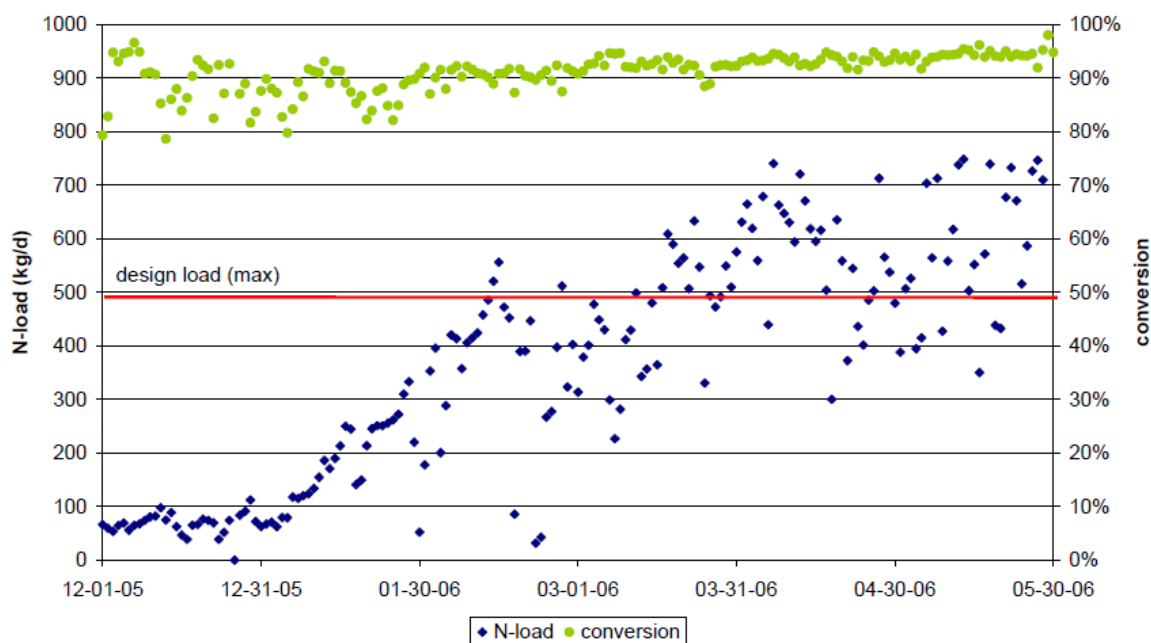
Το παραγόμενο αέριο άζωτο συλλέγεται από τον κατώτερο διαχωριστή τριών φάσεων ενώ στην κορυφή όπου οδηγείται διαχωρίζεται από το νερό και φεύγει από το σύστημα. Η εκροή του πρώτου θαλάμου εισάγεται στο δεύτερο θάλαμο όπου αφαιρείται η παραμένουσα αμμωνία καθώς και τα νιτρώδη. Η εκροή αποβάλλεται από το σύστημα μέσω του ανώτερου διαχωριστή τριών φάσεων.

Για την έναρξη λειτουργίας του πρώτου αντιδραστήρα ANAMMOX απαιτήθηκε διάρκεια 3.5 ετών, αφού δεν υπήρχε διαθέσιμη ιλύς για τον εμπλουτισμό της βιομάζας. Αυτή η καθυστέρηση είχε διάφορες αιτίες. Καθυστερήσεις προκλήθηκαν από τυχαία απώλεια βιομάζας, από προβλήματα πάγου και τοξικότητας που οφειλόταν σε υψηλές συγκεντρώσεις νιτρωδών, από διαρροή μεθανόλης από τον αντιδραστήρα SHARON και απρόβλεπτες εκκενώσεις Dixi λυμάτων (από χημικές τουαλέτες) στο χωνευτή.

Τα προαναφερθέντα προβλήματα, τα οποία προκάλεσαν και τις καθυστερήσεις, λύθηκαν εύκολα, σύμφωνα με τους W.R. Abma et al. (2006), μέσω της βελτίωσης του χειρισμού και τις μετατροπές στην εγκατάσταση. Ωστόσο οι επιπτώσεις στην πρόοδο της λειτουργίας ήταν σχετικά μεγάλες. Αυτό οφειλόταν στη μικρή αρχική συγκέντρωση των ANAMMOX βακτηρίων στον αντιδραστήρα. Κατά το πρώτο στάδιο της περιόδου έναρξης λειτουργίας η μετατροπή των βακτηρίων δεν μπορούσε να προσδιοριστεί από την ισορροπία μάζας. Χάρη στη χρήση των μετρήσεων πραγματικού χρόνου (PCR), ακολούθησε η ανάπτυξη του πληθυσμού ANAMMOX και οι συνθήκες μπόρεσαν να βελτιωθούν. Όταν οι συνθήκες έγιναν καταλληλότερες, ο αντιδραστήρας ANAMMOX εκπλήρωσε πλήρως τις προσδοκίες.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί, απεικονίζεται η εξέλιξη του ρυθμού φόρτισης και μετατροπής του αζώτου με το χρόνο. Παρατηρείται μια απότομη αύξηση του ρυθμού φόρτισης και μετατροπής αζώτου από την αρχή του 2006. Στα μισά του Φεβρουαρίου του

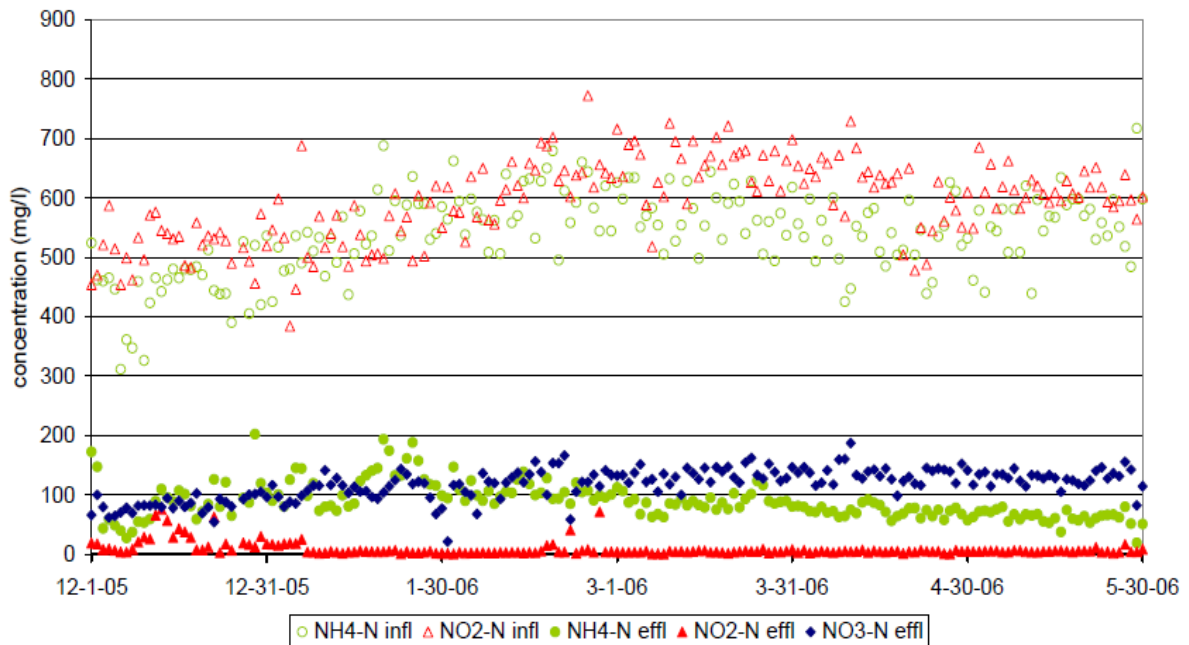
2006, ο ρυθμός φόρτισης έφτασε την τιμή σχεδιασμού, ενώ μετά την αποκατάσταση της εγκατάστασης απομάκρυνσης νερού ο ρυθμός φόρτισης έφτασε στα 750 kg/d, δηλαδή 50% πάνω από το φορτίο σχεδιασμού. Ο ογκομετρικός ρυθμός φόρτισης στο στάδιο αυτό ήταν πάνω από 10 kg/m³d. Η διεργασία ANAMMOX μετέτρεπε 90-95% του αζώτου της τροφοδοσίας.



Σχήμα 6.3: Διάγραμμα φορτίου αζώτου και % μετατροπής αζώτου συναρτήσει του χρόνου. (W.R.Abma et al. 2006)

Η συγκέντρωση νιτρωδών της εκροής του αντιδραστήρα είναι χαμηλότερη από 5-10 mg/L από την αρχή του 2006, υποδεικνύοντας μια πλήρη μετατροπή από τη διεργασία ANAMMOX. Τις φορές που η συγκέντρωση των νιτρωδών αυξήθηκε αυτό οφειλόταν στην ταχεία αύξηση του φορτίου. Η συγκέντρωση αμμωνιακών της εκροής μεταβαλλόταν από 60 έως 130 mg/L. Η συγκέντρωση αυτή προσδιόρισε και την απόδοση απομάκρυνσης του αντιδραστήρα. Η απόδοση μπορούσε να αυξηθεί μέσω της βελτίωσης της αναλογίας αμμωνιακών/νιτρώδη (1:1) στην εκροή του αντιδραστήρα SHARON. Εκτός από τη μετατροπή των αμμωνιακών και των νιτρωδών παράχθηκαν και νιτρικά κατά την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας, όπως ήταν αναμενόμενο. Η εκροή του αντιδραστήρα περιείχε νιτρικά σε συγκέντρωση, κατά μέσο όρο, ίση με 130 mg/L.

Η συμπεριφορά της λειτουργίας του αντιδραστήρα ANAMMOX δείχνει υψηλή σταθερότητα ακόμα και σε ογκομετρικούς ρυθμούς φόρτισης μεγαλύτερους από 10 kg/m³d. Η σταθερότητα μάλιστα διατηρείται ακόμα και με τις ουσιαστικές μεταβολές του ρυθμού φόρτισης. Από μέρα σε μέρα το φορτίο μπορεί να διέφερε από 300 έως 750 kg αζώτου ανά ημέρα. Παρ' όλα αυτά η διεργασία ANAMMOX ήταν επαρκής για τη μετατροπή.



Σχήμα 6.4: Συγκέντρωση αζώτου στην εισροή (influent) και την εκροή (effluent), (W.R.Abma et al. 2006)

Η αξιοπιστία και οι υψηλοί ρυθμοί μετατροπής αποτελούν αποτέλεσμα του σχηματισμού κόκκων υψηλής πυκνότητας και συνεπακόλουθα καλή παραμονή βιομάζας. Η μετατροπή της floccy υλός σε κοκκώδη ANAMMOX υλύ δεν προχώρησε χωρίς προβλήματα σε αρχικό στάδιο. Διακυμάνσεις στην ταχύτητα της ανοδικής ροής προκάλεσαν απώλειες στη βιομάζα. Από την άλλη πλευρά όμως ήταν απαραίτητο να αφαιρεθεί η floccy βιομάζα προκειμένου να προωθηθεί ο σχηματισμός της κοκκώδους βιομάζας. Με προσεκτική αύξηση της ταχύτητας της ανοδικής ροής του αντιδραστήρα επικράτησε η κοκκώδης βιομάζα. Στο στάδιο αυτό η συγκέντρωση της βιομάζας αυξήθηκε με ταχύτατο ρυθμό κάτι που ήταν δυνατό να συμβεί ανάλογα και για το φορτίο. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της βιομάζας κυμάνθηκε μεταξύ 35-40 g VSS/L, ενώ το εύρος μεγέθους της βιομάζας κυμάνθηκε μεταξύ 300-1000 μm, γεγονός που επέτρεψε υψηλούς ρυθμούς καθίζησης.

6.2.2 Μεγάλης κλίμακας εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε SBR

Το 2009, οι Joss et al., δημοσίευσαν τη μελέτη τους με θέμα τη μεγάλης κλίμακας εφαρμογή απομάκρυνσης αζώτου από λύματα με μερική νιτροποίηση και αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας σε ένα αντιδραστήρα SBR. Σύμφωνα με τους ερευνητές λοιπόν, η εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας απαιτεί να ληφθεί υπόψη ότι ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων είναι 0.06 d^{-1} , όπως προσδιορίστηκε πειραματικά (Strous et al. 1998), καθώς και ο έλεγχος των νιτρικών, του οξυγόνου και της αμμωνίας ως πρωταρχικές ουσίες υποστρώματος και πιθανές τοξικές ουσίες (Fux et al. 2002, Strous et al. 1999).

Η εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας έχει προταθεί σε δύο στάδια: (Fux et al. 2002, Kuenen et al. 2008, Feng et al. 2007, Gong et al. 2007, Sliemers et al. 2003, van der Star et al. 2007, Wyffels et al. 2004), όπως συνέβη και στην περίπτωση του πρώτου αντιδραστήρα μεγάλης κλίμακας στο Rotterdam. Εξαιτίας του αργού ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων και θεμάτων τοξικότητας, τα συστήματα αντιδραστήρων που συνδυάζουν νιτροποίηση και αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας έχουν εξεταστεί με βιοφίλμ, κοκκοποίηση, και αντιδραστήρες αιωρούμενης βιομάζας (Feng et al. 2007, Gong et al. 2007, Wyffels et al. 2004, Liu et al. 2008). Τα συστήματα δύο σταδίων που διαχωρίζουν την μερική νιτροποίηση και την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας απαιτούν έλεγχο του pH στο πρώτο στάδιο και έναν καλό συγχρονισμό του πρώτου και του δεύτερου σταδίου (van der Star et al. 2007, Abma et al. 2007, van Kempen et al. 2001, Gustavsson et al. 2008). Αντιδραστήρες συνεχούς λειτουργίας διαλείποντος έργου για συνδυασμένη μερική νιτροποίηση/ANAMMOX με έλεγχο του pH, κατασκευάστηκαν στην Αυστρία σε δύο μονάδες μεγάλης κλίμακας από το 2004, και στην Ελβετία από το 2007 με αξιοπιστία λειτουργίας γύρω στα 500g N/ (m³d) το 2009.

Οι Joss et al. 2009, πρότειναν ένα αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας, διαλείποντος έργου (SBR), με ασυνεχή τροφοδοσία και διακοπτόμενο ή συνεχή αερισμό, ελεγχόμενο από ηλεκτρόδιο επιλογής αμμωνιακών ιόντων ή εναλλακτικά από σήμα αγωγιμότητας. Ο αντιδραστήρας αυτός ήταν κατασκευασμένος και εφοδιασμένος κατάλληλα ώστε να μπορεί να δώσει αποτελέσματα συγκρίσιμα τόσο για πιλοτικές όσο και για μεγάλης κλίμακας εφαρμογές. Παράλληλα πραγματοποίησαν συγκρίσεις και κατέγραψαν πληροφορίες για την λειτουργία αντιδραστήρων μεγάλης κλίμακας.

Παρακάτω παρατίθενται λεπτομέρειες της στρατηγικής ελέγχου κατά τη διάρκεια της κανονικής λειτουργίας του αντιδραστήρα καθώς και κατά την περίοδο έναρξης λειτουργίας. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην διασφάλιση της απουσίας οξειδωτικών βακτηρίων των νιτροδών για την αποφυγή συσσώρευσης των νιτρικών. Μειώνοντας την ηλικία της υλός από 30 σε 4 ημέρες επιτράπηκε η απόρριψη της ικανότητας οξείδωσης των νιτροδών με την συγκέντρωση των νιτρικών της εκροής να πέφτει από το 300±50 σε λιγότερο από 20 mg NO₃-N/ L.

Μια υψηλή δραστηριότητα οξείδωσης αμμωνιακών κατά την περίοδο έναρξης λειτουργίας θεωρείται ως ευνοϊκή για την αποφυγή συγκεντρώσεων διαλυμένου οξυγόνου που περιορίζουν τη βιομάζα ANAMMOX (διατήρηση ≤ 1 mg O₂/L, Wyffels et al. 2004). Γι αυτό το λόγο ο ελάχιστος ρυθμός αερισμού μέσω των εγκατεστημένων φυσητήρων είχε ως αποτέλεσμα ο ρυθμός σχηματισμού NO₂⁻ να πέσει κάτω από τον αρχικό ρυθμό κατανάλωσης της βιομάζας εμπλουτισμού. Όλοι οι αντιδραστήρες λοιπόν ξεκίνησαν να λειτουργούν με διακοπτόμενο αερισμό. Οι χρόνοι αερισμού και τα αναερόβια στάδια ρυθμίστηκαν χειροκίνητα ανάλογα με την δραστηριότητα μερικής νιτροποίησης και αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε κάθε περίπτωση, ώστε η συγκέντρωση των νιτροδών μετά από τον αερισμό να μην υπερβαίνει τα 3-8 mg NO₂⁻-N /L και να καταναλώνεται πλήρως σε κάθε στάδιο ανάμιξης.

Στους πίνακες που ακολουθούν, 6.6 και 6.7, παρουσιάζονται οι αντιδραστήρες που εξετάστηκαν καθώς και τα χαρακτηριστικά λειτουργίας τους.

Πίνακας 6.6: Λίστα αντιδραστήρων που εξετάστηκαν. Joss et al. 2009

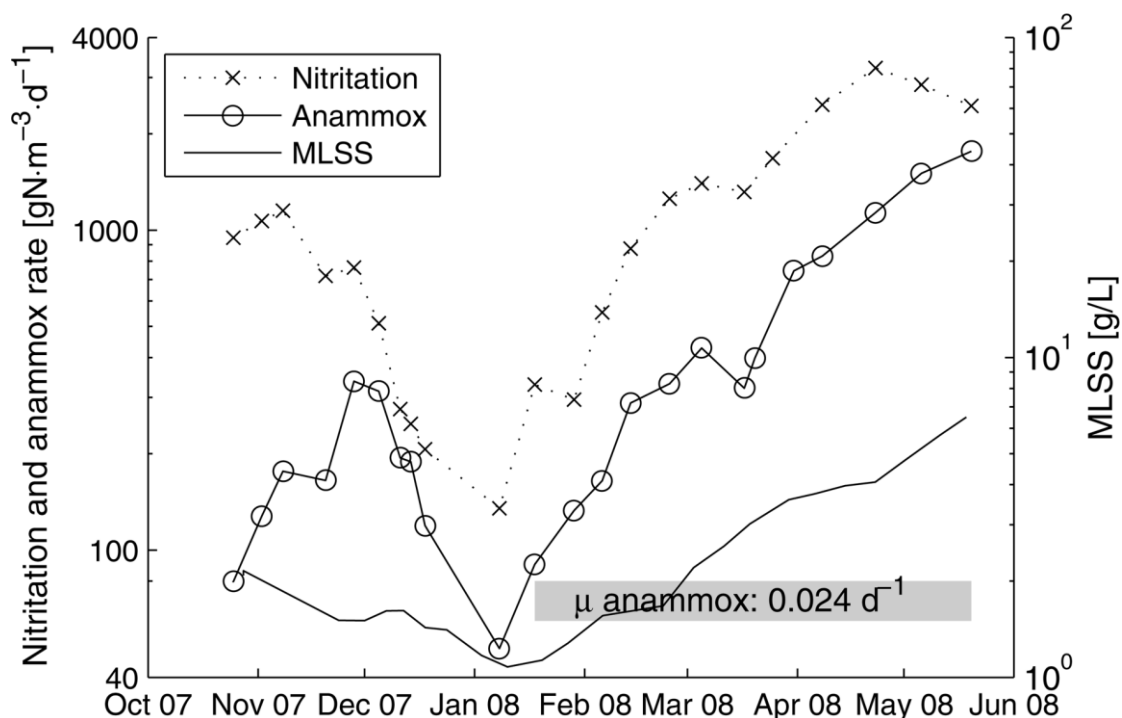
αντιδραστήρας	Όγκος (m ³)	Φορτίο αζώτου (kg N/d)	Εμβολιασμός βιομάζας	Περίοδος εκκίνησης (ημέρες)	MLSS (kg/m ³)	Θερμοκρασία (°C)
Πιλοτικής κλίμακας 400L	0.4	0.22	8/2006	50	6.4±1.1	15-35
Πιλοτικής κλίμακας 8m ³	8	4.1	1/2007	45	-	29.5±0.7
Ζυρίχη 1	1400	625	10/2007	180	3.4±0.5	30±3
Ζυρίχη 2	1400	625	6/2008	0	3.8±0.5	30±3
St. Gallen 1	300	108	8/2007	210	7.7±2	18-30
St. Gallen 2	300	108	8/2008	150	5.9±2	18-30
Niederglatt	160	56	4/2008	90	4±0.5	29±1

Πίνακας 6.7: Σύσταση των λυμάτων από το χωνευτή πριν (input) και μετά (output) την επεξεργασία στους αντιδραστήρες. Joss et al. 2009

	Ζυρίχη		St. Gallen		Niederglatt	
	εισορή	εκροή	εισορή	εκροή	εισορή	εκροή
Θερμοκρασία (°C)	27±1	30±3	-	18-30	20±1	29±1
Αγωγιμότητα (mS/cm ⁻¹)	5.5±0.1	2.4±0.2	-	2.2±0.4	-	-
pH	7.8±0.1	7.1±0.2	-	8.0±0.3	7.7±0.1	7.8±0.1
Αμμώνιο (mg N L ⁻¹)	650±50	30±10	890±100	73±42	760±75	20±15
Νιτρώδη (mg N L ⁻¹)	<0.2	<0.2	-	1±4	<0.2	0.5±0.2
Νιτρικά (mg N L ⁻¹)	<0.2	5±5	-	80±50	3±1	50±10
COD _{διαλυτο} (mg O ₂ L ⁻¹)	300±50	190±50	-	190±35	155±20	60±10
COD _{ολικο} (mg O ₂ L ⁻¹)	630±50	400±100	770±300	325±135	200±30	70±10
TSS (mg L ⁻¹)	250±50	150±100	370±550	120±95	5±5	4±4
DOC (mg L ⁻¹)	80	-	-	72±15	-	-

Κατά την περίοδο έναρξης λειτουργίας του αντιδραστήρα 400L, ο στόχος της απόδοσης επετεύχθη σε πέντε μήνες μετά τον εμπλουτισμό ANAMMOX βιομάζας με μόλις 75% του στόχου δραστηριότητας των ANAMMOX βακτηρίων: μεταξύ της 9^{ης} Αυγούστου 2007 και 14^{ης} Νοεμβρίου 2007 ο ρυθμός απομάκρυνσης μπόρεσε να ανέβει από τα 90 στα 510 gN / (m³d), με αποτέλεσμα ο υδραυλικός χρόνος παραμονής να μειωθεί από τις 13 στις 1.5 ημέρες. Ο ρυθμός ανάπτυξης που σημειώθηκε στις πιλοτικές αλλά και στις μεγάλες κλίμακας εφαρμογές παρουσίασε ένα εύρος μεταξύ των τιμών 0.035 και 0.045 d⁻¹ (χρόνος διπλασιασμού 15 και 25 ημέρες παρατηρήθηκε σε διάρκεια τεσσάρων μηνών). Στη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων της Ζυρίχης, μετά από μια αρχικά επιτυχημένη περίοδο έναρξης λειτουργίας με αύξηση της δραστηριότητας της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας από 45 σε 300 g N / (m³d), σημειώθηκε σημαντική μείωση το Δεκέμβριο του 2007,

όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.5, πιθανότατα λόγω κάποιας τοξικής που υπήρχε στα υγρά απόβλητα:



Σχήμα 6.5: Συγκέντρωση της ιλύος (MLSS) και ρυθμοί μερικής νιτροποίησης και αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας κατά την περίοδο έναρξης λειτουργίας της διεργασίας, στην μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων της Ζυρίχης. Joss et al. 2009

Στη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων του Niederglatt κατασκευάστηκε αντιδραστήρας μερικής νιτροποίησης και αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, ο οποίος ξεκίνησε να λειτουργεί τον Απρίλιο του 2008. Εξαιτίας του εμπλουτισμού από τη μονάδα της Ζυρίχης με 100 m³ κυβικά βιομάζας, η μονάδα αυτή έφτασε το στόχο του ρυθμού απομάκρυνσης 400g N / (m³ d) μέσα σε λίγες μόνο εβδομάδες.

Πιλοτικά πειράματα έδειξαν ότι η οξείδωση των νιτρικών θα πρέπει να αποφεύγεται ή να περιορίζεται στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας καθώς αυτή η διεργασία οδηγεί σε συσσώρευση νιτρικών. Κατά την περίοδο έναρξης λειτουργίας του αντιδραστήρα 400L, η συγκέντρωση εκροής των νιτρικών αυξήθηκε σταθερά κατά τους δύο πρώτους μήνες από 20 σε 95 mg NO₃⁻-N / L. Μια απώλεια δραστηριότητας των βακτηρίων οξείδωσης νιτρικών της τάξης του 0.035 d⁻¹ (0.022 d⁻¹ έχει καταγραφεί από τους Manser et al. 2006) στις ανοξικές συνθήκες καταγράφηκε κατά τη λειτουργία του αντιδραστήρα από τις 26 Απριλίου 2007 έως τις 24 Μαΐου 2007 χωρίς αερισμό ή απόρριψη της βιομάζας. Στη διάρκεια του μήνα αυτού ο πληθυσμός ANAMMOX τράφηκε με επιπλέοντα (30-200 mg NH₄⁺-N L⁻¹), νιτρώδη (έως 120 g NO₂⁻-N m⁻³ d⁻¹) και περιστασιακά με προσθήκη οξέος για έλεγχο του pH στο εύρος μεταξύ 7.6 και 8.6 (H₂SO₄ ή CO₂). Καθώς ο ρυθμός κατανάλωσης αμμωνιακών, εξαιτίας της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, αυξήθηκε από 18 σε 85 g NH₄⁺-N m⁻³ d⁻¹, η οξείδωση των νιτρικών μειώθηκε μόνο από 790 σε 300 g NO₂⁻-N m⁻³ d⁻¹. Επομένως οι Joss et al. 2009

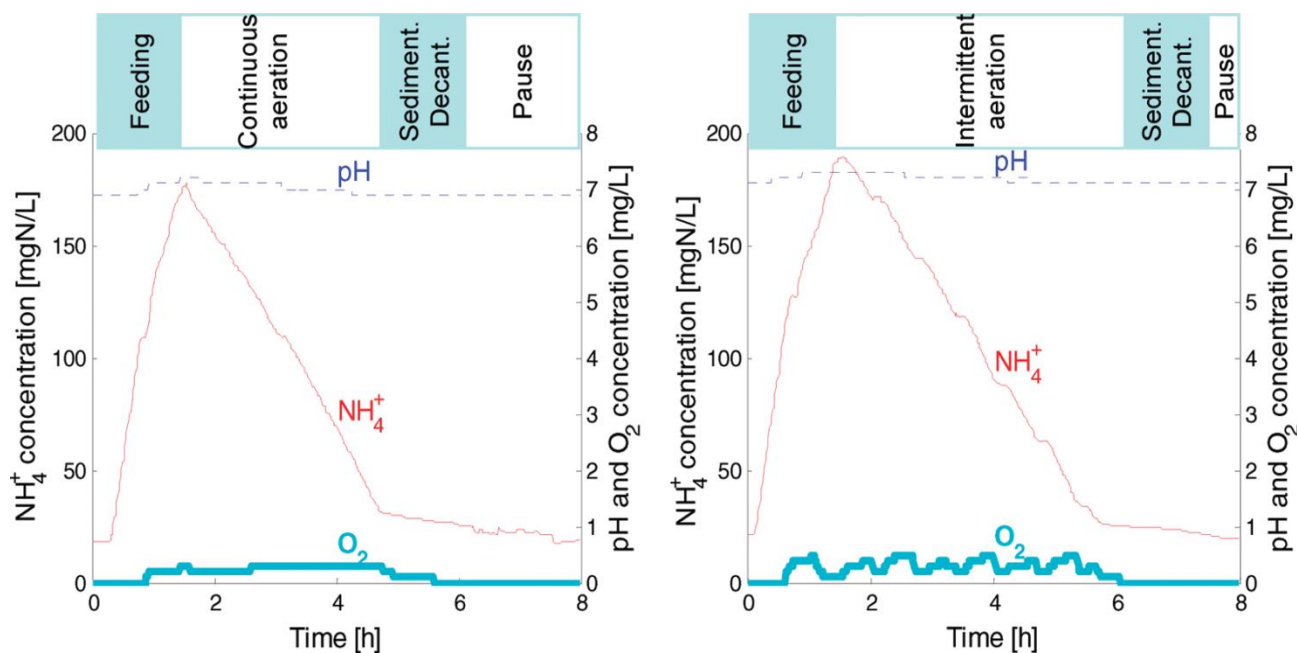
κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι είναι πολύ σημαντικό να διατηρούνται χαμηλά επίπεδα υποστρώματος για τα οξειδωτικά βακτήρια των νιτρωδών καθόλη τη διάρκεια λειτουργίας ($< 5 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$ και $< 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, Wyffels et al. 2004) για τον περιορισμό της ανάπτυξής τους. Κάτω από συνθήκες κανονικής λειτουργίας η ανάπτυξη των οξειδωτικών βακτηρίων των νιτρωδών αποφεύγεται με τη διατήρηση της συγκέντρωσης οξυγόνου $\leq 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (Hanaki et al. 1990) και με την αποφυγή της πλήρους κατανάλωσης της αμμωνίας (παραμονή στον αντιδραστήρα τουλάχιστον $10 \text{ mg NH}_4^+ \text{-N L}^{-1}$, Turk et al. 1989).

Η μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων του St.Gallen εμφάνισε μεταβαλλόμενη δραστηριότητα οξείδωσης νιτρωδών στο σύστημα με αποτέλεσμα τις υψηλές συγκεντρώσεις νιτρωδών στην εκροή $80 \pm 50 \text{ mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1}$. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφειλόταν σε υπερδιαστασιοποιημένο σύστημα αερισμού με περιοδικούς σύντομους αερισμούς που συχνά οδηγούσαν σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (Hanaki et al. 1990) και σε χαμηλές θερμοκρασίες που δυσχέραιναν το ρυθμό ανάπτυξης των ANAMMOX βακτηρίων και τα οδήγησαν σε όμοιο ρυθμό ανάπτυξης με εκείνο των οξειδωτικών βακτηρίων των νιτρωδών (Hellings et al. 1998).

Στα πλαίσια της μελέτης τους οι Joss et al. 2009 πραγματοποίησαν συγκρίσεις μεταξύ του διακοπτόμενου και του συνεχούς αερισμού για την εφαρμογή στη διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας. Ο περιορισμός της διεργασίας ακόμα και στην περίπτωση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου έχει καταγραφεί σε αρκετές δημοσιεύσεις (Egli et al. 2001, Strous et al. 1997).

Η εμπειρία από την διεργασία της συνδυασμένης μερικής νιτροποίησης-αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (Wett et al. 2007, Tsushima et al. 2007) έδειξε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας συμβαίνει ταυτόχρονα, εξαιτίας της δομής βιομάζας αφού το οξυγόνο καταναλώνεται στα εξωτερικά στρώματα και διαχέεται για τη μερική νιτροποίηση ενώ το εσωτερικό τμήμα παραμένει αναερόβιο (Gong et al. 2007, Liu et al. 2008). Επειδή λοιπόν η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια των φάσεων αερισμού, η επαρκής δραστηριότητα ANAMMOX θα μπορεί να εφαρμοστεί με συνεχή αερισμό σε κάθε κύκλο SBR, σε αντίθεση με τα ξεχωριστά στάδια διακοπτόμενου αερισμού και ανάμιξης. Με αυτή τη μέθοδο χειρισμού της διεργασίας ($< 1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), τα νιτρώδη που σχηματίζονται καταναλώνονται ταυτόχρονα με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των νιτρωδών να παραμένει χαμηλότερη από $10 \text{ mg NO}_2^- \text{N L}^{-1}$.

Η αερόβια φάση θα πρέπει να ακολουθείται από μια περίοδο αναερόβιας ανάμιξης για την απομάκρυνση της παραμένουσας ποσότητας νιτρωδών με τη δράση των ANAMMOX βακτηρίων και των φυσαλίδων N_2 που έχουν σχηματιστεί καθώς η άμεση υποβολή στο στάδιο της καθίζησης μπορεί να εμφανίσει προβλήματα (Darpena-Mora et al. 2004). Μετά τον εμπλουτισμό του δεύτερου αντιδραστήρα στη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων της Ζυρίχης (Ιούνιος 2008), ο ένας αντιδραστήρας λειτούργησε με διακοπτόμενο αερισμό και ο δεύτερος με συνεχή αερισμό προκειμένου να γίνει σύγκριση μεταξύ των δύο μεθόδων.



Σχήμα 6.6: Συγκεντρώσεις αμμωνιακών, pH και οξυγόνου κατά τη διάρκεια ενός τυπικού κύκλου SBR μερικής νιτροποίησης-αναερόβιας οξείδωσης αμμωνίας, στους 31° C με συνεχή και διακοπτόμενο αερισμό (45 λεπτά αερισμός και 15 λεπτά ανάδευση) αντίστοιχα, στη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων της Ζυρίχης, 25/9/2008. Joss et al. 2009

Οι χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών που μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια του κύκλου επιβεβαιώνουν ότι κάτω από κανονικές συνθήκες λειτουργίας και στους δύο αντιδραστήρες, η κατανάλωση του NO_2^- από την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας συμβαίνει ταυτόχρονα με τον αερισμό, ενώ οι φάσεις ανάδευσης έχουν ως αποτέλεσμα περιόδους παύσης χωρίς απομάκρυνση αμμωνιακών ιόντων. Οι συγκεντρώσεις εκροής νιτρικών των δύο αντιδραστήρων (και στις δύο περιπτώσεις κυμαινόταν μεταξύ 0-20 $\text{mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1}$) επιβεβαιώνουν ότι και οι δύο αντιδραστήρες ανταποκρίνονται με όμοιο τρόπο στην δραστηριότητα οξείδωσης νιτρικών.

Τα πρωταρχικά πλεονεκτήματα του συνεχούς αερισμού είναι η απλότητα του συστήματος, η καλύτερη παρακολούθηση της επίδοσης του αντιδραστήρα και εν τέλει η υψηλότερη απόδοση του. Η μεγαλύτερη απλότητα δημιουργείται από την απαίτηση σημαντικά λιγότερων μεταγωγών του διακόπτη των αεριστήρων (π.χ. τρεις φορές την ημέρα αντί για αρκετές φορές την ώρα). Παρατεταμένες περίοδοι με αμετάβλητους ρυθμούς αερισμού επιτρέπουν πιο ακριβή παρακολούθηση της απόδοσης του αντιδραστήρα για αρκετά σήματα με σχετικά μικρή αναλογία σήματος/θόρυβο. Τέλος, υψηλότερη απόδοση επιτυγχάνεται κάτω από συνθήκες συνεχούς αερισμού, καθώς κάτω από κανονικές συνθήκες λειτουργίας η ταυτόχρονη αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας καταναλώνει την περισσότερη ποσότητα νιτρικών και η καλύτερη επίβλεψη της διεργασίας επιτρέπει την διατήρηση των ασφαλών ορίων για την αποφυγή της συσσώρευσης των νιτρικών.

Μία άλλη παράμετρος που εξετάστηκε στα πλαίσια της δημοσίευσης των Joss et al. 2009, ήταν η χρήση ενός μόνο αντιδραστήρα ή ενός συστήματος διαφορετικών αντιδραστήρων για

την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Όπως φαίνεται από την μεγάλης κλίμακας εφαρμογή του Rotterdam (van der Star et al. 2007), η λειτουργία της διεργασίας ANAMMOX σε ξεχωριστό αντιδραστήρα επιτρέπει έως δέκα φορές υψηλότερους ρυθμούς για το αναερόβιο βήμα. Παρόλα αυτά θεωρείται ότι η συνδυασμένη μερική νιτροποίηση και η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα (van der Star et al. 2007, Abma et al. 2007, van Kempen et al. 2001, Gustavsson et al. 2008, Abma et al. 2007):

1. Η λειτουργία σε ένα μόνο αντιδραστήρα έχει ως αποτέλεσμα την απλούστευση του ελέγχου και της διαδικασίας (π.χ. μη ύπαρξη ανάγκης για έλεγχο pH)
2. Σε συνθήκες κανονικής λειτουργίας τα νιτρώδη καταναλώνονται συνεχώς και επομένως αποφεύγεται εντελώς η πιθανότητα τροφοδοσίας του επόμενου βήματος με τοξικές συγκεντρώσεις, αναλογία $\text{NO}_2^- : \text{NH}_4^+$ μεγαλύτερη από 1 (π.χ. έως μερικές εκατοντάδες $\text{mg NO}_2^- \text{ N L}^{-1}$)
3. Με τουλάχιστον $550 \text{ mg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ η συνδυασμένη μερική νιτροποίηση και αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας φτάνει μια δραστηριότητα συγκρίσιμη με τις μονάδες δύο βημάτων.

Σε σύγκριση με τα συστήματα βιοφίλμ, η διαλυμένη ιλύς επιτρέπει σημαντικά μικρότερους χρόνους έναρξης λειτουργίας, αν παρέχεται ιλύς εμπλουτισμού. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα με τις διάρκειες των περιόδων έναρξης λειτουργίας, στην περίπτωση του δεύτερου αντιδραστήρα της Ζυρίχης δεν απαιτείται χρόνος για την έναρξη λειτουργίας, λόγω της επάρκειας σε αρχική βιομάζα.

Ένα ακόμα ζήτημα που εκτιμήθηκε στην μελέτη των Joss et al. 2009 ήταν οι εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου. Τα ισοδύναμα των ολικών εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου υπολογίστηκαν λαμβάνοντας υπόψη την κατανάλωση ενέργειας και τις εκπομπές N_2O , ενώ στη συνέχεια συγκρίθηκαν με τις εκπομπές της συμβατικής μεθόδου νιτροποίησης-απονιτροποίησης κατά την απομάκρυνση θρεπτικών. Το υποξείδιο του αζώτου αποτελεί μείζον αέριο του θερμοκηπίου, η επίδραση του οποίου στην αύξηση της θερμοκρασίας της γης είναι 310 φορές μεγαλύτερη από την επίδραση του διοξειδίου του άνθρακα (IPCC *Climate Change 2001: The Scientific Basis*, Cambridge University Press: Cambridge, 2001). Κατά την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας δεν παράγεται μεθάνιο. Το μονοξείδιο του άνθρακα και του αζώτου δεν περιλαμβάνονται στους υπολογισμούς καθώς οι συγκεντρώσεις τους ήταν πολύ χαμηλές, κάτω ή κοντά στο όριο ανίχνευσης.

Οι μέσες συγκεντρώσεις του N_2O στα απαέρια ήταν ίσες με 96 και 76 ppm για την περίπτωση του διακοπτόμενου και του συνεχούς αερισμού, αντίστοιχα, τιμές που ανταποκρίνονται στο 0.6 και 0.4% του απομακρυνόμενου φορτίου αζώτου. Οι εκπομπές N_2O της εφαρμογής δύο σταδίων μερικής νιτροποίησης-αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας στη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων του Rotterdam ήταν αρκετά υψηλότερες, με 1.7% του απομακρυνόμενου φορτίου αζώτου να εκπέμπεται από τη μερική νιτροποίηση και 0.6% από τον ANAMMOX αντιδραστήρα. Οι χαμηλότερες τιμές υποξείδιου του αζώτου καταγράφηκαν στη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων της Ζυρίχης και θεωρείται ότι αυτό οφείλεται στην πολύ μικρότερη συγκέντρωση των ειδών αζώτου στον αντιδραστήρα ($< 10 \text{ mg NO}_2\text{-NL}^{-1}$

σε σχέση με 700 mg NO₂-NL⁻¹). Εφόσον λοιπόν η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας δεν παράγει εκπομπές υποξειδίου του αζώτου (Kartal et al. 2007), οι παρατηρημένες εκπομπές θεωρείται ότι προέρχονται από άλλα βακτήρια, πιθανώς από τα απονιτροποιητικά. Συγκρίσιμες εκπομπές υποξειδίου του αζώτου, 0.03-0.12% του φορτίου αζώτου της εισροής καταγράφηκαν για συμβατική μονάδα (νιτροποίησης-απονιτροποίησης) επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, σε ευνοϊκές συνθήκες λειτουργίας. Όμως έχουν επίσης καταγραφεί και αρκετά υψηλές εκπομπές υποξειδίου του αζώτου, έως και 15% του φορτίου αζώτου: χαμηλές συνθήκες οξυγόνου ευνοούν την συσσώρευση N₂O, και επομένως οδηγούν σε μεγάλες εκπομπές.

Ο πίνακας 6.8 δείχνει ότι αν και η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας επιδεικνύει υψηλότερες εκπομπές υποξειδίου του αζώτου, η απονιτροποίηση της ίδιας ποσότητας αζώτου αυξάνει τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου λόγω της εξωτερικής πηγής άνθρακα που απαιτείται και της αυξημένης κατανάλωσης ενέργειας για τον αερισμό.

Πίνακας 6.8: Εκπομπές ισοδύναμων διοξειδίου του άνθρακα από την μερική νιτροποίηση-ANAMMOX, με συνεχή αερισμό και τη συμβατική μέθοδο νιτροποίησης-απονιτροποίησης στην Ε.Ε.Λ. της Ζυρίχης, Joss et al. 2009.

		Συμβατική νιτροποίηση- απονιτροποίηση	Νιτρωδοποίηση-ANAMMOX του υπερκείμενου μονάδας χώνευσης ιλύος
Κατανάλωση O ₂	Kg O ₂ kg ⁻¹ N, eliminated	4.3	1.9
Ενέργεια για τον αερισμό	kWh kg ⁻¹ N, eliminated	2.4	1.0
Αερισμός (ισοδύναμο CO ₂)	Kg CO ₂ kg ⁻¹ N, eliminated	1.4	0.6
Πηγή άνθρακα	Kg MeOH kg ⁻¹ N, eliminated	2.2	
Πηγή άνθρακα (ισοδύναμο CO ₂)	Kg CO ₂ kg ⁻¹ N, eliminated	3.1	
Παραγωγή N ₂ O	g N ₂ O kg ⁻¹ N, eliminated	3.1	6.3
Παραγωγή N ₂ O (ισοδύναμο CO ₂)	Kg CO ₂ kg ⁻¹ N, eliminated	1.0	1.9
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΙΣΟΔ. CO ₂	Kg CO ₂ kg ⁻¹ N, eliminated	5.5	2.5

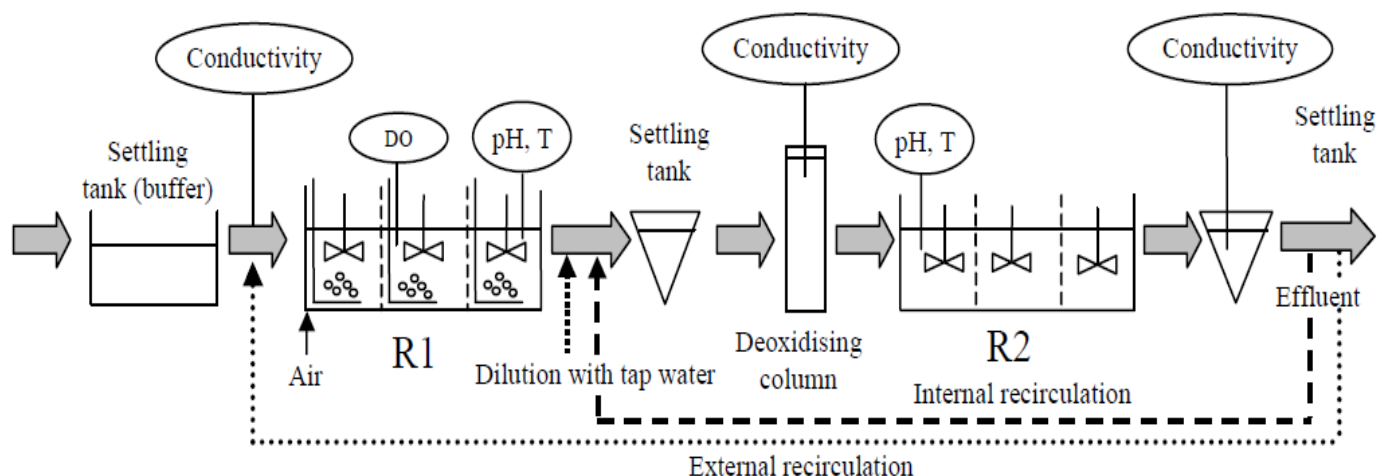
Εναλλακτικά, οι εκπομπές της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας μπορούν να συγκριθούν με την απονιτροποίηση χωρίς την προσθήκη εξωτερικής πηγής άνθρακα. Ωστόσο αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον μειωμένο σχηματισμό βιοαερίου και μείωση 2.7 kg CO₂ / kg N, eliminated των εκπομπών που αποφεύγονται λόγω της παραγωγής ενέργειας (35% επάρκεια ενέργειας). Επομένως και σε αυτή την σύγκριση η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας εκπέμπει το ισοδύναμο των 2.6 kg CO₂ / kg N, eliminated λιγότερα αέρια του θερμοκηπίου. Παρόλα αυτά οι συνθήκες λειτουργίας και στις δύο μεθόδους διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο και δεν θα

μπορούσαν τα παραπάνω αποτελέσματα να γενικευτούν για εφαρμογές με διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας.

6.2.3 Η πιλοτική μονάδα αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε δύο στάδια, στο Himmerfjärden της Στοκχόλμης

Η πιλοτική μονάδα που μελετήθηκε από τη Luisa Gut, κατασκευάστηκε στην Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων του Himmerfjärden, στο νότιο τμήμα της Στοκχόλμης. Ο τύπος του αντιδραστήρα ήταν βιοφίλμ κινούμενης κλίνης (Moving Bed Biofilm Reactor), και περιείχε Kaldnes carriers, ως μέσο για την προσκόλληση της βιομάζας, με ειδική επιφάνεια πάνω από $500 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$. Το σύστημα αποτελούνταν από δύο αντιδραστήρες: στον πρώτο (R1) λάμβανε χώρα η μερική νιτρωδοποίηση (partial nitritation) ενώ στο δεύτερο (R2) ακολουθούσε η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Το σύστημα αυτό λοιπόν υπάγεται στην κατηγορία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε δύο στάδια (two step partial nitritation /ANAMMOX).

Οι δύο αντιδραστήρες ήταν χωρισμένοι σε τρεις ζώνες και διέθεταν τον απαραίτητο για την καλή λειτουργία και εποπτεία εξοπλισμό, όπως μηχανικό αναδευτήρα, όργανο μέτρησης pH, μετρητή διαλυμένου οξυγόνου, θερμομέτρο και μετρητή αγωγιμότητας. Μάλιστα, ο δεύτερος αντιδραστήρας διέθετε και ένα on-line ηλεκτρόδιο για τη μέτρηση και αυτόματη ρύθμιση του pH, ενώ ο πρώτος έφερε διάταξη για τον απαραίτητο αερισμό.



Σχήμα 6.7: Διάταξη της πιλοτικής μονάδας αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας στην Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων του Himmerfjärden, R1-αντιδραστήρας μερικής νιτρωδοποίησης, R2- αντιδραστήρας Anammox, (L. Gut,2006)

Οι δύο αντιδραστήρες, R1 και R2, αρχικά λειτούργησαν ξεχωριστά προκειμένου να αναπτυχθούν οι επιθυμητοί πληθυσμοί νιτροποιητικών και ANAMMOX βακτηρίων, αντίστοιχα. Όταν συνδέθηκαν στο σύστημα, το φορτίο της εισροής αυξήθηκε κατά τους μήνες Ιούνιο-Αύγουστο 2003 και Φεβρουάριο-Ιούλιο 2004. Για το χειρισμό των μεταβαλλόμενων αυτών φορτίων τροποποιήθηκε ο ρυθμός αραίωσης της εισροής στον

ANAMMOX αντιδραστήρα καθώς και ο υδραυλικός χρόνος παραμονής. Εξετάστηκε η δυνατότητα χρήσης εσωτερικής επανακυκλοφορίας (Νοέμβριο 2004) από την εκροή του δεύτερου αντιδραστήρα για την αραίωση στην εισροή του, ωστόσο χωρίς τα επιθυμητά αποτελέσματα αφού παρατηρήθηκε περιορισμός της δραστηριότητας των ANAMMOX βακτηρίων, πιθανών λόγω συσσώρευσης τοξικών μεταβολικών προϊόντων, και επομένως η επιλογή αυτή απορρίφθηκε. Μια ακόμα στρατηγική εξετάστηκε τον Απρίλιο του 2005, και βασίστηκε στην επανακυκλοφορία της εκροής του συστήματος, μέσω της εισροής της στην πρώτη ζώνη του αντιδραστήρα R1, με ταυτόχρονη διακοπή του αερισμού στη ζώνη αυτή. Στόχος αυτής της στρατηγικής ήταν η απονιτροποίηση των νιτρικών που παράγονται κατά την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας. Επιπροσθέτως, το 2005, η θερμοκρασία του συστήματος μειώθηκε από τους 35° C, στους 30° C και τέλος στους 27° C, κατά μέσο όρο, ενώ το Μάρτιο του 2004 διακόπηκε και η διόρθωση του pH, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση της δαπάνης για τα χημικά, χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στην επίδοση της διεργασίας.

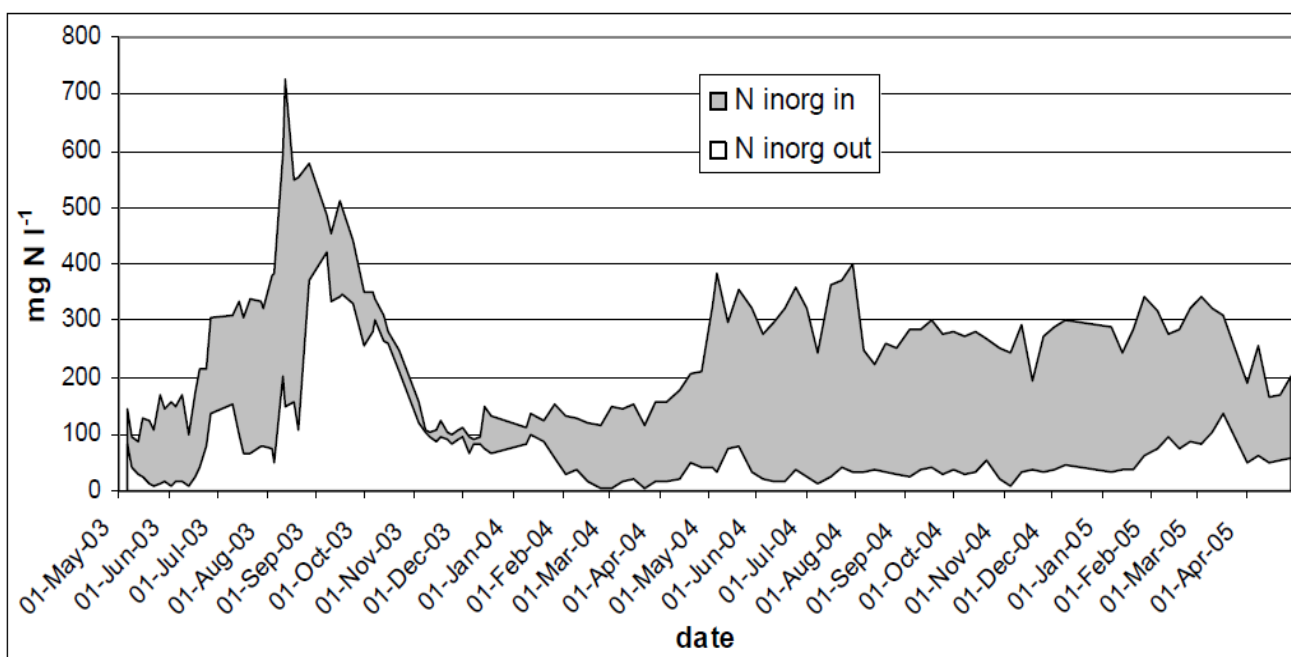
Όσον αφορά στις συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα R2, το διαλυμένο οξυγόνο ήταν ίσο με 0.1 mg O₂ L⁻¹, κατά μέσο όρο. Ωστόσο περιστασιακές αυξήσεις της τιμής του DO έως και 0.5 mg O₂ L⁻¹ δεν προκάλεσαν αναστολή της δραστηριότητας των ANAMMOX βακτηρίων. Το pH στο πρώτο στάδιο λειτουργίας της μονάδας διορθωνόταν με την προσθήκη βασικού διαλύματος για να διατηρηθεί στο 8.2, καθώς στο στάδιο της μερικής νιτροποίησης σημειωνόταν μείωση. Ωστόσο από τη στοιχειομετρία της διεργασίας της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας προέκυπτε αύξηση του pH, η οποία όπως και προβλέφθηκε, ήταν ικανή να αναπληρώσει την πρότερη μείωση. Πράγματι, με τη διακοπή της διόρθωσης του pH στον R2, δεν σημειώθηκε μείωση στην απόδοση, ενώ το pH της εκροής ήταν αυξημένο κατά μία μονάδα σε σχέση με την εισροή.

Το υψηλότερο φορτίο στην εισροή του συστήματος υπολογίστηκε ίσο με 1.2 g N m⁻² d⁻¹ (μέγιστη απομάκρυνση 0.9 g N m⁻² d⁻¹), ενώ η βέλτιστη αναλογία η NO₂⁻ /NH₄⁺ προέκυψε μεταξύ των τιμών 1.0 -1.5. Ο ιδανικότερος υδραυλικός χρόνος παραμονής στον αντιδραστήρα θεωρήθηκε ίσος με 3 ημέρες, αφού μετά την μείωσή του στις δύο ημέρες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των νιτροδών και κατ' επέκταση αναστολή της διεργασίας.

Στο ακόλουθο διάγραμμα (σχήμα 6.8) φαίνεται η απόδοση του αντιδραστήρα ANAMMOX κατά τη διάρκεια διερεύνησης της λειτουργίας του. Η αρχική συγκέντρωση ανόργανου αζώτου αυξήθηκε έως ότου η απόδοση του αντιδραστήρα φτάσει τα 0.9 g N m⁻² d⁻¹. Συγκεντρώσεις νιτροδών οι οποίες υπερέβαιναν τα 30 mg L⁻¹, εμφανίστηκαν στον αντιδραστήρα αρκετές φορές και επηρέασαν σημαντικά τη διεργασία. Τον Αύγουστο του 2003 καταγράφηκε αναστολή της λειτουργία της διεργασίας, η οποία αποκαταστάθηκε το 2004, με το μέσο όρο απόδοσης της διεργασίας να φτάνει το 84%.

Η σταθερή παραγωγή νιτρικών με ρυθμό NO₃-N/(NH₄-N+NO₂-N) περίπου 0.6 (η θεωρητική τιμή είναι 0.11) επιβεβαίωσε και μια μικρή συνεισφορά της νιτροποίησης, η οποία συνέβαινε ταυτόχρονα με την αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας, καθώς οι συνθήκες δεν

ήταν αυστηρά αναερόβιες. Η αναλογία καταναλισκόμενων νιτρωδών προς αμμωνιακά ιόντα υπολογίστηκε ίση με 1.22 για το έτος 2004, γεγονός που επιβεβαιώνει την καθιέρωση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας.



Σχήμα 6.8: Συνολικές συγκεντρώσεις αζώτου στην εισροή και την εκροή του ANAMMOX αντιδραστήρα, (L.Gut,2006).

6.2.4 Πιλοτική εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας σε δύο στάδια, Ζυρίχη.

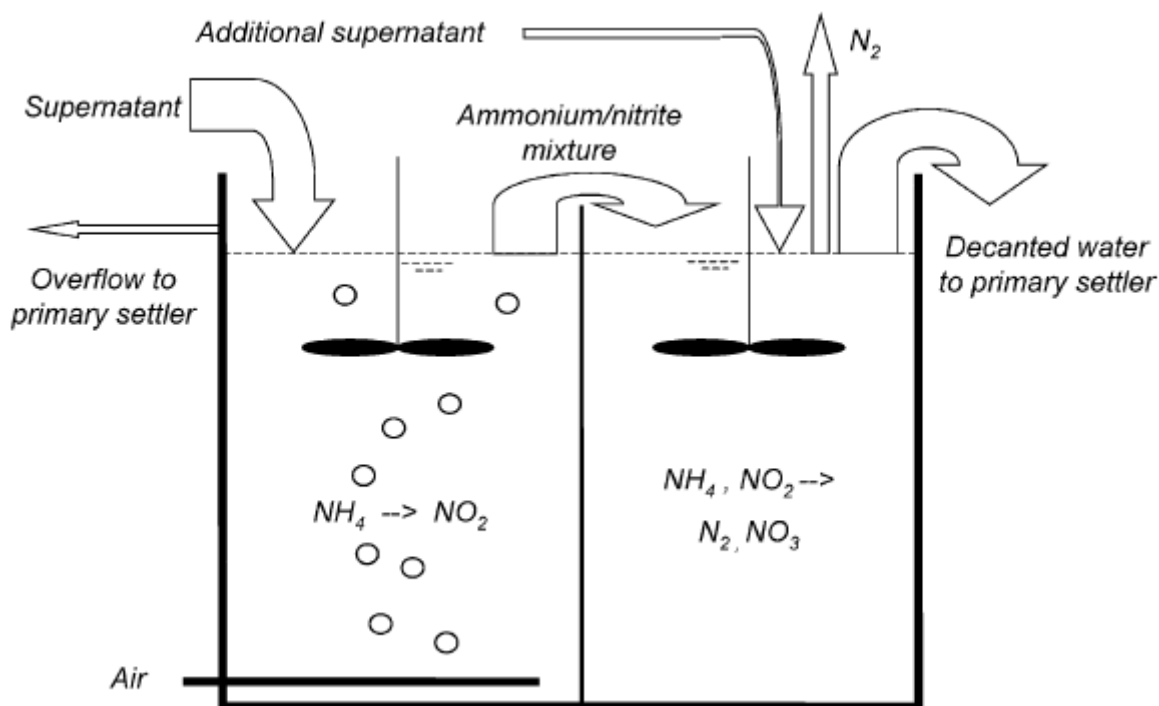
Οι Fux et al. το 2002, δημοσίευσαν τα αποτελέσματα της πιλοτικής εφαρμογής της συνδυασμένης μερικής νιτρωδοποίησης και αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, σε δύο αντιδραστήρες συνολικού όγκου 5 m³. Στόχος της εφαρμογής αυτής ήταν η αποτελεσματική επεξεργασία δύο διαφορετικών λυμάτων, με υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων, προερχόμενων από την εκροή της χώνευσης λύος των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων του Werdhoelzli της Ζυρίχης και του Au του St. Gallen.

Η μερική νιτρωδοποίηση έλαβε χώρα σε αεριζόμενο και συνεχώς αναδευόμενο αντιδραστήρα όγκου 2.5 m³, με περιεχόμενο όγκο υγρού που δεν ξεπέρασε τα 2.1 m³. Ο αντιδραστήρας εμβολιάστηκε με 1 m³ ενεργού λύος από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων του Werdhoelzli και στη συνέχεια προστέθηκε μια ποσότητα της δευτεροβάθμιας εκροής της εγκατάστασης έως ότου ο συνολικός όγκος φτάσει τα 2 m³.

Αντίστοιχα, στον αντιδραστήρα της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (όγκου επίσης 2.5 m³ και μέγιστου όγκο υγρού 2.1 m³) πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με 1000 g TSS που συλλέχθηκαν με σύστημα υφασμάτινου φίλτρου από την εκροή της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων του Koelliken. Η λάσπη αυτή περιείχε ANAMMOX βακτήρια συγγενικά του Candidatus Kuenenia Stutgartiensis. Νέος εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε

μετά από 11 ημέρες (1700 g TSS) προκειμένου να επιταχυνθεί η περίοδος εκκίνησης της διεργασίας. Η επιφάνεια του αντιδραστήρα καλύφθηκε με μπάλες πολυπροπυλενίου διαμέτρου 25mm, για τη μείωση της εισροής οξυγόνου.

Κατά τη διεργασία, τα νιτρώδη που παράγονται στον πρώτο αντιδραστήρα, μαζί με τα εναπομένοντα αμμωνιακά, αποτελούν την τροφοδοσία του ακόλουθου ANAMMOX αντιδραστήρα, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί. Ο χρόνος αντίδρασης έχει ρυθμιστεί μεταξύ 1.5-2 h και η προσθήκη της εισροής πραγματοποιείται τα πρώτα 2-10 λεπτά κάθε κύκλου. Τέλος η ανάδευση σταματάει και η βιομάζα καθιζάνει για 10 λεπτά προτού το υπερκείμενο μεταγγιστεί μέσω της επιπλέουσας αντλίας. Επίσης, μια επιπλέον παροχή ακατέργαστου λύματος εισάγεται στον αντιδραστήρα για την αποφυγή αυξημένων συγκεντρώσεων νιτρωδών, στο βαθμό που κρίνεται απαραίτητο (0-10% της παροχής από τον πρώτο αντιδραστήρα), για τη διατήρηση της συγκέντρωσης του αμμωνίου μεταξύ 10-50 g $\text{NH}_4\text{-N m}^{-3}$. Το pH παραμένει σταθερό και ίσο με 7.52 ± 0.07 , με τη βοήθεια της προσθήκης διαλύματος υδροχλωρικού οξέος.



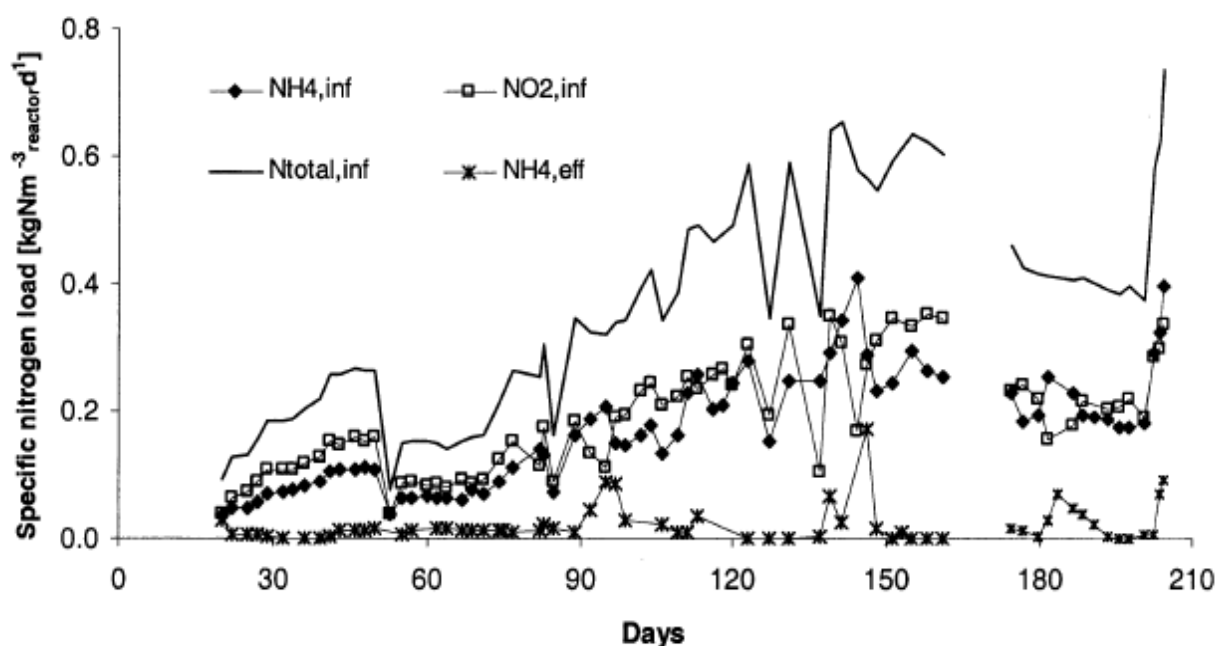
Σχήμα 6.9: Σχηματική διάταξη του αντιδραστήρα μερικής νιτρωδοποίησης (αριστερά) και της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (δεξιά), Fux et al. 2002

Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής εφαρμογής λοιπόν για την περίπτωση του λύματος από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων του Werdhoelzli (πρώτες 165 ημέρες), οι αρχικές συγκεντρώσεις αζώτου στην είσοδο του ANAMMOX αντιδραστήρα κυμάνθηκαν μεταξύ 50 και $100 \text{ g N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ και στην πορεία αυξάνονταν σταδιακά με την προϋπόθεση ότι η συγκέντρωση των νιτρωδών στην εκροή ήταν σχεδόν μηδέν. Η πρόσθετη παροχή λύματος στον αντιδραστήρα από μια διαφορετική αντλία οδήγησε σε πλεόνασμα του αμμωνίου στην

εκροή του αντιδραστήρα ANAMMOX ($38 \pm 47 \text{ g NH}_4\text{-N m}^{-3}$). Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους $31.1 \pm 0.7^\circ \text{C}$. Την 53^η ημέρα (φορτίο αζώτου $270 \text{ g N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), η συγκέντρωση των νιτρωδών αυξήθηκε στα $60 \text{ g NO}_2\text{-N m}^{-3}$ με αποτέλεσμα την σημαντική αναστολή της διεργασίας. Για το λόγο αυτό το φορτίο της εισροής μειώθηκε κατά 50% τις ακόλουθες δύο βδομάδες προκειμένου το σύστημα να ανακάμψει εκ νέου. Ωστόσο, στη συνέχεια του πειράματος το φορτίο του αζώτου αυξήθηκε έως $650 \text{ g N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ την 139^η ημέρα (με μικρές σύντομες μειώσεις τις ημέρες 85^η, 127^η και 137^η λόγω δυσλειτουργίας της αντλίας).

Υπολογίστηκε ότι η συνολική εξάλειψη αζώτου ήταν $92 \pm 7\%$, και εξαρτήθηκε σε πολύ μεγάλο βαθμό από την αναλογία νιτρώδη/αμμώνιο στην εισροή του αντιδραστήρα.

Για την περίπτωση του λύματος από την χώνευση της ενεργού ιλύος από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων του Αι, ημέρες 174-205, το συνολικό ποσοστό εξάλειψης αζώτου ήταν ελαφρώς αυξημένο και ίσο με 95%. Καταγράφηκαν ρυθμοί απομάκρυνσης αζώτου έως και $2.4 \text{ kg N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Η στοιχειομετρική αναλογία μάλιστα της κατανάλωσης αμμωνίου και νιτρωδών και της παραγωγής νιτρικών υπολογίστηκε 1:1.38:0.32 και μοιάζει πολύ με την αντίστοιχη του Strous et al. 1998 (1:1.32:0.26).



Σχήμα 6.10: Αμμώνιο και νιτρώδη στην εισροή (inf) και αμμώνιο στην εκροή (eff) του αντιδραστήρα ANAMMOX. $N_{total,inf}$ είναι το άθροισμα των $NH_{4,inf}$ και $NO_{2,inf}$. Το φορτίο νιτρικών της εισροής και το φορτίο νιτρωδών της εκροής δεν απεικονίζονται καθώς ήταν πολύ χαμηλά, Fux et al. 2002.

6.2.5 Πιλοτικής κλίμακας εφαρμογή της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας με εμβολιασμό κοκκώδους βιομάζας ANAMMOX.

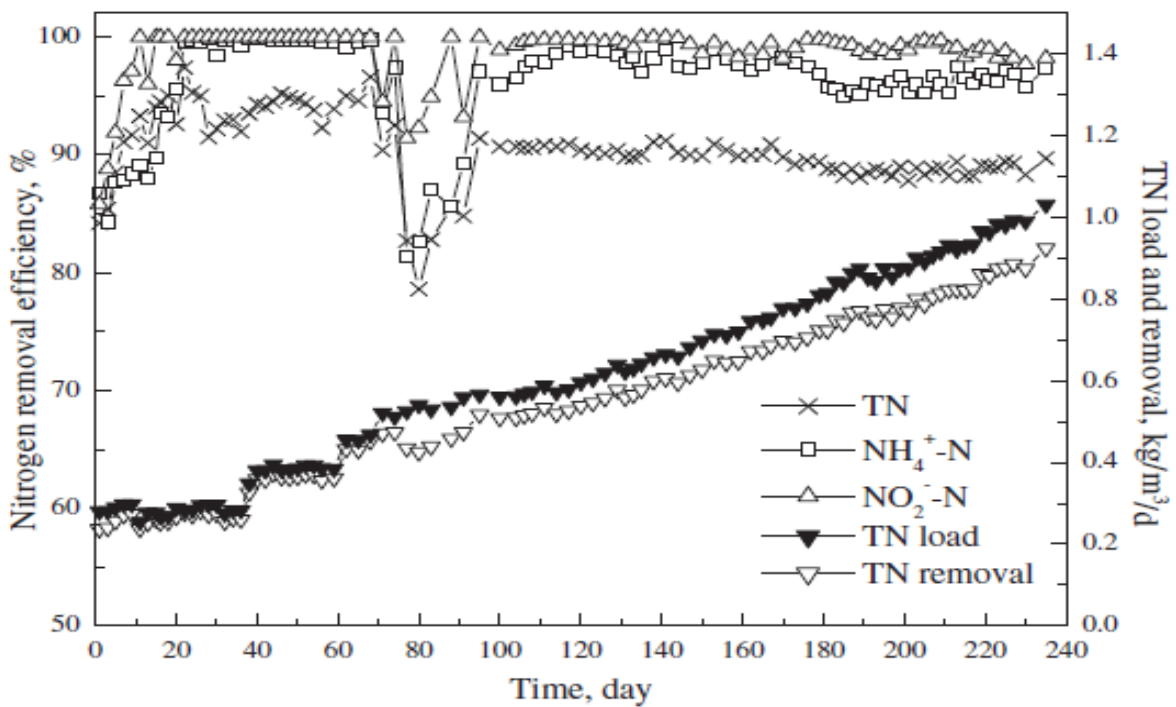
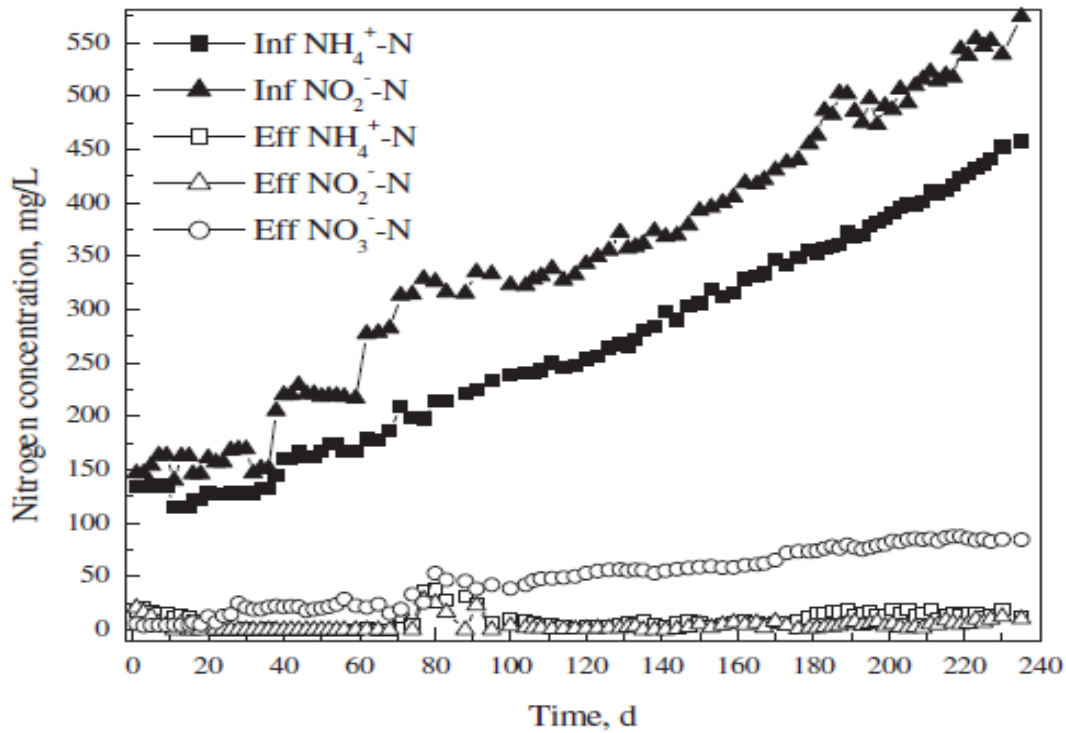
Το 2010, οι Shou-Qing Ni et al. δημοσίευσαν την μελέτη τους που πραγματεύτηκε τη χρήση της κοκκώδους βιομάζας ANAMMOX για τον εμβολιασμό ενός ANAMMOX αντιδραστήρα κοκκώδους υλίου, πιλοτικής κλίμακας, για την επίσπευση της εκκίνησης της διεργασίας και την αποτελεσματική επεξεργασία λυμάτων με υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου.

Ο πιλοτικής κλίμακας UASB αντιδραστήρας που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή του πειράματος είχε ωφέλιμο όγκο 50L ενώ διέθετε water jacket για τη διατήρηση της θερμοκρασίας στους 37° C. Ήταν εξοπλισμένος με διαχωριστή αέριας- στερεής φάσης στην κορυφή και το αέριο που παραγόταν συγκεντρωνόταν στην κορυφή, όπου και πραγματοποιούνταν οι απαραίτητες μετρήσεις. Η επανακυκλοφορία της εκροής από την κορυφή είχε αναλογία 200% με βάση το ρυθμό της εισροής. Η επανακυκλοφορία είχε στόχο, πέρα από την δημιουργία του ανοδικού ρεύματος για την εύνοια της κοκκοποίησης, και την αραίωση της εισροής για την αποφυγή τοξικών επιπτώσεων από τις υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών. Πριν τον εμβολιασμό, τοποθετήθηκε στον πυθμένα του αντιδραστήρα ένα στρώμα πάχους 5 cm από χαλίκι, διαμέτρου 2.5 και 10 mm. Το pH του αντιδραστήρα ρυθμίστηκε μεταξύ 7.5-8 με αέριο CO₂. Μετά τον εμβολιασμό του με 10 L κοκκώδους βιομάζας ANAMMOX, ο αντιδραστήρας λειτούργησε με συνεχή τροφοδοσία, με υδραυλικό χρόνο παραμονής λιγότερο από μια ημέρα.

Η κοκκώδης βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό είχε προέλθει από μια μονάδα επεξεργασίας στραγγιδίων από ΧΥΤΑ. Οι κύριες διεργασίες που λάμβαναν χώρα στη μονάδα αυτή ήταν: αερισμός, αντίστροφη όσμωση, και air stripping. Η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, η θερμοκρασία και το pH ήταν 0.5 mg/L, 30-33° C και 7.4, αντίστοιχα. Το 2008, οι Wang et al. ανακάλυψαν ότι στη μονάδα αυτή συνέβαιναν ταυτόχρονα τρεις διεργασίες: μερική νιτροποίηση, απονιτροποίηση και αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας.

Ο αντιδραστήρας τροφοδοτήθηκε με συνθετικό λύμα, το οποίο περιείχε νιτρώδη και αμμώνιο σε στοιχειομετρική αναλογία μεγαλύτερη από ένα. Η συγκέντρωση του αζώτου από 100mg/L αυξήθηκε σε περισσότερο από 500 mg/L και αντίστοιχα το NLR από 0.28 kg / (m³ d) που ήταν αρχικά, σταδιακά ξεπέρασε το 1.0 kg / (m³ d).

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα που ακολουθούν, σχήμα 6.11, μετά από περίοδο εκκίνησης περίπου δύο εβδομάδων, παρατηρήθηκαν εξαιρετικά αποτελέσματα επεξεργασίας. Η περίοδος εκκίνησης ήταν πολύ σύντομη συγκριτικά με αντιδραστήρες στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν άλλοι τύποι υλίου (Fernandez et al. 2008, Li et al. 2009, Trigo et al. 2006, Yang et al. 2006), υποδεικνύοντας ότι η "ώριμη" κοκκώδης ANAMMOX βιομάζα ήταν ιδανική επιλογή για την εκκίνηση ενός νέου αντιδραστήρα. σχεδόν όλη η ποσότητα αμμωνίου και νιτρικών της εισροής αφαιρέθηκε από το λύμα, γεγονός που σηματοδοτεί την επίτευξη αυξημένης δραστηριότητας των ANAMMOX βακτηρίων στον αντιδραστήρα.



Σχήμα 6.11: Επίδοση του αντιδραστήρα κοκκώδους βιομάζας ANAMMOX ως συνάρτηση του χρόνου. Συγκεντρώσεις των ενώσεων αζώτου στην εισροή και την εκροή (άνω διάγραμμα). Απόδοση απομάκρυνσης αζώτου (ολικού αζώτου (TN), νιτρικών και αμμωνίου, αριστερός άξονας) και φορτίο ολικού αζώτου (TN load, TN removal, δεξιός άξονας), Ni et al. 2010.

Τα εντυπωσιακά αυτά αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υπόθεση των ερευνητών ότι είναι δυνατή η γρήγορη εκκίνηση ενός αντιδραστήρα κοκκώδους ιλύος μεγάλης κλίμακας.

Πιο αναλυτικά κατά τις πρώτες 77 ημέρες, η απόδοση απομάκρυνσης των $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ και $\text{NO}_2^- - \text{N}$ αυξήθηκαν με την αύξηση των συγκεντρώσεων αζώτου στην εισροή και του NLR. Μετά την 12^η ημέρα μάλιστα, όλο το $\text{NO}_2^- - \text{N}$ της εισροής αφαιρέθηκε από το λύμα, ενώ το ποσοστό απομάκρυνσης του $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ κυμάνθηκε μεταξύ 93.2-99%, καθιστώντας τα νιτρώδη ως περιοριστικό θρεπτικό, με αποτέλεσμα ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων να μην φτάνει τον μέγιστο. Γι αυτό και οι συγκεντρώσεις των $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ και $\text{NO}_2^- - \text{N}$, σε 200 και 330 mg/L, αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα του σχήματος 6.11, την ημέρα 77, μετά την απότομη αύξηση των συγκεντρώσεων της εισροής, η απόδοση του συστήματος παρουσίασε μείωση, πιθανότατα λόγω των τοξικών επιπτώσεων της αυξημένης συγκέντρωσης νιτρωδών στον αντιδραστήρα. Ωστόσο, η διακοπή της αύξησης του εισερχόμενου φορτίου οδήγησε στην ανάκαμψη του συστήματος μετά από 14 ημέρες. Μάλιστα όταν αργότερα οι συγκεντρώσεις των $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ και $\text{NO}_2^- - \text{N}$ ξεπέρασαν το 450 και 570 mg N /L δεν εμφανίστηκε αντίστοιχη παρεμπόδιση της δραστηριότητας των βακτηρίων.

Ο ρυθμός απομάκρυνσης αζώτου που καταγράφηκε για μια μεγάλη περίοδο λοιπόν ήταν υψηλός, με το NNR να φτάνει το 0.93 kg/ (m³ d), και η μέση απόδοση απομάκρυνσης TN ήταν 89 ± 0.96 %. Αυτή η πιλοτική εφαρμογή των Ni et al. (2010) θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ιδιαίτερα επιτυχημένη, τόσο λόγω της αρκετά σύντομης περιόδου εκκίνησης, όσο και λόγω των υψηλών αποδόσεων που καταγράφηκαν. Μάλιστα, σύμφωνα και με τους ίδιους, η στρατηγική που ακολουθήθηκε θα μπορούσε να υιοθετηθεί για την υλοποίηση μεγάλης κλίμακας αντιδραστήρων αναερόβιας οξειδωσης της αμμωνίας, για την επίτευξη των προαναφερόμενων αποτελεσμάτων, τα οποία και αποτελούν το κύριο ζητούμενο στην περίπτωση ενός τέτοιου εγχειρήματος.

Κεφάλαιο 7. Συμπεράσματα και προτάσεις

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιχειρήθηκε μια ολοκληρωμένη βιβλιογραφική επισκόπηση της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας, η οποία βασίστηκε κυρίως σε δημοσιεύσεις επιστημονικών περιοδικών. Λόγω του σχετικά πρώιμου σταδίου στο οποίο βρίσκεται η διεργασία αυτή, αφού επιβεβαιώθηκε πειραματικά το 1995 για πρώτη φορά, και καθώς δεν φαίνεται να έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τους επιστήμονες και ερευνητές στη χώρα μας, δεν υπάρχει διαθέσιμο βιβλιογραφικό υλικό στα ελληνικά. Η εργασία αυτή λοιπόν, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι αποτελεί ένα εγχείρημα "εξοικείωσης" με την μέθοδο αυτή, που είναι απαραίτητο σε πρώτο στάδιο, για την περαιτέρω ενασχόληση με το αντικείμενο.

Αξίζει να σημειωθεί ότι από την πρώτη καταγεγραμμένη υπόθεση για την ύπαρξη αυτής της διεργασίας έως την πειραματική της επιβεβαίωση μεσολάβησε μια χρονική περίοδος τριάντα χρόνων. Το γεγονός αυτό είναι εμφανές ότι οφείλεται στη διστακτικότητα της πλειοψηφίας των επιστημόνων να δεχτούν την "επαναστατική γνώση" και την ανατροπή των διαμορφωμένων ισορροπιών.

Επίσης, μία άκρως ενδιαφέρουσα παράμετρο αποτελεί η ιδιαιτερότητα των ANAMMOX βακτηρίων, καθώς παρουσιάζουν μοναδική δομή, εναλλακτικό μεταβολισμό και πολύ μικρό ρυθμό ανάπτυξης.

Όσον αφορά στην αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας από τη σκοπιά της βιοτεχνολογίας, το κύριο ζητούμενο είναι η εφαρμογή της διεργασίας στην επεξεργασία λυμάτων, καθώς φαίνεται να δίνει τη δυνατότητα εξοικονόμησης σημαντικού κόστους λειτουργίας και αντιμετώπισης λυμάτων με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Ωστόσο για την επίτευξη του στόχου αυτού θα πρέπει να λάβει κανείς υπόψη του μια πληθώρα παραγόντων, οι οποίοι θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν σε μεγάλο βαθμό την απόδοση της μεθόδου.

Αρχικά, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο γεγονός ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων είναι μικρός και επομένως θα πρέπει να εξασφαλιστεί η διατήρηση και παραμονή της απαραίτητης βιομάζας στον αντιδραστήρα. Για το λόγο αυτό φαίνεται ως ορθότερη η επιλογή συστημάτων προσκολλημένης βιομάζας, χωρίς βέβαια να αποκλείονται και άλλου τύπου συστήματα εφόσον εξασφαλιστούν οι αναγκαίες συνθήκες, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της μεγάλης κλίμακας εφαρμογής στο Rotterdam όπου η μέθοδος της κοκκώδους ιλύος φάνηκε να ανταποκρίνεται με μεγάλη επιτυχία.

Σημαντικό ρόλο για την αποτελεσματική εφαρμογή της μεθόδου αποτελεί και η ρύθμιση παραμέτρων - συνθηκών λειτουργίας όπως η θερμοκρασία, το pH και το διαλυμένο οξυγόνο καθώς αυξομείωση τους πέρα από το επιθυμητό εύρος τιμών θα μπορούσε να προκαλέσει έως και την πλήρη αναστολή της δραστηριότητας των βακτηρίων, και μάλιστα χωρίς δυνατότητα ανάκαμψης σε κάποιες περιπτώσεις.

Το ίδιο θα μπορούσε να συμβεί και για τις ουσίες υποστρώματος (νιτρώδη, αμμώνιο) όταν εισαχθούν στον αντιδραστήρα σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις ή με μεγάλους ρυθμούς

αύξησης των συγκεντρώσεων τους. Το γεγονός αυτό θα πρέπει να αποτελεί και τον κύριο λόγο ανησυχίας κατά την περίοδο εκκίνησης της λειτουργίας (start-up) ενός ANAMMOX αντιδραστήρα.

Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί το μεγάλο χρονικό διάστημα που απαιτείται για την εκκίνηση της λειτουργίας ενός ANAMMOX αντιδραστήρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πρώτη μεγάλης κλίμακας εφαρμογή στο Rotterdam, όπου απαιτήθηκαν 3.5 χρόνια για την καλλιέργεια και ανάπτυξη του απαιτούμενου πληθυσμού βακτηρίων. Ωστόσο, όπως φαίνεται και από τις ακόλουθες εφαρμογές, εξασφαλίζοντας τον εμβολιασμό βιομάζας από προϋπάρχουσα μονάδα ο χρόνος αυτός μπορεί να μειωθεί δραματικά, εξαλείφοντας την αδυναμία αυτή της μεθόδου.

Για την περαιτέρω εξέλιξη της μεθόδου προκειμένου να βελτιωθεί και να κερδίσει την απαιτούμενη αξιοπιστία ώστε να εφαρμοστεί ευρέως, όπως είναι προφανές, είναι απαραίτητη η μελλοντική έρευνα.

Μια κατεύθυνση στην οποία θα μπορούσε να στραφεί το ενδιαφέρον είναι η εξέταση της καταλληλότητας των διαφορετικών τύπων αντιδραστήρων και μέσων (carriers) για τη βελτίωση της παραμονής και της αύξησης της βιομάζας στο σύστημα.

Επίσης, σημαντική είναι η διερεύνηση της δυνατότητας της εφαρμογής της μεθόδου σε λύματα με διαφορετική σύσταση και προέλευση, όπως για παράδειγμα αστικά λύματα (για τα οποία δεν υπάρχει έως σήμερα εφαρμογή μεγάλης κλίμακας) λύματα πλούσια σε αμμωνία και άζωτο, βιομηχανικά λύματα, λύματα από εκτροφεία ζώων.

Τέλος, περισσότερα στοιχεία θα πρέπει να συγκεντρωθούν σε σχέση με το συνολικό κόστος της εφαρμογής της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας και της, ώστε να μπορεί να αποδειχθεί εμπεριστατωμένα η θεωρητική υπεροχή της σε σχέση με τις άλλες μεθόδους επεξεργασίας λυμάτων.

Βιβλιογραφία

Abma, W. R., Schultz, C. E., Mulder, J. W., van der Star, W. R. L., Strous, M., Tokutomi, T., van Loosdrecht, M. C. M. Full-scale granular sludge anammox process. *Water Sci. Technol.* 2007, 55(8), 27–33.

Ahn YH, Choi HC (2006) Autotrophic nitrogen removal from sludge digester liquids in upflow sludge bed reactor with external aeration. *Process Biochem* 41:1945–1950

Alawi M, Lipski A, Sanders T, Pfeiffer EM, Spieck E (2007) Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *Int Soc Microb Ecol* 1:256–264

Anthonisen A. C., R. C. Loehr, T. B. S. Prakasam, E. G. Srinath, Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, *J. WPCF* 1976, 46, 835–852.

Arrigo KR. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 2005;437:349–55.

Bagchi S, Biswas R, Roychoudhury K, Nandy T (2009) Stable partial nitrification in an up-flow fixed bed bioreactor under oxygen limiting environment. *Environ Eng Sci* 26(8):1309–1318

Brandes JA, Devol AH (2002) A global marine-fixed nitrogen isotopic budget: Implications for Holocene nitrogen cycling. *Global Biogeochem Cycles* 16:1120–1133

Bremner J. M., Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer, *Fertilizer Res.* 1995, 42 (1–3), 321–329.

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

Bettazzi Elena, Simone Caffaz , Claudia Vannini, Claudio Lubello. Nitrite inhibition and intermediates effects on Anammox bacteria: A batch-scale experimental study. *Process Biochemistry* 45 (2010) 573–580

Campos JL, Garrido JM, Méndez R, Lema JM. Effect of two broad-spectrum antibiotics on activity and stability of continuous nitrifying system. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2001;95:1–10.

Cirpus, I. E. Y., M. de Been, H. J. M. Op den Camp, M. Strous, D. Le Paslier, J. G. Kuenen, and M. S. M. Jetten. 2005. A new soluble 10 kDa monoheme cytochrome *c*-552 from the anammox bacterium *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis."* *FEMS Microbiol. Lett.* 252:273–278.

Chamchoi N, Nitorisavut S (2007) Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere* 66:2225–2232.

Chamchoi, N., Nitorisavut, S., Schmidt, J.E., 2008. Inactivation of ANAMMOX communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation and denitrification. *Biores. Technol.* 99, 3331–3336.

Cema G., J. Wiszniowski, S. Zabczyński, E. Zabłocka-Godlewska, A. Raszka, J. Surmacz-Górska, Biological nitrogen removal from landfill leachate by deammonification assisted by heterotrophic denitrification in a rotating biological contactor (RBC), *Water Sci. Technol.* 55 (8/9) (2007) 35–42.

Cema Grzegorz, Comparative study on different Anammox systems, PhD Thesis, 2009, TRITA-LWR PhD Thesis 1053, ISSN 1650-8602, ISRN KTH/LWR/PHD 1053-SE, ISBN 978-91-7415-501-3

Cline JD, Richards FA (1972) Low oxygen concentrations and nitrate reduction in the eastern tropical North Pacific Ocean. *Limnol Oceanogr* 17:885–900

Codispoti LA, Richards FA (1976) An analysis of the horizontal regime of denitrification in the eastern tropical North Pacific. *Limnol Oceanogr* 21:379–388

Dapena-Mora A., Campos J. L., Mosquera-Corral A., Jetten M. S. M. and Méndez R. (2004) Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. *Journal of Biotech.*, 110(2004), 159-170.

Dapena-Mora, A., Fernández, J., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Munde, R., Jetten, M.S.M., 2007. Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process and batch tests based on the nitrogen gas production. *Enz. Microb. Technol.* 40,859–865

Dapena-Mora A., J.R. Vázquez-Padín, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral, M.S.M. Jetten, R. Munde. Monitoring the stability of an Anammox reactor under high salinity conditions *Biochemical Engineering Journal* 51 (2010) 167–171

Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, Thamdrup B, Acuna-Gonzalez J (2003) N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* 422:606–608

Dosta J., I. Fernández, J.R. Vázquez-Padín, A. Mosquera-Corral, J.L. Campos, J. Mata-Alvarez, R. Méndez. Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *Journal of Hazardous Materials* 154 (2008) 688–693

Engstrom P, Dalsgaard T, Hulth S, Aller RC (2005) Anaerobic ammonium oxidation by nitrite (anammox): Implications for N₂ production in coastal marine sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 69:2057–2065

Egli K, U. Fanger, P.J.J. Alvarez, Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate, *Arch. Microbiol.* 175 (2001) 198–207.

Egli K., Bosshard F., Werlen C., Lais P., Siegrist H., Zehnder A.J.B., van der Meer J.R. (2003). Microbial Composition and Structure of a Rotating Biological Contactor Biofilm Treating Ammonium-Rich Wastewater without Organic Carbon. *Microbial Ecology* 45, 419 – 432.

Fernandez I., Mosquera-Corral A., Campos J.L., Mendez R. ,2009, Operation of an Anammox SBR in the presence of two broad-spectrum antibiotics. *Process Biochemistry* 44 (2009) 494–498

Fernández I., A. Dapena-Mora, J.L. Campos, A. Mosquera-Corral, R. Méndez, Post-treatment of effluents from a fish cannery by combined partial nitrification and Anammox processes, in: *Proceedings of the Book of CLONIC Final Workshop, Barcelona, Spain, 2007*, pp. 58–65.

Freitag TE, Prosser JI (2003) Community structure of ammoniaoxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 69:1359–1371

Fux C, V. Marchesi, I. Brunner, H. Siegrist, Anaerobic ammonium oxidation of ammonium-rich waste streams in fixed-bed reactors, *Water Sci. Technol.* 49 (11/12) (2004) 77–82.

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

Ganigue´ R, Lo´pez H, Balaguer MD, Colprim J (2007) Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. *Water Res* 41:3317–3326.

Gong Z, Yang F, Liu S, Bao H, Hu S, Furukawa K (2007) Feasibility of a membrane-aerated biofilm reactor to achieve singlestage autotrophic nitrogen removal based on ANAMMOX. *Chemosphere* 69:776–784

Gut Luisa, ASSESSMENT OF A PARTIAL NITRITATION/ANAMMOX SYSTEM FOR NITROGEN REMOVAL, PhD Thesis, 2006, TRITA-LWR Licentiate Thesis 2034, ISSN 1650-8629, ISRN KTH/LWR/LIC 2034-SE, ISBN 91-7178-167-6

Hamersley MR, Lavik G, Woebken D, Rattray JE, Lam P, Hopmans EC, Sinninghe Damste JS, Kruger S, Graco M, Gutierrez D, Kuypers MMM (2007) Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr* 52:923–933

Hao X., Heijnen J. J. and van Loosdrecht M. C. M. (2002b) Sensitivity analysis of biofilm model describing a one-stage completely autotrophic nitrogen removal (CANON) process. *Bio-technol. Bioeng.*, 77(3), 266-277.

Hanaki K., C. Wantawin, S. Ohgaki, Nitrification at low-levels of dissolved-oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor, *Water Res.* 1990, 24 (3), 297– 302.

Hartig C.; Storm T.; Jekel M. (1999) Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal wastewater by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 854, 163-173.

Halling-Sørensen B.; Nors Nielsen S.; Lanzky P. F.; Ingerslev F.; Holten Lützhøft H.-C.; Jørgensen S.E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the Environment – a review. *Chemosphere*, 36, 357-393.

Hellinga C., Schellen A. A. J. C., Mulder J. W., van Loosdrecht M. C. M. and Heijnen J. J. (1998) The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, 37(9), 135-142.

Hirsch R.; Ternes T.; Haberer K.; Kratz K.-L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of The Total Environment*, 225, 109-118.

Helder W., R. T. P. de Vries, Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (Ems-Dollard estuary), *Neth. J. Sea Res.* 1983, 17, 1–18.

Helmer C. and Kunst S. (1998) Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. *Wat. Sci. Tech.*, 37(4-5), 183-187.

Henze M., Harremoës P., Jansen J. la C. and Arvin E. (2002) *Wastewater treatment: Biological and Chemical Processes*. Springer, Heidelberg, 430 p.

Huang C.-H.; Renew J. E.; Pinkston K.; Sedlak D. L. (2001) Occurrence and fate of antibiotics compounds in municipal wastewater and animal waste. In: Proceedings of the “74th Water Environment Federation Annual Conference and Exposition (WEFTEC.)”, 13- 17 October 2001, Atlanta, USA.

Huston, W. M., H. R. Harhangi, A. P. Leech, C. S. Butler, M. S. M. Jetten, H. J. M. Op den Camp, and J. W. B. Moir. 2007. Expression and characterization of a major c-type cytochrome encoded by gene kustc0563 from *Kuenenia stuttgartiensis* as a recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 51:28–33.

Jetten M S M, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, van Dongen UGJM, van de Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, van Loosdrecht MCM, Kuenene JG (1999) The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol Rev* 22:421–437

Ingerslev F.; Halling –Sørensen B. (2000) Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2467-2473.

Imajo U., T. Tokutomi, K. Furukawa, Granulation of Anammox microorganisms in up-flow reactors, *Water Sci. Technol.* 49 (2004) 155–163.

Isaka, K., Sumino, T., Tsuneda, S., 2007. High nitrogen removal performance at moderately low temperature utilizing anaerobic ammonium oxidation reactions. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 486–490.

Jing-ping, Z., Yong-you, H., Hui-gian, L., 2006. Correlation of anaerobic ammonium oxidation and denitrification. *J. Environ. Sci.* 18 (2), 227–231.

Jianlong W, Jing K (2005) The characteristics of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) by granular sludge from an EGSB reactor. *Process Biochem* 40:1973–1978.

Jung J.Y., S.H. Kang, Y.C. Chung, D.H. Ahn, Factors affecting the activity of anammox bacteria during start up in the continuous culture reactor, *Water Sci. Technol.* 55 (1/2) (2007) 459–468.

Jetten M S M, The microbial nitrogen cycle *Environmental Microbiology* (2008) 10(11), 2903–2909

Jetten M S M, Sliekers O, Kuypers M, Dalgaard T, van Niftrik L, Cirpus I, van de Pas-Schoonen K, Lavik G, Thamdrup B, Le Paslier D, Op den Camp HJM, Hulth S, Nielsen LP, Abma W, Third K, Engstrom P, Kuenen JG, Jorgensen BB, Canfield DE, Sinninghe Damste JS, Revsbech NP, Fuerst J, Weissenbach J, Wagner M, Schmidt I, Schmid M,

Jetten M. S. M., Wagner M., Fuerst J., van Loosdrecht M. C. M., Kuenen G. and Strous M. (2001) Microbiology and application of anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 283-288.

Joss A., Salzgeber J. E., Konig R., Rottermann K., Burger P. F., Leumann S. , Mohn J., and Siegrist H. 2009, Full-Scale Nitrogen Removal from Digester Liquid with Partial Nitritation and Anammox in One SBR. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 5301–5306

Kadlec R. H., R. L. Knight, *Treatment Wetlands*, Lewis Publishers, Boca Raton, La Florida 1996, 373–440

Kalyuzhnyi S., Gladchenko M., Mulder A., Versprille B. (2006). DEAMOX-New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphidedriven conversion of nitrate into nitrite. *Water Research*, 40, 3637-3645.

Kartal B., M. Koleva, R. Arsov, W. van der Star, M.S. Jetten, M. Strous, Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater, *J. Biotechnol.* 126 (2006) 546–553.

Kartal B, Kuypers MMM, Lavik G, Schalk J, Op den Camp HJM, Jetten MSM, Strous M (2007a) Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ Microbiol* 9:635–642

Kartal B, Rattray J, van Niftrik LA, van de Vossenberg J, Schmid MC, Webb RI, Schouten S, Fuerst JA, Sinninghe Damste J, Jetten MSM, Strous M (2007b) *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"* a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 30:39–49

Kartal B. (2008). *Ecophysiology of the anammox bacteria*. PhD thesis. Department of Microbiology, Radboud University Nijmegen. Nijmegen, ISBN 978 90 90227 14 6.

Keller J., Subramaniam K., Gösswein J. and Greenfield P. F. (1997) Nutrient removal from industrial wastewater using single tank sequencing batch reactors. *Wat. Sci. Tech.*, 35(6), 137-144.

Koch G., Egli K., Van der Meer J. R. and Siegrist H. (2000) Mathematical modelling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contractor. *Wat. Sci. Tech.*, 41(4-5), 191-198.

Kuenen, J. G., and M. S. M. Jetten. 2001. Extraordinary anaerobic ammonium- oxidizing bacteria. *ASM News* 67:456–463.

Kuypers MMM, Sliemers AO, Lavik G, Schmid M, Jorgensen BB, Kuenen JG, Sinninghe Damste JS, Strous M, Jetten MSM (2003) Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422:608–611

Kuypers MMM, Lavik G, Woebken D, Schmid M, Fuchs BM, Amann R, Jorgensen BB, Jetten MSM (2005) Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc Natl Acad Sci* 102:6478–6483

Kuai L, Verstraete W (1998) Ammonium removal by the oxygenlimited autotrophic nitrification–denitrification system. *Appl Environ Microbiol* 64:4500-4506

Kuai L. and Verstraete W. (1980) Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(11), 4500-4506.

Li B, Irvin S (2007) The comparison of alkalinity and ORP as indicators for nitrification and denitrification in a sequencing batch reactor (SBR). *Biochem Eng J* 34:248–255

LIAO Dexiang, LI Xiaoming, YANG Qi, ZENG Guangming, GUO Liang, YUE Xiu. Effect of inorganic carbon on anaerobic ammonium oxidation enriched in sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Sciences* 20(2008) 940–944

Liu ST, Yang FL, Gong Z, Meng F, Chen H, Xue Y, Furukawa K (2008) Application of anaerobic ammonium-oxidizing consortium to achieve completely autotrophic ammonium and sulfate removal. *Bioresour Technol* 99(15):6817–6825.

Lindsay MR, Web RI, Strous M, Jetten M, Butler MK, Fuerst JA (2001) Cell compartmentalization in planctomycetes: Novel types of structural organization for the bacterial cell. *Arch Microbiol* 175:413–429

Laanbroek H. J., S. Gerards, Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed continuous cultures, *Arch. Microbiol.* 1993, 159 (5), 453–459.

Liao D., Li X., Yang Q., Zeng G., Guo L., Yue X. Effect of inorganic carbon on anaerobic ammonium oxidation enriched in sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Sciences* 20(2008) 940–944

Li J., Xiong, B., Zhang, S., Yang, H., Zhang, J., 2005. Anaerobic: ammonium oxidation for advanced municipal wastewater treatment is it feasible? *J. Environ. Sci.* 17 (6), 1022–1024.

Liang, Z., Liu, J., 2008. Landfill leachate treatment with a novel process: Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) combined with soil infiltration system. *J. Haz. Mater.* 151, 202–212.

Mulder A., A. A. van de Graaf, L. A. Robertson, J. G. Kuenen, Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, *FEMS Microbiol. Ecol.* 1995, 16 (3), 177–184.

Ma WK, Schautz A, Fishback L-AE, Bedard-Haughn A, Farrell RE, Siciliano SD (2007) Assessing the potential of ammonia oxidizing bacteria to produce nitrous oxide in soils of a high arctic lowland ecosystem on Devon Island, Canada. *Soil Biol Biochem* 39:2001–2013

Makuch Anna, Krystyna Mędrzycka, Elżbieta Płaza. INVESTIGATION OF SULPHONAMIDES EFFECT ON ANAMMOX PROCESS

Masse´ DI, Lu D, Masse L, Droste RL. Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* 2000;75:205–11.

Meyer RL, Risgaard-Petersen N, Allen DE (2005) Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Appl Environ Microbiol* 71:6142–6149

Molinuevo, B., Garcia, M.C., Karakashev, D., Angelidaki, E., 2008, Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: Effect of organic matter content on process performance *Biores. Technol.* 100 2171-2175

Ni Shou-Qing, Bao-Yu Gao, Chih-Cheng Wang, Jih-Gaw Lin,, Shihwu Sung. Fast start-up, performance and microbial community in a pilot-scale anammox reactor seeded with exotic mature granules. *Bioresource Technology* 102 (2011) 2448–2454

Okpokwasili GC, Eleke FN. Effects of antimicrobial agents on the activity and survival of *Aeromonas hydrophila* and nitrifying bacteria in vitro. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka* 1997;25(4):231–40.

Paredes D, Kusch P, Mbwette TSA, Stange F, Müller RA, Köser H (2007) New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment—a review. *Eng Life Sci* 7(1):13–25

Penton CR, Tiedje JM (2006) Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 72:6829–6832

Penton C R., R. Margesin (ed.) *Permafrost Soils*, Soil Biology 16, 149
DOI: 10.1007/978-3-540-69371-0, c Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009

Pynaert K, Smets BF, Beheydt D, Verstraete W (2004) Start-up of autotrophic nitrogen removal reactors via sequential biocatalyst addition. *Environ Sci Technol* 38(4):1228–1235.

Pynaert K., Wyffels S., Sprengers R., Boeckx P., Van Cleemput O. and Verstraete W. (2002) Oxygen-limited nitrogen removal in a lab-scale rotating biological contractor treating an ammonium-rich wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, 45(10), 357-363.

Rattray JE, van de Vossenberg J, Hopmans EC, Kartal B, van Niftrik L, Rijpstra WIC, Strous M, Jetten MSM, Schouten S, Damste JSS (2008) Ladderane lipid distribution in four genera of anammox bacteria. *Arch Microbiol* 190:51–66

Rich, J.J., Dale, O.R., Song, B., and Ward, B.B. (2008) Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in Chesapeake Bay sediments. *Microbiol Ecol* 53: 311–320.

Richards FA (1965) Anoxic basins and fjords. In: Riley JP, Skirrow G (eds) *Chemical oceanography*, vol 1. Academic Press, London, pp 611–645

Rysgaard S, Glud RN (2004) Anaerobic N₂ production in Arctic sea ice. *Limnol Oceanogr* 49:86–94

Risgaard-Petersen, N., Meyer, R.L., Schmid, M., Jetten, M.S. M., Enrich-Prast, A., Rysgaard, S., and Revsbech, N.P. (2004) Anaerobic ammonia oxidation in an estuarine sediment. *Aquat Microb Ecol* 36: 293–304.

Rittmann B. E. and McCarty P. L. (2001) *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. International Edition, 2001. McGraw-Hill Education.

Schalk, J., S. de Vries, J. G. Kuenen, and M. S. M. Jetten. 2000. Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation. *Biochemistry* 39:5405–5412

Schmid M, Walsh K, Webb R, Rijpstra WIC, van de Pas-Schoonen KT, Verbruggen MJ, Hill T, Moffett B, Fuerst J, Schouten S, Sinninghe Damste JS, Harris J, Shaw P, Jetten MSM, Strous M (2003) *Candidatus* “*Scalindua brodae*,” sp. nov., *Candidatus* “*Scalindua wagneri*”, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 26:529–538

Schmidt JE, Batstone DJ, Angelidaki I (2004) Improved nitrogen removal in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by incorporation of Anammox bacteria into the granular sludge. *Water Sci Technol* 49:69–76

Schalk J.; Oustad H.; Kuenen J. G.; Jetten M.S.M. (1998) The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiology Letters*, 158, 61-67.

Sabumon, P.C., 2007. Anaerobic ammonia removal in presence of organic matter: A novel route. *J. Haz. Mater.* 149, 49–59.

Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Bock E., Fuerst J., Kuenen J. G., Jetten M. S. M. and Strous M. (2003) New concept of microbial treatment process for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27, 481-492.

Schmidt I, Batstone and Angelidaki I. (2004) Improved nitrogen removal in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) by incorporation of Anammox bacteria into the granular sludge. *Wat. Sci. Tech.*, 49(11-12), 69-76.

Schmid M, Twachtmann U, Klein M, Strous M, Juretschko S, Jetten MSM, Metzger J, Schleifer KH, Wagner M (2000) Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol* 23:93–96

Schmid MC, Maas B, Dapena A, van de Pas-Schoonen K, van de Vossenberg J, Kartal B, van Niftrik L, Schmidt I, Cirpus I, Kuenen JG, Wagner M, Sinninghe Damste JS, Kuypers M, Revsbech P, Mendez R, Jetten MSM, Strous M (2005) Biomarkers for the in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71:1677–1684

Schmid, M.C., Risgaard-Petersen, N., van de Vossenberg, J., Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Petersen, J., *et al.* (2007) Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine environments: widespread occurrence but low diversity. *Environ Microbiol* 9: 1476–1486.

Schubert CJ, Durlsch-Kalser E, Wehril B, Thamdrup B, Lam P, Kuypers MMM (2006) Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environ Microbiol* 8:1857–1863

Shimamura, M., T. Nishiyama, H. Shigetomo, T. Toyomoto, Y. Kawahara, K. Furukawa, and T. Fujii. 2007. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1065–1072.

Sinninghe Damste JS, Rijpstra WIC, Schouten S, Fuerst JA, Jetten MSM, Strous M (2004) The occurrence of hopanoids in planctomycetes: Implications for the sedimentary biomarker record. *Org Geochem* 35:561–566

Sliekers AO, Third KA, Abma W, Kuenen JG, Jetten MSM (2003) CANON and ANAMMOX in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiol Lett* 218:339–344

Sliekers AO, Derwort N, Gomez JL, Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM (2002) Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res* 36:2475–2482

Sliekers AO, Haaijer SCM, Stafsnes MH, Kuenen JG, Jetten MSM (2005) Competition and coexistence of aerobic ammonium and nitrite-oxidizing bacteria at low oxygen concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:808–817

Soto M, M'endez R, Lema JM. Sodium inhibition and sulphate reduction in the anaerobic treatment of mussel processing wastewaters. *J Chem Technol Biotechnol* 1993;58:1–7.

Sowers T (2001) N₂O record spanning the penultimate deglaciation from the Vostok ice core. *J. Geophys Res Atmos* 106:31903–31914

Strous M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann S, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MSM (1999a) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400:446–449

Strous M (2003) Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:107–114

Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM (1999b) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl Environ Microbiol* 65:3248–3250

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

Strous M, van Gerven E, Zheng P, Kuenen JG, Jetten MSM (1997) Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) Process in different reactor configurations. *Water Res* 31:1955–1962.

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

Strous M, Pelletier E, Mangenot S, Rattei T, Lehner A, Taylo MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, Barbe V, Fonknechten N, Vallenet D, Segurens B, Schenowitz-Truong C, Medigue C, Collingro A, Snel B, Dutilh BE, Op den Camp HJM, van der Drift C, Cirpus I, van de Pas-Schoonen KT, Harhangi HR, van Niftrik L, Schmid M, Keltjens J, van de Vossenberg J, Kartal B, Meier H, Frishman D, Huynen MA, Mewes H-W, Weissenbach J, Jetten MSM, Wagner M, Le Paslier D (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* 440:790–794

Surmacz-Górska J., Cichoń A. and Miksch K. (1997) Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification. *Wat. Sci. Tech.*, 36(10), 73-78.

Szatkowska B, Cema G, Plaza E, Trela J, Hultman B (2007) A one-stage system with partial nitrification and Anammox processes in the moving-bed biofilm reactor. *Water Sci Technol* 55(8–9):19–26.

Swatkowska Beata, PhD Thesis, Performance and control of biofilm systems with partial nitrification and Anammox for supernatant treatment. 2007, TRITA-LWR PhD Thesis 1035, ISSN 1650-8602, ISRN KTH/LWR/PHD 1035-SE, ISBN 978-91-7178-729-3

Tang Chong-jian, Ping Zheng , Qaisar Mahmood , Jian-wei Chen. Start-up and inhibition analysis of the Anammox process seeded with anaerobic granular sludge. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2009) 36:1093–1100 DOI 10.1007/s10295-009-0593-0

Thamdrup B, Dalsgaard T (2002) Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 68:1312–1318

Third KA, Sliemers AO, Kuenen JG, Jetten MSM (2001) The CANON system (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *Syst Appl Microbiol* 24:588–596

Third K. A. (2003) *Oxygen management for optimisation of nitrogen removal in a sequencing batch reactor*. PhD Thesis, School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Western Australia.

Trimmer M, Risgaard-Petersen N, Nicholls JC, Engstrom P (2006) Direct measurement of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification in intact sediment cores. *Mar Ecol Prog Ser* 326:37–47

Toh SK, Webb RI, Ashbolt NJ (2002) Enrichment of the autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters. *Microb Ecol* 43:154–167.

Tsushima I, Kindaichi T, Okabe S (2007) Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Res* 41:785–794

Uhliřova E, Šantrůčková H, Davidov SP (2007) Quality and potential biodegradability of soil organic matter preserved in permafrost of Siberian tussock tundra. *Soil Biol Biochem* 39:1978–1989

van Benthum W. A. J., Garrido J. M., Mathijssen J. P. M., Sunde J., van Loosdrecht M. C. M. and Heijnen J. J. (1998) Nitrogen removal in intermittently aerated biofilm airlift reactor. *Journal of Environmental Engineering*, 124, 239-248

van Loosdrecht M. C. M. and Salem S. (2005) Biological treatment of sludge digester liquids. In: *Proceedings of the IWA Specialized Conference "Nutrient Management in Wastewater Treatment Processes and Recycle Streams"*, 19-21 September 2005, Kraków, Poland, 13-22.

van Loosdrecht M. C. M., Hao X., Jetten M. S. M. and Agama W. (2004) Use of Anammox in urban wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.: Water Supply*, 4(1), 87-94.

van Loosdrecht M. C. M., Van Benthum W. A. J. and Heijnen J. J., (2000) Integration of nitrification and denitrification in biofilm airlift suspension reactors. *Wat. Sci. Tech.*, 41(4-5), 97-103.

van Niftrik L., Willie J. C. Geerts, Elly G. van Donselaar, Bruno M. Humbel, Richard I. Webb, John A. Fuerst, Arie J. Verkleij, Mike S. M. Jetten, and Marc Strous (2008) Linking Ultrastructure and Function in Four Genera of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria: Cell Plan, Glycogen Storage, and Localization of Cytochrome c Proteins. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 190 (2) 708-717

van Niftrik, L. A., J. A. Fuerst, J. S. Sinninghe Damste', J. G. Kuenen, M. S. M. Jetten, and M. Strous. 2004. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 233:7–13.

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

van de Graaf AA, Mulder A, de Bruijn P, Jetten MSM, Robertson LA, Kuenen JG. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology* 1995;61(4):1246–51.

Van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology (UK)* 1996;142:2187–96.

Van der Star, J., van de Graaf, J., Kartal, B., Picioreanu, C., Jetten, M., Loosdrecht, V., 2008. Response of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria to hydroxylamine. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4417–4426.

Verstraete W. and Philips S. (1998) Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. *Environmental Pollution*, 102, S1, 717-726.

Vorobyova E, Soina V, Gorlenko M, Minkovskaya N, Zalinova N, Mamukelashvili A, Gilichinsky D, Rivkina E, Vishnivetskaya T (1997) The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiol Rev* 20:277–290

Vlaeminck SE, Terada A, Smets BF, van der Linden D, Boon N, Verstraete W, Carballa M (2009) Nitrogen removal from digested black water by one-stage partial nitritation and ANAMMOX. *Environ Sci Technol* 43:5035–5041

Vadivelu VM, Keller J, Yuan ZG (2006) Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnol Bioeng* 95:830–839.

Vázquez-Padrín JR, Pozo MJ, Jarpa M, Figueroa M, Franco A, Mosquera-Corral A, Camposa JL, Méndez R (2009) Treatment of anaerobic sludge digester effluents by the CANON process in an air pulsing SBR. *J Hazard Mater* 166:336–341

Windey K., I. De Bo, W. Verstraete, Oxygen-limited autotrophic nitrification denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater, *Water Res.* 39 (2005) 4512–4520.

Waki, M., Tokutomi, T., Yokoyama, H., Tanaka, Y., 2007. Nitrogen removal from animal waste treatment water by anammox enrichment. *Biores. Technol.* 98, 2775–2780.

Wang, J., Kang, J., 2005. The characteristics of anaerobic ammonia oxidation (ANAEROBIC AMMONIA REMOVAL) by granular sludge from an EGSB reactor. *Process Biochem.* 40, 1973–1978.

Wiesmann, Biological nitrogen removal from wastewater, in: A. Fletcher (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 51, Springer- Verlag, Berlin, 1994, pp. 113–154

Woebken, D., Fuchs, B.M., Kuypers, M.M.M., and Amann, R. (2007) Potential interactions of particle-associated anammox bacteria with bacterial and archaeal partners in the Namibian upwelling system. *Appl Environ Microbiol* 73: 4648–4657.

Yang Q, Jia Z, Liu R, Chen J (2007) Molecular diversity and Anammox activity of novel Planctomycete-like bacteria in the wastewater treatment system of a full-scale alcohol manufacturing plant. *Process Biochem* 42:180–187.

Yang Y., J.E. Zuo, P. Shen, X.S. Gu, Influence of temperature, pH value and organic substance on activity of ANAMMOX sludge, *Huan Jing Ke Xue* 27 (4) (2006) 691–695

Yang Jiachun, Li Zhang, Yasuhiro Fukuzaki , Daisuke Hira, Kenji Furukawa High-rate nitrogen removal by the Anammox process with a sufficient inorganic carbon source. *Bioresource Technology* 101 (2010) 9471–9478

Zhang T, Q-M Yan, L Ye (2010) Autotrophic biological nitrogen removal from saline wastewater under low DO. *J Chem Technol Biotechnol* (www.interscience.wiley.com) DOI 10.1002/jctb.2438

Zhang Y, Ruan X-H, Op den Camp HJM, Smits TJM, Jetten MSM, Schmid MC (2007) Diversity and abundance of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater sediments of the Xinyi River (China). *Environ Microbiol* 9:2375–2382