



(12) PATENT

(19) NO

(11) 338103

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C02F 3/34 (2006.01)

C02F 3/12 (2006.01)

C02F 3/30 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20140606	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr
(22)	Inng.dag	2014.05.14	(85)	Videreføringsdag
(24)	Løpedag	2014.05.14	(30)	Prioritet
(41)	Alm.tilgj	2015.11.16		
(45)	Meddelt	2016.08.01		
(73)	Innehaver	Yara International ASA, Postboks 343 Skøyen, 0213 OSLO, Norge Marina Ettl, Schöttroy 13, DE-46519 ALPEN-VEEN, Tyskland Wolfram Franke, Vidsynvegen 15, 3917 PORSGRUNN, Norge Hans-Werner Breiner, Fahrlücke 38, DE-67661 KAISERSLAUTERN, Tyskland Thorsten Stoeck, Freiherr-von-Gienanth Str. 3, DE-67705 TRIPPSTADT, Tyskland Günter Doppelbauer, Bernsweg 2, DE-47445 MOERS, Tyskland		
(72)	Oppfinner			
(74)	Fullmektig			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av en gruppe av halofile og/eller halotolerante bakterier i en biokjemisk prosess for denitrifikasjon av en hypersalt avfallsblanding.		
(56)	Anførte publikasjoner	WO 2010076794 A1 Foglar L. et.al.: Nitrate Removal with Bacterial Cells Attached to Quartz Sand and Zeolite from Salty Wastewater, World J Microbiol Biotechnol (2007) 23:1595-1603. Osaka T. et.al: Effects of Carbon Source on Denitrification Efficiency and Microbial Community Structure in a Saline Wastewater Treatment Process, Water Research 42 (2008) 3709-3718. Cyplik P. et.al.: Effect of Macro/micro Nutrients and Carbon Source Over the Denitrification Rate of Haloferax Denitrificans Archaeon, Enzyme and Microbial Technology 40 (2007), 212-220.		
(57)	Sammendrag			

Den foreliggende oppfinnelsen angår anvendelse av en gruppe av halofile og/eller halotolerante bakterier i en biokjemisk prosess for denitrifikasjon av salt industrielt avfallsvann.

Anvendelse av en gruppe av halofile og/eller halotolerante bakterier i en biokjemisk prosess for denitrifikasjon av en hypersalt avfallsvannblanding

Introduksjon

5 Prosesser for behandling av industrielt avfallsvann fokuserer på forskjellige mål, men generelt er målet reduksjon av organiske og uorganiske forurensinger. Strømmer av industrielt avfallsvann inneholder ofte få forbindelser men i høye konsentrasjoner og som en konsekvens må behandlingsprosessen være veldig spesialisert.

10 Omfanget av behandlingen er avhengig av lovmessige krav. Kommunen definerer vanligvis regler for utslipp til kloakken, og statlige myndigheter, som miljøvernsetater, definerer vanligvis regler for utslipp til elver, innsjøer og hav.

Utslippsstrømmer med høye nitratkonsentrasjoner kan også inneholde store mengder med andre forbindelser slik som klorid (fra fiskehermetikkindustrien, våt kalk-gips avsvovlingsprosess, og gjenvinningsvæske fra ionebyttekolonner) og sulfat (fra garveriavfall).

Spesielt kan ionebytteprosesser lede til strømmer med avfallsvann som er sterkt forurensset med uorganiske stoffer. For eksempel leder en ionebytteprosess for å konvertere et alkalisk metallklorid og kalsiumnitrat til et alkalisk metallnitrat og kalsiumklorid til et meget salt avfallsvann med høy forurensing av nitrat. I nevnte ionebytteprosess kan det alkaliske metallet være kalium eller natrium.

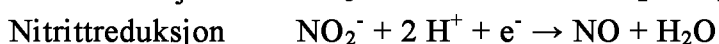
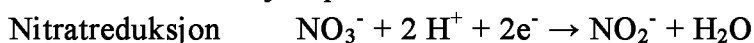
20 Prosesser for behandling av industrielt avfallsvann kan være fysiske (filtrering, separasjon, ionebytting), kjemiske (flokkulering, nøytralisering, oksidering) eller biokjemiske. Den mest egnede behandlingsprosessen må velges avhengig av toksisiteten til forbindelsene og bærekraft. I mange tilfeller er en biokjemisk prosess kostnadseffektiv.

Biokjemisk industriell behandling av avfallsvann krever:

- Valg av arter som er i stand til å bryte ned den tilsiktede forurensningen;
- Etablering av de optimale betingelser for metabolismen til de valgte artene;
- 30 • Tilførsel av substanser for å komplettere tilførselen av næring og karbon.

Denitrifikasjon er en biokjemisk prosess som er vanlig i naturen så vel som i systemer for behandling av avfallsvann. Prosessen under konvensjonelle avfallsvannbetingelser er for eksempel beskrevet i retningslinjene ATV-DVWK-A 131 (Bemessung von einstufigen Belebungsanlagen. Edition 05/2000. DWA. Germany. ISBN: 978-3-933707-41-3). I nærvær av nitrat og i fravær av oksygen, er anaerobe bakterier i stand til å bruke nitrat for oksideringen av organiske forbindelser for å støtte deres metabolisme. Følgelig blir nitrat og biotilgjengelige organiske forbindelser fortært i løpet av prosessen med opprettholdelse og produksjon av biomasse og frigjøringen av CO₂, N₂ og vann.

40 Denitrifikasjonsprosessen består av fire trinn:



Nitrogenoksidreduksjon $2 \text{NO} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$

Dinitrogenoksidreduksjon $\text{N}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$

Nitritt, ett av mellomproduktene i prosessen, er giftig for mange organismer. Spesielt i tilfellet av akkumulering og etter økt konsentrasjon kan nitritt bli en kritisk gift for selve de nitratreduserende bakteriene. Under standardbetingelser blir nitrittreduksjonen utført raskere enn nitratreduksjonen, og under balanserte betingelser blir en akkumulering av nitritt derfor unngått. Høye konsentrasjoner av nitrat og en lett nedbrytbar karbonkilde medfører for det første en høy frigjøring av nitritt og, følgelig, en nitritt giftighetsindusert stopp i nitratreduksjonen.

Det er kjent at høye saltkonsentrasjoner i avfallsvann har negative effekter på biologisk denitrifikasjon. Imidlertid har flere halo-tolerante denitrifiserende bakterier blitt isolert og identifisert i hypersalte vann. Desto høyere saltinnhold i et habitat, desto lavere antall av spesialiserte bakterietyper som kan overleve eller trives i dette habitatet. I ekstreme omgivelser, slik som i krystallisatordammer til soldrevne saltverk, kan relativt få tilpassede typer av halofile bakterier overleve.

Vanntemperaturen har også en innvirkning på denitrifikasjonshastigheten. Opp til en viss grense øker mikrobiell aktivitet med temperaturen. Ettersom nitrat og nitritt konkurrerer om oksygen som elektronakseptor, bør kontakt av mediet med betingelser rike på atmosfærisk oksygen bli unngått for å oppnå optimale denitrifikasjonshastigheter. Følgelig kjører en biologisk denitrifikasjonsprosess fortrinnsvis ved en høy temperatur som imidlertid er begrenset av den maksimale overlevelsestemperaturen til de respektive bakterietypene som er involvert. Med få unntak er denitrifikasjon en anaerob prosess.

Oppfinnerne har nå identifisert en biokjemisk prosess for denitrifikasjon av en hypersalt avfallsvannblanding omfattende en konsentrasjon på minst 0.1 % (v/vol.) nitrat og en konsentrasjon på minst 5 % (v/vol.) klorid, ved bruk av halofile og/eller halotolerante bakterier.

I denne søknaden er en hypersalt blanding slik som et avfallsvann, en saltløsning og lignende, definert til å omfatte minst en konsentrasjon på 5 % (v/vol.) klorid (Cl^-) ioner.

I denne søknaden er en blanding omfattende en høy konsentrasjon av nitrat definert til å omfatte minst en konsentrasjon på 0.1 % (v/vol.) nitrat (NO_3^-).

I denne søknaden, når det refereres til "nitrat" eller "klorid", blir det referert til den totale mengden med "nitrat"- eller "klorid"-forbindelser som er til stede, enten i form av ioner eller som ikke-dissosierte forbindelser.

I denne søknaden, og i henhold til Le Borgne et al. (Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea, Journal of Molekylær Microbiology and Biotechnology 2008;15:74–922008), er halofile bakterier klassifisert som litt halofile når de er aktive i en NaCl-konsentrasjon på 2 til 5 % (v/vol.) (sjøvann har en gjennomsnittskonsentrasjon på 3.5 % (v/vol.)), moderat halofile når de er aktive i en NaCl-konsentrasjon på 5 til 20 % (v/vol.) og ekstremt halofile når de er aktive i en NaCl-konsentrasjon på 20 til 30 % (v/vol.).

Hoveddelen av bakterier ifølge vår oppfinnelse kan klassifiseres som moderat til ekstremt halofile bakterier. Imidlertid var mikroorganismekolonien som ble brukt i våre eksperimenter en blanding av halofile, halotolerante og ikke-spesialiserte arter. Halofile arter krever NaCl for vekst, i motsetning til halotolerante arter, som ikke krever NaCl men kan vokse under salte betingelser.

Kjent teknikk

Litteraturen indikerer spesifisiteten til målet for biobehandling og det resulterende valget av mikroorganismene, og at hvert mål for biobehandling krever en individuell justering av temperatur, pH-verdi, mikronæringsstoffer og den valgte arten.

Okeke et al. (Reduction of perchlorate and nitrate by saline tolerant bacteria. Environmental Pollution 118 (2002) 357–363) beskriver en prosess for biobehandling av avfallsvann, optimalisert for å fjerne perklorationer fra et avfallsvann som inneholder 100 mg/l ClO_4^- (0,01 % v/vol.) og 11,7 mg/l NO_3^- (0,001 % v/vol.). Nitratfjerningseffektiviteten var 16,4 % for en felleskultur med en salttolerant *Citrobacter* bakterie og en ikke-salttolerant, som “perclace” deklart bakterie, og 15,6 % for en *Citrobacter* monokultur innen 7 dager. Acetat og gjærekstrakt ble brukt som karbonkilde. Anbefalt temperature for å fjerne ClO_4^- var 30 °C for 0 - 5 % NaCl.

Nair et al. (Biologisk denitrification of high strength nitrate waste using pre-adapted denitrifying slam. Chemosphere 67 (2007) 1612–1617) viste at nitratfjerning fra et avfallsvann fra et produksjonsanlegg for gjødsel kan utføres ved å bruke en teknologi med aktivert slam.

Tester viste at nitrat-inneholdende slam med startkonsentrasjoner på opp til 4 % NO_3^- kan bli fullstendig behandlet i løpet av en tidsperiode på 6 timer. Imidlertid var ingen klorider til stede. Den anbefalte temperaturen for å fjerne NO_3^- var 37 °C.

Le Borgne et al. (Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea, Journal of Molekylær Microbiology and Biotechnology 2008; 15:74–922008) presenterer en oversikt over bionedbrytningen av organiske forurensninger ved hjelp av halofile bakterier. Denitrifikasjon blir ikke beskrevet.

Tsang et al. (A novel sludge minimized biologisk nitrogen removal process for saline behandling. Water Science & Technology, Vol .59, Issue 10, 2009; pp. 1893-1899) beskriver en flertrinnsprosess for å behandle salt kloakk, omfattende mengder av sulfat (0,05 % v/vol.) med fokus på fjerningen av organiske forurensninger. Kloridsalter blir ikke nevnt.

Rezaee et al. (Denitrification of high salinity, high nitrate waste water using clinoptilolite in a packed bed bioreaktor. Journal of Environmental Research and Management Vol. 3(2). pp. 031-036, March, 2012) beskrev behandlingen av avfallsvann med høy salthet (opp til 4 % v/vol.) og høy mengde nitrat ved bruk av en “packed bed”-bioreaktor fylt med clinoptilolite som en bærer og viste at en 500

mg/l (0,05 % v/vol.) nitratinstrømming kan bli behandlet på en vellykket måte. Temperaturen var 25 °C.

Cyplik et al (Biologisk Denitrification of High Nitrate Processing Waste water from Explosives Produksjon Plant. Water Air Soil Pollution (2012)

5 223:1791–1800) viser biologisk denitrifikasjon av prosesseringsavfallsvann, med et høyt nitratinhold, fra et produksjonsanlegg for eksplosiver og viste at nitrattjerning kan etableres for et avfallsvann med et høyt nitratinhold. 3 g/L med N (fra NO₃⁻) ble fjernet innen 16 dager i nærvær av nitroglyserin og et lavt nivå (21 mg/l) av klorider. Et temperaturnivå blir ikke oppgitt, så standard laboratoriebetingelser (20
10 °C) kan antas.

US 4,356,092 (1982) viser en biologisk prosess for behandling av avfallsvann, men har ikke fokus på fjerning av nitrat. Den omfatter trinnene å dyrke en ny stamme, *Alcaligaenes faecalis* HRL-1, og å tilsette de dyrkede cellene til avfallsvannet som skal behandles. Saltkonsentrasjonen blir ikke diskutert.

15 EP 2018417 B1 (2007) viser også en ny stamme CNCM 1-3448 av *Alcaligenes faecalis*, i stand til å konvertere Kjeldahl-nitrogen, ammoniakk-nitrogen og/eller nitrogenoksider til nitrogen på gassform, og konverteringen av det karboninnholdende materialet til karbondioksid, hvor begge konverteringen finner sted under aerobe betingelser. Saltkonsentrasjonen blir ikke diskutert.

20 CN 101054232 A viser en meget effektiv biologisk prosess for behandling av avfallsvann for hypersalt avfallsvann, hvor det genereres et aerobt granulært slam i en sekvenserende batch-reaktor uten bruk av halofile bakterier, slik at hypersalt avfallsvann kan bli prosessert effektivt og systemets toleranse for saltkonsentrasjonssjokk kan bli forbedret.

25 Den kjente teknikken inkluderer ikke en biokjemisk prosess som fokuserer på rask fjerning av nitrat i nærvær av en høy konsentrasjon av klorider for en uorganisk behandling av avfallsvann.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

30 Oppfinnelsen angår anvendelse av en gruppe av halofile og/eller halotolerante bakterier i en biokjemisk prosess for denitrifikasjon av en hypersalt avfallsvannblanding omfattende en konsentrasjon på minst 0.1 % (v/vol.) nitrat og en konsentrasjon på minst 5 % (v/vol.) klorid, hvor gruppen av halofile og/eller halotolerante bakterier omfatter bakterier fra minst de følgende arter: *Pseudomonas*,
35 *Bacillus* og *Halomonas*, for denitrifikasjon av en hypersalt avfallsblanding.

Det er beskrevet at en hypersalt avfallsvannblanding omfattende en høy konsentrasjon av nitrat blir utsatt for en biokjemisk behandling, hvor nevnte høye konsentrasjon av nitrat, i nærvær av en høy konsentrasjon av klorid, blir redusert til
40 en lavere konsentrasjon, fortrinnsvis på kort tid, ved å eksponere nevnte hypersalte avfallsvannblanding ovenfor halofile og/eller halotolerante bakterier.

Det er vist en biokjemisk prosess for denitrifikasjon av en hypersalt avfallsvannblanding, omfattende en konsentrasjon på minst 0.1 % (v/vol.) nitrat og en konsentrasjon på minst 5 % (v/vol.) klorid, ved bruk av halofile og/eller halotolerant bakterier.

- 5 Det blir vist en biokjemisk prosess for denitrifikasjon av en hypersalt avfallsvannblanding, som kommer fra en ionebytteprosess, omfattende en konsentrasjon på minst 0.1 % (v/vol.) nitrat og en konsentrasjon på minst 5 % klorid (v/vol.), ved å bruke halofile og halotolerante bakterier.

- 10 Ifølge en utførelsesform er konsentrasjonen av nitrat minst 0.20 % (v/vol.), mer fortrinnsvis 0.25 % (v/vol.).

- 15 Behandlingen blir utført av en gruppe bakterier og ikke av en enkelt slekt med bakterier. Med tanke på den høye saltkonsentrasjonen er det rimelig å anta at alle medlemmer av den aktive gruppen er i det minste halotolerant, fortrinnsvis halotolerante og halofile, og valgfritt inneholder den aktive gruppen også ikke-
20 spesialiserte medlemmer. En gruppe ble selektert over tid fra en slamblanding av vanlig denitrifiserende aktivert slam fra et kommunalt anlegg for behandling av avfallsvann og salt sedimentslam fra krystallisasjonsdammen til et solbasert saltverk i Ses Salines, Spania. Omtrent 85 til 95 vekt%, mer fortrinnsvis omtrent 90 vekt% av slammet består av aktivert slam fra denitrifiseringstrinnet til et kommunalt
25 anlegg for behandling av avfallsvann. Omtrent 5 til 15 vekt%, mer fortrinnsvis omtrent 10 vekt% av slammet består av sediment fra krystallisasjonsdammen til et solbasert saltverk, inkludert naturlige halofile denitrifiserende bakterier. Dyrkings- og seleksjonsprosessen blir utført ved å øke kalsiumklorid- og kaliumnitratkonsentrasjonen forsiktig over tid, opp til det ønskede nivået ved en
30 konstant temperatur på 35 °C til 40 °C, og fortrinnsvis 37 °C.

- Selv om en stor andel (69 vekt%) av bakteriene fra det solbaserte saltverket forblir uidentifiserte med korte taksonomiske markørgener (V4-V6 av SSU rDNA), ved bruk av Illumina MySeq parret-ende sekvensering, kunne mange bakterier med sikkerhet bli tilordnet de følgende slekter: *Pseudomonas* (mengde: 19 vekt%),
30 *Bacillus* (mengde: 4 vekt%) og *Halomonas* (mengde: 3 vekt%), og valgfritt med mindre (1 vekt% eller mindre) mengde *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Flexibacter*, *Propionibacterium*, Enterobacteriaceae, *Flavobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobium*, *Lysobacter*, *Sinorhizobium*, *Azospirillum*, *Thiobacillus*, *Sphingobacter*, *Paracoccus*, *Aeromonas*, *Ochrobacterium*, *Nitrosomonas*,
35 *Herbaspirillum*, *Janthinobacterium*, *Lactobacillus*, *Nitrobacter*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Cytophaga*, *Thiomicrospira*, *Beggiatoa*, *Cellvibrio*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Kingella*, *Aquaspirillum*, *Norcadia* og *Azoarcus* ble detektert. Med tanke på de høye saltkonsentrasjonene under hvilke denitrifikasjon forekom, er det rimelig å anta at alle aktive denitrifiserende bakterier enten var halotolerante eller
40 halofile.

Prosessen foregår ved 35°C til 40°C, fortrinnsvis ved omtrent 37°C når optimal ytelse ble målt.

Fortrinnsvis bruker prosessen kaliumacetat som en karbonkilde, men metanol eller etanol er også mulige valg, selv om det er mindre foretrukket i et industrielt oppsett på grunn av de høyere kostnadene.

5 Næringsstoffer blir ikke tilsatt systemet ettersom den spesifikke seleksjonsprosessen av denitrifiserere hovedsakelig krever nitrat. Sporstoffer, så vel som fosfater, var tilstrekkelig til stede i det inngående slammet. I storskala-bruk med konstant behandling av avfallsvannet og inngående slam bare i begynnelsen for å etablere prosessen, kan ytterligere tilførsel av sporstoffer og fosfat være

10 Med anvendelsen ifølge oppfinnelsen ble det vist at en startkonsentrasjon av nitrat på 1.5 til 3.0 g/l kunne bli redusert til en konsentrasjon på omtrent 0.001 g/l innen 24 til 48 timer, spesielt når en slamblending består av omtrent 85 til 95 vekt%, mer fortrinnsvis omtrent 90 vekt% av aktivert slam fra denitrifiseringstrinnet til et kommunalt anlegg for avfallsvannbehandling og av

15 omtrent 5 til 15 vekt%, mer fortrinnsvis omtrent 10 vekt% av salt slam fra krystallasjonsdammen til et solbasert saltverk, ble brukt.

Anvendelsen ifølge oppfinnelsen blir utført i en bioreaktor på vanlig måte, kjent for fagpersonen. Bioreaktoren kan enten være en reaktor med suspendert slam eller en reaktor av "floating bed"-typen. I denne prosessen blir karbonkilden tilsatt

20 som hovednæring for å oppnå betingelsene for en biokjemisk nitratreduksjon. Driften kan være bolkevis eller kontinuerlig.

Avfallsvannet som må behandles kan bli produsert i et ionebytter-anlegg. I produksjonsprosessen reagerer kaliumklorid eller natriumklorid med kalsiumnitrat og leverer kaliumnitrat eller natriumnitrat som produkter og en kalsiumklorid-

25 løsning som avfallsmateriale. Avfallsvannsstrømmen behøver en distinkt behandling, da forurensningen av nitrat er for høy for ubehandlet utslipp.

De følgende tegningene er referert til i denne beskrivelsen.

30 Figur 1: Denitrifikasjon under standard betingelser (ingen tilsetning av karbonkilde, romtemperatur) i 2 liters mikrokosmosoppsett som beskrevet (Eksperiment A).

Figur 2: Denitrifikasjon i 2 liters mikrokosmosoppsett med tilsetning av MeOH (10 ml/l) som karbonkilde ved romtemperatur (Eksperiment B).

35 Figur 3: Denitrifikasjon i 2 liters mikrokosmosoppsett ved en nitrat-konsentrasjon på 260 mg/l (Eksperiment C).

Figur 4: Denitrifikasjon i 2 liters mikrokosmosoppsett ved en nitrat-konsentrasjon på 2,200 mg/l (Eksperiment D).

Figur 5: Vurdering av effekten av temperatur på denitrifikasjonshastighet i et eksperimentelt 2 liters mikrokosmosoppsett (Eksperiment E).

40

Figur 6: Vurdering av effekten av KAc som en karbonkilde (Eksperiment F).

Figur 7: Denitrifikasjon under betingelse med høyt saltinnhold (Eksperiment G) uten betydelig halofile og/eller halotolerante bakterier (ikke ifølge oppfinnelsen).

Figur 8: Total bakteriell mengde (x) og relativ mengde av denitrifiserende bakterier ($\square$) i Eksperiment G, målt fotometrisk (venstre) og ved å bruke DAPI-flekke (høyre).

Figur 9: Denitrifikasjonshastigheter for forskjellige sediment substitusjonsforhold ifølge oppfinnelsen (Eksperiment H).

Figur 10: Total bakteriell mengde (x) og mengde av denitrifiserende bakterier (Δ) i Eksperiment H, målt fotometrisk (venstre) og ved å bruke DAPI-flekke (høyre).

Eksperimentelt

Generelt

En produksjonsprosess av kaliumnitrat blir utført ved ionebytting fra kaliumklorid og kalsiumnitrat, prosessen leverer en avfallsvannstrøm med høy salthet på grunn av kalsiumklorid og høy forurensning av nitrat. En biologisk behandling av denne avfallsvannstrømmen med en maksimal konvertering av nitraten til gassformig nitrogen skulle bestemmes.

Målet med dette eksperimentet er vurderingen og etableringen av et mikrobisk miljø i stand til komplett denitrifikasjon ved høye saltkonsentrasjoner. Avfallsvann-spesifikasjoner inkluderer 2.5 g nitrat/l avfallsvann (0.25 % v/vol.) , 91 g CaCl_2 /l (5.7 % v/vol. med Cl-ioner) avfallsvann og temperaturer som overstiger 50°C og mangel på karbonkilde i det innkommende industrielle avfallsvannet. Kaliumacetat som en ytterligere karbonkilde ble tilsatt ved 30 ml/l.

Den foreslåtte strategien for å utføre eksperimentet var etableringen av et lukket kontrollert laboratoriesystem (2 liters mikrokosmos, i det følgende 2-L-mikrokosmos) som hermer betingelsene i en bioreaktor med aktivert slam. Det eksperimentelle oppsettet til det 2-L mikrokosmos inkluderte mulighetene for å kontrollere oksygenkonsentrasjoner (opprettholde oksygenfrihet), pH-verdier (et intervall mellom 6.5 og 8.5 er nødvendig for effektiv denitrifikasjon) og temperatur. Oppsettet ble derfor designet med permanente online pH-, oksygen- og temperatursensorer, en røreenhet, tilgang til prøvetaking uten oksygenforurensning, og tilgang for argonspyling i tilfelle utilsiktet oksygenering.

Aktivert slam fra anlegg for behandlingen av avfallsvann (WWTP) i Kaiserslautern (Tyskland) ble brukt som en basis for et mikrobisk miljø (2.5 L volum i hvert eksperiment). For sedimentet som inneholdt de naturlige halofile denitrifiserende bakteriene ble det brukt sediment fra krystallisasjonsdammen til et solbasert saltverk fra Ses Salines, Spania.

I løpet av eksperimentene ble det tatt prøver ved forskjellige tidsintervaller for nitrat- og nitritmålinger (ionekromatografi og fotometri), total forekomst av bakterier (ved å bruke DAPI-flekker), relativ mengde nitrittreduktase (nir) gener, som indikerer mengden av denitrifiserende bakterier, og molekylær mikrobisk gruppeprofilering (Illumina ribosomal RNA sekvensering og statistiske analyser av gruppestruktur). I løpet av eksperimentene måtte pH justeres med KOH på grunn av lett surgjøring av det mikrobiske miljøet.

Nitratkonsentrasjoner ble målt fotometrisk under lave saltmengder, og ved å bruke ionekromatografi under høye saltmengder.

Eksperiment A : Standard denitrifikasjon uten prøvemanipulering i et kontrollert 2-L mikrokosmosoppsett.

Dette eksperimentet fungerte som en kontroll for funksjonen av det 2-L mikrokosmossystemet under standard betingelser ved omgivelses (rom) temperatur.

Denitrifikasjon ble utført under standard betingelser (ingen tilsetning av karbonkilde, romtemperatur) i det 2 liters mikrokosmosoppsettet. 20 mg nitrat/l ble tilsatt, tilsvarende nitratkonsentrasjoner som vanligvis forekommer i det innkommende avfallsvannet i WWTP'et.

Resultatene er vist i Figur 1. I det etablerte eksperimentelle oppsettet ble 20 mg nitrat/l avfallsvann denitrifisert innen 85 minutter. Denitrifikasjonshastighet var 14.1 mg/l/h.

Konklusjon: Det eksperimentelle oppsettet passer ideelt til å utføre eksperimentene fordi denitrifikasjon i det 2-L mikrokosmoset er like effektivt som under vanlige betingelser i et velfungerende WWTP.

Eksperiment B: Tilsetning av metanol (MeOH, 10 ml/l) som en ytterligere karbonkilde for å vurdere effekten of this karbonkilde on denitrifikasjonshastighet.

De eksperimentelle betingelsene er som i Eksperiment A med litt økte nitratkonsentrasjoner (33 mg/l). Resultatene er vist i Figur 2. Fullstendig denitrifikasjon av 33 mg nitrat/l er ferdig etter 50 min. Hellingen til trendlinjen er brattere sammenlignet med eksperiment under standard betingelser (uten tilsetning av ekstra karbonkilde). Denitrifikasjonshastigheten er 39.8 mg/l/h.

Konklusjon: Ytterligere karbonkilde (metanol) forbedrer denitrifikasjonen tydelig. Variasjon av karbonkildekonsentrasjon påvirket ikke denitrifikasjonshastigheten positivt i ytterligere eksperimenter.

Eksperiment C: Økning av nitratkonsentrasjon til 260 mg/l (overgår naturlige betingelser med ca. 10 ganger)

Resultatene er vist i Figur 3. Fullstendig denitrifikasjon er fortsatt mulig ved sterkt økt nitratkonsentrasjon. Imidlertid er tiden for komplett denitrifikasjon av 260 mg nitrat/l opp til 34 timer. Denitrifikasjonshastigheten er 7.4 mg/l/h.

Konklusjon: Mikrobiske prosesser ved slike økte nitratkonsentrasjoner er tydelig lavere sammenlignet med Eksperiment A med nitratkonsentrasjoner tilsvarende et mikrobisk miljø. Det virker sannsynlig at mengden av naturlig forekommende bakterier i det eksperimentelle oppsettet er for lavt for en effektiv denitrifikasjon.

5

Eksperiment D: Økning av nitratkonsentrasjon til 2,200 mg/l

Resultatene er vist i Figur 4. Fullstendig denitrifikasjon er fortsatt mulig ved en sterkt forhøyet nitratkonsentrasjon. Imidlertid er tiden for den fullstendige denitrifikasjonen av 2,200 mg nitrat/l opp til 200 timer. Denitrifikasjonshastigheten er 9.3 mg/l/h.

10

Konklusjon: Denitrifikasjonshastigheten er i samme størrelsesorden som i Eksperiment C med en omtrent 10 ganger lavere nitratkonsentrasjon. Dette er for lavt for en standard anvendelse i en WWTP-prosess for fjerning av slike høye nitratlaster. Fra dette eksperimentet virker det også sannsynlig at mengden av naturlig forekommende bakterier i det eksperimentelle oppsettet er for lavt for en effektiv denitrifikasjon. Ytterligere eksperimenter ble derfor utført for å øke mengden bakterier og aktivitet.

15

Eksperiment E: Vurdering av effekten til temperatur på denitrifikasjonshastighet i et eksperimentelt 2-L mikrokosmosoppsett.

20

Flere eksperimenter ble utført med en begynnende nitratkonsentrasjon på omtrent 1000 mg/l for å vurdere effekten til temperatur på denitrifikasjonshastighet i et eksperimentelt 2-L mikrokosmosoppsett. Resultatene er vist i Figur 5. De høyeste denitrifikasjonshastighetene ble oppnådd ved 37 °C. Denitrifikasjonshastighet: 20.4 mg/l/h. Denitrifikasjon er hemmet ved høyere temperaturer.

25

Konklusjon: En temperatur på 37 °C resulterer i forhøyede bakterietettheter og aktiviteter i et eksperimentelt oppsett. Som en konsekvens er denitrifikasjonshastighetene i samme størrelsesorden som under "standard betingelser" (se Eksperimentene A og B) selv ved ekstremt forhøyede nitratkonsentrasjoner. Denne hastigheten er imidlertid fortsatt for lav for en effektiv fjerning av nitrat ved slike konsentrasjoner i industrielle prosesser. Ytterligere eksperimenter ble utført.

30

Eksperiment F: Vurdering av effekten til karbonkilden.

35

MeOH er ikke passende som karbonkilde i industrielle anvendelser (kostnader og sikkerhetsspørsmål). Derfor ble Eksperiment F utført for å evaluere kaliumacetat (KAc) som en alternativ karbonkilde. I alle eksperimentene ble KAc tilsatt ved et definert mengdeforhold: C:N = 1.5:1. Resultatene er vist i Figur 6.

Denitrifikasjonshastigheten er 102 mg/l/h, med KAc som karbonkilde, temperatur ved 37 °C og ekstrem nitratkonsentrasjon.

40

Konklusjon: Dette er den høyeste denitrifikasjonshastigheten oppnådd så lang og overstiger betydelig standardverdier for denitrifikasjon i WWTP rapportert i

vitenskapelig litteratur. Vi konkluderer derfor at KAc som karbonkilde og en optimal temperatur på 37 °C er veldig effektivt for å forbedre mikrobisk denitrifikasjon.

5 Eksperiment G: Denitrifikasjon under betingelser med høyt saltinnhold uten betydelig halofile og/eller halotolerant bakterier (ikke ifølge oppfinnelsen).

Denitrifikasjon under betingelser med høyt saltinnhold ble gjort med en CaCl₂ konsentrasjon på 91 g/l (5.7 % v/vol. med Cl-ioner), en nitratkonsentrasjon på 2.5 g/l (0.25 % v/vol.), KAc som en karbonkilde og ved en temperatur på 37 °C.

10 Resultatene er vist i Figur 7. Denitrifikasjonshastigheten er 43,7 mg/l/h. En betydelig økning i bakteriemengde og denitrifiserermengde i avfallsvannet ble observert i løpet av eksperimentet. Dette ble bestemt ved å bruke kvantitativ sanntids PCR av *nir*-genet (nitrittreduktase, se Saggat et al. Sci. Total Environ), ved å kode en del av denitrifikasjonsprosessen, og total bakteriell last bestemt ved

15 DAPI-mengde, beregnet fra 5 replikater per prøve. Resultatene er vist i Figur 8. Figuren viser (relativ) mengde data i det eksperimentelle oppsettet for Eksperiment G.

Konklusjon: Biomassen til spesifikt denitrifiserende bakterier øker 2,5 ganger i løpet av eksperimentet.

20

Eksperiment H: Substitusjon av aktivert slam med sediment fra soldrevet saltverk inkludert naturlige halofile denitrifiserere.

Aktivert slam fra behandlingsanlegget for avfallsvann (WWTP) i Kaiserslautern (Germany) ble byttet ut med sediment fra krystallisasjonsdammen til et solbasert saltverk fra Ses Salines, Spain, inkludert naturlige halofile denitrifiserere.

25

Resultatene er vist i Figur 9. Utbyttingen av 10 volum% med sediment inneholdende naturlige halofile denitrifiserere økte denitrifikasjonshastigheten sammenlignet med eksperimentet G. Denitrifikasjonshastigheten var 51.8 mg/l/h. Overraskende, det å øke den relative andelen av sediment som inneholder naturlige

30 halofile denitrifiserere (eksperimenter ble gjort for 20 og 30 volum%, se Figur 9) økte ikke denitrifikasjonshastigheten, men hemmet denitrifikasjonen betydelig i stedet.

30

Videre økte biomassen til spesifikt denitrifiserende bakterier 3,5 gang i løpet av eksperimentets gang (se Figur 10). Det kan sees at med prosessen ifølge oppfinnelsen, ved å bruke 10 % salt sediment, blir en startkonsentrasjon av nitrat på

35 2.5 g/l redusert til en konsentrasjon på omtrent 1 g/l etter 24 timer, og til en konsentrasjon på omtrent 0.001 g/l etter 48 timer.

35

* * * * *

40

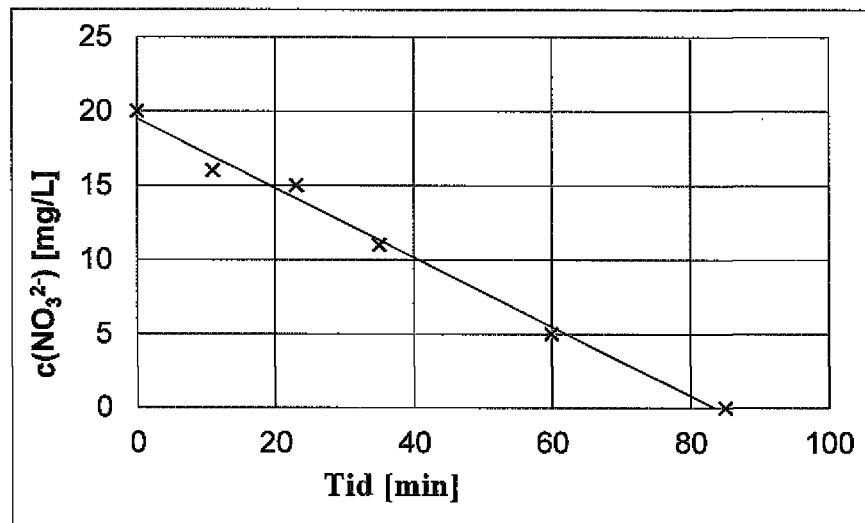
PATENTKRAV

1. Anvendelse av en gruppe av halofile og/eller halotolerante bakterier i en biokjemisk prosess for denitrifikasjon av en hypersalt avfallsvannblanding
5 omfattende en konsentrasjon på minst 0.1 % (v/vol.) nitrat og en konsentrasjon på minst 5 % (v/vol.) klorid, hvor gruppen av halofile og/eller halotolerante bakterier omfatter bakterier fra minst de følgende arter: *Pseudomonas*, *Bacillus* og *Halomonas*, for denitrifikasjon av en hypersalt avfallsblanding.
- 10 2. Anvendelse ifølge krav 1 for behandlingen av hypersalt avfallsvann som stammer fra en ionebytteprosess, omfattende en konsentrasjon på minst 0.1 % (v/vol.) nitrat og en konsentrasjon på minst 5 % (v/vol.) klorid.
- 15 3. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 2, hvor konsentrasjonen av nitrat is minst 0.20 % (v/vol.), mer fortrinnsvis 0.25 % (v/vol.).
- 20 4. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 3 for behandlingen av hypersalt avfallsvann som stammer fra en produksjonsprosess som benytter kaliumklorid og kalsiumnitrat for å produsere en kalsiumklorid- og nitratinneholdende avfallsvannstrøm.
- 25 5. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4 hvori det hypersalte avfallsvannet stammer fra en produksjonsprosess som benytter natriumklorid og kalsiumnitrat for å produsere en kalsiumklorid- og nitratinneholdende avfallsvannstrøm.
- 30 6. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 5, hvor gruppen av minst halotolerante bakterier, fortrinnsvis halotolerante og halofile bakterier, og valgfritt også inneholdende ikke-spesialiserte medlemmer, blir brukt, hvor nevnte gruppe er valgt fra en slamblanding bestående av omtrent 85 til 95 vekt%, mer fortrinnsvis omtrent 90 vekt%, aktivert slam fra denitrifiseringstrinnet til et kommunalt behandlingsanlegg for avfallsvann og omtrent 5 til 15 vekt%, mer fortrinnsvis omtrent 10 vekt%, salt slam fra krystallasjonsdammen til et solbasert saltverk.
- 35 7. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvor de halofile bakteriene er valgt fra artene *Pseudomonas* (mengde: 19 vekt%), *Bacillus* (mengde: 4 vekt%) og *Halomonas* (mengde: 3 vekt%), og valgfritt med mindre (1 vekt% eller mindre) mengde *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Flexibacter*, *Propionibacterium*,
40 *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobium*,

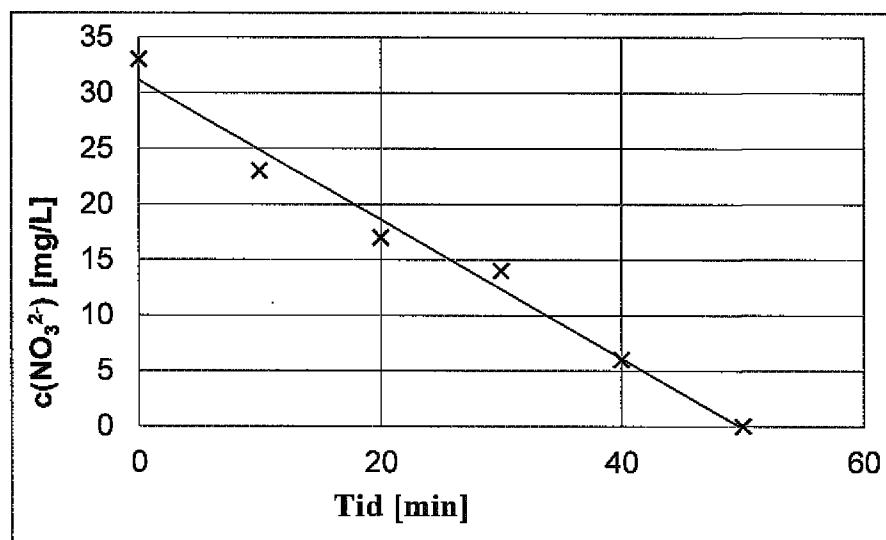
Lysobacter, Sinorhizobium, Azospirillum, Thiobacillus, Sphingobacter, Paracoccus, Aeromonas, Ochrobacterium, Nitrosomonas, Herbaspirillum, Janthinobacterium, Lactobacillus, Nitrobacter, Cellulomonas, Streptomyces, Cytophaga, Thiomicrospira, Beggiatoa, Cellvibrio, Moraxella, Alteromonas, Kingella,
 5 *Aquaspirillum, Norcadia og Azoarcus.*

8. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvor nevnte prosess drives ved 35°C til 40°C, fortrinnsvis ved omtrent 37°C.
- 10 9. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 8, hvor i tillegg kaliumacetat blir brukt som en karbonkilde.
- 15 10. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 9 hvor startkonsentrasjonen til nitrat på 1.5 til 3.0 g/l blir redusert til en konsentrasjon på omtrent 0.001 g/l innen 24 til 48 timer.
11. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 10, hvor den biokjemiske prosessen for denitrifikasjon blir utført i en suspendert slam bioreaktor.
- 20 12. Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvor den biokjemiske prosessen for denitrifikasjon blir utført i en «floating bed»-bioreaktor.

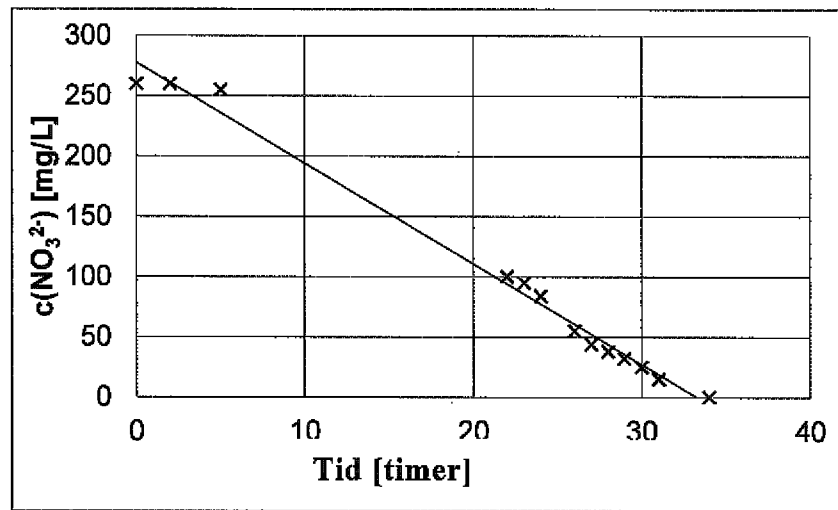
FIGURER



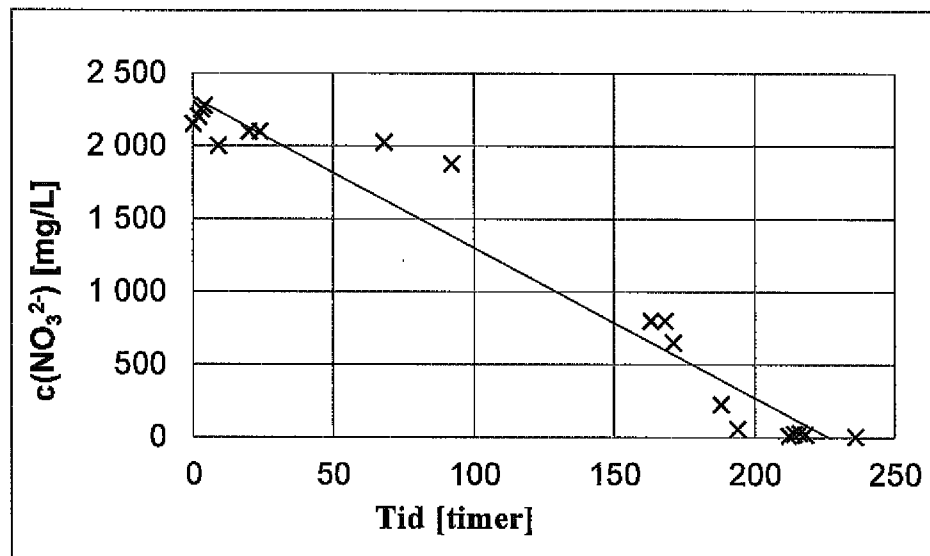
Figur 1



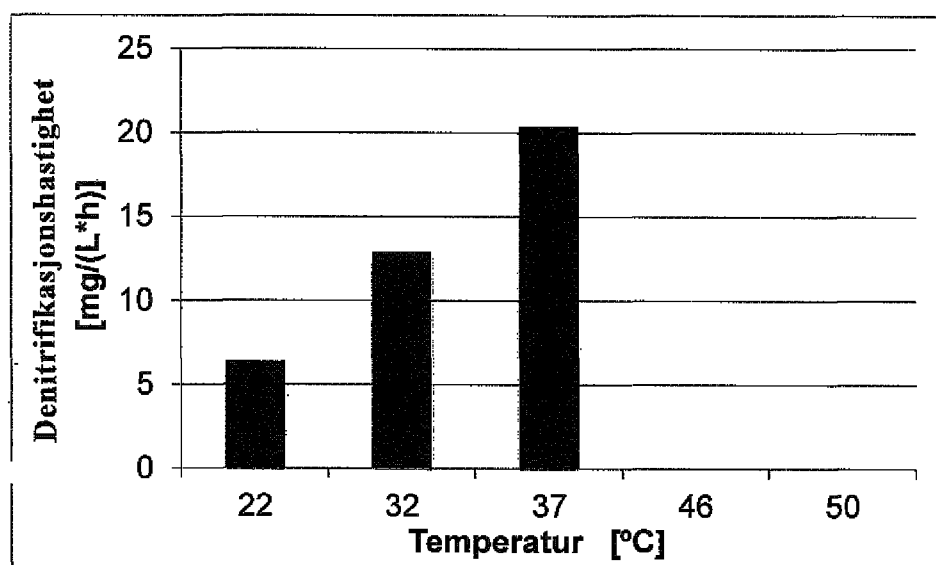
Figur 2



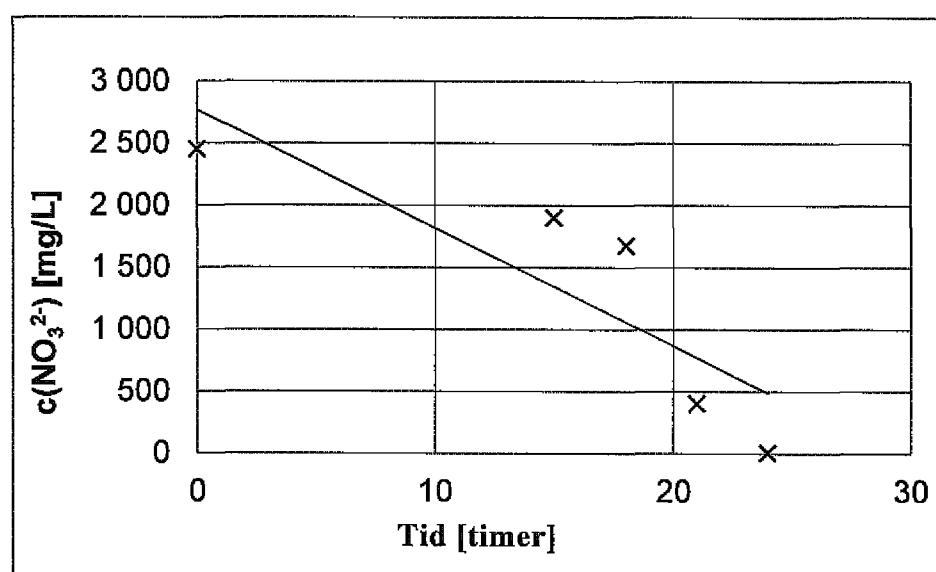
Figur 3



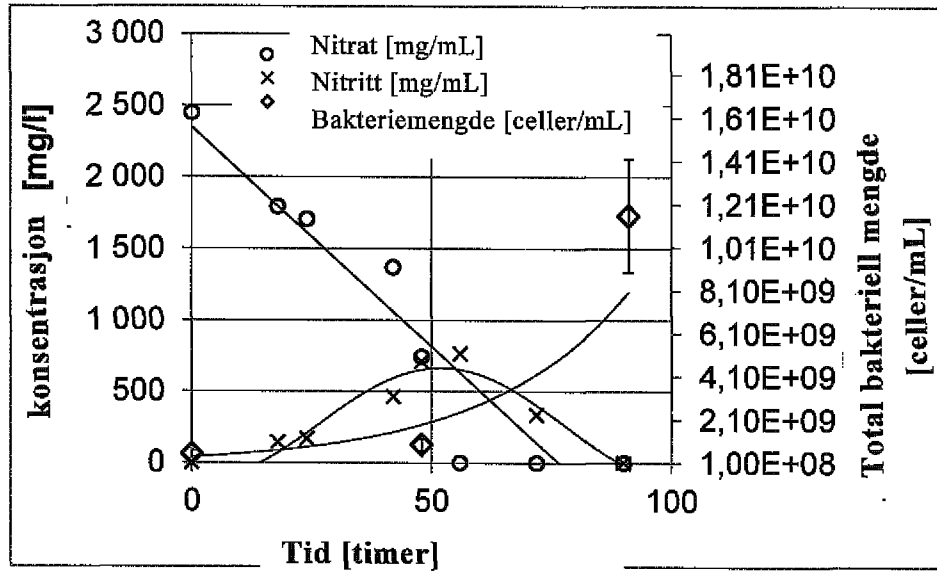
Figur 4



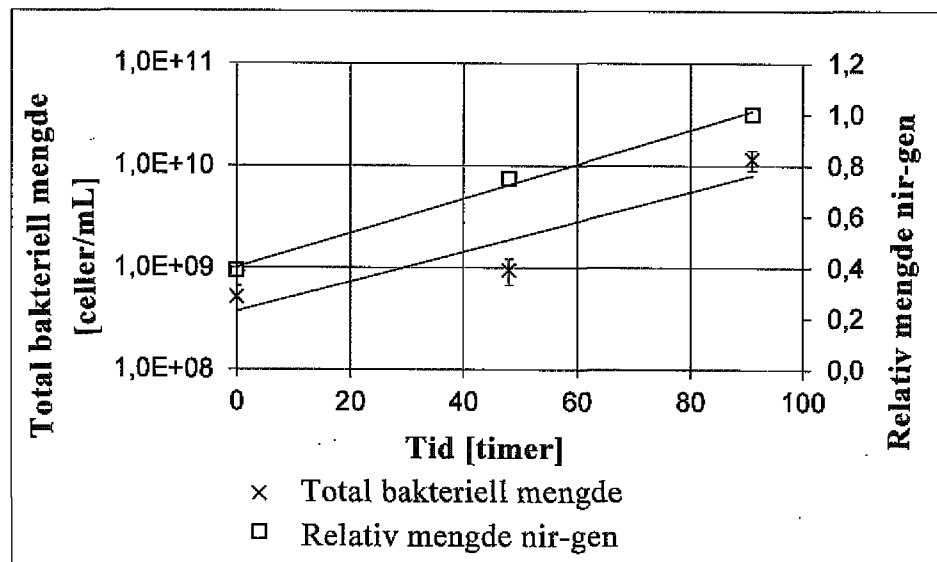
Figur 5



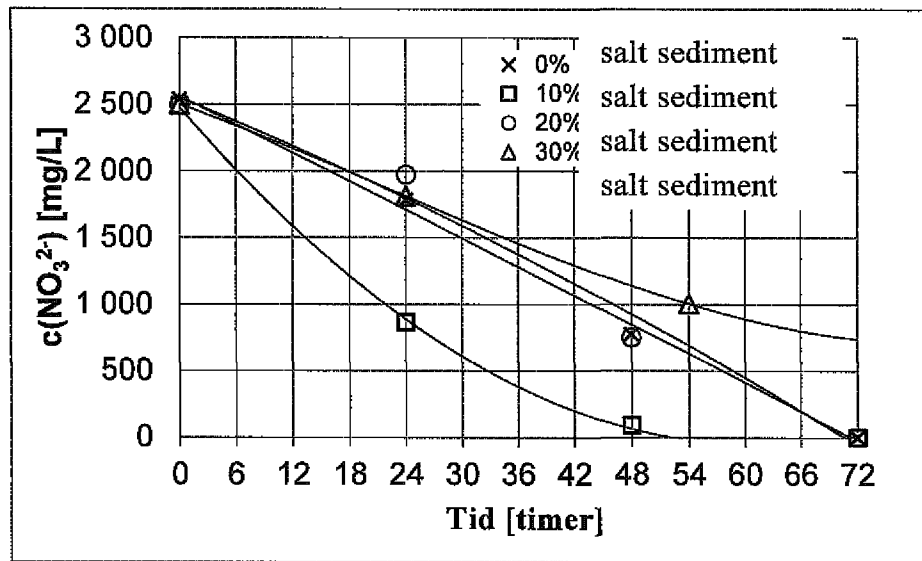
Figur 6



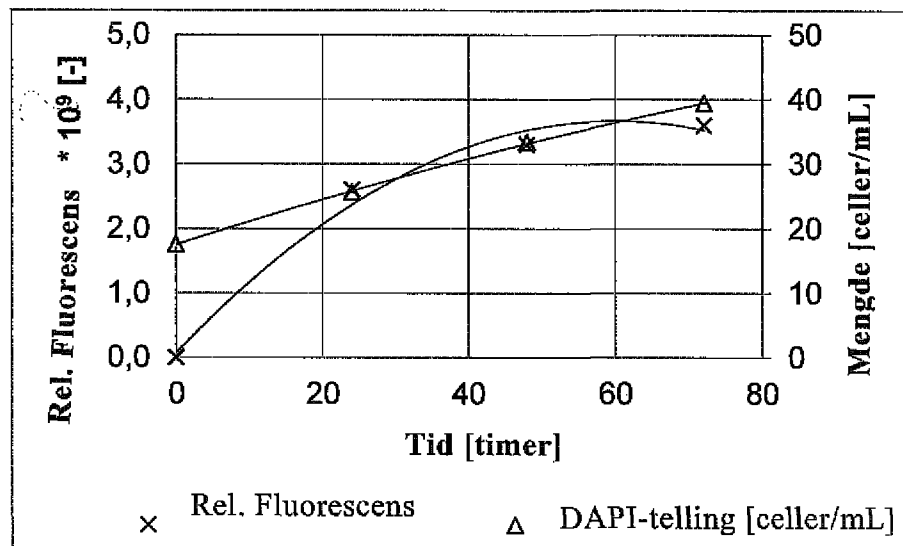
Figur 7



Figur 8



Figur 9



Figur 10