

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie a anatomie rostlin



# Anaerobní oxidace amoniaku

Bakalářská práce 2008

Vypracoval: Jiří Pašíkovský

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Šebestian, CSc.

**Bakalářská práce:**

Pašíkovský J., 2008: Anaerobní oxidace amoniaku. [Anaerobic ammonium oxidation., Bachelor Thesis, in Czech]-34p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The goal of this study is to highlight importance of the anaerobic oxidation of ammonium that has substantial advantages over the aerobic oxidation of ammonium in a marine ecosystem, freshwater and man-made ecosystem. It has been shown, that anaerobic oxidation has considerable influence on the global nitrogen cycle. This process is also suitable to be used in removing excess ammonium from wastewater treatment plants.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 30. dubna 2008:

**Poděkování:**

Děkuji svému školiteli RNDr. Jiřímu Šebestianovi, CSc. za odborné vedení a připomínky při vytváření této bakalářské práce. Za jeho velkou trpělivost, pomoc a čas, který mi věnoval. Velký dík patří samozřejmě mé rodině za podporu při studiu. Nemalý dík patří i mým kamarádům spolubydlícím za příjemnou atmosféru při psaní této bakalářské práce.

## Obsah:

1.	Seznam zkratk	5
2.	Úvod	6
3.	Cíl práce	7
4.	Literární rešerše	8
4.1	Objev anammox procesu	8
4.2	Biodiverzita	9
4.3	Molekulární identifikace	12
4.4	Molekulární diverzita	15
4.5	Ekofyziologie	16
4.6	Struktura buňky anammox bakterií	16
4.6.1	Anammoxosom	17
4.7	Biochemie anammox bakterií	18
4.8	Kultivace anammox biomasy	21
4.8.1	SBR	21
4.8.2	CANON proces	21
4.8.3	SHARON proces	22
4.9	Rozdíl mezi aerobní a anaerobní oxidací amoniaku při čištění odpadních vod	23
4.10	Role anammoxu a globální cyklus dusíku	24
4.11	Aplikace anammox procesu	25
5.	Souhrn, závěr a diskuze	26
6.	Literární přehled	28
7.	Příloha	32

## 1. Seznam zkratk:

Anammox	-	<u>A</u> naerobic <u>a</u> mmonium <u>o</u> xidation
SBR	-	<u>S</u> eguencing <u>B</u> atch <u>R</u> eactor
CANON	-	<u>C</u> ompletely <u>A</u> utotrophic <u>N</u> itrogen removal <u>O</u> ver <u>N</u> itrite
SHARON	-	<u>S</u> ingle reactor system for <u>H</u> igh <u>A</u> monia <u>R</u> emoval <u>O</u> ver <u>N</u> itrite process
MOB	-	<u>M</u> etan <u>O</u> xidující <u>B</u> akterie
AOB	-	<u>A</u> erobně <u>O</u> xidující <u>B</u> akterie
FISH	-	<u>F</u> luorescenční <u>H</u> ybridizace <i>in situ</i>
NOB	-	<u>N</u> itrát <u>O</u> xidující <u>B</u> akterie
TEM	-	<u>T</u> ransmisní <u>E</u> lektronová <u>M</u> ikroskopie
PCR	-	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction

## 2. Úvod

Anaerobní oxidace amoniaku (anammox) si poprvé všiml Richards (1965) v mořském ekosystému. Jeho výpočty byly založeny na základě Redfieldova poměru (Richards, F.A., 1965). Avšak první laboratorní experimenty byly provedeny až v 90. letech 20. století. V anammox procesu je oxidován amoniak dusitanem, který zde slouží jako elektronový akceptor. Jako meziproduct tohoto procesu vzniká hydrazin a hydroxylamin. Anammox reakce probíhá za anoxických podmínek (Jetten, M.S.M. et al., 1998).

Bakterie, které jsou zodpovědné za anammox reakci byly zařazeny do skupiny *Planctomycet*. Zatím jsou identifikovány pouze tři druhy, které byly nazvány *Candidatus „Brocadia“*, *Candidatus „Kuenenia“* a *Candidatus „Scalindua“*. (Schmid, M.C. et al., 2005). Tyto bakterie mají velmi malou růstovou rychlost. Použitím oligonukleotidové sondy byly anammox bakterie detekovány v nejrůznějších ekosystémech. Všechny tyto bakterie mají prokaryotní organelu, anammoxosom (Lindsay, M.R. et al., 2001). Membrána anammoxosomu obsahuje unikátní žebříčkové lipidy (Sinninge Damsté, J.S. et al., 2002).

V posledních letech se anammox proces ukazuje jako příznivá a cenově výhodná alternativa oproti konvenčním metodám likvidace dusíkatých sloučenin z odpadních vod (Grommen, R. a Verstrete, W., 2002) a také hraje důležitou roli v globálním cyklu dusíku.

Odhaduje se, že z anaerobní oxidace amoniaku může pocházet až 50% plynného dusíku uvolněného z oceánů (Kuypers, M.M.M. et al., 2003).

Cílem mé rešeršní práce je seznámit čtenáře s tímto procesem, poukázat na výhody anaerobní oxidace oproti aerobní oxidaci amoniaku a uvést možné využití tohoto procesu v průmyslu.

### **3. Cíl práce:**

- Shromáždění dostupných informací o tomto jevu
- Ukázat výhody anaerobní oxidace amoniaku oproti aerobní oxidaci amoniaku
- Poukázat na uplatnění v ekologických a biologických sférách

#### 4. Literární rešerše:

##### 4.1 Objev anammox procesu:

První zmínky o anaerobní oxidaci amoniaku pocházejí již z 60. let 20. století, kdy na ni ukazoval Francis Richard z Washingtonovy univerzity v Seattlu. Všiml si, že ve vodách anoxického fjordu chybí amoniak. Usoudil, že musí existovat anaerobní oxidace amoniaku na dusík. Avšak v té době to oceánografy nijak nezajímalo (Pilcher, H., 2005).

Celý příběh objevení anammox procesu začal nelibou vůní zkažených vajec z odpadů bohatých na sulfidy. Tato vůně obtěžovala obyvatele Delftu (Nizozemsko). V továrně Gist-Brocades se proto začal odpad obsahující sulfidy zpracovávat v uzavřených tancích, kde ale chyběl přísun kyslíku (Boháček I., 2007).

Do té doby se mělo za to, že amoniak může se rozkládat jen v přítomnosti kyslíku. To znamená, že se koncentrace amoniaku v uzavřených tancích neměla měnit. V rozporu s očekáváním však koncentrace klesala a vznikal dusík (Boháček I., 2007).

Tímto jevem se začal zabývat mikrobiolog z delfské techniky J. Gijs Kuenen, který pomocí elektronového mikroskopu objevil podezřelý mikroorganismus. Ten byl později pojmenován „*Brocadia anammoxidans*“ (viz příloha). *Brocadia anammoxidans* patří do skupiny *Planktomycet*. *Brocadia* je odvozena od místa objevu (Gist-Brocades) a *anammoxidans* popisuje metabolismus bakterie.

*Brocadia anammoxidans* nese rysy jak bakteriálního světa, tak světa eukaryot i světa archebakterií. Podle analýzy DNA ji řadíme do světa bakterií, organely ji řadí do eukaryot a nedostatek polymeru peptidoglykenu v buněčné stěně ji spojuje se světem archeí (Boháček I., 2007).



## 4.2 Biodiverzita:

Použitím anammox specifických sond (16 S rDNA oligonukleotidové) a primerů byla odhalena přítomnost významných populací anammox bakterií v mnoha čistíčkách odpadních vod, sladkovodních ekosystémech a také v mořském ekosystému (viz obr. 1) (Jetten, M.S.M. et al., 2005)

Obr. 1: Geografické rozmístění anammox bakterií v Evropě

K - *Kuenenia* sp.

B - *Brocadia* sp.

S - *Scalindua* sp.



Tyto bakterie patří do tří rodů: 1. *Brocadia* - *Brocadia anammoxidans*

*Brocadia fulgida* (Strous, M. et al., 2002)

2. *Kuenenia* - *Kuenenia stuttgartiensis* (Egli, K et al., 2001)

3. *Scalindua* - *Scalindua wagneri*

*Scalindua brodae*

*Scalindua sorokinii* (Kuypers, M.M.M. et al., 2003)

Další podrobnější studie odhalily přítomnost a aktivitu anammox bakterií ve více než 30 sladkovodních a mořských ekosystémů na celém světě (viz tabulka 1.) (Op den Camp, H.J.M. et al., 2006). Pomocí rozdílných kombinací jak mikrobiologických tak biogeochemických technik se podařilo detekovat a stanovit množství anammox bakterií ve výše zmíněných ekosystémech.

K těmto technikám patří například: obohacování kultur, výživové složky, inkubace značena pomocí  $^{15}\text{N}$  se sedimentem nebo vodními vzorky, analýzy žebříčkových a membránových lipidů, mikroskopie FISH a sekvenování genů 16 S rDNA (Shmid, M. et al. 2005).

Tabulka 1: Rozšíření anammox bakterií v přirozených a umělých ekosystémech po světě

(Op den Camp, H.J.M. et al., 2006)

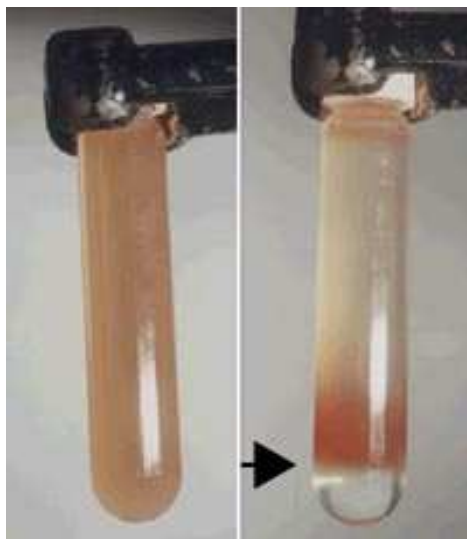
Place	Method of detection
<b>Man-made systems</b>	
Delft/Nijmegen, The Netherlands	<sup>15</sup> N, enrichment, FISH, lipids, clone library
Stuttgart, Germany	Enrichment, FISH, clone library
Dubendorf, Switzerland	Enrichment, FISH, clone library
Hannover, Germany	Enrichment, FISH
Kumanoto, Japan	Enrichment, FISH
Sydney, Australia	Enrichment
Athens, GA, U.S.A.	Enrichment
Kirinya, Jinja, Uganda	FISH
Ghent, Belgium	Enrichment, FISH, clone library
Pitsea, U.K.	Enrichment, FISH, lipids, clone library
Hangzhou, China	Enrichment
Kuyngsan, Korea	Enrichment
Kanagawa, Japan	Enrichment, FISH
Lyngby, Denmark	Enrichment
Mechernich, Germany	Enrichment
Santiago de Compostela, Spain	Enrichment, FISH
Yongin, Korea	Enrichment, FISH
Beijing, China	Enrichment
Ciba, Japan	Enrichment, FISH
Guangzhou, China	Enrichment, clone library
Perth, Australia	Enrichment, FISH
<b>Natural systems</b>	
Skagerak (North Sea)	<sup>15</sup> N, nutrient profiles
Black Sea	<sup>15</sup> N, nutrient profiles, FISH, lipids, clone library
Golfo, Costa Rica	<sup>15</sup> N, nutrient profiles
Thames Estuary, U.K.	<sup>15</sup> N
Arctic Sea (East Greenland)	<sup>15</sup> N, nutrient profiles
Arctic Sea (NW Greenland)	<sup>15</sup> N, nutrient profiles
Mertz Sea, Antarctica	Clone library
Randers Fjord, Denmark	<sup>15</sup> N, nutrient profiles, FISH, clone library
Benguela OMZ, Namibia	<sup>15</sup> N, nutrient profiles, FISH, lipids, clone library
Chesapeake Bay, U.S.A.	<sup>15</sup> N, FISH, clone library
Gullmarsfjorden, Sweden	<sup>15</sup> N, nutrient profiles
Long Island, U.S.A.	<sup>15</sup> N, nutrient profiles

### 4.3 Molekulární identifikace:

Broda (1977) předpovídal existenci chemolitoautotrofních bakterií, které umí přeměnit amoniak za anaerobních podmínek a Abeliovich a Vohnak (1992) potvrdili vysokou koncentraci nitrifikačních bakterií, které žijí bez přístupu kyslíku. První experimenty potvrzující existenci anammox procesu byly provedeny na začátku 90. let 20. století (Mulder, A. et al. 1995). Během pokusů na denitrifikačních pokusných provozech bylo zjištěno, že amoniak a dusitan zmizel z reaktorové odpadní vody a na druhou stranu se zvýšil oproti původnímu množství plynný dusík. V anammox procesu slouží dusitan jako akceptor elektronů. (Jetten, M.S.M. 1998). Jako velice důležité meziproducty celého procesu byly identifikovány hydroxylamin a hydrazin, které jsou extrémně toxickými sloučeninami. Růstová rychlost anammox bakterií se ukázala být velmi malá (Strous, M. et al. 1998).

Pokusy izolovat mikroorganismy „klasickými“ metodami selhaly. Proto musely být bakterie získávány s obohacováním kultur. Pak čištěny a separovány od jiných přítomných organismů použitím centrifugace v Percoll hustotním gradientu (viz obr. 2). Až tento postup zajistil získání relativně čisté kultury bakterií (Strous, M. et al. 1999).

Obr. 2: Výsledek obohacené anammox kultury centrifugací v Percoll hustotním gradientu



(Obr. 2 z (<http://www.microbiology.science.ru.nl/tech/cellfrac>))

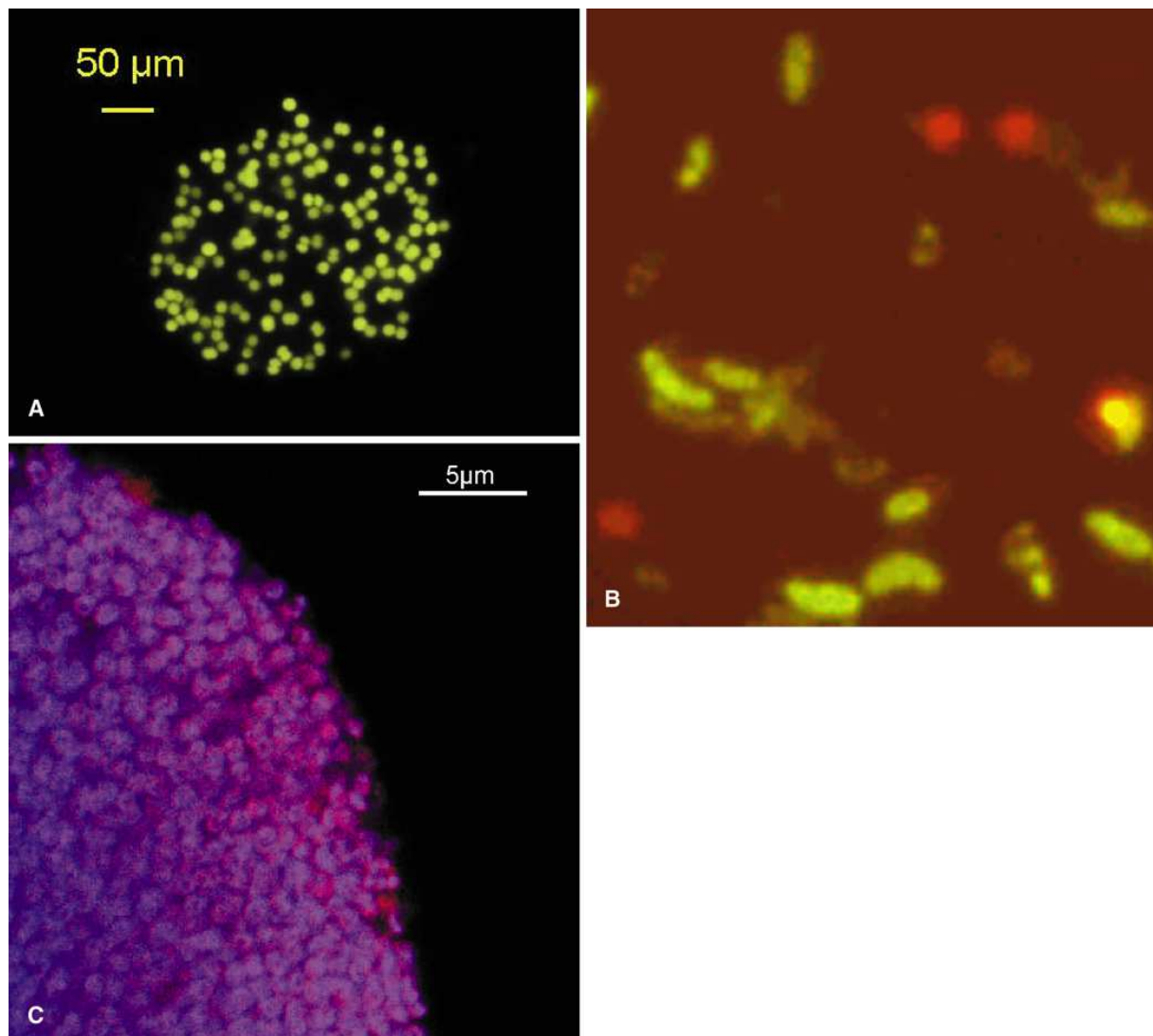
DNA ze separovaných buněk byly použity jako templát pro PCR a dále byla použita sada primerů pro univerzální 16 S rDNA. Podle převládající 16 S rDNA sekvence byly tyto mikroorganismy zařazeny do rodiny *Planctomycet*. 16 S rDNA sekvence byla dále použita

jako zvláštní typ oligonukleotidové sondy k aplikaci pro fluorescenční hybridizaci in situ (FISH) (viz obr. 3) a vedla k odhalení dalších mikroorganismů v několika čističkách odpadních vod po celém světě (Schmid, M. et al. 2000).

Pro detekování dalších anammox mikroorganismů byla navržena specifická sonda Amx368 (Schmid, M. et al. 2003). Sonda Amx820 byla navržena specificky pro určení bakterií rodu *Kuenenia* a *Brocadia* (Schmid, M. et al. 2001) a sondy BS820, Sca1309 a Scabr1114 byly navrženy k detekování bakterií rodu *Scalindua* (Kuypers, M.M.M. et al. 2003, Schmid, M. et al. 2003).

Obr 3.: Detekce anammox bakterií v přírodních ekosystémech pomocí metody FISH

(Schmid, M. et al. 2000)



**A:** Detekce clustru anammox bakterií (žlutě) v Africké mokřině (Ninja Jinya, Uganda), použitím sondy (AMX820)

**B:** Detekce *Scalindua sorokinii* ve vzorku z Černého moře. Určení pomocí 16 S rRNA genové sondy (BS-AMX820)

**C:** Simultánní *in situ* detekce „intergenic spacer region“ (ISR) mezi geny 16 S a 23 S rRNA, *Kuenenia stuttgartiensis*. ISR sonda byla použita v Cy3 (červeně) a 16 S rRNA sonda (BS-AMX820) byla značena s Cy5 (modře).

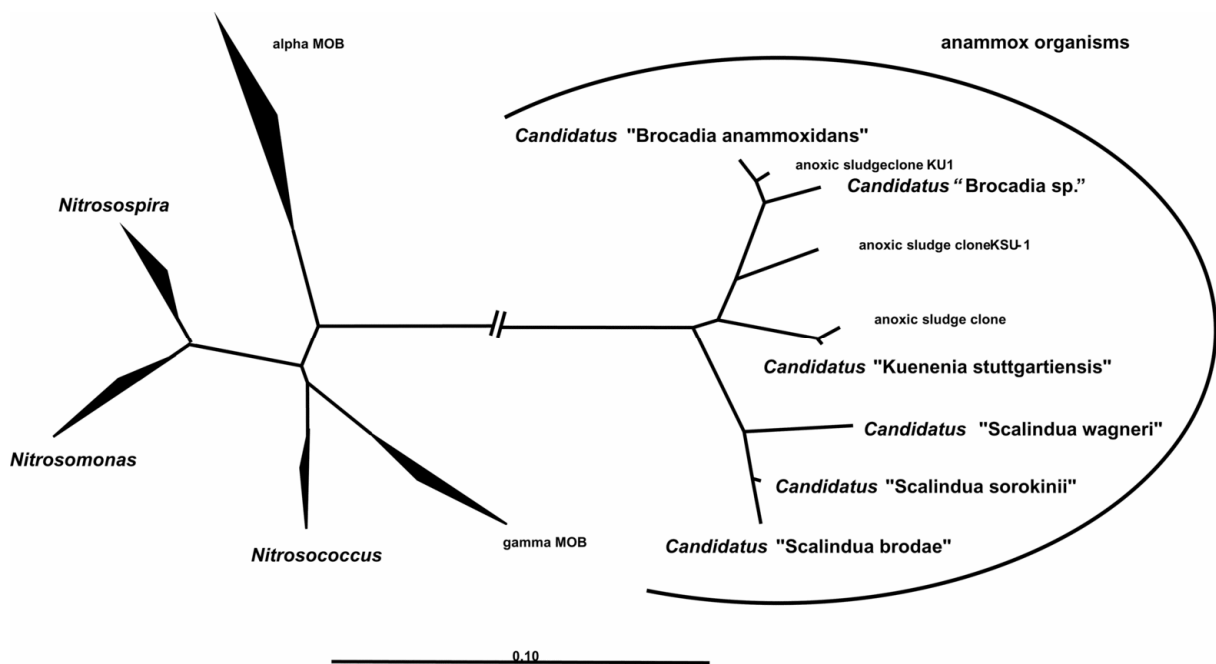
#### 4.4 Molekulární diverzita:

Anammox bakterie patří do rodiny *Planctomycet*, která byla poprvé popsána v roce 1986 Schlessnerem a Stackebrandtem (Schlessner, H., Stackebrandt, E. 1986). *Planctomyceta* jsou vodní bakterie, které byly nalezeny v brakické vodě, mořském ekosystému a také ve sladké vodě. Rozmnožují se pučením.

Zatím zahrnuje pouze čtyři rody: *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata*, *Isosphaera*

Fylogenetické analýzy ukázaly, že anammox bakterie patří do rodiny *Planctomycet* (viz obr.:4). Fylogenetický strom byl odhalen použitím sekvencí 16S rDNA, které obsahovaly více než 1400 nukleotidů (Ludwig, W. et al., 1998).

Obr.4: Diverzita *Planctomycet* odhalená použitím sekvencí 16S rDNA (Ludwig, W. et al., 1998)



Všechny tři rody anammox bakterií sdílejí stejný metabolismus a mají podobnou ultrastrukturu. Evoluční rozdíly mezi anammox bakteriemi jsou hodně velké (<85% sekvenční schody v genech 16 S rDNA) (Schmid, M et al., 2003).

#### 4.5 Ekofyziologie:

Anammox bakterie jsou charakterizovány velmi nízkou růstovou rychlostí. V bioreaktorech, kde je omezen kyslík, se vyskytují shluky anammox bakterií v přítomnosti bakterií, které umí přeměnit amoniak za aerobních podmínek. Ty přeměňují amoniak na dusitan a spotřebovávají anammox proces inhibující kyslík (Sliemers, A. O., 2003).

Generační doba anammox bakterií je za optimálních podmínek 11 dní, ale v průměru 2-3 týdny (Strous, M. et al., 2002).

Vysoká anammox aktivita je pozorována v rozmezí pH mezi 6,4 – 8,3 a teplotou v rozmezí 20 – 43°C. (Strous, M. et al., 1999). Za optimálních podmínek (pH 8 a teplotě 40°C) je specifická aktivita okolo 3,6 mmol N<sub>2</sub> (g · protein)<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> a specifická růstová rychlost 0,0027 h<sup>-1</sup> (Egli, K. et al., 2001).

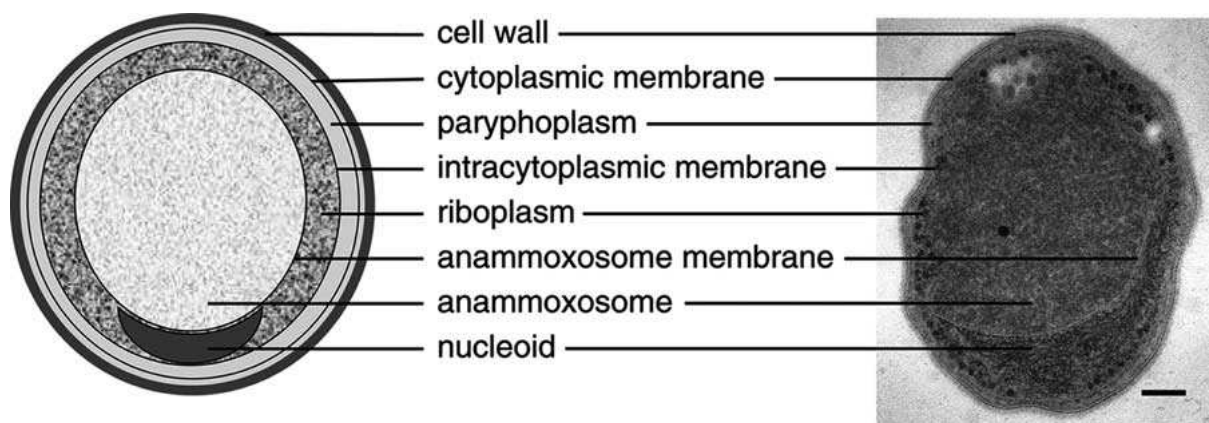
Anammox bakterie jsou velmi citlivé ke kyslíku a dusitanu. Jsou reverzibilně potlačeny i velmi nízkou koncentrací kyslíku (< 1 μM) a ireverzibilně vysokou koncentrací dusitanu (> 10 mM) (Strous, M. et al., 2002).

#### 4.6 Struktura buňky anammox bakterií

Ultrastruktura *Brocadia anammoxidans* má mnoho společných rysů s rodinou *Planctomycet* (viz obr. 5). Tyto mikroorganismy mají bílkovinou buněčnou stěnu bez peptidoglykanu a jsou tudíž necitlivé k ampicilinu. Chromosom je od obklopující cytoplazmy oddělen jednoduchou nebo dvojitou membránou. Membrány anammox bakterií a jiných *Planctomycet* obsahují hopanoidy (Sinninghe Damsté, J.S. et al., 2004). Hopanoidy jsou pentacycklické sloučeniny (viz příloha) podobné sterolům. Jejich primární funkcí je zlepšit fluiditu plasmatické membrány a přizpůsobit ji na extrémní podmínky, které vznikají v procesu anammox (např.: vznik extrémně toxického hydrazinu).



Obr. 5: Buněčné oddíly u anammox bakterií. Vlevo:schéma, vpravo: “*Brocadia anammoxidans*” pohled přes TEM. Úsečka ilustruje vzdálenost 100 nm. (Lindsay, M. R. et al., 2001)



Jsou to kokoidní bakterie s průměrnou velikostí 0,7-2 $\mu$ m (Strous, M. et al., 1998). Všechny tři rody mají stejný metabolismus a podobnou ultrastrukturu (Strous, M. a Jetten, M.S.M., 2004). Vyskytuje se u nich zvláštní organela, která byla nazvána **anammoxosom** (Lindsay, M. R. et al., 2001).

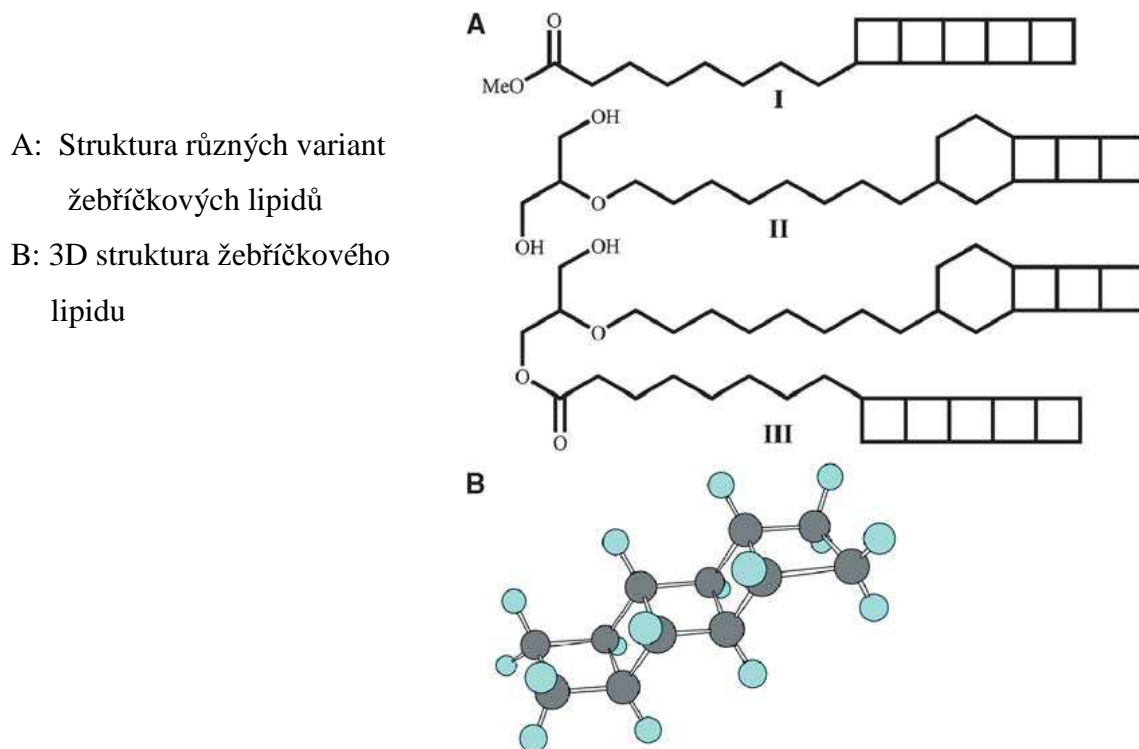
#### 4.6.1 Anammoxosom:

Analýzou pomocí elektronové mikroskopie se podařilo odhalit zvláštní prokaryotní organelu, která se vyskytuje u všech anammox bakterií, anammoxosom. Anammoxosom zaujímá více jak 30% objemu buňky. Je obklopen úseky obsahující nukleoid a ribozomy a strukturálně se podobá pirelulosomu u jiných *Planctomycet* (Lindsay, M.R., et al. 2001). Dále se zjistilo, že tato organela je tvořena téměř výlučně unikátními žebříčkovými lipidy, které mají 3-5 lineárních zřetězených cyklobutanových prstenců (viz obr. 6). V žebříčkových lipidech se vyskytují jak étery, tak estery. (Sinninghe Damsté, J.S. et al., 2002).

Tato membrána je v podstatě nepropustná pro všechny sloučeniny, včetně hydrazinu a protonů. Nachází se zde důležitý protein, který byl nazván hydrazin oxidoreduktáza (Op den Camp, H.J.M. et al. 2006). V anammoxosomu se odehrává vlastní anammox reakce.

Struktura žebříčkových lipidů u anammox bakterií je v přírodě unikátní (Sinninghe Damsté, J.S. et al., 2002).

Obr. 6: Struktura žebříčkových lipidů u *Brocadia anammoxidans* (Jahnke, L.L. et al., 2001)



#### 4.7 Biochemie anammox bakterií:

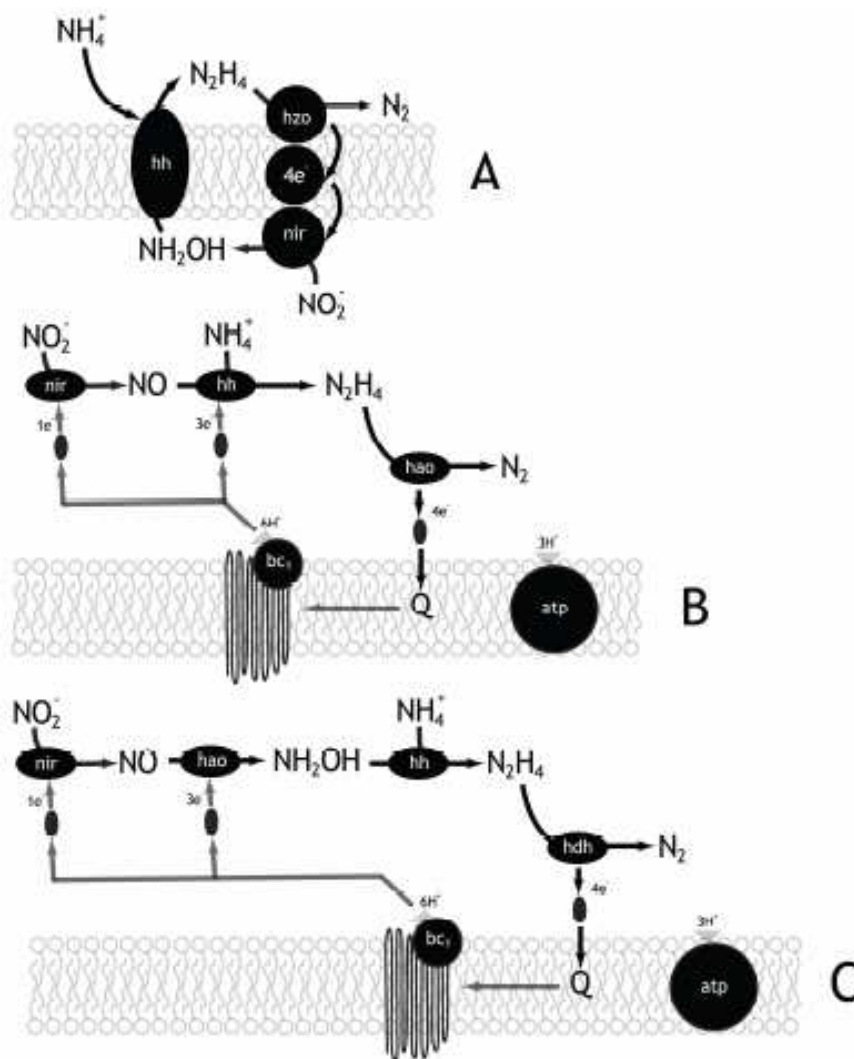
Biochemie anammox bakterií je stále z velké části neznámá. Pomocí použití  $^{15}\text{N}$  značení experimentů, byly zjištěny možné cesty anaerobní oxidace amoniaku a hydrazin ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) a hydroxylamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) byly prokázány jako důležité meziprodukty anammox reakce (van de Graaf, A. A., et al. 1997) (viz obr. 7 A). Dusitan je redukován na hydroxylamin pomocí „nitrát redukujícího enzymu“. Hydroxylamin a amoniak jsou kondenzovány na hydrazin pomocí takzvané „hydrazin hydrolázy“ a hydrazin je oxidován na dusík pomocí „hydrazin oxidoreduktázy“. Dusitan zde slouží jako akceptor elektronů a amoniak jako donor elektronů (Jetten, M.S.M., et al. 1998).

Pozdější analýzy anammox bakterie *Kuenenia stuttgartiensis* naznačily, že meziproduktem může být také oxid dusnatý (NO). Pak jako nitrát reduktáza slouží cytochrom cd1 (Strous, M. et al, 2006) (viz obr. 7 B). Podle této studie je jako první redukován dusitan na oxid dusnatý. Dále je amoniak sloučen s oxidem dusnatým, který utvoří hydrazin a ten je následně oxidován na dusík.

V anammox procesu není dusitan pouze redukován na oxid dusný nebo hydroxylamin, ale uvolněné elektrony slouží také k fixaci  $\text{CO}_2$  (Strous, M. et al., 1999).

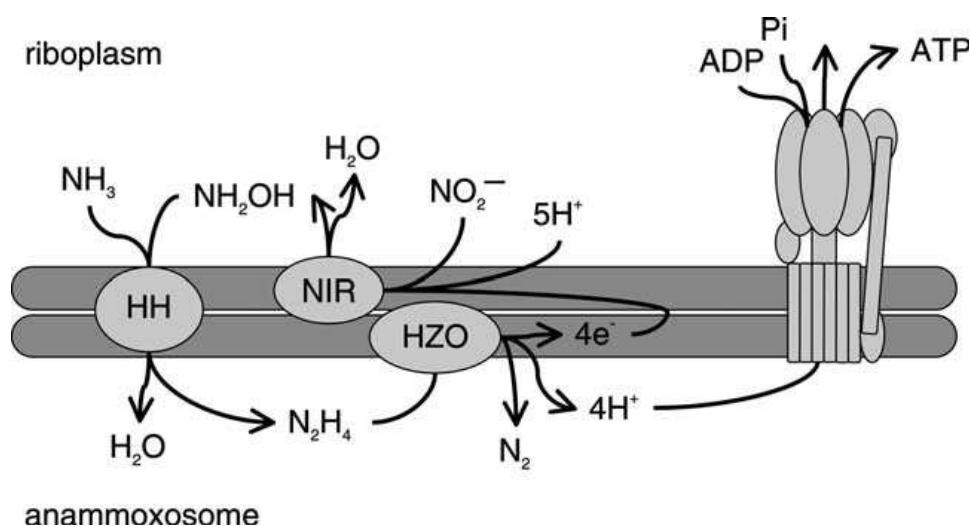
Podle současné hypotézy se uvolní 4 elektrony v posledním kroku anammox reakce. Elektrony z oxidace hydrazinu na dusík přecházejí přes cytochrom c a přes quinol na komplex cytochrom bc1. Zbylé elektrony jsou použity v dalším anammox cyklu. (viz obr. 7 C). Proces anammox začíná s jedním elektronem, který redukuje dusitan ( $\text{NO}_2^-$ ) na oxid dusný ( $\text{NO}$ ) přes cd1 typ nitrát reduktázu. Další tři elektrony redukují oxid dusný na hydroxylamin přes hydroxylamin oxidoreduktázu. Tento enzym tvoří přes 10% veškerých proteinů u anammox bakterií (Schalk, J. et al. 2000). Po tomto kroku by se hydroxylamin a amoniak přeměnili na hydrazin. Další alternativa je, že by se oxid dusný a amoniak přeměnily přímo na hydrazin přes hydrazin hydrolázu s třemi elektrony, jak navrhl Strous M. et al. (2006).

Obr. 7: Rozdílné hypotézy anammox procesu  
 A (Jetten, M.S.M. et al., 2003)  
 B (Strous, M. et al., 2006)  
 C (Kartal, B. et al., 2007)



Proces anammox se odehrává uvnitř anammoxosomu (viz obr. 8). Hydroxylamin a amoniak jsou přeměněny na hydrazin přes hydrazin hydrolázu (HH). Hydrazin je pak oxidován pomocí hydrazin oxidázy (HZO), která je téměř stejná jako hydroxylamin oxidoreduktáza u *Nitrosomonas europaea* (Jetten, M.S.M., et al., 1998). Výsledkem celé přeměny je  $N_2$  a čtyři elektrony a čtyři protony. Tyto čtyři elektrony jsou použity dohromady s pěti protony z riboplasmu a využity na přeměnu dusitanu ( $NO_2^-$ ) pomocí nitrát reduktázy (NIR) (Kuenen, J. G., et al, 2001).

Obr. 8: Hlavní metabolické děje v membráně anammoxosomu (van Niftrik, L.A., et al., 2004)



Anammox reakci určuje protonový gradient s efektivní spotřebou protonů z riboplasmu a produkcí protonů dovnitř anammoxosomu. To je zajištěno rozdílnými náboji a rozdílným pH na obou stranách membrány. pH riboplasmu je alkalické a má negativní náboj v porovnání s pH a nábojem anammoxosomu. To by mělo sloužit k syntéze ATP přes ATPázu zabudovanou do membrány anammoxosomu (van Niftrik, L.A., et al., 2004).

Anammox bakterie nespojují dusitan a amoniak v poměru 1:1, jak by se mohlo zdát, ale v poměru 1:1,3. Nadbytečný dusitan (0,3 mol dusitanu na mol amoniaku) je anaerobně oxidován na dusičnan (van de Graaf, A.A., et al. 1996).

## 4.8 Kultivace anammox biomasy:

### 4.8.1 *Sequencing Batch Reactor (SBR)*

Je standardní metoda pro kultivaci a studování anammox mikroorganismů (Strous, M. et al, 1998). SBR se obvykle provádí v 2 – 15 litrových nádobách vybavených vodním pláštěm, který je připojen k vodní lázni. To zajišťuje stálou teplotu v rozmezí mezi 30 – 37°C. Nádoba je míchána  $80 \pm 10$  otáčkami za minutu. Oxidační nebo redukční potenciál může být kontrolován použitím kombinované oxido-redukční elektrody. Přítomnost oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) v plynu je dostatečná na to, aby zajistila pufrační hodnotu roztoku mezi 7 – 8 pH. (Jetten, M. et al, 2005). Horní limit přeměny dusíku v SBR je okolo  $9 \text{ kg N.m}^{-3}$  za den (Sliekers, A.O. et al., 2003).

Kvůli nízké generační době anammox bakterií trvá obohacování kultivací nejméně 200 dní, lépe 600 dní (Pynaert et al., 2003).

### 4.8.2 *CANON proces*

Spolupráce mezi aerobně a anaerobně oxidujícími bakteriemi (viz příloha). Tento proces je nazván **CANON** ( Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite). V tomto systému spolu koexistují bakterie, které aerobně oxidují amoniak (AOB), a anammox bakterie. Do CANON reaktoru, kde je nedostatek kyslíku, je dodáván amoniak, který je částečně oxidován na dusitan pomocí AOB. Vyprodukovaný dusitan je spolu se zbytkem amoniaku využíván anammox bakteriemi a nakonec přeměněn na dusík (Sliekers, A.O. et al., 2003).

Pomocí metody FISH se podařilo v CANON biomase detekovat kolem 40% AOB a také okolo 40% anammox bakterií. Žádné aerobní bakterie oxidující dusitan (NOB) nebyly odhaleny v tomto systému (Third, K. et al., 2001). Přeměna dusíku v CANON reaktoru je okolo  $1,5 \text{ kg N.m}^{-3}$  za den (Sliekers, A.O. et al., 2003).

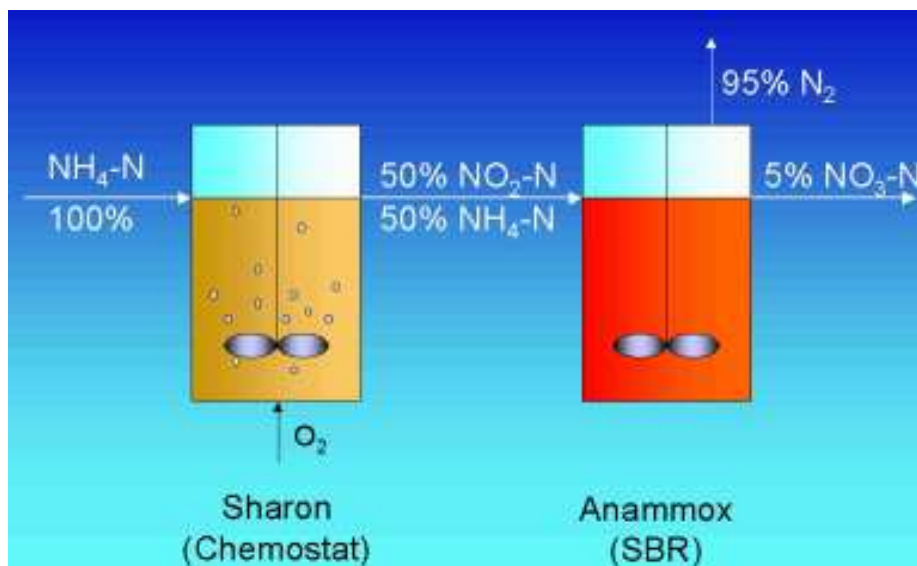
Další studie ukázaly, že jako alternativní zdroj energie pro mikrobiální společenství v CANON reaktoru může sloužit močovina. Močovina je významný zdroj dusíku jak v odpadních vodách tak v přirozeném ekosystému (Sliekers, A.O. et al., 2004).

### 4.8.3 SHARON proces

**SHARON** (Single reactor systém for High Amonia Removal Over Nitrite process) byl vyvinut pro přeměnu amoniaku přes takzvanou dusitanovou cestu. SHARON proces je kombinován s procesem anammox (viz obr.: 9). Tento proces byl testován v laboratorních podmínkách po dobu dvou let a byl úspěšně zvýšen z 2 litrového testovaného objemu na 1800 m<sup>3</sup> (viz příloha) (Jetten, M.S.M. et al., 1997). V SHARON procesu je oxidováno 53% amoniaku na dusitan bez potřeby kontrolování pH. Teplota je zde kolem 35°C a pH mezi 6,5 – 7,5.

Specifická aktivita anammox biomasy je poměrně vysoká: 0,8 kg N (kg suché váhy)<sup>-1</sup> za den a toto množství může být zvýšeno na více než 2 kg N. m<sup>-3</sup> za den (van Dongen, U. et al., 2001).

Obr. 9: Kombinace SHARON a anammox procesu (van Dongen, U. et al., 2001).



#### 4.9 Rozdíl mezi aerobní a anaerobní oxidací amoniaku při čištění odpadních vod:

Konvenční metody využívají bakterie, které nejdříve přemění amoniak na dusitany, pak na dusičnany, a nakonec pomocí denitrifikačních bakterií vzniká plynný dusík. Tyto metody mají značné nevýhody, protože bakterie potřebují kyslík, je tedy nutno provzdušňovat odpadní vody, a také musí být dodáván denitrifikačním bakteriím zdroj energie (např. etanol). Tyto metody jsou nákladné a nepříliš šetrné k životnímu prostředí.

Naproti tomu jsou výhody anaerobní oxidace amoniaku více než zřejmé. Bakterie používají jako zdroj energie přímo amoniak, nepotřebují kyslík a na rozdíl od aerobních bakterií spotřebovávají oxid uhličitý (Boháček, I., 2007).

Je odhadováno, že provozní náklady klesnou až o **90%** a nároky na prostor klesnou až o **50%** (van Dongen, U. et al., 2001).

Navíc se ukazuje, že anaerobní oxidace amoniaku je energeticky více příznivá než aerobní oxidace amoniaku (viz tabulka 2.) (Jetten, S.M. et al., 1999).

Tabulka 2: Rozdíly mezi aerobní a anaerobní oxidací amoniaku (Jetten, S.M. et al., 2001).

<b>Parameters of aerobic and anaerobic ammonia oxidation.</b>			
Parameter	Nitrification $\text{NH}_4^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^-$	Anammox $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$	Unit
Free energy	-275	-357	kJ/mol
Biomass yield	0.08	0.07	mol/mol C
Aerobic rate	200–600	0	nmol/min/ mg protein
Anaerobic rate	2	60	nmol/min/ mg protein
Growth rate	0.04	0.003	/h
Doubling time	0.73	10.6	days
$K_s \text{ NH}_4^+$	5–2600	5	$\mu\text{M}$
$K_s \text{ NO}_2^-$	N/A	<5	$\mu\text{M}$
$K_s \text{ O}_2$	10–50	N/A	$\mu\text{M}$

N/A, not applicable;  $K_s$ , affinity constant.

#### 4.10 Role anammoxu v globálním cyklu dusíku:

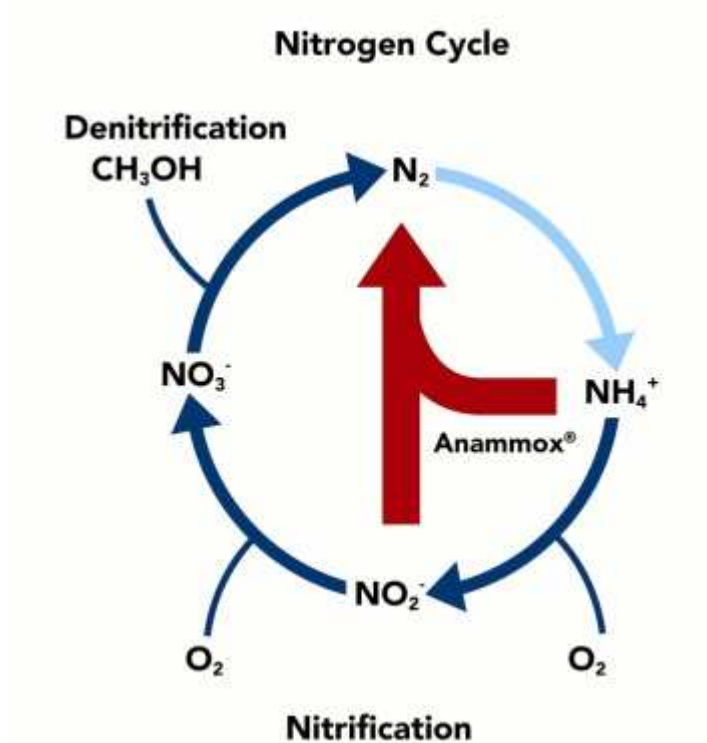
Objev anammox procesu má velký význam pro globální cyklus dusíku.

Normální cyklus dusíku je tvořen dvěma komplementárními procesy. A to vazbou dusíku do organických molekul a uvolnění dusíku z organických molekul.

Bakterie, které váží dusík, produkují amoniak a organismy konzumují amoniak, který je po jejich zániku opět uvolňován. Další bakterie a archea přeměňují amoniak na dusitany a dusičnany. Ty jsou nakonec přeměněny na vzdušný dusík, a cyklus je uzavřen (Boháček I., 2007).

Proces zvaný anammox tvoří v tomto cyklu zkratku (viz obr. 9), z amoniaku a dusitanu vzniká plynný dusík.

Obr. 9: Cyklus dusíku se zahrnutím anammox procesu



(Obr. 9 z ([www.paques.nl/en/anammox\\_nitrogen\\_removal](http://www.paques.nl/en/anammox_nitrogen_removal)))

Odhaduje se, že z anaerobní oxidace amoniaku může pocházet až **50%** dusíku uvolněného z oceánů (Boháček I., 2007).



#### **4.11 Aplikace anammox procesu:**

Anammox proces najde také uplatnění v nejrůznějších biotechnologických sférách. Jako například v ropných rafinériích, výrobě minerálních hnojiv a v neposlední řadě v čističkách odpadních vod. Tyto sféry produkují ohromná množství amoniaku, který je třeba rozložit (Boháček I., 2007).

Aplikací anammox procesu by klesly provozní náklady až o **90%**. Současná cena nitrifikace z anammox procesu se odhaduje asi na 0,75 euro za kg přeměněného dusíku (van Dongen, U et al., 2001). To je velmi nízká cena ve srovnání s 2-5 eury, které byla vypočtena pro jiné testované procesy. Předchozí studie s různými typy odpadních vod ukázaly, že aktivita anammox bakterií není negativně ovlivněna chemickými směsi použité vody (van Dongen, U et al., 2001).

## 5. Souhrn, závěr a diskuze:

První zprávy o anammox procesu přinesl v šedesátých letech dvacátého století Francis Richard z Washingtonovy univerzity v Seattlu. Poukázal na nedostatek amoniaku v anoxickém fjordu (Pilcher, H., 2005). V té době nebyly známy dnešní moderní molekulární techniky a tedy detekce anammox bakterií byla nemožná.

Další podrobnější studie se začaly odehrávat v osmdesátých letech dvacátého století v továrně Gist-Brocades, která se nachází v Nizozemsku. Továrna vypouštěla odpad obsahující sulfidy, které svým zápachem obtěžovaly obyvatele města Delftu. A tak se tento odpad začal zpracovávat v uzavřených tancích, kde nebyl přístup kyslíku. Doté doby se mělo za to, že amoniak se může zpracovávat jen v přítomnosti kyslíku.

Pomocí elektronového mikroskopu byl odhalen mikroorganismus, který byl nazván *Brocadia anammoxidans* (Strous, M. et al., 2002). Tato bakterie patří do rodiny *Planctomycet*. Postupem času byly objeveny i další bakterie, které spadaly do této rodiny. Jsou to bakterie rodu *Kuenenia* (Egli, K. et al., 2001) a *Scalindua* (Kuypers, M.M.M. et al., 2003). Tyto anammox bakterie obývají nejrůznější ekosystémy, přirozené i člověkem vytvořené (Op de Camp, H.J.M. et al., 2006).

První experimenty potvrzení procesu anammox byly získány až v devadesátých letech (Mulder, a. ET AL., 1995). Anammox bakterie mají velmi malou růstovou rychlost a izolovat tyto bakterie klasickými metodami bylo nemožné. Až pomocí obohacování kultur a následné separaci, od jiných bakterií, se podařilo díky centrifugaci v Percoll hustotním gradientu. V procesu anammox vzniká jako meziprodukt hydroxylamin a hydrazin, který je extrémně toxický. Podle nejnovější teorie vzniká jako meziprodukt i oxid dusný. Dusitan zde slouží jako akceptor elektronů (Strous, M. et al., 1999).

Anammox bakterie jsou velmi citlivé ke kyslíku a dusitanu. Anammox reakci může inhibovat i velmi malá koncentrace kyslíku a naopak velká koncentrace dusitanu tuto reakci také inhibuje (Strous, M. et al., 2002).

Proces anammox se odehrává v unikátní prokariotní organelle, anammoxosomu. Tato zvláštní organela má membránu tvořenou žebříčkovými lipidy, které ji činní společně s hopanoidy v podstatě nepropustnou pro všechny sloučeniny (Jahnke, L.L. et al., 2001). V této membráně se vyskytuje i hlavní protein anammox bakterií, hydrazin oxidoreduktáza. Ta tvoří asi 10% veškerých proteinů u anammox bakterií. Biochemie anammox bakterií je ještě poměrně záhadná. Existuje několik možných hypotéz, které ukazují, jak by mohl vznikat z amoniaku a dusitanu plynný dusík.

Proces anammox má velký význam pro globální cyklus dusíku. Normální cyklus dusíku je tvořen dvěma procesy. Vazbou dusíku do organických molekul a uvolnění dusíku z organických molekul. Anammox proces tvoří v tomto cyklu zkratku, kde přímo z dusitanu a amoniaku vzniká plynný dusík. Z tohoto procesu může pocházet až 50% dusíku uvolněného z oceánů (Boháček, I., 2007).

Anaerobní oxidace amoniaku má značné výhody oproti aerobní oxidaci amoniaku. Je značně levnější, může ušetřit až 90% všech nákladů na provoz, a také podmínky na prostor by mohly klesnout až o 50% (van Dongen, U. et al., 2001).

Anammox proces podle posledních průzkumů najde uplatnění v nejrůznějších biotechnologických sférách. Ať už jsou to ropné rafinérie, při výrobě minerálních hnojiv anebo v čističkách odpadních vod. Všude tam, kde jsou produkována obrovská množství amoniaku, který je třeba rozložit.

## 6. Literární přehled:

- Abeliovich A & Vonhak A (1992). Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 158: 267–270.
- Boháček I (2007). Anammox. *Vesmír* 86: 357.
- Broda, E (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17:491–493.
- Egli K, Franger U, Alvarez PJJ, Siegrist H, Vandermeer JR & Zehnder AJB (2001). Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contractor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* 175: 198–207.
- Grommen R & Verstraete W (2002). Environmental biotechnology: the ongoing quest. *Journal of Biotechnology* 98: 113–123.
- Jahnke LL, Eder W, Huber R, Hope JM, Hinrichs KU, Hayes JM, Des Marais DJ, Cady SL, Summons RE (2001). Signature lipids and stable carbon isotope analyses of Octopus Spring hyperthermophilic communities compared with those of Aquificales representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5179–5189.
- Jetten MSM, Horn SJ & van Loosdrecht MCM (1997). Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Wat. Sci. Technol.* 35: 171–180.
- Jetten MSM, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, van Dongen L, van de Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, van Loosdrecht MCM & Kuenen JG (1998). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 421–437.
- Jetten MSM, Strous M, Van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, Van Dongen L, Van de Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, Van Loosdrecht MCM, Kuenen JG (1999). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:421–437.
- Jetten MS, Sliemers O, Kuypers M, Dalsgaard T, van Niftrik L, Cirpus I, van de Pas-Schoonen K, Lavik G, Thamdrup B, Le Paslier D, Op den Camp HJ, Hulth S, Nielsen LP, Abma W, Third K, Engström P, Kuenen JG, Jørgensen BB, Canfield DE, Sinninghe Damsté JS, Revsbech NP, Fuerst J, Weissenbach J, Wagner M, Schmidt I, Schmid M, Strous M (2003). Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 107–14.
- Jetten MSM, Cirpus I, Kartal B, van Niftrik L, van de Pas-Schoonen KT, Sliemers O, Haaijer S, van der Star W, Schmid M, van de Vossenberg J, Schmidt I, Harhangi H,

van Loostrecht M, Gijst Kuenen J, Op den Camp H, Strous M (2005). 1994-2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochemical Society Transactions* 33: 119–123.

- Kartal B, Kuypers MM, Lavik G, Schalk J, Op den Camp HJ, Jetten MS, Strous M (2007). Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ. Microbiol.* 9:635–642.
- Kuenen JG & Jetten MSM (2001). Extraordinary anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *ASM News* 67: 456–463.
- Kuypers MMM, Sliemers AO, Lavik G, Schmid M, Jørgensen BB, Kuenen JG, Sinninghe Damsté JS, Strous M, Jetten MSM (2003). Anaerobic ammonium oxidation by Anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 422:608–611.
- 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.
- Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J, Bachleitner M, Schleifer KH (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis.* 19:554–68.
- Mulder A, van de Graaf AA, Robertson LA, Kuenen GJ (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16:177–184.
- Op den Camp HJ, Kartal B, Guven D, van Niftrik LA, Haaijer SC, van der Star WR, van de Pas-Schoonen KT, Cabezas A, Ying Z, Schmid MC, Kuypers MM, van de Vossenberg J, Harhangi HR, Picioreanu C, van Loosdrecht MC, Kuenen JG, Strous M, Jetten MS (2006). Global impact and application of the anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Biochemical Society Transactions* 34: 174–178.
- Pilcher H (2005). Pipe dreams. *Nature* 437: 1227–1228.
- Pynaert K, Smets BF, Wyffels S, Beheydt D, Siciliano SD, Verstraete W (2003). Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3626–35.
- Richards FA (1965). Anoxic basin and fjords, in: J.P.Riley, G. Skirrow (Eds.), *Chemical Oceanography*, vol. 1, Academic Press, London, 611–645.

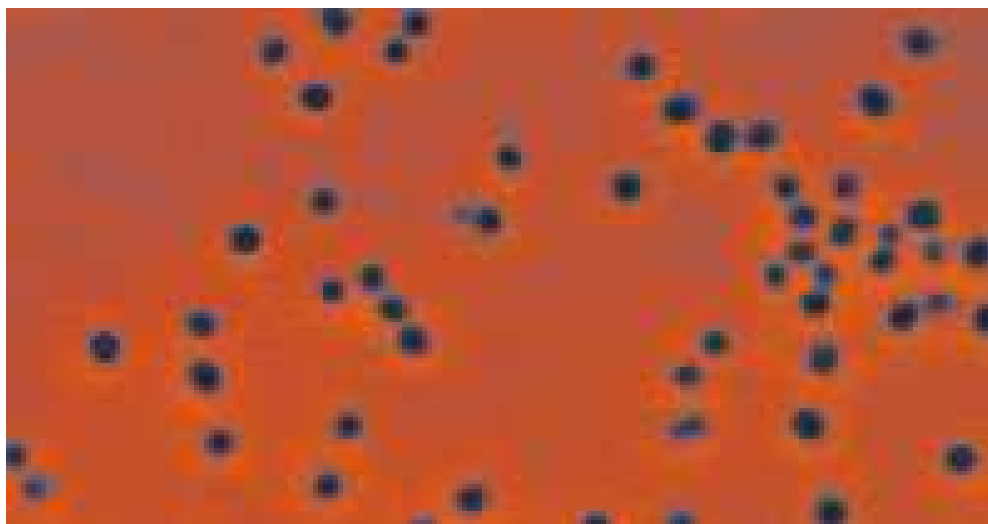
- Schalk J, Devries S, Kuenen JG, Jetten MSM (2000). A novel hydroxylamine oxidoreductase involved in the anammox process. *Biochemistry* 39:5405–5412.
- Schlesner H & Stackebrandt E (1986). Assignment of the genera *Planctomyces* and *Pirella* to a new family *Planctomycetacea* fam. nov. and description of the order *Planctomycetales* ord. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 8: 174–176.
- Schmid M, Twachtmann U, Klein M, Strous M, Juretschko S, Jetten M, Metzger J, Schleifer KH, Wagner M (2000). Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:93–106.
- Schmid M, Schmitz-Esser S, Jetten MSM, Wagner M (2001). 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium oxidising bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environ. Microbiol.* 7:450–459.
- Schmid, M, Walsh, K, Webb, R, Rijpstra, WIC, Pas-Schoonen, K van de, Verbruggen, MJ, Hill, T, Moffett, B, Fuerst, J, Schouten, S, Damsté, JSS, Harris, J, Shaw, P, Jetten, M, 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.
- Schmid M, 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 Damsté JS, Kuypers M, Revsbech NP, Mendez R, Jetten MS, Strous M (2005). Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1677–1684.
- Sinninghe Damsté JS, Strous M, Rijpstra WIC, Hopmans EC, Geenevasen JAJ, van Duin ACT, van Niftrik LA & Jetten MSM (2002). Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* 419: 708–712.
- Sinninghe Damsté JS, Rijpstra WIC, Schouten S, Fuerst JA, Jetten MSM, Strous M. (2004). The occurrence of hopanoids in planctomycetes: implications for the sedimentary biomarker record. *Organic Geochemistry* 35: 561–566.
- Sliemers AO, Third K, Abma W, Kuenen JG & Jetten MSM (2003). CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiol. Lett.* 218: 339–344.
- Sliemers AO, Haaijer S, Schmid M, Harhangi H, Verwegen K, Kuenen JG & Jetten MSM (2004). Nitrification and anammox with urea as the energy source. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 271–278.

- Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, Jetten MSM (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool to study very slowly growing micro-organisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:589–596.
- Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM (1999). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3248–3250.
- Strous M, Kuenen JG, Fuerst JA, Wagner M, Jetten MSM (2002). The anammox case—a new experimental manifesto for microbiological eco-physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:693–702.
- Strous M & Jetten MSM (2004). The anaerobic oxidation of methane and ammonium. *Ann. Rev. Microbiol.* 158: 99–117.
- Strous M, Pelletier E, Manganot S, Rattei T, Lehner A, Taylor MW, Horn M, Daims H, Bartol-Mavel D, Wincker P, Barbe V, Fonknechten N, Vallenet D, Segurens B, Schenowitz-Truong C, Médigue C, Collingro A, Snel B, Dutilh BE, Op den Camp HJ, 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 HW, Weissenbach J, Jetten MS, Wagner M, Le Paslier D.(2006). Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* 440:790–794.
- Third K, Sliemers AO, Kuenen JG & Jetten MSM (2001). The CANON System (Completely Autotrophic Nitrogenremoval Over Nitrite) under ammonium limitation: interaction and competition between three groups of bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 588–596.
- Van de Graaf AA, De Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142: 2187–2196.
- Van de Graaf AA, De Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG (1997). Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of N-15 studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 143:2415–2421.
- Van Dongen U, Jetten MSM & van Loosdrecht MCM (2001). The SHARON-anammox process for the treatment of ammonium rich wastewater. *Wat. Sci. Technol.* 44: 153–16.
- Van Niftrik LA, Fuerst JA, Sinninghe Damsté JS, Kuenen JG, Jetten MS, Strous M (2004). The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 233: 7–13.

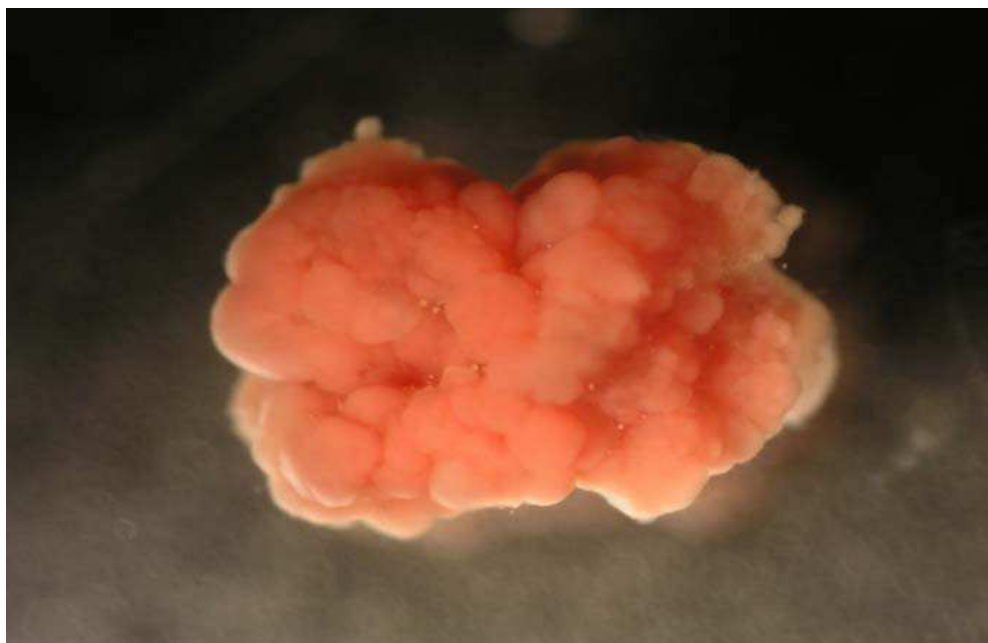
7. Příloha:

Obr. 1.: *Brocadia anammoxidans* a:([www.anammox.com/gallery/anammox\\_cells\\_pc.jpg](http://www.anammox.com/gallery/anammox_cells_pc.jpg))  
b:([www.twanetwerk.nl/default.ashx?DocumentID=7881](http://www.twanetwerk.nl/default.ashx?DocumentID=7881))

a)



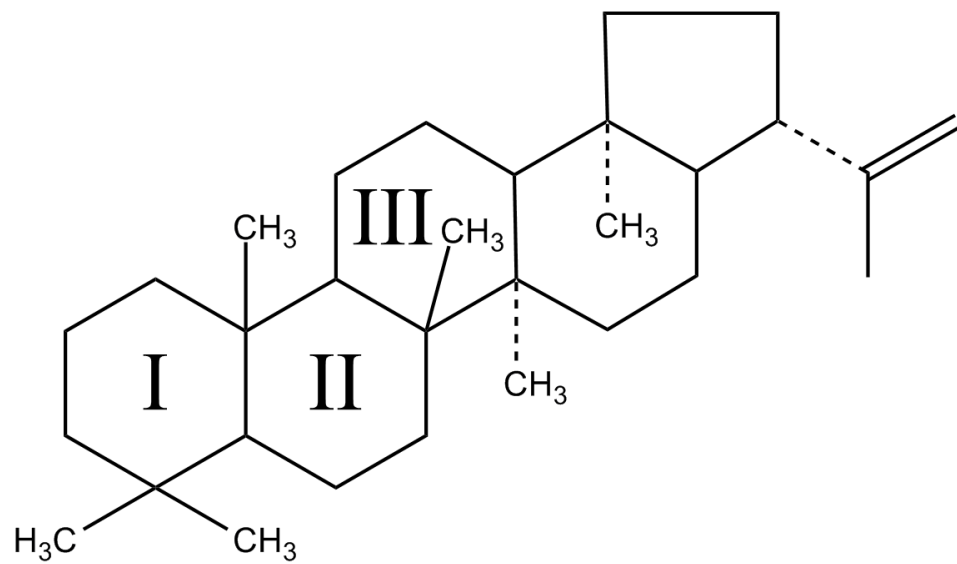
b)





Obr. 2: Obecný strukturní vzorec hopanoidů

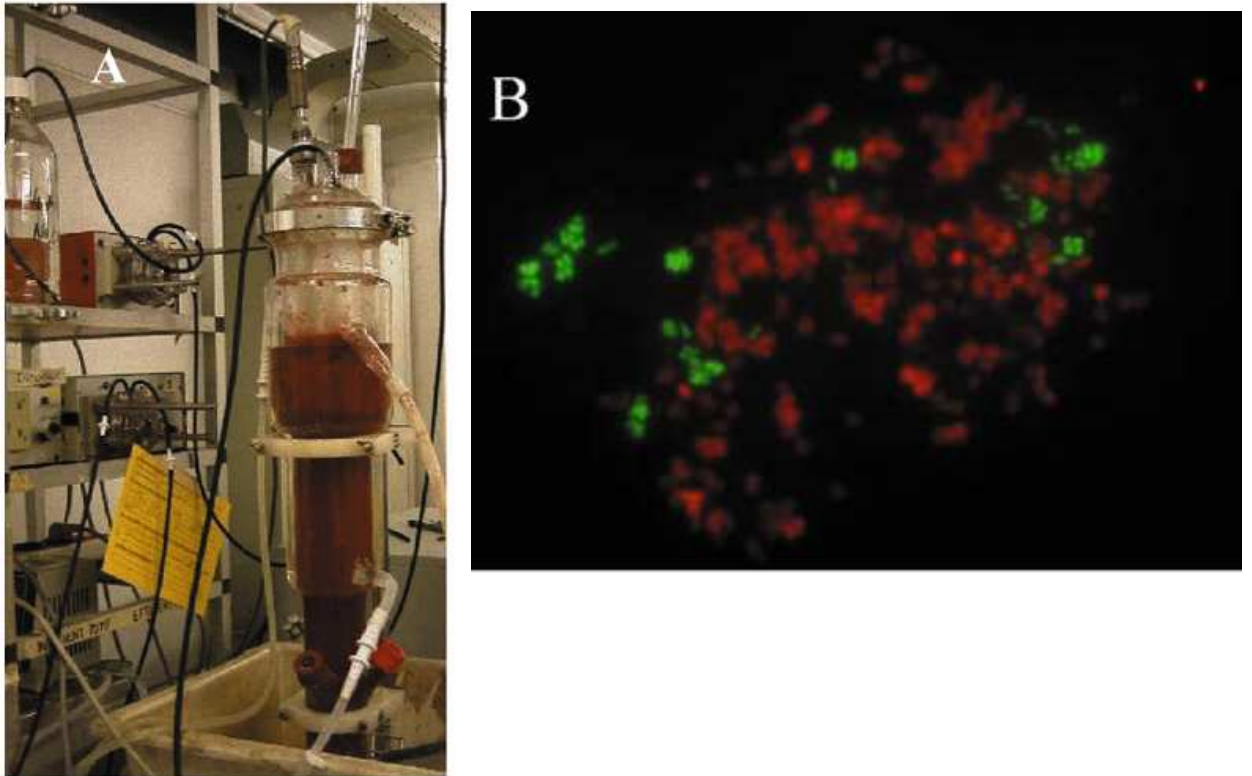
([www.upload.wikimedia.org/wikipedia/en/1/11/Hopanoid\\_01.png](http://www.upload.wikimedia.org/wikipedia/en/1/11/Hopanoid_01.png))



**Obr. 2:** CANON (completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite) plynem poháněný reaktor.

**A:** Obsahuje „*Candidatus B. anammoxidans*” (red Cy3-AMX820 pozitivní buňky) a *Nitrosomonas europaea* (green Fluos-NEU653 pozitivní buňky).

**B:** Buňky z A zobrazené pomocí FISH metody (Jetten, M.S.M. et al. 2003).



Obr. 4 : Anammox reaktor (1800 m<sup>3</sup>) v Rotrdamu ([www.anammox.com/application.html](http://www.anammox.com/application.html)).

