

BAKTERIER FJERNER PHOSPHAT FRA SPILDEVAND



Om forfatterne



Per Halkjær Nielsen er professor.
phn@bio.aau.dk



Marta Nierychlo er staff scientist.
mni@bio.aau.dk



Francesca Petriglieri er ph.d.-studerende
fp@bio.aau.dk

Alle er ved Institut for Kemi og Biovidenskab, Aalborg Universitet.



Kasper Reitzel er lektor ved Biologisk Institut, Syddansk Universitet
reitzel@biology.sdu.dk

Phosphat kan genindvindes fra spildevand ved hjælp af bakterier. Viden om, hvilke bakterier der kan optage og oplagre phosphat, deres levevis og deres betydning er vigtig for, at man kan optimere driftsbetingelserne for disse bakterier på renselanlæggene.

Biologisk fjernelse af phosphat på renselanlægge-
ne sker ved hjælp af en
særlig gruppe bakterier,
som kan optage store mængder
phosphat, hvis de rette driftsforhold
er til stede. Bakterierne optager
opløst phosphat fra spildevandet og
opbevarer det som lagre af lange
kæder af phosphat, kaldet polyphos-
phat. Dermed bindes en stor del af
spildevandets phosphat i biomas-
sen (kaldet det "aktive slam") uden
brug af kemikalier. Slammet kan
derefter direkte bruges som gød-
ning efter afvanding eller overføres
til rådnetank for biogasproduktion
og videre forarbejdning med henblik
på at genindvinde rent phosphat.

Phosphat i spildevand kan fore-
komme opløst, udfældet med Ca^{2+} ,

Mg^{2+} , Fe^{3+} og Al^{3+} , eller bundet i or-
ganiske forbindelser. Koncentratio-
nen af phosphat i dansk spildevand
er 5-10 mg P/l, og for at overholde
de gældende EU-regler må det ren-
sede spildevand højst indeholde til
0,5-1 mg P/l.

Den biologiske phosphatfjernelse
har flere fordele frem for kemisk
fældning. Først og fremmest skal
der ikke tilsættes kemikalier,
som er dyrt og giver anledning
til "kemisk slam", der fylder op i
renseanlægget. Dernæst bindes
phosphat på en måde i bakterie-
erne, som nemt kan genopløses
som phosphat i modsætning til
kemisk fældet phosphat. Det giver
en bedre biotilgængelighed som
gødning. Desuden kan phosphat
nemmere genindvindes som struvit

eller calciumphosphat (se artiklen
side 21), når slammet har været i
en rådnetank. I dag er der cirka 75
danske renselanlæg, som har hel
eller delvis biologisk phosphatfjer-
nelse, og de renses over halvdelen
af det danske byspildevand.

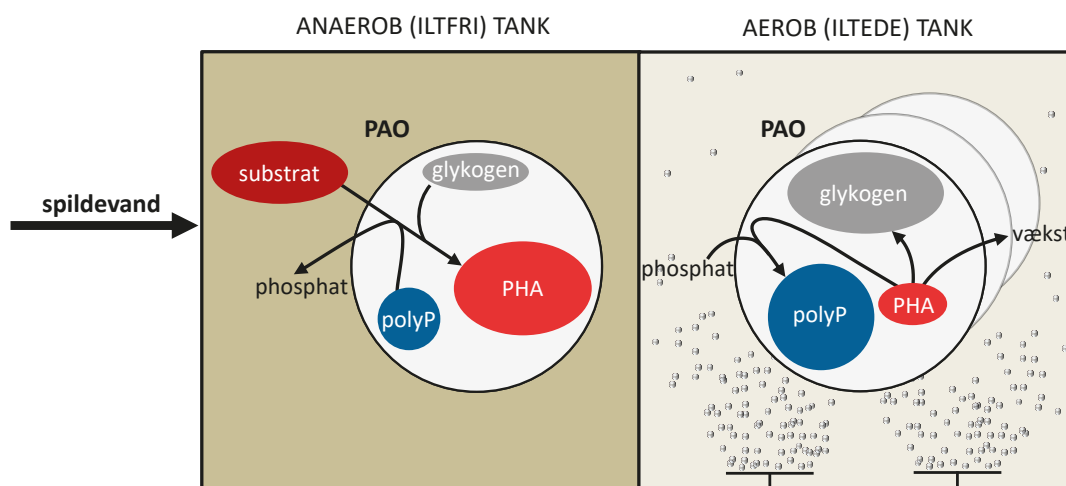
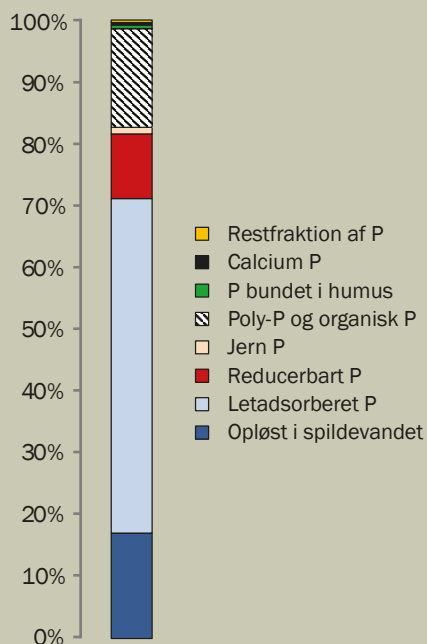
Særlige bakterier fjerner phosphat i renselanlæg

Nogle specielle bakterier, polyphos-
phat-akkumulerende organismer,
er ansvarlige for optag af store
mængder phosphat i biomassen.
Indtil for nyligt har vor viden om
identitet og karakteristika af disse
bakterier været meget sparsom.
Årsagen er, at man ikke kan isolere,
dyrke og studere dem i laboratorie-
t, da de, ligesom langt de fleste
bakteriearter i naturen, har særlige
vækstbetingelser, som endnu ikke

Sammensætningen af fosfatforbindelser

Figuren viser sammensætningen af fosfatforbindelser i indløbsspildevandet til Ejby Mølle rensesanlæg, Odense.

Det totale indhold er på cirka 10 mg P/l. Prøverne har gennemgået en række analyser, der samlet viser, hvorledes fosfat er bundet. Spildevandet indeholder en stor andel af opløst og meget let adsorberet fosfat, en organisk bundet fraktion og en fraktion bundet til reducerbart jern. Renseprocessen sikrer efterfølgende, at den relative andel af opløste og letadsorberede phosphater forsvinder og omdannes, mest til polyphosphat, i det aktive slam.



En stor del af den fosfat, som kommer ind med spildevandet, kan opsamles i visse bakterier som polyphosphat. Disse bakterier kaldes polyphosphat-akkumulerende organismer (PAO). Man kan sikre tilstedeværelse af disse organismer ved at skabe skiftende iltfri (anaerobe) og iltede (aerobe) forhold på rensesanlægge. I den anaerobe fase optager de substrat fra spildevandet og lagrer det, typisk som PHA. Energien hertil får de fra nedbrydning af polyphosphat og glykogen.

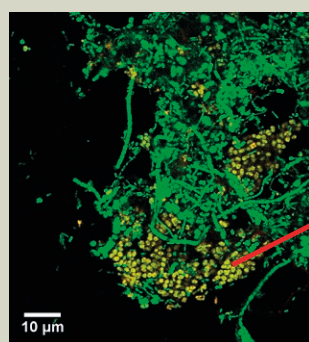
I den efterfølgende iltede fase, hvor der ikke er noget eksternt substrat til stede, optager de fosfat igen og vokser. Det sker ved at bruge PHA som energi- og kulstofkilde. Man høster dagligt biomasse med højt fosfatindhold fra den aerobe tank. Det kan direkte bruges som gødning på markerne eller kan overføres til rådnetanke, hvor polyphosphat frigives som fosfat og efterfølgende kan udfældes som struvit eller calciumfosfat.

er kendt. Vi kan derfor kun studere bakterierne i det aktive slam med indirekte metoder. For eksempel kan man identificere dem med DNA-baserede metoder, man kan visualisere dem med avancerede mikroskopimetoder, og man kan bruge en række forskellige teknikker, for eksempel isotoper, til at undersøge deres levevis.

De senere år har vi i MiDAS-projektet studeret mikrobiologien i danske rensesanlæg. Vi har fundet, at alle anlæg har en overraskende ens artssammensætning, og at der i et typisk anlæg findes 2.000-3.000 bakteriearter, hvoraf langt de fleste findes i meget små mængder. De vigtige bakterier, som er til stede i en mængde over

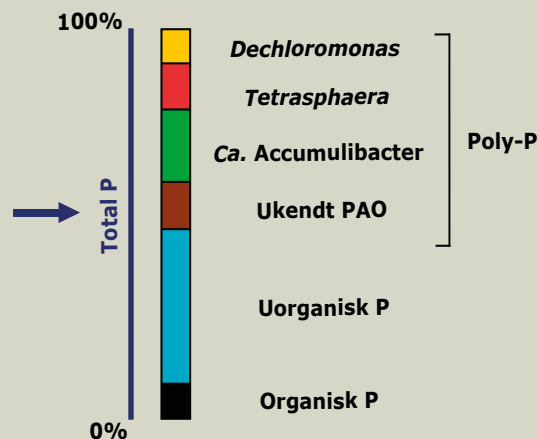
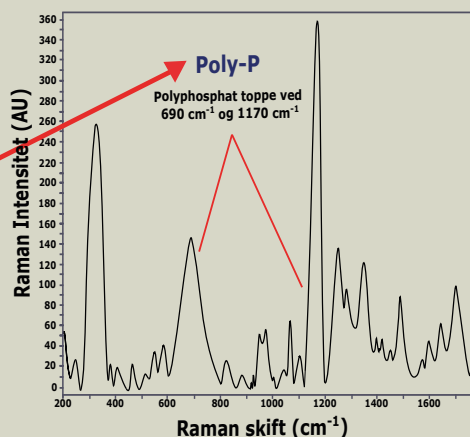
cirka 0,1%, udgøres af cirka 180 slægter og 200 arter. Vi har via ReCoverP-projektet fokuseret på at identificere og karakterisere nye polyphosphat-akkumulerende organismer, og vi kender nu 5 bakterieslægter, der har denne egenskab. De udgør samlet typisk 5-10 % af biomassen i anlæg med biologisk fosfatfjernelse.

Mængden af polyphosphat i bakterier



Ca. Accumulibacter fra Ejby Mølle renselanlæg

Enkelt celle



Mængden af polyphosphat i bakterier kan bestemmes med en kombination af teknikker kaldet FISH-Raman. Med en metode kaldet fluorescerende in situ hybridisering (FISH) kan man identificere og visualisere bestemte bakteriearter ved hjælp af særlige fluorescerende markører og fluorescensmikroskopi. Markørerne kræver, at man kender bakteriernes DNA-profil. Med Raman mikrospektroskopi kan man identificere og kvantificere bestemte kemiske stofgrupper direkte i de enkelte bakterieceller.

Ved at kombinere de to metoder kan man se, om de er polyphosphat-akkumulerende organismer ved at kvantificere deres indhold af polyphosphat og andre polymerer som PHA og glykogen under forskellige driftsforhold.

Figuren til højre viser, at cirka 50 % af al fosfat i det aktive slam findes som polyphosphat i polyphosphat-akkumulerende organismer, og resten findes primært som udfældede jern- og calciumphosphater.

At sikre tilstedeværelse af polyphosphat-akkumulerende organismer på renselanlæg kræver særlige driftsforhold: skiftende anaerobe (iltfrie) og aerobe (iltede) forhold, samt tilstedeværelse af organisk substrat under de anaerobe forhold. Disse organismer er nemlig ret unikke ved, at de er i stand til at optage og oplagre substrat under anaerobe forhold, som de så efterfølgende kan benytte til vækst, når ilt er tilstede. Renselanlæggene håndterer dette ved at have en tank, hvor slammet holdes anaerobt med tilførsel af spildevand i et par timer, hvorefter slammet føres over i en anden tank og iltes i et par timer. I den anaerobe fase optager de fleste polyphosphat-akkumulerende organismer kortkædede fedtsyrer (for eksempel eddikesyre), og oplagrer dem som energirige oplagsstoffer (poly-hydroxyalkanoater, PHA). Det koster energi, og den får bakterierne fra nedbrydning af deres oplagrede polyphosphat og glykogen, som begge er dannet i den tidligere aerobe fase. I den efterfølgende aerobe tank er der ikke

noget opløst substrat, da der ikke tilføres spildevand, så her forbruger de polyphosphat-akkumulerende organismer det oplagrede PHA til vækst og til at danne glykogen. Samtidig optager de opløst fosfat og danner nye lagre af polyphosphat. Dermed opkoncentreres der store mængder af fosfat i organismene, og det kan sammen med overskudsslammet høstes og overføres til rådnetank eller afvandes og benyttes som gødning.

Opdagelse af nye organismer

Indtil for nyligt har man anset en bestemt bakterieslægt, *Candidatus Accumulibacter*, for at være den dominerende polyphosphat-akkumulerende organisme i danske renselanlæg. Imidlertid har vi opdaget, at 2 andre slægter også er vigtige i de danske anlæg, nemlig *Dechloromonas* og *Tetrasphaera*. Da disse bakteriearter ikke nemt kan isoleres, har vi påvist, at de faktisk er polyphosphat-akkumulerende ved at kombinere to metoder direkte i det aktive slam. Den ene metode (kaldet FISH) benyttes til at mærke og

visualisere bestemte bakteriearter med fluorescensmikroskopi, mens den anden metode er en spektroskopimetode (kaldet Raman), som kan identificere og kvantificere bestemte kemiske stofgrupper direkte i de enkelte bakterieceller. Ved at kombinere de to metoder kan man kvantificere organismernes indhold af polyphosphat og andre polymerer under forskellige driftsforhold.

Det har vist sig, at *Candidatus Accumulibacter* og *Dechloromonas* har en levevis, der passer godt med den traditionelle forståelse af polyphosphat-akkumulerende organismer beskrevet ovenfor, hvorimod *Tetrasphaera* har en noget anden levevis. Bakterier i denne slægt foretrækker aminosyrer og kulhydrater som substrat. De akkumulerer ikke PHA eller glykogen, men kan fermentere kulhydrater og dermed også vokse i den anaerobe fase. De bruger tilsyneladende deres optag og akkumulering af fosfat i den aerobe fase som en ekstra energikilde, som de kan benytte under anaerobe forhold.



Fælles for de fleste polyphosphat-akkumulerende organismer er også, at de i varierende omfang er involveret i fjernelse af nitrogen fra spildevandet via denitrifikation, hvor de benytter nitrat som elektron-acceptor i stedet for ilt og danner lattergas (N_2O) eller dinitrogen (N_2). De er derfor vigtige for både fjernelse af fosfat og nitrogen i de danske renselanlæg.

Konkurrence mellem biologisk og kemisk fosfatfjernelse

På de danske renselanlæg har det hidtil været meget uklart, hvor stor en del af fosfatfjernelsen, der sker henholdsvis biologisk og kemisk. Vi har derfor udviklet en ny metode (baseret på NMR = kernemagnetisk resonans) til at kvantificere den totale mængde polyphosphat i det aktive slam. Når vi sammenholder disse tal fra de danske anlæg, kan vi se, at der typisk bindes 20-50 % af slammets totale fosfatindhold som polyphosphat via polyphosphat-akkumulerende organismer. Resten er kemiske udfældninger og fosfat bundet i det organiske materiale.

Hvis man for eksempel ser på sammensætningen af fosfat i aktivt slam fra Ejby Mølle renselanlæg, som har en god biologisk fosfatfjernelse, så indeholder slammet 37 g P/kg tørstof, hvor det meste er bundet som polyphosphat i polyphosphat-akkumulerende organismer. Her er *Candidatus Accumulibacter* vigtigst, men de andre nye polyphosphat-akkumulerende organismer bidrager også væsentligt til fjernelsen. Der findes endvidere stadig nogle polyphosphat-akkumulerende organismer, som er ukendte.

Resultaterne fra dette renselanlæg og en række andre danske anlæg viser, at en relativ stor andel af fosfat i det aktive slam findes på andre former end den foretrukne polyphosphat. Det kan delvis skyldes, at noget fosfat kommer ind på anlægget via spildevandet som udfældet fosfat (især jern og calcium) og forbliver på denne form. Denne del kan vanskeligt genindvindes som "rent" fosfat. En del fosfat

bliver imidlertid udfældet med jern eller aluminium på de fleste anlæg for at supplere den biologiske fjernelse, så man sikrer en lav udløbskoncentration af fosfat. Hvis den biologiske fjernelse og efterfølgende genanvendelse skal maximeres, skal disse kemikalietil sætninger derfor reduceres mest muligt fremover.

Optimering af biologisk fosfatfjernelse

En velfungerende biologisk fosfatfjernelse kan sikres ved, at renselanlægget er korrekt designet og driften optimal. Overvågning af mikrobiologien kan hjælpe med at sikre en god drift, da vi nu ved, hvilke bakterier der skal være til stede og i hvilke mængder. Vi er i gang med at udvikle DNA-baserede metoder til kontinuerlig analyse af deres tilstedeværelse, så det kan sikres, at de er til stede i rette mængder. Endvidere kan vor nye viden om deres levevis hjælpe til at sikre tilstedeværelse af det rette substrat (eddikesyre, aminosyrer og kulhydrater) i de rette tanke i anlæggene. ■

Videre læsning
Fernando, E.Y., S.J. McIlroy, M. Nierychlo, F.H. Alexander, F. Petriglieri, M.C. Schmid, M. Wagner, J.L. Nielsen, and P.H. Nielsen (2019): *Resolving the individual contribution of key microbial populations to enhanced biological phosphorus removal with Raman-FISH*. ISME J. doi.org/10.1038/s41396-019-0399-7.

Nielsen, P.H., S.J. McIlroy, M. Albertsen, M. Nierychlo (2019): *Re-evaluating the microbiology of the enhanced biological phosphorus removal process*. Current Opinion in Biotechnology 57: 111-118.

Staal, L.B., A.B. Petersen, C.A. Jørgensen, U.G. Nielsen, P.H. Nielsen, K. Reitzel (2019): *Extraction and quantification of polyphosphates in activated sludge from waste water treatment plants by ^{31}P NMR spectroscopy*. Wat. Res. doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.065.

Om MIDAS-projektet: midasfieldguide.org

Bliv studerende for en dag



Som **Studerende for en dag** følger du undervisningen på den uddannelse, du er interesseret i. Du spiser frokost med den studerende, som viser dig rundt, og så bliver du klogere på, om uddannelsen er den rigtige for dig.

Besøg Anvendt matematik, Biokemi og molekylær biologi, Biologi, Biomedicin, Datalogi, Farmaci, Fysik, Kemi, Matematik eller Matematik-Økonomi på SDU i Odense.

Tilmeld dig på sdu.dk/nat/studerendeforendag