

Ny metode til måling af polyfosfat i spildevandsslam

ReCoverP-projektet har nu været i gang i et år, og her præsenteres de første resultater af samarbejdet, hvor det netop er lykkedes at udvikle en metode, der specifikt kan identificere og kvantificere polyfosfater i spildevandsslam - ved brug af ^{31}P NMR spektroskopi.

Af Kasper Reitzel¹, Per Halkjær Nielsen^{2*}, Line Boisen Staal¹, Marta Nierychlo², Ulla Gro Nielsen³ og Charlotte Jørgensen¹

¹ Biologisk Institut, Syddansk Universitet

² Center for Microbial Communities, Institut for Kemi og Biovidenskab, Aalborg Universitet

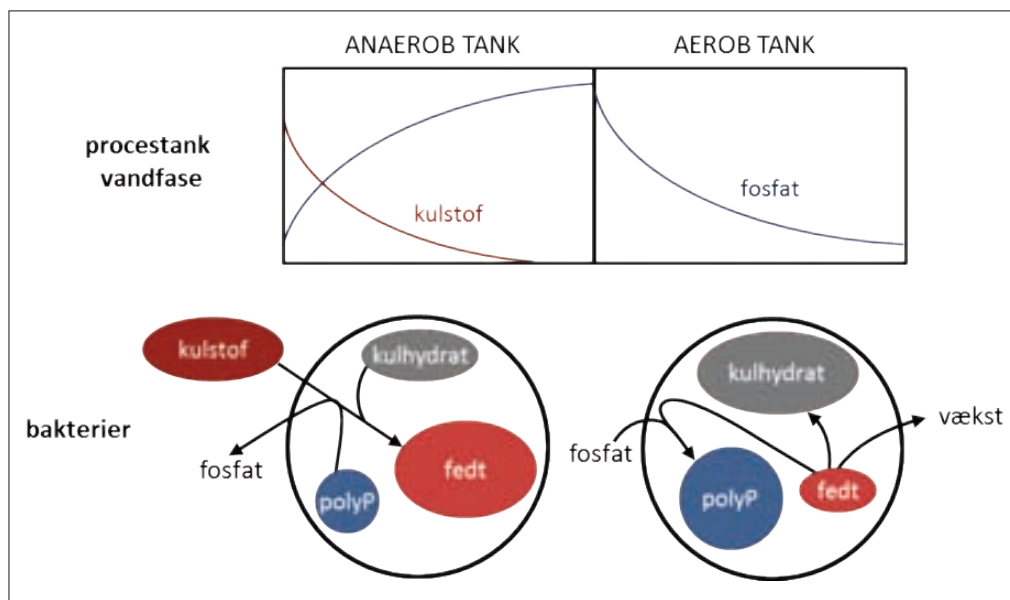
* Per Halkjær Nielsen er leder af projektet ReCoverP

³ Institut for Fysik, Kemi og Farmaci, Syddansk Universitet

Som beskrevet i et tidligere nummer af Dansk Kemi [1], er formålet med det fire-årige forskningsprojekt "ReCoverP" (bevilliget af Innovationsfonden), at foreslå en ny strategi til optimeret fosforgenanvendelse fra spildevandssystemer baseret på en bedre forståelse af fosforforbindelsernes sammensætning i spildevand, reneanlæg, overskudsslam og biogasreaktor.

En af de vigtigste forudsætninger for at kunne optimere genbrug af fosfor fra vores reneanlæg er, at vi kan identificere de

relevante fosforforbindelser i reneanlægget, og efterfølgende forstå de transformationer, som fosforen undergår i de forskellige deltrin gennem hele reneanlægget. Når vi kender betydningen af de forskellige processer for fosforformerne, samt de enkelte fosforformers anvendelighed til f.eks. gødning eller som råstof i industrien, vil det være muligt at optimere reneanlæggene, således at produktionen af genanvendeligt fosfor øges. Et af de første skridt i denne retning er at følge mængden og den kemiske speciering af fosfor i et reneanlæg ved at opstille en massebalance for anlægget. Dette er i sig selv en kompliceret øvelse, da det kræver, at man kender mængden af det fosforrige spildevand, opholdstiden af dette på anlægget, samt de processer, der undervejs påvirker fosforforbindelserne. Det kan være adsorption eller mikrobiel omdannelse i det aktive slam eller under bioforgasning, og det kan være udfældninger af f.eks. struvit i rørsystemerne. Et af delprojekterne i ReCoverP er således at lave en detaljeret fosformassebalance over et reneanlæg.



Figur 1. Biologisk fjernelse af fosfor i reneanlæg. En stor del af den P, som kommer ind med spildevandet, kan opsamles som polyfosfat i visse bakterier. Disse bakterier kaldes under et for polyfosfat-akkumulerende organismer (PAO). Man kan berige mængden af PAO ved at udsætte dem for skiftende iltfri (anaerobe) og iltede (aerobe) forhold på reneanlæggene. I den anaerobe fase optager de substrat (kulstof) fra spildevandet og lagrer det som fedt. Energien får de fra nedbrydning af polyfosfat og kulhydrater. 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 fedt som energi- og kulstofkilde. Man høster dagligt biomasse med højt P-indhold fra den aerobe tank. Det kan direkte bruges som gødning på markerne, eller det kan overføres til rådnetanke (biogasanlæg), hvor polyfosfat frigives som fosfat og efterfølgende kan udfældes som f.eks. struvit.

Hvordan følges fosforstrømmen?

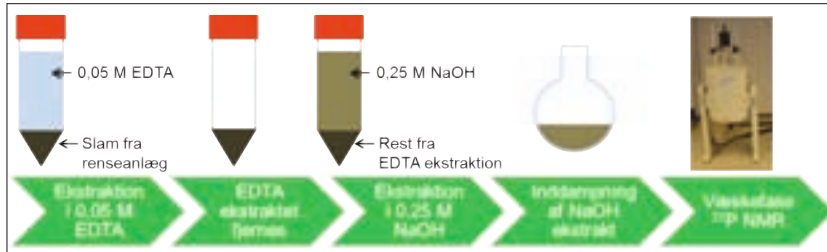
For at kunne følge fosforstrømmen gennem reneanlægget, skal vi kunne identificere og kvantificere de vigtigste fosforforbindelser i spildevandet undervejs. Tidligere undersøgelser af aktivt slam fra reneanlæg har vist, at fosfor især findes som frit fosfat, calcium- og jernfosfater, organisk-bundet fosfat og polyfosfater. Specielt polyfosfater forekommer i store mængder (>30% af total P) i anlæg med biologisk fosforfjernelse. Disse polyfosfater dannes under iltede forhold ud fra frit fosfat i spildevandet af særlige bakterier, de såkaldt polyfosfat-akkumulerende organismer (PAO'er). Denne polyfosfat kan frigives som fosfat fra PAO'erne under iltfrie forhold, figur 1.

Polyfosfater er formentlig en af de vigtigste fosforforbindelser i reneanlæggene, da man potentielt kan styre dannelsen og nedbrydningen af polyfosfater ved f.eks. at ændre på iltkoncentrationen og substrat. Derved bliver det muligt

at frigøre en masse fosfat under kontrollerede forhold, som efterfølgende kan udfældes som f.eks. struvit og derefter genbruges. I Danmark er der i dag et par renselanlæg, som udnytter denne proces og flere kommer til i de kommende år.

Identifikation af polyfosfater

Historisk set har der været anvendt mange forskellige metoder til identifikation af polyfosfater i biologiske matricer, som søsedimenter, jord og spildevandsslam [2].



Figur 2. Metode til polyfosfatidentifikation ved brug af ekstraktion og væskefase ^{31}P NMR spektroskopi. De forskellige trin i metoden er illustreret med grønne pile.

Af metoder kan bl.a. nævnes ekstraktion i 100°C varmt vand, mange forskellige sekventielle ekstraktionsmetoder, anvendelse af polyfosfatspecifikke enzymer, samt fluorescerende farvning af polyfosfat med f.eks. 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI). Desværre er mange af disse metoder behæftet med forholdsvist store usikkerheder, da polyfosfat enten ikke identificeres entydigt, men bestemmes operationelt uden at teste effektiviteten af de forskellige ekstraktionsmetoder, eller da metoderne påvirkes af matricen eller polyfosfatlængden.

En af de mest lovende metoder til identifikation af polyfosfater er ^{31}P NMR spektroskopi (^{31}P NMR), der foruden identifikation af polyfosfater også bruges til at bestemme andre typer af fosfater, som f.eks. fosfor bundet i DNA, lipider og sukkerforbindelser. Væskefase ^{31}P NMR har været anvendt i størsteparten af de publicerede undersøgelser af polyfosfat i biologiske matricer. Her bliver matricen som regel ekstraheret i en NaOH-opløsning, der ofte kombineres på forskellige måder med EDTA, der kompleks-binder metalioner, og derved øger kvaliteten af ^{31}P NMR-spektrret. Man har længe vidst, at væskefase ^{31}P NMR kunne bruges til specifikt at identificere polyfosfat. Men da man er afhængig af en ekstraktion, har det været et åbent spørgsmål, hvorvidt al polyfosfat i den biologiske matrice bliver ekstraheret, og om der evt. sker kemisk omdannelse af polyfosfaten i opløsningen.

Vi har derfor udviklet og testet en ^{31}P NMR-metode til bestemmelse af polyfosfat i spildevandsslam, hvor de overordnede krav til metoden har været:

1. Høj ekstraktionseffektivitet af polyfosfat i slammet.
2. Begrænset kemisk omdannelse af polyfosfat under ekstraktion.
3. Høj kapacitet af analysemetoden.

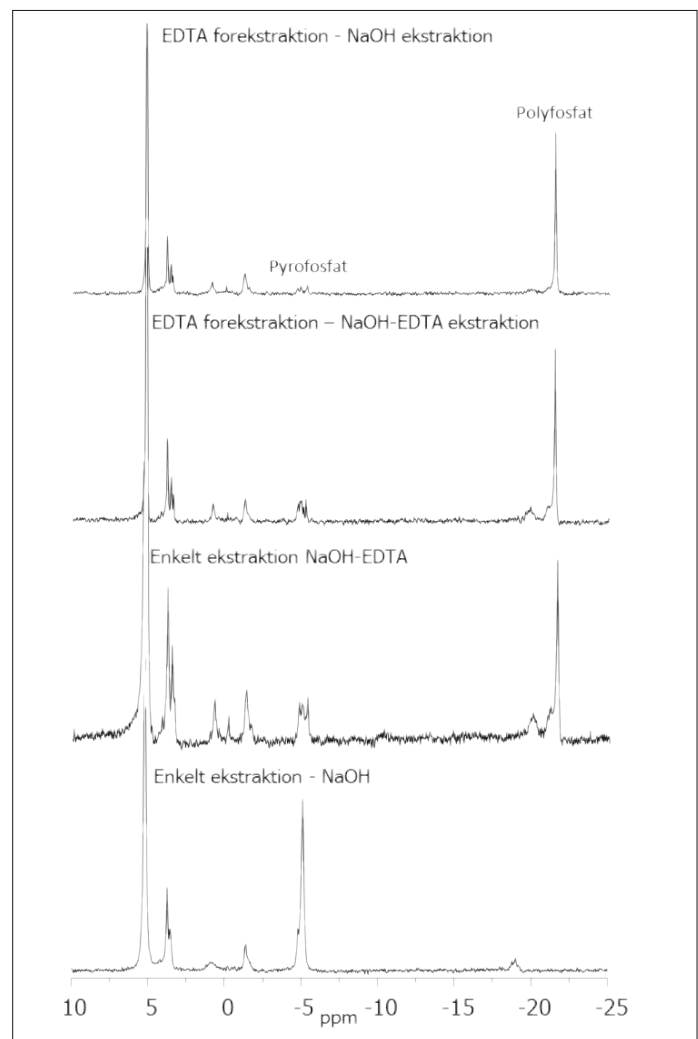
Design af ^{31}P NMR-metode til bestemmelse af polyfosfat i spildevandsslam

Vores udgangspunkt for udvikling af metoden til bestemmelse af polyfosfat, var, at vi ønskede at anvende væskefase ^{31}P NMR. Det gjorde vi da:

- 1) væskefase ^{31}P NMR-spektre har betydeligt højere opløsning end faststof ^{31}P NMR-spektre.
- 2) resonanserne fra polyfosfat og aluminiumfosfater har samme kemiske skiftområde i faststof ^{31}P NMR-spektrret, og de kan derfor være svære at adskille og
- 3) man kan analysere flere prøver med væskefase ^{31}P NMR (ca. tre timer pr. prøve) end med faststof ^{31}P NMR (24-48 timer pr. prøve).

For at optimere og udvikle en specifik ^{31}P NMR-metode til identifikation af polyfosfater i spildevandsslam startede vi derfor med at teste forskellige ekstraktionsmetoder, der tidligere har været anvendt til ekstraktion af organisk fosfor samt uorganiske polyfosfater. Resultatet var, at den største mængde af langkædede polyfosfater blev ekstraheret, hvis vi for-ekstraherede vores slam i 0,05 M EDTA og efterfølgende ekstraherede slammet i 0,25 M NaOH, figur 2. Undlod vi f.eks. at bruge for-ekstraktionen med EDTA blev de langkædede polyfosfater nedbrudt til pyrofosfat, figur 3. Ekstraktionseffektiviteten ved brug af EDTA efterfulgt af NaOH var ca. 50% af den totale fosformængde i slammet. Det betyder, at vi ud fra væskefase ^{31}P NMR-analysen ikke kan vide, om der er mere uidentificeret polyfosfat tilbage i slammet, eller om en del af polyfosfaten nedbrydes til f.eks. fosfat i NaOH-ekstraktet. Derfor valgte vi at kombinere vores væskefase ^{31}P NMR-analyse med faststof ^{31}P MAS NMR. Det gav os mulighed for at kvantificere den totale mængde af langkædede polyfosfater i slammet uden forudgående potentiel

destruktiv behandling af slammet i NaOH. Derudover testede vi også, hvordan for-ekstraktionen i EDTA påvirkede forekomsten af langkædede polyfosfater, figur 4, side 26.



Figur 3. Forskellige væskefase ^{31}P NMR-spektre af aktivt slam. Figuren viser, hvordan polyfosfattoptoppen ved ca. -22 ppm mindskes kraftigt og omdannes til pyrofosfat, hvis der ikke anvendes en for-ekstraktion i EDTA. NMR-spektrene er optaget på et 200 MHz NMR spektrometer.

De første resultater fra faststof ^{31}P NMR analysen indikerede, at kun omkring 40% af polyfosfaterne blev ekstraheret med NaOH, eller at en stor del af polyfosfaten blev nedbrudt til bl.a. fosfat i vores NaOH-ekstrakt. Ved nærmere undersøgelser fandt vi dog, at en stor del af fosforen i slammet ikke blev observeret i faststof ^{31}P MAS NMR-spektret, da denne del af fosforen var bundet i uorganiske jern-fosfater (f.eks. strengit), der på grund af jernets magnetiske egenskaber ikke observeres inden for det normale spektralvindue (-500 til 500 ppm) [3]. Dette er et kendt problem i jordøkologien, og kan omgås ved at sammenligne intensiteten, vi observerede i faststof

^{31}P MAS NMR-spektrene med et spektrum af en fosfatstandard med et kendt fosforindhold [4]. Fra ^{31}P MAS NMR-spektret af fosfatstandard blev den signalintensitet, man kan forvente af en kendt mængde fosfor, fundet. Ved sammenligning af den forventede signalintensitet med den aktuelle signalintensitet i ^{31}P faststof NMR-spektrene så vi, at der "manglede" intensitet i NMR-spektrene. Andelen af "usynligt" fosfor i faststof ^{31}P MAS NMR-spektrene var lineært korreleret med jernindholdet i prøven. Det betyder, at det, som vi troede udgjorde 100% af vores fosfor i NMR-spektret, rent faktisk kun udgjorde en mindre andel, og at vi derfor overestimerede mængden af polyfosfat i vores faststof ^{31}P NMR-prøver. Ved at korrigere vores ^{31}P MAS NMR-spektre for den "usynlige fosfor" fandt

vi, at den totale polyfosfatmængde fundet ved faststof ^{31}P MAS NMR-spektroskopi, var identisk med polyfosfatmængden fundet med væskefase ^{31}P NMR spektroskopi. Det viser, at al polyfosfat bliver ekstraheret fra slammet og at polyfosfaten ikke undergår kemisk omdannelse i NaOH-ekstraktet.

Yderligere test af slammet

Som tidligere beskrevet kan man ikke være sikker på, at signalet omkring -25 ppm i faststof ^{31}P MAS NMR-spektret kun er signaler fra polyfosfater, da man også vil forvente at finde signaler fra aluminiumfosfater i dette område. Derfor blev det testet, hvorvidt hele signalet fra -25 ppm kommer fra polyfosfater. Det blev gjort ved at vaske slammet i vand og hexanol. Denne metode anvendes i jordøkologien til at bestemme mikrobielt fosfor, da hexanolen åbner og ødelægger de mikrobielle cellevægge, så den mikrobielle fosfor frigives fra biomassen. Som det ses af figur 4, forsvinder hele polyfosfattoptoppen, efter at slammet er blevet ekstraheret i hexanol. Dette viser, at der ikke er noget forstyrrende signal fra aluminiumfosfater, og at vi derfor kan bruge resultatet fra faststof ^{31}P NMR til at kvantificere den totale mængde af polyfosfater og derved verificere vores væskefase ^{31}P NMR-metode. Udover at bruge metoden til at identificere og kvantificere polyfosfat i slam kan metoden også bruges med henblik på at beskrive relevante processer. Således blev metoden brugt til at undersøge indholdet af polyfosfat i bakterierne før og efter den anerobe frigivelse af fosfat fra det aktive slam. Det viste, at bakteriebiomassen frigav en fosfatmængde næsten tilsvarende den totale polyfosfatmængde, der blev fundet vha. ^{31}P NMR spektroskopi, hvilket betyder, at disse bakterier stort set udskiller alle polyfosfater under anerobe forhold.

Med metoden til identifikation og kvantificering af polyfosfater på plads, er næste skridt nu at gå videre med analyserne af fosforsammensætningen på udvalgte danske renselanlæg.

Yderligere information

Foruden danske og udenlandske universiteter deltager udvalgte danske forsynings og rådgivere for at sikre, at den nye viden kommer det danske samfund til gode, både via forbedrede teknologier til fosforgenbrug og via nye arbejdspladser i forbindelse med en øget konkurrenceevne på det globale marked. Ønskes mere information om ReCoverP projektet henvises til hjemmesiden <http://www.en.bio.aau.dk/recoverp>.

Tak

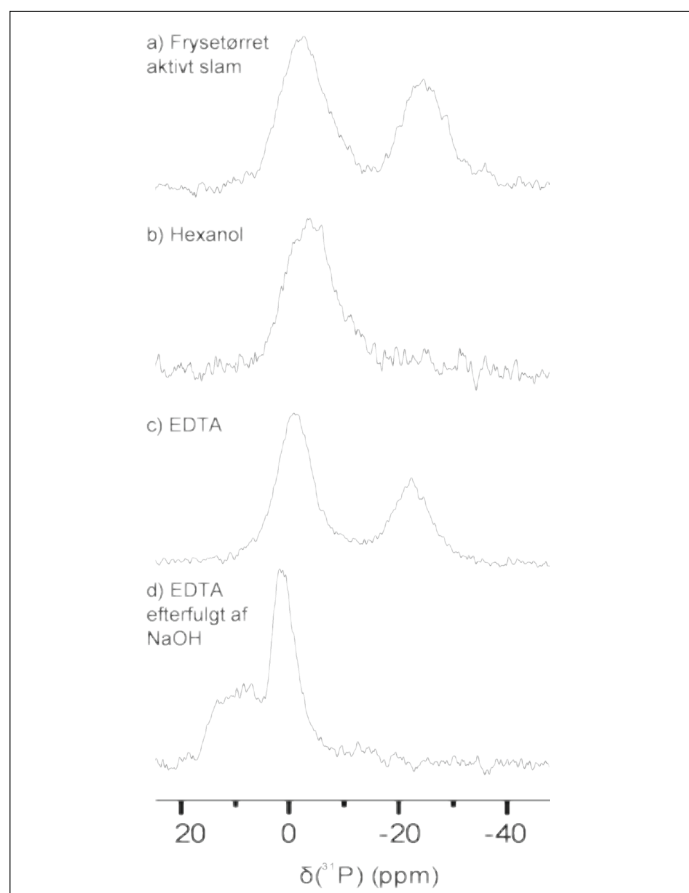
Projektet har modtaget økonomisk støtte fra Innovationsfonden. Derudover støttes Ulla Gro Nielsen af et Villum Young Investigator Fellowship.

E-mail:

Kasper Reitzel: reitzel@biology.sdu.dk

Litteratur

1. Reitzel, K., Nielsen, P.H., Christensen, M.L., Qu, H., Wimmer, R., Nierychlo, M., Jørgensen, C. & U.G. Nielsen (2015). ReCoverP – genvinding af fosfor fra spildevandsslam. *Dansk Kemi* 6: 25-27.
2. Hupfer, M., Gloss, S., Schmieder, P. and Grossart, H.P. (2008). Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments. *International Review of Hydrobiology* 93(1), 1-30.
3. Kim, J., D.S. Middlemiss, N.A. Chernova, B.Y.X. Zhu, C. Masquelier and C.P. Grey (2010). "Linking Local Environments and Hyperfine Shifts: A Combined Experimental and Theoretical ^{31}P and ^{7}Li Solid-State NMR Study of Paramagnetic Fe(III) Phosphates". *Journal of the American Chemical Society* 132(47): 16825-16840.
4. Dougherty, W.J., R.J. Smernik and D.J. Chittleborough (2005). "Application of spin counting to the solid-state P-31 NMR analysis of pasture soils with varying phosphorus content". *Soil Science Society of America Journal* 69(6): 2058-2070.



Figur 4. ^{31}P faststof MAS NMR-spektre af:

- a) Frysetørret aktivt slam fra Ejby Mølle Renselanlæg
 - b) Hexanol-ekstraheret aktivt slam fra Ejby Mølle Renselanlæg
 - c) EDTA-ekstraheret aktivt slam og
 - d) Aktivt slam ekstraheret med EDTA efterfulgt af NaOH.
- Det ses, hvordan signalet fra polyfosfat omkring -25 ppm ligger adskilt fra de øvrige signaler (a), og at hexanolekstraktion fjerner hele polyfosfatsignalet (b). EDTA-ekstraktion ændrer ikke mængden af polyfosfat (c), hvorimod NaOH-ekstraktion fjerner al polyfosfat fra faststof NMR-spektret (d). Spektrene er optaget på et 600 MHz NMR-spektrometer. Figuren viser ^{31}P kemisk skift området.