

Nye metoder til optimering af avanceret kvælstoffjernelse

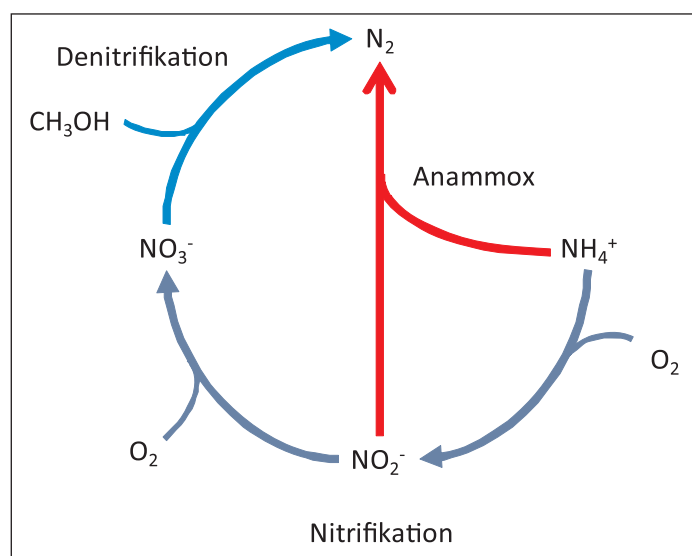
Moderne vandrensingsprocesser stiller endnu højere krav til effektivitet. Anaerob ammonium-oxidation (anammox) er en effektiv biologisk proces til kvælstoffjernelse, men kræver forbedret kontrol af processen. Nye molekylærbiologiske målemetoder giver bedre indblik i de bakterier, der ligger til grund for processen og åbner et vindue til den "sorte boks"

Af Aaron Marc Saunders, mikrobiolog, ph.d., Teknologisk Institut

To af de mikrobiologiske processer som katalyserer omsætningen af kvælstof i naturen – nitrifikation og denitrifikation (figur 1) blev opdaget allerede i 1880'erne og er siden blevet grundigt undersøgt. Det var derfor en banebrydende opdagelse, da en ny og hidtil ukendt proces for omsætning af kvælstof blev opdaget i 1986. Anaerob ammonium-oxidation (anammox), dvs. kvælstofoxidation uden iltforbrug, har vist sig at drive op mod 70% af kvælstofomsætningen i havet - dermed er hovedparten af den luft vi indånder blevet udåndet af en anammox-bakterie. Danske forskere har oven i købet været med i forreste række af disse opdagelser [1,2].

En ny vandrensingsproces

Anammox-processen er en genvej ift. konventionelle processer for kvælstoffjernelse (figur 1) og kan benyttes i nye vandrensingsprocesser, som er billigere i drift. I sammenligning med normal nitrifikation/denitrifikation – som f.eks. bruges i de fleste kommunale renselanlæg – kan driftsomkostningerne reduceres med op til 90%. Reduktionen skyldes, at anammox kræver 50% mindre ilt og dermed spares beluftning, hvilket typisk er den dyreste del af driften. Derudover er det i mange tilfælde i konventionelle anlæg nødvendigt at tilsætte en supplerende kulstofkilde – ofte methanol – for at få denitrifikationen til at køre, hvilket er endnu en udgift.



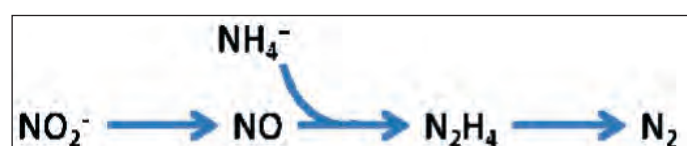
Figur 1. Konventionel kvælstoffjernelse omsætter NH_4^+ til NO_2^- og NO_3^- gennem nitrifikation og NO_3^- til N_2 ved brug af kulstof, f.eks. methanol, gennem denitrifikation. Anammox kortslutter processen ved at kombinere NO_2^- og NH_4^+ til N_2 og dermed spares O_2 og kulstof.

Der ligger en udfordring i, at anammox-bakterier gror langsomt – de fordobler sig kun hver 12.-14. dag. Andre bakterier som f.eks. *E. coli* fordobler sig hvert 20. minut. Anammox-bakterier kræver desuden kun simple, uorganiske forbindelser: ammonium, nitrit og kuldioxid. Processen er derfor bedst egnet til behandling af spildevand, som har meget ammonium og kun lidt organisk kulstof, hvor anammox ikke skal konkurrere med andre og hurtigere voksende bakterier, der kræver organisk kulstof.

Anammox har også en potentiel rolle i klimaindsatsen, ikke direkte – selv om processen forbruger CO_2 – men fordi spildevand fra den voksende biogasindustri er velegnet til behandling med anammox. Det første fuldskala anammox-renseanlæg blev bygget i Rotterdam, Holland, og siden er adskillige andre sat i drift.

Anammox-bakterier er underlige – og svære at undersøge

Ud over deres signifikans i den naturlige og industrielle kvælstofomsætning har anammox bakterier mange karakteristika, som gør dem interessante. De har unikke interne strukturer, bl.a. en form for cellekerne, hvilket normalt kun findes i de "højere" organismer som planter og dyr. Kemien af anammox-reaktionen er også bemærkelsesværdig, idet et mellemlid i reaktionen er hydrazin, der også bruges som brændstof i raketter (figur 2).



Figur 2. Kæden af reaktioner som katalyseres af anammox-bakterier. Hydrazin (N_2H_4), ellers brugt som et brændstof i raketter, dannes som et mellemlid i processen.

Anammox-bakterier er ligesom mange andre bakterier fra det omgivende miljø svære at undersøge, da de ikke kan dyrkes på normal vis, f.eks. på en agarplade. Med omhyggelig processtyring kan de opformeres i anammox-anlæg, men det tager ofte mange måneder pga. deres langsomme vækst.

De kan dog identificeres og tælles ved anvendelse af molekylære metoder. Disse metoder identificerer bakterier baseret på sekvensen af deres DNA – da hver art har en unik DNA-sekvens. Der er typisk omkring 10 mia. bakterier i et gram slam fra et renselanlæg, fordelt på hundredvis af forskellige arter, hver med deres unikke DNA-sekvens. Det er derfor en udfordring at skelne mellem de forskellige sekvenser og specifikt detek-

PCR bruges til hurtig måling af bakterier

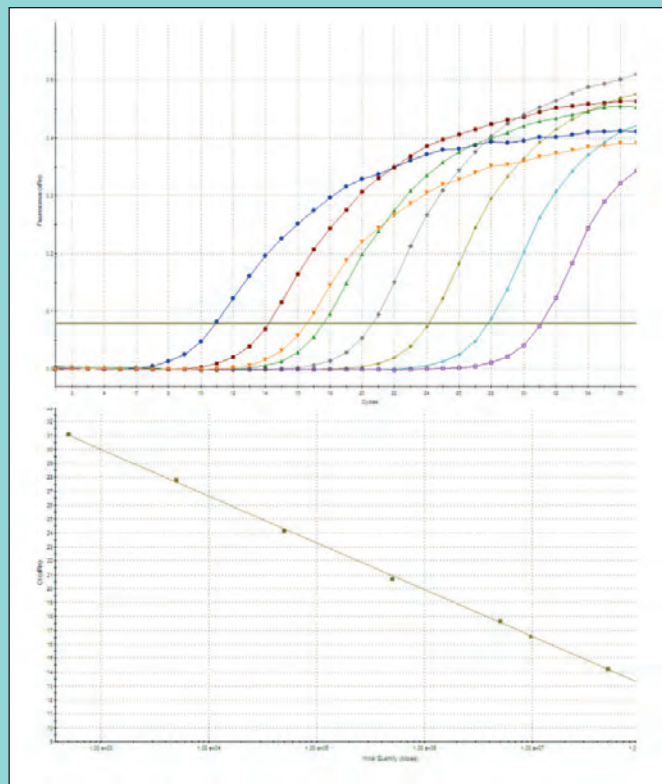
Hver bakterieart har en unik DNA-sekvens, og det er derfor muligt at designe genprober, som binder sig til bestemte steder på bakteriernes gener. Polymerase chain-reaction (PCR; figur 4) er en enzymatisk kopiering af det stykke DNA, der sidder mellem to sådanne genprober. Herved får man en kopi af et ganske bestemt stykke DNA - udvalgt mellem de millioner af andre DNA-sekvenser, der er til stede i prøven. Denne kopiering gentages cirka 30 gange med en fordobling af antallet af det specifikke DNA i hver cyklus – resultatet er en kædereaktion med eksponentiel opformering af det udvalgte stykke DNA.

Når en prøve ankommer til laboratoriet foretages først en kemisk oprensning af alt DNA fra alle bakterier i prøven. Dernæst udføres en PCR med genprober specifikke for de bakterier, man vil detektere. Hvis disse er til stede, kan man detektere et produkt – de mange amplificerede DNA-stykker.



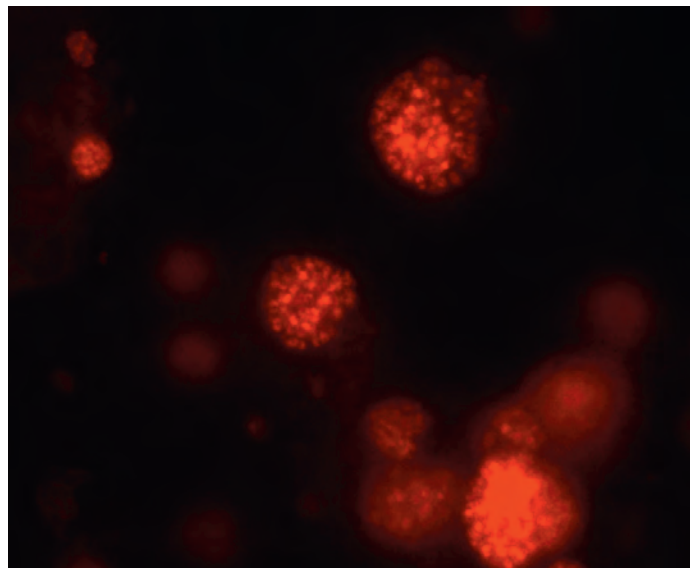
Figur 4. Genprober binder specifikt til en bestemt DNA, som så kan kopieres specifikt med et polymerase-enzym.

I kvantitativ PCR (qPCR) måler man dannelsen af det specifikke stykke DNA (f.eks. med fluorescens) løbende gennem PCR-reaktionen. Jo flere bakterier der er i prøven, jo færre amplifikationscykler vil det tage, før det specifikke produkt kan måles (figur 5). Prøverne sammenlignes med en standardkurve for prøver med kendte koncentrationer.



Figur 5. Antallet af PCR-cykler, som kræves for at kunne måle på et produkt, er proportionalt med startkoncentration. Prøven (orange diamant) bliver derefter sammenlignet med kendte standarder (andre farver).

tere dem, man kigger efter. En hyppigt anvendt metode er en "molekylær farvning" af celler, en såkaldt "FISH"-farvning. Her bruges der genprober med fluorescensmærkning, som kun binder til molekylerne i celler, der har en unik gensekvens, og metoden kan dermed anvendes til at identificere f.eks. anammox-bakterier (figur 3). FISH er foretrukket i bestemte typer undersøgelser, især hvis man skal se, hvordan bakterierne er rumligt arrangeret med andre bakterier, f.eks. i en biofilm.



Figur 3. Anammox-bakterier i havbundssediment identificeret med fluorescerende genprober.

Kan måles hurtigt med ny metode

En teknologi der kaldes kvantitativ PCR (qPCR – se boks) er hurtigere og bedre egnet til rutinemæssige analyser end FISH. PCR bruges på hospitaler til at detektere adskillige vira, f.eks. HIV og hepatitis, og bakterier som klamydia og salmonella. PCR bruges også, når retsmedicinere skal identificere en gerningsmand vha. DNA-spor. Her er det dog et menneskes DNA, der undersøges, i stedet for bakteriernes. Teknologisk Institut har tidligere brugt qPCR til undersøgelse af bakterier i de omgivende miljø, bl.a. til at spore kilder til fækal forurening i drikkevandet [3].

Forskning i Japan [4] har dannet basis for at anvende qPCR til analyse af anammox-bakterier. Denne metode er nu i brug på Teknologisk Institut for at give indblik i væksten af disse ellers svært målbare bakterier. Metoden er følsom, men har vist sig at være specifik på trods af de mange øvrige bakterier i slamprøver og potentiale for andre forstyrrende stoffer i spildevandet. Metoden anvendes nu til monitorering af mikrobiologien under opstart af anammox-pilotanlæg.

E-mail-adresse:

Aaron Marc Saunders: aaron.saunders@teknologisk.dk

Referencer

1. Thamdrup B. & Dalsgaard T. (2002) Production of N_2 through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1312–1318.
2. Revsbech NP, Risgaard-Petersen N, Schramm A, Nielsen LP. (2006) Nitrogen transformations in stratified aquatic microbial ecosystems. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 90 (4):361-75.
3. Skovhus TL, Wejse P, Saunders AM, Bastholm S og Roslev P. (2006) Ny DNA-metode sporer bakterier i drikkevand. *Dansk Kemi.* 87, nr. 8.
4. Tsuchida I, Kindaichi T, and Okabe S. (2007) Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Research.* 41:785-94.