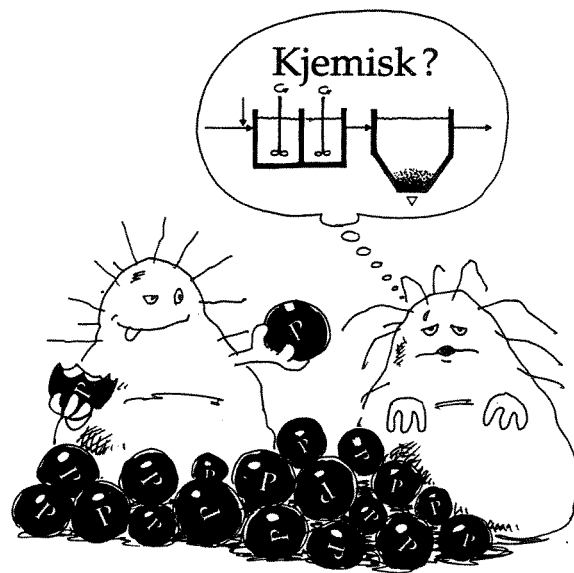


RAPPORT LNR 3373-95

**P**rosessutforming for  
biologisk fosfor- og  
nitrogenfjerning; et  
mikrobiologisk grunnlag



**U**tvikling av norsk kompetanse  
innen biologisk fosfor- og  
nitrogenfjerning

DELRAPPORT III

# NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Prosjektnr.: Undernr.:

O-94144

Løpenr.. Begr. distr.:

3373-95.

#### Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås  
0411 Oslo  
Telefon (47) 22 18 51 00  
Telefax (47) 22 18 52 00

#### Sørlandsavdelingen

Televeien 1  
4890 Grimstad  
Telefon (47) 37 04 30 33  
Telefax (47) 37 04 45 13

#### Østlandsavdelingen

Flute 866  
2312 Ottestad  
Telefon (47) 62 57 64 00  
Telefax (47) 62 57 66 53

#### Vestlandsavdelingen

Thormøhlensgt 55  
5008 Bergen  
Telefon (47) 55 32 56 40  
Telefax (47) 55 32 88 33

#### Akvaplan-NIVA A/S

Søndre Tollbugate 3  
9000 Tromsø  
Telefon (47) 77 68 52 80  
Telefax (47) 77 68 05 09

Rapportens tittel:

Prosessutforming for biologisk fosfor- og nitrogenfjerning; et mikrobiologisk grunnlag. Delrapport III

Dato:

14/12/95

Trykket:

NIVA

Faggruppe:

Forfattere:

Norgaard, Erik  
Mørkved, Kristin

Geografisk område:

Antall sider:

51

Opplag:

50

Oppdragsgiver:

Fylkesmannens miljøvernavdeling i Aust-Agder

Oppdragsg. ref.:

Ekstrakt:

Rapporten beskriver de mikrobiologiske prosessene som utnyttes i biologiske renselanlegg og diskuterer betydningen som ulike miljøparametre har på disse prosessene.

Det legges vekt på prosessene som er involvert i nitrogen- og spesielt fosforfjerning. Modellen til Comaeu/Wentzel er brukt for å gi en biokjemisk forklaring på fenomenet biologisk fosforfjerning (bio-P prosesser).

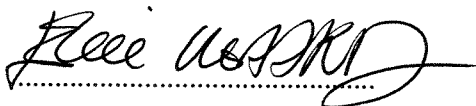
4 emneord, norske

1. Mikrobiologi
2. Fosforakkumulering
3. Avløpsvannrensing
4. Seleksjon

4 emneord, engelske

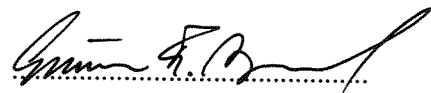
1. Microbiology
2. Phosphorous accumulation
3. Waste water treatment
4. Selection

Prosjektleder



Erik Norgaard

For administrasjonen



Gunnar Fr. Aasgaard

ISBN 82-577-2902-7

O-94144

Prosessutforming for biologisk fosfor- og nitrogenfjerning;  
et mikrobiologisk grunnlag

Delrapport III

Grimstad, 15. august 1995

Prosjekleder:	Erik Norgaard
Medarbeidere:	Kristin Mørkved
	Bjørnar Nordeidet
	Gunnar Fr. Aasgaard

# Forord

Grimstad kommune bygger Norges første renseanlegg som benytter biologiske prosesser til å fjerne både fosfor og nitrogen. Miljøverndepartementet har gitt en økonomisk håndrekning til prosjektet i form av tilskudd på over 20 millioner kr. Deltakere i prosjektgruppen er Norwet, Reid Crowther (Canada) og Asplan Viak Sør. Reid Crowther har gjennomført prosessdesign og beregninger av den biologiske prosessen. Norwet står som prosessansvarlig. Groos renseanlegg (RA) vil få status som et forsknings- og undervisningsanlegg. Kirke-, utdannings- og forskningsdepartementet har gitt Høgskolen i Agder et tilskudd på 4 millioner kroner som bl.a. skal anvendes til etablering av et pilot anlegg etter modell av fullskala-anlegget i skala 1 : 200.

Det er i forbindelse med etablering av Groos RA at prosjektet: *Utvikling av norsk kompetanse innen biologisk fosfor- og nitrogenfjerning er gjennomført*. Prosjektet har i første rekke vært et utredningsprosjekt hvor en gjennom innsamling av litteratur og dokumentasjon/erfaring fra ulike anlegg i drift har bygget opp en kompetansebase innen fagtemaene, aktuelle anleggsutforminger for Bio-P/N-anlegg, styring av Bio-P/N anlegg og slam fra Bio-P/N anlegg.

Norsk institutt for vannforskning (NIVA) har på oppdrag fra miljøvernavdelingen hos Fylkesmannen i Aust-Agder vært ansvarlig for prosjektgjennomføringen.

Miljøvernavdelingen har vært representert med Bjørn Arne Mølland som har ledet prosjektets styringsgruppe med følgende medlemmer i tillegg:

*Bjørn Kristian Pedersen, Miljøvernrådgiver i Grimstad kommune*

*Torbjørn Borgeraas, Avdelingsrådsleder v/HiA, Kjell E. Skaug Høgskolelektor v/HiA*

*Gunnar Fr. Aasgaard, Forskningssjef i NIVA*

*Oddvar Lindholm, Seksjonsleder SFT*

Prosjektmedarbeidere i NIVA har vært:

*Erik Norgaard, prosjektleder*

*Bjørnar Nordeidet*

*Kristin Mørkved*

*Gunnar Fr. Aasgaard.*

Grimstad 15. august 1995

Erik Norgaard

# INNHALDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG .....	7
<b>1. PROSESSKUNNSKAP OM BIOLOGISK FOSFOR OG NITROGENFJERNING .....</b>	<b>8</b>
1.1 BAKTERIER .....	8
1.2 SUBSTRATER, ENERGIKILDER OG MILJØ.....	9
<i>Substrater</i> .....	9
<i>Energi</i> .....	9
1.3 SELEKSJONSPRESS / BAKTERIETILPASNING .....	11
<i>Elektronakseptor</i> .....	11
<i>Substrat</i> .....	11
<i>Sedimenteringsegenskaper</i> .....	11
<i>Temperatur</i> .....	11
<i>Veksthastighet</i> .....	11
1.4 BAKTERIELL OMSETNING I RENSEANLEGG .....	12
<i>Hydrolyse</i> .....	12
<i>Celledød</i> .....	13
<i>Cellevekst</i> .....	13
<b>2. AEROB OMDANNING AV ORGANISK STOFF.....</b>	<b>14</b>
2.1 VEKSTKINETIKK .....	14
<i>Cellevekst</i> .....	14
<i>Utbytte</i> .....	15
<i>Aerob stoffomsetning</i> .....	16
2.2 FAKTORER SOM PÅVIRKER AEROB OMDANNING AV ORGANISK STOFF.....	16
<i>Temperatur</i> .....	16
<i>Oppløst molekylært oksygen</i> .....	17
<i>pH</i> .....	17
<i>Giftstoffer</i> .....	18
<i>Nitrogen og fosfor</i> .....	19
2.3 REAKSJONSKONSTANTER FOR AEROB HETEROTROF OMSETNING AV ORGANISK STOFF .....	19
<b>3. BAKTERIER OG NITROGEN .....</b>	<b>20</b>
3.1 NITROGENASSIMILASJON.....	20
3.2 NITRIFIKASJON .....	21
3.3 NITRIFIKASJONSKINETIKK .....	23
3.4 FAKTORER SOM PÅVIRKER NITRIFIKASJON .....	24
<i>Konsentrasjonen av ammonium og nitrit</i> .....	25
<i>Konsentrasjonen av oppløst molekylært oksygen</i> .....	25
<i>Temperatur</i> .....	26
<i>pH</i> .....	27
<i>Organisk belastning</i> .....	27
<i>Giftige forbindelser</i> .....	28
3.5. REAKSJONSKONSTANTER FOR NITRIFISERENDE BAKTERIER.....	29
3.6 DENITRIFIKASJON.....	30
3.7 ASSIMILATORISK DENITRIFIKASJON .....	30
3.8 DISSIMILATORISK DENITRIFIKASJON .....	30
3.9 DENITRIFIKASJONSKINETIKK .....	32
3.10 FAKTORER SOM PÅVIRKER DENITRIFIKASJON .....	33
<i>Molekylært oksygen</i> .....	33
<i>Kvalitet og konsentrasjon av organisk stoff</i> .....	34
<i>pH</i> .....	35
<i>Temperatur</i> .....	35
<i>Effekten av giftstoffer</i> .....	35
3.11 REAKSJONSKONSTANTER FOR NITRIFISERENDE BAKTERIER.....	36

<b>4. BAKTERIER OG FOSFOR.....</b>	<b>37</b>
4.1 FOSFORASSIMILASJON.....	37
4.2 BIOLOGISK FOSFORFJERNING.....	37
<i>Mikrobiell bevirket kjemisk felling.....</i>	<i>37</i>
<i>Akkumulering av polyfosfat i bakterier.....</i>	<i>37</i>
<i>Utskilling av fosfor under anaerobe forhold.....</i>	<i>39</i>
<i>Fosforakkumulering i aerob fase.....</i>	<i>41</i>
4.3 BIOKJEMISKE MODELLER FOR FOSFORAKKUMULERING.....	41
<i>Anaerob fase.....</i>	<i>41</i>
<i>Hovedteser (anaerob fase).....</i>	<i>42</i>
<i>Aerob fase.....</i>	<i>43</i>
<i>Rene aerobe systemer.....</i>	<i>44</i>
4.4 ENDOGEN RESPIRASJON.....	44
4.5 POLY-P KINETIKK.....	45
4.6 FAKTORER SOM PÅVIRKER POLY-P AKTIVITET.....	45
<i>poly-P bakterier og nitrat.....</i>	<i>45</i>
<i>Substratkvalitet.....</i>	<i>46</i>
<i>pH.....</i>	<i>46</i>
<i>Temperatur.....</i>	<i>46</i>
4.7 REAKSJONSKONSTANTER FOR POLY-P BAKTERIER.....	47
<b>5. KRAV TIL KVALITET I AVLØPSVANN OG TIL DRIFTSBETINGELSER VED ULIKE BIOLOGISKE RENSEPROSESSER.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERANSELISTE.....</b>	<b>49</b>

## Sammendrag

Biologiske renseanlegg baserer driften på mikrobiologiske prosesser. Det er først og fremst de ørsmå bakteriene som spiller hovedrollene ved nedbrytning, omdanning og assimilering (opptak) av organisk stoff, nitrogen og fosfor. Kunnskap om bakterier og deres krav til vekstbetingelser danner grunnlaget for valg av anleggsutforminger for ulike renseprosesser.

Rapporten gjennomgår de mikrobiologiske prosessene som er aktive ved aerob nedbrytning og omdanning av organisk stoff, nitrogenfjerning og fosforfjerning og hva som påvirker disse.

Aerob nedbrytning og omdanning av organisk stoff er som navnet tilsier avhengig av molekylær oksygen. Bakteriene er såkalt kjemoheterotrofe, d.v.s. at de omdanner organiske molekyler med mer enn ett karbonatom. Som en tommelfingerregel brytes 50% av maten helt ned til kulldioksid og vann, mens 50% går til syntese av ny biomasse eller bioslam. Pr. kg KOF nydannes normalt 0,3-0,5 kg biomasse. Aerob nedbrytning foregår mest effektivt ved nøytral pH (pH = 7) og temperaturer > 8-10°C. Prosessen kan hemmes eller opphøre fullstendig ved tilførsel av miljøgifter. Ofte vil nitrogen eller fosfor være begrensende faktorer ved aerob nedbrytning av organisk stoff i et renseanlegg.

Nitrogenfjerning baseres på to prosesser, nitrifikasjon og denitrifikasjon. Ved førstnevnte oksideres ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) til nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) via nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ). *Nitrosomonas* spp er den mest kjente av bakteriene som oksiderer ammonium til nitritt, mens *Nitrobacter* spp. oksiderer nitritt videre til nitrat. Begge er representanter for såkalte kjemoautotrofe bakterier, d.v.s. at de bruker luftas kulldioksid som karbonkilde. De er likeledes helt avhengige av at molekylært oksygen er tilstede i miljøet. Normalt hemmes bakteriene av høye konsentrasjoner med nedbrytbart organisk stoff, da de konkurrerer dårlig med de kjemoheterotrofe bakteriene. Prosessen produserer syre og er således avhengig av at avløpsvannet har god bufferkapasitet. Siden det er lite energi å hente fra nitrifikasjonsprosessene vokser bakteriene langsomt. Derfor er de også følsomme for lave temperaturer og hurtige temperatursvingninger. Dette må tas hensyn til i dimensjoneringen av anlegg som skal fjerne nitrogen.

Denitrifikasjon er en prosess som utnytter nitrat som oksygenkilde i stedet for molekylært oksygen ved nedbrytning av organisk stoff ("anaerob respirasjon"). Nitrat omdannes til molekylært nitrogen som forsvinner ut i atmosfæren. Det er en lang rekke bakterier som har denne egenskapen og det er konsentrasjonen av molekylært oksygen i avløpsvannet som avgjør hvilken oksygenkilde, eller terminal elektronakseptor som skal brukes. Ved oksygenkonsentrasjoner lavere enn 1 mg/l vil denitrifikasjonen dominere. Bakteriene er avhengige av at det lett nedbrytbart organisk stoff tilstede og i tilfeller med fortynnet avløpsvann må metanol eller andre lett nedbrytbare organiske forbindelser tilføres prosessen for å sikre en effektiv denitrifikasjon. Prosessen produserer alkalitet og ca. halvparten av den alkaliteten som forbrukes ved nitrifikasjonen vil erstattes.

Biologisk fosforfjerning baseres på aktivitet av bakterier med helt spesielle egenskaper. Poly-P bakterier, som de ofte kalles, vokser både med og uten molekylært oksygen tilstede i miljøet. Ved å introdusere et anaerobt trinn, en selektor, i forkant av de luftede bassengene, vil disse bakteriene naturlig nok ha fordeler fremfor andre bakterier som enten vokser anaerobt eller aerobt. Poly-P bakteriene skiller fosfat ut anaerobt for så å ta det opp i overskudd i aerob fase. Slam fra slike bio-P anlegg kan inneholde mer enn 6% fosfor (%TS). Fosforen i slammet foreligger dels som polyfosfater og dels bundet som ulike metallfosfater. Poly-P bakterier synes å tolerere store spenn i både pH og temperatur. De viktigste kravene poly-P bakterier stiller til miljøet, ved siden av vekslingen mellom anaerobe og aerobe forhold, er at avløpsvannet inn i selektoren skal inneholde høye konsentrasjoner med korte flyktige fettsyrer (VFA), spesielt eddiksyre. I tillegg må nitratkonsentrasjonen holdes på et lavest mulig nivå.

Rapporten gjennomgår Wentzels biokjemiske modell for prosessene som er aktive i et bio-P anlegg.

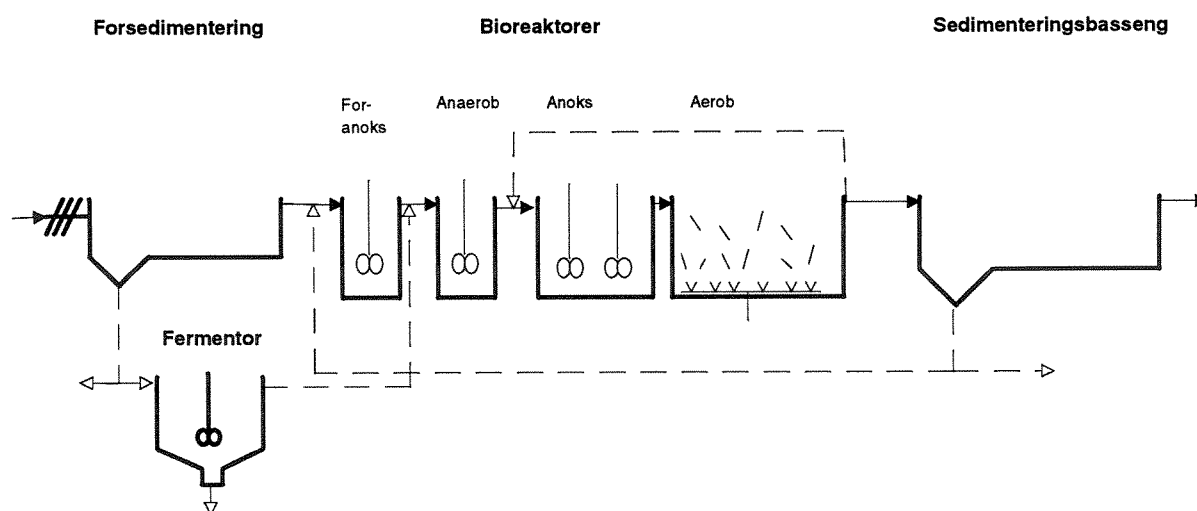
# 1. Prosesskunnskap om biologisk fosfor og nitrogenfjerning

Valg av optimal prosess og anleggsutforming for renseanlegg med biologisk fjerning av både nitrogen og fosfor må baseres på kunnskap om de mikrobielle prosessene som skal etableres i de ulike rensetrinnene i anlegget. Sentrale spørsmål i denne forbindelse blir hvor effektive de ulike omdannelses-prosesser er og hvilke forhold som vil kunne stimulere eller begrense disse.

I rapporten beskrives de prosessene som er aktive i biologiske fosfor og nitrogenfjerningsanlegg. I tillegg presenteres mikroorganismene mer inngående, både med hensyn på egenskaper og behov. Av mikroorganismene er det spesielt *bakteriene* som er renseanleggets drivkraft og som forholdene må legges til rette for, dersom renskrav og god slamkvalitet skal oppnås.

Kapitlet vil gi et faglig grunnlag for å forstå rekkefølgen av bassenger og opplegg for returstrømmer i ulike prosess-utforminger på *bio-P/N* anlegg (biologiske renseanlegg som skal fjerne både fosfor og nitrogen).

I figur 1 fremstilles en grovskisse av den valgte prosessløsningen for Groos RA<sup>1</sup>.



Figur 1. Valgt anleggsutforming ved Groos RA

## 1.1 Bakterier

Bakterier er mikroorganismer og tilhører *prokaryotene* (et eget rike innenfor biologisk klassifisering). De kan observeres i vanlig lysmikroskop (100 - 400 \* forstørrelse) som små stavformede, kulerunde (sfæriske) eller spirillformede organismer som sitter enkeltvis eller i mindre eller større gruppeformasjoner. Størrelsen på hver enkeltcelle ligger normalt i området 0.3 - 2  $\mu\text{m}$ , men det finnes både større og mindre varianter. På grunn av størrelsen har bakterier stor overflate i forhold til volum. Dette er en kritisk faktor i forbindelse med opptak (transport) av næringsstoffer over celleveggen og dermed også celleveksten.

Bakterier formerer seg ved celledeling. Generasjonstiden (tiden mellom hver celledeling) kan være meget kort, 12-15 minutter, for noen arter. Andre bakterier vokser langsommere med generasjonstider

<sup>1</sup> Overskuddsslammet tas ut direkte i etterkant av de aerobe bassengene (ikke fra klaringskammer), fortykkes i en såkalt DAF og avvannes gjennom sentrifugering.



mot 20 timer. Biologisk nitrogenfjerning som er en sentral prosess i et bio-P/N anlegg, er bl.a. avhengig av langsomt voksende nitrifiserende bakterier (se kapittel 1.3.2).

## 1.2 Substrater, energikilder og miljø

Bakterier har et meget variert "kosthold", men normalt deler vi bakteriene inn i to hovedklasser med hensyn på dietten eller *substratvalg*.

### Substrater

Substratet er bakteriens karbonkilde. Kjemo-*heterotrofe* bakterier spiser *organiske* forbindelser som er molekyler bygget opp av mer enn ett karbonatom (C-atom). I de aller fleste sammenhenger, bl.a. i renseanlegget, vil bakteriernes substrat bestå av små, enkle organiske molekyler. Noen eksempler på slike er listet opp under:

ediksyre:	$\text{CH}_3\text{COOH}$
etanol:	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
metanol:	$\text{CH}_3\text{OH}$
propionsyre:	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$
glukose:	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$

Bakterier er imidlertid ikke avhengige av at avløpsvannet kun inneholder slike lett nedbrytbare substrater. Blant de kjemoheterotrofe bakteriene finnes det mange arter som kan bryte ned komplekse organiske molekyler. I dag benyttes bakterier til opprensning av jord som er forurenset bl.a. med olje og klorerte organiske forbindelser. For å utnytte store molekyler produserer bakteriene *enzym*er som kan bryte disse ned i mindre og mer lettfordøyelige enheter.

*Lipider, proteiner, cellulose, lignin og stivelse* er representanter for store molekyler som går under fellesbetegnelsen polymerer. En måte og spalte disse molekylene opp i mindre enheter på kalles *hydrolyse*. Glukose, aminosyrer og fettsyrer er vanlige byggesteiner i polymerer og direkte anvendelige som substrat for bakterier. Hydrolyse foregår uavhengig av om molekylært oksygen ( $\text{O}_2$ ) er til stede eller ikke.

Kjemo*autotrofe* bakterier bruker karbondioksid/bikarbonat ( $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ) som karbon-kilde. Karbondioksid tas opp i bakterien og omdannes til cellemolekyler. Vi sier at kjemoautotrofe bakterier *fikserer* karbondioksid. Felles for slike bakterier er evnen til å vokse i nisjer hvor de har konkurransefortrinn. I miljøer med mye organiske forbindelser (høyt belastede renseanlegg, f.eks) vil disse bakteriene ha store problemer med å konkurrere med kjemoheterotrofe bakterier. Autotrofe bakterier vil normalt være avhengige av at molekylært oksygen er til stede i miljøet.

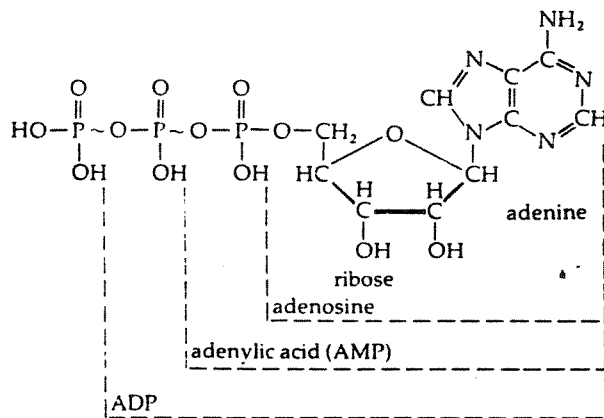
Renseanlegget vil domineres av heterotrofe bakterier. Disse er robuste og konkurransesterke.

### Energi

For å vokse og opprettholde viktige livsfunksjoner trenger bakteriene energi. Bakteriene lagrer energi på samme måte som oss mennesker, nemlig som *fosforylbindinger* i det organiske molekylet ATP (adenosin-5'-trifosfat). Dette molekylet (fig 2) er bakteriernes energibærer eller drivstoff om vi vil. Ortofosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) spaltes av ATP under frigivelse av energi. ATP-nivået i en cellesuspensjon (f.eks

aktivslam) kan brukes til å kvantifisere mikroorganismer og gir derved et bilde på slammets "helsestatus".

Bakteriene skaffe seg ATP ved *substratnivå-fosforylering* eller ved *oksidativ fosforylering*<sup>2</sup>. Førstnevnte foregår ved gjæring, uten O<sub>2</sub> tilstede. Sistnevnte gjennom respirasjon som er avhengig av tilstedeværelse av en terminal elektronakseptor, f.eks O<sub>2</sub> eller NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.



Figur 2. Viser oppbygging av adenosin - 5' - trifosfat (ATP), drivstoffet i bakteriecellen

Begge disse biokjemiske mekanismene involverer en eller flere *redoksreaksjoner* (reduksjons-oksidasjonsreaksjoner). I en redoksreaksjon overføres *reduserende enheter* (elektroner eller hydrogen) fra en forbindelse som lett gir fra seg slike, - en *donor*, til en forbindelse som er "glad i" å ta i mot, - en *akseptor*. En donor går fra redusert til oksidert form, mens en akseptor tar imot reduserende kraft og går fra oksidert til redusert form. Bakteriecellen vil som alle andre levende vesener tilstrebe å være i en termodynamisk likevekt. Derfor vil mengden med energi som frigis i slike reaksjoner være proporsjonal med differensen mellom *red-okspotensialet* til donor-paret og *redokspotensialet* til akseptorparet. Er denne forskjellen stor vil energiutbyttet være høyt. Er forskjellen liten blir energiutbyttet lavt. Bakterier som baserer seg på "små differenser" har dårlig konkurransevne og vil forsvinne i miljøer med mye lett nedbrytbart substrat tilgjengelig (jfr. nitrifiserende bakterier i et renseanlegg med høye konsentrasjoner av lett nedbrytbart materiale og kort oppholdstid for avløpsvannet = høytbelastede anlegg).

Gjæringsreaksjoner foregår i anaerobe miljøer som er kjennetegnet ved total mangel på molekylært oksygen. Anaerobe heterotrofe bakterier danner ATP gjennom substratnivå fosforylering. Via redoksreaksjoner dannes energirike fosforforbindelser. Disse kan gi fra seg fosfor til ADP (adenosin-5'-difosfat) som på denne måten omdannes til ATP.

Aerobe bakterier som er avhengige av molekylært oksygen danner sitt ATP ved oksidativ fosforylering. Denne prosessen baseres på at reduserende enheter overføres fra en organisk eller uorganisk elektron-donor til en elektron-akseptor via en rekke redoksreaksjoner. Den vanligste organiske elektrondonor hos heterotrofe bakterier er NADH (nikotinamid adenin dinukleotid). Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) og noen andre reduserte uorganiske forbindelser kan også fungere som elektrondonor for mer spesialiserte bakterier (jfr. nitrifikasjon).

<sup>2</sup>Fotofosforylering er en tredje måte og generere energi på. Denne metoden er utbredt, men tas ikke med her fordi den ikke er nevneverdig relevant for konvensjonelle renseanlegg

I aerobe miljøer vil den *terminale* (endelige) elektronakseptoren være molekylært oksygen.

Et miljø med høye konsentrasjoner av nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) og lave konsentrasjoner av molekylært oksygen har ofte betegnelsen anoksisk. I slike miljøer kan det etableres *denitrifikasjon*, en nedbrytningsprosess der nitrat er den terminale elektronakseptoren som reduseres til molekylært nitrogen ( $\text{N}_2$ ).

Tilsvarende kan sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) inngå som terminal elektronakseptor under dannelse av hydrogensulfid ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Siden det er sparsomt med sulfat i avløpsvann vil hydrogensulfid sjeldent være et problem i forbindelse med selve renseprosessen.

### 1.3 Seleksjonspress / Bakterietilpasning

Bakterier kan tilpasse seg de aller fleste miljøer. I et renseanlegg vil bakteriene hele tiden utsettes for et *seleksjonspress* fra miljøet rundt. Det er nettopp muligheten for å legge forholdene til rette for seleksjon av spesielle bakterier som ligger til grunn for valg av ulike annleggsutførelser.

Nedenfor beskrives noen seleksjonsegenskaper ved slam og avløpsvann som vil påvirke bakteriekulturen i et biologiske renseanlegg (Henze et al., 1992):

- hvilke terminale elektronakseptorer er til stede
- hvilke organiske forbindelser (substrater) er til stede
- hvilke sedimenterings- og flokkuleringsegenskaper har slammet
- hvilken temperatur er det i avløpsvannet
- hvilken veksthastighet har slamorganismen

#### Elektronakseptor

I et aktivslam anlegg som skal fjerne nitrogen må det være til stede bakterier som både kan bruke molekylært oksygen og nitrat som terminal elektronakseptor for å omsette organiske forbindelser. De bakteriene som er i stand til å bruke begge har naturlig nok et konkurransefortrinn i denne type anlegg.

#### Substrat

I kombinerte bio-P/N anlegg legges forholdene til rette for (selekteres) bakterier som kan ta opp korte fettsyrer som f.eks eddiksyre eller propionsyre for så å lagre disse som polyfettsyrer under anaerobe forhold.

#### Sedimenteringsegenskaper

I et aktiv slam anlegg vil sedimenteringsbasseng inngå som viktige prosesstrinn. Dersom en bakterie har gode synkeegenskaper, vil den holdes tilbake i anlegget. Små og lette bakterier derimot må inngå i større slamfnokker (celleklumper) for å unngå å bli vasket ut.

#### Temperatur

Dersom temperaturen er lavere enn det en bakterie tåler dør den. Veksthastigheten kan også bli så nedsatt at den spesielle bakteriekulturen tynnes ut og forsvinner fra bassengene etter hvert.

## Veksthastighet

I et aktivslam anlegg holdes slamkonsentrasjonen konstant ved å tappe av såkalt overskuddsslam. Med overskuddslammet fjernes bakterier fra anlegget. Beiting av høyere organismer og slamflukt (slam som forsvinner i utløpet) er to andre måter som bakterier fjernes fra anlegget på.

For at en spesiell bakterieart skal overleve i et renselanlegg må den formere seg med høyere hastighet enn den fjernes med.

## 1.4 Bakteriell omsetning i renselanlegg

Den biologiske omsetningen i et renselanlegg baseres på at følgende tre prosesser er aktive til enhver tid:

- hydrolyse
- cellevekst
- celledød

### Hydrolyse

Hydrolyse (figur 3) som reaksjonstype er gjennomgått under kapittel 1.2. Prosessen er aktiv i aerobe, anoksiske og anaerobe miljøer.

Når det gjelder hydrolyseaktivitet eller hastighet, kan denne fremstilles som funksjon av det hydrolyserbare materiale som er tilstede.

Hydrolysehastighet ( $h$ ) bestemmes fra likningsettene (Henze et al., 1992):

$$h_{XS} = k_h * X_s \text{ eller} \\ h_{SS} = k_h * S_s$$

$h_{XS}$ : spesifikk hydrolyse av suspendert organisk stoff

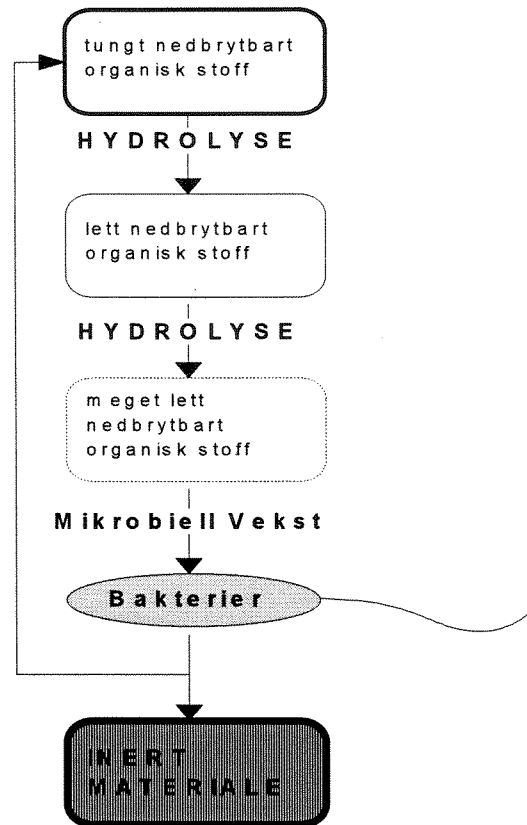
$h_{SS}$ : spesifikk hydrolyse av løst organisk stoff

$k_h$ : hydrolysekonstanten (for enten oppløst ( $S_s$ ) eller suspendert stoff ( $X_s$ ))

I tabell 1 oppgis hydrolysekonstanten som funksjon av kvaliteten på hydrolyserbart stoff og type terminal elektronakseptor.

Tabell 1. Viser hydrolysekonstanter som funksjon av terminal elektronakseptor og organisk stoff (Henze et al., 1992).

Terminal elektronakseptor	$k_h$ ( $t^{-1}$ ) for oppløst stoff	$k_h$ ( $t^{-1}$ ) for suspendert stoff
Molekylært oksygen	0,13 - 0,83	0,025 - 0,058
Nitrat	0,04 - 0,63	0,006 - 0,017
Anaerobt	0,08 - 0,83	0,012 - 0,03



Figur 3. Biologisk omsetning der substratet deles i tre fraksjoner: 1) tungt nedbrytbart organisk stoff, 2) lett nedbrytbart organisk stoff og 3) meget lett nedbrytbart organisk stoff (Henze et al., 1992).

### Celledød

I et renseanlegg foregår det kontinuerlig oppvekst og død av bakterier. Kinetikken for dødsfasen har betydning for stoffomsetningen i renseanlegget. Organisk materiale og næringsalter frigis ved at bakterieceller dør og løses opp. Det organiske stoffet som gjøres tilgjengelig er i første omgang tungt nedbrytbare makromolekyler og polymerer (proteiner, lipider og polysakkarider). Aktiviteten av hydrolytiske enzymer som *proteaser*, *lipaser* og *amylaser* omdanner polymerene til substrater som gir grunnlag for bakterievekst og derved behov for tilførsel av molekylært oksygen eller nitrat. Noe av celledødsfasen forblir uforandret. Denne fraksjonen kalles *inert* (figur 3).

Et annet navn på celledød er bioreduksjon ( $dR/dt$ ). Bioreduksjonen kan beskrives på samme enkle måte som hydrolyseprosessen over:

$$dR/dt = b * X_B, \text{ hvor}$$

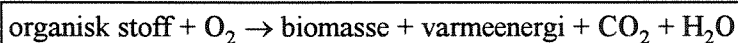
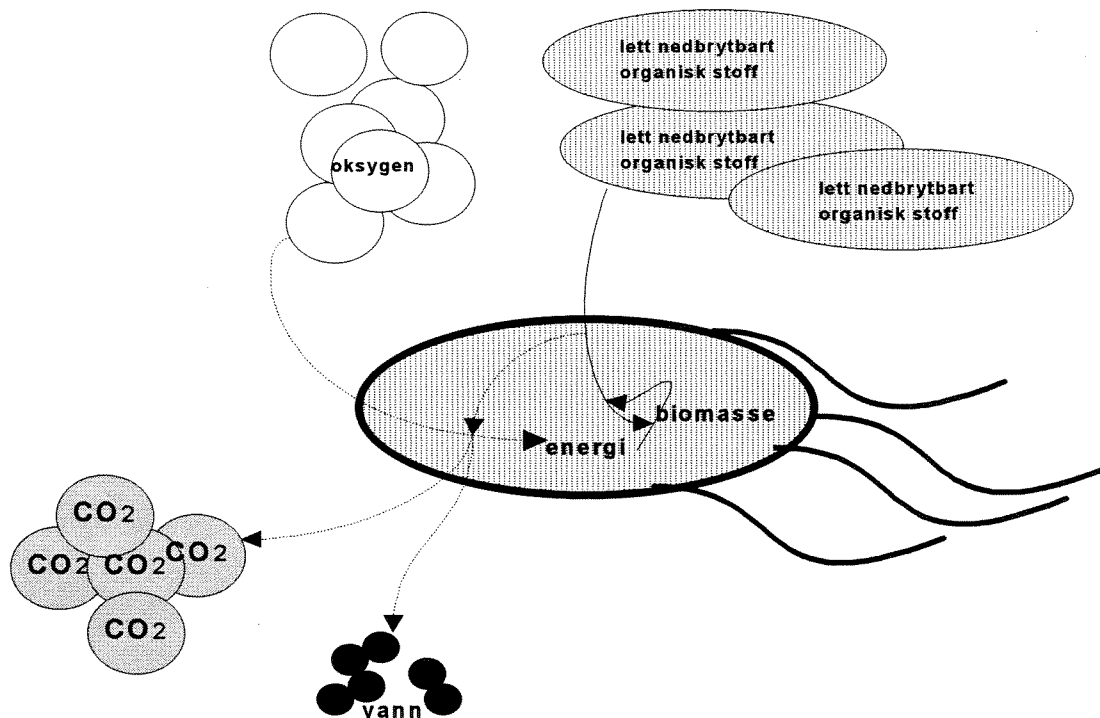
b: bioreduksjonskonstant  
 $X_B$ : biomassen

### Cellevekst

Dette temaet tas opp under kapittel 1.2: "Aerob omdanning av organisk stoff".

## 2. Aerob omdanning av organisk stoff

Under aerob "vekst" skaffer bakteriene seg energi gjennom å oksydere organisk materiale til kuldioksid, vann (H<sub>2</sub>O) og diverse næringssalter som nitrogen (N), fosfor (P) og svovel (S). Samtidig bygges endel av det organiske materialet inn i biomasse,- cellevekst. I noen tilfeller skilles det ut omdanningsprodukter som eventuelt kan fungere som substrat for andre bakterier (*sekundærsubstrat*). Figur 4 viser stoff-flyten ved aerob omdanning i en heterotrof modellbakterie.



Figur 4. Aerob omdanning av organisk stoff i avløpsvann

### 2.1 Vekstkinetikk

#### Cellevekst

Cellevekst ( $dX_B/dt$ ) defineres som økning av biomasse over tid og beskrives ved likningen:

$$dX_B/dt = \mu * X_B$$

$\mu$ : spesifikk veksthastighet

$X_B$ : biomasse

Likningen viser at celleveksten er avhengig av spesifikk veksthastighet ( $\mu$ ). Veksthastigheten som observeres i naturlige systemer er imidlertid nesten uten unntak lavere enn maksimal spesifikk veksthastighet ( $\mu_{\max}$ ).

Dette skyldes at veksthastigheten påvirkes av en lang rekke miljøfaktorer og at forholdene praktisk talt aldri vil være optimale med hensyn på disse. pH, temperatur samt konsentrasjonen av molekylært oksygen, næringssalter og substrat er noen av de vanligste parametrene som påvirker aerob omdanning av organisk stoff.

I systemer hvor forholdene ikke er optimale med hensyn på alle faktorer vil cellevekst beskrives med likningen:

$$dX_B/dt = \mu_{\max} * \sum_0^n f(Z)_n * X_B$$

$\sum_0^n f(Z)_n$ : innvirkningen av ulike "miljøfaktorer"

Noen viktige miljøfaktorer:

- Konsentrasjonen av: substrat (S), nitrogen (N), fosfor (F)
- Mengde oppløst O<sub>2</sub>
- Temperatur (T)

### Utbytte

Vekstutbyttet (Y=Yield) er et mål på hvor effektivt bakteriekulturen omdanner substrat til cellemasse. Utbyttekoeffisienten beregnes ut fra differensen i cellemasse og substratkonsentrasjon i ett bestemt tidsintervall:

$$Y = X_e - X_o / S_o - S_e = dX_B/dt : dS/dt$$

S<sub>o</sub> og S<sub>e</sub> står her for substratkonsentrasjonen ved start og avslutning av en måleperiode. X<sub>o</sub> og X<sub>e</sub> står for cellemassen målt ved start og avslutning av måleperioden.

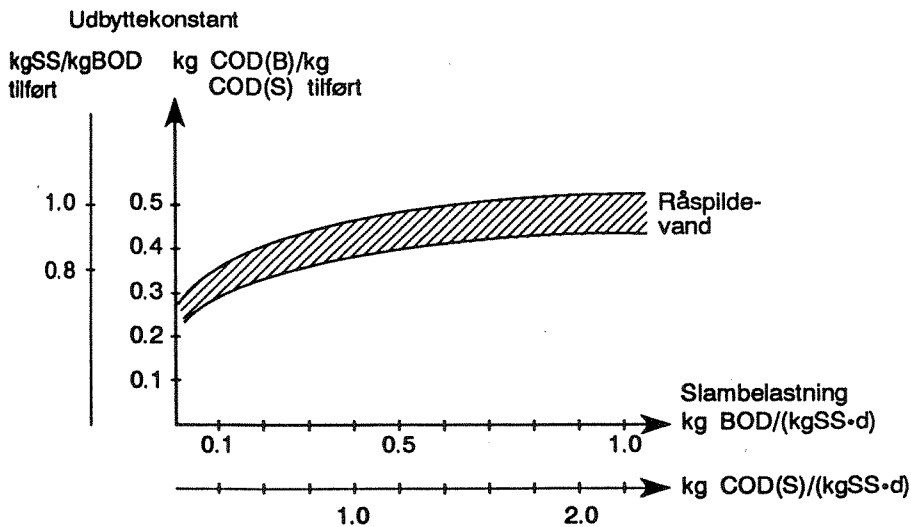
For renkulturer (kulturer av kun én bakterietype) som vokser på ett enkelt substrat (f.eks glukose) vil vekstutbyttet være konstant.

I et naturlig miljø, f.eks i et renseanlegg, vil det være mange bakterier som er virksomme til enhver tid. Få av disse vil være i en aktiv vekstfase (logaritmisk vekstfase) hvor cellemassen øker eksponensielt. Mange er tvert imot i en fase der mye av energien benyttes til vedlikehold (*stasjonær vekstfase*) eller i dødsfasen der bakteriecellene går i oppløsning.

Vekstutbyttet må derfor korrigeres fra idealsituasjonen. Det er spesielt celledbrytningen som foregår under dødsfasene til de forskjellige bakteriene slike korrigerede likninger tar hensyn til.

En tommelfingerregel for en aerob bakterie vil være at ca. 55% av substratet målt som løst KOF (Kjemisk OksygenForbruk) går til biomasse, mens de resterende 45% forbrennes fullstendig for omdanning til kjemisk bundet energi (ATP) som blant annet brukes til oppbygging av biomassen. Slamutbyttet vil imidlertid være avhengig av *slambelastningen* og *slamalder* (figur 5). Med (aerob) *slamalder* menes den gjennomsnittlige oppholdstid for slamfnokkene i de (luftede) biologiske bassengene.

*Slambelastningen* forteller hvor mye nedbrytbart organisk stoff som slammet har å "arbeide med" hvert døgn. Slambelastningen blir således forholdet mellom daglig tilførsel av BOF<sub>7</sub> og den totale slammengden i bassengene.



Figur 5. Viser observerte udbyttekonstanter i aktivslamanlegg som funksjon av slambelastningen (Henze et al., 1992).

### Aerob stoffomsetning

Stoffomsetningen i en bakteriekultur (rensaneanlegget) forteller hvor raskt substrater eller næringsalter tas opp i biomassen:

$$dS/dt = (dX/dt) / Y_{\max}$$

$dS/dt$ : substratopptakshastigheten

$Y_{\max}$ : maksimalt utbytte for en substrattype

$dX/dt$ : biomasse økning

Økningen av biomassen i en kultur er proporsjonal med biomassens omsetning av substratet ( $q$ ):

$$dX/dt = Y * dS/dt \Rightarrow \mu = Y * q$$

Når det kun er substratet som begrenser veksten kan likningen over utvides til:

$$dS/dt = \{(\mu_{\max}/Y_{\max}) * [S/(S+K_s)] * (X_B)\}$$

$K_s$ : Halvmetningskonstanten for substratet (mg KOF/l)

## 2.2 Faktorer som påvirker aerob omdanning av organisk stoff

Det er mange fysiske og kjemiske miljøfaktorer som påvirker aerob heterotrof omdanning av organisk stoff. De viktigste gis en kort vurdering i det etterfølgende.

### Temperatur

Temperaturen er en av de viktigste faktorene som influerer på mikrobiell vekst og overlevelsessevne. Mikrobiell vekst skjer ved temperaturer som varierer fra under frysepunktet til mer enn 100°C.

Bakterier klassifiseres som *psykrofile* (vokser best ved temperaturer < 10°C), *mesofile* (vokser best i



temperaturintervallet 20 - 45°C), *termofile* (vokser best ved temperaturer > 55°C) og *ekstremt termofile* (vokser best ved temperaturer > 70°C).

Psykrofile (kuldeelskende bakterier) kan vokse ved lave temperaturer fordi cellemembranene har et høyt innhold av umettede fettsyrer. Dette hjelper til med å holde membranen flytende eller i en "dynamisk tilstand" som er nødvendig for effektiv transport av substrater inn i cellen og avfallsstoffer ut av cellen. Cellemembranene i termofile bakterier stabiliseres gjennom et høyt innhold av mettede fettsyrer. Temperaturavhengigheten for mikrobiologiske prosesser kan uttrykkes gjennom *Arrhenius likningen*:

$$\mu = Ae^{-E/RT}$$

- A: konstant  
E: aktiveringsenergi (kcal/mol)  
R: gass-konstanten  
T: absolutt temperatur

Likningen under uttrykker hvordan temperaturen påvirker veksthastigheten til en mesofil heterotrof bakterie:

$$\mu_{(max)}(T) = [\mu_{(max)} * (20^{\circ}C)^{\theta} (T-20)]$$

- $\theta$ : temperaturkonstant for heterotrof aerob omdanning

For mesofile aerobe prosesser gjelder likningen mellom 0 og 32°C. Over 40°C faller veksthastigheten drastisk og stopper opp rundt 45°C. Nedgang i veksthastighet ved høyere temperaturer skyldes hovedsaklig at proteiner denaturerer (feller ut) samt at strukturen i cellemembranene endres som igjen gir endret permeabilitet (gjennomtrengelighet) for ulike kjemiske forbindelser (f.eks ulike giftstoffer).

### Oppløst molekylært oksygen

Mikroorganismer kan vokse både med og uten oppløst molekylært oksygen tilstede.

Bakteriene er delt inn i strengt aerobe, fakultativt aerobe og strengt anaerobe. Strengt aerobe bakterier er avhengige av at molekylært oksygen er til stede i vekstmiljøet. De fakultative organismene kan vokse i miljøer uavhengig av om molekylært oksygen er til stede eller ikke. For strengt anaerobe bakterier fungerer molekylært oksygen som en cellegift og må således unngås.

Aerobe mikroorganismer bruker molekylært oksygen som terminal elektronakseptor.

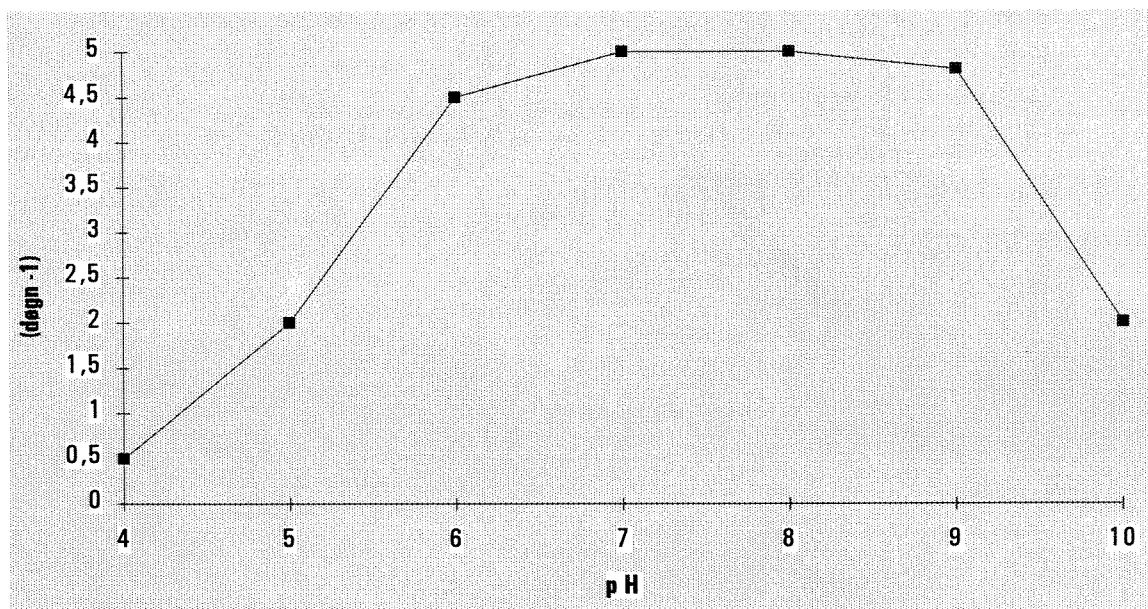
Oksygenavhengigheten for aerobe prosesser beskrives av likningen:

$$\mu_{obs} = \{\mu_{max} * [DO / (DO + K_{DO})]\}$$

- DO: konsentrasjonen av oppløst molekylært oksygen  
 $K_{DO}$ : halvmetningskonstanten for oppløst molekylært oksygen (begrensende parameter)  
 $\mu_{obs}$ : observert veksthastighet

### pH

Biologisk behandling av avløpsvann skjer normalt ved nøytral pH. Generelt kan vi si at optimal pH for bakterievekst er rundt 7 (figur 6), selv om det finnes bakterier som trives best ved ekstreme pH-verdier. De såkalt obligat acidofile bakterier lever best ved pH < 2, mens cyanobakterier (blågrønnalger) vokser best ved pH > 7.



Figur 6. Viser relativ veksthastighet av aerobe heterotrofe bakterier som funksjon av pH-verdier mellom 4-10.

pH påvirker aktiviteten i bakterielle enzymer. pH vil også påvirke ioniseringen av kjemikalier og gjennom det spille en rolle for transporten av næringssalter, substrater og giftige forbindelser inn i cellen.

Normalt vil det være lave pH-verdier (< 6,0) som hemmer bakterier i et renseanlegg.

### Giftstoffer

Relativt sett er aerob heterotrof omdanning i renseanlegg robuste prosesser i forhold til tilsvarende anaerobe prosesser. Mange bakterier har faktisk evnen til å bryte ned giftige forbindelser. Ved økt konsentrasjon og/eller økt løslighet av giftstoffet kan imidlertid effekten på biologiske renseprosesser være alvorlige. Symptomene som registreres er at nedbrytning av organisk stoff opphører og/eller at sedimentasjonsegenskapene i slammet blir dårlige med slamflukt som resultat.

Giftige forbindelser deles gjerne inn i to hovedgrupper:

- tungmetaller
- organiske gifter

Sjokktilførsler av tungmetaller kan ødelegge flokkuleringsegenskapene i slam (Henney et al., 1980), men sedimentasjonsegenskapene kan faktisk også i enkelte tilfeller endres til det bedre. Dette skyldes sannsynligvis at filamentære (trådformige) mikroorganismer (som gir dårlig sedimentering) i enkelte tilfeller er rapportert å være mer sensitive overfor tungmetaller (Neufield, 1976).

Tungmetallene kadmium (Cd), krom (Cr), bly (Pb) og kvikksølv (Hg) vies størst oppmerksomhet i rensesammenhenger, særlig fordi det resulterende slammet kan bli verdiløst og faktisk blir å anse som et spesialavfall dersom disse metallene akkumuleres i nevneverdige mengder.

I aktivslamanlegg vil tungmetallene fjernes fra avløpsvannet gjennom adsorpsjon til slamflokkene. Effektiviteten er avhengig av pH, samt løsligheten og konsentrasjonen av de enkelte metaller. Evnen som metaller har til å binde seg til aktiv slam avtar som følger (Neufield, 1976):

Pb>Cd>Hg>Cr<sup>3+</sup>>Cr<sup>6+</sup>>Sink (Zn)>nikkel(Ni).

Det finnes et utall organiske miljøgifter som vil kunne hemme prosessene i et aktivslam anlegg. De mest påaktede er klorerte hydrokarboner og lettere hydrokarboner (alkaner og aromatiske hydrokarboner). Konsentrasjonen for de aller fleste av disse miljøgiftene skal overstige 1000 mg/l før aktivslamprosessen blir alvorlig hemmet. Konsentrasjonen bør uansett holdes på et minimum da akkumulering (oppkonsentrering) i slammet fører til begrensninger m.h.p. disponering.

Overflateaktive forbindelser (såper og surfaktanter) kan ha alvorlige konsekvenser for sedimentasjonsegenskapene i slammet.

## Nitrogen og fosfor

Dersom avløpsvannet inneholder lave konsentrasjoner av fosfor og/eller nitrogen i tilgjengelige former, d.v.s. fosfor som ortofosfat og nitrogen som ammonium eller nitrat, kan den aerobe omsetningen begrenses eller stoppe helt opp.

Næringssaltbegrensning vises ved at veksthastighet synker langt under teoretisk verdi utfra kunnskap om tilgjengelig organisk materiale, og eventuelt ved seleksjon av filamentære organismer (Sezgin et al., 1978, Strom og Jenkins, 1984). Oppveskt av filamentære organismer i aktiv slam gir dårlige slamegenskaper, bl.a. flyte-slam.

En tommelfingerregel sier at forholdet mellom karbon, nitrogen og fosfor (C:N:P-forholdet) må ligge i området 100:5:1 for at veksthemming eller flyteslam skal unngås (U.S. EPA, 1987). For mange filamentære organismer er syntese og akkumulering av karbon-reserver ved N og P-begrensning en egenskap som gir dem fordeler i konkurransen med fnokkdannende bakterier.

Likningen under beskriver veksthastighet som funksjon av næringssaltkonsentrasjoner i mediet:

$$\mu_{\text{obs}} = \mu_{\text{max}} * \left\{ \frac{[\text{NH}_4]}{[\text{NH}_4] + K_{\text{NH}_4}} \right\} * \left\{ \frac{[\text{PO}_4]}{[\text{PO}_4] + K_{\text{PO}_4}} \right\}$$

$[\text{NH}_4]$ : konsentrasjon av ammonium

$[\text{PO}_4]$ : konsentrasjon av ortofosfat

$K_{\text{NH}_4}$ : halvmetningskonstant for ammonium

$K_{\text{PO}_4}$ : halvmetningskonstant for ortofosfat

## 2.3 Reaksjonskonstanter for aerob heterotrof omsetning av organisk stoff

Tabell 2 gir eksempler på noen reaksjonskonstanter for aerob heterotrof omsetning

Tabell 2. Reaksjonskonstanter for aerob heterotrof nedbrytning (Henze et al., 1992)

Type reaksjonskonstant	Symbol	Benevning	Dokumenterte verdier
Maksimal spesifikk veksthastighet	$\mu_{\text{max}}$	d-1	4-8
Halvmetningskonstanter:			
Substrat	$K_S$	g KOF/m <sup>3</sup>	5- 30
Molekylekylært oksygen	$K_{\text{DO}}$	g O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,5- 1
Nitrogen	$K_{\text{NH}_4}$	g N/m <sup>3</sup>	0,1- 0,5
Fosfor	$K_{\text{PO}_4}$	g P/m <sup>3</sup>	0,1- 0,2
Maksimalt vekstutbytte	$Y_{\text{max}}$	g FSS/g KOF	0,5- 0,7

### 3. Bakterier og Nitrogen

For å omdanne organisk materiale trenger bakterier næringssalter. Dersom den kjemiske sammensetningen av bakterien er kjent, er det mulig å beregne næringssaltbehovet ved hjelp av massebalanser. Tabell 3 viser innhold av karbon og de mest sentrale næringsstoffene, nitrogen, fosfor, svovel og jern (Fe) i bakterier.

Tabell 3. Kjemisk sammensetning av aerobe heterotrofe bakterier (Henze et al., 1992)

Grunnstoff	g/kg VSS	g/kg KOF
Karbon	400 - 600	300 - 400
Nitrogen	80 - 120	55 - 85
Fosfor	10 - 20	7 - 18
Svovel	5 - 15	4 - 11
Jern	5 - 15	4 - 11

#### 3.1 Nitrogenassimilasjon

Bakterier inneholder mye nitrogen og enhver netto tilvekst av bakterier vil således kunne fjerne anselige mengder med nitrogen fra omgivelsene, f.eks fra avløpsvannet i et renseanlegg. Mengden som kan fjernes på denne måten er naturlig nok begrenset av celleveksten som i sin tur avhenger av mengde og kvalitet på karbonkilden(e) som er tilgjengelig (e).

Ved biologisk avløpsrensing vil tilveksten også avhenge av anleggsutforming og driftskriterier ved det enkelte renseanlegget.

Siden nitrogeninnholdet i bakterieceller ligger på 8-12% av tørrstoffet (tabell 3), vil maksimal teoretisk mengde med nitrogen som fjernes ved assimilasjon være:

$$d\text{NH}_4^+-\text{N}/dt = (0,12) * (dX_B/dt)$$

I renseanlegget kan forholdet mellom nitrogenassimilasjon og omsetning av organisk stoff, målt som biokjemisk oksygenforbruk ( $\text{BOF}_7$ ) beskrives ved likningen

$$d\text{NH}_4^+-\text{N}/dt : d\text{BOF}_7/dt = (0,12) * [(dX_B/dt) : (d\text{BOF}_7/dt)]$$

Når cellene dør lekker nitrogen ut av bakteriecellene. Ved høy slamalder (lav slambelastning) vil bioreduksjonen ofte være anselig og føre til slam med lavere nitrogeninnhold.

Ved beregning av nitrogenassimilasjon må derfor likningen korrigeres for celledød (Henze et al., 1992):

$$(d\text{NH}_4^+-\text{N}/dt : d\text{BOF}_7/dt) = \{(0,12) * Y - [(0,12) * b * (X_N / F:M)]\}$$

F/M: slambelastning målt som kg  $\text{BOF}_7$ / FSS x døgn (FSS = flyktig suspendert stoff)

Y: utbytte (cellevekst)

b: dødsrate g FSS/g FSS x døgn

$X_N$ : nedbrytbar del av FSS

Utbyttet (Y) ved aerob heterotrof omdanning ligger i området 0,5 - 0,75 g FSS / g  $\text{BOF}_7$  (0,3 - 0,5 g FSS / g KOF). Maksimal teoretisk nitrogenassimilasjon ved omsetning av 1 g  $\text{BOF}_7$  vil ut fra dette være 90 mg.

Fra et avløpsvann med 120 mg BOF<sub>7</sub>/l inn på det biologiske rensetrinnet vil nitrogenassimilasjon kunne fjerne 11 mg N/l.

Dersom anlegget drives med lav slambelastning, f.eks 0,1 g BOF<sub>7</sub>/g FSS \* døgn og bioreduksjonen settes til 0,1 g FSS / g FSS \* døgn med 80% av biomassen som nedbrytbar, vil det teoretiske opptaket av nitrogen ved assimiliasjon være:

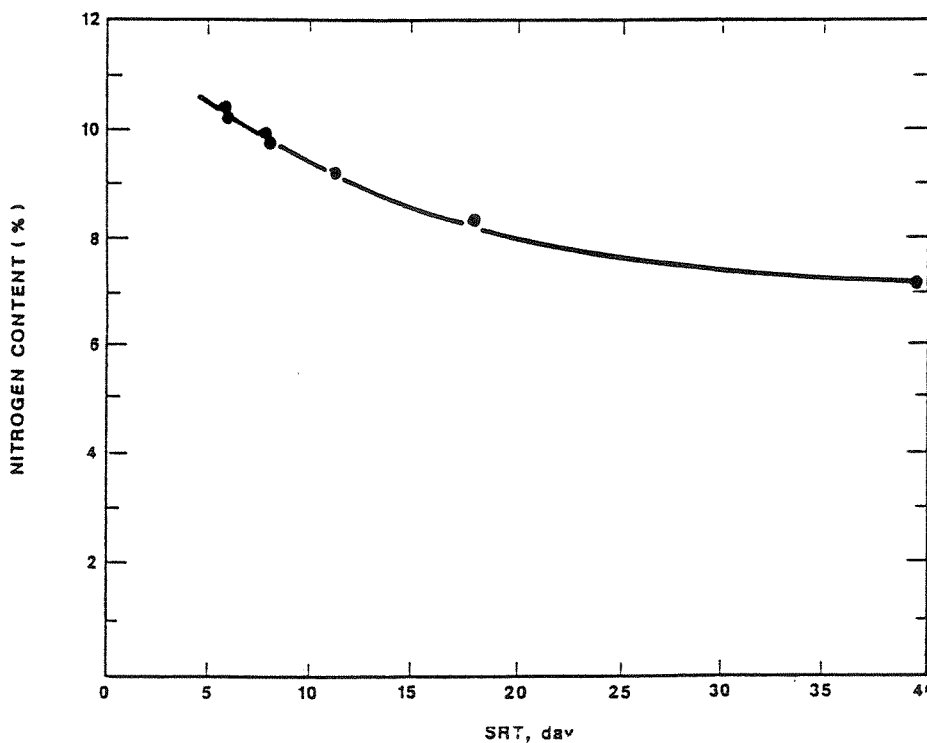
$$(dNH_4^+-N/dt) : (dBOF_7 / dt) = \{[(0,12 * 0,75) - (0,12 * 0,60 * 0,1 / 0,1)] : g BOF_7\}$$

$$(dNH_4^+-N/dt : dBOF_7 / dt) = \text{nitrogenassimilasjon pr. g BOF}_7 = 0,018 \text{ g} = 18 \text{ mg.}$$

✓ Dette tilsier 2,2 mg N / l i et avløpsvann med samme slambelastning og 120 mg BOF<sub>7</sub>/l inn på det biologiske rensetrinnet. Med en gjennomsnittlig nitrogenkonsentrasjon (tot-N) på 25 mg/l vil rensespotensialet med nitrogenassimilasjon være drøye rundt 9 %. Eksemplet er typisk for kvaliteten inn på biotrinnet til Groos RA

I avløpsvann med høyt innhold av lett nedbrytbart organisk materiale kan potensialet for nitrogen fjerning gjennom assimilasjon være langt høyere (≈ 20%). Dette vil normalt ikke være situasjonen i et norsk avløpsvann.

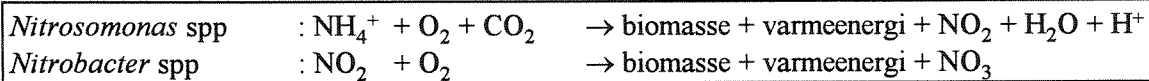
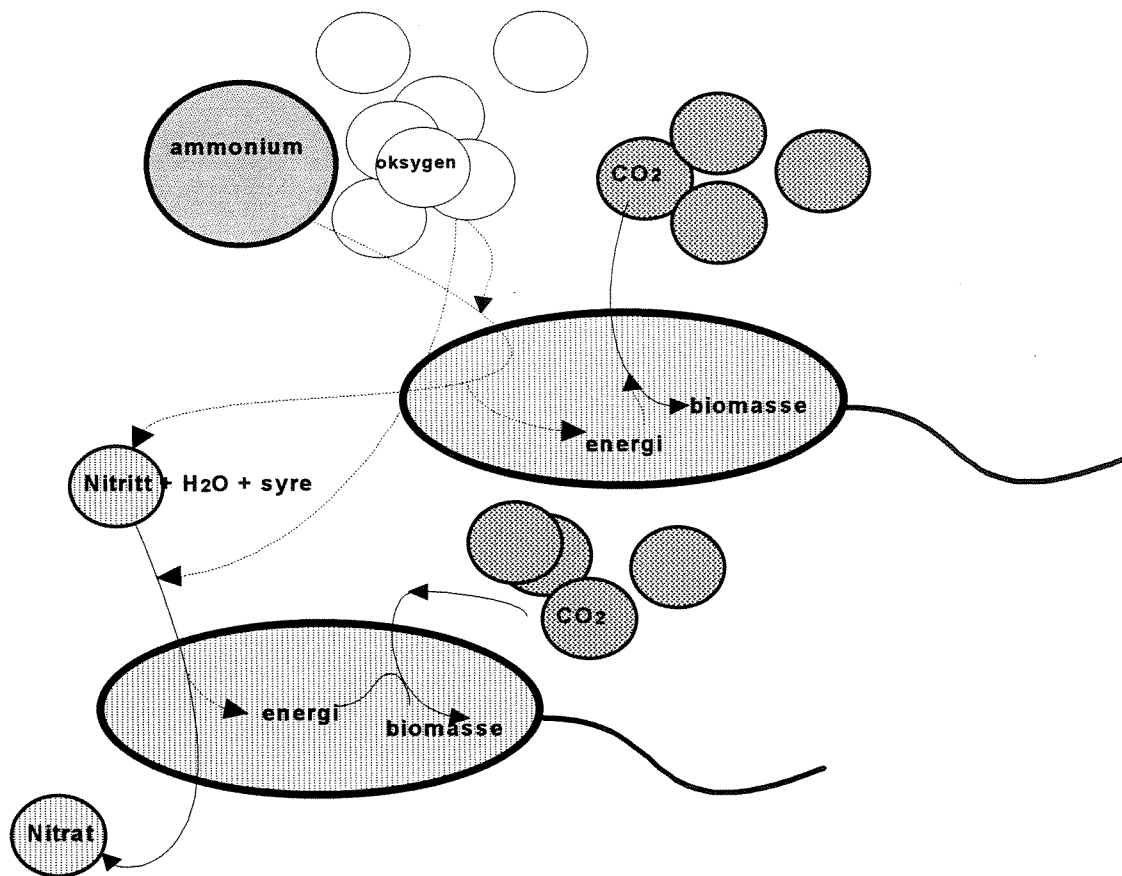
Innholdet av nitrogen i aktivslam vil også være avhengig av slamalderen. Mens nitrogeninnholdet i biomassen fra aktivslam med lav slamalder (5-10 dgn) er 10-12% (av TS), vil det synke ned under 8% når slamalderen øker til over 15 døgn (figur 7).



Figur 7. Endring i nitrogeninnhold i aktivslam som funksjon av slamalder (Fedlak, 1992).

### 3.2 Nitrifikasjon

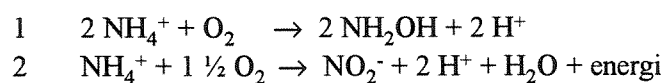
Nitrifikasjon er definert som mikrobiell oksidasjon av ammonium til nitrat. Nitrifikasjonen skjer i to trinn med to forskjellige typer mikroorganismer involvert i hvert sitt trinn (fig 8).



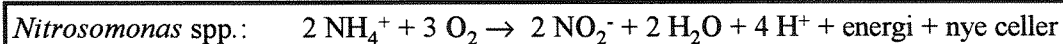
Figur 8. Rollen til *Nitrosomonas* spp. og *Nitrobacter* spp. i nitrifikasjon

*Nitrosomonas* spp. er den vanligste bakteriegruppen som omdanner ammonium til nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ).  
*Nitrospira* spp. og *Nitrosococcus* spp. er andre ammoniumoksidierende bakterier.

Omdanningen skjer via hydroksylamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) og kan deles opp i to trinn:

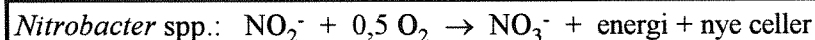


Normalt fremstilles reaksjonen som vist under:



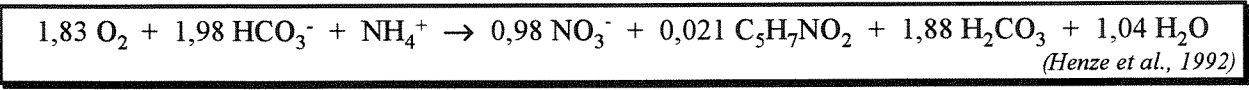
*Nitrobacter* spp. er den viktigste bakterien som omdanner nitrit til nitrat.

Reaksjonen er vist under:

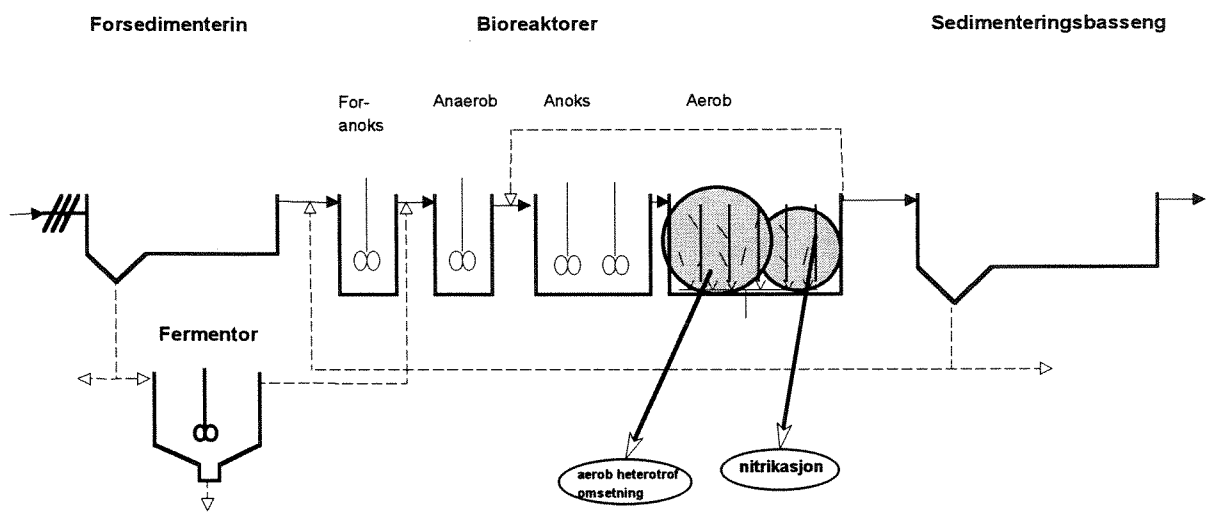


Oksidasjon av ammonium til nitrat frigir energi som bakteriene utnytter bl.a. for å fikse karbondioksid til ny biomasse.

Nitrifikasjon er en aerob prosess. Med utgangspunkt i følgende likning går det med ca. 4,3 mg O<sub>2</sub>/ pr. mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N som oksideres ( C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> : betegner generell formel for organisk materiale i biomassen).



Selv om de nitrifiserende bakteriene er strengt aerobe har de lavere affinitet til molekylært oksygen enn det heterotrofe aerobe bakterier har. I renseanlegg med stempelstrøm vil aktiviteten til nitrifiserende bakterier og heterotrofe aerobe bakterier kunne plasseres som vist i figur 9.



Figur 9. Aerob heterotrof omsetning og nitrifikasjon i renseanlegget på Groos.

Fordi bakterier er ømfintlige overfor store svingninger i pH og pH-verdier utenfor optimalområdet (ref kap. 1.2.2.3 og kap. 1.3.2.4) kan hydrogenionene (syren) som dannes fra nitrifikasjonsprosessen forårsake problemer for nitrifikasjonen i avløpsvann som er dårlig bufret. Avløpsvannet må derfor ha tilstrekkelig alkalitet som kan nøytralisere syredannelsen.

### 3.3 Nitrifikasjonskinetikk

Veksthastigheten til *Nitrobacter* spp. er høyere enn for *Nitrosomonas* spp. Det betyr at det begrensende trinnet i nitrifikasjonsprosessen vanligvis er omdanningen av ammonium til nitrit.

Spesifikk veksthastighet for nitrifiserende bakterier ( $\mu_n$ ) kan beskrives i henhold til Monodkinetikk:

$$\mu_{obs} = \{ \mu_{max} * [ \text{NH}_4^+ ] / ( K_{\text{NH}_4} + [ \text{NH}_4^+ ] ) \}$$

- K<sub>NH4</sub>: halvmetningskonstanten for ammonium
- [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]: konsentrasjonen av ammonium

Halvmetningskonstanten for ammonium (K<sub>NH4</sub>) ligger i området 0,05-5,6 mg/l for *Nitrosomonas* spp. og i området 0,06 - 8,4 mg/l for *Nitrobacter* spp. (Verstraete og Varenburg, 1986). En normal K<sub>NH4</sub> for samlet nitrifikasjonsprosess kan imidlertid settes til 0,5 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l (Henze et al., 1992).

I renseanlegg vil oppløst molekylært oksygen (DO) være en begrensende faktor. Effekten av DO må normalt tas hensyn til ved vurdering av spesifikk veksthastighet. Uttrykket over vil dermed kunne modifiseres til:

$$\mu_n = \{\mu_{max} * [NH_4^+]/(K_{NH_4^+} + [NH_4^+]) * [DO]/(K_{DO} + [DO])\}$$

$\mu_n$ : spesifikk veksthastighet for nitrifiserende bakterier

$K_{DO}$ : halvmetningskonstanten for oppløst oksygen

$K_{NH_4^+}$ : halvmetningskonstanten for ammonium

Halvmetningskonstanten for DO,  $K_{DO}$ , er temperaturavhengig og beregnet å ligge mellom 0,15-2 mg/l (US. EPA, 1975). En normal  $K_{DO}$  er 0,3 mg/l.

Det finnes flere komplekse likningssett som beskriver vekstkinetikken for nitrifiserende bakterier. I slike likningssett er veksthastighet en funksjon av varierende pH og temperatur i tillegg til konsentrasjonen av oppløst molekylært oksygen og substratet selv.

Barnes og Bliss (1983) uttrykker spesifikk veksthastighet for nitrifiserende bakterier ( $\mu_n$ ) som følger:

$$\mu_n = \{ [NH_4^+] - N / (0,4 * e^{0,118(T-15)} + [NH_4^+]) \} * [DO * e^{0,095(T-15)} / (1+DO)] * [1,83 * (pH_{op} - pH)]$$

Maksimal spesifikk veksthastighet ( $\mu_{max}$ ) for nitrifiserende bakterier ligger mellom 0,006 og 0,035  $t^{-1}$  som er mye lavere enn  $\mu_{max}$  for aerobe heterotrofe bakterier med glukose som substrat;

$\mu_{max} = 0,18 - 0,38 t^{-1}$ . (US. EPA, 1977, Christensen og Harremoës, 1978, Grady og Lim, 1980).

Energimengden som frigis gjennom nitrifikasjonen er minimal og siden produsert biomasse er proporsjonal med mengde frigitt energi er celleutbyttet (slamproduksjonen) for nitrifiserende bakterier mange ganger lavere enn for aerobe heterotrofe bakterier (Rittman, 1987).

Maksimalt utbytte for *Nitrosomonas* spp. er 0,29, mens maksimalt celleutbytte for *Nitrobacter* spp. er mye lavere, - ca. 0,08 g celle/g  $NH_4^+$ -N (Bitton et al. 1994). Eksperimentelle data viser normalt utbytter som ligger langt lavere; - 0,04-0,13 g celle/g  $NH_4^+$ -N for *Nitrosomonas* spp. og 0,02-0,07 g celle/g  $NH_4^+$ -N for *Nitrobacter* spp (Ederle, 1988). Et utbytte på 0,15 g celler/g  $NH_4^+$  oksidert for nitrifikasjonsprosessen totalt sett synes å være fornuftig (Henze et al., 1992).

P.g.a. lavt utbytte og lave ammoniumkonsentrasjoner i norsk avløpsvann vil andelen med nitrifiserende bakterier i aktiv slammet sjelden overstige 5%. Ovenforstående utbyttekoeffisienter betyr også at *Nitrosomonas* spp. normalt være til stede i et større antall enn *Nitrobacter* spp. i nitrifiserende slam.

### 3.4 Faktorer som påvirker nitrifikasjon

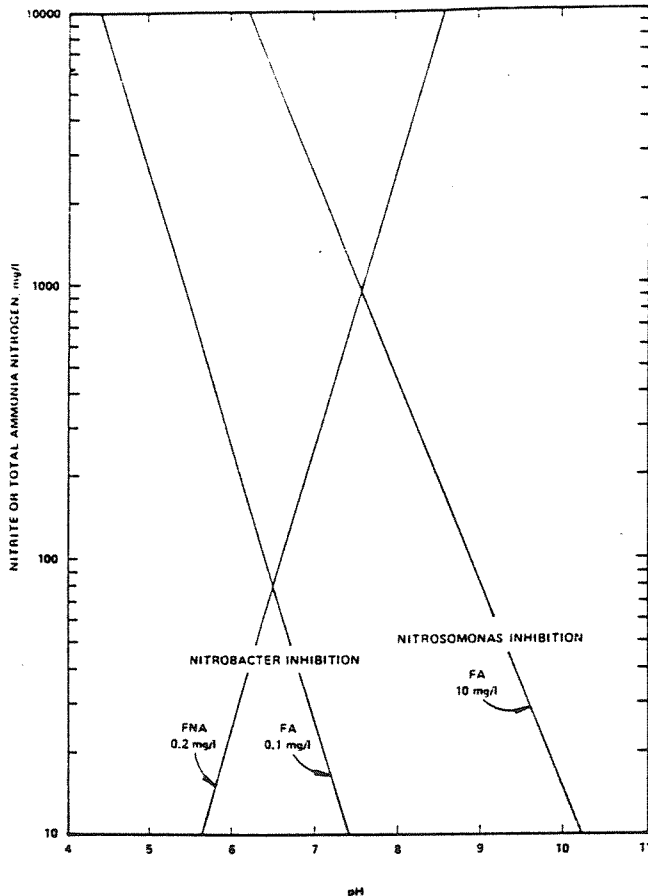
Nitrifiserende bakterier er lite konkurransedyktige i miljøer hvor det er mye lett nedbrytbart organisk stoff tilstede. For at forholdene skal ligge godt til rette for nitrifikasjon må slambelastningen derfor være lav. Flere faktorer i avløpsvannet vil påvirke nitrifikasjonen, enten ved å stimulere eller ved å hemme de aktuelle prosessene:

- konsentrasjonen av ammonium og nitrit (energikildene)
- konsentrasjonen av løst molekylært oksygen (DO)
- pH (alkalitet)
- temperatur
- forholdet mellom lett nedbrytbart organisk materiale (uttrykt som biokjemisk oksygen forbruk:  $BOF_7$ ) og nitrogen
- tilstedeværelse av giftige forbindelser



## Konsentrasjonen av ammonium og nitrit

Anthonsen et al. (1976) har vist at både ammonium og nitrit kan virke inhiberende på nitrifikasjonsprosessene når disse foreligger i store mengder. Dette skyldes i hovedsak en pH-effekt og forklares ved at ammonium og nitrit har giftvirkning i uionisert form d.v.s. som ammoniakk ( $\text{NH}_3$ ) og salpetersyring ( $\text{HNO}_2$ ). Figur 10 viser den optimale pH for nitrifisering (ved høye N-konsentrasjoner).



Figur 10. Ammonium og nitritinhibering av nitrifikasjonsprosessene (Fedlak, 1992)

FA = fri ammoniakk ( $\text{NH}_3$ )

FNA = Fri salpetersyring ( $\text{HNO}_2$ )

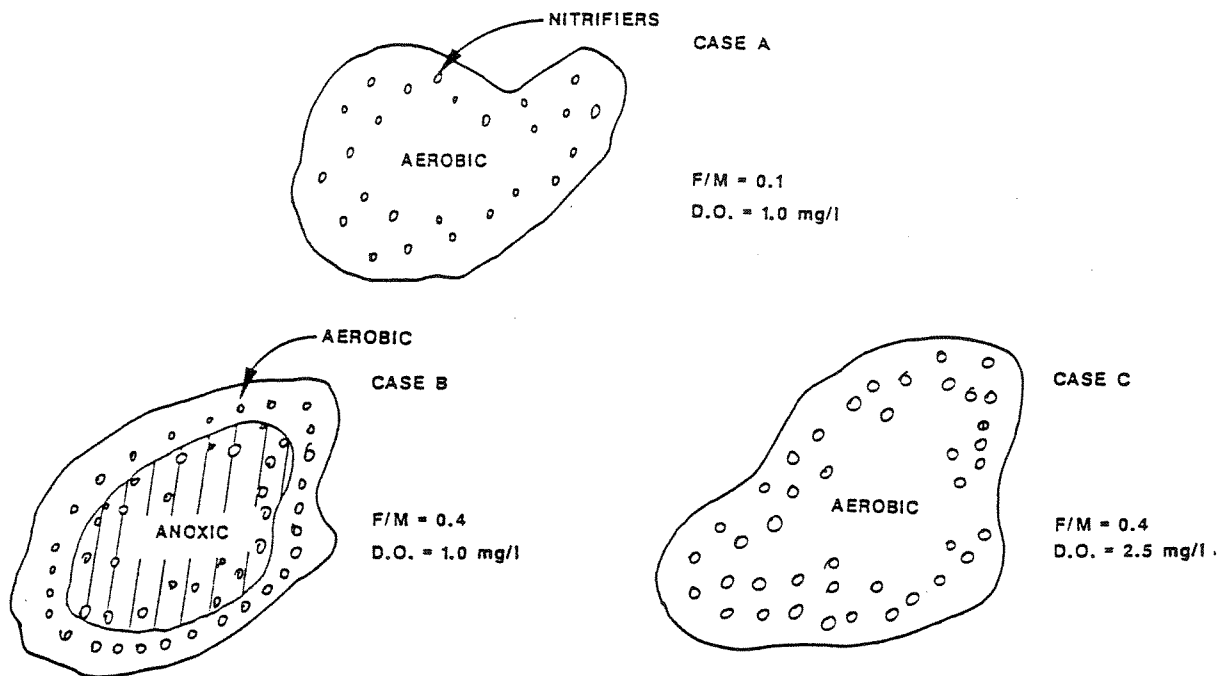
## Konsentrasjonen av oppløst molekylært oksygen

Konsentrasjonen av oppløst molekylært oksygen er en av de viktigste vekst-/reguleringsfaktorene for nitrifiserende slam. Halvmetningskonstanten  $K_{\text{DO}}$  ligger i området 0,15 - 2 mg/l (US. EPA 1975). Det er viktig at oksygenet distribueres jevnt i luftebassengene og som en tommelfingerregel kan en nedre DO-grense på 2 mg/l gjelde.

Diffusjonen for ulike forbindelser er en begrensende faktor for prosessene i aktivslam. Det betyr at de aktuelle driftskriterier også avgjøres av størrelsen på slamfnokkene, temperatur og ulike substratkonsentrasjoner. Dersom de nitrifiserende bakteriene er jevnt distribuert i slamfnokkene vil oksygenforbruket være høyt ved høy slambelastning på grunn av høy omsetning av organisk stoff. Diffusjon av oksygen inn i slamfnokkene vil avta, noe som igjen fører til at de nitrifiserende bakteriene hemmes eller dør ut.

I lavbelastede anlegg med høy slamalder vil oksygenforbruket generelt være lavt noe som muliggjør diffusjon av oksygen inn til kjernen av slamfnokkene som igjen fører til at aktiv nitrifikasjon kan opprettholdes i hele slamfnokken. Dette betyr at oksygenkonsentrasjonen må økes i høybelastede anlegg

dersom nitrifikasjon skal kunne opprettholdes. I lavbelastede anlegg vil nitrifikasjon opprettholdes ved langt lavere oksygendoseringer. Situasjonen er beskrevet gjennom eksemplet i figur 11.



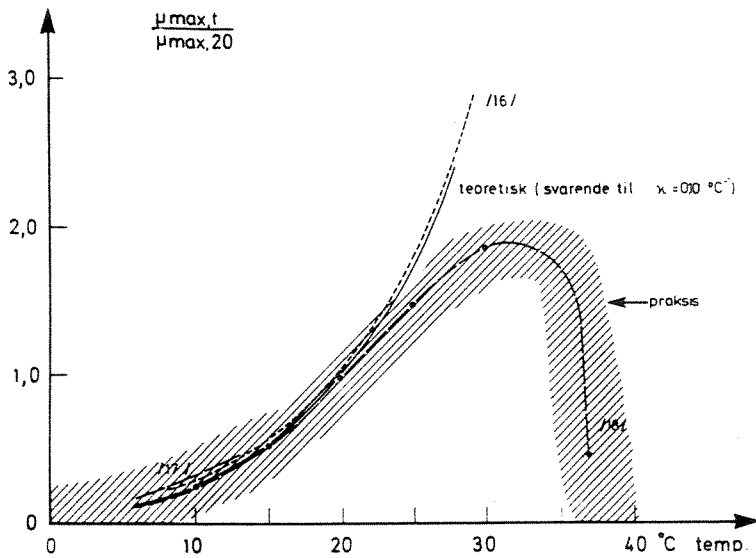
Figur 11. Effekten av slambelastning på nitrifikasjon og oksygendosering (Fedlak., 1992).

I renkulturer er det dokumentert at *Nitrobacter* spp. kan bruke  $\text{NO}_3^-$  som terminal elektronakspetor i fravær av molekylært oksygen (Bock et al., 1988). I slike tilfeller benytter bakteriene organiske forbindelser som karbonkilde. Det er imidlertid usikkert om denne type prosesser foregår i mer komplekse miljøer (f.eks i aktivslam).

## Temperatur

Veksthastigheten til nitrifiserende bakterier er sterkt påvirket av temperaturen i avløpsvannet. Optimal temperatur er beregnet å ligge i området  $30^\circ\text{C}$  (figur 12). Aktiviteten avtar med lavere temperaturer. Norsk avløpsvann har gjerne en temperaturvariasjon i området fra  $6-7^\circ\text{C}$  til  $15-16^\circ\text{C}$ .

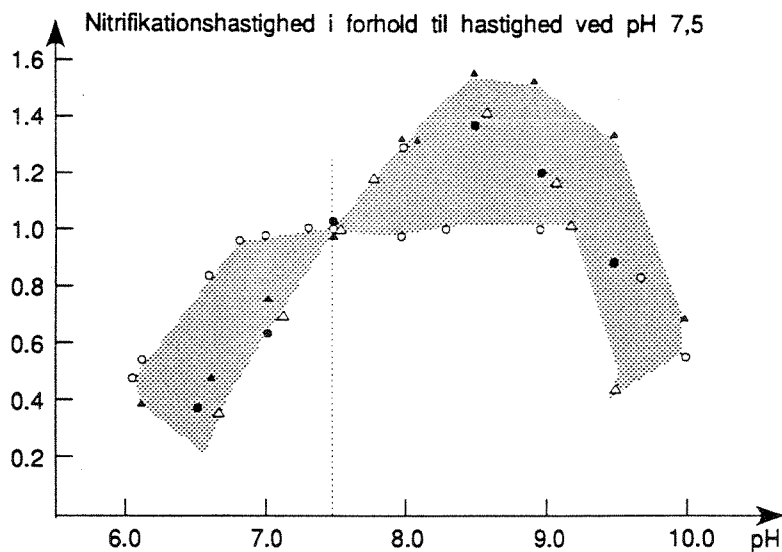
Lave temperaturer i avløpsvannet krever spesielle dimensjoneringshensyn for å oppnå nitrifikasjon.



Figur 12. Temperaturens innvirkning på nitrifikasjonsprosessene i aktivslamanlegg (Henze et al., 1992)

## pH

Optimal pH for vekst av *Nitrosomonas spp.* og *Nitrobacter spp.* ligger mellom 7,5 og 8,5 (figur 13). Nitrifikasjonen avtar sterkt under pH 6,0. Det forbrukes alkalitet som et resultat av at det produseres hydrogenioner ved oksidasjon av ammonium til nitrit. Forbruket er ca. 2 mol  $\text{HCO}_3^-$  pr. mol ammonium som oksideres eller ca. 7,14 mg  $\text{CaCO}_3/\text{mg NH}_4^+\text{-N}$  som oksideres.



Figur 13. Nitrifikasjon som funksjon av pH (Henze et al., 1992)

Det er viktig at det er nok alkalitet tilstede for å bufre denne surgjøringen av avløpsvannet. Fall i pH kan minimeres gjennom støtlufting av avløpsvannet slik at surgjørende  $\text{CO}_2$  fjernes. Det vanligste tiltaket er imidlertid å sette til bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) eller karbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) i form av et salter. Tiltak som dette fordyrer imidlertid driften av biologiske renseanlegg som i utgangspunktet skulle klare seg uten bruk av kjemikalier.

## Organisk belastning

Andelen nitrifiserende bakterier synker etter som slambelastningen øker (se kapittel 1.3.2.6). Tabell 4 viser hvilken rolle slambelastning og utløpskonsentrasjonen av lett nedbrytbart stoff betyr for nitrifikasjonen.

Tabell 4. Aktiv nitrifikasjon som funksjon av slambelastning og konsentrasjon lett nedbrytbart organisk materiale (Henze et al., 1992).

Slambelastning (g oppløst BOF <sub>7</sub> /FSS x døgn)	0,05	0,15	0,3	0,6
BOF <sub>7</sub> i utløpet (g / m <sup>3</sup> )	5 - 10	10 - 20	15 - 25	20 - 40
Nitrifikasjon	+	(+)	-	-

## Giftige forbindelser

Nitrifiserende bakterier utsettes for både substrat og produktinhibering. I tillegg vil giftige forbindelser i avløpsvannet hemme en eller begge nitrifikasjonsprosessene. Det viser seg at flere giftstoffer har en sterkere virkning overfor *Nitrosomonas* spp. enn *Nitrobacter* spp. (Bitton, 1983, Bitton et al., 1989)

Organisk stoff i avløpsvannet har ingen direkte giftvirkning overfor nitrifiserende bakterier. Den hemmende virkningen som høye BOF<sub>7</sub>-konsentrasjoner har forklares simpelthen ved oksygenbegrensning. Nitrifiserende bakterier har lavere affinitet til molekylært oksygen enn det konkurrerende heterotrofe bakterier har (Barnes og Bliss, 1983).

Det er vist at følgende forbindelser har spesielt sterke giftvirkninger overfor nitrifiserende bakterier:

- cyanid (CN<sup>-</sup>), thiourea, fenol(er), aniliner, tungmetaller (sølv, kvikksølv, nikkel og sink)

Den generelle regelen om at nitrifikasjon er en spesielt følsom prosess kan vise seg å være en myte (Henze et al., 92). Virkningen som endel tungmetaller og vanlig kjente organiske miljøgifter har på nitrifikasjon er nemlig ofte dokumentert i *renkulturer*. I aktiv slamsystemer er det imidlertid neppe grunn til å anta at nitrifikasjonsprosessen er spesielt mer følsomme overfor giftstoffer enn andre aerobe mikrobielle prosesser.

Tabell 5 viser at disse bakteriene kan tåle relativt store konsentrasjoner med kjente industrikjemikalier, tilsatsstoffer og antibiotika.

Tabell 5. Konsentrasjonen av ulike miljøgifter som gir 75% hemming av nitrifikasjon i aktivslam

Organisk forbindelse	Konsentrasjon (mg/l) som gir 75% hemming	Organisk forbindelse	Konsentrasjon (mg/l) som gir 75% hemming	Organisk forbindelse	Konsentrasjon (mg/l) som gir 75% hemming
acetone	2 000	kloroform	18	fenol	5,6
allyl	1,9	cresoler	11,4 - 16,5	streptomycin	> 400
icotiocyanat		(o,m og p)			
karbon	35	etanol	2 400	thioacetamid	0,53
disulfid					
kobber	150	metyl	0,8	thiourea	0,076
		isotiocyanat			
krom (Cr <sup>3+</sup> )	118	EDTA	> 350	trimetylammin	118

I renkulturer er det imidlertid dokumentert at giftvirkningen av endel tungmetaller øker med økende konsentrasjon av NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Som et eksempel vises til at giftvirkningen som kobber har overfor *Nitrosomonas europaea* økes med økende ammoniumkonsentrasjoner, fra 3 mg/l til 23 mg/l (Sato et al., 1988).

### 3.5. Reaksjonskonstanter for nitrifiserende bakterier

Tabell 6 gir eksempler på noen reaksjonskonstanter for nitrifiserende bakterier.

Tabell 6. Reaksjonskonstanter for nitrifiserende bakterier

Type reaksjonskonstant	Symbol	Benevning	Dokumenterte Verdier for <i>Nitrosomonas</i>	Dokumenterte Verdier for <i>Nitrobacter</i>	Dokumenterte Verdier for Total-prosess
Maksimal spesifikk veksthastighet	$\mu_n$	d <sup>-1</sup>	0,6-0,8 <sup>3</sup>	0,6-1,0 <sup>3</sup>	0,6-0,8 <sup>3</sup> 0,28-0,45 <sup>4</sup> 0,14-0,84 <sup>5</sup>
Halvmetningskonstant substrat	K <sub>NH<sub>4</sub></sub>	g NH <sub>4</sub> -N/m <sup>3</sup>	0,3-0,7 <sup>3</sup> 0,05-5,6 <sup>6</sup>	0,8-1,2 <sup>3</sup> 0,06-8,4 <sup>6</sup>	0,3-0,7 <sup>3</sup> 0,5 <sup>4</sup>
Halvmetningskonstant molekylært oksygen	K <sub>DO</sub>	g O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,5-1,0 <sup>3</sup>	0,5-1,5 <sup>3</sup>	0,5-1,0 <sup>3</sup> 0,2-1,0 <sup>4</sup> 1,3 <sup>7</sup>
Bioreduksjon	b	d <sup>-1</sup>	0,03-0,06 <sup>3</sup>	0,03-0,06 <sup>3</sup>	0,03-0,06 <sup>3</sup>
Maksimalt vekstutbytte	Y <sub>max</sub>	g FSS/g KOF	0,1-0,12 <sup>3</sup> 0,05-0,29 <sup>4</sup> 0,04-0,13 <sup>5</sup>	0,05-0,07 <sup>3</sup> 0,02-0,08 <sup>4</sup> 0,02-0,07 <sup>5</sup>	0,15-0,20 <sup>3</sup> 0,15 <sup>5</sup>

<sup>3</sup>Henze et al. (1992)

<sup>4</sup>Fedlake (1993)

<sup>5</sup>Bitton (1993)

<sup>6</sup>Verstraete og Vaerenberg, 1986

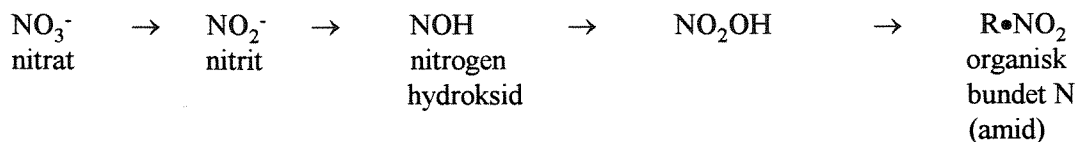
<sup>7</sup>Metcalf og Eddy, 1991

### 3.6 Denitrifikasjon

Mikrobiell reduksjon av nitrat kalles denitrifikasjon og skjer ved to mekanismer;- assimilatorisk og dissimilatorisk.

### 3.7 Assimilatorisk denitrifikasjon

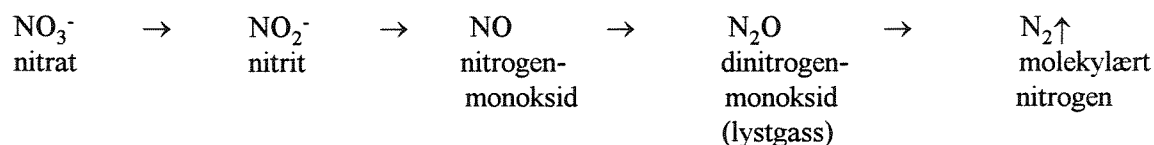
Ved denne prosessen tas nitrat opp og omdannes til ammonium i mikroorganismen. Ammonium brukes videre i syntesen av makromolekyler i cellen (f.eks proteiner). Noen kjente mellomprodukter ved assimilatorisk denitrifikasjon er:



Enzymene som er aktive ved assimilatorisk denitrifikasjon er ikke påvirket av molekylært oksygen i det hele tatt. Assimilatorisk denitrifikasjon er heller ikke ansett å være av spesiell betydning for fjerning av nitrogen i renseanlegg.

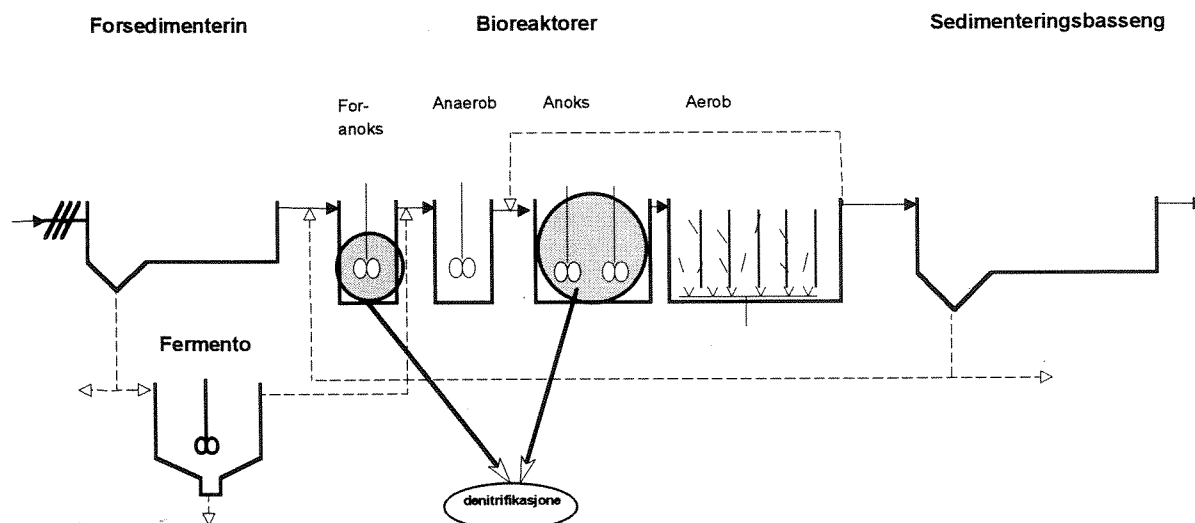
### 3.8 Dissimilatorisk denitrifikasjon

Dette er egentlig en anaerob respirasjon. d.v.s. en celleånding uten luft til stede. Nitrat inngår som terminal elektronakseptor i elektrontransportkjeden i stedet for molekylært oksygen. I prosessen reduseres nitrat til molekylært nitrogen ( $\text{N}_2$ ) via en rekke mellomprodukter:



Molekylært nitrogen er hovedproduktet fra dissimilatorisk denitrifikasjonen. Siden denne gassen har lav vannløslighet vil den unslippe renseanlegget til atmosfæren. Produksjon av nitrogenbobler kan bli så omfattende at dette forårsaker driftsproblemer gjennom å føre til dårligere sedimentasjonsegenskaper i slammet.

Anleggsutformingen ved Groos legger opp til denitrifikasjon i to deler av prosesslinjen som vist i figur 14. I senere kapitler vil denitrifikasjon være ensbetydende med dissimilatorisk denitrifikasjon.



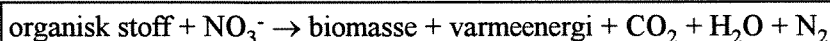
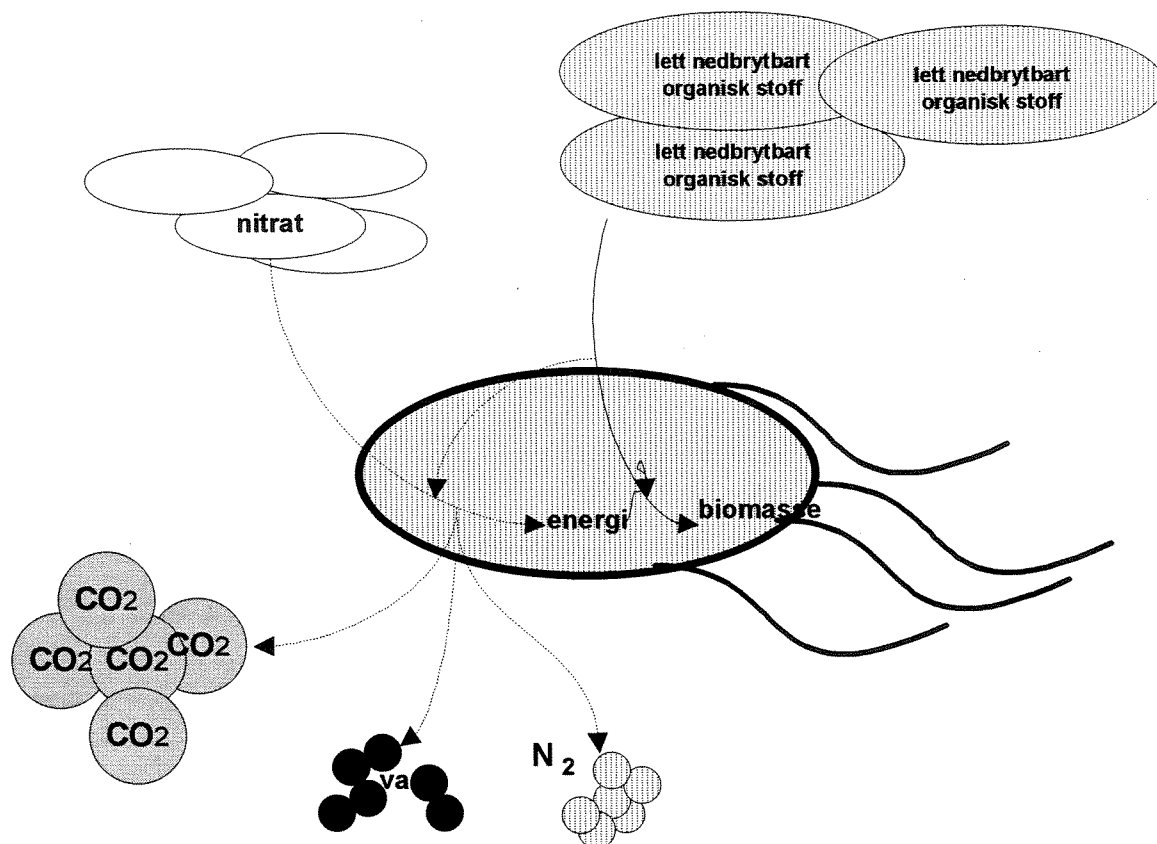
Figur 14. Denitrifikasjon i rensenanlegget på Groos

Denitrifiserende bakterier tilhører en hel rekke forskjellige grupper, hvorav noen av de mest kjente er:

- *Pseudomonas* spp.
- *Bacillus* spp.
- *Acinetobacter* spp.
- *Alcaligenes* spp.
- *E.coli* (*Escherichia coli*).

Stort sett er dette bakterier som også bruker molekylært oksygen som terminal elektronakseptor. Når konsentrasjonen av oppløst molekylært oksygen synker under et visst nivå begynner disse bakteriene å produsere enzymene som er nødvendige for å drive denitrifikasjonen.

Stoff-flyten gjennom en denitrifiserende bakterie er vist i figur 15



Figur 15. Stoff-flyten ved denitrifikasjon

$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{N}$  er en generell formel for organisk stoff slik det foreligger i avløpsvann (Henze et al., 1992).

Nedbrytning av 1 gram "modellsubstrat" kan teoretisk gi et celleutbytte på 0,47 g som ligger nær opp til det som forventes ved aerob heterotrof omdanning. I dette tilfellet benyttes imidlertid all energien fra denitrifikasjonen til cellevekst og bakteriene får nitrogen gjennom assimilering av ammonium (jfr. kapittel 1.3.1). Reaksjonslikningen kan fremstilles som vist av Henze et al. (1992):



Vi ser av likningen at denitrifikasjon produserer alkalitet. Reduksjon av ett mol nitrat gir litt i underkant av 1 ekv. alkalitet dersom bakteriene i aktivslammet bruker ammonium som nitrogenkilde, hvilket normalt vil være situasjonen.

Denitrifikasjon vil dermed delvis oppveie for nitrifikasjonens forbruk av alkalitet (jfr. kap 1.3.3.4).

### 3.9 Denitrifikasjonskinetikk

Kinetikken ved denitrifikasjon beskrives normalt ved et Monoduttrykk.

$$\mu_D = \mu_{\max} * \left\{ \left[ \frac{[\text{NO}_3^-]}{K_{\text{NO}_3} + [\text{NO}_3^-]} \right] * \left[ \frac{S}{K_s + S} \right] \right\}$$

$\mu_D$  = veksthastigheten for denitrifiserende bakterier

$\mu_{\max}$  = maksimal veksthastighet for denitrifiserende bakterier

$K_{\text{NO}_3}$  = halvmetningskonstanten for nitrat



Spesifikk nitratomsetning ( $dNO_3/dt$ ) forholder seg til spesifikk veksthastighet som vist i likningen:

$$dNO_3/dt = \{ (\mu_{max}/Y_{max}) * [S/(S+K_s)] * X_B \}$$

Normalt vil konsentrasjoner av substrat (organisk stoff i avløpsvannet) og nitrat være mye høyere enn verdiene for de respektive halvmetningskonstantene, henholdsvis 20 mg KOF/l og 0,5 mg  $NO_3^-/l$ .

Uttrykket over vil derfor kunne forenkles til:

$$dNO_3/dt = \mu_{max}/Y_{max} * X_B$$

I et renseanlegg skilles det mellom såkalt etterdenitrifikasjon og fordenitrifikasjon.

I *etterdenitrifikasjonsanlegg* doseres metanol eller annet substrat inn i prosessen.

Anlegg etableres med fordenitrifikasjon fordi substratmengden i avløpsvannet vurderes å være tilstrekkelig høy til å sikre ønsket denitrifikasjon.

### 3.10 Faktorer som påvirker denitrifikasjon

Faktorer som innvirker på denitrifikasjonsprosessen:

- molekylært oksygen
- kvalitet og konsentrasjon av organisk stoff
- pH
- temperatur
- giftige forbindelser og sporstoffer

#### Molekylært oksygen

Molekylært oksygen konkurrerer effektivt med nitrat som terminal elektronakseptor i respirasjonen. Oksidasjon av ett mol glukose med molekylært oksygen som terminal elektronakseptor frigir mer energi enn med nitrat som terminal elektronakseptor, henholdsvis 686 kcal og 570 kcal, og bakteriene foretrekker, akkurat som oss, "prima vare" når denne finnes. Dette er også årsaken til at denitrifikasjon må skje i fravær av molekylært oksygen. Vi sier at molekylært oksygen hemmer denitrifikasjonsprosessen. Som en tommelfingerregel kan 1 mg DO/l settes som absolutt øvre grense for DO i et denitrifiserende basseng.

Normalt vil oksygenhemming fremstilles som et Monoduttrykk:

$$K_{DO(NO_3)} / (K_{DO(NO_3)} + [DO])$$

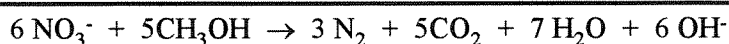
$K_{DO(NO_3)}$ : halvmetningskonstanten for oksygenhemming

På grunn av diffusjonsforhold i slamfnokker kan denitrifikasjon utmerket godt foregå i avløpsvann med relativt høye DO-konsentrasjoner. Slambelastningen må imidlertid være høy i slike systemer slik at diffusjons-begrensninger fører til at reell  $O_2$ -konsentrasjon inne i fnokkene er lavere enn i væskefasen.

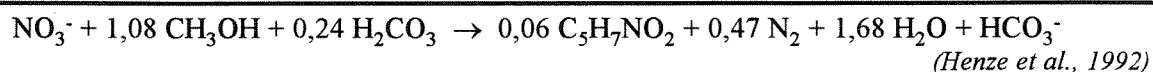
## Kvalitet og konsentrasjon av organisk stoff

Denitrifiserende bakterier er avhengige av å ha lett nedbrytbare organiske forbindelser tilgjengelig for å være effektive ved de hydrauliske oppholdstidene (HRT) som er aktuelle i renseanlegg. Avløpsvannet kan i seg selv være en god karbonkilde (fordenitrifikasjon)<sup>8</sup>, men ofte må eksterne karbonkilder doseres til prosessen (etterdenitrifikasjon).

Det finnes flere slike substrater. Metanol og eddiksyre er blant de best undersøkte. Nebrytning av metanol ved denitrifikasjon er fremstilt i reaksjonslikningen under:

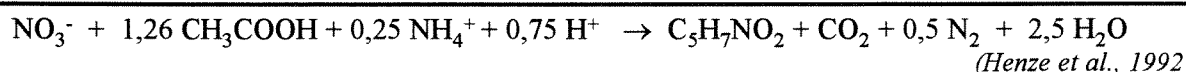


For å redusere ett mol med nitrat går det med 5/6 mol metanol. Noe av metanolen brukes imidlertid til syntese og vedlikehold av cellene:



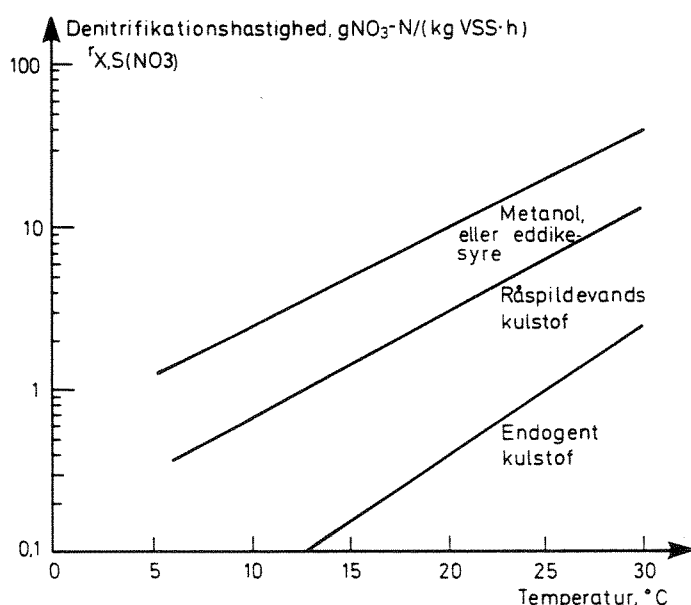
For å fjerne 1 gram med nitrat-nitrogen vil ca. 2,5 g metanol (tilsvarer 3,7 g KOF) omdannes. Ut fra denne substratmengden vil det produseres 0,45 g med celledmasse og dannes ca. 3,6 g alkalitet.

Tilsvarende likning ved denitrifikasjon av eddiksyre er:



Her produseres 0,75 ekv. alkalitet for hvert mol nitrat-N som omsettes. Grunnen til at tallet blir lavere enn for metanolomsetning er at eddiksyren i seg selv forbruker noe alkalitet.

I figur 16 vises sammenhengen mellom karbonkilde og spesifikk denitrifikasjonshastighet.



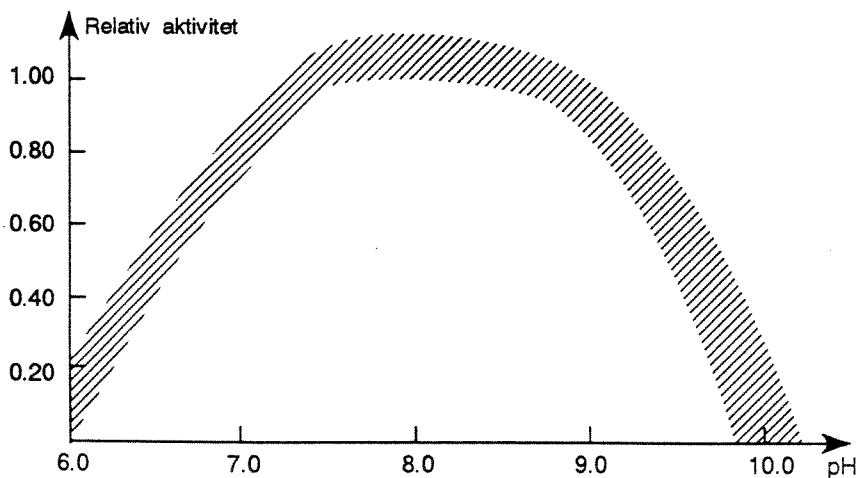
Figur 16. Sammenheng mellom spesifikk denitrifikasjonshastighet, karbonkilde og temperatur (Henze et al., 1992)

<sup>8</sup>Prosessvann fra ulike næringsmiddelindustri kan være en ressurs for biologiske renseprosesser som f.eks. denitrifikasjon og fosforakkumulering. Også annet industrielt avløpsvann kan i enkelte tilfeller brukes som karbonkilder for denitrifikasjon.

## pH

I avløpsvann er denitrifikasjon mest effektiv ved pH verdier mellom 7,0 og 9,0 (Christensen og Harremoës, 1978, Henze et al., 1992). Alkaliteten stiger som følge av denitrifikasjonsprosessen. Pr. 1 mg nitrat som reduseres til molekylært nitrogen produseres 3,6 mg alkalitet målt som  $\text{CaCO}_3$ . Det betyr at omlag halvparten av den alkaliniteten som forbrukes gjennom nitrifikasjonsprosessen tilbakeføres.

Figur 17 viser denitrifikasjon som funksjon av pH.



Figur 17. Denitrifikasjon som funksjon av pH (Henze et al., 1992).

## Temperatur

Denitrifikasjon skjer over et vidt temperaturspenn og påvirkes av denne på omtrent samme måte som aerob heterotrof omdanning. D.v.s. at den empiriske likningen:  $\mu_{(max)}(T) = \mu_{(max)}(20^\circ\text{C})^{\theta(T-20)}$  også gjelder ved denitrifikasjon. Denitrifikasjon kan også skje termofilt. Veksthastigheten ved  $50^\circ\text{C}$  er omtrent 50% av den som måles ved  $35^\circ\text{C}$ .

Figur 16 (over) beskriver forøvrig spesifikk denitrifikasjonshastighet som funksjon av karbonkilde og temperatur. Det er en positiv sammenheng mellom temperaturløselvne og innhold av lett omsettbare substrater som eddiksyre og metanol.

## Effekten av giftstoffer

Generelt gjelder at denitrifiserende bakterier er mindre sensitive overfor giftstoffer enn nitrifiserende bakterier.

Flere av enzymene som er aktive ved denitrifikasjon (blant annet *nitrat reduktase*) er avhengige av selen (Se) og fremfor alt molybden (Mo). Tilsats av disse metallene kan vise seg å stimulere denitrifikasjonsprosessene (Chakrabarti og Jones, 1983).

### 3.11 Reaksjonskonstanter for nitrifiserende bakterier

Tabell 7 gir eksempler på noen reaksjonskonstanter for denitrifiserende bakterier.

Tabell 7. Reaksjonskonstanter for dissimilatorisk denitrifiserende bakterier (Henze et al., 1992).

Type reaksjonskonstant	Symbol	Benevning	Verdier
Maksimal spesifikk veksthastighet, avløpsvann /KOF	$\mu_{\max}$	$d^{-1}$	3 - 6
Maksimal spesifikk veksthastighet, metanol			5 - 10
Maksimal spesifikk veksthastighet, eddiksyre			5 - 10
Halvmetningskonstant nitrat	$K_{NO_3}$	$g\ NH_4-N/m^3$	0,2 - 0,5
Halvmetningskonstant molekylært oksygen	$K_{DO(NO_3)}$	$g\ O_2/m^3$	0,1 - 0,5
Halvmetningskonstant, avløpsvann/KOF	$K_{KOF}$	$d^{-1}$	10 - 20
Halvmetningskonstant, metanol	$K_{MeOH}$		5 - 10
Halvmetningskonstant, eddiksyre	$K_{HAc}$		5 - 10
Temperaturkonstant	$\kappa$	$^{\circ}C^{-1}$	0,06 - 0,12
Dødsratekonstant	$b$		0,05 - 0,1
Maksimalt vekstutbytte, avløpsvann/KOF	$Y_{\max}$	$g\ FSS/g\ KOF$	0,4 - 0,6
Maksimalt vekstutbytte, metanol		$g\ FSS/g\ NO_3-N$	1,6 - 1,8
Maksimalt vekstutbytte, eddiksyre		$g\ FSS/g\ metanol$	0,5 - 0,65

## 4. Bakterier og fosfor

Fosfor er et sentralt næringsstoff for alle levende organismer. Det er en viktig bestanddel av DNA og av *fosfolipidene* som er byggesteiner i cellemembran og cellevegg. Fosfor er en viktig komponent i ATP, da det er avspalting av fosfor (i en fosforylgruppe) som frigir energien som bakteriecellene bruker til de aller fleste av livsfunksjonene.

En vanlig bakterie inneholder 1-2 % fosfor (% av TS).

### 4.1 Fosforassimilasjon

Bakterier kan normalt ikke ta opp organiske fosfor-forbindelser, men er avhengig av at fosfor foreligger løst og på ioneform som ortofosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). En høy andel ortofosfat i avløpsvannet vil derfor være en fordel for mikrobiell vekst. Imidlertid vil organiske fosforforbindelser kunne mineraliseres (omdannes) til ortofosfat av en lang rekke bakterier. Det er enzymer av type *fosfataser* som er aktive i disse prosessene.

Dersom konsentrasjonen av  $\text{BOF}_7$  og fosfor i avløpsvannet inn på et aktivslam anlegg er henholdsvis 120 mg og 3 mg/liter, vil mikrobiell vekst alene kunne fjerne 60% fosfor gjennom assimilasjon i biomassen.

### 4.2 Biologisk fosforfjerning

Ved biologisk fosforfjerning i renseanlegg (bio-P anlegg) økes rensegraden ved at bakterier tar opp og akkumulerer mer fosfor enn det som behøves for oppbygging av de normale cellebestanddelene. I tillegg til denne fosforakkumuleringen skjer det også en "naturlig" kjemisk felling av fosfor som funksjon av de helt spesielle mikrobielle prosessene som etableres i deler av slike anlegg.

#### Mikrobiell bevirket kjemisk felling

Naturlige kjemiske fellingsreaksjoner viser seg å spille en rolle ved biologisk fosfor-fjerning. En mulig årsak til dette er at ortofosfat som løses ut i den anaerobe selektoren reagerer med metaller som er til stede i avløpsvannet (Arvin, 1983). Det er dokumentert at fosfor foreligger som salter av magnesium (Mg), kalsium (Ca) og kalium (K) (van Groenestijn, 1988., Comeau et al., 1987). Disse metallene kan karakteriseres som "biologiske" og fungerer som motkationer i *antiportsystemer* som koples til transport av negativt ladde ortofosfat-molekyler ut av og inn i cellen. Avløpsvannets innhold av disse metallene kan i helt spesielle tilfeller være så lave at biologisk felling begrenses.

I biofilmanlegg med denitrifikasjon vil forhøyede alkalitetsverdier inne i bakteriefilmen også legge forholdene til rette for øket utfelling av fosfor.

#### Akkumulering av polyfosfat i bakterier

Med fosforakkumulering eller luksusopptak forstås at bakteriene tar opp mer fosfor enn det som brukes for oppbygging av den normale bakteriecellen, d.v.s. 1-2 % av tørrstoff. Relativt mange bakterier har denne egenskapen:

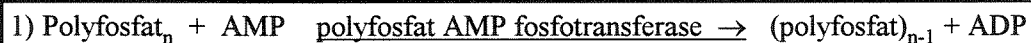
- *Acinetobacter* spp.
- *Pseudomonas* spp.
- *Aerobacter* spp.
- *Moraxella* spp.
- *Escherichia coli*
- *Mycobacterium* spp.
- *Beggiatoa* spp.

Det er ikke klarlagt om *Acinetobacter* spp. er den dominerende fosforakkumulerende bakterien i aktivslam. Resultater kan tyde på at det er en sammenheng mellom avløpsvannets innhold av organisk materiale og sammensetningen av den fosforakkumulerende flora. Auling et al. (1991) viste at *Acinetobacter* spp. i hovedsak dominerte i avløpsvann med lave konsentrasjoner med organisk materiale. Streichan et al. (1990) viste at det også kan være en sammenheng mellom anleggsutforming og type fosforakkumulerende bakterier som selekteres. Lötter og Murphy (1985) viste i et omfattende arbeide med slam fra ulike soner i et bio-P/N anlegg at *Acinetobacter* spp. var den dominerende bakterien.

Fosfor som tas opp i overskudd lagres i lange fosforkjeder (*polyfosfater*) som kan observeres som mørke (høy tetthet) partikler under lysmikroskop. Polyfosfatene tjener som energi og muligens også som fosforkilde for bakteriene.

Enzymet ATP: *polyfosfat phosphotransferase*, er dokumentert å katalyserer sluttreaksjonen i syntese av polyfosfat. I nærvær av magnesium ioner ( $Mg^{2+}$ ) overføres den terminale fosforylgruppen fra ATP til den voksende polyfosfat-kjeden (Wentzel et al. 1986).

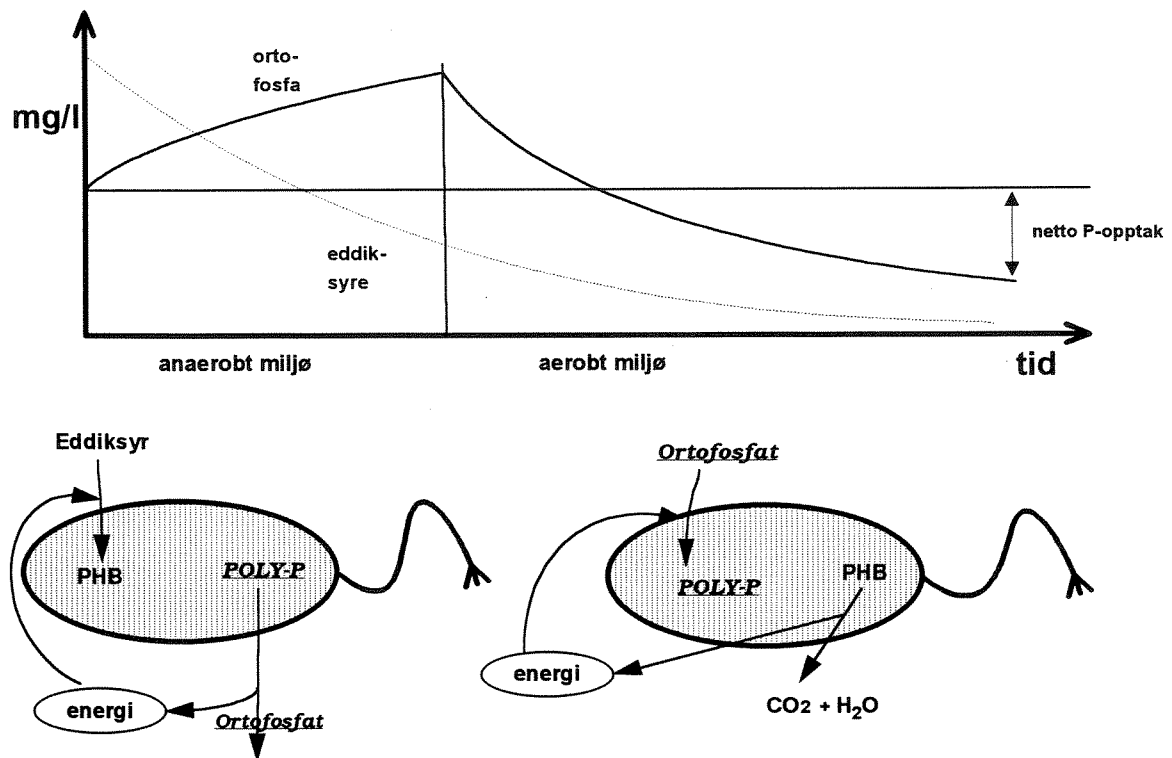
Nedbrytningen av polyfosfater katalyseres av flere enzymer i henhold til minst 3 vel dokumenterte reaksjonsveier. Et reaksjonsforløp er vist i reaksjonslikningene under (Wentzel et al., 1986).



Polyfosfataser er representanter for *hydrolytiske* enzymer som involveres i nedbrytningen av polyfosfater.

Poly-P bakterier (polyfosfatakkumulerende bakterier) tar opp fosforen under aerobe forhold, akkumulerer den som polyfosfat for så å skille fosforen ut igjen under anaerobe forhold.

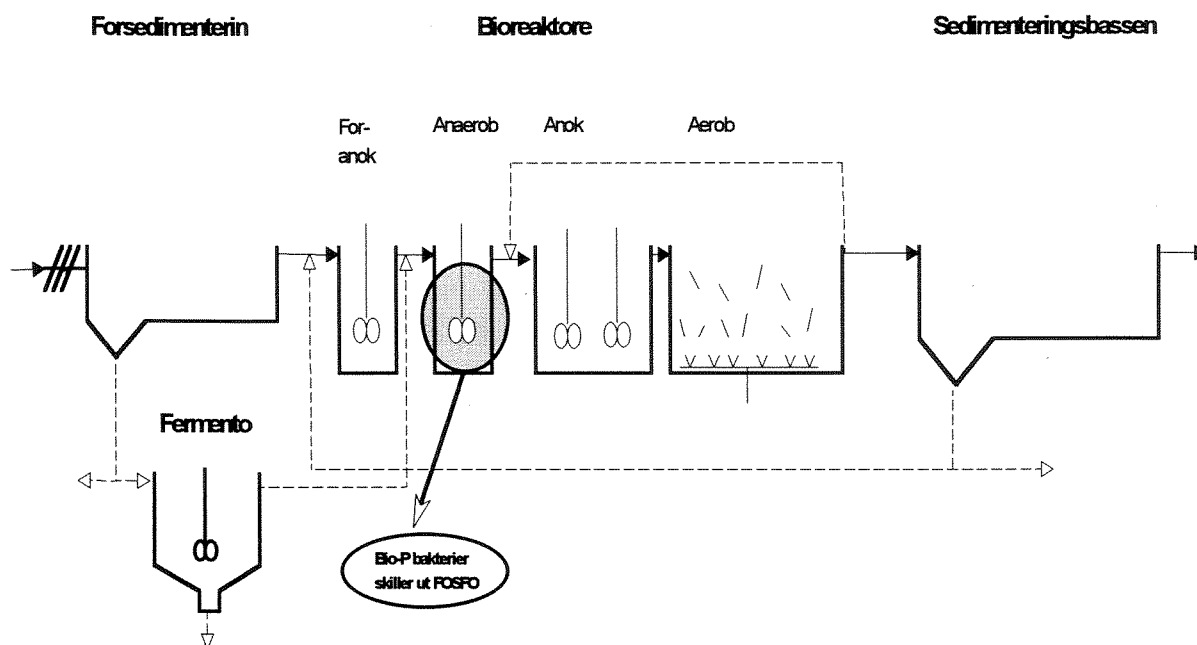
Figur 18 viser utlekking og opptak av fosfor som funksjon av oksygenforholdene i avløpsvannet.



Figur 18. Fosforflyt ut og inn av bakteriecellen som funksjon av miljø.

#### Utskilling av fosfor under anaerobe forhold.

Etablering av et anaerobt trinn i forkant av de luftede bassengene er funnet å være helt nødvendig for å få til bio-P fjerning. Det anaerobe trinnet kalles en selektor fordi det legger forholdene til rette for en type bakterier som tåler store svingninger i redokspotensialet. Groos RA etableres som et 4-trinns Bardenpho anlegg hvor selektorens plassering med anaerob utløsning av fosfor er tegnet inn i figur 19 under.



Figur 19. Utløsning av fosfor i det anaerobe trinnet ved Groos RA.

Under anaerobe forhold bruker bakteriene energi som produseres fra hydrolyse av polyfosfat til å ta opp korte fettsyrer (VFA= volatile fatty acids), f.eks eddiksyre eller propionsyre, som igjen lagres som polyfettsyrer i form av PHB (*poly-β-hydroksybutyrat*) eller PHV (*poly-β-hydroksyvalerat*) inne i bakteriecellen. PHB og PHV fungerer som karbonreserver eller opplagsnæring for bruk i aerobt miljø (Wentzel et al., 1991)<sup>9</sup>.

Syntese av PHB skjer ut fra eddiksyre som råstoff. Eddiksyren omdannes til *acetyl-CoA* ved hjelp av energi som frigis fra hydrolyse av polyfosfater. NADH som virker som reduserende kraft ved syntesen av PHB/PHV dannes gjennom nedbrytning av intracellulært organisk stoff.

I det anaerobe bassenget vil tilstedeværelse av bakterier som f.eks *Aeromonas spp.* være viktig for å produsere flyktige fettsyrer fra andre tilgjengelige organiske lett nedbrytbare forbindelser i avløpsvannet. I mange anleggsutforminger inngår også egne surningstanker der fettsyrene dannes gjennom hydrolyse av mekanisk slam fra forsedimenteringsbassengene. Surningstanken etableres for å sikre tilstrekkelig karbonopptak og dermed optimale forhold for maksimal fosforakkumulering i den aerobe fasen.

Ved siden av eddiksyre og propionsyre er det vist at følgende substrater kan gi fosforakkumulering i aktivslam systemer (Abu-Ghararah og Ransdall, 1990, Jones et al., 1987).

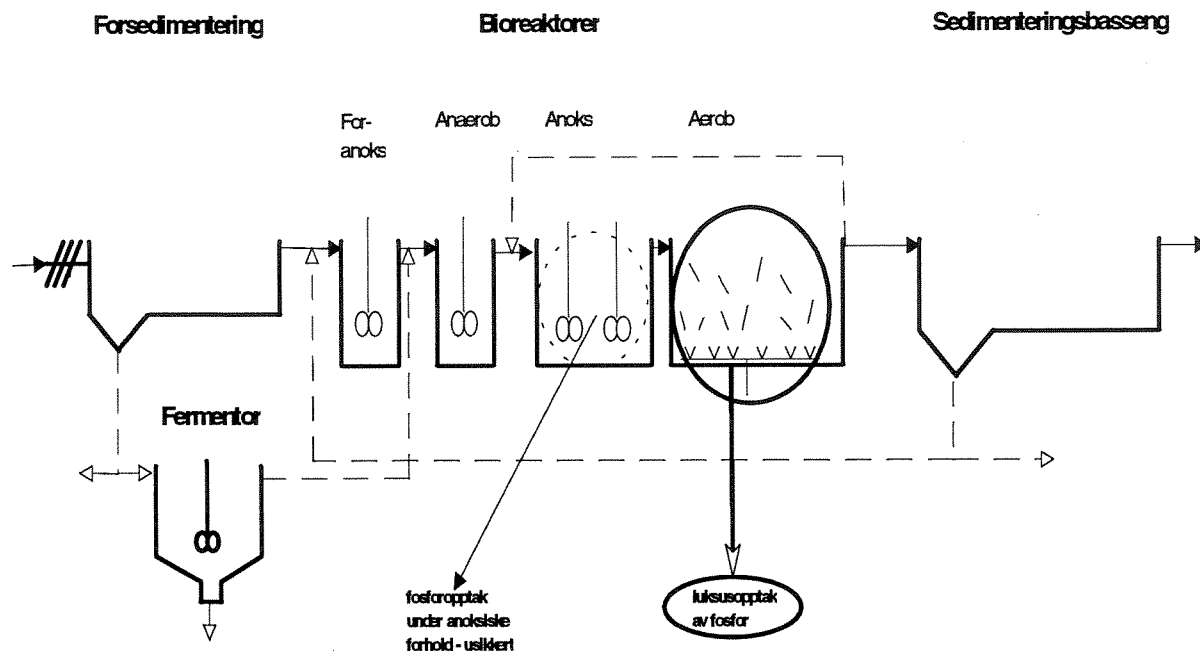
- smørsyre (C<sub>4</sub>) og iso-smørsyre
- valerinsyre og isovalerinsyre
- etanol og metanol

<sup>9</sup>Opptaket av fettsyrene har også som funksjon i å regulere pH over den *cytoplasmatiske membranen*. Det er dette fenomenet som fører til at fosfor skiller ut som ortofosfat i mediet.



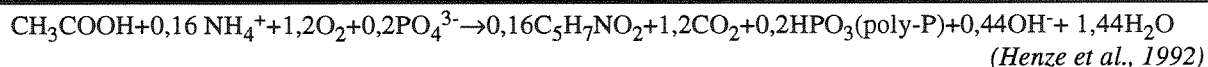
## Fosforakkumulering i aerob fase

Figur 20 viser hvor fosforakkumuleringen vil foregå i et 4-trinns Bardenpho anlegg som er aktuelt på Groos.



Figur 20. Akkumulering av fosfor i Groos-anlegget

Syntese av polyfosfater ved aerobe forhold kan forenklet beskrives ved følgende reaksjonslikning:



Det er dokumentert at det også kan foregå fosforakkumulering ved anoksiske forhold (lave konsentrasjoner med molekylært oksygen og forhøyede konsentrasjoner av nitrat).

Utbyttet ved aerob poly-P akkumulering målt som suspendert stoff kan bli meget høyt p.g.a. fosforanrikningen. I renkultur er utbyttet opp til 1,2 g SS / g KOF dokumentert. I slike celler er fosforinnholdet > 10% av TS.

### 4.3 Biokjemiske modeller for fosforakkumulering

Det er utarbeidet flere modeller som forsøker å forklare de biokjemiske prinsippene i bio-P anlegg (Comeau et al. 1986., Wentzel et al. 1986., Miro et al. 1987).

I det nedenforstående beskrives Wentzels modell fra 1986 (har sitt utgangspunkt i Comeaus modell). Denne modellen synes frem til nå å gi den mest helhetlige forklaring på hvilke miljøsammenhenger som er nødvendige og hvilke reguleringsmekanismer som er aktive i bio-P prosene.

Modellen omhandler *Acinetobacter* spp. i en anaerob - aerob sekvens som fører til opptak av fosfor i overskudd.

#### Anaerob fase

## Anaerob fase

Med anaerob fase menes i denne sammenheng et miljø uten ekstern elektronakseptor til stede, - d.v.s. fravær av molekylært oksygen og nitrat. I tillegg må avløpsvannet inneholde relativt høye konsentrasjoner med lett nedbrytbart organisk materiale.

I et anaerobt miljø vil det pr. definisjon ikke være til stede proton- eller elektron"feller". Dette fører igjen til at et NADH/NAD-forhold vil øke og derfor også til at det produksjon av ATP gjennom oksidativ fosforylering opphører. Uten ATP-produksjon vil ATP/ADP-forholdet avta.

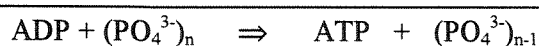
Effekten av et økende NADH/NAD-forhold og et avtagende ATP/ADP-forhold vil være henholdsvis hemming og stimulering av TCA-syklus. Det vil ut fra dette fremstå som klart at tilstedeværelse av en proton/elektron-"felle" for nydannet NADH fører til stimulering av TCA-syklus. Et synkende ATP/ADP-forhold vil videre stimulere ATP-produksjon via hydrolyse av opplagret poly-P med påfølgende overføring av en energirik fosforyl-gruppe til ADP (*adenocyl-kinase*).

Dersom det hadde vært en elektron og energikilde til stede ville konsekvensen av en høy konsentrasjon av organisk karbon være at organismen kunne ta opp organisk karbon og lagre dette som poly- $\beta$ -hydroksybutyrat (PHB). Kilden til elektroner vil variere avhengig av de(t) substratet som var tilgjengelig. Siden det best dokumenterte substratet for *Acinetobacter* spp. er eddiksyre vil denne C<sub>2</sub>-forbindelsen benyttes i modellen.

## Hovedteser (anaerob fase)

Nedenfor beskrives de anaerobe forutsetningene for modellen:

- En høy konsentrasjon av eddiksyre i avløpsvannet tillater *passiv diffusjon* over den cytoplasmatiske membran *uten* forbruk av energi (nøytral diffusjon).
- *Aktivering av eddiksyre* til acetyl-CoA gjennom koplet ATP hydrolyse får ATP/ADP-forholdet til å avta. Dette vil i sin tur stimulere nydannelse av ATP gjennom nedbryting av poly-P med tilhørende overføring av energirik fosforylgruppe til ADP.



- *Hydrolyse* av poly-P for dannelse av ATP og etterfølgende forbruk av ATP, øker det intracellulære nivå av ortofosfat. Gjennom poly-P nedbrytning vil kationene som stabiliserer den negative ladningen på poly-P kjeden frigjøres med det resultat at den intracellulære kationekonsentrasjonen også øker. Fosfat (negativ ladning) og kationer (M<sup>+</sup>) vil derfor frigis til avløpsvannet.
- Den høye konsentrasjonen av acetyl-CoA og et tilsvarende høyt NADH/NAD-forhold stimulerer PHB-syntese. Det er innlysende at PHB-syntesen oksyderer NADH til NAD<sup>+</sup> under frigivelse av elektroner (og protoner) for reduksjon av acetoacetyl-CoA til  $\beta$ -hydroksybutyryl-CoA. PHB fungerer derfor som en elektron-"felle" og vil på den måten redusere NADH/NAD-forholdet. Dette vil igjen stimulere TCA-syklus (og den assosierte glyoksylat-syklusen som reguleres gjennom NADH/NAD-forholdet) med nydannelse av NADH som resultat. Denne interaksjonen mellom TCA-syklus og PHB-syntese styrt av NADH/NAD-forholdet sikrer at det dannes nok elektroner og protoner til å "ta opp" all eddiksyre og lagre størsteparten av denne som PHB. En del oksyderes gjennom TCA-syklus for å sikre produksjon av NADH. Wentzel (1986) viser støkiometrisk at 89% lagres som PHB, mens 11% omdannes til CO<sub>2</sub>.

- Syntese av PHB fører til at den intracellulære konsentrasjonen av eddiksyre avtar som igjen muliggjør ytterligere opptak av denne organiske syren.

Forholdet mellom opptak av eddiksyre og utskillelse av fosfat forklares ikke gjennom ovenfor stående. Det er to fundamentale biokjemiske prinsipper som kopler eddiksyreopptak til frigivelse av kationer og fosfat

1. Dannelse av intracellulær ortofosfat og kationer fra poly-P hydrolyse trengs for dannelse av energi til bruk for opptak og lagring av eddiksyre.
2. Opptak av eddiksyre i "syreform" vil redusere pmf (= proton motive force = gradient av protoner over den cytoplasmatiske membran) som er grunnlage for energiproduksjon/energibalanse i levende celler samt for transport av molekyler over den cytoplasmatiske membranen.

pmf =  $\Delta\mu_H$  består av en pH komponent og en ladningskomponent ( $=\Delta\Psi$ ) i henhold til likningen:

$$\Delta\mu_H = \Delta\Psi + (2,3 RT/F) * \Delta pH$$

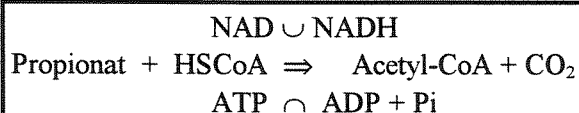
R: gasskonstant

F: Faradays konstant

Dersom eddiksyre skal tas opp kontinuerlig må pmf holdes på et stabilt nivå. Det er foreslått at dette kan oppnås gjennom at frigivelse av fosfat og kationer skjer samtidig med opptak av protoner og hydroksylioner. Dette oppnås ved at :

- fosfattransport ut av cellen skjer gjennom en antiport med hydroksyl som mot-anion
- kationfrigivelse skjer ved en tilsvarende antiport med  $H^+$ -ioner som mot-kation
- eddiksyreopptaket skjer gjennom passiv diffusjon.

For andre potensielle substrater som f.eks butyrat og propionat behøves ingen TCA-syklus for å sikre nydannelse av NADH. For propionat vil NADH dannes som følger:



### Aerob fase

I denne fasen er en ekstern elektronakseptor,  $O_2$ , til stede. Videre er poly-P-bakteriene i et miljø der konsentrasjonen av organisk karbon er begrensende for normalt heterotrof vekst i avløpsvannet. Dette fordi lett nedbrytbart organisk stoff er assimilert i den anaerobe fasen. *Acinetobacter* spp. inneholder imidlertid lagret PHB. Et resultat av tilstedeværelse av en ekstern elektronakseptor,  $O_2$ , vil være at NADH/NAD-forholdet reduseres (respirasjonskjeden) og at ATP/ADP-forholdet økes gjennom oksidativ fosforylering.

Et avtagende NADH/NAD-forhold stimulerer nedbrytning av PHB, driften av TCA-syklus samt den assosierte glyoksylat-syklus. Nedbrytning av PHB til eddiksyre fremskaffer karbon og energi for å opprettholde cellens vitale funksjoner.

Med hensyn til poly-P-nedbrytning/syntese vil et høyt ATP/ADP-forhold stimulere poly-P-syntese. Et viktig resultat av et høyt ATP/ADP-forhold er at det setter organismen i stand til å opprettholde en

stabil pmf og til å utnytte ATP for transport av molekyler inn og ut av cellen. Det vil si at forskjellen mellom ekstracellulær og intracellulær pH ikke lenger er den bestemmende faktor for transport som den var i anaerob fase.

### Rene aerobe systemer

Rene kulturer av *Acinetobacter* spp. som utvikles aerobt har vist seg å både kunne akkumulere PHB og poly-P såsant det er nok substrat til stede (Wentzel, 1986). Den høye konsentrasjonen av f.eks eddiksyre som entrer TCA-syklus vil høyne ATP/ADP-nivået til et nivå tilstrekkelig for poly-P syntese. Samtidig vil NADH/NAD øke. Dersom eddiksyrekonsentrasjonen og dermed acetyl-CoA er høy nok, vil PHB syntese stimuleres. TCA-syklus supplerer tilstrekkelig med protoner og elektroner for reduksjon av eddiksyre til PHB.

I et fullstendig blandet system med slamalder på 10-20 døgn vil substratkonsentrasjonen være lav. *Acinetobacter* spp. konkurrerer meget godt om substrater i langtidsluftede bassenger. I slike systemer er det imidlertid ikke observert akkumulering av hverken poly-P eller PHB. Modellen hjelper med å forklare dette fenomenet. På grunn av det lave substratnivå vil ATP/ADP-forholdet ikke stige tilstrekkelig til å indusere poly-P syntese. NADH/NAD holdes lavt, - noe som sammen med lavt substratnivå vil hemme syntese av PHB.

Dersom *Acinetobacter* spp. fra et langtidsluftet system isoleres og dyrkes aerobt vil den starte med å syntetisere poly-P og PHB nesten umiddelbart. Denne egenskapen synes derfor å være nedarvet hos bakterien. Det nødvendige signal eller stimulus som skal til er altså:

- høyt ATP/ADP-forhold
- høyt NADH/NAD-forhold
- høy substratkonsentrasjon, -fortrinnsvis eddiksyre

Dersom det ekstracellulære substratnivå kan holdes høyt som f.eks i kontrollerte pilotforsøk eller intracellulære konsentrasjoner av PHB er høy som i den aerobe sonen i et A/O-system;- da vil ATP/ADP-forholdet være tilsyttrekkelig høyt for poly-P akkumulering. Dersom den ekstracellulære substratkonsentrasjonen er høy og det er en ekstern elektron-akseptor tilgjengelig,- da vil både PHB og poly-P kunne akkumuleres.

## 4.4 Endogen respirasjon

Når en prøve inneholdende *Acinetobacter* spp. hentet fra aerob sone i et renkultursystem luftes videre i batch-kultur, vil endringer i fosfat-konsentrasjonen og det biologiske oksygen forbruket (BOF) vise et forløp i to klart adskilte faser.

1. En relativt hurtig nedgang i BOF<sub>7</sub> sammen med en mindre uttalt nedgang i ekstern P-konsentrasjon.
2. En langsom nedgang i oksygen forbruk sammenfattet med en langsom økning i ekstern P-konsentrasjon.

Den første fasen med synkende P-konsentrasjon henspiller helt klart på en fortsettelse av prosessene i den aerobe reaktoren, d.v.s. nedbrytning av lagret karbon (PHB) og utnyttelse av energien til syntese av

poly-P. Mot slutten av "fase 1" har *Acinetobacter* spp. forbrukt all sin opplagsnæring (PHB) og dermed fullført poly-P dannelsen. Denne fasen er interessant siden den reflekterer en sann endogen oppførsel<sup>10</sup>.

Det langsomt avtagende oksygenforbruket sammenfattet med en langsom økning i ekstern P-konsentrasjonen kan forklares på følgende måte:

- Nedgangen i BOF<sub>7</sub> antas å være proporsjonal med nedgangen i aktiv biomasse, d.v.s. celledød. Nedgangen i aktiv biomasse ble funnet å være 0,04 mg FSS/mg FSS \* døgn. Dersom frigivelse av ortofosfat sammenliknes med lagrede P-konsentrasjoner blir resultatet at fosfor frigis i en mengde omtrent sammenfallende med nedgangen i aktiv biomasse. Dette betyr i at den målte økning i ortofosfatkonsentrasjon må skyldes frigivelse av lagret P på grunn av celledød eller endogent massetap i *Acinetobacter* spp. og ikke p.g.a. hydrolyse av poly-P.

## 4.5 poly-P kinetikk

I anaerob fase vil utløsning av ortofosfat som funksjon av opptak av eddiksyre (HAc) beskrives ved uttrykket:

$$d[\text{PO}_4^{3-}]/dt = \{v_{\text{HAc, PO}_4} * k_{\text{HAc}} * \frac{[\text{HAc}]}{[\text{HAc}] + K_{\text{HAc}}}\} * X_{\text{BP}}$$

HAc: eddiksyre

$k_{\text{HAc}}$ : opptakskonstant for eddiksyre

$X_{\text{BP}}$ : mengde (masse) poly-P bakterier

$v_{\text{HAc, PO}_4}$ : støkiometrisk koeffisient mellom eddiksyre og ortofosfat

Opptak av eddiksyre kan beskrives ved et tilsvarende uttrykk:

$$d\text{HAc}/dt = \{k_{\text{HAc}} * \frac{[\text{HAc}]}{[\text{HAc}] + K_{\text{HAc}}}\} * X_{\text{BP}}$$

I den aerobe fasen beskrives fosforopptaket ved likningen:

$$d\text{PO}_4^{3-}/dt = \{(\mu_{\text{max}}/Y_{\text{max}}) * \frac{[\text{PO}_4^{3-}]}{[\text{PO}_4^{3-}] + K_{\text{PO}_4}}\} * X_{\text{BP}}$$

$K_{\text{PO}_4}$ : Halvmetningskonstanten for ortofosfat

## 4.6 Faktorer som påvirker poly-P aktivitet

Poly-P bakterienes krav til miljøet er relativt likt det som aerobe heterotrofe og denitrifiserende bakterier har. For å få til fosforakkumulering er det videre spesielle krav til sammensetningen av avløpsvannet inn på den anerobe selektoren sett i forhold til konsentrasjonen av nitrat.

### poly-P bakterier og nitrat

Nitrat regnes normalt å ha en negativ effekt på poly-P bakterier. Grunnene til dette er ikke fullstendig kjent, men den logiske forklaringen er at nitrat stimulerer oksidativ omdanning av de organiske forbindelser som finnes i avløpsvannet fremfor gjæring av de samme substratene til fettsyrer. Det betyr i

<sup>10</sup> med endogen respirasjon menes egentlig nedbrytning av intracellulær opplagsnæring i levende celler

såfall at dannelsen av fettsyrene som er nødvendige for at poly-P bakteriene skal selekteres og skille ut ortofosfat i det anaerobe trinnet begrenses eller opphører helt.

En annen forklaring ligger i at denitrifiserende bakterier konkurrerer med poly-P bakteriene om fettsyrene. Denne forklaringen går imidlertid ut ifra at poly-P bakterier ikke er denitrifiserende. I arbeider av blandt andre Carlson et al., (1991a og 1991b) og Kuba et al. (1993) dokumenteres at denitrifikasjon og fosforakkumulering kan skje samtidig. Om dette er en normal situasjon eller om den fremelskes under spesielle forhold er imidlertid gjenstand for diskusjon.

Mostert et al. (1988) har gjennomført forsøk der anaerob utnyttelse av flyktige fettsyrer i biologiske rensesanlegg ble studert. Med nitrat tilstede ble mesteparten av propionsyren tatt opp av poly-P bakterier og omdannet til polyfettsyrer under utløsning av ortofosfat. 33-50% av eddiksyren og 20% av smørsyren ble lagret i polyfettsyrer,- resten ble brutt ned av denitrifiserende bakterier. Nesten 100% av tilsatt melkesyre ble brukt til denitrifikasjon.

Konklusjonen som forfatterne trekker er at eddiksyre og propionsyre induserer utløsning av ortofosfat uavhengig av om nitrat er til stede i miljøet. Smørsyre og melkesyre kan bare benyttes under totalt fravær av nitrat.

Fosforopptak fant sted samtidig med fosforutløsning også når nitrat var tilstede, men i ulik grad uavhengig av kvaliteten på substratene.

### Substratkvalitet

Bio-P fjerning er som nevnt avhengig av at det er flyktige fettsyrer til stede i avløpsvannet som tilføres det anaerobe rensetrinnet (selektoren). Disse fettsyrene vil normalt kunne dannes av gjæringsorganismer som er til stede i selektoren. Fosforutløsning er dermed avhengig av at tilført avløpsvann inneholder høye konsentrasjoner av fermenterbare organiske forbindelser eller fettsyrer.

Mostert et al. (1988) og Abu-ghararah og Randall (1991) har studert effekten av ulike fettsyrer og konkluderer med at eddiksyre, propionsyre og iso-valerinsyre er de beste stimulatorer av fosforutløsning, mens maursyre ikke stimulerer anaerob fosforutløsning fra poly-P bakterier i det hele tatt.

### pH

Optimal pH for oppvekst av *Acinetobacter* spp. er funnet å variere fra 6 til 9 avhengig av karbonkilde (Hao og Chang, 1987., van Groenestijn et al. 1989). Vekst er dokumentert helt ned til 4,8 og opp til 9,5. Høyeste fosfatopptakshastighet i en renkultur av *Acinetobacter* spp. ble funnet ved nøytrale forhold (pH=7,0). Van Groenestijn viste at fosforopptaket var rimelig stabilt innenfor pH 6-9, mens Yeoman et al. (1988) fant at aktivslam har et effektivt fosfatopptak i området 6-8. Fuhs og Chen (1975) fant at sure forhold måtte til for å indusere ortofosfatutløsning fra *Acinetobacter lwoffii*.

Konklusjonen er at fosforakkumulering kan foregå innenfor et svært vidt pH-område og at poly-P bakterier antagelig kan adapteres til de pH-forhold som vil være normalt forekommende i norsk avløpsvann. Fosforutløsning i anaerobt miljø kan synes å være stimulert av svakt sure forhold.

### Temperatur

Biologisk fosfor fjerning er relativ upåvirket av temperatur. Air Products and Chemicals, Inc. (1981) konkluderte at de ansvarlige bakteriene er psykrofile bakterier som vokser bedre ved lave temperaturer enn det typiske aktislam bakterier gjør (max 20°C). I laboratorieskalaforsøk med SBR-teknikk (Satsvis Biologis Rensing) gjennomført innenfor et temperaturintervall på 5 - 15°C viste Sell et al. (1981) at det

ikke var noe forskjeller i fosforfjerningseffektiviteten i temperaturintervallet 10 -15°C og videre at det var en forbedring i aktivitet når temperaturen ble senket til 5°C. Ved slambelastning (F/M) = 0,25 kg BOF<sub>7</sub>/kg FSS\*døgn, endret fosforopptakshastigheten seg fra 0,74 til 0,79 L P/gVSS \* time. Ved F/M= 0,16 kg BOF<sub>7</sub>/kg FSS \* døgn, var økningen fra 0,47 til 0,68 L P /g VSS \* time.

Ekama et al. (1984) rapporterte mer effektiv fosfor fjerning ved 14°C enn ved 22°C (lab-skala forsøk). Imidlertid har både fullskala og pilotskalaforsøk vist at temperatursenkning i avløpsvannet kan påvirke poly-P bakterier negativt og føre til lavere opptaksaktivitet og derved høyere fosfor-konsentrasjoner i utløpet. Waltrip (1991) rapporterte således om signifikante reduksjoner i fosforopptak som funksjon av temperaturnedgang. Dataene i hans rapport stemmer overens med en  $\theta$ -faktor<sup>11</sup> på 1,045 for temperaturer i intervallet 13 - 20°C, og en  $\theta$ -faktor på 1,0375 for temperaturer mellom 20 og 27°C. Referanseverdien for fosforopptak (eller fjerning ) ved 20°C var 4,8 mg/l og gjennomsnittlig SRT i forsøkene var 5,8 døgn. Tilsvarende var referanseverdien for fosforopptak ved 15°C for studiene foretatt av AIR Products 3,30 mg/l.

Pilotskala studier foretatt av McClintock et al. (1991) over et temperaturspenn på 10 - 20°C har også vist at biologisk fosfor fjerning er påvirket av temperaturen, men temperaturkoeffesienten var en funksjon av SRT. En  $\theta$ -faktor på 1,038 ble benyttet ved SRT = 15 døgn, mens en  $\theta$ -faktor på 1,137 ble benyttet for SRT = 5 døgn. Prosessen opphørte i et anlegg som ble drevet med SRT på 5 døgn når temperaturen sank under 10°C.

De tilsynelatende motstridende resultatene når det gjelder i hvilken grad temperaturen påvirker bio-P prosesser kan skyldes en høy grad av diversitet innenfor denne spesielle floraen. Hvilken type poly-P bakterier som utvikles er avhengig av kulturen som er tilstede i utgangspunktet og på hvilken måte anlegget drives.

Uavhengig av hvilke bakterier som er til stede vil muligheten for å resirkulere DO og NO<sub>x</sub> være adskillig større ved drift under kalde betingelser. Dette vil igjen redusere potensialet for hvor mye organisk stoff som kan lagres i anaerob fase og følgelig redusere fosforfjerningen. Ut fra denne "indirekte temperaturpåvirkningen" anbefales det å benytte en  $\theta$ -faktor på 1,045 ved dimensjonering av slike anlegg.

Det anbefales også å unngå SRT < 5 døgn ved lave temperaturer (< 12°C).

## 4.7 Reaksjonskonstanter for poly-P bakterier

Tabell 8. Reaksjonskonstanter for dissimilatorisk denitrifiserende bakterier (Henze et al., 1992).

Reaksjonskonstant	Symbol	Benevning	Verdi
Maksimal spesifikk veksthastighet	$\mu_{\max}$	d <sup>-1</sup>	2 - 4
Maksimal utbyttekonstant, eddiksyre	$Y_{\max}$	kg KOF(B)/kg KOF(HAc)	0,5 - 0,6
Maksimal utbyttekonstant eddiksyre	$Y_{\max}$	kg SS/kg KOF (HAc)	0,6 - 0,8
Maksimal utbyttekonstant eddiksyre	$Y_{\max}$	kg P / kg KOF (HAc)	0,07- 0,10
Halvmetningskonstant for opptak av eddiksyre	$K_{\text{HAc}}$	mg HAc/l	2 - 6
Halvmetningskonstant for opptak av ortofosfat	$K_{\text{PO}_4}$	mg P/l	0,1 - 0,5
Syreopptakskonstant	$k_{\text{HAc}}$	kg KOF (HAc)/(kg KOF(X) * d)	0,5 - 2
Temperaturkonstant for $\mu_{\max}$ og $k_{\text{HAc}}$	$\kappa$	°C <sup>-1</sup>	0,01- 0,02

<sup>11</sup>  $\mu_{(\max)}(T) = [\mu_{(\max)} * (20^\circ\text{C})^{\theta(T-20)}]$

## Referanseliste

- Abu-ghararah, S. H. og C. W. Randall 1990. The effects of organic compounds on biological phosphorus removal. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 23, pp 585-594.
- Anthonisen, A. C. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* Vol. 48, pp 835-852.
- Arvin, E. 1983. Observations supporting phosphate removal by biological mediated chemical precipitation-a review. *Water Sci. Technol.* Vol. 15, pp 43-63.
- Auling, G., F. Pilz., H.-J. Busse, S. Karrash, M. Streichan og G. Schön 1991. Analysis of the polyphosphate accumulating microflora in phosphorous-eliminating anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 57, pp 3585-3592.
- Barnes, D. og P. J. Bliss 1983. *Biological control of nitrogen in waste water treatment* E. & F. N. Spon, London.
- Bitton G. 1983. Bacterial and biochemical tests for assessing chemical toxicity in the aquatic environment: A review. *Crit Rev. Environ. Control*, Vol. 13, pp 51-67.
- Bitton, G., B. J. Dutka og C. W. Hendricks 1989. Microbial toxicity tests, I: B. P. Parkhurst, S. S. Baker, Jr. og W. Warren-Hicks (Eds.) *Ecological Assessment of Hazardous Waste Sites*, EPA 600/3 - 89/013. U.S. EPA, Corvallis, OR.
- Bock, E., P. A. Wilderer og A. Freitag 1988. Growth of *Nitrobacter* in the absence of dissolved oxygen. *Water Res.*, Vol. 22, pp 243-250.
- Chakrabarti, T. og P. H. Jones 1983. Effect of molybdenum and selenium addition on denitrification of wastewater. *Water Res.* Vol. 17, pp 931-936
- Christensen, M. H. og P. Harremoës 1978. Nitrification and denitrification in waste water treatment. I: R. Mitchell (Ed.) *Water Pollution Microbiology*, Vol. 2, pp 391-414, Wiley, New York.
- Comeaou, Y., B. Rabinowitz, K. J. Hall og W. K. Oldham 1987. Phosphate release and uptake in enhanced biological phosphorous removal from wastewater. *J. Water Pollut. Control Fed.* Vol. 59, pp 707-715.
- Edeline, F. 1988. *L'Épuration Biologique des Eaux Résiduaires: Théorie et Technologie*. Editions CEBEDOC, Liege, Belgium.
- Ekama, G. A., G. R. Marais og I. P. Siebritz 1984. Biological excess phosphorus removal. I: Theory design and operation of nutrient removal activated sludge processes, Water research Comission, Pretoria, South Africa, 7/17-7/32.
- Fuhs, G. W. og M. Chen 1975. Microbial basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Micr. Ecol.* Vol. 2, pp 119-138.
- Grady, C. P. M. Jr. og H. C. Lim 1980. *Biological Waste Treatment*. Marcel Decker. New York.



- Groenestijn, J. W. van 1988a. Accumulation and degradation of polyphosphate in *Acinetobacter* sp. PhD Thesis. Wageningen, University of Wageningen.
- Groenestijn, J. W. van., G. J. F. M. Vlekke, D. M. Anink, K. H. Deinema og A. J. B. Zehnder 1988b. Role of cations in accumulation and release of phosphate by *Acinetobacter* Strain 201 A. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 54, pp 2894-2901.
- Carlson, H., A. Hilmer og P. Johansson 1991a. Inverkan av nitrat, substrat och syre på system för biologisk fosforavskiljning. VATTEN Vol. 47, pp 129-138.
- Carlson, H., A. Hilmer og P. Johansson 1991b. Pilotforsök med kombinerad biologisk fosfor- och kväveavskiljning. VATTEN Vol. 47, pp 139-143.
- Hao, O. J. og C. H. Chang 1987. Kinetics of growth and phosphate uptake in pure culture studies of *Acinetobacter* species. Biotechnol. Bioeng. Vol. 29, pp 819-831.
- Henney, R. C., M. C. Fralish og W. C. Lacina 1980. Shock load of chromium (VI). J. Water Pollut. Control Fed. Vol. 52, pp 2744-2760.
- Henze, M., P. Harremoës, J. la Cour Jansen og E. Arvin 1992. Spildevandsrensning - Biologisk og kemisk. Polyteknisk forlag.
- Kuba, T., G. Smolders, M. C. M. van Loosdrecht og J. J. Heijnen 1993. Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. Wat. Sci. Tech. Vol. 27, pp 241-252.
- Lötter, L. og M. Murphy 1985. The identification of heterotrophic bacteria in an activated sludge plant with particular reference to polyphosphate accumulation. Water SA. Vol. 11, pp 179-184.
- McClintock, S. A., C. W. Randall, V. M. Pattarkine 1991. The Effects of temperature and mean cell residence time on enhanced biological phosphorus removal. Environmental Engineering, Proceedings of the 1991 Specialty Conference on Environmental Engineering. ASCE, pp 319-324.
- Metclaf og Eddy, Inc. 1991. Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and reuse (3rd. ed.). McGraw-Hill, new York.
- Mino, T., V. Arun, Y. Tsuzuki og T. Matsuo 1987. Effects of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. I. Ramadori, R (Ed.) Biological phosphorus removal from wastewaters. Advances in Water Pollution Control. pp 27-38 Oxford, Pergamon Press.
- Mostert, E. S., A. Gerber og C. J. J. van Riet 1988. Fatty acid utilisation by sludge from full-scale nutrient removal plants, with special reference to the role of nitrate. Water SA. Vol. 14, pp 179-184.
- Neufeld, R. D. 1976. Heavy metals induced deflocculation of activated sludge. J. Water pollution control Fed. Vol. 48, pp 1940-47.
- Rittmann, B. E. 1987. Aerobic biological treatment. Environ. Sci. Technol. Vol. 21, pp 128-136.
- Sato, C., S. W. Leung og J. L. Schnoor 1988. Toxic response of *Nitrosomonas europaea* to copper in inorganic medium of wastewater. Water Res. Vol. 22, pp 1117-1127.

- Sell, R. L., D. J. Krichen, O. J. Noichl og D. G. Hantzog 1981. Low temperature biological phosphorus removal, 54th Water Pollution Control Fed. Conf., Detroit.
- Sezgin, M., D. Jenkins og D. S. Parker 1978. A unified theory of activated sludge bulking. J. Water Polluton Control Fed. Vol. 50, pp 972-977.
- Streichan, M., J. R. Golecki og G. Schön 1990. Polyphosphate -accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorous removal. FEMS Microbiol. Ecol. Vol. 73, pp 113-124.
- Strom, P. F. og D. Jenkins 1984. Identification and significance of filamentous micro-organisms in activated sludge. J. Water Pollut. Control Fed. Vol. 54, pp 584-589
- U.S. EPA 1975. Process Design Manual of Nitrogen Control. Office of Technology Transfer, Washington D.C.
- U.S. EPA. 1977. Wastewater Treatment Facilities for Sewered Small Communities. EPA-625/1-77 -009.
- U.S. EPA. 1987a. The Causes and control of activated sludge bulking and foaming. EPA-625/8-87/012, Cincinnati, OH:
- Verstraete, W. og E. van Vaerenbergh 1986. Aerobic activated sludge. I: H. J. Rehm og G. Reed (Eds.) Biotechnology, Vol. 8, pp 43-112, Vol. Ed.VCH Germany.
- Waltrip, G. D. 1991. Full-scale nutrient removal demonstration project in the York River treatment plant with the VIP process. 45th Annual Conference. Virginia Water Pollution Control Association, Williamsburg, Vrginia, VA., U.S.A.
- Wentzel. M. C., L. H. Lötter, R. H. Loewenthal og G. R. Marais 1986. Metabolic behaviour of *Acinetobacter* ssp. in enhanced biological phosphorus removal - a biochemical model. Water SA. Vol. 12, pp 209-224.
- Yeoman, S., T. Stephenson, J. N. Lester og R. Perry 1988. The removal of phosphorus during wastewater treatment: A review. Environment. Pol. Vol. 49, pp 183-233.

**Norsk institutt for vannforskning**

Postboks 173 Kjelsås  
0411 Oslo

Telefon: 22 18 51 00  
Telefax: 22 18 52 00

Ved bestilling av rapporten,  
oppgi løpenummer 3373-95.

ISBN 82-577-2902-7