

# OM NITRIFIERANDE BAKTERIER

## On the Role of Nitrifying Bacteria

av ANDERS TERNSTRÖM, THOMAS WELANDER och LARS GUNNARSSON, ANOX AB,  
Forskningsbyn IDEON, S-223 70 Lund

### Abstract

The composition of the nitrifying microflora may vary considerably between different sewage treatment plants. The taxonomy of the nitrifying bacteria and the conditions needed for nitrification are outlined. Present and future methods for the detection of nitrifiers and the assessment of nitrification inhibition are discussed.

*Key words* – nitrifying bacteria, taxonomy, growth conditions.

### Sammanfattning

Den nitrifierande mikrofloras sammansättning kan variera kraftigt mellan olika reningsverk. De nitrifierande bakteriernas taxonomi och under vilka förutsättningar de kan operera behandlas. Tillgängliga och framtida metoder för att detektera nitrifierare och nitrifikationshämmning diskuteras.

### Inledning

Den ökande eutrofieringen av sjöar och kustnära hav har lett till hårdare krav på kväveavskiljning vid svenska reningsverk. I växt- och djurproteiner föreligger kvävet i starkt reducerad form och frigörs vid förmultning (mineralisering) därför som ammoniumjoner ( $\text{NH}_4^+$ ) eller ammoniak ( $\text{NH}_3$ ). Ammonium dominerar helt vid neutralt pH.

Det finns, teoretiskt sett, tre biologiska vägar att bli av med ammonium i avloppsvatten:

1. *Direktupptag och inkorporering till organiskt material.* De flesta bakterier kan ta upp ammonium direkt från vattnet och använda det för sin proteinsyntes. Idag reduceras kvävehalten i många reningsverk med ungefär 20 % på detta sätt, en fysiologiskt sett förhållandevis låg siffra som beror på att slambakterierna i de nuvarande processerna förbränner organiska föreningar snarare än att använda dem för nybildandet av celler. Om aktivslamprocessen ändrades mot en maximal slamproduktion skulle ammoniumupptaget i de flesta kommuners avloppsvatten kunna ökas betydligt.
2. *Direkt oxidering till kvävgas.* Energimässigt är detta en fullt möjlig väg men hittills har man inte med säkerhet kunnat belägga att den existerar i naturen.
3. *Oxidering till nitrat.* Nitrat kan sedan reduceras till kvävgas av denitrifierande bakterier som använder nitrat som elektronacceptor i en anaerob respiration.

Oxidering från ammonium till nitrat ombesörjs i naturen huvudsakligen av två grupper av bakterier: *ammoniumoxiderarna* som står för oxidationen från ammonium via hydroxylamin till nitrit, och *nitritoxiderarna* som oxiderar det sista steget från nitrit till nitrat. (Det finns inga kända isolat som är kapabla att oxidera hela kedjan från ammonium till nitrat.) Med ett gemensamt namn kallas bakterierna *nitrifierare*. Nitrifierarna betraktas som den kanske känsligaste länken i biologiska reningsprocesser. Nitrifierarna utgör dock ingalunda någon enhetlig grupp, vilket annars ofta förutsätts vid studier av nitrifikationsprocesser. Nyare taxonomiska undersökningar indikerar att det existerar hundratals arter, var och en med sina speciella egenskaper och sin ekologiska nisch. Den nitrifierande populationen kan därför skilja sig markant från ett reningsverk till ett annat.

### Taxonomi

I teknisk litteratur brukar ammoniumoxiderare oftast klumpas ihop under namnet »*Nitrosomonas*» eller rentav »*Nitrosomonas europaea*». En riskabel överförenkling, eftersom det ger intryck av att det rör sig om en och samma bakterie som uppträder i reningsverken. Så är emellertid inte fallet, vilket nyligen visats av Koops et al. (1991) som undersökte de genetiska egenskaperna hos 64 *Nitrosomonas*-isolat. De fann att endast 7 av isolaten tillhörde arten *Nitrosomonas europaea* medan de övriga 57 fördelades på 12

andra arter som tidigare varit okända för taxonomerna. Förmodligen existerar ännu fler *Nitrosomonas*-arter som väntar på sin upptäckt, men redan det faktum att släktet omfattar 13 arter, var och en med sin speciella ekologiska nisch, visar på att variationsrikedomen inom ammoniumoxiderarna är betydligt större än vad som oftast framgår av litteraturen. Dessutom är det inte alla arter som hör till *Nitrosomonas*, minst lika många ingår i *Nitrosolobus*, det ekologiskt kanske viktigaste ammoniumoxiderande släktet (Belser 1979), och åtminstone ett tiotal arter hör till endera *Nitrosococcus* eller *Nitrospira* (Watson et al. 1989).

Situationen är likartad för nitritoxiderarna som också indelas i fyra släkten: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* och *Nitrospira*. Några mera omfattande taxonomiska studier har ännu inte utförts på dessa, men de data som finns indikerar att det även här existerar flera arter inom varje släkte (Watson et al. 1989). Sammantaget innebär detta att man måste räkna med hundratals arter av nitrifierare. Vissa egenskaper har de gemensamt, andra är däremot artberoende.

Nitrifierarnas mycket långsamma tillväxthastighet, på ett dygn förökas de i bästa fall 2–3 gånger – något många andra bakterier klarar av på en timme – innebär att det även under optimala förhållanden kan ta åtskilliga veckor innan en fungerande nitrifieringsflora etableras i ett reningsverk. Under mindre gynnsamma omständigheter går det ofta inte alls, ett välkänt problem i tempererade klimat är att få igång nitrifikationen under vintern. Den långsamma tillväxten beror på att ammonium- och nitritoxidation är en tämligen ineffektiv process, ty för varje kol som används vid celluppbyggnaden krävs oxidation av ungefär 100 nitritmolekyler. Något större hopp om att hitta snabbväxande nitrifierare finns därför inte. I stället får man koncentrera sig på att göra tillvaron så bra som möjligt för de nitrifierare som man vill ska etableras.

## Fysiologiska faktorer

Temperaturen har dels en generell effekt, dels en artberoende effekt på nitrifieringsfloran. Generellt gäller att nitrifikationshastigheten ökar med stigande temperatur. Eftersom nitrifierare i regel har en mesofil natur, betyder detta att nitrifikationshastigheten ökar tämligen linjärt inom temperaturintervallet 10–30°C. Under och över denna temperatur blir nitrifikationshastigheten däremot helt avhängig vilka arter av nitrifierande bakterier som förekommer. Det finns säkerställda rapporter om nitrifikation såväl vid 60°C i varma källor som vid ett par minusgrader under polarisarna (Watson et al. 1989, Koops et al. 1991). Hittills har bara en köldtålig art isolerats och beskrivits, *Nitrosomonas cryotolerans*, och denna är av mindre

intresse för de flesta reningsverk eftersom den normalt hör hemma i oceanerna och därför kräver någon procent salthalt för att kunna existera. Att det även förekommer »sötvattensnitrifierare» som växer vid mycket låga temperaturer står dock klart.

Nitrifikation är normalt kopplat till svagt alkaliska förhållanden, pH 7,5–8,0 är i regel optimalt för nitrifikation. Rimligen är detta en följd av att de så kallade ammoniumoxiderarna i själva verket utnyttjar ammoniak som energikälla; förhållandet ammonium/ammoniak förskjuts mot ammoniak vid stigande pH. Nitrifikation vid låga pH-värden, vilket sedan länge noterats i sura jordar, har tidigare oftast ansetts bero på aktiviteten hos heterotrofa nitrifierare. Sådana förekommer såväl hos bakterier som hos mikrosvampar, men de föredrar organiskt kväve och utnyttjar endast i undantagsfall, och då tämligen ineffektivt, ammonium. På senare tid har åsikterna svängt sedan man lyckats isolera koldioxidfixerande nitrifierare som fungerat väl vid pH 4,0 (De Boer et al. 1991). Hittills har man dock inte kunnat visa att de utnyttjar ammoniak vid detta låga pH, de tycks istället nitrifiera genom att hydrolysera urea (Allison och Prosser 1991).

Även i ganska sura avloppsvatten kan nitrifikation pågå, förutsatt att nitrifierarna tidigare bildat flockar. Speciellt ammoniumoxiderarna bildar spontant aggregat vilka förefaller skydda de individuella cellerna mot låga pH-värden. Mekanismen är långtifrån klarlagd, den vanligaste teorin går ut på förekomsten av mikronischer med högre pH i flockarna. Men denna teori bortser från det faktum att det är ammoniumoxiderarna själva som avger protoner vid nitritbildningen. Om en protongradient föreligger, skulle pH alltså i själva verket vara lägre i ammoniumoxiderarnas omedelbara närhet. En ur bakteriologisk synvinkel rimligare förklaring är att nitrifierarna samverkar med andra flockbakterier för att hålla pH under kontroll. Men än så länge kan man bara spekulera om en sådan samverkan, vare sig nitrifierare eller andra flockbakterier har nämligen studerats tillräckligt väl taxonomiskt. I sura eller toxiska avloppsvatten har man lyckats sätta igång nitrifikation genom att tillsätta lera eller vermiculit och därmed få en buffrande och skyddande struktur på vilken nitrifierarna kan etableras (Powell och Prosser 1991).

Nitrifikation är en strikt aerob process, men den erforderliga syrehalten beror på andra faktorer. Om avloppsvattnet innehåller stora mängder organiskt material krävs höga syrgashalter, i annat fall konkurreras nitrifierarna ut av heterotrofa bakterier som är betydligt effektivare på att utnyttja syret. Vid låga halter organiskt material kommer syrgashalten däremot av allt att döma att selektera fram speciella arter av nitrifierare. Hos en del ammoniumoxiderare finns ett ureas som börjar produceras vid låga syrgashalter och liksom vid låga pH-värden kommer alltså urea att

bli ett viktigt substrat för nitrifikationen. Låg syrgashalt förefaller också ha en generell effekt i det att ammoniumoxiderare som regel är klart bättre på att utnyttja syret än nitritoxiderarna (Belser 1979). En betydande nitritackumulering kan alltså bli följden. Speciellt verkar nitritackumulering ske vid höga temperaturer, över 25°C.

Syrgashalten för nitrifierare i biobäddar kan bli mycket låg på grund av masstransportproblem. Biobäddar kan i betydligt större utsträckning än suspenderade flockar ses som ekologiska enheter, biotoper, och nitrifierarnas effektivitet i dessa system är sannolikt i hög grad avhängig en balans med bla mikronematoder som genom sin aktivitet bildar syrgasledande kanaler i biofilmen.

## Tillväxtstimulerande faktorer

Två ständigt upprepade »sanningar» är att ammoniumoxiderare är strikta autotrofer, dvs de tillgodoser sitt kolbehov uteslutande genom fixering av koldioxid; samt att nitritoxiderare visserligen kan växa heterotroft, men att de i så fall gör det mycket, mycket långsamt. Teserna är generaliseringar gjorda efter fysiologiska studier av *Nitrosomonas europaea* respektive *Nitrobacter winogradskyi*. De gäller ingalunda alltid.

Många ammoniumoxiderare är utpräglade *mixotrofer*, vilket innebär att de växer snabbast (alternativt bildar mer cellmassa) då de samtidigt kan tillgodose sitt kolbehov från koldioxid och någon organisk källa (Watson et al. 1989). Fördelningen mellan autotrofa och mixotrofa ammoniumoxiderare i ett reningsverk beror troligtvis i hög grad på typ och halt av organiska ämnen i avloppsvattnet. De mixotrofa ammoniumoxiderare som hittills studerats, och de är ganska få, utnyttjar i huvudsak lättillgängliga lågmolekylära föreningar som glukos, organiska syror samt korta alkoholer och fettsyror. Men även komplexa föreningar som peptoner, jästextrakt och oidentifierade kväveföreningar i avloppsvatten från livsmedelsindustrier har gynnat etableringen av en mixotrof mikroflora.

Bland nitritoxiderarna är situationen likartad. Här finns arter med utpräglat mixotrof natur, och dessutom arter som bla *Nitrobacter hamburgensis*, vilka faktiskt växer bättre heterotroft. Märkligt nog förefaller produkten, nitrat, stimulera många nitritoxiderare, en del arter verkar t o m inte kunna utföra nitritoxidation om inte nitrat finns närvarande (Watson et al. 1989).

## Tillväxthämmande faktorer

Det finns ingen anledning tro att nitrifierare är känsligare än andra bakterier för celltoxiska ämnen. Ändå

finns det fog för uppfattningen att den nitrifierande mikrofloran är den känsligaste länken i avloppsvattenreningen. Det beror framför allt på nitrifierarnas enkelriktade energiupptag, de är totalt avhängiga ett fungerande ammoniumoxidas. Deras oförmåga att byta till en alternativ energiutvinning gör att alla substanser som råkar blockera ammoniumoxidaset samtidigt kommer att fullständigt strypa nitrifikationen. Ett annat skäl till nitrifierarnas störningskänslighet är den långa generationstiden, slås nitrifierare ut av ett bakteriedödande ämne tar det speciellt vintertid mycket lång tid att etablera en ny nitrifieringsflora.

Ammoniumoxidaset inhiberas av en lång rad kemiska substanser, speciellt toxiska förefaller många svavelinnehållande ämnen vara, t o m aminosyrorna methionin och cystein kan ställa till med stora problem. Beträffande klorerade eller bromerade ämnens toxicitet gentemot nitrifierare har det funnits olika uppgifter. Arciero et al. (1989) rapporterade att ämnena kometaboliserar utan någon toxisk effekt på de undersökta nitrifierarna. Det skulle alltså kunna tyda på att reaktionerna är artvarierande, men en annan bild har börjat kunna skönjas främst efter ett arbete av Rasche et al. (1991). Det förefaller som om ammoniumoxidaset är tämligen ospecifikt i sin aktivitet och att det också katalyserar spjälkningen av halogener från kolväten. En kloratom verkar kunna avspjälkas från klorometaner, kloretaner och 1,2-dikloretan utan någon toxisk inverkan, medan kloravspjälkning från kloroform, 1,1-dikloretan, di-, tri- och tetraklorföreningar ger toxiska effekter på de flesta nitrifierare. Det står klart att det är nedbrytningsprodukterna snarare än substraten som ger den toxiska effekten.

Den blockerande effekt som vissa kväveföreningar som bla urea ibland uppvisar är markerat artvarierande. Koops et al. (1991) visade t ex att sex av de nio erkända *Nitrosomonas*-arterna faktiskt kan utnyttja urea vid nitrifikationen. Nitrifikationsprodukterna, nitrit respektive nitrat, förefaller relativt lindrigt inhibitoriska men även här finns förmodligen betydande skillnader mellan arterna. Andra substanser som kan antas inhibera endast vissa arter är till följd av den magra taxonomiska kunskapen om nitrifierarna föga kända, men de spelar naturligtvis en framträdande roll i selektionstrycket.

## Detektionsmetoder

Att nitrifierarna omfattar så många olika arter medför dels ett behov av metoder för att kunna differentiera mellan dem, dels att metoderna för mätning av nitrifikationshämning behöver modifieras.

Nitrifierarnas begränsade metaboliska repertoar innebär att de traditionella taxonomiska undersökningsmetoderna inte kan användas. I stället måste de

ekologiskt viktiga egenskaperna (som är de samma som selekterar fram en viss art i ett reningsverk) kopplas till genetiska detektionsmetoder. För att få fram sådana krävs betydande forskningsinsatser; dessa är helt nödvändiga om vi bättre vill kunna förstå och styra de faktorer som påverkar nitrifikations-effektiviteten. Genetiska sonder riktade mot sekvenser i bakteriernas ribosomala RNA är förmodligen den mest effektiva väg man för närvarande kan gå (Ternström 1992).

Den internationella standarden för nitrifikations-hämning, ISO 9509:1989, bygger på mätning av nitrifikationshastigheten hos ett slamprov. Metoden tar ingen hänsyn till variationen mellan olika nitrifierare. Ett identiskt avloppsvattenprov, som testas med slam taget från samma källa vid två olika tidpunkter, kan ge olika resultat genom att slammets nitrifieringsflora under tiden har förändrats. Då slambakteriernas egenskaper är okända, blir rättvisande bedömningar av ett avloppsvattens toxicitet svåra att utföra. ISO-metoden är okänslig, detektionsgränsen ligger vid ungefär 15 % hämning. Den är arbetskrävande, vid testning av större provserier använder man därför ibland i stället Microtox. Men de ljusemitterande bakterier som används i Microtox-testet tillhör en helt annan utvecklingsgren än nitrifierarna (de är med andra ord inte ens släkt på långt håll) och hämmas därför inte alltid av samma substanser. ISO-metoden är långsam, testet kräver nästan en arbetsdag, och kan därför inte användas för att alarmera om toxiskt avloppsvatten ute på renings-verken.

För att på ett rättvisande och reproducerbart sätt kunna jämföra nitrifikationshämning orsakad av olika avloppsvatten eller kemikalier bör i stället en taxonomiskt definierad blandflora av nitrifierare med kända egenskaper användas. Inom ANOX bedrivs fn forskning och utveckling inom detta område. Resultaten kommer att rapporteras i denna tidskrift vid ett senare tillfälle.

- Allison, S. M. & Prosser, J. I. 1991. Urease activity in neutrophilic autotrophic ammonia-oxidizing bacteria isolated from acid soils. – *Soil Biol. Biochem.* 23: 45–52.
- Arciero, D., Vanneli, T., Logan, M. & Hooper, A. B. 1989. Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacteria *Nitrosomonas europaea*. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 640–643.
- Belser, L. W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. – *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 309–333.
- De Boer, W., Klein Gunnewiek, P. J. A., Veenhuis, M., Bock, E. & Laanbroek, H. J. 1991. Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. – *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3600–3604.
- Koops, H.-P., Böttcher, B., Möller, U. C., Pommerening-Röser, A. & Stehr, G. 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria. – *Gen. Microbiol.* 137: 1689–1699.
- Powell, S. J. & Prosser, J. I. 1991. Protection of *Nitrosomonas europaea* colonizing clay minerals from inhibition by nitrapyrin. – *Gen. Microbiol.* 137: 1923–1930.
- Rasche, M. E., Hyman, M. R. & Arp, D. J. 1991. Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea*: cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. – *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2986–2994.
- Ternström, A. 1992. Classification, grouping & identification of bacteria isolated from food and the environment. – *Diss. Food Hygiene, Dept of Food Technology, Lund University.*
- Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.-P. & Hooper, A. B. 1989. Nitrifying bacteria. – I: Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N. & Holt, J. G. (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3. pp.1808–1833. Williams & Wilkins, Baltimore.