



Przegląd stanu wiedzy w zakresie biochemicznych przemian azotu w procesie oczyszczania ścieków

Jolanta Podedworna, Monika Żubrowska-Sudoł
Instytut Zaopatrzenia w Wodę i Budownictwa Wodnego
Politechnika Warszawska, Warszawa

Review of a state of know-how on the biochemical changes of mineral nitrogen during waste water treatment process

Summary

The paper presents review of a state of know-how on the biochemical changes of mineral nitrogen. New ways of nitrogen elimination from waste water were described: autotrophic nitrification/autotrophic oxygen denitrification, autotrophic nitrification/autotrophic anaerobic denitrification (anaerobic ammonium oxidation), heterotrophic nitrification/heterotrophic oxygen nitrification.

Key words:

heterotrophic nitrification, autotrophic denitrification, anaerobic ammonium oxidation (anammox process).

1. Wstęp

Od stu lat usuwanie azotu ze ścieków łączone jest z podstawowym łańcuchem biochemicznych przemian od azotu organicznego poprzez azot amonowy i azot utleniony do azotu gazowego. Zachodzące procesy amonifikacji, nityfikacji i denitryfikacji dysymilacyjnej określane są już mianem przemian klasycznych, a ich podstawy i mechanizmy dokładnie są opisane w wielu pozycjach literatury przedmiotu (m.in. Szetela [1]).

Istotny przełom w wiedzy na temat przemian azotu mineralnego, mimo wcześniej prowadzonych badań, nastąpił w kilku

Adres do korespondencji

Jolanta Podedworna,
Instytut Zaopatrzenia
w Wodę i Budownictwa
Wodnego,
Politechnika Warszawska,
ul. Nowowiejska 20,
00-653 Warszawa.

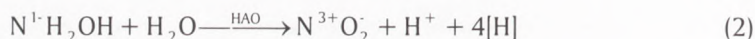
ostatnich latach. W świetle najnowszych doniesień literaturowych, poza wymienioną i uznaną za klasyczną drogą eliminacji azotu ze ścieków, za możliwe uznać należy jeszcze trzy inne:

- nitryfikacja autotroficzna / autotroficzna denitryfikacja tlenowa,
- nitryfikacja autotroficzna / autotroficzna denitryfikacja beztlenowa,
- nitryfikacja heterotroficzna / heterotroficzna denitryfikacja tlenowa.

2. Nitryfikacja autotroficzna

Choć zasadniczo teoria autotroficznej nitryfikacji nie uległa zmianie to odkrycie, że hydroksyloamina, będąca produktem pośrednim I fazy procesu, może stanowić substrat dla bakterii z rodzaju *Nitrosomonas* rzuca nowe światło na nie znane dotąd mechanizmy przemian azotu nieorganicznego.

Utlenianie amoniaku do azotynów przez bakterie *Nitrosomonas* przebiega w dwóch etapach [2].



Reakcja (1) jest katalizowana przez enzym AMO (monooksygenaza amonu). Reakcja (2) generująca energię dokonuje się przez enzym HAO (oksydoreduktaza hydroksyloaminy) (Hooper i in., 1984 cyt. za Jettenem i in. [3]), z wodą stanowiącą źródło dla drugiego atomu tlenu w azotynie [4]. Reakcja ta wymaga transferu czterech elektronów, których pochodzenie nie jest jeszcze w pełni poznane.

Choć już Kluyver i Donker (1926), cytując za Jettenem i in. [3], jako pierwsi uznali hydroksyloaminę (NH_2OH) za pośredni etap utleniania amoniaku do azotynów to dopiero Boettcher i Koops [5] oraz de Bruijn i in. [6] wykazali, że *Nitrosomonas* mogą na niej wzrastać. W hodowli okresowej na mieszance substratowej hydroksyloaminy i amoniaku Boettcher i Koops [5] uzyskali wzrost *Nitrosomonas* z ponad dwukrotnie wyższą wydajnością (0,5 mg białka/mM) w stosunku do oznaczonej wcześniej dla samego amoniaku (0,2 mg białka/mM). W hodowli chemostatycznej podobne rezultaty uzyskali de Bruijn i in. [6] odnotowując, dla substratu w proporcji 20 mM amoniaku i 10 mM hydroksyloaminy, podniesienie wydajności biomasy *Nitrosomonas* do 4,7 mg s.m./mM przy wartości 1,4 mg s.m./mM dla hodowli prowadzonej jedynie na amoniaku. W każdym przypadku wzrostu bakterii na mieszaninie hydroksyloaminy i amoniaku odzysk azotu w formie azotynów był jednak zawsze niższy od wynikającego ze stechiometrii reakcji co wskazywało na formowanie lotnych tlenków azotu. W przeprowadzonych w celu wyjaśnienia tego „ubytku” azotu doświadczeniach w warunkach beztlenowych wykazano, że w środowisku anoksyicznym w obecności hydroksyloaminy lub amoniaku *Nitrosomonas* są zdolne do redukcji azo-

tynów produkując przy tym N_2O . Mimo powtarzalności pozytywnych wyników w hodowli okresowej, próby beztlenowego wzrostu *Nitrosomonas* przeprowadzone metodą hodowli ciągłej na substracie będącym mieszaniną hydroksyloaminy, amoniaku i azotynu nie były jednak w pełni udane [6].

3. Autotroficzna denitryfikacja tlenowa

Pierwsze wzmianki o możliwości prowadzenia denitryfikacji przez nityfikatory autotroficzne pojawiły się już w drugiej połowie lat sześćdziesiątych (cyt. za Bockiem i in. [7] – Hopper, 1968), a następnie w połowie lat osiemdziesiątych (Poth i Focht [8], Poth [9]). W warunkach ograniczonego natlenienia, w hodowlach 3. różnych szczepów bakterii nityfikacyjnych (*Nitrosomonas europaea*, *Nitrosolobus multififormis*, niezidentyfikowany szczep *Nitrosomonas* sp.) Poth [9] odnotował powstawanie tlenu azotu, podtlenu azotu lub azotu gazowego.

Remde i Konrad [10] w hodowli bakterii *Nitrosomonas europaea* oraz *Nitrosovibrio* K71 w warunkach tlenowych, uzyskali produkcję tlenu azotu ((odpowiednio dla badanych szczepów około 1,7 i 0,75 nmol $NO/(mg \text{ biomasy} \cdot \text{min})$). Kiedy warunki tlenowe zmieniano nagle na beztlenowe obserwowano powstawanie znaczących ilości podtlenu azotu (odpowiednio dla badanych szczepów rzędu 45,6 i 4,7 nmol $N_2O/(mg \text{ biomasy} \cdot \text{min})$, zwiększyła się również ilość tlenu azotu do około 5,4 nmol $NO/(mg \text{ biomasy} \cdot \text{min})$ dla *Nitrosomonas europaea* i 1,8 nmol $NO/(mg \text{ biomasy} \cdot \text{min})$ dla *Nitrosovibrio* K71. van Niel (1991), cytując za Kuenenem i Robertsonem [11], uwzględniając wartość szybkości nityfikacji w tlenowej hodowli ciągłej *Nitrosomonas europaea* wykazał, że produkcja tlenu azotu przez te bakterie stanowiła około 0,1% całkowitej nityfikacji. Krótkie wystawienie *Nitrosomonas europaea* na warunki beztlenowe powodowało wzrost tej wartości do 0,5% oraz powstawanie N_2O z wydajnością 3,9% całkowitej nityfikacji.

Wstępne doniesienia wskazujące na możliwość prowadzenia procesu denitryfikacji w odpowiednich warunkach środowiskowych przez autotroficzne bakterie nityfikacyjne nie określały, czy proces ten związany jest ze wzrostem komórek nityfikatorów. Bock i in. [7] prowadząc hodowlę czystych kultur *Nitrosomonas eutropha* w warunkach braku tlenu rozpuszczonego wykazali, że proces redukcji azotynów z wodorem cząsteczkowym jako dawcą elektronu prowadzi do przyrostu komórek. Ponadto stwierdzono, że w warunkach anoksycznych donorem elektronów do redukcji azotynów może być także amoniak. W czystych kulturach *Nitrosomonas eutropha* oraz w mieszanej kulturze *Nitrosomonas eutropha* i *Enterobacter aerogenes* (z amoniakiem jako dawcą elektronów) obserwowano powolną symultaniczną eliminację amoniaku oraz azotynów w stosunku molowym około 1 : 1. Obserwowanemu ubytkowi azotu nie towarzyszył jednak przyrost biomasy. Produktami końcowymi obserwowanych w przeprowadzonych badaniach procesów był azot gazowy (produkt główny) oraz podtlenek azotu. Produktem pośrednim, zarówno w warunkach

ograniczonego natleniania, jak i braku tlenu rozpuszczonego była hydroksyloamina. Autorzy porównali także efektywność eliminacji azotu w czystych kulturach *Nitrosomonas europaea* (doświadczenia prowadzono w warunkach ograniczonego natleniania) i *Nitrosomonas eutropha* (doświadczenia prowadzono w warunkach ograniczonego natleniania oraz braku tlenu rozpuszczonego) oraz kulturach mieszanych *Nitrosomonas europaea* i *Nitrosomonas eutropha* z różnymi chemoorganotroficznymi bakteriami (*Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes eutrophus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Pseudomonas saccharophila*, *Ancylobacter aquaticus*). Stwierdzono, że w kulturach mieszanych na poziom eliminacji azotu w sposób znaczący oddziaływała obecność innych mikroorganizmów. W mieszanej hodowli szczepów *Nitrosomonas* sp. oraz tlenowych denitryfikatorów, w warunkach ograniczonego natleniania, otrzymano prawie całkowitą eliminację azotu amonowego. *Enterobacter aerogenes* jako „partner” *Nitrosomonas eutropha* w znaczący sposób wpływał na podwyższenie efektywności beztlenowego utleniania amoniaku.

Produkcję azotu gazowego z amoniaku w warunkach niskiego stężenia tlenu uzyskali także Muller i in. [12]. W szczelnym dla gazu i zaszczepionym osadem utleniającym jon amonowy reaktorze, przy koncentracji tlenu powyżej 0,15% zużyciu tlenu towarzyszyło zawsze powstawanie N_2 , gdy stężenie tlenu było na poziomie 0,3%, w postaci azotu gazowego odzyskiwano około 58% jonu amonowego. W warunkach beztlenowych natomiast żadnej przemiany amoniaku nie odnotowano. Sformułowano następujące hipotezy na powstawanie azotu w przeprowadzonym eksperymencie: konwencjonalna denitryfikacja przez heterotrofy z wykorzystaniem endogennego źródła węgla lub denitryfikacja z udziałem bakterii autotroficznych, w której elektrony były dostarczane przez utlenianie albo jonu amonowego albo azotynu. Biorąc pod uwagę fakt, że wydzielanie azotu gazowego występowało tylko w obecności niskiego stężenia tlenu i po dodaniu amoniaku, a zanikało przy braku amoniaku mimo obecności wystarczającej ilości azotynu uznano, że zarówno denitryfikacja konwencjonalna jak i utlenianie azotynu powinny zostać wykluczone w rozważanym przypadku, jako możliwe drogi redukcji azotu. Na podstawie reakcji stechiometrycznej i różnic w bilansie azotu Muller i in. [12] wykazali, że N_2 zawsze pochodził od jonu amonowego.

W świetle przedstawionych publikacji i wcześniejszych badań prowadzonych przez ich autorów jednoznacznie stwierdzono, że nitryfikatory w warunkach niskiego stężenia tlenu w oczyszczanych ściekach mogą znacząco się przyczynić do usuwania z nich azotu poprzez udział w produkcji N_2O i N_2 [3].

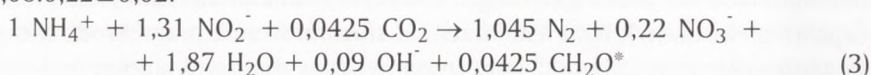
4. Autotroficzna denitryfikacja beztlenowa (proces „Anammox”)

4.1. Historia odkrycia i stechiometria procesu

Do niedawna utlenianie jonu amonowego identyfikowano tylko z systemami tlenowymi. Teoretycznie jednak amoniak może być nieorganicznym donorem elektronów, wykorzystywanym w procesie denitryfikacji. Podając za Mulderem i in. [13] wolna energia tej reakcji (-297 KJ/mol) jest bez mała tak samo znacząca jak przypisywana tlenowej nitryfikacji (-349 KJ/mol). Cytując Jettena i in. [3], Broda (1977) opisał potencjalną obecność w naturze chemolitotroficznych bakterii zdolnych do utleniania amoniaku do azotu gazowego, z wykorzystaniem azotanu jako utleniacza (akceptora elektronów). Po wielu latach od sformułowania przez Brodę swojej hipotezy zaobserwowano „ubytek” jonu amonowego w denitryfikującym reaktorze fluidalnym, w którym oczyszczano eluat z komory fermentacyjnej [13,14]. Przemianom jonu amonowego towarzyszyło zużywanie azotanów i produkcja N_2 . Najniższa zaobserwowana szybkość usuwania azotu amonowego wynosiła $0,4 \text{ kg N/m}^3 \cdot \text{d}$. Dowód na beztlenową (a właściwie anoksyczną – przyp. autorek) oksydację jonu amonowego przeprowadzono na podstawie bilansu azotu i równowagi reakcji oksydo-redukcyjnych w badaniach układu o przepływie ciągłym. Wykazano, że anaerobowe utlenianie jonu amonowego jest nowym procesem, w którym oksydacja 5 moli jonu amonowego wymaga 3 moli azotanu, w wyniku czego powstają 4 mole N_2 ($3 \text{ NO}_3^- + 5 \text{ NH}_4^+ \rightarrow 4 \text{ N}_2 + 9 \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+$). Procesowi nadano nazwę „Anammox” (*anaerobic ammonium oxidation*) [13]. Dla potwierdzenia, że produktami reakcji jest N_2 przeprowadzono doświadczenie z określonymi izotopami azotu; odpowiednio w NH_4^+ zastosowano izotop azotu ^{15}N , a w NO_3^- izotop azotu ^{14}N . W uzyskanych poprzez porównanie znaczonych próbek utworzonego $^{14,15}\text{N}_2$ wynikach wskazano jednak, że w analizowanym procesie raczej azotyn, a nie azotan był preferowanym akceptorem elektronów [15], a stosunek moli amoniaku do azotynu i powstającego N_2 wynosi 1:1:1 zgodnie z reakcją: $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$.

Dowodami na mikrobiologiczny charakter procesu były wyniki doświadczenia z wykorzystaniem hodowli porcjowej [15]. W testach z dodatkiem osadu czynnego poddanego wstępnie promieniowaniu gamma lub sterylizacji w temperaturze 121°C , a także bez dodatku osadu czynnego, nie obserwowano zmian w stężeniu amoniaku. Dodawanie do inkubacji różnych inhibitorów (m.in. 2,4 dinitrofenolu, HgCl_2) powodowało całkowite zahamowanie utleniania amoniaku. Na tej podstawie wnioskowano, że eliminacja azotu amonowego obserwowana w reaktorze z aktywnym osadem czynnym nie zachodziła na drodze reakcji chemicznych, ale wynikała z aktywności wyspecjalizowanych grup mikroorganizmów. Poza tym, w przeprowadzonym eksperymencie szybkość utleniania amoniaku była proporcjonalna do początkowej ilości biomasy, co również potwierdzało mikrobiologiczny charakter zachodzących procesów.

Kolejne próby wykonano w modelu reaktora fluidalnego, do którego w celu wzbogacenia biomasy w mikroorganizmy utleniające jon amonowy w warunkach beztlenowych, dawkowano ścieki syntetyczne wykonane na bazie amoniaku, azotynu oraz kwaśnego węgla z dodatkiem minerałów i elementów śladowych [16,17]. W ciągu trzech pierwszych miesięcy pracy urządzenia na substracie zawierającym 30 mM jonu amonowego i azotynowego osiągnięto prędkość beztlenowego utleniania amoniaku rzędu $3 \text{ kg N-NH}_4^+/\text{m}^3 \cdot \text{d}$, zaś maksymalna prędkość specyficzna procesu wynosiła $1300\text{-}1500 \text{ nmol NH}_4^+/\text{mg s.m.o.} \cdot \text{h}$. Produktem końcowym obserwowanego procesu, oprócz azotu gazowego, były także azotany występujące w znacząco mniejszej ilości do N_2 . Autorzy zaproponowali następujący stosunek stechiometryczny zużycia amoniaku i azotynów oraz produkcji azotanów $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{NO}_3^-$ $1:1,31 \pm 0,06:0,22 \pm 0,02$:



*W równaniu (3) formuła CH_2O opisuje biomasę.

W tych samych badaniach [17] dodatkowe eksperymenty z izotopem węgla ^{14}C w CO_2 potwierdzono, że proces „Anammox” jest rzeczywiście autotroficzny, a także, iż wykorzystywanie dwutlenku węgla następuje tylko w obecności równocześnie jonu amonowego i azotynu. W przeprowadzonych próbach utlenieniu 1 mola NH_4^+ towarzyszyła asymilacja przez biomasę 0,041 mola C. Oszacowana przez autorów szybkość wzrostu mikroorganizmów prowadzących proces ANAMMOX wynosiła $0,001 \text{ h}^{-1}$ (mikroorganizmy bardzo wolno rosnące). Ponieważ w doświadczeniach zabezpieczano ściśle beztlenowe warunki procesu (całkowity brak tlenu rozpuszczonego) dowiedziono tym samym, że przemiana jonu amonowego do azotu gazowego nie potrzebuje tlenu. Doprowadzając zaś tlen w sposób zamierzony wykazano, że jest on inhibitorem procesu.

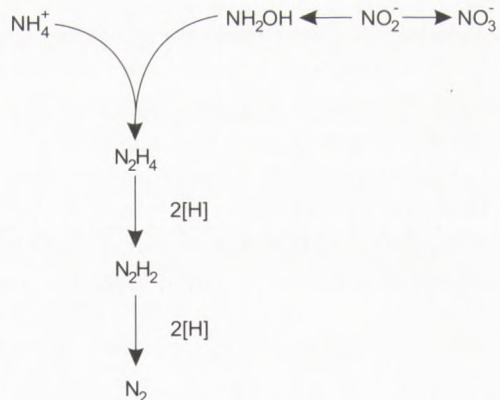
Także w badaniach Helmera i in. [18] potwierdzono, że akceptorem elektronów w beztlenowym utlenianiu amoniaku są azotyny, a nie jak początkowo założono azotany [13]. W przeprowadzonym przez autorów eksperymencie, dodanie do oczyszczanych ścieków azotynów spowodowało wzrost szybkości przekształcania amoniaku z $16,5 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}\cdot\text{h}$ do $32,1 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}\cdot\text{h}$. Eliminacja amoniaku wynosiła wówczas 97,7%, a uzyskany przez autorów stosunek molowy $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-$ wyniósł 1:1,37, odpowiadał zatem stosunkowi zaproponowanemu przez van de Graafa i in. [17].

4.2. Szlak metaboliczny

Określenie szlaku metabolicznego beztlenowego utleniania amoniaku było przedmiotem badań van de Graafa i in. [19]. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wskazano, że najbardziej prawdopodobnym akceptorem elektronów

pochodzących z utleniania amoniaku jest hydroksyloamina, powstająca z azotynów. Założono, że reakcją generującą elektron dla redukcji NO_2^- do hydroksyloaminy jest utlenianie hydrazyny do N_2 , najprawdopodobniej katalizowane przez oksydoreduktazę hydroksyloaminy (HAO). Ponadto wysunięto hipotezę, że w reakcji dysproporcjonowania oraz tworzenia hydrazyny istotną rolę może odgrywać enzym podobny do reduktazy rybonukleotyduowej R2 (*R2 ribonukleotide reductase*). W ostatnich latach dowiedziono, że reduktaza rybonukleotyduowa R2 z *Escherichia coli* katalizuje reakcję dysproporcjonowania hydrazyny do amoniaku i azotu gazowego (Han i in. 1996, cytując van de Graafa i in. [19]). Występowanie hydroksyloaminy oraz hydrazyny w szlaku metabolicznym procesu ANAMMOX potwierdzono w badaniach Egliego i in. [20]. Na podstawie analizy ^{15}N -NMR [19] stwierdzono, że powstające w procesie ANAMMOX azotany pochodzą od azotynów. W przeprowadzonym eksperymencie znakowany $^{15}\text{NO}_3^-$ powstawał tylko wówczas, kiedy w teście wykorzystywano $^{15}\text{NO}_2^-$. W obecności znakowanego $^{15}\text{NH}_3$ nie stwierdzono obecności w odpływie z reaktora $^{15}\text{NO}_3^-$. Postawiono hipotezę, że w wyniku przekształcenia azotynu do azotanu wytwarzany jest czynnik redukcyjny, niezbędny do asymilacji CO_2 , stanowiącego źródło węgla dla autotroficznych mikroorganizmów prowadzących proces ANAMMOX. Autorzy założyli, że reakcja beztlenowego tworzenia NO_3^- z NO_2^- może być katalizowana przez enzym podobny do oksydoreduktazy azotynowej.

Podsumowując, według proponowanego przez autorów metabolicznego szlaku beztlenowego utleniania amoniaku (rys. 1), amoniak z wykorzystaniem hydroksyloaminy jako akceptora elektronu utleniany jest do hydrazyny, która następnie zostaje utleniona do azotu gazowego.



Rys. 1. Prawdopodobny metaboliczny szlak beztlenowego utleniania amoniaku [19].

4.3. Warunki prowadzenia procesu oraz charakterystyka biomasy uczestniczącej w procesie ANAMMOX

Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych w sekwencyjnym reaktorze porcjowym Strous i in. [21] wyznaczyli parametry fizjologiczne charakteryzujące biomasę prowadzącą proces ANAMMOX oraz optymalne warunki zachodzenia beztlenowego utleniania amoniaku. W badaniach cytowanych autorów wydajność biomasy wynosiła $0,066 \pm 0,01$ C-mol/mol NH_3 , maksymalna właściwa szybkość przekształcania amoniaku 45 ± 5 nmol/ (min · mg białka), maksymalna szybkość wzrostu $0,0027 \text{ h}^{-1}$ (czas podwojenia 11 dni). Proces ANAMMOX przebiegał bez zakłóceń w temperaturze $20\text{--}43^\circ\text{C}$ (temperatura optymalna wynosiła 40°C) oraz przy pH w zakresie $6,7\text{--}8,3$ (optymalne pH wynosiło $8,0$). W warunkach optymalnych maksymalna właściwa szybkość utleniania amoniaku dochodziła do 55 nmol/ (min · mg białka). Ponadto stwierdzono, że inhibujący wpływ na proces mają azotyny w stężeniu większym od 20 mM. W przypadku, gdy stężenie azotynów przez dłuższy czas (12 h) utrzymywało się na wysokim poziomie aktywność biomasy ANAMMOX spadała do zera. Zahamowanie procesu następowało również przy zbyt niskim stężeniu NO_2^- , gdyż związek ten stanowi jeden z substratów reakcji.

W literaturze przedmiotu jako inhibitory procesu ANAMMOX wskazywane są także fosforany oraz acetylen (van de Graaf i in. 1996, Jetten i in. 1997 cyt. za Strous i in. [22]). van de Graaf i in. [17] obserwowali całkowity spadek aktywności biomasy prowadzącej proces ANAMMOX po dodaniu do medium hodowlanego fosforanów w ilości od 5 do 50 mM KH_2PO_4 . Po doprowadzeniu fosforanów w ilości jedynie 1 mM KH_2PO_4 nie odnotowano inhibującego wpływu rozpatrywanego związku na aktywność beztlenowego utleniania amoniaku.

Czynnikiem abiotycznym mającym decydujący wpływ na zachodzenie autotroficznej denitryfikacji beztlenowej są warunki tlenowe panujące w reaktorze. Początkowe testy [17] wykazały, że tlen całkowicie hamuje aktywność kultur ANAMMOX (badania prowadzono w hodowli beztlenowej). W celu zbadania odwracalności inhibicji tlenem, zastosowano układ ze zmiennymi warunkami tlenowymi (naprzemienienie: 2 h warunki tlenowe, 2 h warunki beztlenowe [23]). W przeprowadzonym eksperymencie, procesy utleniania amoniaku oraz redukcji azotynów obserwowano jedynie w warunkach beztlenowych. Jednak w ciągu całego eksperymentu aktywność mikroorganizmów uczestniczących w procesie ANAMMOX w fazach beztlenowych pozostawała stała, dowodząc tym samym, że hamujący efekt tlenu jest odwracalny. Wrażliwość na tlen kultur zdolnych do prowadzenia procesu ANAMMOX badano także przy bardzo niskich wartościach nasycenia tlenem ($2, 1, 0,5, 0\%$). W eksperymentach tych potwierdzono, że proces zachodzi w warunkach całkowitego braku tlenu cząsteczkowego. Według Egliego i in. [20] odwracalna inhibicja tlenem procesu ANAMMOX występuje jedynie przy niskich stężeniach tlenu ($0,25 \div 1,0\%$ nasycenia tlenem). Wysokie stężenia tego wskaźnika powodują inhibicję nieodwracalną.

Izolacja oraz identyfikacja szczepu bakteryjnego zdolnego do prowadzenia bez-tlenowego utleniania amoniaku została przeprowadzona po raz pierwszy przez Strousa i in. [24]. Wyizolowany szczep nazwano *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Na podstawie identyfikacji filogenetycznej, wykonanej przy zastosowaniu najnow-szych technik mikrobiologicznych, między innymi łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR, *polymerase chain reaction*) oraz hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*), *Candidatus Brocadia anammoxidans* został zaliczony do rzędu *Planctomyces*. Szczep bakteryjny prowadzący proces ANAMMOX został również zidentyfikowany przez Schmida i in. (2000) (za Helmer-Madhok [25]). Autorzy nazwali go *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*.

Wciąż jednak identyfikacja bakterii beztlenowo utleniających jon amonowy w próbkach środowiskowych (gleba, woda, ścieki) przy użyciu tradycyjnych metod mikroskopowych jest bardzo trudna ze względu na ograniczoną liczbę tych specy-ficznych gatunków charakteryzujących się dodatkowo znaczną różnorodnością mor-fologiczną, wolnym tempem wzrostu i wydajności (cyt. za Jettenem i in. [3]: Watson i in., 1989 i odpowiednio Gay i Corenon 1984, Wood, 1986). Zastosowanie najnow-szych technik molekularnych z nowymi technikami mikroskopowymi, takimi jak np. skaningowa mikroskopia laserowa umożliwi w najbliższej przyszłości izolację i prze-strzenne rozmieszczenie poszczególnych mikroorganizmów odpowiedzialnych m.in. za utlenianie jonu amonowego w warunkach beztlenowych, pozwalając uzyskać in-formacje na temat ich filogenetycznych powiązań i znaczenia ekologicznego [15].

5. Heterotroficzna nityfikacja i heterotroficzna denityfikacja tlenowa

Pytanie, czy autotroficzne bakterie nityfikacyjne zajmują monopolistyczną po-zycję w przyrodzie, czy też bakterie heterotroficzne odgrywają istotną rolę w prze-kształceniu jonu amonowego do azotanu jest nadal otwarte. Nityfikacja heterotro-ficzna była znana od dawna, ale uważano ją za mało znaczącą (cyt. za Jettenem i in. [3]: Meiklejohn, 1940 i Verstraete, 1975) głównie z uwagi na fakt, że heterotroficzne nityfikatory nie powodują akumulacji azotynów czy azotanów, których ilość jako produktów oksydacji jest powszechnym sposobem pomiaru efektywności procesu. Według Schlegela [26] w przeciwieństwie do autotroficznej nityfikacji proces pro-wadzony przez hetrotrofy nie jest sprzężony ze wzrostem i produkcją biomasy, a tempo heterotroficznej nityfikacji jest wolniejsze od nityfikacji autotroficznej o współczynnik rzędu $10^3 \div 10^4$.

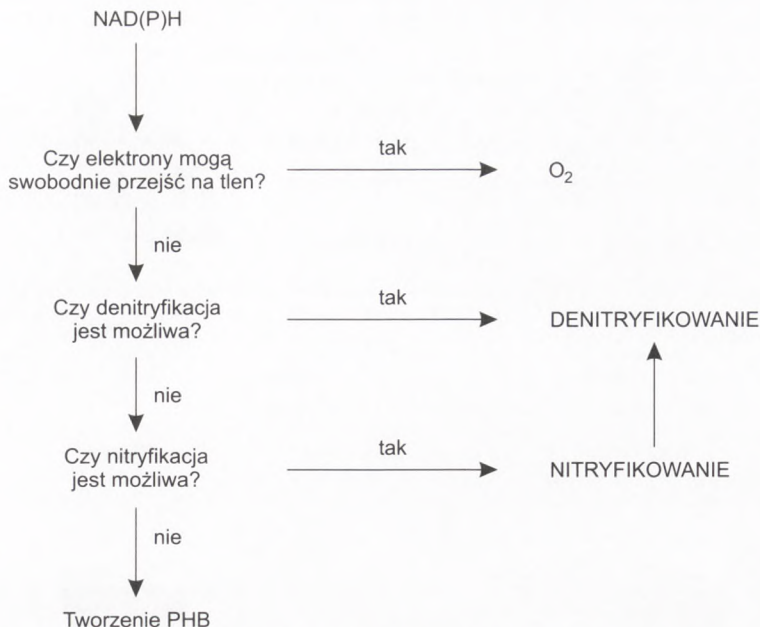
Pierwsze doniesienia dotyczące możliwości występowania procesu denityfikacji heterotroficznej w obecności tlenu rozpuszczonego pochodziły, cytując za Robert-sonem i Kuenenem [27,28] od Marshalla i in. (1953), von Meschnera i Wuhrmanna (1963), Krula (1976). W eksperymentach wymienionych autorów nie wyeliminowano jednak możliwości występowania mikrosterf beztlenowych, które umożliwiały zaj-ście klasycznej denityfikacji w warunkach anoksycznych. Poza tym w wielu przy-

padkach nie monitorowano stężenia tlenu rozpuszczonego. Przyjętą w cytowanych pozycjach literatury hipotezę zachodzenia tlenowej denitryfikacji jednoznacznie potwierdzono w doświadczeniach przeprowadzonych przez Krula i Veeningena [29], Meiberga i in. [30], Lloyd i in. [31], Robertsona i Kuenena [27,28], podczas których zapewniono ściśle tlenowe warunki w całej hodowli.

Poczynienie obserwacji, że *Thiosphaera pantotropha*, organizm wyizolowany przez Robertsona i Kuenena [32] na oczyszczalni w Gist Brocades (Holandia), jest nie tylko heterotroficznym nitryfikatorem, ale także tlenowym denitryfikatorem przemieniającym większość swoich produktów oksydacji (azotynów) bezpośrednio do gazowych związków azotu, zmusiło do ponownej oceny procesu nitryfikacji heterotroficznej. Bilans azotu przeprowadzony dla czystych kultur *T. pantotropha* wykazał, że szybkość procesu nitryfikacji heterotroficznej w kilku przypadkach była znacznie wyższa niż wcześniej sądzono, co zrodziło nadzieję na jednoetapowe usuwanie azotu w systemach oczyszczania ścieków.

W eksperymentach prowadzonych przez Robertsona i Kuenena [27,28] wykazano, że *T. pantotropha* w procesie oddychania jako ostateczne akceptory elektronów może symultanicznie wykorzystywać azotany oraz tlen. Analizując ilość tlenu pobieraną przez ten organizm w środowisku azotanów stwierdzono, że jest ona niższa od tej, jaką obserwowano bez obecności tego związku. Kiedy do hodowli oprócz azotanów dodawano inhibitory denitryfikacji ilość tlenu zużywana przez *Thiosphaera pantotropha* wzrastała. Jednocześnie stwierdzono wówczas mniejszą produkcję gazu oraz akumulację azotynów. Na podstawie uzyskanych wyników badań – z zastosowaniem hodowli ciągłej w chemostacie (Robertson i in. [33]) – dowiedziono, że obecność azotanów i azotynów obniża szybkość heterotroficznej nitryfikacji. Maksymalną szybkość tego procesu wynoszącą 93,9 nmol/(mg białka · min) wyznaczono, kiedy jedynym azotowym substratem dla *Thiosphaera pantotropha* był amoniak (źródło węgla organicznego stanowił octan). Ponadto odnotowano, że szybkość zarówno nitryfikacji jak i denitryfikacji rosła wraz ze spadkiem stężenia tlenu rozpuszczonego. Zależność taką obserwowano do pewnej określonej wartości tego wskaźnika – około 25% nasycenia tlenem. Przy niższych wartościach stężenia tlenu odnotowano spadek szybkości analizowanych procesów, ale tylko w hodowlach zaopatrywanych jedynie w amoniak. W przypadku, kiedy substratem dla *Thiosphaera pantotropha* były również azotany szybkość procesów gwałtownie wzrastała, a efektywność tlenowej denitryfikacji osiągała poziom charakterystyczny dla procesu prowadzonego w warunkach anoksycznych. Na podstawie uzyskanych wyników proponowano schemat przebiegu procesów heterotroficznej nitryfikacji i tlenowej denitryfikacji prowadzonych przez *Thiosphaera pantotropha* (rys. 2).

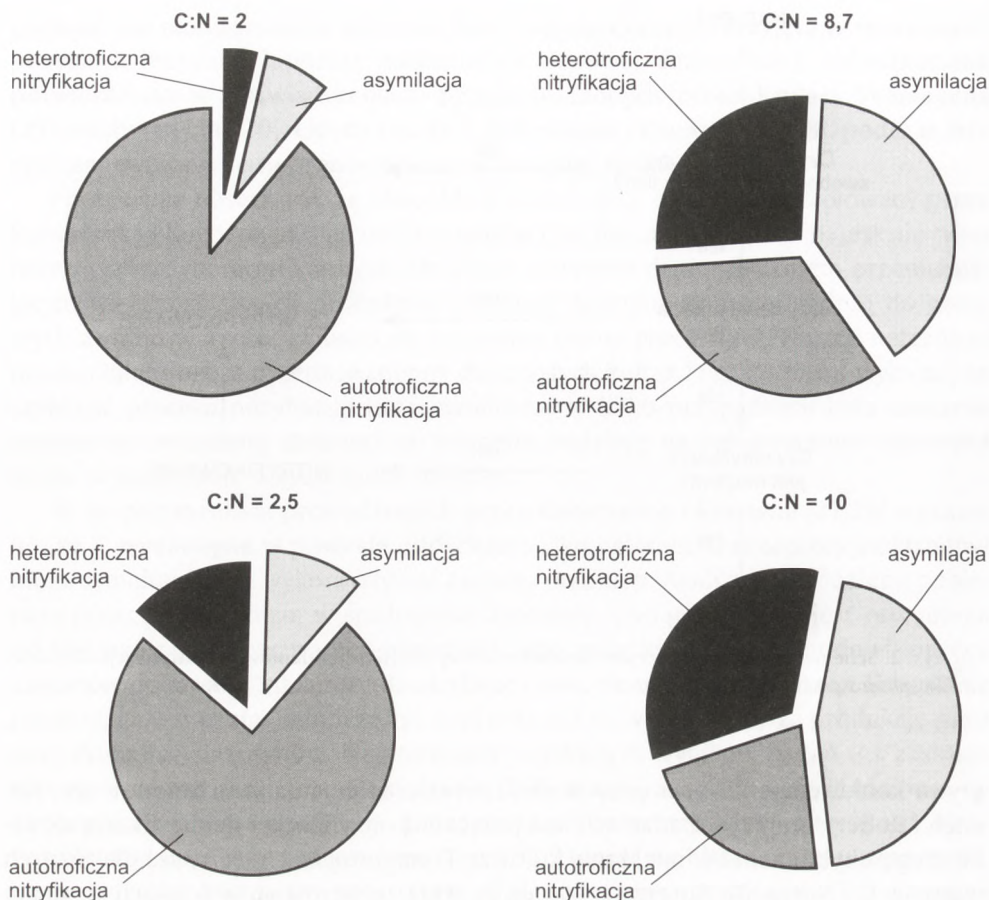
van Niel i in. [34] podjęli badania porównawcze procesu nitryfikacji z wykorzystaniem równolegle dobrze znanych nitryfikatorów autotroficznych (*Nitrosomonas europaea*) i heterotroficznych (*Thiosphaera pantotropha*) przy różnych wartościach stężenia tlenu i stosunku C : N w środowisku. Udowodniono w nich, że w warunkach niskiego stężenia tlenu i wysokiej wartości stosunku C : N *T. pantotropha* wy-



Rys. 2. Schemat przebiegu procesów heterotroficznej nitryfikacji i tlenowej denitryfikacji dla bakterii *Thiosphaera pantotropha* [33].

grywa konkurencję z *N. europaea* w efektywności utleniania jonu amonowego. Kuenen i Robertson [11] w badaniach nad połączoną nitryfikacją i denitryfikacją określili drogę ubytku azotu w mieszanej kulturze *T. pantotropha* i *N. europaea* dla różnych wartości C : N (rys. 3). Autorzy wykazali, że wraz ze wzrostem w ściekach stosunku C : N rośnie wielkość ubytku jonu amonowego na drodze heterotroficznej nitryfikacji, czemu towarzyszy proporcjonalnie większa jego asymilacja będąca dowodem większej wydajności biomasy heterotroficznej niż uzyskana dla autotrofów. W systemach oczyszczania ścieków wyższa asymilacja azotu amonowego jednoznaczna jest jednak z wyższym przyrostem osadu, co, jak się wydaje, czyni proces nitryfikacji heterotroficznej mniej konkurencyjny w stosunku do nitryfikacji autotroficznej.

Denitryfikacja tlenowa w kulturze *T. pantotropha* była także przedmiotem doświadczeń prowadzonych m.in. przez Bella i in. [35], Bella i Ferguson [36], Richardsona i Ferguson [37], Thomsena i in. [38], Kuenena i Robertsona [11], Ferguson [39], Robertsona i in. [40], Artsa i in. [41]. Wobec uzyskania przez badaczy w części rozbieżnych wyników zastosowano, w celu dokładnego poznania przemian jonu amonowego, azotynowego i azotanowego, izotop azotu ^{15}N . W badaniach prowadzonych na hodowli okresowej z zastosowaniem chromatografii gazowej i spektrometrii masowej potwierdzono, że w warunkach tlenowych i w obecności *T. pantotropha* azot gazowy powstaje z jonu amonowego i/albo azotynu i azotanu. Szybkość reakcji oceniono jednak na około 10% wartości wstępnie sugerowanej przez Robertsona



Rys. 3. Zakres przemian jonu amonowego w mieszanej kulturze *Thiosphaera pantotropha* i *Nitrosomonas europaea* dla różnych wartości stosunku C : N [11].

i in. [33,40]. Robertson i in. [40], a wcześniej także van Niel i in. [42] potwierdzili produkcję N_2 przez inne heterotroficzne nityfikatory. Jeden z gatunków *Alcaligenes faecalis* TUD produkował prawie równe ilości N_2 i N_2O . W eksperymentach prowadzonych z izotopem ^{15}N w kulturze *Alcaligenes faecalis* wykazano, że bakteria ta w warunkach tlenowych produkuje $^{14,15}N_2O$ i $^{15,15}N_2O$ z $^{14}NH_4^+$ i $^{15}NO_2^-$.

Otte i in. [43] analizowali przemiany azotu w okresowej chemostatycznej kulturze *A. faecalis* w naprzemiennych warunkach tlenowo-beztlenowych. Autorzy odnotowali 25% ubytek NO_2^- w postaci N_2O . Fakt, że *T. pantotropha* generuje N_2 potwierdzono także w hodowli ciągłej w chemostacie na substracie z jonem amonowym lub azotowym znaczonego izotopem ^{15}N oraz z limitowanym octanem stanowiącym źródło węgla organicznego [41]. W odróżnieniu od hodowli okresowej uzyskano tu produkcję zarówno N_2 jak i N_2O , co przypisuje się limitowanemu dostępowi sub-

stratu. Ilość podtlenku azotu w strumieniu gazu rosła wraz ze wzrostem stężenia tlenu rozpuszczonego w środowisku; gdy stężenie to przekroczyło 95% obserwowano już tylko produkcję N_2O . W tych samych badaniach odnotowano, że dodanie hydroksyloaminy do podłoża zawierającego jon amonowy powoduje, że tylko ona staje się źródłem powstających gazów N_2 i N_2O . Tym samym potwierdzono wcześniejsze spostrzeżenia Robertsona i Kuenena [44], że hydroksyloamina jest inhibitorem oksydacji jonu amonowego przez *T. pantotropha*, nie wpływając jednak w żaden sposób na całkowitą szybkość nityfikacji/denitryfikacji.

W ostatnich badaniach wprawdzie nie potwierdzono równie wysokiej, jak wcześniej sugerowano, efektywności symultanicznie zachodzących heterotroficznej nityfikacji i denitryfikacji tlenowej z udziałem modelowego organizmu za jaki uznano *T. pantotropha*, nie wydaje się jednak by mogło powrócić przeświadczenie o zupełnie nieznaczącej roli tych procesów w usuwaniu azotu ze ścieków. W ostatnio prowadzonych eksperymentach inne powszechnie spotykane w naturalnym środowisku heterotroficzne nityfikatory [45] utrzymują swoją wcześniej opisywaną aktywność [40]. Ich miejsce w przemianach związków nieorganicznego azotu wynika z szerokiej ich dostępności i szybkiego wzrostu. Przekształcanie produktów swojej oksydacji do azotu gazowego udokumentowano w hodowlach szeregu innych heterotroficznych nityfikatorów, potwierdzając jednocześnie możliwość eliminacji azotu przez pojedynczy organizm [46-49].

Przedstawione wyniki pochodzą w znacznej mierze z badań o charakterze podstawowym, nie mających wiele wspólnego z działaniami aplikacyjnymi. Ciągłe jeszcze panuje przekonanie, że azot tradycyjnie jest usuwany ze ścieków z zastosowaniem metody osadu czynnego, zatem w drodze klasycznej nityfikacji i denitryfikacji. Spośród przedstawionych „nowych” przemian mikrobiologicznych azotu mineralnego, jak się wydaje, w najbliższej przyszłości bardziej beztlenowe utlenianie jonu amonowego stanie się obiecującym procesem w aspekcie potencjalnych oszczędności energii i niższego zapotrzebowania na ChZT w oczyszczanych ściekach niż aerobowa denitryfikacja sprzężona z heterotroficzną nityfikacją, której szybkość jest jednak dużo niższa od wyznaczanej dla nityfikacji autotroficznej (tab. 1).

Tabela

Porównanie szybkości autotroficznej i heterotroficznej nityfikacji [11,16]

Organizm	Szybkość nityfikacji nM/ mg s.m. · min	Związek azotu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70-90	hydroksyloamina
<i>Pseudomonas</i> sp.	40-450	hydroksyloamina
<i>Alcaligenes</i> sp.	33	oksym aldehydu pirogronowego
<i>Pseudomonas</i> sp.	2,6	oksym aldehydu pirogronowego
<i>Thiosphaera pantotropha</i>	35	amoniak
<i>Alcaligenes faecalis</i>	17-22	amoniak
<i>Pseudomonas</i> sp.	24	amoniak
<i>Nitrosomonas</i> sp.	130-1200	amoniak i hydroksyloamina

Literatura

1. Szetela R., (1996), *Usuwanie azotu i fosforu w procesach biochemicznych*, w: *Odnowa wody. Podstawy teoretyczne procesów* – pod red. A.L. Kowala, wyd. II, Oficyna Wydawnicza PWR, Wrocław.
2. Bock E., Koops H. P., Ahler B., Harms H., (1992), *Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source*, in: Eds. Balows A., Trueper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleiffer K. H., *The Procaroyotes*, Springer Verlag, Berlin, 414-430.
3. Jetten M. S. M., Logeman S., Muyzer G., Robertson L. A., de Varies S., van Loosdrecht M. C. M., Kuenen J. G., (1997), *A. van Leeuwenhoek*, 71, 75-93.
4. Anderson K. K., Hooper A. B., (1983), *FEBS Lett.*, 164, 236-240.
5. Boettcher B., Koops H. P., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 122, 236-266.
6. de Bruijn P., van de Graaf A. A., Jetten M. S. M., Robertson L. A., Kuenen J. G., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 125, 179-184.
7. Bock E., Schmidt I., Stüven R., Zart D., (1995), *Arch. Microbiol.*, 163, 16-20.
8. Poth M., Focht D., (1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1134-1141.
9. Poth M., (1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 957-959.
10. Remde A., Conrad R., (1990), *Arch. Microbiol.*, 154, 187-191.
11. Kuenen J. G., Robertson L. A., (1994), *FEMS Microbiology Reviews*, 15, 109-117.
12. Muller E. B., Stouthamer A. H., Verseveld H. W., (1995), *Biodegradation*, 6, 339-349.
13. Mulder A., van de Graaf A. A., Robertson L. A., Kuenen J. G., (1995), *FEMS Microbiology Ecology*, 16, 177-184.
14. van de Graaf A. A., Mulder A., Slijkhuys H., Robertson L. A., Kuenen J. G., (1990), *Anoxic ammonium oxidation*, in: *Proc. 5th European Congress on Biotechnology*, Eds. Christiansen C., Munck L., Villadsen J., 1, 388-391 (Munkgaard International Publishers, Copenhagen).
15. van de Graaf A. A., Mulder A., Bruijn P., Jetten M. S. M., Robertson L. A., Kuenen J. G., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4, 1246-1251.
16. Jetten M. S. M., Robertson L. A., Kuenen J. G., (1995), *Recent advances in the removal of nitrogen from wastewater*, in: *Proceedings of the International Symposium on Microbiol Ecology* (Sao Paolo), 112-131.
17. van de Graaf A. A., Bruijn P., Robertson L. A., Mulder A., Jetten M. S. M., Kuenen J. G., (1996), *Microbiology*, 142, 2187-2196.
18. Helmer C., Tromm C., Rosenwinkel K-H., Seyfried C. F., Kunszt S., (2001), *Wat. Sci. Tech.*, 43, 1, 311-320.
19. van de Graaf A. A., Bruijn P., Robertson L. A., Mulder A., Jetten M. S. M., Kuenen J. G., (1997), *Microbiology*, 143, 2415-2421.
20. Egli K., Fanger U., Alvarez P. J. J., Siegrist H., van der Meer J. R., Zehnder A. J. B., (2001), *Arch. Microbiol.*, 175, 3, 198-207.
21. Strous M., Heijnen J. J., Kuenen J. G., Jetten M. S. M., (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 589-596.
22. Strous M., van Gerven E., Zheng P., Kuenen J. G., Jetten M. S. M., (1997a), *Water. Res.*, 31, 8, 1955-1962.
23. Strous M., van Gerven E., Kuenen J. G., Jetten M. S. M., (1997 b), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 6, 2446-2448.
24. Strous M., Fuerst J. A., Kramer E. H. M., Logemann S., Muyzer G., van de Pas-Schoonen K. T., Webb R., Kuenen J. G., Jetten M. S. M., (1999), *Nature*, 400, 446-449.
25. Helmer-Madhok C., Schmid M., Filipov E., Gaul T., Hippen A., Rosenwinkel K-H., Seyfried C. F., Wagner M., Kunst S., (2002), *Wat. Sci. Tech.*, 46, 1-2, 223-231.
26. Schlegel H. G., (1996), *Mikrobiologia ogólna*, PWN, Warszawa.
27. Robertson L. A., Kuenen J. G., (1984a), *Arch. Microbiol.*, 139, 351-354.
28. Robertson L. A., Kuenen J. G., (1984b), *A. van Leeuwenhoek*, 50, 522-544.
29. Krul J. M., Veeningen R., (1977), *Water Res.*, 11, 39-43.
30. Meiberg J. B. M., Bruinenberg P. M., Harder W., (1980), *J. Gen. Microbiol.*, 120, 453-463.
31. Lloyd D., Boddy L., Davies K. J. P., (1987), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45, 185-190.

32. Robertson L. A., Kuenen J. G., (1983), *J. Gen. Microbiol.*, 129, 2847-2855.
33. Robertson L. A., van Niel E. W. J., Torremans R. A. M., Kuenen J. G., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 11, 2812-2818.
34. van Niel E. W. J., Arts P. A. M., Wesseling B. J., Robertson L. A., Kuenen J. G., (1993), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 102, 109-118.
35. Bell L. C., Richardson D. J., Ferguson S. J., (1990), *FEBS Lett.*, 265, 85-87.
36. Bell L. C., Ferguson S. J., (1991), *Biochem J.*, 273, 423-427.
37. Richardson D. J., Ferguson S. J., (1992), *Arch. Microbiol.*, 157, 535-537.
38. Thomsen J. K., Lonsmann J. J., Cox R. P., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 110, 319-324.
39. Ferguson S. J., (1994), *A. van Leeuwenhoek*, 66, 89-110.
40. Robertson L. A., Dalsgaard T., Revsbeck N. P., Kuenen J. G., (1995), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 18, 113-120.
41. Arts P. A. M., Robertson L. A., Kuenen J. G., (1995), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 18, 305-316.
42. van Niel E. W. J., Braber K. J., Robertson L. A., Kuenen J. G., (1992), *A. van Leeuwenhoek*, 62, 231-237.
43. Otte S., Grobben N. G., Robertson L. A., Jetten M. S. M., Kuenen J. G., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 6, 3211-3223.
44. Robertson L. A., Kuenen J. G., (1992), *Nitrogen removal from water and waste*, in: *Microbial control of pollution*, Eds. Fry J. C., Gadd G. M., Herbert R. A., Jones C. W., Watson-Craig I. A., 227-267, Society for General Microbiology, Reading UK.
45. Carter J. P., Hsiao Y. H., Spiro S., Richardson D. J., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2852-2858.
46. Castignetti D., Hollocher T. C., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 4, 620-623.
47. Robertson L. A., Cornelisse R., de Vos P., Hadjioetomo R., Kuenen J. G., (1989), *A. van Leeuwenhoek*, 56, 289-300.
48. Coyne M. S., Tiedje J. M., (1990), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73, 263-270.
49. Patureau D., Davison J., Bernet N., Moletta R., (1994), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 14, 71-78.