



Recente ontwikkelingen in de verwijdering van stikstof uit afvalwater

DR. IR. MIKE JETTEN, TU DELFT

PROF. DR. IR. MARK VAN LOOSDRECHT, TU DELFT

De omzetting van ammonium-stikstof in N_2 -gas is essentieel voor de meeste afvalwaterinstallaties. Daarbij dient de uitstoot van N_2O minimaal te zijn. In Delft is hiervoor een gecombineerd systeem ontwikkeld: het Sharon- en Anammoxproces. Het Sharonproces (Single reactor for High activity Ammonium Removal Over Nitrite) kan zonder biomassaretentie en pH-sturing worden bedreven zodat ongeveer 50 procent van het ammonium wordt geoxideerd tot nitriet en de beluchtingskosten met 60 procent worden verminderd. Het effluent van een dergelijk partieel nitrificatieproces is een ideale voeding voor het Anammoxproces. In dit proces wordt ammonium als elektronendonor gebruikt voor de denitrificatie van nitriet tot N_2 -gas. Hierdoor is toevoeging van een CZV bron zoals methanol niet meer nodig.

In de huidige landbouw wordt stikstof toegevoegd in vorm van biologisch gefixeerde stikstof of kunstmest. Slecht een deel van deze stikstof wordt gebruikt voor assimilatie in planten of dieren. De rest gaat verloren via diffuse processen en draagt zodoende bij aan de stikstofbelasting van het milieu. Ammonium is één van de meest belangrijke stikstofverbindingen, die uit het milieu verwijderd dient te worden (Van Loosdrecht en Jetten, 1998). In de biologische afvalwaterzuivering wordt daarbij veelvuldig gebruik gemaakt van nitrificatie en denitrificatie. Voor deze processen is een grote hoeveelheid zuurstof (energie) en CZV nodig. Dit CZV zou beter aangewend kunnen worden om methaan te vormen (Van Loosdrecht en Jetten, 1996). Daarnaast komt een significante (6%) hoeveelheid van het biologisch gevormde N_2O uit sub-optimaal

functionerende afvalwaterzuiveringsinstallaties (Schön *et al.*, 1994). Recentelijk zijn een aantal nieuwe microbiële stikstofomzettingen beschreven, die kunnen worden toegepast om een efficiëntere ammoniumverwijdering zonder risico van N_2O -uitstoot te realiseren. Deze processen zijn met name toepasbaar bij afvalstromen met een hoog ammoniumgehalte (groter dan 300 mgN/l). Op basis van de in dit artikel beschreven processen is het mogelijk de afvalwaterzuivering duurzamer te bedrijven. Een voorstel hiertoe is in 1996 in een prijsvraag van de STOWA uiteengezet.

De anaërobe oxidatie van ammonia

De ontdekking van biologische anaërobe ammonium oxidatie (Anammox) is in 1995 beschreven (Mulder *et al.*). In dit nieuwe biologische proces worden nitriet en ammonia

onder anaërobe omstandigheden omgezet in stikstofgas. De bacteriën, die verantwoordelijk zijn voor het Anammoxproces, zijn bestudeerd met behulp van een zogenaamde sequentiële batch reactor (SBR) (Strous *et al.*, 1998). De SBR is een veelzijdige reactor waarin biomassa zeer efficiënt vastgehouden kan worden.

Verschillende belangrijke fysiologische parameters (tabel 1) zoals de biomassa-opbrengst, de maximale ammoniumomzettingssnelheid en de maximale groeisnelheid zijn met slib uit de SBR bepaald.

Het voornaamste product van de Anammoxreactie was stikstofgas, maar 20 procent van het toegevoegde nitriet werd teruggevonden als nitraat. Deze nitraatvorming is waarschijnlijk gekoppeld aan de generatie van voldoende reductie-equivalenten voor biomassaproductie met behulp van kooldioxide fixatie. De stikstofbalans vertoonde de volgende verhouding 1:1.32:0.26 voor respectievelijk de consumptie van ammonium en nitriet en de productie van nitraat. Door middel van de stabiele en selectieve condities in de SBR kon een hoge verrijking (74%) van de Anammox-bacteriën verkregen worden.

Identificatie van de Anammoxbacteriën als *Brocadia anammoxidans*

Sommige *Nitrosomonas*-stammen zijn in staat tot anaërobe ammoniumoxidatie met nitriet als elektronacceptor (tabel 1). Onder anoxische of zuurstof gelimiteerde condities is de reactiesnelheid echter minder dan één procent van de normale nitrificatiesnelheid (Jetten *et al.*, 1999; Schmidt en Bock, 1997). Door gebruik te maken van zeer selectieve anaërobe ophopingsculturen met ammonium en nitriet als de enige substraten en bicarbonaat als de enige koolstofbron was het mogelijk een morfologische zeer opvallende bacterie op te hopen, die in geen enkel opzicht leek op de bekende ammonia-oxiderende bacteriën (Jetten *et al.*, 1999). De Anammoxactiviteit van zulke ophopingsculturen was meer dan 20 maal hoger dan de anaërobe snelheid, die voor aërobe ammonia-oxideerders was bepaald (tabel 1). Deze ophopingsculturen werden voor meer dan 70 procent gedomineerd door een bacterie die tenminste drie eigenschappen gemeen heeft met bacteriën uit de orde van de *Planctomycetales*: celdeling door knopvorming, interne celcompartimenten, en de aanwezigheid van 'crateriforme' structuren en de aanwezigheid van zeer ongebruikelijke vetzuren in de celmembraan (Strous *et al.*, 1999). De dominante bacterie kon recentelijk gezuiverd worden door een combinatie van micro-manipulatie en dichtheidsgradiëntentrifugatie (Strous *et al.*, 1999). Op deze manier kon een 99.6 (0.2% zuivere celsuspensie) verkregen worden. Deze cellen hadden een hoge

Tab. 1 Belangrijke fysiologische parameters voor microbiële aërobe en anaërobe ammoniumoxidatie.

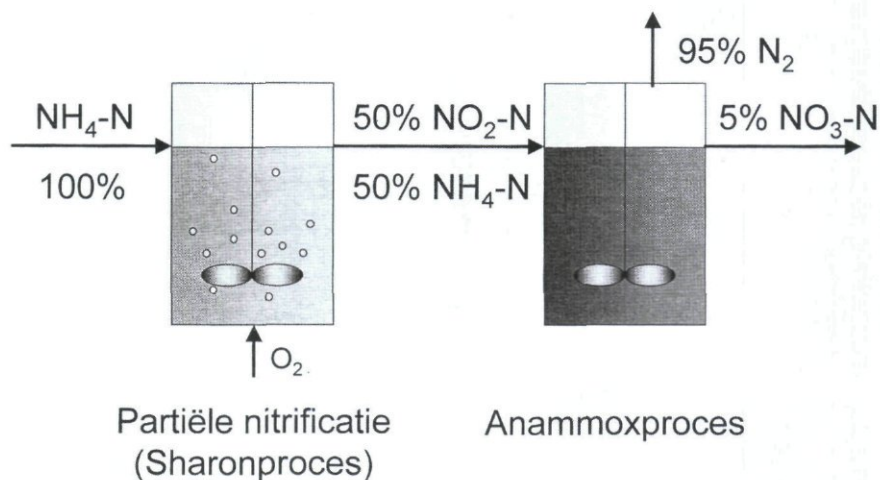
Parameter	Anammox	Nitrificatie	Eenheid
Maximale specifieke aërobe NH_4^+ omzettingssnelheid	0	2-5	kg $NH_4^+-N \cdot kg^{-1}$ VSS $\cdot$ dag $^{-1}$
Maximale specifieke anaërobe NH_4^+ omzettingssnelheid	1.1	<0.05	kg $NH_4^+-N \cdot kg^{-1}$ VSS $\cdot$ dag $^{-1}$
Biomassa-opbrengst	0.07	0.1	kg eiwit $\cdot$ kg $^{-1}$ NH_4^+-N
K_s voor ammonium	≤ 0.1	≥ 1	mg/l NH_4^+-N
K_s voor nitriet	≤ 0.1	Onbekend	mg/l NO_2^-N
K_s voor zuurstof	Niet van toepassing	> 0.26	mg/l O_2

Anammoxactiviteit en gebruikten CO_2 als koolstofbron.

Het 16S rDNA gen van de geïsoleerde bacterie werd gebruikt om een tiental zeer specifieke sondes te ontwerpen, waarmee de Anammoxbacterie herkend kan worden. Met behulp van fluorescente *in situ* hybridisatie werd aangetoond dat deze sondes alleen met de Anammoxbacterie hybridiseren. Een verwantschapsanalyse toonde aan dat de Anammoxbacterie inderdaad tot de orde van de *Planctomycetales* behoorde. Dit wijst erop dat een nieuwe chemolithoautotrofe planctomycete-achtige bacterie verantwoordelijk is voor het Anammoxproces. Ondertussen heeft de bacterie de naam *Brocadia anammoxidans* gekregen.

Ecologische niches van de Anammoxbacteriën

Regelmatig wordt gerapporteerd dat afvalwaterinstallaties een groot gat in hun stikstofbalans vertonen. In drie van deze installaties met een biofilmreactor en een zeer hoge ammoniumbelasting, een lage CZV-belasting en een beperkte beluchtingscapaciteit verdween een substantieel deel van de ammonia als gasvormige stikstofverbindingen (Jetten *et al.*, 1999). In dergelijke systemen zouden condities kunnen heersen waarbij



Afb. 1: Het gecombineerde Sharon-Anammoxproces voor de verwijdering van ammonium uit slibgistingwater.

zowel nitrificerders als Anammoxbacteriën samenwerken. De Anammoxbacteriën kunnen zich dan in de diepere biofilm handhaven. Deze waarneming duidt erop dat anaërobe ammonium oxidatie veel meer verspreid is dan tot nu toe is aangenomen.

Toekomstige studies met de specifieke fluorescente 16S rRNA sondes zullen zeker bijdragen aan ons begrip van de diversiteit en de verspreiding van de planctomycete-achtige Anammoxbacteriën.

Het mogelijke reactiemechanisme voor Anammox

De mogelijke metabole route voor anaërobe ammonium-oxidatie is onderzocht met behulp van ^{15}N -labelingsexperimenten. Deze experimenten toonden aan dat hydroxylamine en hydrazine belangrijke intermediairen in het proces zijn. Biologisch bekeken is hydrazine is een zeer zeldzame stikstofverbinding. Nog nooit werd deze verbinding als intermediair in een biologisch proces waargenomen. Ondertussen zijn ook hoge activiteiten van een hydra-

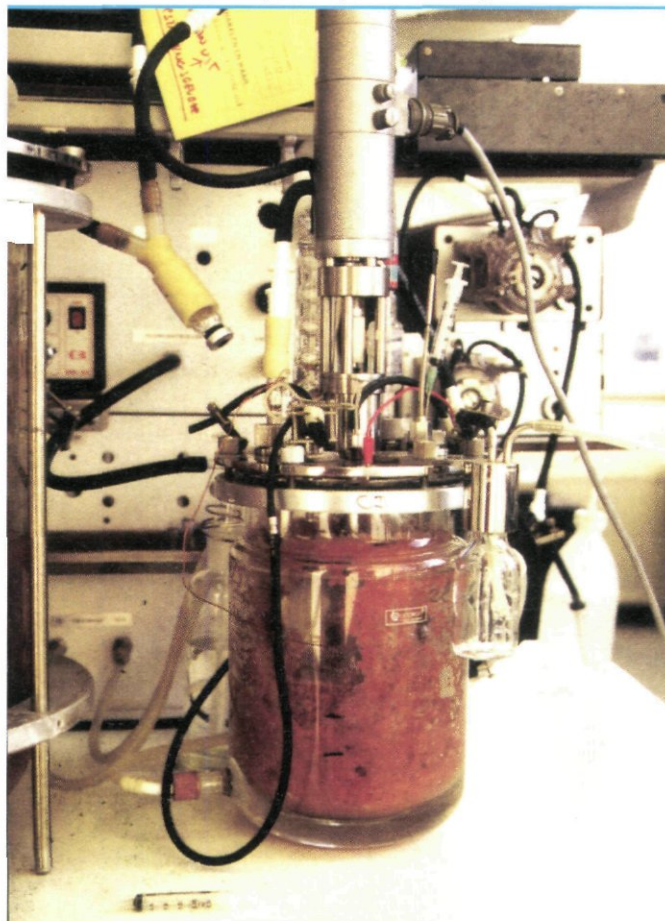
zine oxiderend enzym in celvrije extracten van de Anammoxbacterie gevonden en gezuiverd (Jetten *et al.*, 1999). Van belang is dat in het Anammoxmetabolisme, in tegenstelling tot normale denitrificatie, N_2O niet als intermediair optreedt.

De combinatie van partiële nitrificatie en het Anammoxproces

Op dit moment wordt ammonium uit afvalwater verwijderd door een combinatie van nitrificatie en denitrificatie. Een aantal van de nadelen van deze systemen (hoog energieverbruik, grote beluchtingscapaciteit, kosten van methanol, mogelijke uitstoot van lachgas en grote installaties) kunnen worden vermeden, wanneer een nieuw systeem voor ammoniaverwijdering zou worden gebruikt. Dit nieuwe systeem is gebaseerd op een combinatie van partiële oxidatie van ammonium tot nitriet, en denitrificatie van het gevormde nitriet met ammonium als elektrondonor (afbeelding 1). De microbiële principes van de twee processen (Sharon en Anammox), die betrokken zijn bij dit nieuwe systeem zijn recentelijk opgehelderd (Hellinga *et al.*, 1998; Jetten *et al.*, 1999; Van Loosdrecht en Jetten, 1996).

Het Sharonproces is zeer geschikt voor het verwijderen van ammonia uit afvalstromen met hoge ammoniacconcentraties (hoger dan 600 mg-N/l) zoals slibgistingwater. Het Sharonproces wordt uitgevoerd als een continu geroerde tank zonder enige biomassa-retentie. Hierdoor is het mogelijk om boven 25°C de nitrietoxiderende bacteriën effectief uit het systeem te weren. Een reactortemperatuur van 35°C en een relatief korte verblijftijd (ongeveer een dag) van het slibgistingwater resulteren in een stabiele partiële nitrificatie met nitriet

Een 'twee liter Anammox-SBR reactor'. De dieprode kleur van de Anammoxbiomassa wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van grote hoeveelheden cytochromen in de cellen.



Sharon:	$2\text{ NH}_4^+ + 2\text{ HCO}_3^- + 1.5\text{ O}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- + 2\text{ CO}_2 + 3\text{ H}_2\text{O}$ (1)		
Anammox:	$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{ H}_2\text{O}$ (2)		
Gecombineerde proces:	$2\text{ NH}_4^+ + 2\text{ HCO}_3^- + 1.5\text{ O}_2 \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{ CO}_2 + 5\text{ H}_2\text{O}$ (3)		
	SHARON	ANAMMOX	
Ammonium belasting	0.63-1.0	0.24 - 1.34	kg $\text{NH}_4^+\text{-N m}^{-3}\text{ reactor dag}^{-1}$
Nitriet belasting	niet van toepassing	0.22 - 1.29	kg $\text{NO}_2^-\text{-N m}^{-3}\text{ reactor dag}^{-1}$
Stikstofbelasting	afhankelijk van de Invoerconcentratie	0.46 - 2.63	kg $\text{N}_{\text{tot}} \text{ m}^{-3}\text{ reactor dag}^{-1}$
Hydraulische verblijftijd	1 dag	afhankelijk van influent concentratie	
$\text{NH}_4^+\text{-N}$ effluent	199	27 ± 85	mg N l^{-1}
$\text{NO}_2^-\text{-N}$ effluent	469	3 ± 3	mg N l^{-1}
efficiëntie NH_4^+ verwijdering	76-90	88 ± 9	%
efficiëntie NO_2^- verwijdering	niet van toepassing	99 ± 2	%
Maximum activiteit	10.3	0.26	kg $\text{N}_{\text{tot}} (\text{kg dw})^{-1} \text{ dag}^{-1}$

Tab. 2 Een overzicht van de parameters van een Anammox fluïde bed reactor (Jetten et al. 1997) en een Sharon reactor met partiële nitrificatie. Beide reactoren werden gevoed met slibgistingswater. Het nitriet voor het Anammoxproces werd apart toegediend.

als eindproduct. Om de pH-daling ten gevolge van de nitrificatie te compenseren is het nodig om het gevormde nitriet in dezelfde reactor te denitrificeren. Dit gebeurt door regelmatige onbeluchte periodes in te voeren en dan methanol toe te voegen. Wanneer het Sharon-proces wordt gekoppeld aan het Anammoxproces hoeft slechts de helft van het ammonium te worden omgezet naar nitriet. In dat geval is de hoeveelheid bicarbonaat in het slibgistingswater juist voldoende om de verzuring door nitrificatie te compenseren. Het Sharonproces is intensief getest op laboratoriumschaal voor de ammoniaverwijdering uit slibgistingswater en is momenteel in gebruik bij slibgistinginstallaties in Utrecht en Rotterdam.

De combinatie van het Anammox- en Sharonproces is in STOWA-verband langdurig getest op laboratoriumschaal (tabel 2) met slibgistingswater als ammoniumbron. De Sharonreactor werd bedreven zonder pH-

controle of biomassaretentie. Het ammonium werd voornamelijk omgezet tot nitriet. Op deze manier kon een ammonium-nitriet mengsel van de juiste samenstelling verkregen worden, dat gebruikt kon worden als influent voor de Anammoxreactor. Gedurende de testperiode bedroeg het verwijderingsrendement (inclusief verstoringen) voor ammonium ongeveer 83 procent. Tijdens dit onderzoek is tevens aangetoond dat het mogelijk is om de Anammoxbacteriën uit conventioneel zuiveringsslib op te hopen.

Deze nieuwe combinatie kan zonder al te veel moeilijkheden worden geïmplementeerd in de bestaande infrastructuur van de huidige afvalwaterinstallaties. Het gebruik van compacte reactoren, die een minimum aan ruimte nodig hebben, maakt hun implementatie erg aantrekkelijk. Naast de uitvoering op volle schaal ligt er nu de uitdaging om het afvalwaterzuiveringsproces als geheel te optimaliseren (duurzamer te maken).

LITERATUUR

Hellings C., A. Schellen, J. Mulder, M. van Loosdrecht en J. Heijnen (1998). The Sharon-process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Wat. Sci. Tech.* 37:135-142.

Jetten M., S. Horn en M. van Loosdrecht (1997). Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Wat. Sci. Tech.* 35, 171-180.

Jetten M., M. Strous, K. van de Pas-Schoonen, J. Schalk, L. van Dongen, A. van de Graaf, S. Logemann, G. Muyzer, M. van Loosdrecht en J. Kuenen (1999). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Reviews* 22, 421-437

Mulder A. A. van de Graaf, L. Robertson en J. Kuenen (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol* 16, 177-183.

Schmidt I. en E. Bock (1997). Anaerobic ammonium oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch. Microbiol.* 167, 106-111.

Schoen G., M. Bussmann en G. Geywitz-Hetz (1994). Bildung von Lachgas (N_2O) im belebten Schlamm aus Kläranlagen. *Wasser-Abwasser* 135, 293-301.

Strous M., J. Fuerst, E. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K. van de Pas, R. Webb, J. Kuene en M. Jetten (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* 400, 446-449.

Strous M., E. van Gerven, Z. Ping, J. Kuenen en M. Jetten (1997). Ammonium removal from concentrated waste streams with the Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Wat. Res.* 31, 1955-1962.

Strous M., J. Heijnen, J. Kuenen en M. Jetten (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool to study very slowly growing micro-organisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 589-596.

Strous M., J. Kuenen en M. Jetten (1999). The key physiological parameters of the Anammox process. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3248-3250.

Van Loosdrecht M. en M. Jetten (1998). Microbiological conversions in nitrogen removal. *Wat. Sci. Tech.* 38, 1-7.

Van Loosdrecht M. en M. Jetten (1996). De RWZI (AWZI) van de toekomst: een combinatie van het Anammox-proces en het Sharon-proces. In 'STOWA 25 jaar toegepast onderzoek waterbeheer'. Klapwijk SP (Ed) Stowa rapport 11, ISBN 90-74476-59-7, pagina 155-171.

Microscopische opname van de voor het Anammoxproces verantwoordelijke bacterie *Brocadia anammoxidans*. a) Fasecontrast beeld 1250 maal vergroot. b) Cellen gekleurd met ethidiumbromide om het DNA zichtbaar te maken. c) Cellen gekleurd met een Anammoxspecifieke 16S rRNA sonde.

