

Vannforskning ved Institutt for teknisk biokjemi, NTH.

Av Geir Walsø

Geir Walsø er vitenskapelig assistent ved institutt for teknisk biokjemi, NTH.

De ulike forskningsaktiviteter med tilknytning til vann ved Institutt for teknisk biokjemi har basis i forskjellige problemstillinger og er således ikke koordinert i et felles problemkompleks. De ulike prosjektene har imidlertid det til felles at de omhandler mikrobiell aktivitet i vandig miljø.

Jeg skal kort beskrive disse ulike forskningsprosjekter som for tiden pågår ved vårt institutt.

Afall fra en rekke storindustrielle prosesser representerer en helsemessig fare for vårt miljø.

I sitt arbeide for graden «doktor ingeniør» presentert i avhandlingen «Mikrobiell kometabolisme av lavmolekylære klorerte hydrokarboner», har Edvar Onsøyen (1979) studert nedbrytbarheten av en type kjemikalier som inkluderer både antatt biologisk inerte og toksiske forbindelser. Vår kjennskap til hvordan slike forbindelser mineraliseres er begrenset, og mange synes å tvile på mikroorganismers deltagelse i nedbrytning av lavmolekylære klorerte hydrokarboner.

Utgangspunktet for Onsøyen's arbeide var å slå fast hvorvidt noen valgte klorerte hydrokarboner virkelig degraderes av mikroorganismer, og eventuelt i hvilken grad, og hvor fort nedbrytningen skjer. Innledende forsøk viste at TCE-tjære (tid-

ligere biprodukt fra vinylklorid-produksjon, bestående vesentlig av lavmolekylære klorerte hydrokarboner) som eneste karbon- og energikilde, ikke resulterte i vekst av mikroorganismer. Utgangspunktet for Onsøyen's arbeide var derfor at eventuell mikrobiell degradering av lavmolekylære klorerte hydrokarboner skjer ved kometabolisme. Gjennom denne prosessen detoksifiseres den aktuelle kjemiske forbindelsen ved at molekylet forandres uten at tilstrekkelig mengde karbon og energi nødvendig for mikrobiell vekst frigjøres. Kometabolisme reflekterer således en mangel på substratspesifisitet i noen av de aktuelle mikrobielle transportmekanismer og enzymer. For at kometabolisme skal finne sted må det med andre ord forefinnes andre karbon-, og vanligvis også andre energikilder for normal vekst.

Mesteparten av Onsøyen's arbeide har hatt utspring i omsetning av modellsubstansen 1,2-dikloretan med propan som hovedsakelig karbon- og energikilde (kostrat). Propan og luft ble blandet inn i et mineralmedium med biologisk materiale fra brakkvann og sediment som inokulum. Denne heterogene anrikningskulturen har vært utgangspunktet for de videre mikrobielle studiene.

Dyrking av den heterogene floraen i kontinuerlig kultur resulterte i dominans

av to typer bakterier, en stav-formet bakterie, tentiativt identifisert som *Mycobacterium* sp., og en kokke-formet bakterie av ikke identifisert genus.

Forsøk med renkultur av *Mycobacterium* sp. ga grunnlag for å slå fast at cel- lenes aktuelle fysiologiske tilstand er av stor betydning for hvorvidt dikloretan brytes ned.

Onsøyen har gjennom sitt arbeide en- tydlig vist at mikroorganismer under gitte betingelser kan ta opp 1,2-dikloretan og deklorere forbindelsen kvantitativt til uorganisk klorid. En betydelig del av det dehalogenerte produkt videreomsettes til CO₂. Propan er vist å være nødvendig kosubstrat for omsetning av dikloretan, mens andre substrater som *n*-alkaner (propananaloger), *n*-propanol (potensielt mel- lomprodukt i propanomsetningen) og glukose ikke synes å kunne gi kometa- bolsk nedbrytning av dikloretan under de rådende forhold.

Dr.ing. Edvar Onsøyen's arbeide følges i dag opp med studier av kometabolsk omsetning av andre klorerte hydrokarbon- ner, blant annet kloroform og heksaklor- benzen.

I forbindelse med Norges oljeaktivitet i Nordsjøen, ble Forskningsprogram om Havforurensninger (FOH) etablert ved Kgl.res. av 5. mars 1976. Et av FOH's formål er å studere mikrobiologisk og kje- misk nedbrytning av olje og oljekompo- nenter i norske farvann.

Fra 1. juli 1977 er vårt institutt enga- sjert i den mikrobiologiske siden av pro- blemet, med dr.ing. Steinar Pedersen som ledende forsker. Utgangspunktet har vært å studere mikrobiell omsetning/nedbryt- ning av olje i marint miljø. Hensikten har vært å fremskaffe data som gir uttrykk for nedbrytningspotensialet i havet, dvs.

hvor mye av eventuelt spilt olje som vil kunne brytes ned ad mikrobiell vei.

Arbeidet har foregått og foregår g'en- nom en kombinasjon av *in situ*-studier og modellforsøk i laboratoriet. En meget vik- tig del av arbeidet har vært å utvikle ana- lysemetoder for de ulike målinger. En rekke forsøk utføres med radioisotop- merkede substrater, ³H-merket råolje, og ¹⁴C-merkete spesifikke oljekomponenter (hydrokarboner av typen heksadekan, naftalen, benzen o.a.) for bl.a. å få uttrykk den totale mineraliseringshastighet.

Det er gjennomført flere tokt i Nord- sjøen, Norskehavet og Barentshavet. Un- dersøkelsen i Nordsjøen viste at nivået av generelt heterotrofe og spesifikt oljened- brytende bakterier ikke har endret seg i nevneverdig grad i løpet av de senere år (Pedersen *et al* (1979)). Gjennomsnittlig antall heterotrofe bakterier ligger i om- rådet 10⁴-10⁵ organismer pr. liter, mens oljegraderende bakterier forefinnes i antall av 10²-10⁴ organismer pr. liter.

Måling av heterotrof aktivitet i Nord- sjøen viste at nedbrytningshastigheten for en rekke forbindelser som blant andre glukose og acetat ikke er vesentlig for- skjellig fra de hastigheter som er målt i andre, moderat forurensede havområder (10⁻²-10⁻³ µg/liter, døgn). Nedbrytnings- hastighetene for heksadekan og benzen ble bestemt til 10⁻³-10⁻⁴ µg/liter, døgn. De angitte hastigheter gjelder omsetning *in situ*. Oljespill vil føre til en oppblomst- ring av oljegraderende bakterier, slik at omsetningshastigheten vil øke flere stør- relsesordner.

Den mikrobielle aktivitet i de varmeste deler av Barentshavet kan sammenliknes med forholdene i Nordsjøen, bedømt på grunnlag av bakterietettheter og omset- ningshastigheter for forskjellige organiske substrater.

En nyere undersøkelse i Norskehavet/ Barentshavet viste at nivået av heterotrofe og spesifikt oljenedbrytende bakterier var overraskende høyt nær østkysten av Svalbard og i de vestlige deler av Barentshavet ($10^5 \cdot 10^7$ organismer pr. liter) sammenlignet med bakterietall registrert i nordlige deler av Nordsjøen i havområdet mellom Island og Jan Mayen ($10^3 \cdot 10^6$ organismer pr. liter, Pedersen *et al* (1980)). De oljenedbrytende bakterier utgjør imidlertid en relativt beskjeden andel av den «totale» bakterielle populasjon (0,01—0,1%), noe som synes å indikere at disse havområdene er lite utsatt for oljeforurensninger. Måling av nedbrytningshastigheter for forskjellige organiske forbindelser viste at mineraliseringshastigheten for oljehydrokarboner var lav i hele det undersøkte området (heksadekan: $< 0,6 \cdot 10^{-3}$ µg/liter, døgn).

Dosent Kjell Eimhjellen som har vært og er faglig veileder på de foran nevnte prosjekter, har også gjennom en årrekke vært interessert i de biokjemiske og mikrobiologiske forhold i aktiv slam prosessen. I den anledning utfører undertegnede et forskningsarbeid som ledd i et dring-studium, der emnet for den vitenskapelige avhandling er «Lav-temperatur aktiv slam prosess, mikrobiologiske og biokjemiske studier».

I Norge har vi tradisjonelt betraktet oss som selvforsynt med rikelige mengder rent vann til de ulike formål, og de restriksjoner for utslipp av avløpsvann av ulike kategorier som er gjennomført i den øvrige industrialiserte verden, har ikke blitt vurdert nødvendig hos oss. I den senere tid har imidlertid behovet for rensprosesser meldt seg.

Av de biologiske metodene som er vurdert mest anvendbar for norske forhold er aktiv slam prosessen. Imidlertid synes

prosessen tradisjonelt å ha begrensninger ved lave temperaturer. I diskusjonene om effektivitet og praktiske anvendelser av mikrobiologiske prosesser for rensing av avløpsvann, synes det å være en utbredt oppfatning at slike prosesser er mindre anvendbare i Norge, da det hos oss er for lave temperaturer i store deler av året. En slik holdning skyldes først og fremst den oppfatning at mikrobiologisk effektivitet automatisk betinger høyest mulig temperatur. Dette er en naturlig innstilling basert på erfaringer en har fra arbeid med mikrober i laboratoriet. I tillegg blir slike tanker underbygget ved at de aktiv slam-anlegg vi har her i landet synes å fungere dårlig i vinterhalvåret.

Basert på erfaringer fra tidligere arbeider med psykrofile mikroorganismer ved vårt institutt, ble det startet undersøkelser av aktiv slam-prosessen ved lav temperatur. Utgangspunktet har vært om mulig å utvikle en psykofil/psykrotrof flora som i all vesentlighet har de positive egenskaper et «normalt» slam har. For å kunne sammenligne prosessdata oppnådd ved lav temperatur med tilsvarende ved «normal» temperatur, ble det bygget to aktiv slam-anlegg i laboratorieskala. Et skulle operere ved 5°C eller lavere, det andre ved romtemperatur, ca. 20°C.

Den heterogene mikrobielle kulturen som er benyttet i de respektive anlegg er dyrket opp under kontinuerlig drift ved de aktuelle temperaturer gjennom lengre tid. I første omgang har omsetningshastighetene av organiske forbindelser, samt ammonium, i luftetanken under omsetning av husholdningskloakkvann vært studert. Eneste tilskattede variable har i utgangspunktet vært den hydrauliske belastning, mens de øvrige driftsparametre søkes å variere minst mulig. Hensikten var å framskaffe data for å beskrive aktiv slam pro-

sessen først og fremst ved lav temperatur. Konsentrasjonen av mikroorganismer (slam) i luftetanken er holdt tilnærmet konstant lik 3 g/l, da dette er en vanlig, aktuell slamkonsentrasjon i et aktiv slam-anlegg i full skala. Overskuddsslam ble diskontinuerlig fjernet ved at en viss mengde slam ble tatt ut av systemet en gang daglig.

Temperaturene som ble valgt var henholdsvis 20°C og 3°C for normal- og lavtemperaturslam. Bakgrunnen for disse valg er at mens 20°C representerer ekstremt høy temperatur på avløpsvann i sommerhalvåret, vil 3°C representere ekstremt lav temperatur på avløpsvann i vinterhalvåret. Ut i fra erfaringer fra mikrobiologisk arbeid i laboratoriet skulle således 20°C være gunstig temperatur for omsetning av organisk materiale, mens 3°C i utgangspunktet representerer en veksttemperatur for mikroorganismer langt under det optimale, selv for psykofile mikroorganismer. Lavtemperatur-slammet utsettes altså for svært vanskelige driftsforhold.

Den kvalitative og kvantitative sammen-setning av substratet (avløpsvannet) er den parameteren i systemet som er mest vanskelig å kontrollere, og følgelig også holde konstant. For best mulig å kompensere for store variasjoner, ble det derfor valgt å forsterke kloakken ved kontinuerlig tilsats av en volummessig beskjeden del av en konsentrert blanding av enkle organiske og uorganiske forbindelser. Som rutinemessig mål for innhold av organisk materiale generelt er valgt parameteren kjemisk oksygenforbruk (KOF).

Selv med en heterogen mikrobiell kultur og med et komplekst substrat som avløpsvann, vil det likevel innstille seg tilnærmet stasjonære forhold i reaktoren. Daglige rutineundersøkelser ved analyse og bestemmelse av KOF egner seg således

godt for å konstatere hvorvidt anlegget har nådd «steady state» eller pseudo-«steady state», som nok er en mer dekkende betegnelse på den fysiologiske tilstanden slammet vil befinne seg i. Ved «steady state» ble luftekaret tømt, mikro-organismene sentrifugert fra, og supernatanten filtrert før nedfrysing og lagring for senere analyser av spesifikke komponenter.

Ved ekstra høy slambelastning under de rådende forhold brøt normal-temperatur prosessen sammen ved at kraftig vekst av filamentære organismer dominerte floraen med den følge at slamreturen ble utilstrekkelig, og slammet ble vasket ut av reaktoren. Slike fenomener ble overhodet ikke observert i lav-temperatur anlegget i denne driftsperioden. Med bakgrunn i de undersøkelser som er gjort, kan en foreløpig trekke fram følgende momenter:

Aktiv slam prosessen ved lav temperatur (3°C) synes absolutt konkurransedyktig med en tilsvarende opererende ved 20°C. Renseeffekten med hensyn på organisk materiale målt som KOF er riktignok noe dårligere i lav-temperatur anlegget ved slambelastninger i området 0.5—0.7 kg KOF/kg slam, døgn (85—92% ved 3°C mot 90—93% ved 20°C), samtidig som nitrifiseringsprosessen synes noe hemmet ved 3°C ved høye organiske og hydrauliske belastninger. Ved lavere slambelastning (ca. 0.2 kg KOF/kg slam, døgn) med husholdningskloakk som eneste substrat synes renseseffekten å være lik i de to anleggene. Den lave temperaturen forårsaker imidlertid vekst av mikroorganismer som spesielt under høy organisk og hydraulisk belastning viser langt bedre flokkulerings- og sedimenteringsegenskaper enn slam dyrket ved 20°C under ellers like forhold.

Husholdningskloakk inneholder som kjent en rekke polymere forbindelser (proteiner, polysakkarider, lipider). Disse høymolekulære forbindelsene må brytes ned til mindre enheter før de kan transporteres inn i cellene og nyttiggjøres. Til dette formål produserer mikrobenes ekstracellulære enzymer.

I gitte situasjoner er denne typen enzymer funnet å være den begrensende faktor for total omsetning av polymert materiale i systemet. I den anledning studeres for tiden proteolytisk aktivitet i de to anleggene som funksjon av substra-

tets sammensetning. For å få best mulig kontrollerbare betingelser med hensyn til hva som fødes inn i anleggene, anvendes nå fullstendig syntetisk, sterilt medium.

Videre er det planlagt å studere amylolytisk aktivitet i tillegg under andre betingelser med hensyn til substrat.

Foruten de tre nevnte prosjekter har også instituttet vært involvert i et prosjekt vedrørende biologisk denitrifisering under SINTEF, avd. teknisk kjemi, ved at sivilingeniør Gerd Halmø utførte sine laboratorieforsøk hos oss under dosent Kjell Eimhjellen's faglige veiledning.

LITTERATUR:

- Onsøyen, E.* (1979) «Mikrobiell kometabolisme av lavmolekulære klorerte hydrokarboner». Dr. ing.-avhandling. Institutt for teknisk biokjemi, NTH, Trondheim, 142 s.
- Pedersen, S., Sommer, T. og Eimhjellen, K.* (1979) «Måling av oljenedbrytningshastighet/mikrobiell aktivitet i havområder som er utsatt for oljeforurensning». Rapport nr. 2, FOH 44.11.10.401, Institutt for teknisk biokjemi, NTH, Trondheim, 158 s.
- Pedersen, S., Sommer, T. og Eimhjellen, K.* (1980) «Måling av oljenedbrytningshastighet og generell mikrobiell aktivitet i Norskehavet, Barentshavet og i Trondheimsfjorden». Rapport nr. 3, FOH 44.11.10.401, Institutt for teknisk biokjemi, NTH, Trondheim, 64 s.