

NN31085.93-03

g e

g e n e r e l e r i o o l w a t e r -
z u i v e r i n g s i n r i c h t i n g e n

rwzi
2000

R93-03

**MODELFORMING EN OPTIMALISATIE VAN
BIOLOGISCHE DEFOSFATERING VAN
AFVALWATER: Microbiële aspecten**



Stichting voor de Technische Wetenschappen
Technology Foundation

Postbus 3021, 3502 GA Utrecht



RIZA

Rijkswaterstaat
Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer
en Afvalwaterbehandeling

Postbus 17, 8200 AA Lelystad

stowa

Stichting Toegepast Onderzoek
Waterbeheer

Postbus 8090, 3503 RB Utrecht

NN31003.93-03

generatie rioolwaterzuiveringsinrichtingen RWZI 2000

projectleiding en secretariaat: postbus 17, 8200 AA Lelystad 03200 - 70411



BIBLIOTHEEK
STARINGGEBOUW

MODELFORMING EN OPTIMALISATIE VAN BIOLOGISCHE DEFOSFATERING VAN AFVALWATER

Microbiële aspecten

CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS



0000 0922 6784

17 SEP. 1997

auteur:

Landbouwniversiteit Wageningen
vakgroep Microbiologie:

RWZI 2000 93-03

dr.ir. E.W.J. van Niel

INHOUDSOPGAVE

| | |
|--|----|
| VOORWOORD | 3 |
| SAMENVATTING | 4 |
| 1 INLEIDING | 5 |
| 1.1 Het principe van biologische defosfatering in afvalwaterzuiveringsinstallaties | 5 |
| 1.2 Organismen betrokken in fosfaatverwijdering | 7 |
| 1.3 Het koolstofmetabolisme | 7 |
| 1.4 Effect van nitraat op de anaërobe fosfaatafgifte | 9 |
| 1.5 Doel van het onderzoek | 10 |
| 2 MATERIAAL EN METHODEN | 11 |
| 3 RESULTATEN EN DISCUSSIE | 19 |
| 3.1 Karakterisering van de polyP-ophopende populaties van Renpho- en F&D-slib | 19 |
| 3.2 Enkele factoren die van invloed zijn op de fosfaatafgifte | 20 |
| 3.2.1 pH | 20 |
| 3.2.2 Laagmoleculaire verbindingen | 22 |
| 3.2.3 Een kortere anaërobe fase | 26 |
| 3.3 Koolstofmetabolisme en fosfaatafgifte | 27 |
| 3.3.1 Anaëroob/aëroob-experiment met acetaat | 27 |
| 3.3.2 Anaëroob/aëroob-experiment met ¹⁴ C-acetaat | 29 |
| 3.3.3 Stoichiometrie | 31 |
| 3.3.4 Koppeling tussen anaërobe PHB- en glycogeenmetabolisme en polyfosfaatafbraak | 32 |
| 3.4 Invloed van nitraat en stikstofmonoxyde op de fosfaatafgifte | 36 |
| 3.4.1 Afwezigheid van actieve denitrificerende polyP-ophopers | 36 |
| 3.4.2 Effect van stikstofmonoxyde op de anaërobe fosfaatafgifte | 38 |
| 3.4.3 Effect van stikstofmonoxyde op enige enzymen | 41 |
| 3.4.4 Effect van nitraat op de fosfaatafgifte | 43 |
| 3.5 Effect van glucose-oxydatie tot gluconzuur op het fosfaatgehalte van <i>Acinetobacter johnsonii</i> 210A | 46 |
| 3.5.1 Inleiding | 46 |
| 3.5.2 Kinetiek van glucosedehydrogenase | 46 |
| 3.5.3 Continu culturen | 47 |
| 3.5.4 Berekening van de stoichiometrische coëfficiënten | 49 |
| 3.5.5 Conclusies | 51 |
| 3.5.6 Lijst van Symbolen | 52 |
| 4 RELEVANTIE VAN HET UITGEVOERDE ONDERZOEK VOOR DE PRAKTIJK | 53 |
| 5 CONCLUSIES | 55 |
| 6 REFERENTIES | 57 |
| BIJLAGE 1: lijst met afkortingen | 63 |

VOORWOORD

Naast het onderzoekprogramma PNs 1992 van de STOWA, waarin ervaring uit de praktijk is verkregen op het gebied van biologische fosfaatverwijdering op rwzi's, is tevens binnen het onderzoekprogramma RWZI 2000 aandacht besteed aan de fundamentele (microbiële) kennisopbouw bij biologische defosfatering. In dit kader is in onderlinge samenwerking tussen vakgroep Microbiologie van de Landbouwniversiteit te Wageningen en de vakgroep Bioprocestechnologie van de Technische Universiteit te Delft een onderzoeksproject uitgevoerd. Doel van dit fundamentele onderzoeksproject was enerzijds de nog bestaande leemtes in de microbiële kennis in te vullen en anderzijds deze microbiologische, bioprocestechnologische en zuiveringstechnologische kennis en ervaring te combineren om te komen tot een onderbouwd ontwerpmodel voor biologische defosfatering.

Het voorliggende rapport beschrijft het fundamentele onderzoek naar een verdere invulling van bovengenoemde leemtes in microbiële kennis, dat is uitgevoerd door dr. ir. E.W.J. van Niel op de Landbouwniversiteit Wageningen onder dagelijkse begeleiding van dr. ir. G.J.J. Kortstee en prof. dr. A.J.B. Zehnder. Dit onderzoek is een vervolg op het werk van dr. K.J. Appeldoorn die een "Fill and Draw"-systeem voor biologische defosfatering heeft ontwikkeld.

Het onderzoek is financieel ondersteund vanuit de "Stichting Technische Wetenschappen" (projectnr. 90212) en het RWZI 2000 onderzoekprogramma (projectnr. 3225/4).

Begeleiding van dit onderzoek en afstemming met de meer praktische biologische defosfateringsprojecten heeft plaatgevonden op zogenaamde "fosfaatdagen", waarbij vertegenwoordigers van waterkwaliteitsbeheerders, ingenieursburo's, universiteiten en de financierende instanties betrokkenen waren.

Verder wenst de uitvoerder dr. ir. E.W.J. van Niel graag iedereen die aan dit onderzoeksproject heeft bijgedragen, te bedanken.

Lelystad, november 1993

Voor de Stuurgroep RWZI 2000

prof. dr. J. de Jong
(voorzitter)

SAMENVATTING

Om na te gaan of een anaërobe periode de groei van *Acinetobacter*, het bacterie geslacht dat verantwoordelijk wordt gehouden voor defosfatering, stimuleert, werd Renpho-slib dat een klein percentage acinetobacters bevatte verder gekweekt in het F&D-systeem. Na ongeveer 6 weken bleken er geen of nauwelijks acinetobacters meer aanwezig. Het F&D-slib bevatte ca. 85% polyfosfaatophopers. Beide slibsoorten bevatten kleine aantallen denitrificerende, polyfosfaatophopende bacteriën.

Om te onderzoeken bij welke pH en welke organische verbindingen het slib het meest actief was bij de afgifte van fosfaat werden kortdurende experimenten uitgevoerd met gewassen suspensies van beide slibsoorten. Het afgeven van fosfaat verloopt sneller naarmate de pH hoger is. Van alle substraten bleken acetaat en propionaat superieur bij de stimulering van de fosfaatafgifte. Beide verbindingen worden waarschijnlijk actief opgenomen en omgezet in poly- β -hydroxybutyraat (PHB) en poly- β -hydroxyvaleraat (PHV). Voor acetaat werd dit bevestigd met ^{14}C -acetaat. De omzetting van deze vetzuren in de genoemde polymeren kost energie die door polyfosfaatdegradatie verkregen wordt. De reductie-equivalenten die nodig zijn voor dit proces komen uit de oxydatie van glycogeen. In de aërobe fase worden PHB en PHV weer afgebroken, het glycogeen wordt weer opgebouwd evenals polyfosfaat.

De aanwezigheid van nitraat werkt storend bij defosfatering. Er zijn twee effecten van nitraat te onderscheiden in slibsoorten waarin geen grote aantallen denitrificerende fosfaatophopers zijn aan te tonen. Ten eerste kan uit nitraat NO worden gevormd tijdens denitrificatie. NO remt adenylaatkinase, een enzym dat betrokken is bij de polyfosfaatafbraak. Bij een concentratie van 0.3 mM NO in de vloeistoffase wordt het enzym in intacte cellen geheel geremd. Voorlopige experimenten laten zien dat het tweede remmende effect van nitraat wordt veroorzaakt door het molecuul nitraat. Deze remming treedt vooral op bij lage fosfaatafgiftesnelheden die te vinden zijn bij toediening van bijvoorbeeld vetzuren anders dan acetaat en propionaat. Dit effect wordt bediscussieerd.

Het geremd worden van de fosfaatafgifte gaat samen met de remming van de acetaatopname, de remming van de PHB- en PHV-vorming, en de verminderde oxydatie van glycogeen via de glycolyse bij toediening van NO. Dit vormt een sterke aanwijzing dat deze drie processen samenhangen met het fosfaatmetabolisme.

Omdat *Acinetobacter* soorten zich niet konden handhaven in het F&D-systeem werd *Acinetobacter johnsonii* 210A onderzocht op zijn vermogen veel polyfosfaat te synthetiseren. In acetaat-gelimiteerde continu culturen bevat *A. johnsonii* 210A een P-gehalte van 4.5%. Het gehalte kon worden verhoogd door een extra energiebron in de vorm van glucose aan het medium toe te voegen. Glucose werd alleen maar geoxydeerd tot gluconzuur en levert de cel ATP-equivalenten op. In acetaat-gelimiteerde continu culturen met een verdunningsnelheid van 0.1 h^{-1} werd een lineaire toename in de biomassa-opbrengst en het polyfosfaatgehalte waargenomen bij oplopende concentraties van glucose. Het P-gehalte steeg van 4.9 tot 7.2% wat aantoont dat *Acinetobacter* stammen zeer wel in staat zijn grote hoeveelheden polyP op te hopen.

1 INLEIDING

De laatste jaren is het fosfaatgehalte in het afvalwater sterk afgenomen, vooral dankzij het gebruik van fosfaatvrije wasmiddelen. Dit had tot gevolg dat de biologische defosfatering meer in de belangstelling kwam. Fosfaatverwijdering met behulp van actief slib is reeds meer dan 30 jaar bekend, maar het duurde tot het midden van de zeventiger jaren voordat bewezen werd dat micro-organismen hiervoor verantwoordelijk waren. Sindsdien is veel empirisch en wetenschappelijk onderzoek verricht aan biologisch defosfaterend slib. Tot nu toe is echter nog weinig begrepen van de ecologie en fysiologie van de betrokken organismen. Dit is mede te wijten aan het ontbreken van een geïsoleerd fosfaatverwijderend organisme dat hetzelfde gedrag vertoont als defosfaterend slib. Toch is het rendabel om onderzoek te doen met actief slib, mits er sterk geselecteerd is voor fosfaatverwijderende populaties. Dit is te bereiken met goed gedefinieerde processen zoals bv. Fill and Draw (F&D)-systemen (Appeldoorn *et al.*, 1992b). Empirisch onderzoek aan biologische defosfatering al dan niet in combinatie met chemische methoden, wordt voornamelijk gedaan in pilot plants en bestaande installaties. Voor een uitstekend rapport hierover wordt verwezen naar de Handleiding biologische fosfaatverwijdering (Janssen & Rensink, 1992).

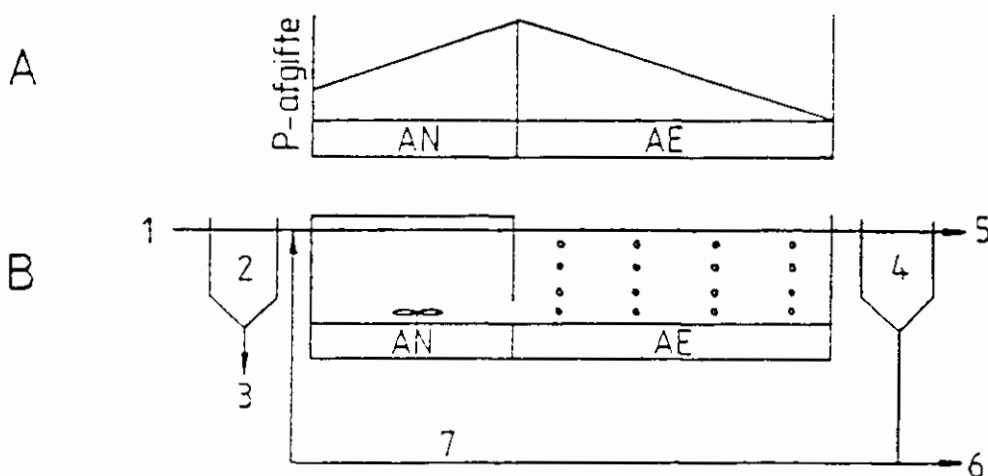
Het onderzoek dat in dit verslag is beschreven, sluit aan op het werk van K.J. Appeldoorn (1990, 1993). Een aantal vragen die voortkwamen uit zijn onderzoek zijn in het voor u liggende verslag beantwoord. In dit verslag wordt getracht eem beter inzicht te krijgen in de koppeling tussen het fosfaatmetabolisme en het koolstofmetabolisme van fosfaatophopende organismen, omdat deze koppeling een cruciale rol speelt bij een goede defosfatering. Als tweede wordt bekeken waarom in aanwezigheid van nitraat in de praktijk de anaërobe fosfaatafgifte nadelig beïnvloedt. Het blijkt dat in slib zonder actieve denitrificerende fosfaatophopers, stikstofmonoxyde (NO), een intermediair in de denitrificatie, de polyfosfaatafbraak remt. Aangetoond is waar NO de afgifte remt. Het zal duidelijk gemaakt worden dat NO zeker niet de enige verklaring is voor de inhibitie door nitraat. Het derde onderwerp dat is onderzocht was geheel anders van aard. Het ging om de vraag of het mogelijk is om een fosfaatophopende bacterie meer polyfosfaat per cel te laten synthetiseren door een extra energiebron aan het medium toe te voegen. Deze studie is met een reïncultuur van *Acinetobacter johnsonii* 210A uitgevoerd. Tenslotte worden enige relevanties voor de praktijk beschreven die voortkomen uit dit onderzoek.

1.1 Het principe van biologische defosfatering in afvalwaterzuiveringsinstallaties

Indien de condities geschikt zijn, kunnen zich in het actief slib populaties van bacteriën manifesteren die meer fosfaat opnemen dan voor hun groei nodig is. Dit fosfaat wordt in de cellen opgeslagen in de vorm van polyfosfaat (polyP). De hoeveelheid fosfaat, uitgedrukt als fosfor (P), die kan worden opgeslagen, bedraagt maximaal ca. 17% van de droge stof (Appeldoorn, 1993). De opname van fosfaat

vindt plaats onder aërobe of anoxische omstandigheden. Het proces is reversibel: onder anaërobe condities wordt het polyP afgebroken tot orthofosfaat, dat weer door de cel wordt uitgescheiden. De afbraak en fosfaatafgifte kan worden versneld door de aanwezigheid van geschikte organische verbindingen. De eenvoudige vetzuren, zoals acetaat en propionaat, stimuleren het best. Deze verbindingen zijn de uitscheidingsprodukten van acidogene bacteriën die complexere verbindingen fermenteren. Dankzij dit principe kan het slib gebruikt worden als de drager van het fosfaat.

De verrijking van polyP-ophopende bacteriën in het slib kan worden verkregen door bij het afvalwaterinlaatpunt een anaërobe fase te introduceren. De volgende fase is aëroob, waarin het afgegeven fosfaat én de fosfaat in het influent wordt opgenomen, m.a.w. er is een netto opname. Het slib wordt tenslotte gescheiden van het afvalwater in een nabezinker. Het water kan daarna op het oppervlaktewater geloosd worden. Het slib kan direct worden teruggevoerd naar de anaërobe fase (retourslib). Dit noemt men het Hoofdstroomproces (Figuur 1). Het retourslib of een gedeelte daarvan kan eventueel ook een anaërobe nabehandeling ondergaan, waarbij het fosfaat uit het slib wordt gehaald (Zijstroomproces). Een gering deel van het slib, het spuislib, wordt afgevoerd om de slibhoeveelheid in de installatie gelijk te houden. Indien ook stikstof verwijderd moet worden is een anoxische fase tussen de anaërobe en aërobe fase geplaatst. Met de biologische methode op deze wijze uitgevoerd kunnen fosfaatconcentraties in het effluent lager dan 1 mg P.l^{-1} worden bereikt (Yeoman *et al.*, 1988). Vergelijkbare resultaten kunnen met chemische defosfatering worden behaald. Deze techniek, welke berust op fosfaatprecipitatie, heeft een verwijderingspercentage van ongeveer 80-95%. Het nadeel van de laatste techniek is echter o.a. de optredende verzouting van het effluent en een extra hoeveelheid chemisch fosfaatslib.



Figuur 1 Fosfaatafgifte- en opnameprofiel in een installatie volgens het hoofdstroomproces. AN: anaëroob; AE: aëroob; 1: influent; 2: voorbezinker; 3: primair slib; 4: nabezinker; 5: effluent; 6: spuislib; 7: retourslib.

1.2 Organismen betrokken in fosfaatverwijdering

Actief slib bestaat voor een groot deel uit een heterogeen bacteriële populatie, met o.a. acidogene organismen, nitrificeerders, denitrificeerders en strict aëroben. Het bestaan van polyP-ophopers werd slechts zo'n 20 jaar geleden vastgesteld. Fuhs & Chen (1975) beschreven voor het eerst een polyP-ophopende *Acinetobacter* sp. dat uit actief slib werd geïsoleerd. Zij beschouwden dit genus type als de meest belangrijke deelnemer in het defosfaterend proces. Sindsdien is dit door meerdere onderzoekers ondersteund (o.a. Buchan, 1983; Deinema *et al.*, 1985; Lötter & Murphy (1985). Andere onderzoekers waren van mening dat defosfaterende eigenschappen niet beperkt waren tot *Acinetobacter* spp. Dit werd experimenteel vastgesteld m.b.v. diverse technieken, te weten: autoradiografie aan de hand van ophoping van ³²P-polyfosfaat (Suresh *et al.*, 1985); fluorescerende antilichamen (Cloete *et al.*, 1985) en biomarkers karakteristiek voor *Acinetobacter* (Hiraishi *et al.*, 1989; Auling *et al.*, 1991). Met behulp van de laatst genoemde techniek kwam naar voren dat organismen behorende tot de pseudomonads, de *Proteobacteria*-groep en de *Flaviobacterium-Cytophaga*-groep een belangrijke rol kunnen spelen bij de biologische fosfaatverwijdering.

In het algemeen kan gezegd worden dat polyP-vorming niet beperkt is tot één genus. Het procesontwerp en de compositie van het influent bepalen in belangrijke mate de uitslag van de competitie tussen de verscheidene fosfaatophopende organismen.

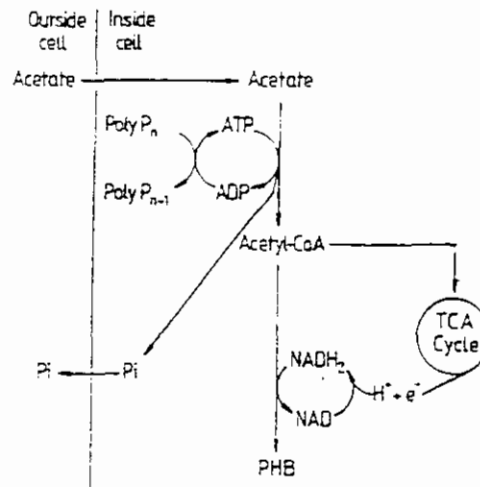
1.3 Het koolstofmetabolisme

Marais *et al.* (1983) en Wentzel *et al.* (1984) suggereerden reeds dat de energie die vrijkomt bij de afbraak van polyfosfaat onder anaërobe condities kan worden gebruikt voor de opname en opslag van geschikte substraten zoals vetzuren. De vetzuren, veelal acetaat, propionaat en valeraat, worden door acidogene bacteriën geproduceerd uit complexe verbindingen. De polyfosfaat-ophopende bacteriën zetten de vetzuren om in osmotisch inerte poly- β -hydroxyalkanoaten (PHA), voornamelijk bestaande uit poly- β -hydroxybutyraat (PHB) en poly- β -hydroxyvaleraat (PHV) (Comeau *et al.*, 1987). Voor de synthese van PHA uit acetaat zijn reductie-equivalenten nodig in de vorm van NADH. Er zijn twee biochemische modellen voorgesteld voor de PHB-synthese uit acetaat door fosfaatophopers die verschillen in de bron van NADH.

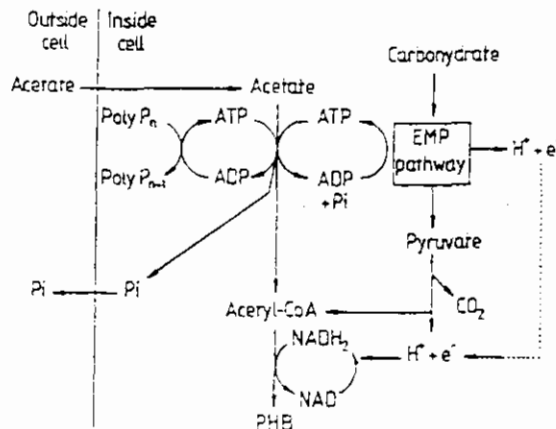
Het eerste model werd door de groepen van Comeau (1984) en Wentzel (1986) geponeerd. Een centraal idee in dit model is dat een deel van de opgenomen acetaat wordt geoxydeerd via de citroenzuurcyclus voor de levering van reductie-equivalenten (Figuur 2). Mino *et al.* (1987) veronderstelden dat glycogeen fungeert als bron voor NADH. Glycogeen wordt volgens hen afgebroken via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-route (Figuur 3). Het eindproduct van deze route, acetyl-CoA, wordt dan ook omgezet in PHB. Een argument tegen het Comeau/Wentzel-model is dat in veel gevallen de citroenzuur-cyclus niet actief is onder anaërobe omstandigheden, ondanks de waarneming dat de betrokken enzymen vaak wel hun activiteit behouden, zoals aangetoond door Lötter (1989) en Florentz & Hartmann (1982). De reden voor het niet actief zijn van de cyclus is dat FAD, het coenzym dat

gebruikt wordt door succinaatdehydrogenase, zonder zuurstof niet geregenereerd wordt. Bordacs & Chiesa (1987, 1989) ondersteunden dit gegeven door de waarneming dat slechts een kleine hoeveelheid $^{14}\text{CO}_2$ werd geproduceerd gedurende de anaërobie opname van ^{14}C -gelabelde acetaat. Mino *et al.* (1987) vond dat het glycogeengehalte in het slib inderdaad afnam tijdens de anaërobie fase en weer toenam in de aërobie fase. Een kritiek op deze observatie is dat strict aërobie, niet-fosfaatophopende organismen verantwoordelijk kunnen zijn voor het omzetten van glycogeen (Hochachka, 1980).

Tijdens de aërobie periode wordt PHB gebruikt als koolstof- en energiebron door de polyP-ophopers waardoor groei en opname van fosfaat kan plaatsvinden en in het geval van het Mino-model wordt ook glycogeen gesynthetiseerd uit PHB.



Figuur 2 Schematisch diagram voor het biochemie model volgens Comeau/Wentzel onder anaërobie condities.



Figuur 3 Schematisch diagram voor het biochemie model volgens Mino onder anaërobie condities.

Later suggereerden Wentzel *et al.* (1992) dat beide modellen van toepassing kunnen zijn. Het metabolisme voorgesteld door het Comeau/Wentzel-model zou plaatsvinden in defosfaterende slib-typen die voor een groot deel bestaan uit Acinetobacters. Deze bacteriën kunnen geen glycogeen synthetiseren en bezitten geen EMP-route. Het metabolisme volgens het Mino-model zou daartegenover in andere fosfaatophopende genera voorkomen. Tot nu toe is onbekend welke bacteriën verantwoordelijk zijn voor defosfatering.

Het lijkt erop dat fosfaatverwijderende organismen een ecologische niche hebben in milieus die onderhevig zijn aan alternerende aërobe en anaërobe perioden. Zij maken daarbij gebruik van 3 verschillende polymeren: polyP, PHA en glycogeen. Echter, het precieze mechanisme van hun onderlinge relatie is nog niet onomstotelijk vastgesteld. In een goed defosfaterend systeem (zonder nitraat) is een sterke selectie opgetreden voor polyP-ophopers die de organische verbindingen, welke zijn vrijgekomen uit de fermentatie, snel opnemen. Hierdoor wordt competitie met de overige organismen voor deze substraten tijdens de aërobe fase uitgeschakeld. De efficiëntie van defosfatering is afhankelijk van de samenstelling van het influent, het procesontwerp en de toegepaste procescondities.

1.4 Effect van nitraat op de anaërobe fosfaatgifte

Voor het verkrijgen van een goede defosfatering in afvalwaterzuiveringsinstallaties is de aanwezigheid van nitraat gedurende de anaërobe periode ongewenst. In installaties met hoge aërobe slijbleeftijden wordt nitraat gevormd uit ammonium door nitrificerende bacteriën. Via het retourslib komt het nitraat in de anaërobe zone en voorkomt aldus een efficiënte fosfaatgifte (bv. Wentzel *et al.*, 1984). Dit heeft tot gevolg dat in de aërobe fase de fosfaatopname ook slechter verloopt (Hascoet & Florentz, 1985). Diverse verklaringen zijn gegeven voor de reductie van de anaërobe fosfaatgifte door nitraat:

1. Precipitatie van fosfaat door een toename van de pH als gevolg van denitrificatie (Arvin & Kristensen, 1983; Hascoet *et al.*, 1984);
2. Inhibitie door nitraat van enzymen betrokken bij fosfaatgifte (Lötter, 1984; Lötter & Van der Merwe, 1987);
3. Een te hoge redoxpotentiaal in de aanwezigheid van nitraat (Rensink, 1981; Peirano *et al.*, 1983);
4. Competitie tussen denitrificeerders en polyfosfaatophopende bacteriën voor vetzuren (o.a. Iwema & Meunier, 1984; T'Seyen, 1986);
5. De aanwezigheid van denitrificerende fosfaatophopers (o.a. Koch & Oldham, 1985; De Vries & Rensink, 1985; Kuba *et al.*, 1992).

Slechts weinig experimenteel bewijs is geleverd dat een van de bovenstaande verklaringen ondersteunt. Het kan zijn dat meerdere mogelijkheden tegelijkertijd voorkomen. Appeldoorn *et al.* (1992a) toonden aan dat fosfaatprecipitatie door verhoging van de pH door denitrificatie slechts voor een gering deel de reductie in fosfaatgifte verklaart. Evenzo geldt dat voor de remming van het enzym fosfotransacetylase door nitraat (Lötter & Van der Merwe, 1987). Competitie voor het substraat zal een belangrijke rol spelen daar waar de productie van deze verbindingen (door de fermentatie van complexere verbindingen) de

snelheidsbepalende stap is (Rensink *et al.*, 1981). In een groot aantal installaties komen actieve denitrificerende fosfaatophopers voor (o.a. Shin *et al.*, 1992). Kuba *et al.* (1992) slaagden erin een slibcultuur te kweken die fosfaat verwijderde met uitsluitend denitrificerende fosfaatophopers door de aërobe fase te vervangen door een anoxische fase. Toch bleek de bovenstaande verklaringen niet van toepassing te zijn voor bepaalde slibsoorten. Appeldoorn (1990, 1993) vond dat in slib zonder actieve denitrificerende fosfaatophopers en onder constante pH nochtans nitraat een negatieve invloed had. Remming van de denitrificatie in dit slib met behulp van azide of cyanide bleek de inhibitie van de fosfaatafgifte door nitraat op te heffen. Er werd vastgesteld dat een intermediair, stikstofmonoxyde (NO), een potentiële remmer is van de fosfaatafgifte. De fosfaat-afgiftesnelheid in aanwezigheid van acetaat nam af met 50% door 30 μM NO. Verder onderzoek toonde aan dat produktiesnelheden van NO door denitrificerend slib aanzienlijk kunnen zijn, namelijk 16-390 $\mu\text{mol.g DW}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Bij de bepaling van deze produktiesnelheid werd gebruik gemaakt van een NO-strippings-methode.

Resumerend kan ook hier in het algemeen gezegd worden dat de mate van inhibitie door nitraat in de anaërobe fase afhankelijk is van de procescondities, het type slib en de compositie van het influent.

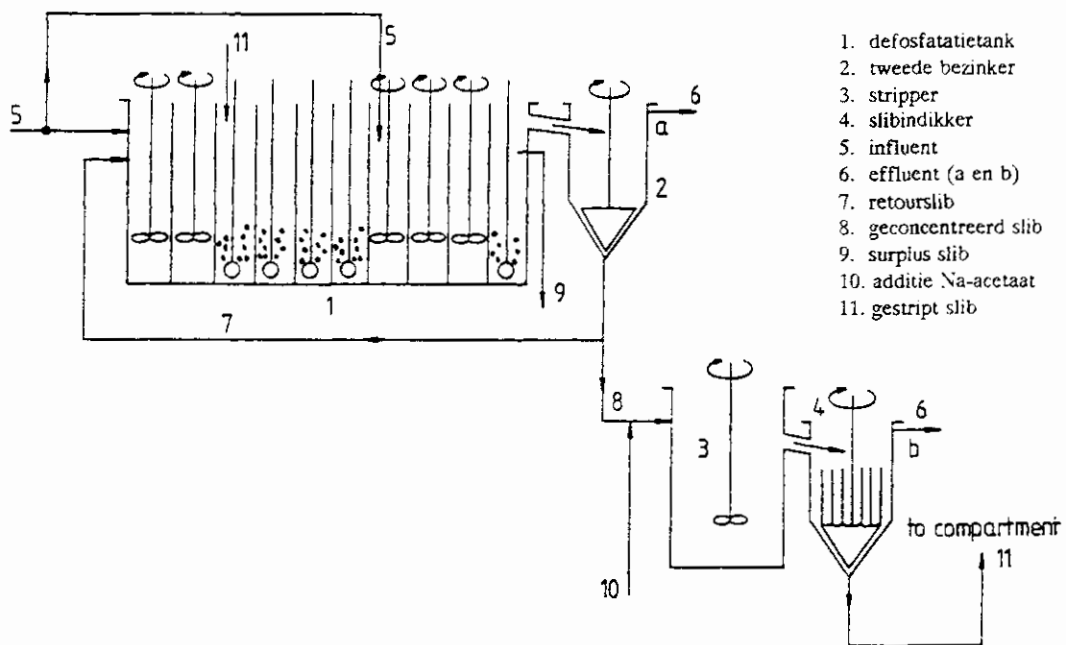
1.5 Doel van het onderzoek

Dit onderzoek werd ingesteld om het inzicht in de fundamentele processen van defosfatering zoals dat in actief slib voorkomt, te verdiepen. Een aantal vragen konden worden afgeleid: (1) wat zijn de optimale condities voor het verkrijgen van een optimale fosfaatopname; (2) hoe is het fosfaatmetabolisme gekoppeld aan het koolstofmetabolisme in fosfaatophopers; (3) waar en hoe vindt de remming van de fosfaatafgifte plaats door aanwezigheid van nitraat; (4) hoe kan het interne polyP-gehalte van de cel worden verhoogd.

Voor dit onderzoek zijn twee slibsoorten gebruikt, één praktijkslib uit het Renpho-systeem van de vakgroep Milieutechnologie van de Landbouwniversiteit Wageningen en een onder gedefinieerde condities gekweekt defosfaterend slib uit het Fill & Draw (F&D)-systeem. Afhankelijk van de experimenten werd gebruik gemaakt van vers Renpho- en F&D-slib alsmede F&D-slib dat gedurende 2 tot 3 dagen op ijs werd verzameld.

2 MATERIAAL EN METHODEN

Slibsoorten: Er zijn twee slibsoorten gebruikt. Renpho-slib was afkomstig van een experimentele reactor met biologische defosfatering van de vakgroep Milieutechnologie van de Landbouwniversiteit te Wageningen (Rensink *et al.*, 1989). Deze reactor behandelt huishoudelijk afvalwater en is verdeeld in anaërobe en aërobe compartimenten. Het slibmonster werd uit het laatste aërobe compartiment genomen (Figuur 4). Fill-and-draw slib werd verkregen uit systemen in ons laboratorium (zie verderop). Vers slib werd meteen gebruikt voor de experimenten en oud F&D-slib is surplus-slib dat gedurende 2 tot 3 dagen op ijs werd verzameld.

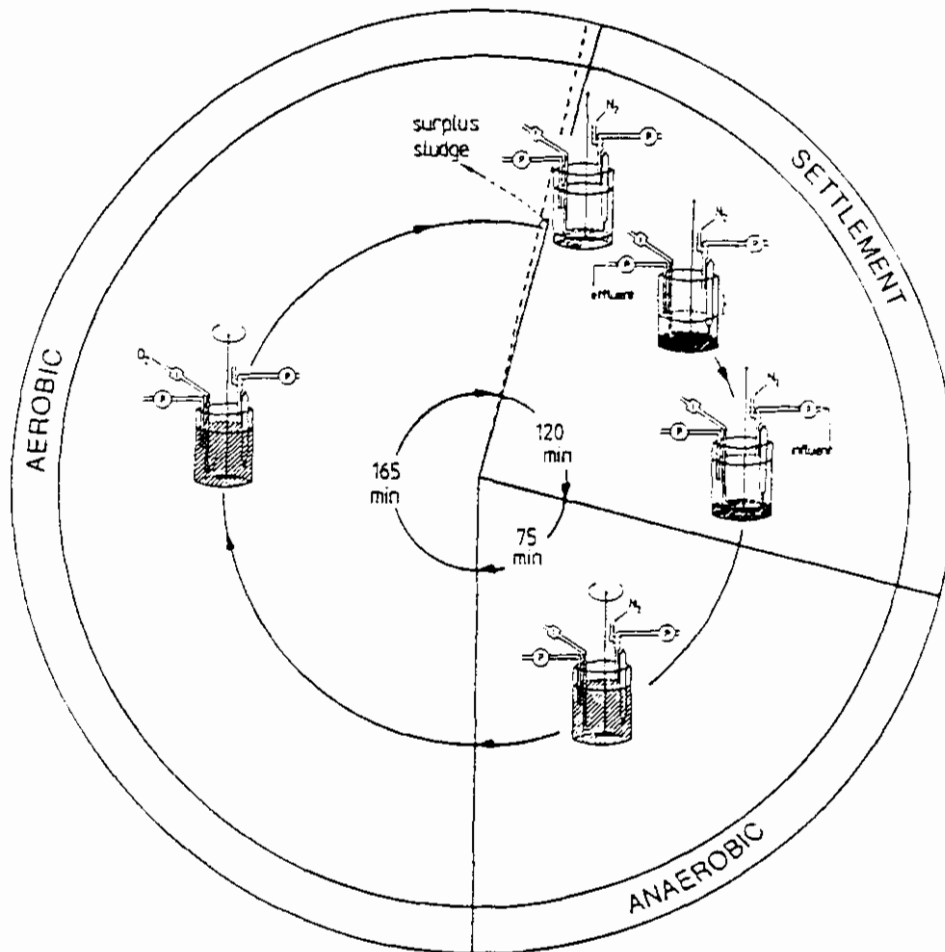


Figuur 4 Renpho-installatie met biologische defosfatering en denitrificatie.

Reinculturen: *Acinetobacter johnsonii* stam 210A (Deinema *et al.*, 1980) was geïsoleerd uit actief slib. De bacteriën werden aangehouden op bouillon agar, om de twee maanden doorgeënt en bewaard bij 4°C. De organismen werden gekweekt in batch bij 20°C op basismedium (zie verderop) met daaraan toegevoegd 10 mM PIPES-KOH buffer (pH 7.0); KH₂PO₄, 0.68; en een koolstof- en energiebron (10 mM) zoals acetaat en butyraat. *A. johnsonii* 210A werd tevens gekweekt in continu culturen (3 liter fermentoren van Applikon) met een verdunningssnelheid van 0.1 h⁻¹, een opgeloste zuurstofconcentratie van 80-90% luchtverzadiging en een pH van 7. De zuurstofconcentratie en de pH werden geregeld door een Applikon Biocontroller 1030. De temperatuur werd op 20°C gehouden. Het gebruikte medium is volgens Van Groenestijn (1988) met de volgende wijzigingen: acetaat werd gebruikt als koolstof- en energiebron (10 mM) en eventueel glucose als een additionele energiebron (0-100 mM). Aan dit medium werd ook pyroloquinoline quinone (PQQ) toegevoegd in een concentratie van 100 nM.

F&D-systemen: fermentors (2 l) werden geïnoculeerd met 900 ml Renpho-slib (3 g DW.l⁻¹; 4% P). Digitale tijdschakelaars bedienden pompen, roerinstallatie en gaskleppen. Hierdoor werden in de fermentor cycli met een anaërobe (75 minuten), een aërobe (165 minuten) en een bezinkingsperiode (120 minuten) aan het slib opgelegd (Figuur 5). Aan het einde van de aërobe periode werd automatisch 3% slib gespuid, waardoor de hoeveelheid slib in de fermentor op 2.5 - 4 g droge stof.l⁻¹ gehouden werd. In de bezinkingsperiode werd 300 ml medium eruit gepompt en vervangen door eenzelfde volume standaardmedium. Het fosforgehalte in het slib bedroeg 8-10% van het drooggewicht. Het systeem opereerde op een slibleeftijd van 8.3 dagen.

Tijdens de anaërobe en de bezinkingsperioden werd een stikstofatmosfeer in de fermentor gehandhaafd. In de aërobe fase werd lucht via een bruissteen door het slib geblazen.



Figuur 5 Schema van het fill en draw systeem met de verschillende fases in een cyclus, opgelegd aan het slib (Appeldoorn *et al.* 1992b).

Het **basismedium** bevatte per liter gedemineraliseerd water: 2.56 g NH_4Cl , 0.6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.07 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g EDTA, 0.6 g KCl en 2 ml sporenoplossing (1.5 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g $\text{H}_3\text{B}_3\text{O}_3$, 0.03 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g KI, 0.12 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.12 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ per liter gedemineraliseerd water). Het **standaardmedium** bevatte 0.51 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.09 g glucose. H_2O , 0.09 g K_2HPO_4 en 0.05 g KH_2PO_4 per liter basismedium. Het fosfaat en glucose werd apart gesteriliseerd en later toegevoegd. In de fermentor werd de pH op 7.2 ± 0.1 gehandhaafd door automatisch met verdund zwavelzuur en natronloog te titreren.

Standaardmedium werd voor de F&D-systemen gebruikt en basismedium voor fosfaatafgifte en -opname-experimenten.

Isolaties uit slib. Het slibmonster (Renpho-/F&D-slib) werd in tweeën verdeeld. Het ene deel werd gedurende 30 seconden en het andere deel gedurende 2x30 seconden getrild met een sonicator (met een tussenpauze van 30 seconden). Van beide verkregen suspensies werd een verdunningsreeks gemaakt tot en met 10^{-6} . Elke verdunning werd uitgeplaat op acetaatagar en bij 25°C weggezet. Na ongeveer zeven dagen werden de losliggende kolonies overgeënt op acetaatmoederplaten met 25 kolonies per plaat (5x5) en vervolgens geïncubeerd bij 25°C . Na ongeveer weer zeven dagen werden deze kolonies d.m.v. een entstempel met 25 naalden overgeënt op acetaat-, acetaat+glucose- en acetaat+nitraatplaten en weer geïncubeerd bij 25°C . De acetaat+glucose-platen werden dagelijks gecontroleerd, om te kijken welke kolonies in staat waren het glucose om te zetten naar gluconzuur. Aan de platen was broomkresolpurper toegevoegd als pH-indicator (pH 5.2 - 6.8). Rondom de kolonies die in staat waren zuur te vormen, ontstond een gele hof. Het was nodig om de platen elke dag te controleren, daar de gele kleur na verloop van tijd verdween. De kolonies, die in staat waren om zuur te vormen werden onderzocht op fosfaatophoping d.m.v. de Neisser-kleuring. De acetaat+nitraat-platen werden gebruikt om te kijken welke kolonies in staat waren te denitrificeren en werden anaëroob geïncubeerd.

Samenstelling agarmedia. **Acetaatmedium** bevatte per liter demiwater: 2.56 g NH_4Cl , 0.6 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.07 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g EDTA, 2.0 g $\text{NaAcetaat} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g KH_2PO_4 , 0.09 g K_2HPO_4 , 15 g agar en 2 ml sporenoplossing. **Acetaat+glucose-medium** is acetaatmedium aangevuld met (per liter demiwater): 1.0 g glucose. H_2O , 0.03 g broom-kresolpurpur en 1 nmol pyrrollo-quinoline quinone (PQQ). **Acetaat+nitraat-medium** is acetaatmedium aangevuld met (per liter demiwater): 5.0 g KNO_3 en 0.07 g TRIS.

Fosfaatafgifte- en fosfaatopname-experimenten. Voor fosfaatafgifte- en eventueel ook fosfaatopname-experimenten werd een hoeveelheid vers slib uit het systeem genomen aan het eind van de aërobe fase of surplus slib werd voor 2 tot 3 dagen op ijs opgevangen en bewaard. Het slib werd gecentrifugeerd en gewassen met 50 mM Tris-HCl (pH 7) (deze buffer alleen gebruikt bij fosfaatafgifte-experimenten) of met 10 mM PIPES-KOH (pH 7) (voornamelijk gebruikt bij fosfaatafgifte- en opname-experimenten).

Anaërobe experimenten werden uitgevoerd in 39 ml septumflesjes met 25 ml afgiftemedium (=basismedium met 4 g Tris-HCl of 3 g PIPES-KOH per liter, pH 7). Aan dit medium werd eventueel NO_3^- , NO_2^- , KCN of andere verbindingen toegevoegd (voor specificatie zie resultaten sectie). Het slib werd in een concentratie variërende van 3-6 g drooggewicht per liter toegevoegd. De suspensie werd vervolgens anaëroob gemaakt (5 min. doorleiden met stikstofgas). Het experiment werd gestart door het injecteren van 0.2 - 1 ml van het (anaërobe) substraat met een spuit via het septum. De septumflesjes werden continu geschud bij 20 of 25°C. Bij gebruik van stikstofmonoxyde (NO) werd zoveel toegevoegd dat de vloeistoffase 0.3 mM bevatte (oplosbaarheid 0.04323 bij 25°C, 1 atm, Handbook of chemistry and physics, 1947). Het anaërobe slib werd dan 5 minuten gepreincubeerd met NO alvorens het experiment te starten met het substraat.

Anaërobe-aërobe experimenten werden uitgevoerd in 100 of 250 ml septumflessen met 90 tot 180 ml afgiftemedium (= basis-medium met 3 g PIPES-KOH per liter, pH 7). Het slib werd in een concentratie variërende van 4 - 6 g drooggewicht per liter toegevoegd. De slibsuspensie werd anaëroob gemaakt door 5 minuten stikstofgas door te leiden. Het experiment werd gestart door het toevoegen van een anaëroob substraatoplossing (10 -20 ml 100 mM). De slibsuspensie werd continu geroerd met een roervlo bij kamertemperatuur. Tijdens de anaërobe fase werd continu stikstofgas doorgeblazen en tijdens de aërobe fase werd belucht met perslucht. Van tijd tot tijd werden monsters van 1.5 tot 3 ml genomen voor de bepaling van orthofosfaat, substraat, glycogeen, polyfosfaat en polyhydroxyalkanoaten.

Radioactief experiment met slib. Het surplus F&D-slib werd 2 dagen op ijs verzameld en bewaard. Het slib werd gecentrifugeerd, gewassen met PIPES-KOH buffer (10 mM, pH 7.0) en tenslotte geresuspendeerd in 100 ml afgiftemedium (=basismedium met 3 g PIPES-KOH per l, pH 7). De slibsuspensie met een concentratie van 6 g.l⁻¹ werd anaëroob gemaakt (5 minuten met N₂ doorblazen). Het experiment werd gestart met het toevoegen van 5 ml anaëroob koud acetaat (120 mM) en 100µl ¹⁴C-acetaat (7.4 kBq.µl⁻¹, specifieke activiteit = 1.89 MBq.µmol⁻¹). Gedurende de anaërobe fase werd stikstofgas door de vloeistof geblazen. Het afgas werd door drie potjes met ieder 8 ml 1 N NaOH geleid om CO₂ op te vangen. Na 80 minuten werd overgegaan op de aërobe fase door lucht i.p.v. stikstof door de slibsuspensie te leiden. Na de aërobe periode volgde weer een anaërobe periode (stikstof doorblazen) en een aërobe periode. Tijdens het begin van de tweede anaërobe periode werd opnieuw koud acetaat toegevoegd (5 ml 120 mM). Gedurende het gehele experiment werd de suspensie geroerd met een magnetische roerder. Op regelmatige tijden werden monsters genomen. Deze werden onmiddellijk gecentrifugeerd en gewassen. De supernatant werd gebruikt om de externe hoeveelheid ¹⁴C-acetaat en de opgeloste hoeveelheid ¹⁴CO₂ te bepalen. De slibpellets ondergingen twee verschillende extractiemethoden te weten voor polyhydroxyalkanoaten en voor glycogeen. De totale telling van ¹⁴C in de slibsuspensie één minuut na het toedienen van de radioactieve acetaat werd op 100% gesteld. Een zo compleet mogelijke ¹⁴C-balans voor elk tijdstip werd vastgesteld:

* ¹⁴C-acetaat in supernatant (eerste 40 minuten van experiment);

* ¹⁴CO₂ in supernatant (na 40 minuten) en loogfracties;

* ¹⁴C-hydroxyalkanoaat in chloroformfractie uit de extractiemethode volgens

Braunegg *et al.* (1978). Er dient rekening mee gehouden te worden dat bij deze extractie nog 20% van het gemethyleerde hydroxybutyraat en hydroxyvaleraat in de waterige methanolfractie achterblijven. Hiervoor is gecorrigeerd.

* ^{14}C -glycogeen na koken met loog, wassen met ethanol (67%, v/v) en oplossen in gedemineraliseerd water;

* ^{14}C -verbindingen in de wateroplosbare celfractie (dit bevindt zich in de waterige methanolfractie van de extractiemethode volgens Braunegg *et al.* (1978)) minus de ^{14}C -glycogeenfractie (bepaald zoals boven beschreven).

Van elke fractie werd 100 μl genomen voor het meten van de radioactiviteit met behulp van vloeibare scintillatie telling.

Oxydatiecapaciteitsmetingen. Voor het meten van oxydatiecapaciteiten en -snelheden werd gebruik gemaakt van een biologische zuurstofmeter (Biological Oxygen Monitor, BOM). De cel- of slijsuspensie werd in een gethermostateerd vaatje gebracht dat werd afgesloten met een zuurstofelektrode. De zuurstofconsumptie werd polarografisch met een Clark-type zuurstofelektrode gemeten en de temperatuur werd op 20°C gehouden. Monsters van **Renpho- en F&D-slib** werden aan het eind van de aërobe fase genomen, gecentrifugeerd en éénmaal gewassen met 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7). Voor **reinculturen** van *A. johnsonii* stam 210A werd met deze techniek de activiteit van glucose dehydrogenase (GDH) van gewassen en verse monsters uit de chemostaat gemeten. De gewassen cellen werden 4 maal geconcentreerd en waren geresuspendeerd in 50 mM Tris-HCl (pH 7). Twee ml van deze suspensie werd aan 2 ml 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7) met of zonder 2 mM CaCl_2 toegevoegd. De reactie werd gestart door injectie van glucose (concentratie in suspensie 25 mM). De glucose-afhankelijke zuurstofopname-snelheid werd gecorrigeerd voor de endogene respiratie. Wanneer PQQ werd toegevoegd had deze een concentratie van 2.5 μM .

^{31}P -NMR. *In vivo* ^{31}P -NMR spectra werden opgenomen bij 121.5 MHz met behulp van een 300 MHz Bruker AMX spectrometer waaraan een 20 mm driedelige sensor was verbonden die op ^{31}P was afgestemd. De spectra werden verkregen bij 25°C . Het spui-slib van een F&D-systeem werd voor 2 à 3 dagen opgevangen op ijs, waarna het gecentrifugeerd en eenmaal gewassen werd met 50 mM Tris-HCl (pH 7.6). De pellet met een natgewicht van 9.91 g, werd geresuspendeerd in 20 ml van dezelfde buffer (dit komt neer op ongeveer 60 g DW.l^{-1} , met het gegeven dat ca. 88% van het natgewicht water is). Met deze concentratie zakt het slib niet verder uit, wat een vereiste is voor het homogeen meten van een ^{31}P -signaal. Bovendien hield het slib door zijn dikte zichzelf voortdurend anaëroob. Tien ml van deze slijsuspensie en 1 ml D_2O werd in een NMR-buis gebracht voor de uiteindelijke meting.

Enzymassays. Alle assays zijn bij 30°C uitgevoerd op een Hitachi U 1100 Spectrophotometer. Het reactiemengsel bevatte 0.01-0.2 ml celvrij extract per ml assay, wat resulteerde in 60-600 μg eiwit per ml. Wanneer NO werd toegevoegd (0.2 ml per cuvet = 0.5 mM in de vloeistoffase), werd dit gas 3-5 minuten gepreïncubeerd voordat de reactie werd gestart.

Polyfosfaat:AMP fosfotransferase werd spectrofotometrisch bepaald bij 340 nm via het volgen van de oxydatie van NADH. Eén liter van het reactiemengsel bevatte het volgende: Tris-HCl (pH 8.5), 100 mmol; MgCl_2 , 8 mmol; NADH, 0.2

mmol; AMP, 1 mmol; polyfosfaat ($n=35$), 0.2 g; lactaat dehydrogenase, 2 U; pyruvaat kinase, 2 U; en P^1, P^5 -di(adenosine-5')-pentafoosfaat (Ap_5A), 0.3 mmol. De reactie werd gestart door het toevoegen van fosfoenolpyruvaat (PEP) (5 mmol).

Adenylaatkinaase (EC 2.7.4.3) werd gemeten via het volgen van de reductie van NADP. Het reactiemengsel bevatte per liter: Tris-HCl (pH 8.5), 100 mmol; $MgCl_2$, 8 mmol; NADP, 0.4 mmol; glucose, 5 mmol; hexokinase, 2 U; en glucose-6-fosfaat dehydrogenase, 1 U. De reactie werd gestart door het toevoegen van ADP (2 mmol).

Polyfosfaat glucokinaase werd gemeten via het volgen van de reductie van NADP zoals beschreven door Van Groenestijn *et al.* (1987). Glucose-6-fosfaat wordt uit polyfosfaat en glucose gevormd, en deze wordt vervolgens geoxydeerd door glucose-6-fosfaat dehydrogenase. De reactie werd met glucose gestart.

Polyfosfatase (EC 3.6.1.11) activiteit werd gemeten via het volgen van fosfaatvorming uit polyfosfaatafbraak zoals beschreven door Bonting *et al.* (1991) met een uitzondering dat de reactie werd gestart door het toedienen van celvrij extract.

Acetaatkinaase (EC 2.7.2.1) activiteit werd bepaald door het volgen van de vorming van acetaatfosfaat. Eén liter reactiemengsel bevatte: Tris-HCl (pH 8), 100 mmol; $MgCl_2$, 10 mmol; dithiotreitol (DTT), 1 mmol; natriumacetaat, 20 mmol; NH_2OH , 1 mol; NaOH, 875 mmol; ATP, 4 mmol; en glutathion, 4 mmol. De reactie werd gestart door het toevoegen van celvrij extract. Elke 10 minuten werd een monster genomen en 1:1 gemengd met een vers gemaakt mengsel van trichloorazijnzuur (24.5 mM) en $FeCl_3$ (0.1 mM) in 1 N HCl. De absorptie werd spectrofotometrisch bepaald bij 540 nm. Het eiwitgehalte werd bepaald volgens Bradford (1976).

Voor het bepalen van het type remming van adenylaatkinaase door NO werd gebruik gemaakt van commercieel verkrijgbaar enzym. Deze werd verdund tot een activiteit van ongeveer $45 U \cdot ml^{-1}$. Hetzelfde assay, zoals hierboven beschreven, werd gebruikt met dit verschil dat een concentratiegebied van 0.1 tot 2 mM ADP werd toegediend. Alvorens de reactie te starten werd het enzym gepreïncubeerd met NO (48 tot 120 μM).

Analyses. Drooggewichten van de biomassa werden bepaald door 10 ml (slibsuspensies) of 100 ml (reinculturen) te centrifugeren en eenmaal te wassen met gedemineraliseerd water. De pellet werd overgebracht in aluminium weegbakjes en gedurende één nacht gedroogd bij $100^\circ C$. Eiwit werd bepaald volgens de methode van Lowry *et al.* (1951) Ortho- en totaalfosfaat werden bepaald volgens standaardmethoden (American Public Health Association 1976). Nitriet werd gemeten volgens Griess-Romijn van Eck (1966). Nitraat werd bepaald volgens Cataldo *et al.* (1975). Poly- β -hydroxybutyraat (PHB) en poly- β -hydroxyvaleraat (PHV) werden bepaald volgens Braunegg *et al.* (1978). De analyses werden uitgevoerd op een Chrompack CP9000 met een vlamionisatie detector (H_2 , lucht). De kolom was 25 m lang, 0.32 mm ID, en gepakt met SIL 5CB (dikte 1.2 μm). De temperatuurverloop in de oven was van 60 tot $250^\circ C$ en N_2 was de dragergas. De monsters (10 μl) werden met een autosampler, model 911, geïnjecteerd. Natrium- β -hydroxybutyraat werd als standaard voor PHB gebruikt. De concentratie aan PHV werd berekend via de respons factor ratio van de methylester van valeraat en butyraat (Willard *et al.*, 1974). Aangenomen werd dat de respons factor ratio van de methylesters van HV en HB hiermee overeen kwam. In ons geval bedroeg deze ratio

1.094 \pm 0.02 (n=4) voor vergelijkbare concentraties (in mg.l⁻¹). NO werd gaschromatografisch bepaald op een chrompack 438A met een ss-kolom (110x0.21 cm) gevuld met molzeef 5A (60/80 mesh), N₂ als dragergas (30 ml.min⁻¹), injectortemperatuur 120°C, ECD-detector 300°C, oven 180°C. Vetzuren werden bepaald met een HPLC, met een Chrompack organische zuren kolom (30x6.5 mm ID) en een differentiële refractometer (LKB 2142). De mobiele fase was een 0.01 N H₂SO₄ oplossing, met een stroomsnelheid van 0.6 ml.min⁻¹. De werkt temperatuur was 60°C. Monsters (20 μ l) werden geïnjecteerd met een Spectra Physics autosampler (SP8775). Glycogeen werd geëxtraheerd van gewassen slibmateriaal op de volgende manier. Slib werd gedurende 4 uur bij 100°C verhit in 10% NaOH. Het mengsel werd gecentrifugeerd en de supernatant werd vervolgens verwijderd. De pellet werd gemengd met 66% (v/v) ethanol en gecentrifugeerd. Het neerslag werd opgelost in gedemineraliseerd water. Glycogeen werd met behulp van de anthron-zwavelzuur methode voor hexosen gekwantificeerd (Trevelyan en Harrison, 1952). Een tweede methode voor het bepalen van glycogeen werd gebruikt door het celmateriaal 4 uur te koken bij 100°C met 0.6 N H₂SO₄. Het mengsel werd gecentrifugeerd en de glucose in de supernatant werd bepaald met de HPLC onder dezelfde condities als voor acetaat. Met deze laatste methode kon tegelijkertijd totaal fosfaat in het celmateriaal worden bepaald.

Chemicaliën. Gelabeld ¹⁴C-natrium acetaat (1.89 MBq/ μ mol) was afkomstig van Amersham Nederland BV, Den Bosch. Stikstofmonoxyde kwam van Hoek Loos (Schiedam). Hexokinase (EC 2.7.1.1), glucose-6-fosfaat dehydrogenase (EC 1.1.1.49), adenylaatkinase (EC 2.7.4.3), lactaat dehydrogenase (EC 1.1.1.27), pyruvaatkinase (EC 2.7.1.40), NADP, NAD, NADH, AMP, ADP, ATP, PEP waren van Boehringer, Mannheim. Ap₅A en polyfosfaatglas (n=35) waren verkregen via Sigma Chemical Co. (Amsterdam). Alle andere chemicaliën waren van analytische graad.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Karakterisering van de polyP-ophopende populaties van Renpho- en F&D-slib

Om enige indruk te krijgen welke typen en aantallen polyfosfaatophopende organismen aanwezig zijn in Renpho- en F&D-slib, werd een groot aantal isolaties uit vers slib (eind aërobe fase) uitgevoerd. Elk der geïsoleerde organismen werd op een drietal eigenschappen getest. Ten eerste werd gekeken naar polyP-vorming (Neisserkleuring); ten tweede werd nagegaan of het organisme gluconzuur produceert uit oxydatie van glucose en ten derde werd het vermogen tot denitrificatie bekeken. De eerste en derde eigenschap zijn evident. De tweede genoemde test plus een aantal andere eigenschappen werden gekozen om eenvoudig vast te stellen of men te maken had met een *Acinetobacter* species. Het merendeel van de *Acinetobacter* stammen is niet in staat glucose op te nemen en te gebruiken voor groei, maar ze kunnen wel glucose oxyderen tot gluconzuur mits het co-enzym pyrrolo-quinoline quinone (PQQ) aanwezig is (Gerner-Smidt & Tjerberg, 1990). Het gluconzuur hoopt op in het medium waardoor de pH omlaag gaat en kan als zodanig worden aangetoond. De resultaten staan in Tabel 1 weergegeven. Indien elk der eigenschappen afzonderlijk bekeken wordt dan zijn de volgende trends in het Renpho- en het daarvan afgeleide F&D-slib waar te nemen: (1) het aantal polyP-ophopende organismen neemt fors toe, (2) daarentegen neemt het aantal gluconzuurproducerende stammen sterk af en daalde zelfs tot 0, terwijl (3) de denitrificerende populatie met ongeveer de helft afneemt. Het F&D-slib selecteert dus sterk voor fosfaatophopers en

Tabel 1 Karakterisering van de populatie van Renpho- en F&D-slib met betrekking tot polyP-vorming, gluconzuurvorming en denitrificatie. Sonicatietijden: 30 en 2x30 seconden (Renpho- en F&D1-slib) en 4x30 en 8x30 seconden (F&D2-slib).

| Omschrijving stammen | Renpho | | F&D1 | | F&D2 | |
|--|--------|----|--------|----|--------|----|
| | aantal | % | aantal | % | aantal | % |
| totaal aantal stammen | 438 | | 534 | | 486 | |
| gluconzuurvormers | 108 | 25 | 23 | 4 | 0 | 0 |
| denitrificeerders | 126 | 29 | 118 | 22 | 71 | 15 |
| polyP-ophopers | 22 | 5 | 198 | 37 | 411 | 85 |
| polyP-ophopende gluconzuurvormers | 22 | 5 | 14 | 3 | 0 | 0 |
| polyP-ophopende denitrificeerders | 9 | 2 | 66 | 12 | 62 | 13 |
| polyP-ophop. denitrif. gluconzuurvorm. | 9 | 2 | 6 | 1 | 0 | 0 |

ondanks de afwezigheid van nitraat in het influent blijven denitrificeerders in het systeem. Dit is te verklaren doordat kleine hoeveelheden NO_2^- en NO_3^- (samen ca. 0.1 mM) werden gevormd door nitrificatie. Het Renpho-slib bestaat volgens de gegevens in Tabel 1 voor ongeveer een kwart deel uit voornamelijk gluconzuurvormende species. Deze groep bestond uitsluitend uit *Acinetobacter* stammen. Daarvan is slechts een klein deel in staat om polyP te accumuleren. In het F&D-systeem zijn ze nagenoeg verdwenen, terwijl een betere defosfatering plaats vindt dan in het Renpho-systeem. Geconcludeerd kan worden dat het F&D-systeem selecteert voor polyP-organismen verschillend van *Acinetobacter* en het selecteert niet duidelijk voor denitrificerende, polyP-ophopende organismen. Dit laatste is waarschijnlijk toe te schrijven aan de kweekcondities: een korte anaërobe periode zonder nitraat gevolgd door een aërobe periode. Het hier gevonden verband tussen een betere defosfatering en de afwezigheid van *Acinetobacter* species is identiek aan de bevindingen gedaan door Hiraishi *et al.* (1989) en Auling *et al.* (1991). M.a.w. de groei-condities in het F&D-systeem leiden tot een selectie van polyfosfaatophopers welke niet tot de *Acinetobacters* behoren.

Er dient te worden opgemerkt dat de getallen in de tabel slechts als indicaties moeten worden opgevat. De verklaring hiervoor is het volgende. De organismen komen voornamelijk in vlokken voor. Om losse cellen te krijgen worden de vlokken korte tijden gesoniceerd. Het is gebleken dat langere sonicatietijden meer polyP-ophopers los maakt (Tabel 1, verschil tussen F&D1 en F&D2)). Bij een korte tijd soniceren gaat niet de hele vlok in suspensie. Langere tijden leiden echter weer tot desintegratie van de cellen. Het optimale tijdstip ligt daartussen in. Langer soniceren van F&D-slib was gunstiger dan voor Renpho-slib, omdat in het eerst genoemde de vlokken veel compacter en steviger waren. Ten tweede dient te worden opgemerkt dat de resultaten aangaande denitrificerende stammen in Tabel 1 vooral wat het Renpho-slib betreft met grote voorzichtigheid gehanteerd dienen te worden. Soms werden helemaal geen denitrificerende isolaten gevonden terwijl het slib wel denitrificeerde. Met betrekking tot het percentage polyP-ophopende denitrificeerders in F&D-slib moet worden opgemerkt dat de 12 en 13% zeker de bovengrens vertegenwoordigen. Middelen van dit gegeven met twee voorgaande studies geeft een percentage polyP-ophopende denitrificeerders van 7 ± 5 . De standaardafwijking bij het percentage polyP-ophopers in Renpho-slib was relatief gering: 5 ± 1 . De condities waaronder het Renpho-slib werd gekweekt wisselden wat onderzoek aan dit slib ernstig bemoeilijkte. Het F&D-slib bevond zich daarentegen in een 'steady state' fase die ongeveer 6 weken na het opstarten werd bereikt.

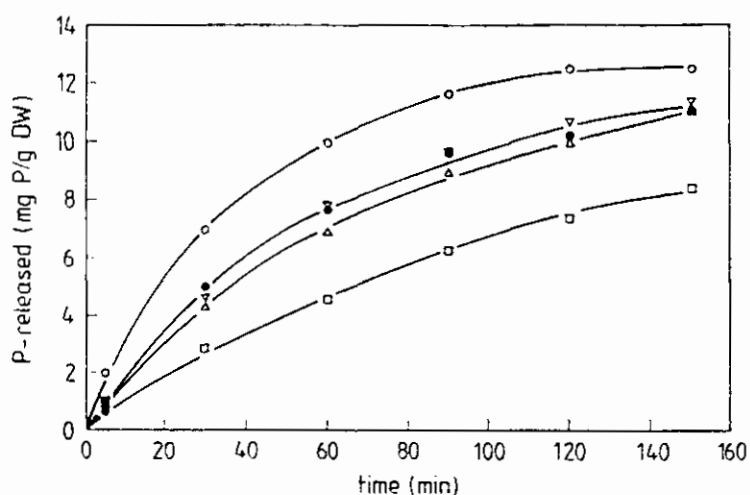
Met nadruk moet gesteld worden dat het kleine aantal stammen dat per groep gevonden wordt in Renpho-slib te gering is om tot een verantwoorde conclusies te komen met betrekking tot het percentage polyP-ophopers dat kan denitrificeren.

3.2 Enkele factoren die van invloed zijn op de fosfaatafgifte

3.2.1 pH

De pH in de anaërobe zone en in de strippertank in praktijkopstellingen ligt meestal tussen 7 en 7.5. Het strippen van fosfaat wordt gedaan met behulp van

natriumacetaat (azijnzuur met natronloog). Economisch gezien is het aantrekkelijker om alleen azijnzuur te gebruiken, maar dat leidt weer tot een afname in de fosfaatafgifte. Een voor de hand liggende verklaring zou kunnen zijn dat de pH-verlaging die optreedt bij azijnzuurdosering ongunstig kan zijn voor de fosfaatafgifte. Om dit te bevestigen werd met Renpho-slib een aantal fosfaatafgifte-experimenten bij verschillende pH's uitgevoerd tussen pH 6.0 en 8.0. De initiële fosfaatafgiftesnelheid nam toe bij stijgende pH (Figuur 6 en Tabel 2). Bij pH 6 is de afgiftesnelheid een factor 3-4 lager dan bij pH 7.0, en een factor 8 lager dan bij pH 8. Vergelijkbare resultaten zijn in het co-onderzoek door Smolders (1992) gevonden met F&D-slib. Tevens bleek, dat de totale hoeveelheid afgegeven fosfaat ook toenam bij hogere pH. Dit kan worden verklaard doordat het transport van fosfaat over de celmembraan geremd wordt door een lagere pH (H.W. van Veen, persoonlijke mededeling). De beste afgifte werd bij pH 8.0 gevonden.



Figuur 6 Fosfaatafgifte door Renpho-slib bij verschillende pH's. pH 6.0 (□), 6.5 (Δ), 7.0 (•), 7.5 (▽) en 8.0 (○).

Tabel 2 Initiële fosfaatafgifte- en denitrificatiesnelheden in Renpho-slib bij verschillende pH-waarden.

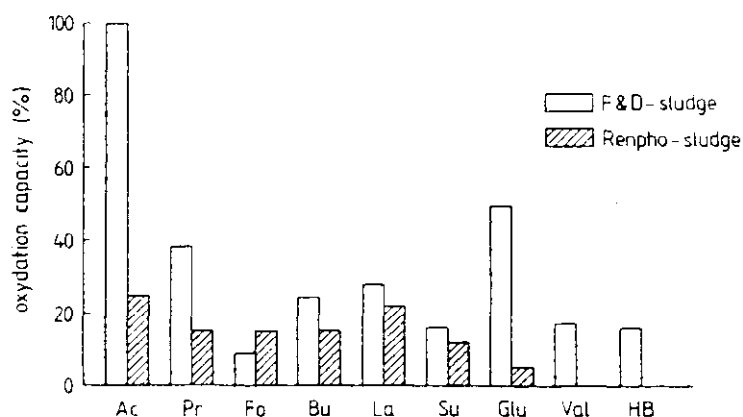
| pH | P-afgiftesnelheid mg P.min ⁻¹ .g DW ⁻¹ | denitrificatiesnelheid μmol NO ₃ ⁻ .min ⁻¹ .g DW ⁻¹ |
|-----|---|--|
| 6.0 | 0.07 | 3.02 |
| 6.5 | 0.19 | 3.58 |
| 7.0 | 0.26 | 4.19 |
| 7.5 | 0.26 | 4.31 |
| 8.0 | 0.57 | 5.10 |

In dezelfde monsters werd ook de denitrificatiesnelheid gemeten. Deze snelheid nam toe met de pH-waarde hoewel minder significant dan de fosfaatafgifte (Tabel 2). Van het denitrificatievermogen is bekend dat het optimum tussen pH 7.0 en 8.0 ligt (Knowles, 1982).

Concluderend kan gezegd worden dat door een hogere pH aan te leggen in de anaërobe zone meer en sneller fosfaat afgegeven kan worden en dat ook eventuele denitrificatie sneller verloopt. Op grond van deze gegevens moet het toedienen van azijnzuur (dat de pH verlaagt) aan de strippertank sterk worden afgeraden.

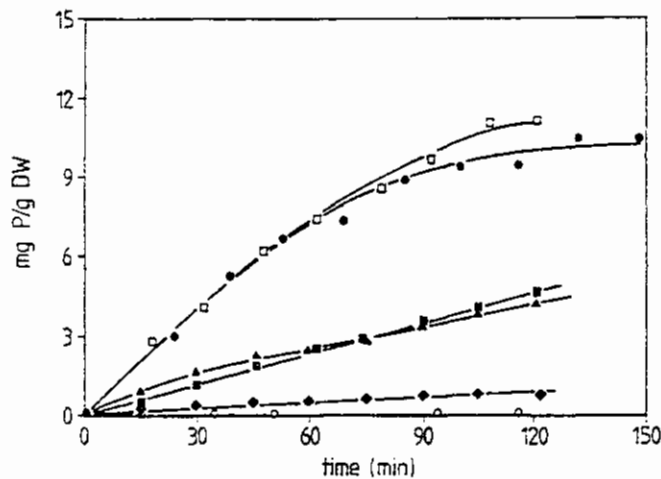
3.2.2 Laagmoleculaire verbindingen

Het is reeds lang bekend dat de mate van fosfaatafgifte in de anaërobe fase afhankelijk is van o.a. de influentsamenstelling (Toerien, 1990). Afgifte-experimenten met diverse organische verbindingen, zoals die in de literatuur vermeld staan, leveren voor elk slib andere profielen op. In deze studie zijn ook dergelijke experimenten uitgevoerd met Renpho- en F&D-slib. Renpho-slib wordt gevoed met huishoudelijk afvalwater. Dit wordt gefermenteerd tot een verscheidenheid van produkten. Deze kunnen in de aërobe fase worden geoxydeerd als ze niet al in de anaërobe periode worden omgezet in poly- β -hydroxyalkanoaten (Figuur 2 en 3). Om na te gaan of dit ook het geval is na 2 maanden kweken in het F&D-systeem werden van beide systemen monsters genomen en oxydatie-snelheden gemeten. Het F&D-slib kan de meeste aangeboden verbindingen ondanks dat het gekweekt wordt op een specifiek medium, met vergelijkbare snelheden oxyderen (Figuur 7). Acetaat lijkt veel harder geoxydeerd te worden, zeer waarschijnlijk omdat de polyP-ophopers sterk in aantal zijn toegenomen en deze organismen op PHB groeien. Acetaat (acetyl-CoA) is een belangrijk intermediair bij groei op PHB. Ondanks het feit dat reeds zeer snel na toediening glucose niet meer aan te tonen valt in de anaërobe fase wordt glucose toch harder geoxydeerd door het F&D-slib dan door Renpho-slib. Mogelijk is dit een gevolg van selectie van facultatief anaërobe organismen die glucose zowel kunnen fermenteren als verademen.



Figuur 7 Relatieve oxydatiesnelheden van verschillende verbindingen door Renpho-slib en F&D-slib. De oxydatiesnelheid van acetaat door F&D-slib is op 100% ($= 16 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g DW}^{-1}$) gesteld. Ac = acetaat; Pr = propionaat; Fo = formiaat; Bu = butyraat; La = lactaat; Su = succinaat; Glu = glucose; Val = valeraat; HB = β -hydroxybutyraat.

In aanwezigheid van een groot aantal organische en enkele anorganische verbindingen werden de fosfaatafgifteprofielen in zowel Renpho- als F&D-slib gemeten. In beide slibsoorten treden dezelfde profielen op, maar zij verschillen alleen in snelheid en maximale fosfaatafgifte. Vandaar dat in Figuur 8 een select aantal fosfaatafgifteprofielen van Renpho-slib zijn weergegeven en in Figuur 9 de opnameprofielen van diverse vetzuren. Van alle gemeten fosfaatafgifteprofielen zijn de initiële specifieke snelheden berekend (Tabel 3). Het F&D-slib heeft in de meeste gevallen een veel hogere fosfaat-afgiftesnelheid dan Renpho-slib. Dit komt omdat F&D-slib veel meer polyP-ophopers bevat en bovendien onder condities gekweekt wordt die gunstig zijn voor dit soort organismen. Zoals in vele onderzoeken naar voren komt, leveren acetaat en propionaat de hoogste fosfaatafgiftesnelheden op. De overige verbindingen stimuleren de fosfaatafgifte minder goed of nauwelijks. Acetaat en propionaat nemen gedurende het experiment af in het medium, terwijl bijvoorbeeld formiaat en butyraat niet of nauwelijks verdwijnen (Figuur 9). Comeau *et al.* (1987) lieten reeds zien dat acetaat, propionaat, formiaat en butyraat door het slib opgenomen worden en vervolgens omgezet in poly- β -hydroxybutyraat (PHB) of poly- β -hydroxyvaleraat (PHV). De energering die hiervoor nodig is wordt geleverd door de polyP-afbraak (Comeau *et al.*, 1984). Hierover meer in sectie 3.3.

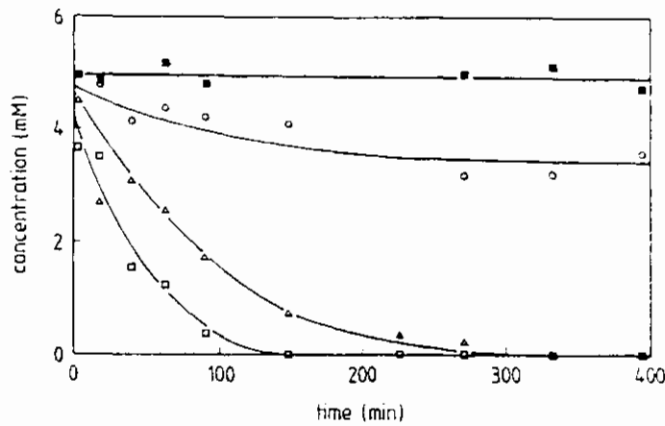


Figuur 8 Anaërobie P-afgifteprofielen door Renpho-slib bij verschillende organische verbindingen. De initiële concentraties van elk der verbindingen was 5 mM. Acetaat (•), propionaat (□), formiaat (■), butyraat (▲), CO₂ (◆) en zonder additie (○).

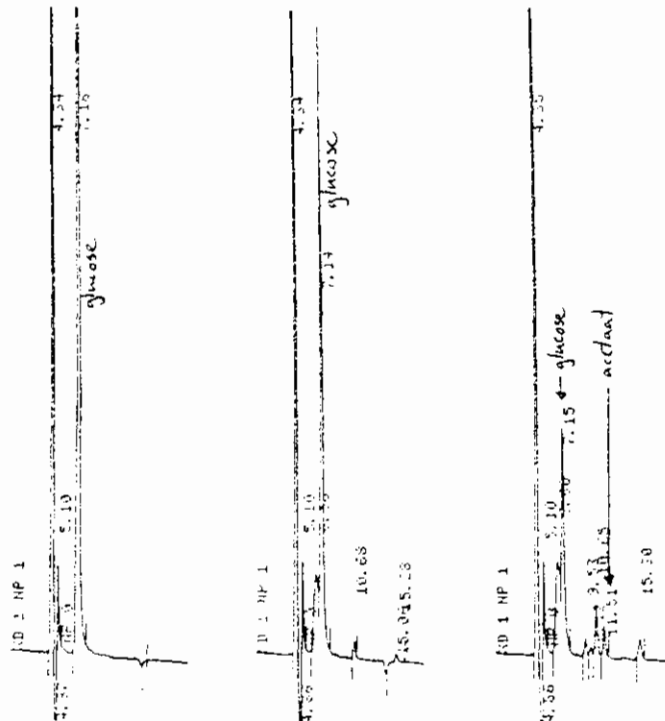
Van alle carbonzuren die getest werden had oxalaat geen of nauwelijks effect. Ethanol had in dit experiment ook geen effect, dit in tegenstelling tot eerdere experimenten (De Vries en Rensink, 1985). Glucose had in het begin geen effect op de fosfaatafgifte bij Renpho-slib. Na verloop van tijd kwam toch meer orthofosfaat vrij en nam glucose af terwijl daarnaast andere organische producten werden gevormd, waaronder acetaat (Figuur 10). Andere pieken in het chromatogram werden niet geïdentificeerd. Het lijkt er dus op dat glucose eerst gefermenteerd moet worden en dat de produkten daarvan de versnelde fosfaatafgifte bewerkstelligen. Bij

F&D-slib was er een directe stimulering van de fosfaatafgifte door glucose.

Arsenaat is een remmer van de ATP-productie. Het veroorzaakt een verlaging van de energieproductie en daardoor een versnelde fosfaatafgifte. Hoge concentraties ammonium kunnen leiden tot een futole cyclus van het transport van dit ion over het celmembraan (Kleiner, 1985). In Tabel 3 is te zien dat 80 mM NH_4^+ inderdaad de fosfaatafgifte redelijk stimuleert. Toedienen van CO_2 had slechts een gering effect bij Renpho-slib.



Figuur 9 Anaërobe opname van acetaat (□), propionaat (Δ), butyraat (o) en formiaat (■) door fosfaatafgevend F&D-slib.



Figuur 10 HPLC-spectra van supernatanten van monsters genomen op respectievelijk de tijdstippen 1 (a), 18 (b) en 25 (c) uur.

Uit bovenstaande resultaten mag worden geconcludeerd dat de P-afgifte een gevolg moet zijn van energiewinning verkregen uit de afbraak van polyP. Hoe harder de cel energie verbruikt hoe sneller de polyP-afbraak en fosfaatafgifte zal verlopen. Met acetaat en propionaat worden in de meeste gevallen de beste resultaten verkregen. Een verklaring hiervoor is waarschijnlijk als volgt. In tegenstelling tot een groot aantal andere verbindingen kunnen acetaat en propionaat worden omgezet in de corresponderende poly- β -hydroxyalkanoaten. Dit vereist een activering van beide verbindingen waarbij energie nodig is. Bovendien is de laatste jaren duidelijk geworden dat acetaat en propionaat actief kunnen worden opgenomen: zowel *Escherichia coli* w (Wagner *et al.*, 1972) als *Corynebacterium glutamicum* (Ebbighausen *et al.*, 1991) bevat een actief transportsysteem voor acetaat dat ook actief is met propionaat. Onlangs is ook evidentie bij *A. johnsonii* 210A voor een actief acetaatopnamesysteem gevonden (Van Veen en Kleefsman, niet gepubliceerde resultaten). Het lijkt erop dat ook de organismen in het slib die verantwoordelijk zijn voor defosfatering, een dergelijk actief systeem bezitten. Andere verbindingen, zoals formiaat en butyraat, zullen waarschijnlijk passief worden opgenomen door het slib. Voor butyraat is dat aangetoond bij *E. coli* (Kay, 1978).

Tabel 3 Initiële fosfaatafgiftesnelheden ($\text{mg P} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g DW}^{-1}$) door Renpho- en F&D-slib in aanwezigheid van diverse verbindingen (concentratie: 5 mM, tenzij anders vermeld).

| verbinding | Renpho-slib | F&D-slib |
|--------------------------------------|-------------|----------|
| acetaat | 0.18-0.22 | 0.44-1.4 |
| propionaat | 0.14 | 0.52 |
| butyraat | 0.05 | 0.07 |
| formiaat | 0.05 | 0.07 |
| pyruvaat | 0.10 | 0.41 |
| lactaat | 0.06 | - |
| succinaat | 0.04 | - |
| oxalaat | 0.009 | - |
| glucose | 0.006 | 0.13 |
| ethanol | 0.006 | - |
| CO ₂ | 0.02 | - |
| arsenaat | 0.03 | - |
| NH ₄ ⁺ (80 mM) | 0.07 | - |
| geen additie | 0.006 | 0.006 |

Zonder enige toevoeging geeft slib ook fosfaat af zij het met een lage snelheid (Tabel 3). Met behulp van ^{31}P -NMR is 17 uur lang de endogene fosfaatafgifte gevolgd in F&D-slib van 2 à 3 dagen oud (Figuur 11). Elk spectrum is een gemiddelde van 1 uur meten. Voor de leesbaarheid zijn de spectra met 2 uur tussenpozen weergegeven. Duidelijk is te zien dat de polyP-piek afneemt en na 17 uur bijna geheel is verdwenen. Het fosfaat is voornamelijk buiten de cel terug te vinden. Het scheidend vermogen van de interne en externe orthofosfaatpieken was niet goed mogelijk. Dit vermogen is pH-afhankelijk en het verschil tussen interne en externe pH was niet groot genoeg om de pieken te scheiden.

Blijkbaar wordt polyP ook afgebroken in afwezigheid van substraat. Het afbraakproces duurt alleen langer. Het polyP wordt waarschijnlijk langzaam afgebroken voor energieproductie dat nodig is voor het onderhoud van de cel (zogenaamde endogene fosfaatafgifte). Dit zou een economisch aantrekkelijke manier zijn om het slib van fosfaat te ontdoen. Het nadeel is echter dat de energie van polyfosfaatabraak niet wordt benut om de noodzakelijke vetzuren op te nemen die nodig zijn om onder aërobe omstandigheden fosfaat op te nemen.



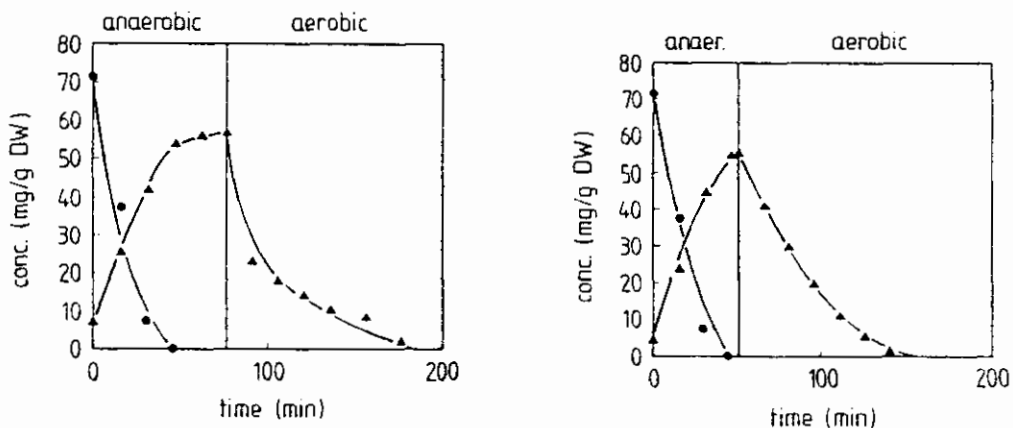
Figuur 11 ^{31}P -NMR spectra van F&D-slib. Elk spectrum is een gemiddelde van 1 uur meten. Het eerste spectrum is 1 uur na de start gemaakt, de laatste is na 17 uur opgenomen. Piekidentificatie: a. intern orthofosfaat; b. extern orthofosfaat; c. polyfosfaat.

3.2.3 Een kortere anaërobe fase

Het F&D-slib heeft een slibleeftijd van 8.3 dagen en ondergaat voortdurend een anaërobe periode van 75 minuten, een aërobe periode van 165 minuten en een bezinkingsperiode van 120 minuten. Dit slib is geheel geconditioneerd aan deze tijdzetting, zoals een fosfaatafgifte- en -opnameplaatje laat zien in Figuur 12A. Het externe acetaat (3.75 mM) is binnen 50 minuten opgenomen. De fosfaatafgifte neemt op dat moment sterk af. Gedurende de resterende tijd (ongeveer 25 minuten) levert

de anaërobie geen grote bijdrage meer. Ook de interne reacties van de cellen, d.w.z. PHB-synthese en glycogeenafbraak, zijn niet meer aan grote veranderingen onderhevig (Figuur 13). Op grond van deze gegevens kan het F&D-slib met een kortere anaërobe periode toe. Van een F&D-systeem dat lange tijd met bovenstaande periodelengten gefunctioneerd had, werd de anaërobe periode verkort met 25 minuten en de aërobe met eenzelfde tijd verlengd zodat de verblijftijd van het slib gelijk bleef. Het gedrag van het slib veranderde niet noemenswaardig gedurende de zes weken dat dit experiment werd uitgevoerd. Het acetaat werd net binnen de anaërobe periode opgenomen. Zodra de beluchting aan ging, schakelde het slib onmiddellijk van fosfaatafgifte over op fosfaat-opname (Figuur 12B). Voor de fosfaatafgifte geldt dus dat de minimale anaërobe periode bepaald wordt door de aard en hoeveelheid van de COD-belasting. In dit onderzoek werden anaërobe perioden korter dan 50 minuten niet getest.

Of in de praktijkinstallaties de anaërobe periode ook zonder meer verkort kan worden is afhankelijk van snelheid waarmee organische verbindingen in het influent anaëroob afgebroken kunnen worden.



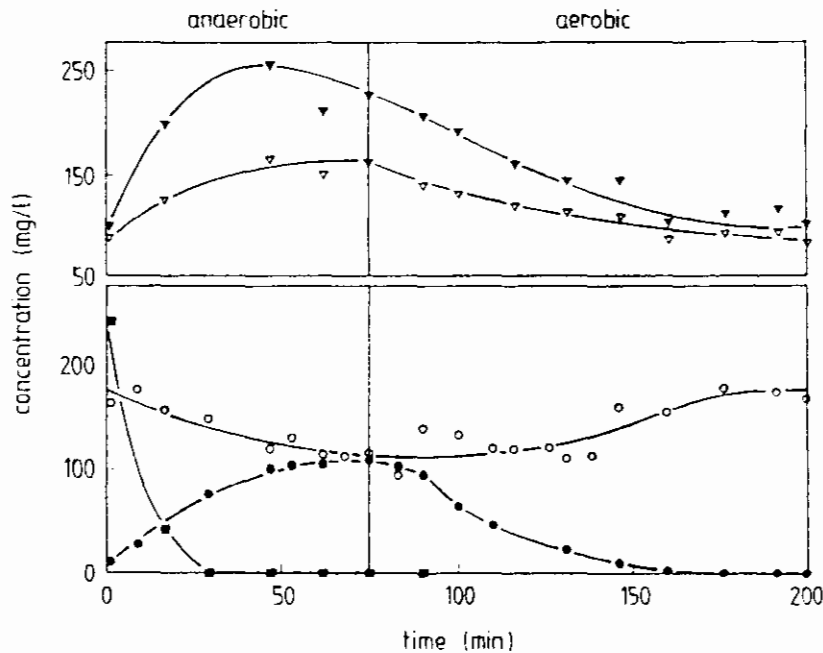
Figuur 12 A. Fosfaatafgifte en -opname (in mg P.g DW⁻¹) (▲) en acetaatopname (●) in het F&D-systeem gedurende een anaërobe fase van 75 minuten en een aërobe fase van 165 minuten (drooggewicht = 2.9 g/l). B. Idem als A, maar met een anaërobe fase van 50 minuten en een aërobe fase van 190 minuten.

3.3 Koolstofmetabolisme en fosfaatafgifte

3.3.1 Anaëroob/aëroob-experiment met acetaat

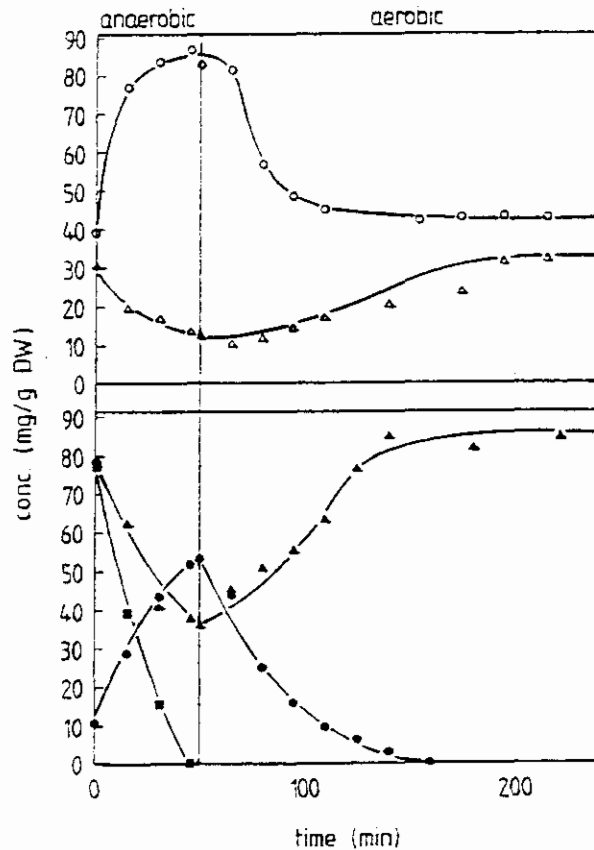
Acetaat wordt tijdens de anaërobe fosfaatafgifte door het slib opgenomen. In de cel moet acetaat tot een osmotisch inerte verbinding worden omgezet. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat acetaat wordt omgezet in poly- β -hydroxybutyraat (PHB) (Comeau *et al.*, 1984). Daarvoor is een reductiestap nodig en de bron van reductie-equivalenten blijkt nog een punt van discussie te zijn. Met F&D-slib, dat gedurende 2 dagen op ijs was opgevangen, zijn in dit onderzoek verschillende anaëroob/aëroob-experimenten verricht om tot een duidelijk inzicht te komen in dit probleem.

In Figuur 13 is het verloop van PHB, glycogeen en extern fosfaat te zien indien acetaat wordt toegediend. Acetaat is geheel opgenomen na 40 minuten. In die tijdsperiode wordt de meeste fosfaat afgegeven en PHB gevormd. Naast PHB wordt ook een niet onaanzienlijke hoeveelheid poly- β -hydroxyvaleraat (PHV) gevormd. De PHB/PHV-ratio na toedienen van acetaat bedraagt 2.3 - 3.0 mol.mol⁻¹. Verder was een daling van het glycogeen gehalte waar te nemen. Zodra lucht werd doorgeleid vond opname van fosfaat plaats. Dit ging gepaard met een afname in de PHB- en PHV-gehaltenes en een toename in het glycogeen gehalte. Het verloop van het glycogeen gehalte ondersteunt de theorie van Mino *et al.* Eenzelfde experiment werd ook uitgevoerd, maar dan zonder toevoeging van acetaat of ander substraat. Gedurende de anaërobie fase werd een kleine hoeveelheid fosfaat afgegeven, terwijl de PHB-, PHV- en glycogeenconcentraties niet veranderden. Tijdens de daarop volgende aërobie fase werd het fosfaat weer opgenomen, de PHB- en PHV-gehaltenes namen iets af en dat van glycogeen nam iets toe (resultaten niet weergegeven).



Figuur 13 Verloop van fosfaat (●), acetaat (■), PHB (▼), PHV (▽) en glycogeen (○) in een gewassen F&D-slib suspensie gedurende 1 anaërobie (75 min.) en 1 aërobie (135 min.) periode na toediening van 4 mM acetaat (drooggewicht = 7.8 g/l).

Een verlenging van de aërobie periode met 25 minuten leidde niet tot een verdere omzetting van PHB en ook de glycogeenproductie nam niet verder toe (Figuur 14). Het resultaat in Figuur 14 doet suggereren dat de cellen in de aërobie fase een vaste minimale PHB-concentratie handhaven: in de aërobie periode wordt alleen de hoeveelheid PHB (en PHV) afgebroken die in de anaërobie periode wordt geproduceerd uit acetaat. Ook het glycogeen gehalte wordt weer aangevuld tot de hoeveelheid die het slib had aan het begin van de anaërobie periode.

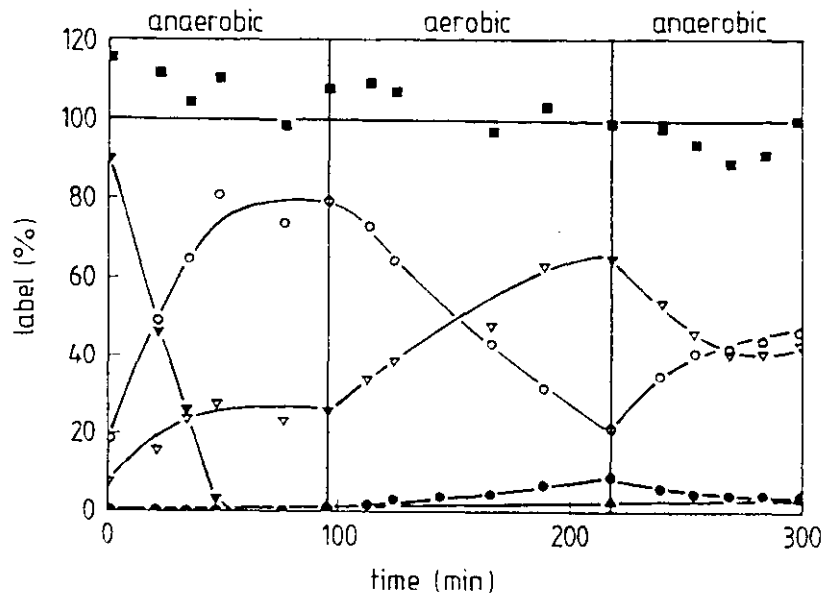


Figuur 14 Verloop van fosfaat (•), acetaat (■), polyP (▲), PHB (o) en glycogeen (Δ) in het F&D-systeem gedurende 1 korte anaërobe (50 min.) en 1 langere aërobe periode (190 min.).

3.3.2 Anaëroob/aëroob-experiment met radioactief acetaat

Om te weten te komen of glycogeen inderdaad uit de aangeboden acetaat wordt gevormd via PHB is een experiment met ^{14}C -acetaat uitgevoerd. Het gewassen slib onderging 3 opeenvolgende fasen, respectievelijk anaëroob (95 minuten), aëroob (120 minuten) en anaëroob (80 minuten). De eerste anaërobe fase werd gestart met 4.9 mM koud acetaat en $6.6 \mu\text{M}$ ^{14}C -acetaat. Bij aanvang van de tweede anaërobe fase werd alleen koud acetaat toegevoegd tot een beginconcentratie van 6.2 mM. Bij dit experiment werd alleen de radioactiviteit gevolgd. De suspensie werd tijdens de anaërobe fase continu met stikstof begast en de perslucht werd gedurende de aërobe fase aangezet. Het afgas werd door 2N NaOH geleid om $^{14}\text{CO}_2$ te vangen. In Figuur 15 en Tabel 4 staan de resultaten weergegeven. Alle radioactieve acetaat werd binnen 50 minuten opgenomen. Ongeveer 80% daarvan werd omgezet naar PHB (+PHV) en ongeveer 20% werd teruggevonden in de wateroplosbare celfractie. Een klein deel (3%) werd als $^{14}\text{CO}_2$ gedetecteerd. Er werd geen radioactief glycogeen gevormd. In de aërobe fase daalde de radioactieve PHB-fractie met 75%. Het merendeel werd in de wateroplosbare celfractie gevonden ($\pm 75\%$ van de omgezette radioactieve PHB kwam daarin terecht); 17% van de omgezette PHB werd als

glycogeen gevonden en slechts 2.5% ontweek als $^{14}\text{CO}_2$. In de volgende anaërobe fase werd weer radioactief PHB opgebouwd (deze verliep van 20 naar 50% van het totale label), waarschijnlijk afkomstig uit de wateroplosbare celfractie (22%) en glycogeen (6%). Gedurende deze fase werd slechts 1% $^{14}\text{CO}_2$ gevormd. In Figuur 15 is ook de totale radioactiviteitsbalans weergegeven, waarbij de startwaarde van radioactiviteit in de slib suspensie (= toegediend ^{14}C -acetaat) op 100% is gesteld. In het begin liggen de waarden ruim boven 100%, waarschijnlijk als gevolg van absorptie van acetaat aan de biomassa. Het is uit de balans op te maken dat geen radioactiviteit op een of andere wijze uit het systeem verdwenen is.



Figuur 15 Verloop van radioactief label in de verschillende compartimenten van suspensie van gewassen F&D-slib: acetaat (▼), PHB en PHV (○), wateroplosbare celfractie (▽), glycogeen (•) en CO_2 (▲) gedurende een sequentie van 3 fasen: anaëroob, aëroob en anaëroob. Totale radioactiviteit (■). Drooggewicht was ca. 6 g/l.

Het eerste wat opvalt is dat zeer weinig $^{14}\text{CO}_2$ wordt gevormd in elk der fasen. In de eerste anaërobe fase kan dat nog wel verklaard worden als verondersteld wordt dat inderdaad glycogeen als NADH-bron fungeert en dan dus ook de enige CO_2 -bron is. Echter, in de aërobe fase wordt PHB afgebroken en is in principe de C- en energiebron. Ruwweg gesproken zou men mogen verwachten dat ongeveer 50% van de omgezette gelabelde PHB in $^{14}\text{CO}_2$ terug te vinden is, maar experimenteel werd slechts 1.5% gevonden. Tijdens de start van de tweede anaërobe fase is een hoeveelheid radioactief glycogeen aanwezig (10%) en daalt in deze fase met meer dan de helft (tot 4%). Glycogeen zou volgens het model van Mino *et al.* de CO_2 leverancier moeten zijn, maar dat werd hier niet bevestigd ($^{14}\text{CO}_2$ toename van 4.5 naar 5.5%). Deze $^{14}\text{CO}_2$ produkties pleiten zowel tegen het model van Comeau als tegen het model van Mino.

Ten tweede blijkt dat radioactief glycogeen gevormd wordt. Het is echter niet duidelijk of glycogeen uit PHB gevormd wordt (via een aantal intermediären) of uit

de pool van de wateroplosbare celfractie.

Ten derde is te zien dat tijdens de aërobe fase het voornaamste deel van de omgezette radioactieve PHB-fractie terug te vinden is in de wateroplosbare celfractie. Onder anaërobe omstandigheden is ook reeds een substantieel deel van de radioactiviteit in deze fase te vinden. Welke verbindingen dat zijn is tot nu toe onbekend.

Wel kan men uit Figuur 15 afleiden dat het F&D-slib een zeer dynamisch systeem bezit. Zodra anaëroob acetaat wordt toegediend wordt zeer snel PHB en andere, wateroplosbare verbindingen gevormd. Zodra er aërobie heerst wordt PHB snel afgebroken en verbindingen 'hopen' zich op in de waterfractie. Deze verbindingen kunnen ook weer snel omgezet worden in PHB nadat de condities weer anaëroob worden.

Dit experiment toont aan dat het model van Comeau *et al.* niet toepasbaar is. Er wordt in de anaërobe fase te weinig $^{14}\text{CO}_2$ gevormd. Het feit dat glycogeen afneemt tijdens de anaërobe fase en toeneemt tijdens de aërobe fase pleit voor het model van Mino *et al.* Echter, er wordt nauwelijks $^{14}\text{CO}_2$ tijdens de tweede anaërobe fase gevormd, terwijl wel radioactief glycogeen wordt afgebroken. Deze lage $^{14}\text{CO}_2$ -productie in de tweede anaërobe fase kan nog wel verklaard worden indien CO_2 -fixatie plaats vindt óf dat het eindproduct van glucose niet acetyl-CoA is maar pyruvaat dat omgezet kan worden in propionaat en vervolgens in PHV. Inderdaad wordt PHV geproduceerd als acetaat aan het slib wordt toegediend, zoals hierboven reeds beschreven is.

Een verklaring voor de lage $^{14}\text{CO}_2$ -productie tijdens de aërobe fase kan niet gegeven worden. Een controle-experiment met niet-gelabeld acetaat toonde aan dat de slib suspensie gedurende de aërobe fase voor 80-90% luchtverzadigd was. Het experiment werd ook uitgevoerd met uniform gelabeld acetaat. Er werd echter niet meer $^{14}\text{CO}_2$ geproduceerd dan met 'single-labelled' acetaat. Smolders (1992) heeft met zijn F&D-slib wel degelijk CO_2 vorming gemeten in zowel de anaërobe als de aërobe fase. Bordacs en Chiesa (1989) namen een lage anaërobe $^{14}\text{CO}_2$ -productie uit opname van ^{14}C -acetaat waar, terwijl aëroob een grote $^{14}\text{CO}_2$ -productie was waar te nemen t.g.v. de omzetting van ^{14}C -PHB.

Concluderend kan worden gezegd dat het radioactieve experiment aantoont dat acetaat voor het overgrote deel in PHB wordt omgezet en dat glycogeen gevormd wordt in de aërobe periode en wordt geconsumeerd tijdens de anaërobe periode. Het is niet duidelijk of glycogeen ontstaat uit acetaat via PHB of via verbindingen die in de wateroplosbare celfractie zitten.

3.3.3 Stoichiometrie

Uit het model van Mino *et al.* (1987) (Figuur 3) kan de theoretische stoichiometrie worden berekend. Voor de vorming van PHB en PHV uit acetaat is per monomeer 1 NADH nodig. Dit wordt geproduceerd uit de degradatie van glycogeen. Eerst wordt glucose gevormd en vervolgens omgezet in acetyl-CoA. Per glucose wordt 3 ATP en 4 NADH geproduceerd, zodat per glucose 4 monomeren HB of HV kunnen worden gevormd. Eén van deze monomeren wordt zelf uit 1 glucose gevormd en de overige 3 monomeren moeten gevormd worden uit 6 acetaat. De omzetting van acetaat naar HB kost de cel energie in de vorm van ATP-equivalenten. Ten eerste wordt acetaat

over het membraan getransporteerd d.m.v. actief transport. Uit het werk van Kleefman en Van Veen (niet gepubliceerde resultaten) is per transport van één acetaat 0.67 tot 1 ATP nodig. Ten tweede volgt een activering van acetaat naar acetylCoA dat 1 ATP kost. In totaal is dus 1.67-2 ATP nodig per acetaat. Dit komt deels uit de glycogeenafbraak en deels uit de afbraak van polyP. De hydrolyse en membraantransport van één fosfaatgroep levert ca. 1.33-1.67 ATP-equivalenten op. Met deze gegevens kunnen de theoretische stoichiometrische coëfficiënten worden uitgerekend (Tabel 4).

Van een drietal identieke experimenten zoals in Figuur 13 weergegeven is een gemiddelde berekend voor de stoichiometrie tussen de belangrijkste componenten tijdens de anaërobe fase (Tabel 4). Uit de radioactieve experimenten kwam naar voren dat ongeveer 80% van de toegevoegde acetaat in PHB werd omgezet. Dit gegeven werd gebruikt om de experimenteel gevonden coëfficiënten te corrigeren. In de laatste kolom van Tabel 4 staan de uiteindelijke experimentele waarden en de conclusie is dat deze niet veel afwijken van de theoretische waarden.

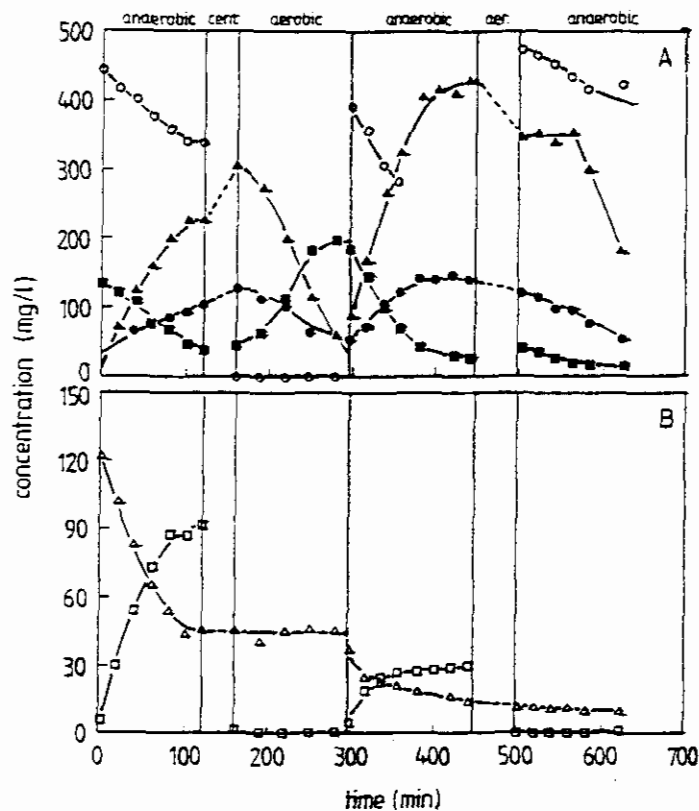
Tabel 4 Stoichiometrie van de anaërobe fosfaatafgifte door F&D-slib met acetaat. De theoretische waarden zijn afgeleid uit het model van Mino *et al.*

| component | theoretisch | experimenteel | |
|----------------------|-------------|---------------|-----|
| | | correctie | |
| acetaat | 6 | 6 | 6 |
| glycogeen | 1 | 0.54 | 0.7 |
| PHA | 4 | 2.8 | 3.5 |
| orthofosfaat | 3-6 | 4 | 4 |
| PHA/glycogeen | 4 | | 3-5 |
| acetaat/orthofosfaat | 1.5-2 | 1.0-1.5 | |

3.3.4 Koppeling tussen anaërobe PHB- en glycogeenmetabolisme en polyP-afbraak

Zolang er gewerkt wordt met actief slib dat rijk is aan polyP-accumulerende organismen, kan men niet voor 100% zeker zijn dat het patroon in Figuur 13 zich daadwerkelijk in één type organisme afspeelt, namelijk een polyP-ophoper. Van een aantal processen kan men reeds aannemen dat die gekoppeld zijn, zoals acetaatopname en fosfaatafgifte. Dit kan o.a. afgeleid worden uit de stoichiometrie: de hoeveelheid fosfaat die wordt uitgescheiden is afhankelijk van de toegediende hoeveelheid acetaat. De produktie van PHB (en PHV) uit acetaat is bewezen met ^{14}C -acetaat. Met het radioactief experiment was het niet eenduidig vast te stellen of er een koppeling bestaat tussen PHB en glycogeen. Dit was te wijten aan de hoge

hoeveelheid radioactiviteit van niet nader bekende componenten uit de wateroplosbare celfractie. Deze was hoog genoeg om alle geproduceerde ^{14}C -gelabelde glycogeen te laten ontstaan. Het is echter niet eenvoudig om de koppeling tussen glycogeenafbraak en PHB-synthese via een directe methode aan te tonen, omdat de hoeveelheid radioactiviteit in de wateroplosbare celfractie aanzienlijk groter is dan in de glycogeenfractie (zie 2^e en 3^e panel van Figuur 15). Vandaar dat er drie alternatieve, indirecte manieren zijn toegepast om de koppeling vast te stellen.



Figuur 16 Het verloop van een aantal componenten tijdens het volledig strippen van polyP uit F&D-slib. A. Acetaat (o), PHB (▲), PHV (•) en glycogeen (■). B. Orthofosfaat (□) en polyP (Δ).

1. Het F&D-slib ontdoen van polyfosfaat

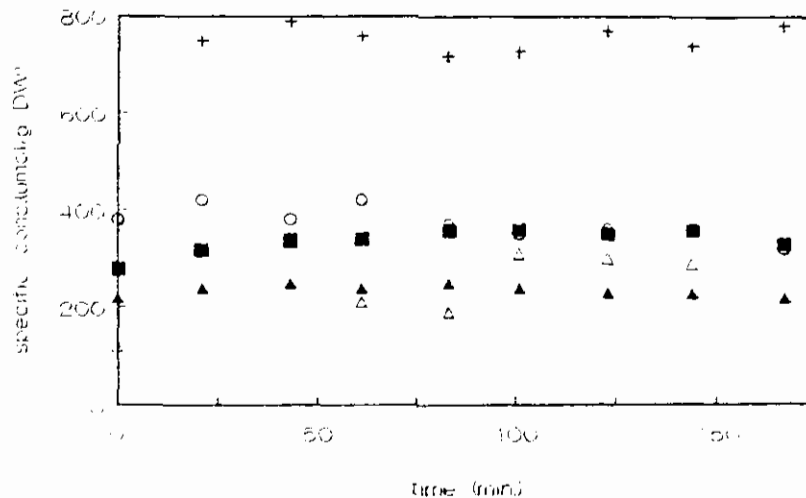
Indien er een koppeling bestaat tussen het koolstofmetabolisme en het fosfaatmetabolisme dan mag verwacht worden dat bij het afwezig zijn van polyP er geen anaëroob koolstof-metabolisme zal plaatsvinden.

Aan anaëroob F&D-slib, verkregen door spuislib gedurende 2 dagen op ijs te verzamelen, werd een overmaat (15 mM acetaat) toegevoegd om zoveel mogelijk polyP af te breken. Na 2 uur nam de toename in de orthofosfaatconcentratie af en kwam nagenoeg tot stilstand, terwijl nog voldoende acetaat (ca. 11.3 mM) aanwezig was (Figuur 16A). Kennelijk was een component limiterend geworden. Het slib werd gewassen en daarna 2 uur onder aërobe condities gebracht zonder orthofosfaat in het medium. De polyP-aanwas bleef dus uit (Figuur 16B), maar de PHB- en PHV-concentraties namen af en dat van glycogeen nam weer toe (Figuur 16A). In een volgende anaërobe fase met overmaat acetaat werd opnieuw fosfaat afgegeven in 2 uur tijd. Bijna alle polyP was nu uit de cellen verdwenen en glycogeen bereikte ook een minimum waarde.

In de laatste anaërobe fase was nauwelijks nog polyP aanwezig en de fosfaatafgifte verwaarloosbaar klein. Toch werd er acetaat opgenomen, maar zowel het PHB- als het PHV-gehalte nam af. Een verklaring hiervoor is niet te geven.

In de eerste anaërobe fase was het glycogeen gehalte gedaald tot ca. 0.85% van het drooggewicht, in de tweede anaërobe fase was dat ca. 0.65% en in de laatste anaërobe fase was de glycogeenconcentratie 0.45%. Het glycogeen werd gemeten in de vorm van glucose (zie Materiaal en Methoden). Biomassa zonder glycogeen heeft van nature glucose-eenheden in de celwand en buitenmembraan. Bij *A. johnsonii* 210A bedroeg dit glucose-gehalte 0.42% van het drooggewicht en komt overeen met de laagste concentratie glucose dat in het slib was gemeten. Hieruit blijkt dat glycogeen in de anaërobe fase dus geheel wordt omgezet. Glycogeen kan dus een limiterende factor zijn in de fosfaatafgifte.

2. Remming van de polyP-afbraak



Figuur 17 Anaërobe fosfaatafgifte-experiment met F&D-slib in aanwezigheid van 0.3 mM stikstofmonoxyde. De volgende concentraties zijn gevolgd: acetaat (+), orthofosfaat (Δ), PHB (■), PHV (▲) en glycogeen (o).

Met dit experiment wordt vooruitgelopen op het effect van NO wat pas hierna

besproken gaat worden (zie 4.4.2.). Door de afbraak van polyP te remmen moet, indien er sprake is van een koppeling tussen acetaatopname en fosfaatafgifte en tussen PHB-synthese en glycogeenafbraak, ook het hele koolstofmetabolisme stil liggen. Toevoeging van 0.3 mM stikstofmonoxyde (NO) aan slibsuspensies remt een enzym dat betrokken is in de polyP-afbraak (zie 4.4.3.).

Met F&D-slib is een anaëroob afgifte-experiment uitgevoerd in aanwezigheid van 0.3 mM NO (Figuur 17). Zoals te verwachten was, werd er nauwelijks orthofosfaat uitgescheiden en acetaat opgenomen. De concentraties van zowel PHB en PHV als van glycogeen veranderden niet. Dit resultaat kan er ook op duiden dat glycogeen een rol speelt bij de defosfatering, tenzij glycogeenafbraak direct gevoelig is voor NO.

3. Berekening m.b.t. de grootte van de niet-polyP-ophopende populaties in het slib

In Tabel 1 is te zien dat ongeveer 85% van de geïsoleerde kolonies uit het F&D-slib polyP-ophopen. Dit wordt ondersteund door tellingen gedaan door Appeldoorn *et al.* (1992). Met andere woorden de overige 15% hopen geen fosfaat op. Wanneer de polymeren PHB, PHV en glycogeen alleen aanwezig zijn in het niet-defosfaterende deel van de populatie dan is de som van de gehalten van deze polymeren veel meer dan 100% (Tabel 5). Bovendien lijkt een glycogeenhalte van ongeveer 65% ook onwaarschijnlijk. Deze berekening laat zien dat het waarschijnlijk is dat de genoemde polymeren in polyP-ophopende organismen aanwezig zijn. Met andere woorden, ook deze gegevens zouden er op kunnen duiden dat polyP-ophopende organismen 3 polymeren bezitten, polyP, PHA en glycogeen, die een functionele relatie bezitten.

Tabel 5 De gemeten concentraties van een aantal polymeren aan het begin (0 min.) en het eind (75 min.) van een anaërobe fosfaatafgifte-experiment met acetaat en F&D-slib en het verschil tussen beide concentraties (Δ). De concentraties zijn uitgedrukt in: A. %DW (gehele drooggewicht); B. % 0.85*DW (alleen de polyP-ophopende populaties); en C. % 0.15*DW (de niet-polyP-ophopende populaties). (Gly= glycogeen).

| Tijd | PHB | PHV | Gly | PHB | PHV | Gly | PHB | PHV | Gly |
|----------|------|-----|-----|-----------|-----|------|-----------|------|------|
| min. | % DW | | | % 0.85*DW | | | % 0.15*DW | | |
| 0 | 2.9 | 2.9 | 9.7 | 3.4 | 3.4 | 11.4 | 19.3 | 19.3 | 64.7 |
| 75 | 9.7 | 5.9 | 5.8 | 11.4 | 6.9 | 6.8 | 64.7 | 39.3 | 38.7 |
| Δ | 6.8 | 3.0 | 3.9 | 8.0 | 3.5 | 4.6 | 45.4 | 20.0 | 26.0 |

De conclusie uit bovenstaande resultaten is dat er een koppeling is tussen fosfaatafgifte en het koolstofmetabolisme onder anaërobe omstandigheden. Hetzelfde geldt voor fosfaatopname en het koolstofmetabolisme onder aërobe omstandigheden. Tijdens de anaërobe fase wordt acetaat actief opgenomen en omgezet naar PHB.

Polyfosfaat fungeert daarbij als energiebron en glycogeen zowel als energiebron als reductiemiddel (Figuur 3). In de aërobe fase is PHB de primaire koolstof- en energiebron voor groei, fosfaatopname en glycogeenvorming.

3.4 Invloed van nitraat en stikstofmonoxyde op de fosfaatafgifte

3.4.1 Afwezigheid van actieve denitrificerende polyP-ophopers

Eén van de verklaringen voor het negatief effect van nitraat op de fosfaatafgifte kan de aanwezigheid van denitrificerende polyfosfaatophopers zijn. In aanwezigheid van nitraat zullen deze organismen denitrificeren en daarbij fosfaat opnemen. De fosfaatafgifteprofiel is dan de resultante van afgifte door niet-denitrificerende polyfosfaatophopers en fosfaatopname door denitrificerende polyfosfaatophopers. Om uitsluitsel te krijgen of in Renpho- en/of F&D-slib actieve denitrificerende polyfosfaatophopers voorkomen zijn de volgende twee experimenten uitgevoerd.

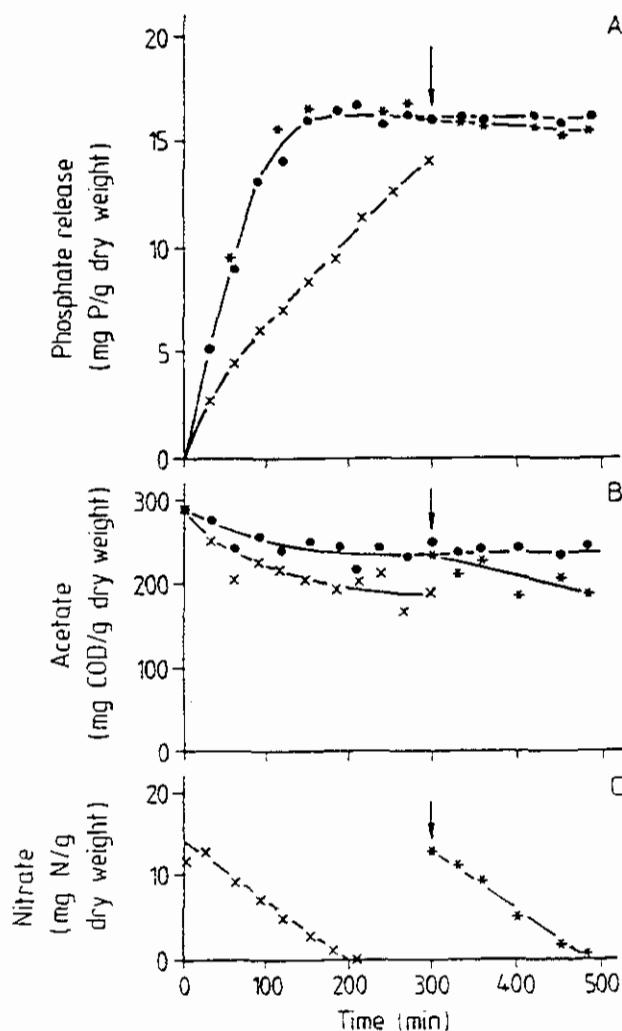
a. Anoxische fosfaatopname in aanwezigheid van overmaat acetaat?

Met vers Renpho-slib zijn drie fosfaatprofielen bepaald in aanwezigheid van overmaat acetaat (15.6 mM): a. zonder nitraat; b. met 3.6 mM nitraat; c. met 3.6 mM nitraat toegevoegd op tijdstip 300 min. In afwezigheid van nitraat was de initiële fosfaat-afgifte $9 \text{ mg P.g DW}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en de afgifte was na 3 uur beëindigd (Figuur 18A). Acetaat werd met een snelheid van ongeveer $20 \text{ mg.g drooggewicht}^{-1}.\text{h}^{-1}$ opgenomen (Figuur 18B). Indien nitraat aanwezig was, verliep de fosfaatafgifte minder snel ($4.5 \text{ mg P.g DW}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Het verschil in beide hellingen kan bijvoorbeeld verklaard worden door aan te nemen dat denitrificerende polyP-ophopers fosfaat opnemen terwijl ze nitraat naar stikstof omzetten. Deze fosfaatopname zou ook moeten plaatsvinden wanneer de fosfaatafgifte reeds is beëindigd. Vandaar dat in één geval na 300 minuten nitraat werd toegevoegd. Het bleek dat slechts een geringe hoeveelheid fosfaat werd opgenomen met een snelheid van $0.2 \text{ mg P.g DW}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figuur 18A). Deze opnamesnelheid is te klein om het verschil in de initiële fosfaatafgiftesnelheden met en zonder nitraat te kunnen verklaren. De fosfaatopname door toevoegen van nitraat op $t=300 \text{ min.}$ was te wijten aan groei van denitrificerende organismen. Dit is theoretisch af te leiden uit de volgende aannamen:

a. voor de synthese van 1 gram biomassa is ongeveer 14 mg P nodig (Appeldoorn et al., 1992);

b. per mol nitraat wordt 32.5 g biomassa gevormd (Stouthamer, 1988).

In Figuur 18B is te zien dat nog ruim voldoende acetaat aanwezig is op tijdstip 300 minuten. De omzetting van 3.6 mM nitraat in het experiment levert maximaal $117 \text{ mg biomassa.l}^{-1}$ op, waarvoor 1.64 mg P.l^{-1} nodig is. In Figuur 18A is te zien dat ongeveer 1.7 mg P.l^{-1} ($0.57 \text{ mg P.g drooggewicht}^{-1}$ en drooggewicht = 3 g.l^{-1}) werd opgenomen. De berekening laat zien dat de oorzaak van de remming van de fosfaatafgifte door nitraat in dit slib niet bij denitrificerende, polyP-ophopende bacteriën ligt.



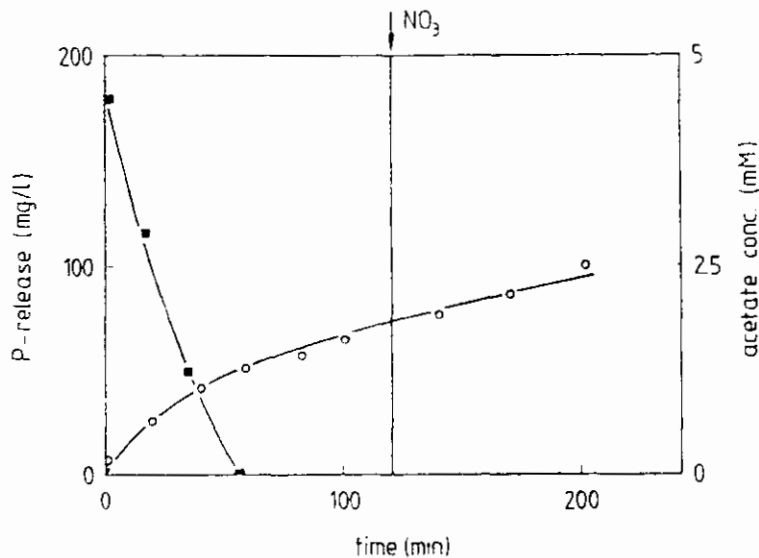
Figuur 18 Fosfaatafgifte en -opname (A), met gelijktijdige acetaatopname (B) en omzetting van nitraat (C) door Renpho-slib (3 g.l^{-1}). Het slib werd geïncubeerd zonder nitraat (\bullet), met 3.6 mM nitraat vanaf de start van het experiment (\times) en met 3.6 mM nitraat na 300 minuten toegevoegd ($*$). De pijl geeft de tijd van het toevoegen van nitraat aan. De resultaten zijn gemiddelden van 3 onafhankelijke incubaties (Appeldoorn, 1993).

b. Anoxische fosfaatopname in afwezigheid van acetaat?

Uit het werk van Kuba *et al.* (1992) blijkt dat Renpho-slib in een F&D-systeem na ongeveer 21 dagen in staat is voor meer dan 99% fosfaat uit het medium op te nemen gedurende de anoxische fase. Nitraat i.p.v. zuurstof fungeert nu als terminale elektronenacceptor, zodat selectie optreedt voor denitrificerende fosfaatophopers. In de anoxische fase is geen extracellulair acetaat meer aanwezig. In het geval dat een externe koolstofbron in de anoxische fase aanwezig is, zal een competitie om nitraat optreden tussen de denitrificerende fosfaatophopers en overige denitrificeerders. Dit kan tot gevolg hebben dat geen fosfaat wordt opgenomen voor polyfosfaatsynthese, maar dat alleen fosfaat voor groei wordt opgenomen, zoals in

voorgaand experiment te zien is (Figuur 18). Vandaar dat dit experiment nogmaals is herhaald, maar nu zonder acetaat in de anoxische fase. Er werd F&D-slib ($3.2 \text{ g drooggewicht.l}^{-1}$) gebruikt welke eerst een anaerobe fase met 4 mM acetaat (Figuur 19) onderging. Nadat de acetaat geheel was opgenomen werd 4 mM nitraat aan de suspensie toegevoegd. Er werd echter geen fosfaat opgenomen wat er op wijst dat dit slib geen of nauwelijks denitrificerende polyP-ophopers bezit.

Weliswaar bevatten beide slibsoorten denitrificerende fosfaatophopers (Tabel 1) maar kennelijk zijn deze onder de toegepaste kweekcondities (korte anaërobe periode en bijna 3 uur aërobie en geen nitraat) niet actief of hun enzymen voor de denitrificatie zijn niet tot expressie gekomen. Van Loosdrecht *et al.* (1992) laten zien dat Renpho-slib dat oorspronkelijk onder anaërobe/aërobe condities was gekweekt, na een aantal cycli onder zuurstofloze omstandigheden en dosering van nitraat een actieve denitrificerende polyfosfaatophopende populatie ontwikkelde.



Figuur 19. Fosfaatafgifte (o) en acetaatopname (■) door F&D-slib (3.2 g.l^{-1}). De anoxische fase werd gestart op tijdstip 120 minuten door toevoegen van 4 mM nitraat.

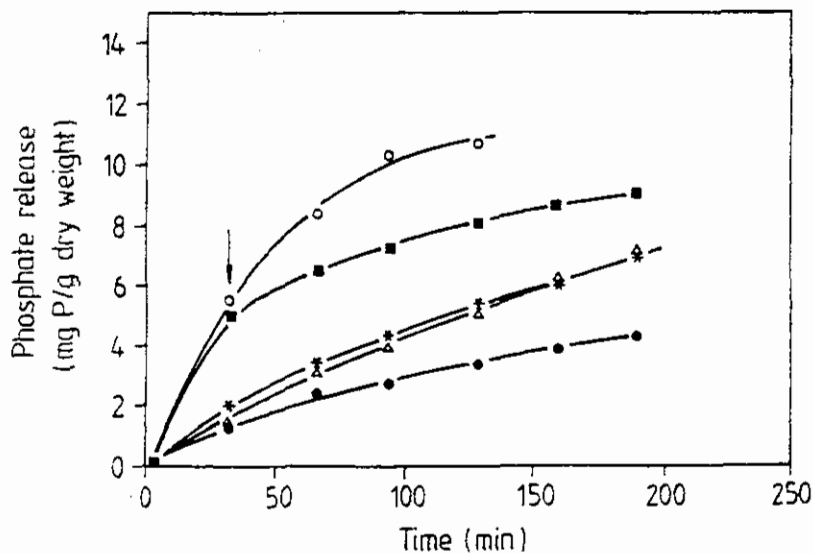
3.4.2 Effect van stikstofmonoxyde op de anaërobe fosfaatafgifte

Het is bekend dat de aanwezigheid van nitraat tot gevolg heeft dat de anaërobe fosfaatafgifte slechter verloopt. Verschillende suggesties zijn geleverd om dit fenomeen te verklaren. Appeldoorn (1990) heeft aangetoond dat een intermediair van de denitrificatie, stikstofmonoxyde (NO), de directe remmer is van de fosfaatafgifte. Op dit gebied zijn aanvullende experimenten verricht die dit ondersteunen (Appeldoorn, 1993). Deze aanvullende experimenten worden hieronder beschreven.

Er werd een aantal fosfaatafgifte-experimenten verricht met vers Renpho-slib met en zonder NO . Het resultaat staat in Figuur 20 weergegeven. NO met een concentratie van 0.3 mM in de waterfase remde de fosfaatafgiftesnelheid met 77%. KCN had vrijwel geen invloed op de fosfaatafgifte, maar bleek de remming door NO

enigszins op te heffen (verschil in helling met en zonder KCN is 28.6%). Toedienen van NO 30 minuten na de start van het experiment bracht onmiddellijk remming van de fosfaatafgifte teweeg. NO ging geen chemische reactie aan met KCN. Dit werd bepaald door NO toe te voegen aan een flesje met basismedium en KCN (5 mM) zonder slib. Dit flesje werd vervolgens bij 25 °C geschud. Van tijd tot tijd werd de NO-concentratie in de gasfase gemeten.

Bij een volgend fosfaatafgifte-experiment, maar nu met 2-3 dagen oud F&D-slib en NO, werd ook de acetaatconcentratie gevolgd. Tevens werd een endogene fosfaat-afgifte gemeten van dit slib (Figuur 21A). NO bleek de door acetaat gestimuleerde fosfaatafgifte bijna geheel te inhiberen (remming: 90-96%), m.a.w. de fosfaatafgifte-snelheid was gelijk aan die van de endogene fosfaatafgifte. Zonder NO was acetaat binnen 50 minuten geheel verdwenen, terwijl nauwelijks acetaat werd opgenomen in aanwezigheid van 0.3 mM NO (Figuur 21B). Kennelijk stagneert NO de acetaatopname. De grootte van het inhibitie-effect van NO op de fosfaatafgifte bleek afhankelijk te zijn van het substraat (Tabel 6). Bijvoorbeeld, de door butyraat gestimuleerde fosfaatafgifte werd in zijn geheel niet gehinderd door NO.



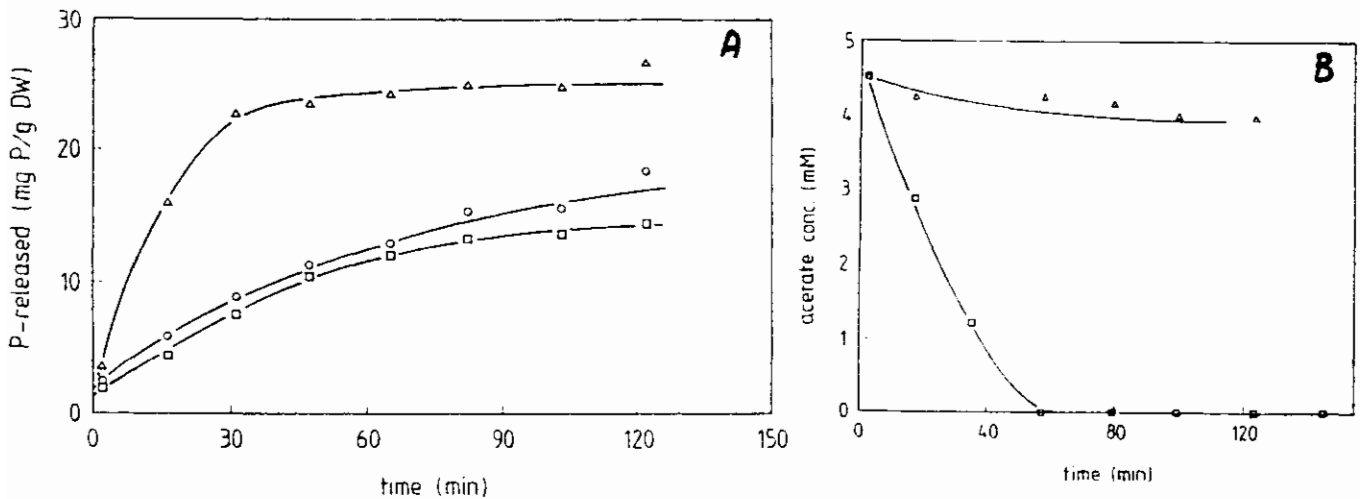
Figuur 20 Fosfaatafgifte door Renpho-slib in de aanwezigheid van 0.3 mM stikstofmonoxyde (NO) (•); 0.3 mM NO plus 5 mM KCN (*) ; 0.3 mM NO en toevoeging van KCN op t= 30 min. (Δ); 5 mM KCN en toevoeging van NO op t=30 min. (■); zonder toevoeging (o). De pijl geeft het moment van toevoegen aan (Appeldoorn, 1993).

Het effect van NO was het sterkst met acetaat. Van Veen en Kleefsman (niet-gepubliceerde resultaten) hebben met *A. johnsonii* 210A aangetoond dat acetaat waarschijnlijk actief wordt opgenomen. Butyraat wordt daarentegen waarschijnlijk passief opgenomen (Kay, 1978). Binnen de cel wordt acetaat omgezet in PHB. Door deze omzetting is energie nodig. Dit kan anaeroob worden geproduceerd door polyP af te breken. De lokatie van de remming door NO moet ergens op deze biochemische routes liggen.

De remming van de fosfaatafgifte door NO, zoals gemeten in gewassen slib en

enzymassays, is niet het gevolg van een pH-effect. Toedienen van NO-concentraties die maximale remming teweeg brengen, leiden tot een pH-daling van slechts enkele hondersten pH-eenheden. NO zou op de volgende manieren de fosfaatafgifte kunnen remmen:

- remming van de polyfosfaatafbraak;
- remming van het fosfaattransport over de celmembraan;
- remming van het acetaattransport over de celmembraan.
- combinaties van a, b en c.



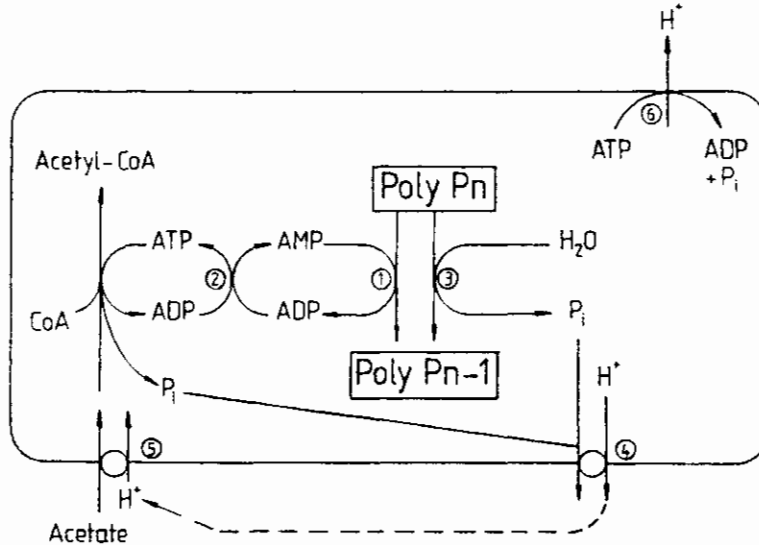
Figuur 21 A. Anaërobie fosfaatafgifte door F&D-slib met acetaat (Δ), acetaat en 0.3 mM NO (o) en zonder toevoeging (endogene fosfaatafgifte) (\square). B. Opname van acetaat in afwezigheid (\square) en aanwezigheid (Δ) van 0.3 mM NO.

Tabel 6 Initiële specifieke fosfaatafgiftesnelheden ($\text{mg P}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g DW}^{-1}$) en bijbehorende initiële specifieke substraatopnamesnelheden ($\mu\text{mol}\cdot\text{g DW}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) met een aantal substraten met en zonder NO. De endogene afgiftesnelheid refereert naar afgifte zonder substraattoevoeging; (n.b. = niet bepaald).

| substraat | initiële P-afgiftesnelheid | | | substraat-opnamesnelheid | |
|-------------------|----------------------------|-------------|----------------|--------------------------|-------|
| | endogeen | + substraat | substraat + NO | -NO | +NO |
| acetaat | 0.19 | 0.88 | 0.22 | 33 | 0-1.3 |
| pyruvaat | 0.10 | 0.41 | 0.15 | 24 | 0 |
| 3-hydroxybutyraat | 0.10 | 0.59 | 0.34 | 16 | 9.8 |
| butyraat | 0.16 | 0.39 | 0.46 | 2.6 | n.b. |
| geen additie | 0.06 | - | 0.07 | - | - |

3.4.3 Effect van NO op enige enzymen

Een aantal enzymen betrokken bij de polyP-afbraak en de activering van acetaat werden op eventuele remming door NO gecontroleerd. In Figuur 22 is in een schema weergegeven bij welke reacties een aantal van deze enzymen betrokken zijn. In Tabel 7 staan de percentages van de remmingen door NO weergegeven. De percentages zijn uit het verschil in enzym-activiteiten in aanwezigheid van NO of zonder NO berekend. Stikstofmonoxyde bleek duidelijk adenylaatkinase en polyfosfaat glucokinase te remmen. Alle enzymen die in de assays zijn gebruikt, zoals hexokinase, glucose-6P-dehydrogenase, lactaatdehydrogenase en pyruvaatkinase werden niet door NO geremd. Het commercieel verkrijgbare adenylaatkinase (EC 2.7.4.3) dat gezuiverd was uit varkens, werd ook geremd door NO, maar de adenylaatkinases van *A. johnsonii* 210A en van een denitrificerende fosfaatophoper (geïsoleerd uit het slib van Kuba, Delft) werden niet geïnhibeerd, zelfs niet bij een NO-concentratie van 1 mM.



Figuur 22 Biochemische route van de polyfosfaatafbraak en de koppeling met de activering van acetaat. 1. PolyP:AMP fosfotransferase; 2. adenylaatkinase; 3. polyfosfatase; 4. fosfaattransport; 5. acetaattransport; 6. ATPase.

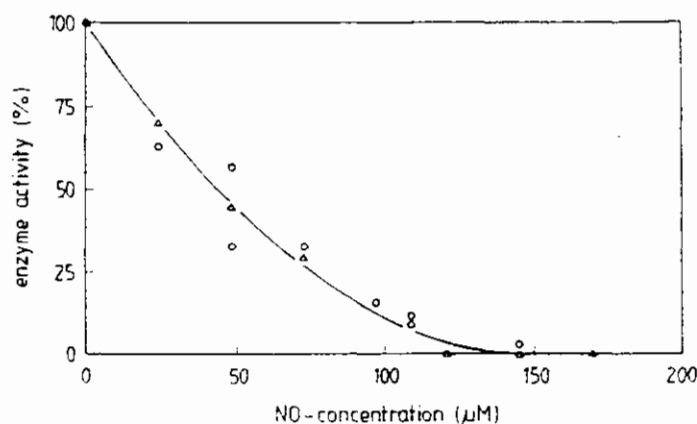
Op grond van de activiteiten (Tabel 7) zal polyfosfaat glucokinase een minder belangrijke rol spelen in de polyfosfaatafbraak dan de combinatie polyP:AMP fosfotransferase en adenylaatkinase. Vandaar dat alleen de remming van adenylaatkinase verder is bestudeerd. Ten eerste werd vastgesteld dat het enzym van zowel het varken als van F&D-slib (in celvrij extract) al voor 50% geremd werd door 44 μM NO (= K_i), en 100% remming trad op bij ongeveer 150 μM NO (Figuur 23). Ten tweede werd het type remming door NO vastgesteld door bij enkele NO-concentraties de activiteiten van adenylaatkinase te meten bij verschillende ADP-concentraties. In Figuur 24 is de Lineweaver-Burke plot weergegeven, waaruit opgemaakt kan worden dat het om een non-competitieve remming gaat. Dit betekent dat de affiniteitsconstante (K_m) niet, maar de maximale omzettingssnelheid (V_{max}) wel wordt beïnvloed door NO.

Tabel 7 Specifieke activiteiten van een aantal enzymen in celvrij extract van vers F&D-slib en hun remming door 0.5 mM NO op een aantal enzymen; (n.b. = niet bepaald).

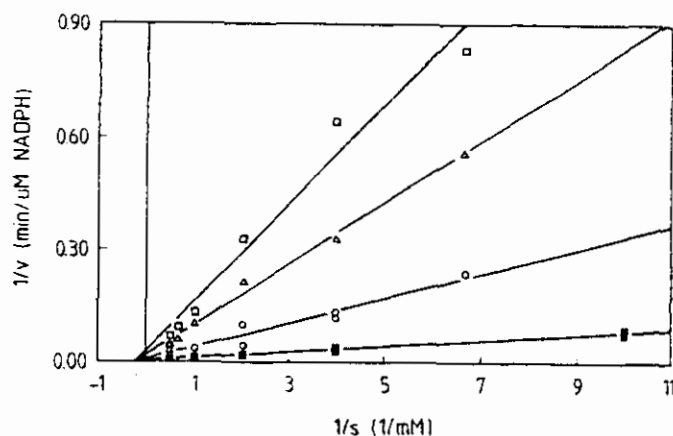
| enzym | specifieke activiteit nmol.min ⁻¹ .mg eiwit ⁻¹ | inhibitie door NO (%) |
|-----------------------------|---|-----------------------------|
| polyP :AMP fosfotransferase | 730 | 0 |
| adenylaatkinase | 2376 | 50-75 |
| polyP glucokinase | 61 | 100 |
| polyfosfatase | 210 | n.b. |
| acetaatkinase | 59 | 0 |

In een later experiment is ook de gevoeligheid van adenylaatkinase in celvrij extract van F&D-slib voor NO getoetst. Dit adenylaatkinase bleek even gevoelig voor NO als varkensadenylaatkinase (Figuur 23). Het verschil tussen intacte cellen en celvrij extract met betrekking tot de gevoeligheid van adenylaatkinase voor NO (0.3 mM versus 0.15 mM) berust waarschijnlijk op binding van NO aan celwandbestanddelen.

Hoewel het effect van NO op de fosfaatafgifte nu tot op het moleculaire niveau bekend is, kon helaas de vorming van NO uit nitraat onder normale anaërobe condities niet gemeten worden vanwege het ontbreken van de gevoelige NO-elektrode die hiervoor vereist is. Een gevolg hiervan was dat ook niet bepaald kon worden onder welke omstandigheden er wel accumulatie van NO plaatsvond en onder welke niet. Ophoping van NO tijdens denitrificatie is waargenomen bij *Alcaligenes*, *Flavobacterium* en *Pseudomonas* stammen (Betlach en Tiedje, 1981). Het lijkt dus een algemeen verschijnsel te zijn in bacteriën.



Figuur 23 De remming van varkens adenylyl kinase (o) en adenylyl kinase in celvrij extract van F&D-slib (Δ) door NO.

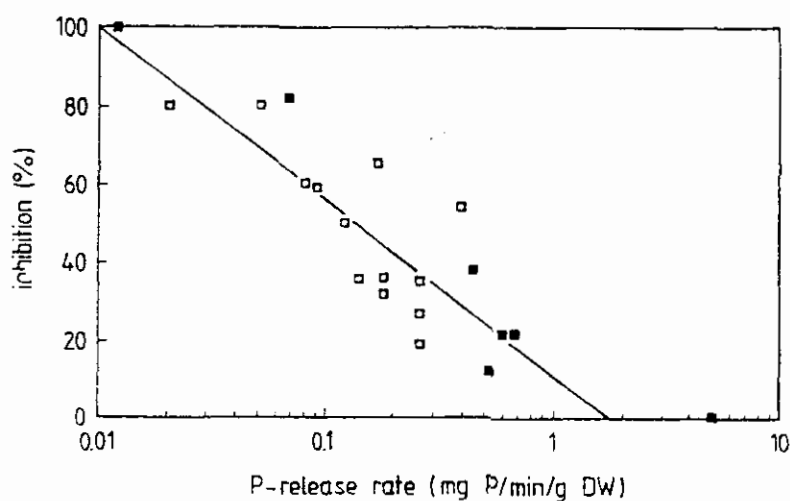


Figuur 24 Lineweaver-Burke plot van commercieel verkrijgbaar varkens adenylaat-kinase bij diverse inhibitorconcentraties ter bepaling van het type remming door NO. (□) 135 μM NO, (Δ) 120 μM NO, (o) 50 μM NO en (■) 0 μM NO.

3.4.4 Effect van nitraat op de anaërobe fosfaatafgifte

1. Remming door aanwezigheid van nitraat afhankelijk van fosfaatafgiftesnelheid

Er zijn een groot aantal fosfaatafgifte-experimenten uitgevoerd in aan- en afwezigheid van nitraat. Daarbij is gebruik gemaakt van F&D-slib (zowel in steady state situaties als van F&D-slib dat in ontwikkeling was) en Renpho-slib. Daarnaast werden verschillende substraten toegediend. Ook zijn gegevens gebruikt van ander onderzoek (De Vries & Rensink, 1985; Appeldoorn, 1990). De remming van de fosfaatafgifte door 4.0 mM nitraat is groter naarmate de grootte van de afgiftesnelheid lager is (Figuur 25). Bij snelheden boven 1.1 mg P.min⁻¹.g DW⁻¹ was geen sprake meer van enige remming.



Figuur 25 Het remmingseffect door nitraat als functie van de initiële specifieke fosfaatafgiftesnelheid. F&D-slib (■); Renpho-slib (□).

2. Een ander remmend effect van nitraat op de fosfaatafgifte?

In Figuur 25 is te zien dat bij hoge fosfaatafgiftesnelheden bijna of geen invloed van nitraat te merken is. Deze snelheden worden vooral teweeggebracht door acetaat of propionaat (zie Tabel 3). In sectie 4.4.3. is vastgesteld dat juist de fosfaatafgifte die gestimuleerd wordt door acetaat, geremd wordt door NO. Het effect van zowel nitraat als stikstofmonoxyde werd vergeleken bij de aanwezigheid van twee substraten, te weten acetaat en butyraat. Het bleek dat NO geen, maar nitraat wel een effect had bij butyraat (zie ook Tabel 6). In Tabel 8 zijn deze bevindingen bij elkaar gezet. Er is voornamelijk gebruik gemaakt van surplus F&D-slib dat gedurende 2-3 dagen op ijs was verzameld. Uit experimenten met dit 'oude' slib kwam naar voren dat nitraat ook de endogene fosfaatafgifte in grote mate inhibeert, terwijl dit effect niet met vers slib was waar te nemen (Tabel 8).

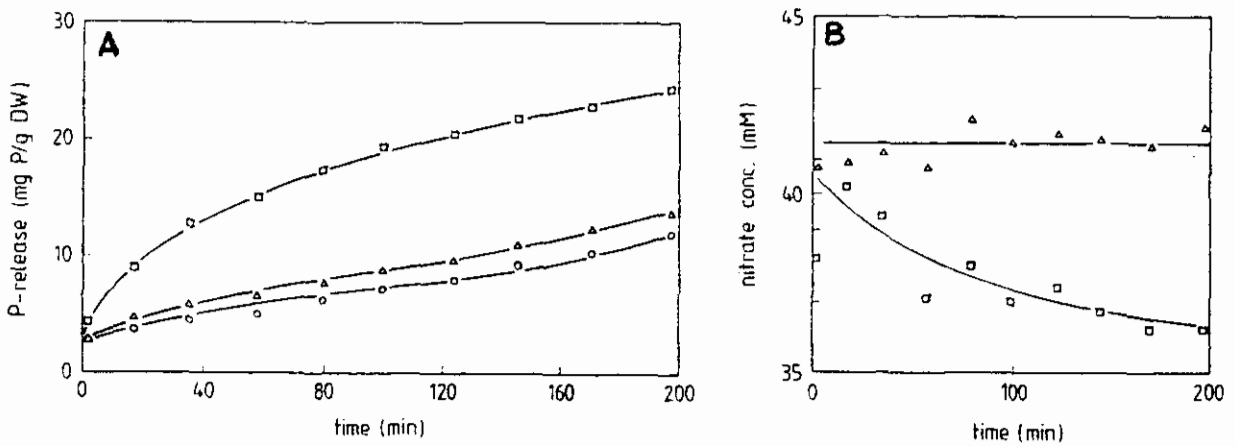
Eén van de verschillen tussen het 'oude' en vers slib is dat het 'oude' een ca. tienmaal hogere endogene fosfaatafgiftesnelheid heeft. Dit kan wellicht veroorzaakt worden door produktie van vetzuren uit de fermentatie van complexere organische verbindingen die vrijkomen uit bijvoorbeeld cellysis. Verder kan het zijn dat bepaalde energiereserves van de polyP-ophopende organismen uitgeput raken waardoor nu meer polyP moet worden aangesproken om de energie-status van de cel te handhaven.

Om het effect van nitraat op het 'oude' slib te kunnen verklaren werden verschillende experimenten uitgevoerd. Het uitschakelen van de denitrificatie met 5 mM azide bleek het effect van nitraat niet op te heffen (Figuur 26). Hieruit kan worden geconcludeerd dat het om het molecuul NO_3^- zelf moet gaan. Deze conclusie wordt versterkt door de resultaten uit fosfaatafgifte-experimenten in aanwezigheid van diverse anionen (Figuur 27). Dit experiment liet zien dat de remming specifiek door nitraat wordt veroorzaakt en dat het niet door een zouteffect wordt veroorzaakt.

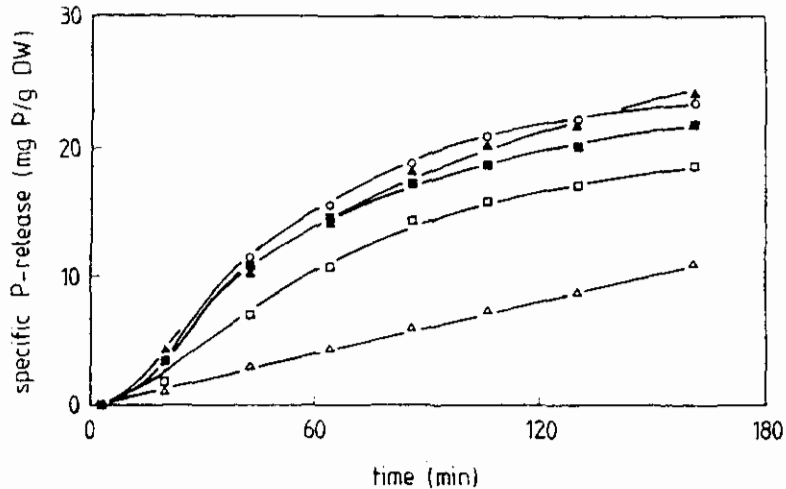
Tabel 8 Inhibitie van anaërobe fosfaatafgifte door F&D-slib in de aanwezigheid van nitraat (4 mM) of NO (0.3 mM) bij verschillende substraten.

| slibconditie | substraat | inhibitie (%) | |
|-----------------------------|-----------|---------------|-----------------|
| | | NO | NO_3^- |
| 2-3 dagen op ijs bewaard | acetaat | 96 | 0-20 |
| | butyraat | 0 | 54 |
| | endogeen | 0 | 84 |
| vers | endogeen | 0 | 0 |

Dit nitraateffect is niet verder bestudeerd. Verder onderzoek moet vaststellen of nitraat eventueel het fosfaattransport over het membraan remt, óf dat het passief transport van vetzuren remt, óf dat nitraat een andere polyP-afbraakroute remt, bv. via polyfosfatase.



Figuur 26 A. Remming van de endogene fosfaatafgifte van 2 dagen oud F&D-slib door nitraat (4 mM) met (o) en zonder (Δ) azide (5 mM); zonder nitraat (□). B. Verloop van de nitraatconcentratie met (Δ) en zonder (□) azide.



Figuur 27 Endogene fosfaatafgifte door 2-3 dagen op ijs verzameld F&D-slib met diverse zouten (4 mM). NO_3^- (Δ), NO_2^- (▲), Cl^- (■), SO_4^{2-} (○) en zonder toevoeging (□).

Concluderend kan worden opgemerkt dat in slib zonder actieve denitrificerende polyP-ophopers, nitraat vooral een remmend effect vertoont indien de fosfaatafgiftesnelheid laag is. Hoe beter het slib fosfaat afgeeft hoe minder het geremd wordt door nitraat. Een eenduidige verklaring is hiervoor nog niet te geven, hoewel één effect van nitraat toegeschreven zou kunnen worden aan de productie van NO uit nitraat.

3.5 Effect van glucose-oxydatie tot gluconzuur op het fosfaatgehalte van *Acinetobacter johnsonii* 210A

3.5.1 Inleiding

In koolstof- en energie-gelimiteerde continu culturen bedraagt het gemiddelde fosforgehalte in *Acinetobacter johnsonii* 210A ongeveer 5% van het drooggewicht. Voor de polyP-synthese is energie nodig en een energielimitatie kan een reden zijn dat het fosfaatgehalte laag blijft. Het doel van dit onderzoek was te bepalen of het fosfaatgehalte verhoogd kan worden door aan de cultuur een extra energiebron toe te voegen in de vorm van glucose.

A. johnsonii 210A is in staat om glucose slechts tot gluconzuur te oxyderen. Beide verbindingen worden niet als koolstofbron gebruikt. Deze oxydatie is reeds uitgebreid bestudeerd met *A. calcoaceticus* (van Schie, 1987; Noorman, 1991) en leidt bij dit organisme tot een verhoging van de biomassa opbrengst. Glucose wordt geoxydeerd m.b.v. glucosedehydrogenase (GDH) en heeft pyrroloquinoline quinone (PQQ) als coenzym. Het enzym bevindt zich aan de periplasmische zijde van het celmembraan. Het coenzym PQQ kan niet door stam 210A worden gesynthetiseerd en dient dan ook aan het medium te worden toegevoegd (100 nM). De vraag die nu gesteld kan worden is in hoeverre *A. johnsonii* 210A de energie uit de glucose-oxydatie kan benutten voor de polyP-synthese.

3.5.2 Kinetiek van glucosedehydrogenase

De specifieke activiteit van GDH van cellen gekweekt in aan- en afwezigheid van glucose en PQQ is gemeten m.b.v. de BOM. Culturen die gekweekt zijn zonder PQQ vertonen alleen glucose-oxydatie indien PQQ aan het BOM-vaatje wordt toegevoegd (Tabel 9). Reconstitutie van het GDH-enzym wordt sterk gestimuleerd door Ca^{2+} -ionen. Toedienen van supernatant zonder glucose en acetaat levert hetzelfde resultaat. Het coenzym PQQ bracht geen stimulatie teweeg van de apoenzymsynthese. Het bleek namelijk dat celsuspensies, waaraan PQQ was toegevoegd, na 4 uur in afwezigheid of aanwezigheid van chloramphenicol geen verschil gaf te zien in glucose oxydatie-activiteiten. Gewassen cellen van culturen gekweekt in aanwezigheid van glucose en PQQ vertoonden steeds dezelfde activiteit, ongeacht de glucoseconcentratie in de voeding: $156 \mu\text{mol glucose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g DW}^{-1}$. Deze activiteit is hoog genoeg om maximaal 20-22 mM glucose te oxyderen. Niet gewassen monsters, direct uit de chemostaat, bleken wel de gewenste maximale glucose-oxydatie-activiteit te bezitten voor de condities waaronder gekweekt was (zie voorbeeld in Tabel 9). Dit verschil is misschien te wijten aan de wasprocedure van de cellen, waardoor activiteit verloren gaat, bijvoorbeeld doordat een gedeelte van het GDH uit het periplasma de buffer in verdwijnt. Een andere reden kan zijn dat de culturen minstens een lage acetaatconcentratie nodig hebben (zoals in de chemostaat) om de glucose-oxydase-activiteit op een hoog peil te houden. De hoogste activiteit werd gemeten in de chemostaat met een cultuur op 100 mM glucose en bedroeg $368 \mu\text{mol glucose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g DW}^{-1}$. Dit betekent dat, onder de condities zoals was aangelegd, maximaal 55 mM glucose kon worden geoxydeerd.

De K_s voor glucose zoals gemeten in de BOM, was onder de geteste condities 1.8 mM. Deze waarde is in dezelfde orde van grootte als gevonden voor *A. calcoaceticus* (3 mM, Dokter *et al.*, 1987).

Tabel 9 De specifieke activiteit van glucosedehydrogenase ($\mu\text{mol glucose}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g DW}^{-1}$) in cellen van *A. johnsonii* 210A gekweekt in continu culturen (zonder PQQ: geen PQQ aan celsuspensie in de BOM toegevoegd; met PQQ: PQQ minstens 5 minuten van te voren toegevoegd).

| Groei conditie | Voorbehandeling | GDH-activiteit | |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | | zonder additie PQQ | met additie PQQ |
| acetaat | gewassen | 0 | 60 |
| acetaat | gewassen + CaCl_2 (2 mM) | 0 | 164 |
| acetaat | gewassen + supernatant | 0 | 177 |
| acetaat + PQQ + 30 mM glucose | gewassen | 156 | 156 |
| acetaat + PQQ + 30 mM glucose | niet gewassen | 240 ¹⁾ | - |

¹⁾ Hierbij was aangenomen dat de endogene respiratie identiek was aan dat van de gewassen cellen die in aanwezigheid van PQQ en 30 mM glucose waren gekweekt.

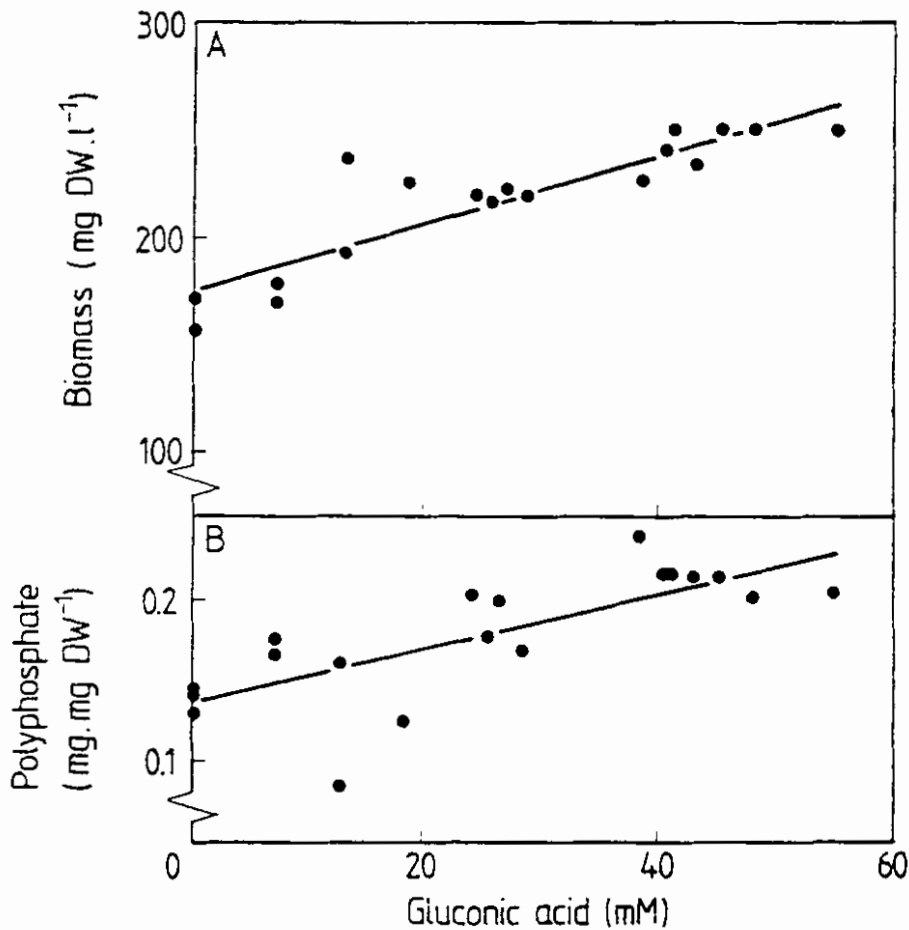
3.5.3 Continu culturen

Van de ingaande glucoseconcentratie kon 95-99% worden teruggevonden in de cultuurvloeistof in de vorm van glucose en gluconzuur, m.a.w. deze verbindingen werden niet door de cellen opgenomen. Acetaat was ten alle tijden niet detecteerbaar in de cultuurvloeistof.

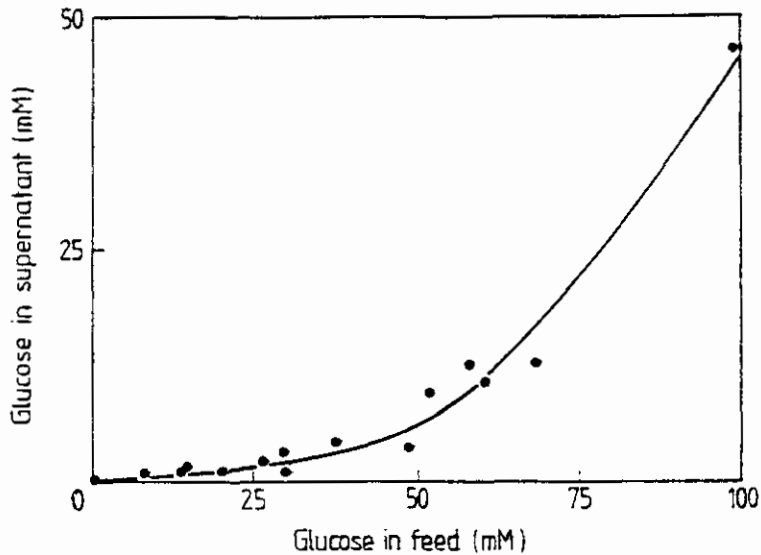
Glucose-oxydatie leidde tot zowel een toename in de biomassa als in de polyP-concentratie in de cel. In Figuur 28 is de biomassa- en polyP-concentratie uitgezet tegen de hoeveelheid glucose die is geoxydeerd. De maximale toename van beide lag bij de oxydatie van 55 mM glucose. De biomassa nam in dat geval toe van 172 naar 250 $\text{mg DW}\cdot\text{l}^{-1}$ en de polyP-concentratie van 0.13 naar 0.24 $\text{mg poly-P}\cdot\text{mg DW}^{-1}$. Dit laatste correspondeert met een toename van fosfor (in de vorm van polyP) in de cel van 3.4 tot 5.7% van het totale drooggewicht. Deze waarden zijn reeds gecorrigeerd voor het organisch gebonden fosfor in de bacteriële biomassa (1.5% van totale drooggewicht, welke constant werd verondersteld onder alle condities). De toename van de biomassa en polyP-concentratie was lineair met de hoeveelheid glucose die werd geoxydeerd. Naar gelang de concentratie van glucose in de voeding toenam, was er ook een toename in de glucoseconcentratie in de cultuur waar te nemen. Uit de massabalansvergelijkingen voor biomassa, acetaat en glucose toegepast op steady state condities, bleek dat dit te wijten was aan de maximale specifieke

glucose-oxydatiecapaciteit, welke lager was dan voor *A. calcoaceticus* was gevonden onder dezelfde condities (Van Schie, 1987), en slechts ten dele aan de relatief lage affiniteit voor glucose ($K_s = 1.8$ mM). In Figuur 29 zijn de gemeten glucoseconcentraties weergegeven. De lijn door de punten is verkregen aan de hand van de steady state vergelijkingen.

Het eiwitgehalte van de cel bij verschillende glucoseconcentraties bleef constant op $52.0 \pm 2.5\%$ van het drooggewicht zonder polyP. Uit de elementanalyse bleek de compositie van de biomassa van *A. johnsonii* 210A te zijn: $\text{CH}_{1.66}\text{O}_{0.51}\text{N}_{0.25}\text{P}_{0.013}$.



Figuur 28 Het verloop van A. de biomassaconcentratie van *Acinetobacter johnsonii* 210A zonder polyP en B. de hoeveelheid polyP in de biomassa bij toenemend hoeveelheden geoxydeerd glucose. De bacterie werd gekweekt onder acetaat gelimiteerde condities in continu cultuur.



Figuur 29 De glucoseconcentratie die in de cultuurvloeistof achterbleef als functie van de glucoseconcentratie in de voeding. De punten zijn experimenteel gemeten en de lijn is bepaald uit steady state vergelijkingen.

3.5.4 Berekening van de stoichiometrische coëfficiënten

Onder de steady state condities kan men stellen dat de conversiesnelheden van acetaat, r_A , en glucose, r_G , uitgedrukt kunnen worden als het product van de verdunningssnelheid en het verschil tussen mediumconcentratie, $C_{l,0}$ en de concentratie in de fermenter, C_i :

$$-r_A = D*(C_A - C_{A,0}) \quad (1)$$

en

$$-r_G = D*(C_G - C_{G,0}) \quad (2)$$

De biomassa- en polyP-conversiesnelheden, respectievelijk r_X en r_P , zijn op dezelfde wijze te formuleren:

$$r_X = \mu*C_X = D*C_X \quad (3)$$

en

$$r_P = D*C_{PX} \quad (4)$$

met C_{PX} = de concentratie aan polyP in de biomassa. De conversiesnelheden zijn positief voor productie en negatief voor consumptie. De interne reacties die hier een rol spelen zijn acetaatdissimilatie en -assimilatie, polyP-vorming, biomassavorming en glucose-oxydatie. De conversiesnelheden zijn aan elkaar gerelateerd met een lineaire vergelijking met coëfficiënten bestaande uit macroscopische opbrengst en onderhoudsparameters. De acetaatconversiesnelheid is een lineaire 'Pirt-achtige' functie van de biomassa-productiesnelheid, de polyP-productiesnelheid, de glucose-oxydatiesnelheid en de onderhoudsenergiebenodigdheden (Roels, 1983), volgens de

vergelijking:

$$-r_A = r_X/Y_{SX} + r_P/Y_{SP} - r_G/Y_{SG} + m_s * C_X \quad (5)$$

De macroscopische opbrengstparameters Y_{SX} , Y_{SP} , en Y_{SG} zijn expressies voor respectievelijk biomassa-opbrengst op acetaat, polyP-opbrengst en een energie-equivalentie ratio tussen glucose en acetaat. Deze parameters worden als constanten beschouwd. In het onderzoek is slechts 1 verdunningssnelheid ($\mu = 0.103 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$) gebruikt, vandaar dat de onderhoudsparameter, m_s , niet onafhankelijk van de biomassa-opbrengst berekend kan worden. Vergelijking (5) veranderd dan in:

$$-r_A/C_X = (\mu/Y_{SX} + m_s) + r_P/(Y_{SP} * C_X) - r_G/(Y_{SG} * C_X) \quad (6)$$

Een data set van 11 steady states en de lineaire vergelijking (6) werden gebruikt in een lineaire regressie procedure om de parameterwaarden te schatten.

Tabel 10 Waarden (C-mol.C-mol^{-1}), met standaarddeviaties, van de macroscopische opbrengst coëfficiënten, welke verkregen zijn uit de lineaire regressie-procedure. De waarden worden vergeleken met resultaten van anderen.

| Coëfficiënt | Deze studie | Andere studie | organisme |
|-------------|------------------|----------------------|-------------------------------|
| Y_{sx} | 0.62 ± 0.16 | $0.49 \pm 0.05^{1)}$ | <i>A. johnsonii</i> stam 210A |
| Y_{sp} | 0.06 ± 0.03 | $0.13 \pm 0.05^{1)}$ | <i>A. johnsonii</i> stam 210A |
| Y_{sg} | 23.47 ± 4.13 | $20.0 \pm 8.0^{2)}$ | <i>A. calcoaceticus</i> |

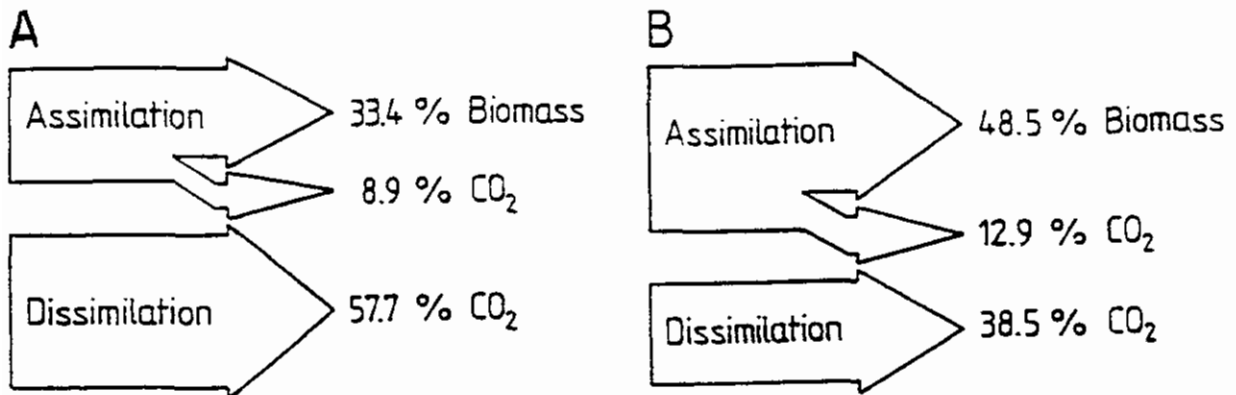
¹⁾ Smolders, 1991

²⁾ Noorman, 1991

De volgende waarden zijn gevonden voor de parameters m.b.v. de fitprocedure: $(\mu/Y_{sx} + m_s) = 0.25 \pm 0.05 \text{ [C-mol.C-mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$; $1/Y_{sp} = 16.1 \pm 8.6 \text{ [C-mol.P-mol}^{-1}]$ en $1/Y_{sg} = 0.043 \pm 0.008 \text{ [C-mol.C-mol}^{-1}]$. In Tabel 10 staan de waarden van de parameters weergegeven. De coëfficiënt Y_{sx} kon worden berekend door een waarde voor m_s te nemen, $0.09 \pm 0.04 \text{ C-mol.C-mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, zoals die door Smolders (1991) is gevonden voor hetzelfde organisme. Er is een grote deviatie in Y_{sp} , wat waarschijnlijk wordt veroorzaakt door de relatief lage produktiesnelheid van polyP t.o.v. de overige conversiesnelheden.

3.5.5 Conclusies

Maximale glucose-oxydatie in acetaat-gelimiteerde continu culturen van *A. johnsonii* 210A bij een verdunningsnelheid 0.1 h^{-1} leidde tot een verhoging van de celopbrengst van ongeveer 45% en een verhoging in het polyP-gehalte van ongeveer 85%. Zonder glucose werd 42% van de acetaat in de voeding geassimileerd (Figuur 30). Van deze geassimileerde acetaat ontwijkt 21% als CO_2 (Gommers *et al.*, 1988). Glucose-oxydatie naar gluconzuur voorziet de cel van additionele energie en kan als zodanig een deel van de acetaat voor dissimilatie vervangen. Daaruit volgt dat meer acetaat geassimileerd kan worden. Bij maximale glucose-oxydatie (55 mM , $D = 0.1 \text{ h}^{-1}$) werd ongeveer 62% van de acetaat geassimileerd. Theoretisch kan 100% acetaat worden geassimileerd (inclusief de 21% biosynthetische CO_2), waarbij glucose-oxydatie de enige energiebron is, maar *A. johnsonii* 210A bleek slechts een beperkte glucose-oxydatiecapaciteit te bezitten. De hoeveelheid energie nodig voor de polyP-vorming was in deze berekeningen niet meegenomen omdat de energiekosten voor de synthese van dit polymeer niet bekend zijn. De waarde voor Y_{SG} , zoals in Tabel 2 is weergegeven, betekent dat de energieproductie uit de oxydatie van 7.8 mol glucose tot gluconzuur equivalent is met de volledige oxydatie van 1 mol acetaat. De energie uit de glucose-oxydatie wordt voor ongeveer 83% gebruikt voor biomassavorming en slechts 17% voor polyP-synthese. De hoeveelheid energie die nodig is voor polyP-synthese uit extern orthofosfaat in termen van molen glucose of molen acetaat kan beter bepaald worden bij fosfaatdeficiënte cellen die een gederepresseerd primair transportsysteem voor fosfaat bezitten (Bonting *et al.*, 1992; van Veen *et al.*, 1993). Dit gaat waarschijnlijk ook gepaard met een verhoogde synthese van de polyP-synthese enzymen.



Figuur 30 Schema van de invloed van glucose als een extra energiebron op de assimilatieve en dissimilatieve omzetting van acetaat onder substraat gelimiteerde condities. A. situatie zonder glucose; B. situatie onder maximale glucose oxydatie.

3.5.6 Lijst van symbolen

| | | |
|------------|-------------------------------------|---|
| C_i | concentratie van component i | C-mol.l ⁻¹ |
| $C_{i,0}$ | concentratie in influent | C-mol.l ⁻¹ |
| D | verdunningsnelheid | h ⁻¹ |
| m_s | onderhoudsenergie | C-mol.C-mol ⁻¹ .h ⁻¹ |
| r_i | netto conversiesnelheid | C-mol.l ⁻¹ .h ⁻¹ |
| $Y_{i,j}$ | macroscopische opbrengstcoëfficiënt | C-mol.C-mol ⁻¹ of P-mol.C-mol ⁻¹ |
| μ | groeisnelheid | h ⁻¹ |
| subscripts | | |
| A | acetaat | |
| G | glucose | |
| P | fosfaat | |
| X | biomassa | |

4. Relevantie van het uitgevoerde onderzoek voor de praktijk

Dit onderzoek is een voortzetting van het werk van Appeldoorn (1990, 1993). Appeldoorn had het F&D-systeem ontwikkeld voor ons lab waardoor biologische defosfatering op laboratoriumschaal onder gedefinieerde omstandigheden kon worden bestudeerd. Zijn onderzoek bestond o.a. uit het optimaliseren van het defosfateringproces. Een aantal vragen met betrekking tot de fysiologie van de polyP-accumulerende populatie in het slib, kwamen uit dit en ander onderzoek naar voren, en zijn getracht in dit onderzoek te beantwoorden.

Voor de anaërobe fosfaatafgifte is de pH een belangrijke factor. In de meeste praktijkinstallaties ligt de pH rond 7. Bij deze waarde wordt reeds een goede fosfaat-afgiftesnelheid bereikt, maar bij hogere pH verloopt de afgifte beter. Onder pH 7 neemt de afgiftesnelheid af. Bij pH 6 ligt de snelheid al een factor 3-4 lager dan bij pH 7. In een strippertank is het daarom beter om natriumacetaat (azijnzuur met natronloog) dan azijnzuur te doseren.

Reeds lang is bekend dat eenvoudige vetzuren een positief effect hebben op de P-afgifte. Met acetaat worden de beste resultaten verkregen (zie o.a. Rensink *et al.*, 1979). Dit onderzoek heeft aangetoond dat acetaat actief wordt opgenomen door de polyP-ophopende bacteriën en voornamelijk wordt omgezet in PHB. Hierbij is glycogeen nodig voor reductie-equivalenten en polyP als energieleverancier. Aëroob wordt PHB door deze organismen gebruikt om te kunnen groeien en fosfaat op te nemen. Het is dus van belang dat de drie bovengenoemde polymeren in voldoende mate aanwezig zijn in de organismen om tot een goede defosfatering te komen. In plaats van acetaat kan ook propionaat worden gebruikt omdat dit zuur door hetzelfde transportsysteem als dat van acetaat wordt opgenomen bij gelijkblijvende stoichiometrie. Het nadeel is echter dat propionaat meer koolstof bevat (introductie van onnodig COD is ongewenst in afvalwatersystemen). Een aantal verbindingen wordt slechts passief opgenomen of moet eerst gefermenteerd worden tot kleinere verbindingen. Deze processen zijn vaak de snelheidsbepalende stappen in de P-afgifte. Een gevolg hiervan is dat competitie zal optreden met andere organismen voor deze fermentatieproducten.

Een ander lang bekend verschijnsel is de negatieve invloed van de aanwezigheid van nitraat op de anaërobe P-afgifte. Door het feit dat in veel gevallen in de praktijk fosfor en stikstof simultaan verwijderd wordt is het onvermijdelijk dat nitraat aanwezig is. Het is mogelijk de P-afgifte en de denitrificatie-zone (respectievelijk anaërobe en anoxische zone) van elkaar te scheiden. In dit onderzoek kwam naar voren dat de P-afgifte minder last heeft van nitraat naarmate de P-afgiftesnelheid hoger ligt. Een hogere snelheid is te verwezenlijken door acetaat in de anaërobe fase te introduceren en/of de procescondities zo gunstig mogelijk af te stemmen voor de polyP-accumulerende populatie. Appeldoorn (1990, 1993) heeft vastgesteld dat de remming van de P-afgifte door de aanwezigheid van nitraat veroorzaakt kan worden door stikstofmonoxyde (NO), een intermediair van de denitrificatie. De overige suggesties die in de literatuur gegeven zijn met betrekking tot nitraat, dragen niet of in mindere mate bij aan het negatieve effect van nitraat. In dit onderzoek werd aangetoond dat NO een effectieve, reversibele remmer is van adenylaatkinase afkomstig uit F&D-slib. Dit enzym is betrokken bij de afbraak van polyP. Er kan in aanwezigheid van NO geen of veel minder ATP worden gevormd.

Dit heeft tot gevolg dat geen acetaat opgenomen kan worden. De PHB-synthese ligt stil wat nadelige gevolgen heeft voor de groei van de polyP-accumuleerders en dus voor de ontwikkeling van een populatie van dergelijke organismen in het slib. Renpho- en F&D-slib bezaten slechts een gering percentage denitrificerende, polyP-ophopende bacteriën. Volgens nog niet gepubliceerde gegevens is ongeveer 80% van alle slibsoorten die biologisch defosfateren in staat om snel fosfaat op te nemen onder anaërobe condities in de aanwezigheid van nitraat zonder extracellulaire elektronendonor.

Verder kwam uit de isolaties van organismen uit beide slibsoorten naar voren dat voor een goede defosfatering waarschijnlijk geen *Acinetobacter* species vereist zijn. In Renpho-slib bleken de meeste polyP-ophopende organismen te behoren tot het geslacht *Acinetobacter*. In het F&D-slib, dat voor meer dan 80% uit polyP-accumulerende organismen bestaat, waren nauwelijks *Acinetobacter* species aanwezig. Dit komt overeen met ander onderzoek (Hiraishi *et al.*, 1989; Auling *et al.*, 1991): slib met een groot defosfateringsvermogen bevat geen *Acinetobacter* species, dit in tegenstelling tot slibsoorten met een lager defosfateringsvermogen. Momenteel wordt in dit laboratorium F&D-slib bekeken op polyP-ophopers die niet tot het genus *Acinetobacter* behoren.

Wetenschappelijke conclusies

1. In goed defosfaterend slib, zoals het Fill and Draw-slib, komen waarschijnlijk geen fosfaat-ophopende *Acinetobacter* species voor. In slib dat een geringer defosfaterend vermogen heeft, zoals Renpho-slib, komt deze genus type wel voor. Zowel Renpho- als F&D-slib bevat lage aantallen denitrificerende, polyfosfaatophopende bacteriën. Volgens nog niet gepubliceerde gegevens behoort Renpho- en Fill and Draw-slib tot het kleinere percentage slibsoorten dat fosfaat niet opneemt wanneer eind-anaëroob slib onder anaërobe condities wordt geïncubeerd in de aanwezigheid van nitraat maar zonder extracellulaire elektron donor.
2. De anaërobe fosfaatafgifte is een pH-afhankelijk proces en verloopt beter naarmate de pH hoger wordt.
3. Het slib geeft fosfaat beter af naarmate de polyfosfaat-bevattende organismen onder anaërobe condities een hoger energieverbruik hebben. Door het toedienen van acetaat of propionaat werkt men dat het beste in de hand, omdat deze vetzuren snel en mogelijk actief worden opgenomen en een energie-vragende activering ondergaan voordat ze worden omgezet in polyhydroxyalkanoaten. De hydrolyse van polyfosfaat en de oxydatie van glycogeen zorgen voor deze energie.
4. Acetaat wordt door het Fill and Draw-slib onder anaërobe condities voor minstens 80% omgezet in poly- β -hydroxybutyraat (PHB) en poly- β -hydroxyvaleraat (PHV). Glycogeen wordt hierbij gebruikt als leverancier van reductie-equivalenten. In principe kan het slib fosfaat af blijven geven totdat één van de componenten limiterend wordt, te weten het toegediende substraat, polyfosfaat of glycogeen. PHB en PHV worden in de aërobe fase gebruikt als koolstof- en energiebron voor groei, fosfaatopname en glycogeenopbouw.
5. Stikstofmonoxyde (NO) is een remmer van de acetaatgeïnduceerde polyfosfaatafbraak bij Fill and Draw-slib. Bij intacte cellen is de remming bijna volledig bij 0.3 mM NO. De remming wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat NO adenylaatkinase remt. Het adenylaatkinase in het celvrij extract van Fill and Draw-slib werd geheel geremd bij 0.15 mM NO. Ook andere processen, zoals acetaatopname, PHB- en PHV-synthese én glycogeenafbraak worden geremd.
6. Commercieel verkrijgbaar varkens adenylaatkinase werd evenals het adenylaatkinase van Fill and Draw-slib volledig geremd door NO bij 0.15 mM. De remming is non-competitief hetgeen betekent dat de K_m van ADP niet wordt beïnvloed maar wel de maximale omzettingssnelheid van ADP.
7. De aanwezigheid van nitraat wordt meer storend voor defosfatering, naarmate de fosfaatafgiftesnelheid van het slib lager is. Dit effect kan niet verklaard worden door de vorming van NO uit de denitrificatie van nitraat, omdat NO vooral remt bij hoge fosfaat-afgiftesnelheden. De verklaring voor dit nitraat-effect is kort besproken.
8. De aanwezigheid van een extra energiebron in acetaatgelimiteerde continu culturen van *A. johnsonii* 210A, gekweekt bij overmaat fosfaat en een

verduunningssnelheid van 0.1 h^{-1} , doet het polyfosfaatgehalte in de cel maximaal met ca. 68% toenemen, het P-gehalte werd verhoogd van 4.9 naar 7.2% van het drooggewicht.

Conclusies voor de praktijk

1. Het strippen van fosfaat geschiedt sneller en levert een groter rendement op bij hogere pH-waarden (7-8). Bij pH 6 is de snelheid een factor 3-4 lager dan bij pH 7. Strippen van fosfaat moet dan ook gebeuren met neutraal natriumacetaat en niet met azijnzuur.
2. In een systeem waarin een optimaal defosfaterend proces wordt gevoerd, zijn organismen aanwezig die gebruik maken van op zijn minst 3 polymeren, te weten polyfosfaat, poly- β -hydroxyalkanoaten en glycogeen. Een tekort aan elk van deze 3 componenten kan aanleiding geven tot een slechte defosfatering.
3. De meerderheid van alle slibsoorten die biologisch defosfateren zijn in staat snel fosfaat op te nemen wanneer eind anaërobe fase-slib onder anaërobe condities geïncubeerd wordt met nitraat zonder een extracellulair koolstofsubstraat. Het Fill and Draw-slib behoort niet tot deze groep van slibsoorten.
4. Lage fosfaat-afgiftesnelheden kunnen geheel geremd worden door nitraat, terwijl zeer hoge afgiftesnelheden zelfs helemaal geen hinder ondervinden van nitraat. Eén van de manieren om hiertoe te komen is het doseren van acetaat in de anaërobe fase van een installatie die uitsluitend uit een hoofdstroomproces bestaat.
5. Stikstofmonoxyde (NO) remt de polyfosfaatafbraak die wordt gestimuleerd door acetaat. NO wordt voor het grootste deel gevormd door de denitrificatie. Het is dus aan te bevelen het strippen met acetaat en denitrificatie van elkaar gescheiden te houden.

5 REFERENTIES

- American Public Health Association (1976) Standard methods for examination of water and wastewater, 14th edition, American Public Health Association, Washington DC.
- Appeldoorn, K. (1990) Biologische defosfatering onder gedefinieerde condities. Verslag voor NOVEM.
- Appeldoorn, K.J. (1993) Ecological aspects of the biological phosphate removal from waste waters. PhD thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands.
- Appeldoorn, K.J., Boom, A.J., Kortstee, G.J.J., Zehnder, A.J.B. (1992a) Contribution of precipitated phosphates and acid-soluble polyphosphate to enhanced biological phosphate removal. *Water Res.* 26: 937-943.
- Appeldoorn, K.J., Kortstee, G.J.J., Zehnder, A.J.B. (1992b) The fill and draw system as a method to study the enhanced biological phosphate removal by activated sludge under defined conditions. *Water Res.* 26: 453-460.
- Arvin, E. and Kristensen, G.H. (1983) Phosphate precipitation in biofilms and flock. *Wat. Sci. Tech.* 15: 65-85.
- Auling, G., Pilz, F., Busse, H.-J., Karrasch, S., Streichan, M., Schön, G. (1991) Analysis of the polyphosphate-accumulating microflora in phosphorus-eliminating anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3585-3592.
- Betlach, M.R. and Tiedje, J.M. (1981) Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Env. Microbiol.* 42: 1074-1084.
- Bonting, C.F.C., Kortstee, G.J.J., Zehnder, A.J.B. (1991) Properties of polyphosphatase:AMP phosphotransferase of *Acinetobacter* strain 210A. *J. Bacteriol.* 173: 6484-6488.
- Bonting, C.F.C., van Veen, H.W., Taverne, A., Kortstee, G.J.J., Zehnder, A.J.B. (1992) Regulation of polyphosphate metabolism in *Acinetobacter* strain 210A grown in carbon- and phosphate-limited continuous culture. *Arch. Microbiol.* 158: 139-144.
- Bordacs, K. and Chiesa, S.C. (1987) Carbon flow and effluent variability in phosphorus-accumulating activated sludge cultures. In: *Advances in Water Pollution Control: Biological phosphate removal from wastewaters* (ed. R. Ramadori) pp. 225-236. Pergamon Press, Oxford.
- Bordacs, K. and Chiesa, S.C. (1989) Carbon flow patterns in enhanced biological phosphorus accumulating activated sludge cultures. *Wat. Sci. Tech.* 21: 387-396.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Braunegg, G., Sonnleiter, B., Lafferty, R.M. (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6: 29-37.

Buchan, L. (1983) Possible biological mechanism of phosphorus removal. *Wat. Sci. Tech.* 15: 87-103.

Cataldo, D.A., Haroom, M., Schrader, L.E., Young, V.L. (1975). Rapid colorimetric determination by nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80.

Cloete, T.E., Steyn, P.L., Buchan, L. (1985) An auto-ecological study of *Acinetobacter* in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 17: 139-146.

Comeau, Y., Hall, K.J., Oldham, W.K. (1984) A biochemical model for biological enhanced phosphorus removal. *Proc. IAWPRC Post. Conf. Seminar on Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewaters*, vol. 2, Paris. pp. 75-76.

Comeau, Y., Oldham, W.K., Hall, K.J. (1987) Dynamics of carbon reserves in biological dephosphatation of wastewater. In: *Biological phosphate removal from wastewaters. Proc. of IAWPRC spec. conf. Rome* pp. 39-55. Pergamon Press, Oxford.

Deinema, M.H., Van Loosdrecht, M., Scholten, A. (1985) Some physiological characteristics of *Acinetobacter* spp. accumulating large amounts of phosphate. *Wat. Sci. Tech.* 17: 119-125.

De Vries, H.P. and Rensink, J.H. (1985) Biological phosphorus removal at low sludge loadings by partial stripping. In: *Proceedings of the International Conference on Management Strategies for Phosphorus in the Environment* (J.N. Lester & P.W.W. Kirk, eds.). pp. 54-65. Seeper Ltd London.

Dokter, P., Pronk, J.T., van Schie, B.J., van Dijken, J.P., Duine, J.A. (1987) *In vivo* and *in vitro* substrate specificity of the quinoprotein glucose dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41. *FEMS Microbiol. Lett.* 43: 195-200.

Ebbighausen, H., Weil, B., Krämer, R. (1991) Carrier-mediated acetate uptake in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 155: 505-510.

Florentz, M. and Hartemann, P. (1982) Enzymatic study of activated sludge in anaerobic-aerobic run. *Environ. Tech. Lett.* 3: 345-372.

Fuhs, G.W. and Chen, M. (1975) Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbiol. Ecol.* 2: 119-138.

Gerner-Smidt, P. and Tjernberg, I. (1990) Lack of PQQ dependent glucose dehydrogenase apoenzyme in some *Acinetobacter* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* 58: 99-100.

Gommers, P.J.F., van Schie, B.J., van Dijken, J.P., Kuenen, J.G. (1988) Biochemical limits to microbiological growth yields. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 86-94.

Griess-Romijn van Eck (1966) Physiological and chemical testes for drinking water. NEN 1056, IV-2, Nederlands Normalisatie Instituut Rijswijk.

Hascoet, M.C. and Florentz, M. (1985) Influence of nitrate on biological phosphorus removal from wastewaters. *Water Sth Afr.* 11: 1-8.

Hascoet, M.C., Florentz, M. and Granger, P. (1984) Biochemical aspects of enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Proc. IAWPRC Post Conf. Seminar on Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewaters, Vol. 1*, pp. 54-71. Paris.

Hiraishi, A., Masamune, K., Kitamura, H. (1989) Characterization of the bacterial population structure in an anaerobic-aerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles. *Appl. Microbiol.* 55: 897-901.

Hochachka, P.W. (1980) *Living without oxygen - Closed and Open Systems in Hypoxia Tolerance.* Harvard University Press.

Iwema, A. and Meunier, A. (1984) Influence of nitrate on acetic acid induced biological phosphate removal. *Proc. IAWPRC Post Conf. Seminar on Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewaters, Vol. 2*, pp.21-28. Paris.

Janssen, P.M.J. and Rensink, J.H. (1992) Handleiding biologische fosfaatverwijdering. Programma PN-1992. STORA.

Kay, W.W. (1978) Transport of carboxylic acids. In: *Bacterial transport* (ed. B.P. Rosen) *Microbiol. Series 4*: 385-411. New York.

Kleiner, D. (1985) Bacterial ammonium transport. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 87-100.

Knowles, R. (1982) Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46: 43-70.

Koch, F.A. and Oldham, W.K. (1985) Oxidation-reduction potential - a tool for monitoring, control and optimization of biological nutrient removal systems. *Wat. Sci. Tech.* 17: 259-281.

Kuba, T., Van Loosdrecht, M., Smolders, G.J., Heijnen, S. (1992) Biological phosphorus removal under denitrifying conditions. Abstract 4th Netherlands Biotechnology Congress. A.A. Balkema, Rotterdam Brookfield p. F15.

Lötter, L.H. (1984) The role of bacterial phosphate metabolism in enhanced

phosphorus removal from activated sludge. Proc. IAWPRC Post Conf. Seminar on Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewaters, Vol. 1, pp. 162-172. Paris.

Lötter, L.H. (1989) Two year study on the enhancement of biological phosphate removal by altering process feed composition (metabolic control mechanisms). Report to the Water Research Commission, WRC 137/3/89, PO Box 824, Pretoria 0001, South Africa.

Lötter, L.H. and Murphy, M. (1985) The identification of heterotrophic bacteria in an activated sludge plant with particular reference to polyphosphate accumulation. Water SA 11: 179-184.

Lötter, L.H. and Van der Merwe, E.H.M. (1987) The activities of some fermentation enzymes in activated sludge and their relationship to enhanced phosphorus removal. Water Res. 21: 1307-1310.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Faar, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Marais, G.v.R., Loewenthal, R.E., Siebritz, I.P. (1983) Observations supporting phosphate removal by biological excess uptake. A review. Wat. Sci. Tech. 15: 15-41.

Matsuo, T., Mino, T., Sato, H. (1992) Metabolism of organic substances in anaerobic phase of biological phosphate uptake process. Wat. Sci. Tech. 25: 83-92.

Mino, T., Arun, V., Tsuzuki, Y., Matsuo, T. (1987) Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. In: Biological phosphate removal from wastewaters. Proc. of IAWPRC spec. conf. Rome pp. 27-38. Pergamon Press, Oxford.

Noorman, H.J. (1991) Methodology on monitoring and modelling of microbial metabolism. PhD thesis, Delft University of Technology, The Netherlands.

Peirano, L.E., Henderson, D.B., Gonzales, J.G.M., Davis, E.F. (1983) Full scale experiences with the Phostrip process. Wat. Sci. Tech. 15: 181-195.

Rensink, J.H. (1981) *Biologische defosfatering en procesbepalende factoren*. In: Defosfateren, nieuwe ontwikkelingen en praktijkervaringen in Nederland en Zweden. NVA-symposium, pp. 3.1-3.20.

Rensink, J.H., Donker, H.J.G.W., Brons, H.J. (1979) Biologische fosfaatverwijdering in een actief slib installatie. H₂O 13: 296-300.

Rensink, J.H., Donker, H.J.G.W., De Vries, H.P. (1981) Biological P removal in domestic wastewater by the activated sludge process. In: Proc. 5th EAS Symp., München, West Germany.

Roels, J.A. (1983) Energetics and kinetics in biotechnology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.

Shin, H.S., Jun, H.B., Park, H.S. (1992) Simultaneous removal of phosphorus and nitrogen in a sequencing batch reactor. *Biodegradation* 3: 105-111.

Smolders, G-J (1991) Modelvorming en optimalisatie van de biologische fosfaatverwijdering uit afvalwater. Voortgangs-rapportage.

Smolders, G-J (1992) Modelvorming en optimalisatie van de biologische fosfaatverwijdering uit afvalwater. Voortgangs-rapportage.

Stouthamer, A.H. (1988) Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds. In: *Biology of anaerobic microorganisms* (A.J.B. Zehnder, ed.). pp. 245-303. John Wiley & Sons, New York.

Suresh, N., Warburg, R., Timmerman, M., Wells, J., Coccia, M., Roberts, M.F., Halvorson, H.O. (1985) New strategies for the isolation of microorganisms responsible for phosphate accumulation. *Wat. Sci. Tech.* 17: 99-111.

Toerien, D.F., Gerber, A., Lötter, L.H., Cloete, T.E. (1990) Enhanced biological phosphorus removal in activated sludge systems. *Advances in Microbial Ecology* 11: 173-230.

Trevelyan, W.E., Harrison, J.S. (1952) Studies on yeast metabolism. I Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.* 50: 298-310.

T'Seyen, J. (1986) Elimination du phosphorus des eaux résiduaires par voie biologique. PhD thesis Centre de Sciences de l'Environnement, Metz. France.

Van Groenestijn, J.W., Deinema, M.H., Zehnder, A.J.B. (1987) ATP production from polyphosphate in *Acinetobacter* strain 210A. *Arch. Microbiol.* 148: 14-19.

Van Loosdrecht, M.C.M., Kuba, T., Smolders, G-J., Heijnen, S.J. (1992) Biologische defosfatering onder denitrificerende condities. *H₂O* 25: 526-531.

Van Schie, B.J. (1987) The physiological function of gluconic acid production in *Acinetobacter* species and other gram-negative bacteria. PhD thesis, Delft University of Technology, The Netherlands.

Van Veen, H.W., Abee, T., Kortstee, G.J.J., Konings, W.N., Zehnder, A.J.B. (1993) Characterization of two phosphate transport systems in *Acinetobacter johnsonii* 210A. *J. Bacteriol.* 175: 200-206.

Wagner, C., Odom, R., Briggs, W.T. (1972) The uptake of acetate by *Escherichia coli* w. *J. Bacteriol.* 47: 1036-1043.

Wentzel, M.C., Dold, P.L., Ekama, G.A., Marais, G.v.R. (1984) Kinetics of biological

phosphorus release. Proc. IAWPRC Post. Conf. Seminar on Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewaters, vol. 1, pp. 90-103. Paris.

Wentzel, M.C., Lötter, L.H., Loewenthal, R.E., Marais, G.v.R. (1986) Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal - a biochemical model. Water Sth. Afr. 12: 209-224.

Wentzel, M.C., Ekama, G.A., Marais, G.v.R. (1992) Processes and modelling of nitrification denitrification biological excess phosphorus removal systems - A review Wat. Sci. Techn. 25: 59-82.

Willard, H.H., Merritt, L.L.Jr., Dean, J.A. (1974) Instrumental methods of analysis. 5th ed., D. Van Nostrand, New York, N.Y.

Yeoman, S., Stephenson, T., Lester, J.N., Perry, R. (1988) The removal of phosphorus during wastewater treatment: A review. Environ. Poll. 49: 183-233.

BIJLAGE 1**AFKORTINGEN**

| | |
|-------|---------------------------------|
| BOM | Biological Oxygen Monitor |
| DW | drooggewicht |
| GDH | glucose dehydrogenase |
| NO | stikstofmonoxyde |
| PHA | poly- β -hydroxyalkanoaat |
| PHB | poly- β -hydroxybutyraat |
| PHV | poly- β -hydroxyvaleraat |
| polyP | polyfosfaat |
| PQQ | pyrroloquinoline quinone |

**PUBLIKATIEREEKS "TOEKOMSTIGE GENERATIE
RIOOLWATERZUIVERINGSINRICHTINGEN RWZI 2000" ¹**

- 1 "Behandeling van stedelijk afvalwater in de toekomst"
Een haalbaarheidsonderzoek. I. Eindrapport II. Werkrapport
RIZA, TNO-Maatschappelijke Technologie en Witteveen & Bos Raadgevende
ingenieurs
Juli 1986
- 2 "Toekomstige generatie rioolwaterzuiveringsinrichtingen; RWZI 2000"
Onderzoekplan
RIZA, STORA
Januari 1988
- 3 "Jaarverslag 1988"
RIZA, STORA
Maart 1989
- 4 "Slibontwatering; een voorstudie"
TU-Delft, TU-Eindhoven
RWZI 2000 89-01
Januari 1989
- 5 "Knelpunten bij de invoering van defosfatering"
Witteveen & Bos Raadgevende ingenieurs
RWZI 2000 89-02
April 1989
- 6 "Selectieve verwijdering van zware metalen uit ruw rioolwater met behulp van een
magneetsysteem"
Smit-Nymegen, TNO-Maatschappelijke Technologie
RWZI 2000 89-03
Oktober 1989
- 7 "Verwijdering van zware metalen uit zuiveringslib door elektrolyse"
TNO-Maatschappelijke Technologie
RWZI 2000 89-04
Oktober 1989

¹ Te bestellen bij:
STOWA, Postbus 8090, 3503 RB Utrecht
tel. 030-321199

- 8 "Hydrolyse van zuiveringsslib in combinatie met anaërobe vergisting"
TNO-Maatschappelijke Technologie
RWZI 2000 89-05
Oktober 1989
- 9 "Het drogen van zuiveringsslib met het Carver-Greenfieldproces"
TNO-Maatschappelijke Technologie. Witteveen & Bos Raadgevende
ingenieurs
RWZI 2000 89-06
December 1989
- 10 "Natte oxydatie van zuiveringsslib met het Vertech-systeem"
TNO-Maatschappelijke Technologie. Witteveen & Bos Raadgevende
ingenieurs
RWZI 2000 89-07
December 1989
- 11 "Symposium "RWZI 2000" d.d. 5 oktober 1989"
RIZA, STORA
RWZI 2000 89-08
December 1989
- 12 "Jaarverslag 1989"
RIZA, STORA
RWZI 2000 90-01
Maart 1990
- 13 "AB-Systemen; een inventarisatie"
DHV Raadgevend Ingenieursbureau BV
RWZI 2000 90-02
September 1990
- 14 "Vergisting van aëroob gestabiliseerd slib"
DHV Raadgevend Ingenieursbureau BV
RWZI 2000 90-03
Augustus 1990
- 15 "Het afleiden van procestechnologische relaties uit bedrijfsgegevens van rwzi's"
DHV Raadgevend Ingenieursbureau BV
RWZI 2000 90-04
December 1990
- 16 "Automatische regeling van het slibgehalte in beluchtingstanks"
Adviebureau BKH
RWZI 2000 90-05
September 1990

- 17 "Verkenning Bio-Denitro/Bio-Denipho"
Witteveen & Bos Raadgevende ingenieurs
RWZI 2000 90-06
Juni 1990
- 18 "Linpor-sponsjes als dragermateriaal bij de aërobe zuivering van rioolwater"
TNO-Maatschappelijke Technologie
RWZI 2000 90-07
Oktober 1990
- 19 "Jaarverslag 1990"
RIZA, STORA
RWZI 2000 91-01
Maart 1991
- 20 "Deep Shaft-systemen; een inventarisatie"
DHV Raadgevend Ingenieursbureau BV
RWZI 2000 91-02
Maart 1991
- 21 "Perspectives for the utilization of membrane-assisted sludge retention in municipal waste water treatment plants"
A feasibility study
RU-Groningen
RWZI 2000 91-03
Juni 1991
- 22 "Jaarverslag 1991"
RIZA, STOWA
RWZI 2000 92-01
Maart 1992
- 23 "Vergisten van zuiveringsslib; een vergelijking tussen thermofiele en mesofiele slibgisting"
Haskoning B.V., RIZA, LU-Wageningen, DHV Water B.V.
RWZI 2000 92-02
Maart 1992
- 24 "First Dutch-Japanese workshop on the treatment of municipal waste water;
8-11 april 1991, Heelsum, The Netherlands. Part I and part II.
RIZA, STOWA, TU-Delft
RWZI 2000 92-03
Maart 1992

- 25 "Biologische fosfaatverwijdering in combinatie met een korrelreactor"
LU-Wageningen, DHV Water B.V.
RWZI 2000 92-04
Augustus 1992
- 26 "Anaërobe behandeling van stedelijk afvalwater in Nederland"
Covernota van het uitgevoerde onderzoek 1976 - 1991
LU-Wageningen, Haskoning B.V.
RWZI 2000 92-05
Mei 1992
- 27 "Vergaande nutriëntenverwijdering op een zeer laagbelaste aktiefslibinstallatie"
Zuiveringsschap Hollandse Eilanden en Waarden, Grontmij N.V.
RWZI 2000 92-06
Oktober 1992
- 28 "Ontwikkeling van een slib-op-drager systeem voor de aërobe zuivering van stedelijk afvalwater"
Fase II: Onderzoek naar de processtabiliteit en optimalisatie van het zuiveringsrendement.
TNO-IMW
RWZI 2000 92-07
Oktober 1992
- 29 "Behandeling van stedelijk afvalwater met het schachtreactorsysteem"
V & P Waste Water Management B.V.
RWZI 2000 92-08
Juli 1994
- 30 "Stikstofverwijdering uit interne stromen op rwzi's"
DHV Water B.V.
RWZI 2000 92-09
December 1992
- 31 "Jaarverslag 1992"
RIZA, STOWA
RWZI 2000 93-01
April 1993
- 32 "Onderzoek demonstratie-installaties magnetische defosfatering"
Envimag B.V.
RWZI 2000 93-02
April 1993

33 "Modelvorming en optimalisatie van biologische defosfatering van afvalwater:
Microbiële aspecten"
LU-Wageningen, vakgroep Microbiologie
RWZI 2000 93-03
November 1993