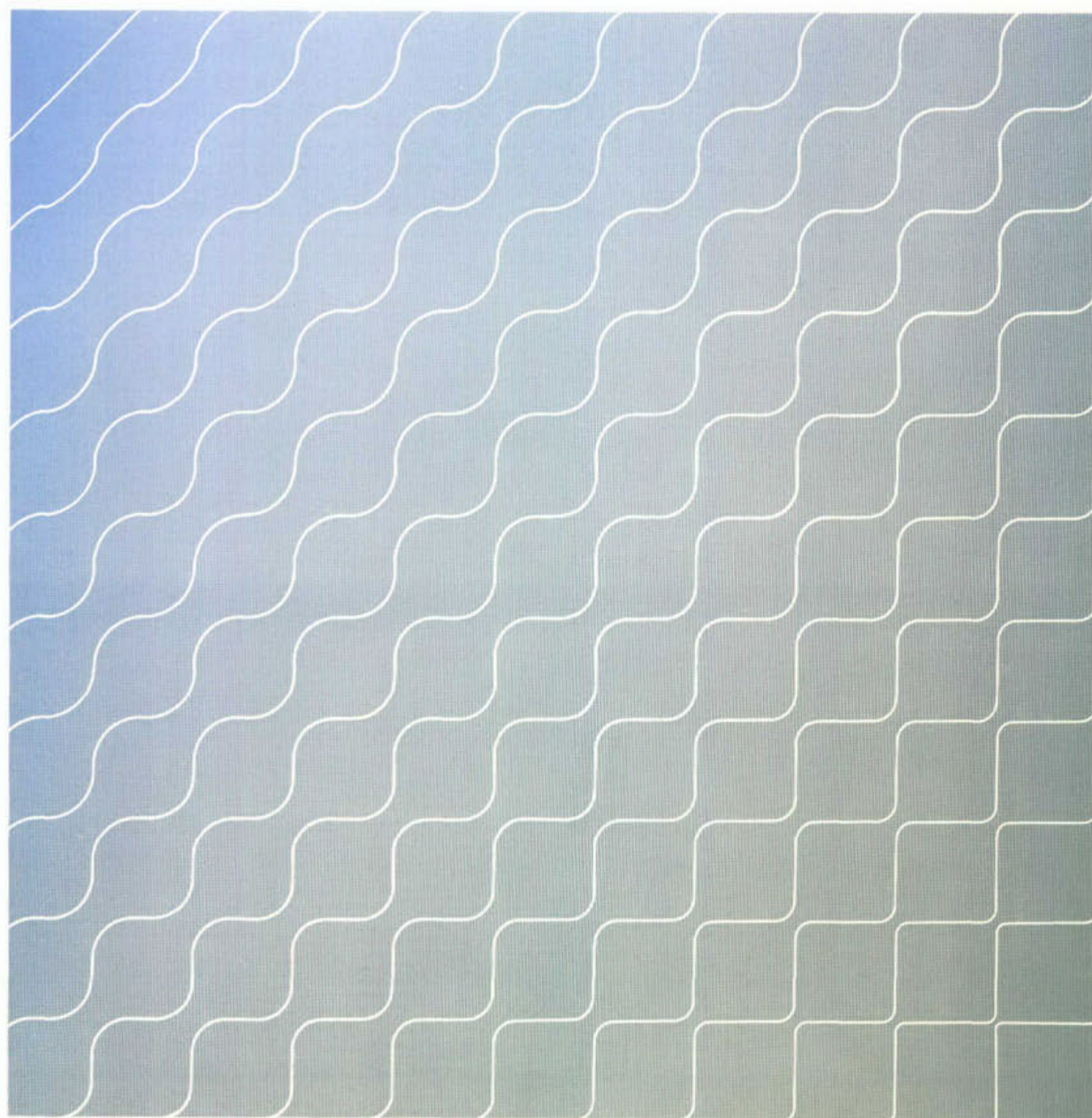




## **AEROBE BIOFILM OP GESUSPENDEERDE DRAGER TEN BEHOEVE VAN WATERZUIVERING**





Stichting voor de Technische Wetenschappen  
Technology Foundation

Postbus 3021, 3502 GA Utrecht



Ministerie van Volkshuisvesting,  
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer

Directoraat-Generaal Milieubeheer  
Postbus 30945, 2500 GX Den Haag



Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en  
Visserij

Postbus 20401, 2500 EK Den Haag



**RIZA**

Rijkswaterstaat  
Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer  
en Afvalwaterbehandeling

Postbus 17, 8200 AA Lelystad

**stowa**

Stichting Toegepast Onderzoek  
Waterbeheer

Postbus 8090, 3503 RB Utrecht



---

## **AËROBE BIOFILMS OP GESUSPENDEERDE DRAGERS TEN BEHOEVE VAN WATERZUIVERING**

**Dynamische aspecten van biofilmdikte, populatiesamenstelling  
en minimale slibproductie**

auteur(s):

TU-Delft:

vakgroep Bioprocestechnologie

dr.ir. L. Tijhuis

dr.ir. M.C.M. van Loosdrecht

prof.dr.ir. J.J. Heijnen

vakgroep Microbiologie en Enzymologie

ir. P. Arts

dr.ir. P. Bos

prof.dr. J.G. Kuenen

**RWZI 2000 94-06**

**INHOUDSOPGAVE**

	VOORWOORD	3
	SAMENVATTING	5
	ALGEMENE INLEIDING	9
	DEELPROJECT A: MICROBIOLOGISCHE ASPECTEN	11
A1	INLEIDING	11
A2	KINETIEK VAN GESUSPENDEERDE GROEI	13
	A2.1 <i>Thiosphaera pantotropha</i>	
	A2.2 <i>Burkholderia picketti</i> G9 en <i>Alcaligenes faecalis</i> TUD	
A3	GEÏMMOBILISEERDE GROEI	20
	A3.1 Fysiologie van gehechte cellen	
	A3.2 Biofilmmorfologie van reïncultures en mengcultures	
A4	ONTWIKKELING METHODES VOOR BIOFILM STUDIE	29
	A4.1 Gevoelige acetaat bepaling	
	A4.2 Confocale Scanning Laser Microscopie	
A5	DISCUSSIE: oorspronkelijke doelstelling en evaluatie	33
A6	CONCLUSIES	38
	DEELPROJECT B: PROCESTECHNOLOGISCHE ASPECTEN	41
B1	INTRODUCTIE	41
	B1.1 Biofilmvorming	
	B1.2 Biofilmafslag	
	B1.3 Biofilmheterogeniteit	
B2	MATERIAAL EN METHODEN	44



B3	BIOFILMVORMING EN BIOMASSAPRODUCTIE	45
	B3.1 Relatie, gebaseerd op de thermodynamica, voor de beschrijving van de maintenance Gibbs-energiebehoefte tijdens aërobe en anaërobe groei	
	B3.2 Vorming van heterotrofe biofilms op kleine gesuspendeerde dragers in airliftreactoren	
	B3.3 Vorming van nitrificerende biofilms op kleine gesuspendeerde dragers in airliftreactoren	
	B3.4 Invloed van afslag, substraatbelasting en reactorschaal op de vorming van heterotrofe biofilms in airliftreactoren	
	B3.5 Biofilmvorming in een praktijkreactor	
B4	BIOFILMAFSLAG	58
	B4.1 Biofilmafslag in biofilm-airlift-suspensie-reactoren in afwezigheid van groei	
	B4.2 Effect van afslagfactoren op de biomassaafslag van gesuspendeerde, niet gevoede ronde biofilms in airliftreactoren	
B5	BIOFILMHETEROGENITEIT	62
	B5.1 Vaste-stofverblijftijd in ronde biofilms in een biofilm-airlift suspensiereactor	
	B5.2 Dynamica van populaties en biofilmstructuur in de biofilm-airlift-suspensiereactor voor koolstof- en stikstofverwijdering	
	B5.3 Populatieverdeling in aërobe biofilms op kleine gesuspendeerde dragers	
	ALGEMENE CONCLUSIES	71
	TOEKOMSTIG ONDERZOEK	73
	REFERENTIES	75
	BIJLAGEN	
	Bijlage A Experimentele opstelling van BAS-reactor met randapparatuur	79
	Bijlage B Biological Oxygen Monitor	81
	Bijlage C Samenstelling van de geconcentreerde media	82

## VOORWOORD

In het kader van de onderzoekprogramma's RWZI 2000 (projektnummer 3244/3), Stichting Technische Wetenschappen (projektnummer DST88-1548) en de Stimuleringsregeling "Milieutechnologie" (projektnummer 51120/0210) is door de Technische Universiteit Delft onderzoek uitgevoerd naar het gedrag van micro-organismen in biofilms op gesuspendeerde dragers in aërobe airlift-reactoren.

Dit fundamentele onderzoek bestond uit twee deelprojecten, waarbij de aandacht was gevestigd op de microbiologische en procestechnologische aspecten.

Het microbiologisch onderzoek richtte zich met name op de fysiologische overeenkomsten en verschillen tussen organismen, groeiende in supensiecultures en organismen die in biolagen geïmmobiliseerd zijn. De achterliggende gedachte hierbij was de mogelijkheid om de beter beschikbare gegevens van gesuspendeerde cultures te gebruiken in modellen voor de beschrijving van biofilms.

Het onderzoek naar de procestechnologische aspecten heeft zich met name geconcentreerd op een drietal nauw verbonden thema's: biofilmvorming, biofilmafslag en biofilmheterogeniteit.

Het onderzoek heeft veel nieuwe inzichten opgeleverd, maar door de complexiteit is het niet mogelijk gebleken een algehele modelmatige beschrijving van biofilms op te stellen. Wel zijn enkele nieuw verworven inzichten in de praktijk toegepast.

Het onderzoek is uitgevoerd door de vakgroep Bioprocestechnologie (dr.ir. L. Tijhuis, dr.ir. M.C.M. van Loosdrecht en prof.dr.ir. J.J. Heijnen) en Microbiologie en Enzymologie (ir. P. Arts, dr.ir. P. Bos en prof.dr. J.G. Kuenen) van de Technische Universiteit te Delft.

Het onderzoek is begeleid door een commissie bestaande uit ir. C. Kerstens (Zuiveringsbeheer Provincie Groningen, voorzitter), ir. C. van Beersum (RIZA, tot 01/90), drs. N. Boots (STW), ir. A.J.M.L. Borghans (Gist-brocades tot 01/90), ir. E. Eggers (DHV Water B.V.), ir. B.A. Heide (TNO-MW), ir. S.S.J. Houtman (NOVEM, vanaf 05/93), drs. M.E. Ikelaar (NOVEM, tot 05/93), prof.dr.ir. S.A.L.M. Kooijman (VU), dr. R. Mulder (01/90 - 01/92), ing. G.B.J. Rijs (RIZA, vanaf 01/90), ir. P.C. Stamperius (STOWA), ir. W. van Starckenburg (RIZA, tot 01/92), prof.dr. A.H. Stouthamer (VU) en ir. B. Versprille (Biothane Systems Int., vanaf 01/92).

Lelystad, december 1994

Voor de Stuurgroep RWZI 2000

prof.dr. J. de Jong  
(voorzitter)





## SAMENVATTING

In dit rapport worden de resultaten beschreven van een vierjarig onderzoeksproject dat is uitgevoerd aan de Technische Universiteit Delft. In dit onderzoek stond de biofilm vorming in de Biofilm Airlift Suspensiereactor (BAS-reactor) centraal. Hierbij is langs twee onderzoekslijnen gewerkt: een microbiologische en een procestechnologische. Tijdens het onderzoek zijn de volgende aspecten aan de orde gekomen:

- (i) Vergelijking kinetiek en interactie's bacteriën in suspensie en biofilm
- (ii) Methodes voor biofilmonderzoek
- (iii) Slibproductie
- (iv) Biofilmvorming
- (v) Biofilmafslag
- (iv) Biofilmheterogeniteit.

### Vergelijking kinetiek bacteriën in suspensie en biofilm

De onderliggende vraag bij dit onderzoekspunt was of het mogelijk is om, in suspensiecultures bepaalde, kinetiek te gebruiken voor de beschrijving van de omzetting door biofilms. Dit uiteraard met inachtneming van de effecten van diffusie. In het onderzoek is het gebleken dat het vrijwel onmogelijk is om in speciaal daartoe ontworpen (en algemeen voor dit doel gebruikte) reactoren geschikte biofilms te verkrijgen. Dit heeft te maken met een schijnbaar inherente heterogeniteit van biofilmsystemen. Hierdoor is het transport van substraat naar en de diffusie van substraat in de biofilm niet goed te berekenen. Zonder een goede beschrijving van deze transportprocessen is het onmogelijk om uit meetgegevens de werkelijke microbiele kinetiek in de biofilm te bepalen en vervolgens te vergelijken met suspensie cultures.

De ervaringen met de kweek van biofilms in het laboratorium wijzen erop dat beschreven fysiologische verschillen tussen biofilm- en suspensiegroei in veel gevallen terug te voeren zullen zijn op het niet goed in ogenschouw nemen van de effecten die de heterogeniteit op het substraattransport naar de biofilm heeft. In deze situatie is het meest aannemelijk dat er geen verschil is tussen de kinetiek van gesuspendeerde en biofilm organismen.

### Methodes voor biofilm onderzoek

Voor de kweek van biofilms in het laboratorium is met name de Rotatorque-reactor en de airlift reactor bekeken. De eerste reactor is een veel gebruikt instrument in het biofilmonderzoek. Het is echter gebleken dat de reactor zelf aanleiding geeft tot een sterk heterogene biofilmvorming en daarom niet geschikt is voor biofilm onderzoek. De airlift reactor heeft als voordeel dat de biofilm deeltjes homogeen in de reactor verdeeld zijn, bovendien blijkt het goed mogelijk om morfologisch homogene biofilms te kweken.

Om de heterogeniteit in de biofilm te kunnen kwantificeren zijn twee methodes gebruikt. De Confocale Scanning Laser Microscoop blijkt goed in staat om drie dimensionale beelden van biofilms te geven. Voor sommige elementen in het biofilm onderzoek (transport van deeltjes in de film) blijkt het apparaat geschikt. Bestudering van de populatieverdeling van verschillende organismen is voorlopig echter nog vrijwel onmogelijk door een te lage fluorescentie van de target microorganismen.

Microelektrodes kunnen gebruikt worden om substraatgradienten in de biofilm op te sporen. Deze techniek is bruikbaar om een indruk te krijgen van een globale populatieverdeling in de biofilm. Nadeel is echter dat de heterogeniteit van de biofilm veroorzaakt dat een profiel op iedere plaats van een biofilm weer anders is.



### Slibproductie

Er is onderzocht of de slibproductie door de biofilms in de airliftreactor, net als in suspensiecultures, te beïnvloeden is door gebruik te maken van de Pirt-maintenance-relatie. Tevens is onderzocht via een uitgebreide literatuurstudie van welke factoren de parameter in deze relatie, de maintenancecoëfficiënt, afhankelijk is. De maintenancecoëfficiënt blijkt duidelijk afhankelijk van de temperatuur, in mindere mate van de elektronacceptor, en is geen functie van het soort microorganismen of het type elektronendonor. De maintenance blijkt onder anaërobe of anoxische condities gelijk aan die onder aërobe condities. Voor de biofilmgroei in de airliftreactor is gevonden dat de biomassaopbrengst inderdaad een functie is van de groeisnelheid volgens de Pirt-maintenance relatie. Het is eenduidig aangetoond dat in een biofilm reactor inderdaad lage slibproducties worden gerealiseerd.

### Biofilmvorming

Er is nagegaan onder welke reactorcondities, met name hydraulische verblijftijd en substraatbelasting, heterotrofe en nitrificerende biofilms tot ontwikkeling komen. Om een goede biofilmvorming te verkrijgen moet de hydraulische verblijftijd kleiner zijn dan de inverse van de maximale groeisnelheid van de gesuspendeerde microorganismen. Bij deze korte verblijftijden worden gesuspendeerde microorganismen uitgespoeld. De vorming van heterotrofe en van nitrificerende biofilms volgt achtereenvolgens drie stadia. Dit proces gaat van kale drager, via gedeeltelijk begroeide drager naar volledig volgroeide biofilms. De waargenomen opstart in laboratoriumreactoren (2-3 l) kwamen goed overeen met een opstart van een praktijkinstallatie (300 m<sup>3</sup>). De biofilmafslag tijdens de biofilmvorming is een functie van de concentratie kale drager in de reactor. De nitrificerende biofilms zijn sterker dan de heterotrofe biofilms, wat resulteert in een lagere biofilmafslag bij gelijke kale dragerconcentratie. Tijdens de aangroei van heterotrofe biofilms bij een dragerconcentratie tussen de 50 en 150 kg·m<sup>-3</sup> wordt minder dan 5% van de gevormde heterotrofe biomassa vastgehouden in de biofilm. Voor nitrificerende biofilms ligt dit percentage bij 70 kg·m<sup>-3</sup> drager rond de 60% en bij 150 kg·m<sup>-3</sup> drager rond de 40%. Het verloop van de begroeiingsstadia en de biomassaconcentratie is sterk niet-lineair. Dit kan worden verklaard door een afnemende biofilmfslag in de loop van het experiment door een afname van de kale dragerconcentratie.

Voor het verkrijgen van ronde, gladde biofilms is een samenspel vereist tussen hoge afslagkrachten en hoge substraatbelasting. Rafelige biofilms ontstaan vooral bij een combinatie van lage afslagkrachten en zeer hoge substraatbelasting. Bij een te lage substraatbelasting of een te hoge shear kan een gedeelte van het basalt onbegroeid blijven. Zeer goede biofilmvorming is verkregen in een nitrificerende BAS-reactor met 20-30 kg·m<sup>-3</sup> biomassa en een hoge conversiecapaciteit van 5 kgN·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> bij een verblijftijd van 1 h. Een hoge vaste-stofhouding bleek een negatieve invloed te hebben op de zuurstofoverdracht van de gasfase naar de vloeistof in de airliftreactor.



### Biofilmafslag

Biofilmafslag is de dominante factor voor de vorming en stabiliteit van biofilms. In dit onderzoek is nagegaan hoe het wel of niet voeden van de biofilm, de reactorgeometrie, de superficiële gassnelheid, de aanwezigheid van kale drager en de ruwheid van de drager invloed hebben op de biofilmafslag. De biofilmafslag bleek in het algemeen een combinatie van een tweetal mechanismen: erosie en breken. Geheel tegen de verwachting neemt de biofilmafslag neemt sterk af naar een veel lagere waarde wanneer in een steady state situatie, bij dezelfde hydrodynamische condities, de voeding wordt uitgezet. Relaties uit de literatuur die de biofilmafslag als functie van diverse groei-, sterkte- en reactorparameters voorspellen, kunnen deze daling niet goed beschrijven. Nieuwe concepten voor de opbouw en sterkte van biofilms zijn noodzakelijk om dit fenomeen te beschrijven.

De kale dragerconcentratie en de ruwheid van het drageroppervlak hebben een duidelijke invloed op de biofilmafslag. De verandering van het stromingspatroon ten gevolge van een verandering van de superficiële gassnelheid lijkt een belangrijke invloed te hebben op de biofilmafslag. Kleine geometrische variaties op laboratoriumschaal kunnen een grote invloed hebben op de gemeten biofilmafslag. De resultaten verkregen in dit deel van het onderzoek zijn een goede basis voor de ontwikkeling van een kwantitatief hydrodynamisch-biologisch model voor de beschrijving van biofilmafslag in de BAS-reactor.

Op basis van de verkregen inzichten over condities voor biofilmvorming en biofilmafslag is het mogelijk gebleken de opstart en volgroeiing van nitrificerende biofilms te optimaliseren.

### Biofilmheterogeniteit

Er zijn twee aspecten van de heterogeniteit van biofilms onderzocht, de verblijftijd van kleine tracerdeeltjes in de biofilm en de verdeling van heterotrofe en nitrificerende microorganismen in de biofilm. De tijdconstante van de hechting van tracerdeeltjes was een factor 20 kleiner dan de tijdconstante van het loslaten. Deze processen konden niet worden beschreven met een dynamisch adsorptie-desorptie model, noch met het biofilmmodel BIOSIM. Voor het goed voorspellen van de verblijftijd van deeltjes in de biofilm zijn nieuwe concepten voor het beschrijven van het transport van deeltjes naar en in de biofilm noodzakelijk. Hierbij kan gedacht worden aan een dynamisch biofilmoppervlak waar gaten en kloven worden gevormd en snel dichtgroeien. Via deze gaten en kloven is er transport mogelijk van microorganismen en colloïdaal materiaal naar de diepe regionen van de biofilm. Deze kennis is van groot belang om te begrijpen hoe gesuspendeerde organische stof door biofilms kan worden afgebroken.

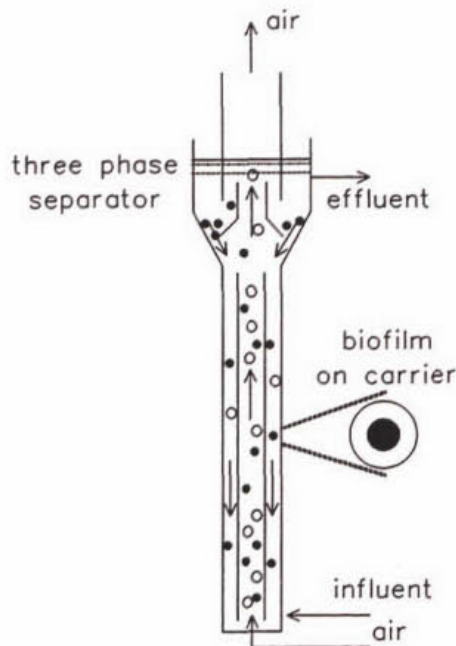
De interactie van heterotrofe en nitrificerende biomassa is onderzocht tijdens schakelingen tussen puur nitrificerend en heterotroof medium. De nitrificeerders ontwikkelden zich in de bestaande uitgangsbiofilm, terwijl bij de toegepaste korte verblijftijd zich verrassenderwijs een heterotrofe laag vormde op de nitrificerende biofilm. Deze laag veroorzaakte diffusielimitatie voor de onderliggende nitrificeerders. Deze heterotrofe laag was relatief zwak en verdween snel na het verdwijnen van het heterotrofe substraat, waarna de nitrificatie zich binnen twee dagen op het oude niveau herstelde. Ook uit metingen met microelectrodes blijkt dat in biofilms gevormd in BAS reactoren gevoed met afvalwater de nitrificeerders meer binnen in de biofilm te vinden zijn. De populatieverdeling van microorganismen in de biofilm wordt in grote lijnen juist voorspeld door het biofilm simulatieprogramma BIOSIM.





## ALGEMENE INLEIDING

Uit een haalbaarheidsonderzoek (Voorneburg), ontwikkelingsonderzoeken (Heijnen 84, Heijnen 87, Kampf, Mulder), technologisch-economische evaluaties (anoniem, Kampf 1990) en een eerste praktijktoepassing (Heijnen) blijkt dat het toepassen van aërobe biofilms op kleine gesuspendeerde dragers in een turbulente airliftreactor resulteert in een aantrekkelijke waterzuiverings techniek. Een schematische weergave van de Biofilm Airlift Suspensiereactor is gegeven in figuur 1. De voordelen ten opzichte van de conventionele technieken liggen op het gebied van hoge zuiveringscapaciteit, zeer lage surplusslibproductie, compactheid en goede effluentkwaliteit (Heijnen).



Figuur 1 Schematische weergave van de Biofilm Airlift Suspensiereactor

Eind jaren tachtig werd geconstateerd dat er een gebrek aan kennis is van de microbiële mechanismen in de biofilm en de kwantitatieve, dynamische beschrijving hiervan (Beeftink 1988). Op basis van deze ervaringen is besloten om een project te starten gericht op een gestructureerde kwantitatieve modelmatige beschrijving van het fenomeen van aërobe biofilmvorming op kleine gesuspendeerde dragers in een turbulente drie-fasen airliftsuspensiereactor. Deze kwantitatieve beschrijving zou kunnen bijdragen aan de vergroting van kennis op het gebied van:

- dynamica en beheersing van de biofilmdikte
- kwantificering van de surplusslibproductie in- en de vaste stofinvang door de biofilm
- dynamica, beheersing en kwantificering van de microbiële samenstelling van de biofilm
- kwantificering en vergelijking van de microbiële activiteiten in de biofilm en in de waterfase.



Op basis van deze vraagstelling is een projectvoorstel geschreven, opgebouwd uit een tweetal sterk samenhangende onderzoeksprojecten, subproject A: microbiologische aspecten, subproject B: proceskinetische aspecten. (Kuenen 1988) In het oorspronkelijke onderzoeksvoorstel waren voor beide lijnen een aantal aandachtspunten aangegeven. Deze aandachtspunten waren:

Subproject A:

- de vergelijking van de fysiologie van gesuspendeerde en biofilmbacteriën, inclusief de bestudering van de biomassaproductie van biofilms van reïncultures
- de interactie van mengcultures in suspensie en biofilm
- de ontwikkeling van methodes om microorganismen in biofilms te bestuderen

Subproject B:

- de snelheid van aangroei, dikte en geometrie van de biofilm.
- de microbiële samenstelling van de biofilm
- de surplusslibproductie op sedimenthoudend afvalwater
- de interactie van gesuspendeerde microorganismen met de biofilmmicroorganismen

Op basis van de vraagstelling en het projectvoorstel is een vierjarig onderzoeksproject uitgevoerd binnen het Kluyverlaboratorium voor Biotechnologie van de Technische Universiteit Delft. De resultaten van dit onderzoek zijn samengevat in dit rapport. De resultaten zijn uitgebreid weergegeven in twee dissertaties (Tijhuis 1994, Arts 1995), een groot aantal publikaties in wetenschappelijke tijdschriften en een aantal verslagen van studenten en stagiaires aan de Technische Universiteit Delft. Tevens zijn er twee fabrieksvoorontwerpen uitgevoerd voor de rejectiewaterbehandeling van de afvalwaterzuiveringsinstallatie Rotterdam-Dokhaven middels een BAS-reactor.

Gedurende de vierjarige onderzoeksperiode is, in nauw overleg met de begeleidingscommissie, het onderzoek uitgekristalliseerd rond een aantal thema's. De verschillen en overeenkomsten in de experimentele uitvoering en de aandachtsgebieden kunnen voor beide onderzoekslijnen als volgt worden samengevat:

	Deelproject A MICROBIOLOGIE	Deelproject B PROCESKINETIEK
Experimentele uitvoering	Reïncultures <i>Thiosphaera pantotropha</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> Rotatorque	Open Mengcultures Nitrificeerders Acetaat-oxydeerders Airlift reactor
Onderzoeksthema's	Kinetiek Microorganismen Biofilmvorming Biofilmafslag Biofilmheterogeniteit	Kinetiek biofilm Methode ontwikkeling Kinetiek mengcultures Biofilmheterogeniteit



## DEELPROJECT A: MICROBIOLOGISCHE ASPECTEN

### A1 INLEIDING

Natuurlijke biofilms zijn zeer dynamische, heterogene structuren, opgebouwd uit meerdere typen van organismen. Doordat iedere individuele soort binnen een mengpopulatie zijn eigen activiteiten heeft, kunnen er tal van zeer uiteenlopende interacties plaatsvinden. De activiteit van een mengpopulatie is dus méér dan de som van de activiteiten van de individuele leden. Een aantal biologische interacties die binnen een mengpopulatie kunnen plaats vinden zijn: neutralisme, commensalisme, mutualisme, competitie, ammensalisme en predatie. Van de in de populatie aanwezige soorten is een groot gedeelte inactief. Hierdoor worden de nutriënt- en energiestromen slechts door een kleine groep van actieve organismen benut. Door wijzigingen aan te brengen in het leefmilieu van een gemeenschap, kunnen andere soorten geactiveerd worden, die dan andere functies bezitten. Ook kan er plasmide-overdracht plaatsvinden in een mengpopulatie, waardoor organismen zich anders kunnen gaan gedragen. Verder kunnen biofilms tot wel 1 mm dik worden. Dit heeft tot gevolg dat er binnen de biofilm gradiënten van zuurstof, voedingsstoffen en afvalproducten ontstaan. Doordat niet alle organismen dezelfde concentraties (zuurstof, substraten, etc.) zien, zullen ze zich fysiologisch anders gedragen. Deze en nog andere eigenschappen maken biofilms tot zeer complexe systemen. Om meer te weten te komen van de fundamentele principes van deze systemen zal in eerste instantie onderzoek gedaan moeten worden aan zeer vereenvoudigde systemen.

Het doel van dit onderzoek is het bestuderen van de fysiologische verschillen tussen organismen groeiende in suspensiecultures en organismen die in biolagen geïmmobiliseerd zijn. Aandachtspunten hierbij zijn de specifieke activiteiten op diverse substraten, de groeisnelheid, de onderhoudsenergie en de surplusslibproductie. Hierdoor wordt het mogelijk om te kijken of gegevens uit gesuspenseerde cultures in biofilmmodellen gebruikt mogen worden. Het voordeel is dat aan gesuspenseerde cultures makkelijker gemeten kan worden. In dit onderzoek zijn niet alleen reïncultures, maar ook kunstmatige mengsels van reïncultures, en, waar relevant, ook natuurlijke mengpopulaties gebruikt.

Dit onderzoek bestaat uit zes onderdelen:

1) Bepaling van fysiologische en kinetische parameters in suspensiecultures van modelorganismen die relevant zijn voor de afvalwaterzuivering.

Gekozen is voor *Thiosphaera pantotropha* als modelorganisme. Het (niet beweeglijke) organisme is in staat tot hechting op vast dragermateriaal en is een facultatief denitrificerend organisme, afkomstig uit een denitrificerende biofilm-reactor t.b.v. de verwijdering van organische verbindingen en sulfide uit fabrieks-afvalwater. Aangezien aerobe microorganismen zeer makkelijk zuurstof-bepoort kunnen raken in een biofilm, is met deze keuze ook de mogelijkheid geopend om studies te doen aan denitrificerende biofilms. De keuze van *T.pantotropha* werd mede bepaald door zijn vermogen tot simultane heterotrofe nitrificatie en denitrificatie onder aerobe condities.

Als verdere model-organisme is gekozen voor (de beweeglijke) *Burkholderia pickettii* G9 (voorheen *Pseudomonas pickettii* G9), die eveneens afkomstig is uit de bovengenoemde biofilm reactor en *Alcaligenes faecalis*. Deze organismen zijn heterotroof en ze zijn beide tot een gedeeltelijke denitrificatie in staat. Zoals later zal blijken kunnen ze in mengcultuur zeer efficiënt denitrificeren, en ze zijn daarom als "model"- mengcultuur voor het biofilm onderzoek gekozen.



2) Een studie van interacties tussen denitrificerende bacterien: Competitie en mutualisme. In dit onderzoek is gebruik gemaakt van de hierboven besproken gedefinieerde mengcultuur van *B. pickettii* G9 en *A. faecalis* om de interacties tussen beide organismen te bestuderen. *B. pickettii* G9 kan onder anaerobe condities nitraat slechts tot nitriet omzetten en is niet in staat nitriet (in hoge concentraties toxisch) verder te reduceren. *A. faecalis* daarentegen kan alleen nitriet denitrificeren tot (voornamelijk)  $N_2O$ . In elkaars aanwezigheid moeten ze in staat zijn nitraat te reduceren tot  $N_2O$ . M.a.w. om anaeroob op nitraat te groeien hebben beide organismen elkaar nodig (mutualisme). Als substraat is gekozen voor acetaat, dat beide organismen nodig hebben als koolstof-en energiebron. Ze zullen in deze situatie dus competieren om het aanwezige acetaat. De competitie, gecombineerd met mutualisme, kan men als model gebruiken voor de interacties, zoals die optreden in mengcultures en zeker ook in biofilms. Inzicht in (de fysiologie van) dit soort suspensie-mengcultures moet dienen als basis voor vergelijkbare studies met kunstmatige biofilms van deze microorganismen.

3) Fysiologie van *T. pantotropha* in dunne biofilms. *T. pantotropha* werd in een biofilm-reactoer onder anaerobe omstandigheden in aanwezigheid van acetaat en nitraat gekweekt. De biofilm- kweekmethode (Rototorque) bleek duidelijke experimentele beperkingen op te leggen en daarom bleek het alleen mogelijk om de maintenance (onderhouds) coefficient te bepalen. Deze werd vergeleken met die van in suspensie gekweekte cultures. De beperkte bruikbaarheid van de reactor was aanleiding tot een vervolgonderzoek naar de bruikbaarheid voor fysiologisch onderzoek van dit in de literatuur aanbevolen reactorsysteem.

4) Onderzoek naar de bruikbaarheid van de RotoTorque-reactor voor fysiologische en kinetische studies aan geïmmobiliseerde cultures. Deze reactor is speciaal ontwikkeld voor biofilmonderzoek (Montana State University, USA). Omdat biofilms zeer complexe systemen zijn en het moeilijk is om hieraan te meten, is in eerste instantie gekozen voor een simpele biofilm bestaande uit een reïncultuur van voor de afvalwaterzuivering relevante organismen (*Thiosphaera pantotropha*, *Burkholderia pickettii* G9 en *Pseudomonas aeruginosa*). In een beperkt aantal gevallen is van een natuurlijke mengpopulatie gebruik gemaakt.

5) Gevoelige acetaatbepaling voor het meten van groei en substraatconsumptie (kinetiek). Acetaat is een van de belangrijke centrale organische verbindingen in de koolstof-omzettingen in (an)aerobe afvalwaterzuiverings-systemen. De kinetiek van de omzetting van acetaat kan alleen direct gemeten worden als deze verbinding zelf nauwkeurig kan worden bepaald. Op grond van een recente publicatie hebben we een zeer gevoelige acetaat bepaling operationeel gemaakt waarmee acetaat tot ongeveer 0.5-1.0 micromol/l kan worden bepaald.

6) Het nagaan van de bruikbaarheid van de Confocale Scanning Laser Microscopie (CSLM) binnen het biofilmonderzoek.

Om de dynamiek in de populatiesamenstelling te kunnen vaststellen werd gebruik gemaakt van immunologische en microscopische technieken. Met behulp van deze technieken kunnen individuele soorten geïdentificeerd en gelocaliseerd worden in de biolaag en kan de mogelijke rol van de individuele bacterie-soorten in een meersoortige biolaag worden beschreven. Eén van de technieken die geschikt is voor identificatie en localisatie van organismen in een biolaag is de Confocale Scanning Laser Microscopie (CSLM).



## A2 KINETIEK VAN GESUSPENDEERDE GROEI

Om een vergelijking van de fysiologie van gesuspenderde en geïmmobiliseerde bacterie-cultures mogelijk te maken is het van belang om de fysiologie van deze micro-organismen in suspensie te bestuderen. In de meeste experimenten is gebruik gemaakt van *T. pantotropha* en *Burkholderia pickettii* G9. In de literatuur wordt vaak beschreven dat er een correlatie bestaat tussen de beweeglijkheid van een micro-organisme en de mogelijkheid om een homogene biofilm (bedekken van het gehele oppervlak) te vormen. Als gevolg daarvan zal een niet beweeglijk organisme (*T. pantotropha*) onregelmatige biofilms vormen, terwijl een beweeglijk organisme (*B. pickettii* G9) homogene biofilms zou kunnen gaan vormen. De fysiologie van deze twee organismen in suspensieculturen wordt hieronder besproken. Aandacht werd geschonken aan belangrijke parameters voor het biofilmonderzoek, zoals yield,  $m_s$ ,  $K_s$ , en nitrificatie/aerobe denitrificatiecapaciteit.

A 2.1 *Thiosphaera pantotropha*

Omvangrijk fysiologisch onderzoek aan *T. pantotropha* heeft aangetoond dat dit organisme in staat is tot simultane heterotrofe nitrificatie en aerobe denitrificatie, en aldus uit ammonium moleculaire stikstof kan produceren. Deze eigenschap bleek niet stabiel te zijn. Het organisme heeft in de loop der tijd de mogelijkheid tot aerobe denitrificatie gedeeltelijk verloren. Zowel in batch als in chemostaat cultures zijn stikstofbalansen opgesteld. In deze eerste serie experimenten werden geen gasmetingen gedaan, maar werd de denitrificatie/nitrificatie activiteit berekend uit de hoeveelheid stikstof die niet terug te vinden was in oplosbare stikstofverbindingen of in biomassa. Tabel A1 geeft de resultaten weer van de batchcultures. In alle experimenten (met en zonder nitraat of nitriet) kon met de gebruikte bepalingmethode geen belangrijk verlies van nitraat of nitriet gemeten. De stikstof-recovery in batch en chemostaatcultures (Tabel A2) was vrijwel 100 %. In de meeste culturen (Tabel A1 en A2) werd een heel klein verlies van stikstof gevonden. De totale fout in de berekende stikstofconsumptie was echter in dezelfde grootte van orde als de gevonden waarden. Om het plaatsvinden van aerobe denitrificatie met lage snelheden toch betrouwbaar aan te kunnen tonen, werd daarna de veel gevoeliger massa-spectrometrie gebruikt, waarmee de veronderstelde gasvormige eindproducten zeer gevoelig kunnen worden gemeten.

Tabel A1 Stikstofbalansen van aerob batch-gekweekte *T. pantotropha* LMD 82.5 en *T. pantotropha* LB cellen. Kweekcondities: pH 8.2, T= 37 °C, 10 mM acetaat in de af- of aanwezigheid van 20 mM  $KNO_2$  of 20 mM  $KNO_3$ . Nitriet in de uitgaande stroom was altijd < 0.1 mM.

stam LMD	DO (%)	$NH_4^+$ in (mM)	$NO_3^-$ in (mM)	$NH_4^+$ uit (mM)	$NO_3^-$ uit (mM)	N biomass (mM)	N verlies (mM)
82.5	85	14.4±0.1	31.8±0.8	10.2±0.3	31.8±0.1	3.9 ±0.0	0.4±0.9
82.5	85	15.4±0.3	30.9±0.6	10.8±0.2	30.8±0.5	3.8±0.0	1.0±0.9
LB	85	14.4±0.1	31.1±0.2	10.2±0.2	30.2±1.1	4.0±0.0	1.2±1.3
LB	30	15.4±0.1	31.9±0.2	11.5±0.2	30.7±0.9	3.7±0.0	1.4±0.9
82.5	0 <sup>1)</sup>	12.0±0.1	31.7±0.9	7.9±0.2	13.3±0.9	3.6±0.0	19.0±1.3

<sup>1)</sup> anoxische condities



Tabel A2 Stikstofbalansen van *T. pantotropha* LMD 82.5 en *T. pantotropha* LB in aerobe en anaerobe continuecultures bij een verdunningsnelheid van 0.14 h<sup>-1</sup>. Kweekcondities: pH 8.2, T = 37 °C, 20 mM acetaat en 32 mM KNO<sub>3</sub>.

Exp no.	Initiele concentraties (mM N)			Eind concentraties (mM N)			Biomass	N verlies (mM)
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		
1a	5.7±0.0			4.0±0.0	<0.10		1.4±0.0	0.20±0.04
1b	5.1±0.1			3.2±0.5	<0.10		1.2±0.0	0.75±0.49
2a	5.4±0.0		18.4±0.4	3.8±0.0	<0.10	18.3±0.0	1.7±0.0	0.01±0.38
2b	5.2±0.0		18.7±0.1	3.7±0.0	<0.10	19.5±0.6	1.5±0.0	-0.79±0.60
3a <sup>1</sup>	5.1±0.0		18.7±0.1	3.0±0.1	<0.10	18.9±0.1	1.5±0.0	0.28±0.16
3b <sup>1</sup>	5.2±0.0		22.8±0.6	3.3±0.0	<0.10	22.5±0.7	1.8±0.0	0.38±0.93
4a	5.9±0.0	22.0±0.5		3.9±0.0	22.6±0.6		1.7±0.0	-0.25±0.83
4b	5.6±0.0	23.0±0.7		4.3±0.1	22.5±0.0		1.7±0	0.12±0.73
5 <sup>2</sup>	5.8±0.0		20.3±0.1	2.5±0.1	<0.10	13.7±0.2	1.9±0.0	7.90±0.27

<sup>1</sup> *T. pantotropha* LB, <sup>2</sup> Anoxische condities

Directe metingen van N<sub>2</sub>- en/of N<sub>2</sub>O- productie met de massa-spectrometer werden uitgevoerd. Verwacht werd dat in het geval *T. pantotropha* nog in staat zou zijn tot heterotrofe nitrificatie en aerobe denitrificatie kwantitatief significante activiteiten gemeten zouden moeten worden. Figuur A1 laat de resultaten zien van een batchcultuur van *T. pantotropha*, waaraan een mengsel van <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en <sup>14</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> als N-bron is toegevoegd. Tijdens het experiment werd N<sub>2</sub> geproduceerd (ongeveer 16 nmol.min<sup>-1</sup>.mg eiwit<sup>-1</sup>, gemeten met de gaschromatograaf). Dezelfde resultaten werden gevonden met <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en <sup>15</sup>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in acetaat-gelimiteerde continue culturen bij verschillende zuurstofconcentraties (roersnelheid bleef hoger dan 850 rpm). In deze experimenten werd de gemeten nitrificatie/denitrificatiesnelheid berekend uit de <sup>15</sup>N gelabelde gasproductie (ongeveer 10 nmol. min<sup>-1</sup>. mg eiwit<sup>-1</sup>). Dit is slechts 4 - 10 % van de oorspronkelijk gevonden denitrificatiesnelheden bij *T. pantotropha*. Deze waarde is kwantitatief, maar valt wel binnen de totale fout van de chemische analysemetingen van het supernatant (Tabel A1 en A2).

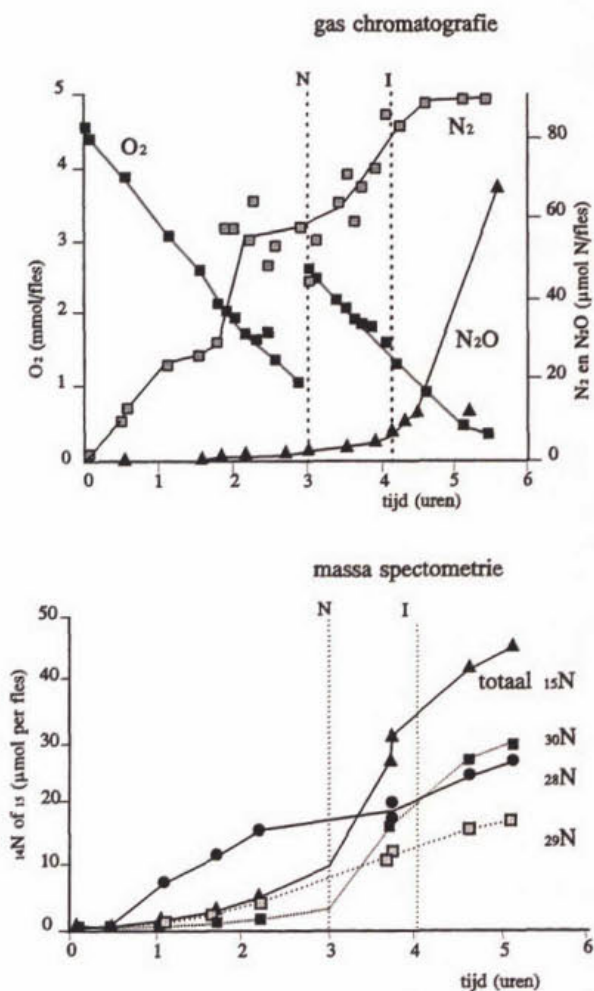
Omdat bleek dat een studie van de biofilm bij voorkeur tijdens denitrificatie onder anaerobe/anoxische omstandigheden diende te geschieden, is *T. pantotropha* eerst in suspensie gekweekt op een acetaat-gelimiteerd medium in de continucultuur, met nitraat als electronen-acceptor. De anaerobe Yield (acetaat) en de onderhouds-energy-coefficient werden daarbij



bepaald op  $Y = 16.4 \pm 0.6$  g biomassa per mol acetaat en  $m_s = 1.75 \pm 0.19$  mmol acetaat per g biomassa per uur. De  $K_s$  waarde (affiniteitsconstante) voor substraten is een belangrijke parameter in biofilmonderzoek. Bij het gebruik van biofilms is het soms nodig te weten hoe de cultuur zich gaat ontwikkelen onder gegeven omstandigheden. In biofilms is sprake van substraatgradiënten. In de onderste lagen van biofilms zullen de substraatconcentraties lager zijn dan in de bovenste lagen. Deze kunnen zelfs rond de  $K_s$  waarde liggen. Als gevolg hiervan zal competitie optreden tussen verschillende organismen en afhankelijk daarvan zal de biofilm zich verder ontwikkelen. Met behulp van de  $K_s$  waarde kan dus een voorspelling gedaan worden over de ontwikkeling van een competitie tussen micro-organismen in een biofilm.

Een veel voorkomende koolstofbron in afvalwater is acetaat. In dit onderzoek is dan ook de  $K_s$  waarde voor acetaat bij *T. pantotropha* in suspensie bepaald. De  $K_s$  waarde kan via verschillende wegen bepaald worden. Er is een directe methode die rechtstreeks het zogenaamde residueel substraat, de lage concentratie acetaat die de bacteriecultuur laat liggen, meet. Met behulp van de Monod formule kan dan de  $K_s$  berekend worden. Het direct meten van het residueel acetaat in een biofilm zal praktisch niet mogelijk zijn, omdat er geen micro-electroden bestaan om heel gevoelig acetaat te meten. Bovendien is er sprake van van een grote heterogeniteit (zie geïmmobiliseerde groei). Indirecte methoden meten niet het residueel substraat, maar meten bijvoorbeeld de zuurstofopnamesnelheid als functie van de acetaatconcentratie met een acetaatconcentratie met een zuurstof-electrode-kamer (een z.g. Biological Oxygen Monitor:BOM). Vaak zijn deze methoden niet makkelijk reproduceerbaar of geven een verkeerd beeld van de werkelijkheid.

Om een indicatie te krijgen van de grootte van de  $K_s$  en om deze te kunnen vergelijken met de directe  $K_s$  metingen is de "schijnbare"  $K_s$  voor acetaat eerst bepaald dmv de indirecte methode met behulp van de zuurstofopnamesnelheid. De  $K_s$  voor *T. pantotropha* bij pH 8 en 37 °C was 9.2  $\mu\text{M}$ , wanneer het organisme was gekweekt bij een  $D (= \mu)$  van 0.1 h. Eerder is gevonden dat de  $K_s = 28 \mu\text{M}$  voor acetaat bij eenzelfde  $D$ . In kunstmatig geïmmobiliseerde cellen (groeïend bij  $\mu_{\text{max}}$ ) werd een waarde van ongeveer 20-38  $\mu\text{M}$



Figuur A1 Resultaten verkregen met een aerobe batchcultuur van *Thiosphaera pantotropha* op acetaat. N = Toevoeging van  $^{15}\text{NO}_2$ , I = toevoeging van acetyleen (remmer  $\text{N}_2\text{O}$  reductase).



gevonden.

Uit de eerste directe metingen bleek dat de residuele acetaatconcentratie dermate laag was dat deze ver beneden deze waarden lag en niet goed en betrouwbaar gemeten kon worden met de gebruikelijke acetaatbepalingen (rechtstreeks met de HPLC of de enzymatische Boehringer acetaatkit). Begonnen is met het zoeken naar een nauwkeurig en gevoelig detectiemethode om lage acetaatconcentraties te meten. Deze werd gevonden in een recent artikel van King [22]. Voor details zie hoofdstuk II.3.

Om de acetaatconsumptie tijdens het monsternemen laag te houden moeten lage biomassaconcentraties (2 mM) van *T. pantotropha* worden in eerste instantie gebruikt. Na het bereiken van een steady state werd de residuele acetaatconcentratie bepaald. Meerdere runs werden uitgevoerd bij verschillende verdunningssnelheden (Tabel A3). Met behulp van deze waarden is tevens de  $K_s$  berekend. Opvallend is dat de residuele acetaatconcentratie erg laag is. Om enigzins betrouwbaar te kunnen meten (ondergrens acetaatmeting is ongeveer 1  $\mu\text{M}$ ) werd de verdunningssnelheid verhoogd tot vlak onder de  $\mu_{\text{max}}$ . Teneinde een potentiële interferentie door wandgroei te voorkomen werd de culture na een steady state meting schoongemaakt. In een dergelijke korte periode kon geen significante wandgroei worden waargenomen. Gezien deze resultaten (nl. zeer lage residuele acetaatconcentraties) zijn de experimenten herhaald bij een lagere ingaande acetaatconcentratie (0.2 mM), teneinde de consumptie tijdens de monsternamen nog verder te verlagen. De theorie voorspelt dat de yield (Y) van de cultures onafhankelijk is van de gebruikte ingangconcentratie, hetgeen ook inderdaad het geval bleek te zijn. De resultaten zijn weergegeven in Tabel A4. Als deze getallen vergeleken worden met de getallen verkregen bij 2 mM acetaat dan valt op dat deze waarden veel hoger (ongeveer 100 maal) zijn. Dit verschil is erg groot en kan niet met de eventueel gemaakte analysefouten verklaard worden. Blijkbaar is de  $K_s$  dichtheidsafhankelijk. Hoe hoger de dichtheid van de cellen in de cultuur hoe lager de  $K_s$  is. Een tweede, belangrijk verschil is dat de directe bepaling van de  $K_s$  voor acetaat een waarde oplevert die sterk afwijkt van die verkregen met de zuurstofopname metingen (vergelijk tabel A3 en A4). Hiermee dient rekening te worden gehouden, als men dit soort processen modeleert.

Tabel A3  $K_s$ -waarden voor acetaat bij *T. pantotropha* bij verschillende verdunningssnelheden. Gebruikt werd de Monodformule met als  $\mu_{\text{max}} = 0.45 \text{ h}^{-1}$ .  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 8, 2 mM acetaat, 32 mM nitraat.

verdunningssnelheid ( $\text{h}^{-1}$ )	residueel acetaat ( $\mu\text{M}$ )	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )
0.40	0.86	0.11
0.42	1.7	0.12



Tabel A4  $K_s$ -waarden voor acetaat bij *T. pantotropha* bij verschillende substraatconcentraties. Gebruikt werd de Monodformule met als  $\mu_{\max} = 0.45 \text{ h}^{-1}$ .  $D = 0.40 \text{ h}^{-1}$ , pH 8,  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 32 mM nitraat. Beide experimenten zijn in duplo uitgevoerd. De Yield was onafhankelijk van de gebruikte ingangconcentratie.

ingående acetaatconcentratie (mM)	residueel acetaat ( $\mu\text{M}$ )	$K_s$ ( $\mu\text{M}$ )
0.2	92	10.63
0.5	9.3	1.16
2.0	0.86	0.11

#### A2.2 *Burkholderia pickettii* G9 en *Alcaligenes faecalis*, TUD

*B. pickettii* G9, een denitrificeerder, was geïsoleerd uit een ophopingscultuur, welke beënt was met slib uit een anaerobe ammoniumoxiderende fluïde bedreactor [51]. Van sommige denitrificeerders is bekend dat ze ook onder aerobe condities kunnen denitrificeren. Bij *B. pickettii* G9 is gekeken of dit organisme onder aerobe condities ook de mogelijkheid van denitrificatie bezit.

In aerobe batchculturen (> 50 % luchtverzadiging) van *B. pickettii* G9 werd geen significante omzetting van nitraat of nitriet gevonden. Ook in aerobe continue culturen onder acetaatlimitatie (Tabel A5) werd geen kwantitatief significante aerobe denitrificatie en nitrificatie gevonden. In alle experimenten was de stikstofrecovery rond 100 %. Zelfs bij een zeer lage opgeloste-zuurstofconcentratie (5 % luchtverzadiging) werd geen nitraatafname gevonden. Zowel de luchtverzadigingsconcentratie als de pH van het medium had geen effect op de denitrificatie- en nitrificatiecapaciteit. Wel significant is de produktie van kleine hoeveelheden (hooguit enkele tientallen  $\mu\text{mol/l}$ ) nitriet onder aerobe condities. Gezien deze resultaten kan geconcludeerd worden dat *B. pickettii* G9 niet in staat is om onder aerobe condities kwantitatief significant te denitrificeren en/of heterotroof te nitrificeren. In de RotoTorque-experimenten (zie geïmmobiliseerde groei) werd alleen onder anaerobe condities gekweekt, zodat de rest van de suspensieculturen ook onder anaerobe condities werd uitgevoerd. Op deze manier is het mogelijk een vergelijking te maken van de fysiologie van het organisme in suspensie en in geïmmobiliseerde systemen.

Zowel in anaerobe batchculturen als in anaerobe chemostaatculturen onder acetaatlimitatie was *B. pickettii* G9 echter niet in staat goed te groeien. Een lichte groei werd meestal pas gevonden na 5 dagen, die vrij snel daarna stopte.

*B. pickettii* G9 werd daarom eerst voorgekweekt onder aerobe acetaatlimiterende condities en na het bereiken van een steady state werd de lucht vervangen door stikstofgas om anaerobe condities te verkrijgen. Figuur A2 geeft de resultaten weer. Vanaf dag 0 (overgang van aerob naar anaerob) nam de nitraatconcentratie in de cultuur af. Nitraat werd omgezet, onder gelijktijdige vorming van nitriet. De verhouding nitraatomzetting: nitrietproductie was ongeveer 1:1. In anaerobe batchculturen is aangetoond dat na 12 dagen groei meer nitraat verdwenen was dan nitriet geproduceerd. Met behulp van de gaschromatograaf kon in gasmonsters van deze culturen stikstofgas aangetoond worden. Blijkbaar is de omzetting van nitraat naar stikstofgas een heel langzaam proces.

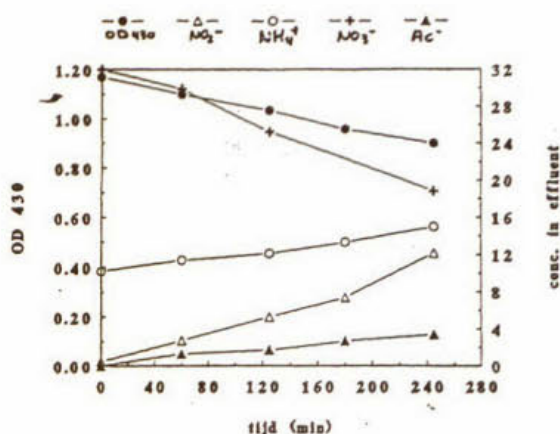


Tabel A5 Stikstofbalansen bij *B. pickettii* G9 in aerobe continueculturen bij een verdunningssnelheid van  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . Kweekcondities:  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7, 20 mM acetaat in de af- of aanwezigheid van 32 mM  $\text{KNO}_3$ . De stikstof in de biomassa werd berekend uit de drooggewichtgetallen door gebruik te maken van de volgende elementsamenstelling:  $\text{CH}_{1.9}\text{O}_{0.56}\text{N}_{0.26}$ .

DO (%)	Ingaande concentraties (mM N)		Eind concentraties (mM N)			Biomass	Stikstof verlies (mM)
	Ammonium	Nitraat	Ammonium	Nitriet	Nitraat		
80	$13.4 \pm 0.2$	-	$10.0 \pm 0.1$	0.01	-	3.3	$0.0 \pm 0.2$
80	$13.3 \pm 0.1$	$30.9 \pm 0.4$	$9.9 \pm 0.1$	0.16	$31.0 \pm 0.3$	3.3	$0.0 \pm 0.5$
30	$14.3 \pm 0.1$	$32.1 \pm 0.2$	$11.2 \pm 0.1$	0.21	$32.4 \pm 0.3$	3.0	$-0.4 \pm 0.4$
10	$13.4 \pm 0.0$	$32.0 \pm 0.3$	$10.2 \pm 0.1$	0.16	$31.5 \pm 0.2$	2.8	$0.8 \pm 0.4$

Het is ook duidelijk te zien in figuur A2 dat de cultuur uitspoelde, echter de cultuur spoelde minder snel uit dan de opgelegde verdunningssnelheid. Dit duidt op een hele langzame groei ( $\pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ ). Na een aantal dagen nam de groei van het organisme af. Waarschijnlijk is dit het gevolg van de hoge nitrietconcentratie die in de cultuur was ontstaan. Omdat *B. pickettii* G9 direct afkomstig was uit een denitrificerende biofilm reactor, leek een mogelijk verklaring van het waargenomen gedrag dat het organisme anaeroob in samenwerking met een ander microorganisme zou moeten functioneren die de nitriet verwijdert. Wij hadden de beschikking over *Alcaligenes faecalis*, een organisme dat uitstekend op nitriet kan denitrificeren. Daarom werden "tandem"experimenten uitgevoerd met een mengsel van *B. pickettii* G9 en *Alcaligenes*

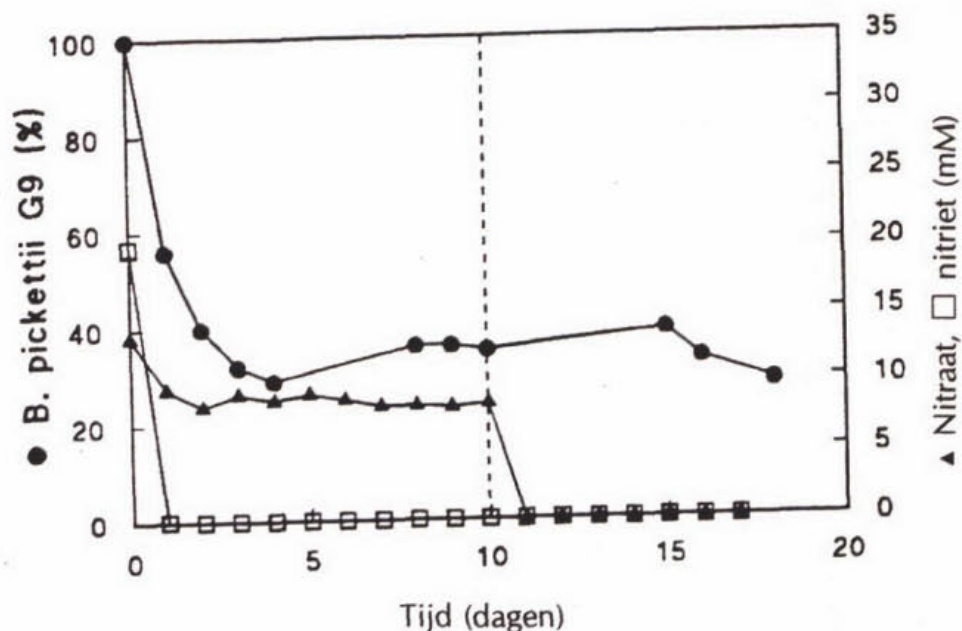
*faecalis* onder anaerobe condities in suspensieculturen. Anaerobe groeiexperimenten hebben aangetoond dat *A. faecalis* alleen nitriet, dus geen nitraat, kan denitrificeren tot  $\text{N}_2\text{O}$  en  $\text{N}_2$ . In elkaars aanwezigheid zouden ze in staat moeten zijn om nitraat om te zetten tot  $\text{N}_2\text{O}$ . Als C-bron werd gekozen voor acetaat. *B. pickettii* G9 werd eerst aerob in een chemostaat ( $D = 0.05 \text{ h}^{-1}$ ) gekweekt. Na het bereiken van een steady state werd de lucht vervangen door stikstofgas. De nitraatconcentratie nam direct af en tegelijkertijd werd nitriet geproduceerd. Na 1 dag kweken werd een batchcultuur van *A. faecalis* toegevoegd (dag 0, Figuur A3). De dag na beënten kon er geen nitriet in het effluent meer aangetoond worden. Verder was alle acetaat verbruikt. De cultuur was acetaat-gelimiteerd. Na ongeveer 5 dagen werd een soort steady state bereikt. In aanwezigheid van elkaar waren de bacteriën blijkbaar in staat nitraat te reduceren tot gasvormige stikstofverbindingen. De verhouding tussen *B. pickettii* G9 en *A.*



Figuur A2. Anaerobe chemostaatcultuur van *B. pickettii* G9 bij een verdunningssnelheid van  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . Kweekcondities:  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 mM acetaat, 32 mM  $\text{KNO}_3$  en 15 mM ammonium.

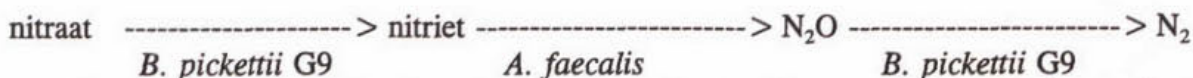


*faecalis* werd bepaald met behulp van celtellingen op platen. In Figuur A3 zijn de percentages weergegeven. Na het bereiken van een steady state situatie was ongeveer 35 % van de cellen *B. pickettii* G9.



Figuur A3 Mengcultuur van *B. pickettii* G9 en *A. faecalis* onder anaerobe condities bij een verdunningssnelheid van  $0.05 \text{ h}^{-1}$ .

Aan het eind van het experiment werd een mediumvat met nitriet in plaats van nitraat aangekoppeld. De verwachting was dat *B. pickettii* G9 zou uitspoelen. Dit was echter niet het geval. Na 6 dagen was het percentage *B. pickettii* G9 cellen nog redelijk constant (30 %). Een monster uit de gasfase werd in de gaschromatograaf gespoten. Hieruit bleek dat er alleen stikstofgas aanwezig was, terwijl *A. faecalis* nitriet niet verder dan tot  $\text{N}_2\text{O}$  omzet. Deze gegevens zijn bevestigd met de massa-spectrometer ( $^{15,15}\text{N}_2$  productie). *B. pickettii* G9 moet in deze situatie voor een snelle omzetting van  $\text{N}_2\text{O}$  naar  $\text{N}_2$  zorgen. Dat het organisme hiertoe in staat is, is inderdaad aangetoond in anaerobe batchculturen. *B. pickettii* en *A. faecalis* zijn dus samen in staat nitraat te reduceren tot stikstofgas, volgens



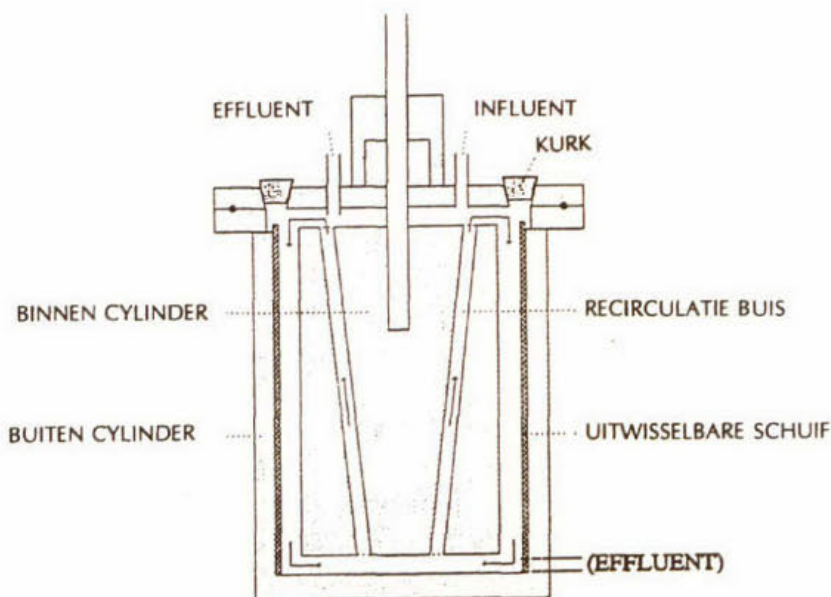
Berekingen toonden aan dat de verhouding van de aantallen van beide organismen in de mengcultuur op nitriet alleen te verklaren is als *A. faecalis* uitsluitend groeit op de reactie  $\text{nitriet} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ , terwijl *B. Picketti* G9 nagenoeg alle geproduceerde  $\text{N}_2\text{O}$  tot  $\text{N}_2$  omzet.

Tussen beide organismen is dus een duidelijke interactie aanwezig, die in de literatuur wordt aangeduid als competitie (voor acetaat) gecombineerd met mutualisme (uitwisselen van de electronen-acceptoren). In principe is de combinatie van deze beide bacterien hiermee een zeer interessant model-systeem voor de verdere vergelijking van suspensie systemen met biofilms. Door tijdgebrek en door het ontbreken van een geschikt biofilmreactor-systeem is het biofilmonderzoek met het tandem echter binnen het kader van dit onderzoek niet uitgevoerd.



### A3 GEÏMMOBILISEERDE GROEI

Voor het kweken van geïmmobiliseerde cultures werd de RotoTorque-reactor gebruikt [9]. Om kinetische parameters te bepalen en te modelleren is het van belang dat gewerkt wordt met een homogene biofilm (een homogene laag van dezelfde dikte), welke het hele oppervlak bedekt. De RotoTorque-reactor heeft als eigenschap dat de vloeistoffase ideaal gemengd is en dat de afschruifkrachten over de reactorwand gelijk zijn. Dit zijn optimale condities voor homogene biofilmvorming. Verder is de RotoTorque-reactor vaak gebruikt in studies naar de biofilmfysiologie. De RotoTorque-reactor is een Continuous Flow Stirred Tank Reactor (CFSTR). De cilindrische reactor is gemaakt van transparant autoclaveerbaar polycarbonaat. De reactor bestaat uit een pot met daarin een massieve (polycarbonaat) cilinder (Figuur A4), die met een te variëren snelheid draait. De draaisnelheid bepaalt de lokale stroomsnelheid en afschruifkrachten aan de wand van de pot en is dus onafhankelijk van de mediumtoevoer. Kanalen in de binnencilinder zorgen voor een interne vloeistofmenging tijdens het draaien van de binnencilinder. In de binnenwand van de buitenwand van de reactor zitten twaalf verwijderbare plaatjes. Aan de bovenzijde van de reactor zitten monstername-openingen. Dit biedt de mogelijkheid om aseptisch monsters van de biofilm te nemen. Hierdoor kan op verschillende momenten tijdens de groei van de biolaag de fysiologie en de opbouw bestudeerd worden. De karakteristieken van de gebruikte reactoren staan vermeld in Tabel A6.



Figuur A4 Schematische weergave van een rototorque reactor.

Eerst is gekeken naar de menging van de RotoTorque-reactor. Om homogene biofilms te krijgen is het van belang dat er geen gradiënten aanwezig zijn in de vloeistoffase. Naar de mengkarakteristieken van de reactor is gekeken met behulp van stap- en pulseresponsmetingen. Uit deze experimenten bleek dat de RotoTorque-reactor ideaal gemengd is.

#### A3.1 Fysiologie van gehechte cellen: Reincultuur van *T. pantotropha*

Er is een aantal fysiologische experimenten in de RotoTorque-reactor uitgevoerd. Het kweken in de RotoTorque-reactor onder aerobe condities is erg moeilijk. De reactor zelf kan niet belucht worden. Om tijdens het kweken in de RotoTorque-reactor aerobe condities te



behouden kan alleen gekweekt worden bij hele lage substraatconcentraties (in dit geval acetaat). Als het medium belucht wordt zal er bij 30°C 236  $\mu\text{M}$  zuurstof oplossen. Voor de volledige oxidatie van 1 mol acetaat is 2 mol zuurstof nodig. Dit betekent dat maximaal 118  $\mu\text{M}$  acetaat in het medium aanwezig mag zijn om het systeem aerob te houden. De concentratie nitraat zal daardoor ook laag (236  $\mu\text{M}$ ) zijn en het is moeilijk deze zeer lage nitraatconcentraties goed te meten. Bij het opstellen van balansen is het erg belangrijk dat van nauwkeurige metingen wordt uitgegaan. Dit probleem doet zich onder anaerobe omstandigheden niet voor: hier kan immers nitraat als electronacceptor gebruikt worden.

Tabel 6 Karakteristieken van de twee gebruikte RotoTorque-reactoren.

Parameters	Reactor 1	Reactor 2
Diameter van binnen cylinder (mm)	100.5	100.8
Diameter van buiten cylinder (mm)	116.6	115.7
Ruimte tussen cylinders (mm)	8.05	7.45
Natte hoogte van binnen cylinder (mm)	175.2	176.5
Natte hoogte van buiten cylinder (mm)	189.2	192.5
Natte lengte van uitwisselbare schuif (mm)	188.3	191
Breedte van uitwisselbare schuif (mm)	17.0	17.0
Totale natte oppervlak ( $\text{m}^2$ )	0.18	0.18
Werk-volume (L)	0.67	0.67
Oppervlakte volume verhouding ( $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ )	0.27	0.27
Totale oppervlak van schuiven (%)	21.1	21.2
Natte oppervlak buiten cylinder (%)	38.0	38.1
Natte oppervlak binnen cylinder (%)	30.4	30.5
Natte oppervlak van bodem, deksel en recirculatie buizen (%)	31.6	31.4

De experimenten, die hier beschreven worden, zijn onder anaerobe condities uitgevoerd bij 30 °C. Een synthetisch medium bestaande uit 4 mM acetaat en 8 mM nitraat werd continu toegevoegd aan de reactor. In de opstartfase werd gekweekt bij een verdunningsnelheid van 0.15  $\text{h}^{-1}$ . Nadat de gesuspendeerde cultuur een steady state had bereikt werd de verdunningsnelheid verhoogd tot 1.2  $\text{h}^{-1}$  (ongeveer 5 maal zo hoog als de  $\mu_{\text{max}}$ ). De cultuur werd bijna direct uitgewassen. Na korte tijd (ongeveer 12 uur) werden op de wand van de reactor gehechte cellen zichtbaar. Gedurende de experimenten werd geen acetaat meer in het effluent gevonden (Figuur A6). Na het verdwijnen van acetaat bereikte de nitraatconcentratie in het effluent een hoogste waarde van ca. 3 mM. Indien alle acetaat zou zijn verbrand tot  $\text{CO}_2$  (dus bij "nulgroei", d.w.z. alle acetaat wordt gebruikt voor onderhoud van de cel), zou een residuele nitraatconcentratie van 1.6 mM verwacht worden. Blijkbaar treedt er dus groei op in de reactor. Indien de hoeveelheid gehechte biomassa tijdens het experiment zou toenemen, zou dit leiden tot een afname van de specifieke groeisnelheid van de cultuur. Dit zou moeten leiden tot een toename van de onderhoudsbehoefte en dus daling van de residuele nitraatconcentratie. Aanname hierbij is dat bij de gegeven concentratie nitraat niet limiterend is in het systeem en dat de onderhoudsenergie-behoefte van het organisme hetzelfde blijft. Aangezien de daling in residuele nitraatconcentratie niet werd waargenomen, kan worden geconcludeerd dat er een evenwicht bestond tussen groei van gehechte cellen en afslag (het effluent was erg troebel). Ook uit het ammoniumverbruik is af te leiden dat er zich een



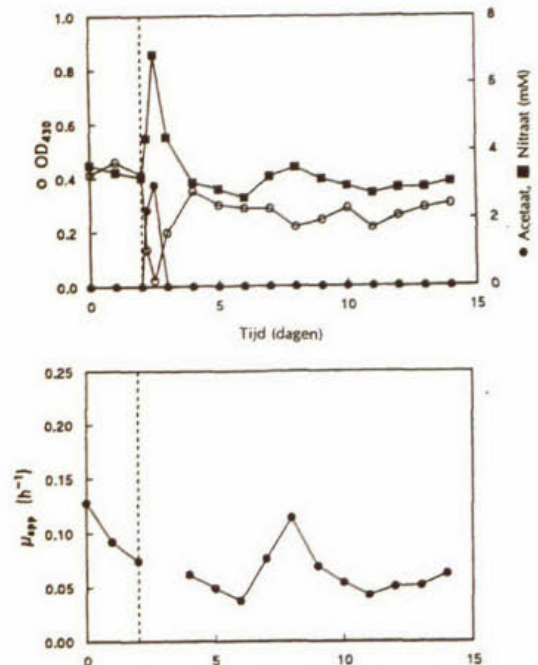
evenwicht instelt tussen groei en afslag: bij toename van de hoeveelheid gehechte biomassa zou immers een afname van de ammoniumassimilatie worden verwacht. Tijdens anaerobe, heterotrofe groei kunnen reproduceerbare steady states worden bereikt. Echter tijdens deze steady states is er een evenwicht tussen groei van gehechte cellen en afslag. Dit resulteert in een hoge biomassaconcentratie in het effluent. Door afslag van de biomassa neemt de specifieke groeisnelheid van de biomassa toe. Dit leidt tot een toename in de productie van biomassa (surplusslibproductie).

Naarmate het percentage van het substraat dat wordt gebruikt voor maintenance energie toeneemt zal er steeds meer acetaat worden verbrand en dus het nitraat verbruik gaan toenemen. Als de  $m_s$  bekend is dan kan men uit de verhouding van het acetaat/nitraat verbruik de groeisnelheid afleiden. Dit is aangegeven in figuur A5b waaruit te zien is dat de (gemiddelde) groei van de biofilm varieerde tussen 0.0 en 0.11 per uur. Uit directe metingen van de groeisnelheid (dmv tellingen van de toename van cellen in de biofilm) aan het eind van het experiment (figuur A5b, 15 dagen,  $\mu = 0.07$ ) bleek dat deze ongeveer 0.1 per uur bedroeg. Dit getal komt dus redelijk overeen met de 0.07 en geeft aan dat de  $m_s$  verkregen uit de suspensie cultures ook in biofilms van dezelfde orde van grootte is.

Men mag dan ook uit deze waarneming voorzichtig concluderen dat althans voor *T. pantotropha* de onderhoudsenergiebehoefte tussen niet en wel geïmmobiliseerde cellen niet significant verschilt. Deze waarneming ondersteunt andere, in de literatuur gerapporteerde, waarnemingen die er op wijzen dat in veel gevallen de fysiologie van geïmmobiliseerde cellen niet verschilt met die van gesuspendeerde cellen, als men tenminste experimenteel werkelijk vergelijkbare situaties vergelijkt. De hierboven genoemde (ruwe) overeenkomst van de gemeten  $K_s$ -waarden voor acetaat duiden ook in deze richting. Dit impliceert derhalve dat voor het modelleren van biofilm-kinetiek het gebruik van gegevens uit suspensiecultures in eerste instantie een goede benadering lijkt.

### A3.2 Biofilmmorfologie van reincultures en mengcultures

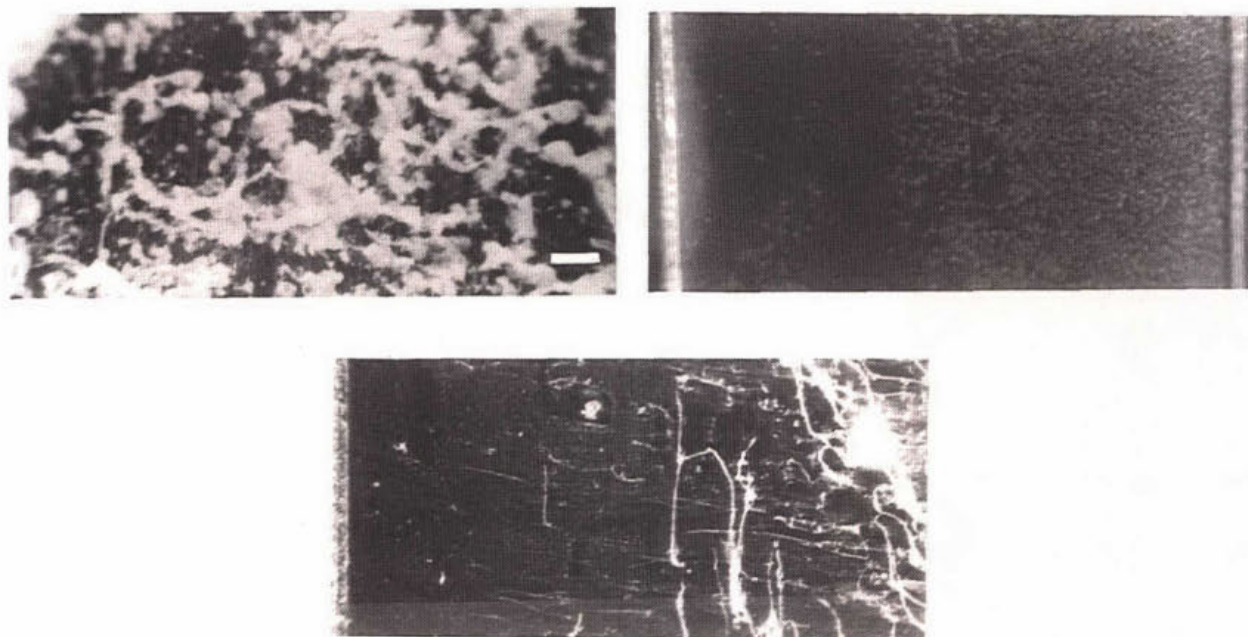
De experimenten in de RotoTorque-reactor zijn uitgevoerd zowel met reincultures als met ongedefinieerde mengcultures. Tabel A7 geeft een overzicht van alle uitgevoerde experimenten. Tijdens deze experimenten werden geen homogene biofilms waargenomen, maar een grote verscheidenheid aan biofilmstructuren werd gevonden. De biofilmstructuur die gevonden werd was afhankelijk van het gekweekte micro-organisme. In het geval van *T. pantotropha* vond snelle groei op het oppervlak plaats na verhoging van de verdunningssnelheid boven de maximale specifieke groeisnelheid van het organisme. De oppervlaktegroei bestond uit microkolonies met lege ruimtes ertussen. Zelfs na drie weken kweken bleef de structuur pluksgewijs (Figuur A6). Dit verschijnsel werd ook gevonden bij



Figuur A5 Effluent concentraties van een experiment met *Thiosphaera pantotropha* in een Rototorque (a) en geschatte specifieke groeisnelheid ( $\mu_{app}$ ) gedurende het experiment (b).



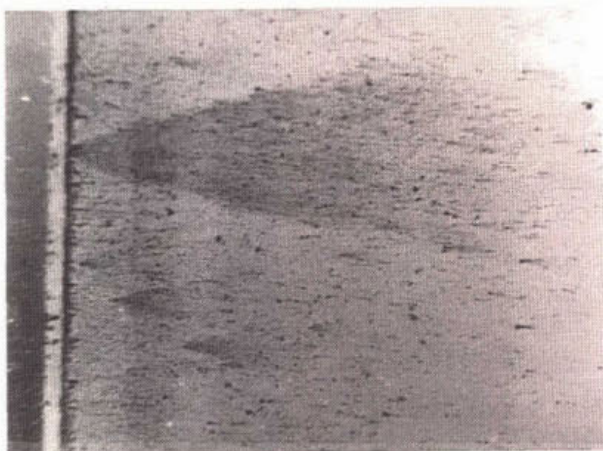
sommige mengcultures. In sommige experimenten met *T. pantotropha* of mengcultures ontstonden filamenteuze structuren (Figuur A6). Dit was vooral in de experimenten bij een hoge substraatbelasting. Anaerobe cultures van *B. pickettii* G9 vormden een dunne basisfilm met microkolonies erop. Ook na lang kweken bleef deze pluksgewijze structuur. *Pseudomonas aeruginosa* vormde relatief gladde biofilms. Maar ook met dit organisme was de biofilm niet geheel homogeen.



Figuur A6 Verschillende voorbeelden van inhomogene biofilm op de RotoTorque-monsternameplaatjes: (a) pluksgewijze structuur (*T. pantotropha*); (b) microkolonies; (c) filamenten (mengcultuur). Goed zichtbaar is de afname van de celconcentratie in de richting van de stroming (links naar rechts).

Verder waren nog andere factoren aanwezig die van invloed waren op de biofilmstructuur:

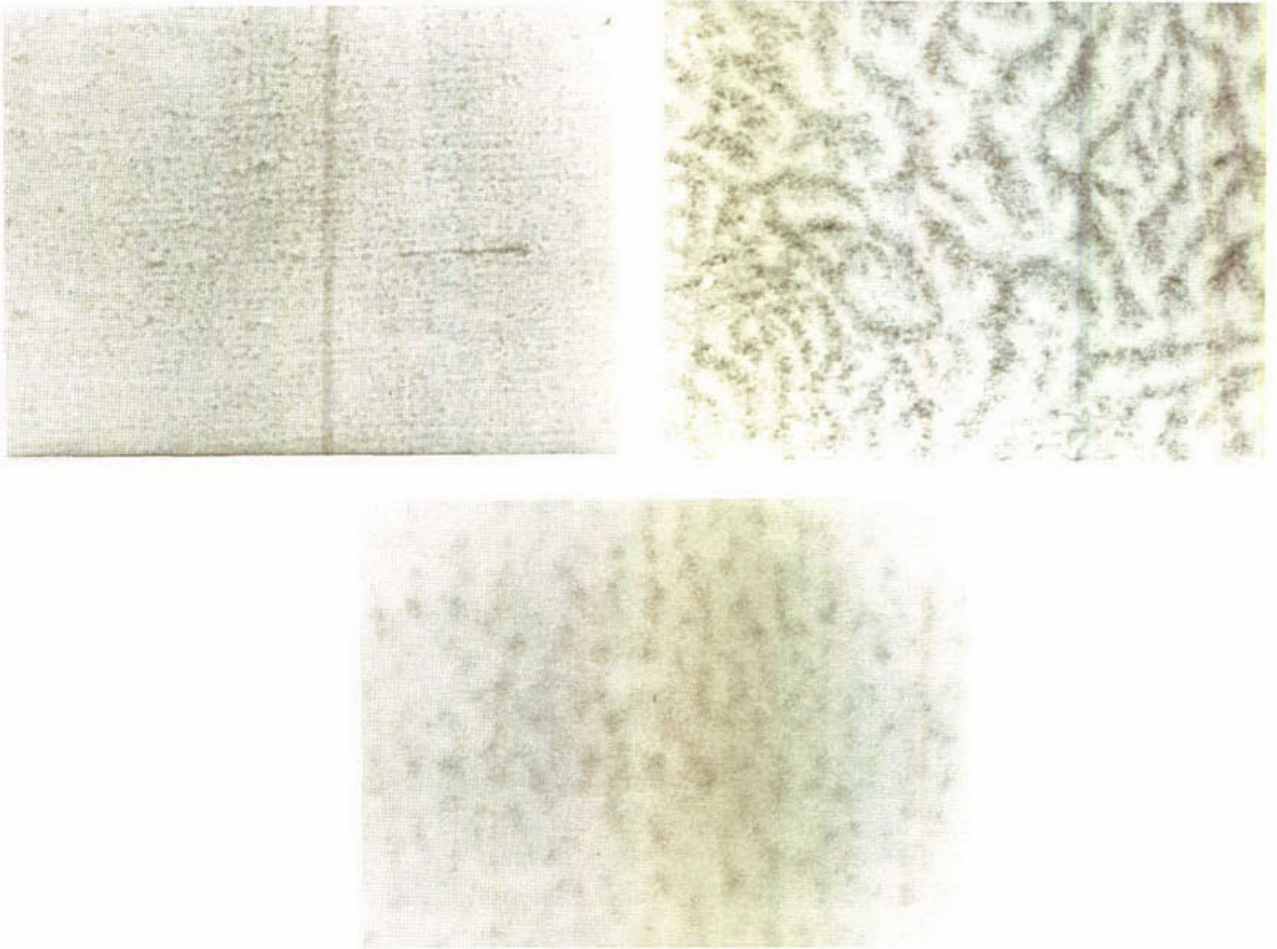
- de oppervlakkenarakteristieken van de reactor en de monsternameplaatjes; kleine krasjes op het oppervlak hadden een groot effect (Figuur A7)
- de stromingsrichting; lijnstructuren werden gevonden welke de richting van de mediumstroom volgden (Figuur A8). Verder werden ook duinstructuren gevonden (Fig. A8).



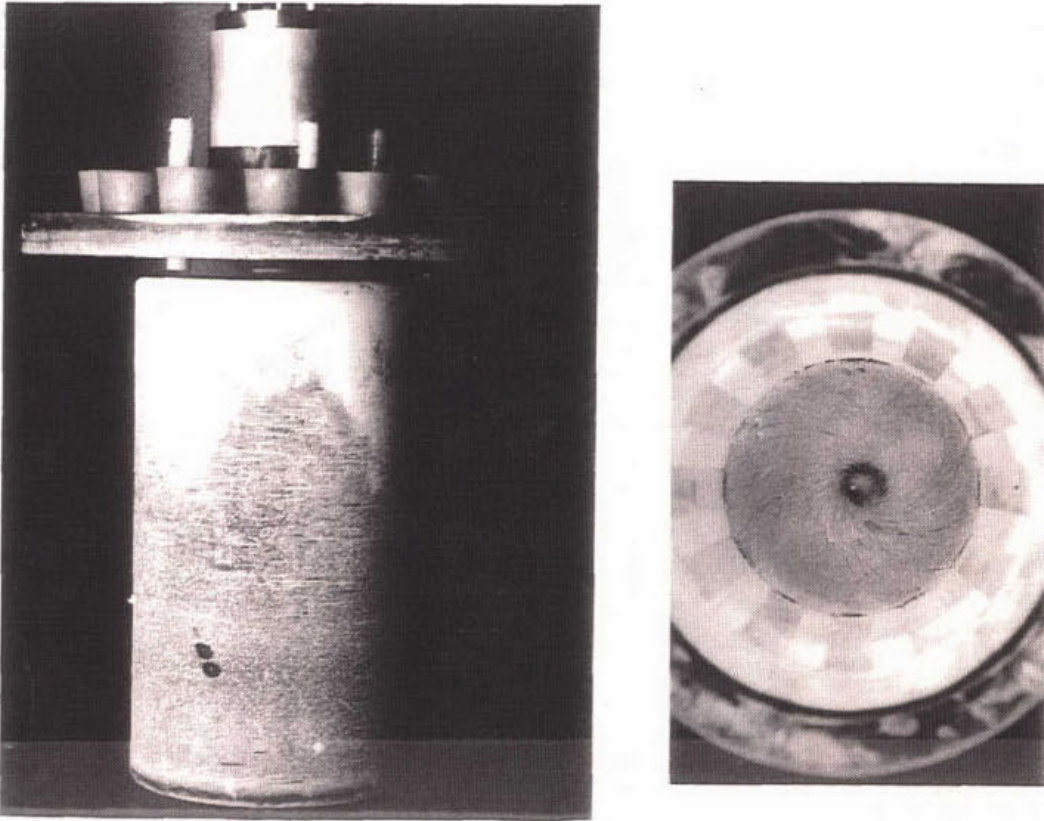
Figuur A7 Komeetachtige structuur in een biofilm.



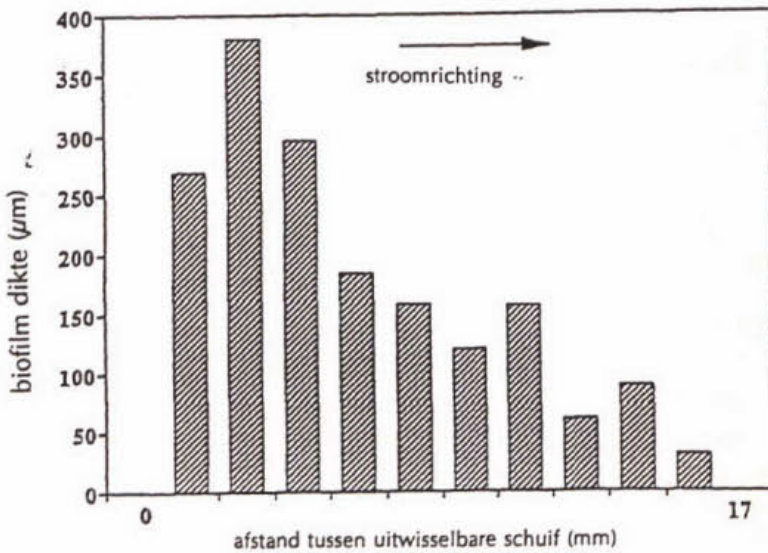
- de reactor; er werden grote verschillen gevonden in verticale en horizontale (Figuur A9) richting. In het laatste geval begon biofilmvorming aan de upstream kant van de monsternameplaatjes en de stukjes tussen de plaatjes en verder nam de hoeveelheid biomassa af in de richting van de vloeistofstroom (Figuur A10). Het verschil in biofilmdikte nam toe na langere tijd van kweken.
- afslag van biomassa; tijdens de experimenten lieten regelmatig grote delen van de biofilm los. De biofilms onderin de reactor waren meer gevoelig voor afslag dan bovenin de reactor



Figuur A8 Verschillende structuren in een biofilm van *P. Aeruginosa*  
(a) lijnpatroon, (b) heuvels, (c) duinen.



Figuur A9 Biofilm inhomogeniteiten  
(a) binnencylinder, (b) bodem van de Rotator-reactor



Figuur A10 Variatie in dikte van een biofilm op een testplaatje in een Rotator biofilm. rotator biofilm.



Tabel A7 Groeikarakteristieken en gevonden biofilmstructuren in de RotoTorque-reactoren.

EXPERIMENTELE CONDITIES						BIOFILM-STRUCTUREN						
Micro-organisme	Bewe-gelijk	C-bron	C-be-lasting	O <sub>2</sub>	N	Gradient in de dikte	Vlek-kerig	Lij-nen	Dui-nen	Kome-ten	Filamen-ten	
			(mmol. m <sup>-2</sup> .u <sup>-1</sup> )		(rpm)	Horizont al	Vertica al					
mengcultuur	nd	ac	1.2	+	200	+	+	+	±	—	—	
mengcultuur	nd	ac	1.2	+	200	+	nd	+	+	—	+	
mengcultuur	nd	ac	1.2	+	200	+	nd	+	nd	—	—	
mengcultuur	nd	ac	1.2	+	200	+	+	+	+	—	—	
<i>P. aeruginosa</i>	+	gluc	6.9	+	150	nd	nd	—	nd	+	—	
<i>P. aeruginosa</i>	+	gluc	8.0	+	150	nd	nd	—	+	+	—	
<i>P. aeruginosa</i>	+	gluc	6.9	+	150	+	+	—	+	+	—	
<i>T. pantotropha</i>	—	ac	37.0	—	250	+	+	+	±	—	—	
<i>T. pantotropha</i>	—	ac	37.0	—	150	+	+	+	±	—	—	
<i>T. pantotropha</i>	—	ac	19.0	—	150	+	+	+	±	—	—	
<i>T. pantotropha</i>	—	ac	1.9	—	250	+	+	+	±	—	—	
<i>P. pickettii</i>	+	ac	1.9	—	250	+	+	+	—	—	—	
<i>P. pickettii</i>	+	ac	1.9	—	150	+	+	+	—	—	—	
<i>P. pickettii</i>	+	ac	37.0	—	150	+	+	+	—	—	—	
<i>P. pickettii</i>	+	ac	0.9	+	150	+	+	+	—	—	—	

+: aanwezig, -: niet aanwezig, ±: niet duidelijk, nd: niet bepaald, ac: acetaat, gluc: glucose, rpm: rotaties per minuut

De experimenten [11] tonen aan dat biofilms altijd inhomogeniteiten zullen bevatten in tegenstelling tot berichten uit de literatuur. De mogelijke oorzaken en consequenties worden hieronder besproken.

#### Mogelijke oorzaken van biofilminhomogeniteiten

**Beweeglijkheid:** In de literatuur wordt gesuggereerd dat beweeglijkheid van het organisme belangrijk kan zijn om homogene biofilms te vormen. Van organismen als *T. pantotropha*, een niet beweeglijk organisme, wordt verwacht dat ze microkolonies of onregelmatige biofilms vormen. Echter beweeglijke organismen (*B. pickettii* G9 en *P. aeruginosa*) zouden homogene biofilms moeten vormen. Uit dit onderzoek komt naar voren dat de gebruikte beweeglijke organismen ook inhomogene biofilms vormen. Beweeglijkheid is dus geen garantie voor de vorming van homogene biofilms.

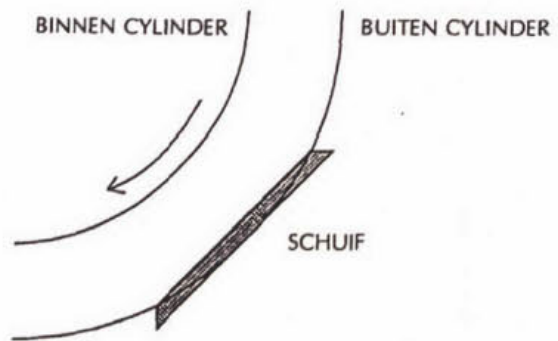
**Oppervlakte ruwheid en flow.** In de literatuur wordt vaak beschreven dat er een correlatie bestaat tussen de ruwheid van een oppervlakmateriaal, celhechting en biofilmvorming. Deze correlatie werd in dit onderzoek ook gevonden. De biomassaophoping op opgeruwd polycarbonaat bleek hoger te zijn dan op niet opgeruwd polycarbonaat. Op dezelfde manier kunnen locale onregelmatigheden op het oppervlak er voor zorgen dat cellen beschermd worden tegen afslag. Bij het komeetachtige biofilmpatroon (Figuur A7) begon de biofilmvorming bij onregelmatigheden op het oppervlak en aan de zijkanten van de monsternameplaatjes. Dit patroon suggereert een directe interactie tussen vloeistofstroom en biofilmophoping. Ook de aanwezigheid van losse microkolonies kan op dezelfde manier van invloed zijn op de biofilmvorming. Dit zou de aanwezigheid van lijn- en streepstructuren in



de stromingsrichting kunnen verklaren.

*Menging in de reactor:* In de meeste experimenten nam de dikte van de biofilm af zodra de afstand tot de top van de reactor toenam. Dit kan het gevolg zijn van een niet homogene verdeling van de nutriënten in de reactor. Het substraat wordt bovenin de reactor toegevoegd en als het substraat groeilimiterend is, kunnen gemakkelijk concentratie-gradiënten ontstaan. Echter, tracerstudies hebben aangetoond dat de reactor ideaal gemengd is op macroschaal en dat de mengtijd kleiner is dan de hydraulische verblijftijd. Dit houdt daarentegen niet in dat de reactor goed gemengd is op microschaal. Met het verbruik van het substraat moet daarom rekening worden gehouden. De karakteristieke tijden van substraatomzetting tijdens twee experimenten werd berekend (Tabel A8). Deze waarden bleken in dezelfde grootte-orde te liggen als de mengtijd. Karakteristieke opnametijden kleiner of gelijk aan de mengtijd betekenen dat de opname van substraat even snel of sneller is dan de menging in de reactor. Dit zal tot concentratiegradiënten leiden, omdat biomassa dicht bij de invoer van het substraat in staat is meer substraat te consumeren. Een dikkere biolaag zal dus ontstaan dicht bij de invoer van medium. Lager in de reactor ontstaat een gebrek aan substraat. Afslag, welke meestal plaatsvindt als er substraat of zuurstof te kort is, was ernstiger in de lagere gedeeltes van de reactor.

*Reactorgeometrie:* In horizontale richting werd op elk individueel monsternameplaatje in de stromingsrichting een afname in de dikte van de biofilm waargenomen. Het ontstaan van deze horizontale gradiënten kan verklaard worden door de lokale geometrie van de reactor: deze is rond, terwijl de monsternameplaatjes recht zijn. Hierdoor zal op de plek waar een monsternameplaatje zit de ronding minder zijn en is de afstand tot de binnencilinder met 8 % afgenomen (Figuur A12). Dit heeft een grote invloed op de stroming en shear op deze plekken. De verstoring van een homogene stroming van het medium als gevolg van de rechte monsternameplaatjes resulteert in verschillen in externe diffusiegradiënten tussen biofilmoppervlak en de bulkvloeistof. Dit kan ook van invloed zijn op de horizontale biofilmophoping.



Figuur A11 Schematische weergave van een Rotatorque monsterplaatje t.o.v. de reactorwand.

#### Consequenties van de inhomogeniteit

*Oppervlakvergroting:* De inhomogeniteit van een biofilm zal in de meeste gevallen het contactoppervlak tussen bulkvloeistof en biofilm vergroten. Dit geldt vooral voor biofilms met veel, lange, dunne filamenten. Als de biofilm onregelmatig en discontinu is (figuur A6b) zal het oppervlak van de biofilm-bulkinterface kleiner zijn dan bij een homogene biolaag die evenveel biomassa bezit. In het eerste geval is het niet mogelijk de biomassaconcentratie te bepalen, omdat de directe metingen het gemiddelde van een monsternamegebied geven (bijvoorbeeld drooggewichtbepaling) of niet gerelateerde lokale waarden (diktemetingen).

*Massatransport:* Door de inhomogeniteit van de biofilm zullen bepaalde plekken dikkere biofilms bevatten dan de gemiddelde waarde. Als de gemiddelde waarde overeenkomt met de penetratiediepte van het limiterend substraat, dan zullen de diepere delen van de dikkere biofilms substraatgelimiteerd worden (Figuur A13). Hierdoor kunnen anaerobe zones ontstaan



Tabel 8 Fysiologische parameters en karakteristieke tijden van substraatopname en mening.

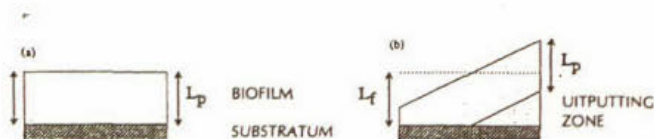
Parameters	<i>T. pantotropha</i>	<i>P. aeruginosa</i>
N (rpm)	150	150
V (l)	0.67	0.65
$X_s \cdot V$ (mg)	43	3.5 <sup>d</sup>
$X_f \cdot A$ (mg)	460	38 <sup>d</sup>
$\mu^a$ (h <sup>-1</sup> )	0.1	0.074
D (h <sup>-1</sup> )	1.2	3.0
$S_i$ (mg/l)	240	15.7
S (mg/l)	1.2 <sup>b</sup>	2
$Y_{XS}$ (g/g) <sup>a</sup>	0.27	0.41 <sup>c</sup>
$t_{s1}$ (s) <sup>a</sup>	15	175
$t_{s2}$ (s) <sup>a</sup>	16	181
tm (s)	32	32

<sup>a</sup>  $t_{s1} = S/D(S_i - S)$ ;  $t_{s2} = Y_{XS} \cdot S \cdot V / \mu(X_s V + X_f A)$ ;  $\mu = X_s \cdot V \cdot D / (X_s \cdot V + X_f \cdot A)$

<sup>b</sup> Residuele acetaat concentratie is 1.2 mg.l<sup>-1</sup> (bepaald in continucultuur).

<sup>c</sup> Zie Robinson *et al.* 1984

<sup>d</sup> Herberekend uit aantal kolonie-vormende eenheden per m<sup>2</sup>, met cel-volume 10<sup>-12</sup> cm<sup>3</sup>, celdichtheid 1,07 g.cm<sup>-3</sup> en drooggewicht 25 % van het nat-gewicht.



Figuur A12 Illustratie substraatgebrek in inhomogene biofilm.

in aerobe biofilms, ook al is dit niet berekend uit de gemiddelde biofilmdikte. Dit is vooral het geval als in een groot gebied grote verschillen in biofilmdikte zijn. Zoals bij de horizontale diktegradiënten op de monsternameplaatjes ontstaan, kan een lokaal te kort aan substraat of zuurstof de afslag aan de upstream zijde van een plaatje verklaren. Hier zijn de biofilms het dikst.

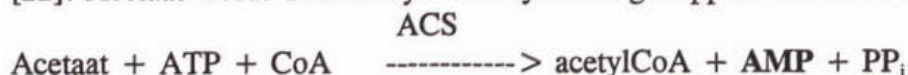
**Kinetiek en modellering:** Zoals hierboven beschreven is het duidelijk dat de hoeveelheid actieve biomassa in een inhomogene biofilm niet nauwkeurig te meten is. Het is daarom niet mogelijk om specifieke substraatconsumptiesnelheden te berekenen aan de hand van substraatconcentratie verschillen tussen het influent en het effluent (substraat omgezet per hoeveelheid biomassa per tijdsduur). De biofilminhomogeniteit heeft ook invloed op het massatransport in de biofilm. Omdat de substraatconcentratie de sleutelfactor is in de fysiologie van microbiële cellen heeft de ligging van een individuele cel in een biofilm niet alleen effect op zijn groei (en dus hoeveelheid biomassa), maar ook zijn fysiologische eigenschappen. De berekende kinetische parameters zijn daarom systeemafhankelijk en kunnen niet gebruikt worden als algemene waarde. Bestaande biofilmmodellen houden geen rekening met meer-dimensionale biofilminhomogeniteit en de parameters verkregen met deze inhomogene biofilms hebben geen algemene waarde. Het resultaat van deze modellen is alleen gerelateerd aan een bepaald systeem en kunnen niet algemeen worden gebruikt.

## A4 ONTWIKKELING METHODES VOOR BIOFILM STUDIE

### A4.1 Gevoelige acetaatbepaling

Meten van residuele acetaatconcentraties in chemostaatcultures met zeer gevoelige acetaatbepaling

De zeer lage concentraties acetaat werden gemeten volgens de methode beschreven door King [22]. Acetaat wordt door acetyl-CoA-synthase gekoppeld aan CoA waarbij AMP vrijkomt.



Het vrijgekomen AMP kan zeer gevoelig ( $< 1 \mu\text{M}$ ) met de HPLC worden gemeten.

#### *Methode*

Allereerst werd alle glaswerk goed schoongemaakt en geautoclaveerd bij  $120^\circ\text{C}$ . Aan 1.0 ml monster werd volgens voorschrift [22]  $10 \mu\text{l}$  van de BSA-, ATP-, CoA- en Acetyl-CoA-synthase-stock toegevoegd, 1 uur geïncubeerd bij  $37^\circ\text{C}$ , vervolgens 2 minuten bij  $100^\circ\text{C}$  gezet. Na 5 minuten centrifugatie werd het monster op ijs bewaard. Nadat het monster was afgekoeld werd  $20 \mu\text{l}$  in de HPLC geïnjecteerd. De AMP-piek werd gemeten bij  $254 \text{ nm}$ . De data werden geanalyseerd met een integrator waarbij de basislijn bijgesteld kon worden. De gevonden oppervlaktes werden aan acetaatstandaarden gerelateerd.

#### *Stock-oplossingen*

acetyl-CoA-synthase	20 U.ml <sup>-1</sup> demi
CoA	38.4 mg in 5 ml demi
ATP	10 mM in demi
BSA	200 $\mu\text{g}$ .ml <sup>-1</sup> demi

#### *Gegevens HPLC*

HPLC	1090, Hewlet-Packard, Inc.
Kolom	10 cm, 4.6 mm silica
Loopvloeistof	0.1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 6.0)
Temperatuur	40 °C
Loopsnelheid	1.0 ml.min <sup>-1</sup>
AMP	A <sub>254</sub>
Detector	HP 1040A-D.A.D.
Integrator	HP 3390
Calibratie	AMP of bekende hoeveelheid acetaat met het reactie (enzym)
mengsel ijklijn	0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{M}$

#### *Chemostaat cultures*

Fermentoren (1.5 l) van Applikon werden gebruikt. Het volume werd constant gehouden door een peristaltische pomp, welke gekoppeld was aan een Applikon level detector. De pH werd constant (8.0) gehouden door automatische titratie van 1 M KOH en 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De cultuur werd doorborreld met lucht (0.5 l.min<sup>-1</sup>), de roersnelheid was 800 rpm en de



luchtverzadiging was 80 %. Mineraal medium beschreven door van Schie *et al.* [52] werd gebruikt. Na sterilisatie werd steriel acetaat en nitraat aan het medium toegevoegd. De chemostaat was voorzien van een extra uitgang voor monstername. *Thiosphaera pantotropha* LMD 89.149 werd in deze experimenten gebruikt.

### *Monstername*

Een snelle monstername is van essentieel belang in deze experimenten. Een snellere monstername dan de gebruikelijke methode is ontwikkeld door gebruik te maken van een extra uitgang (een lange rechte buis tot halverwege de cultuur). Voor monstername werd overdruk in de chemostaat opgebouwd door de afgasslang dicht te knijpen. De cultuur werd via deze extra uitgang uit de fermentor gedrukt. De cultuur werd direct over een nitrocellulose filter geleid. De cultuur werd onder vacuum afgezogen door een waterstraalpomp en het filtraat werd op ijs opgevangen. De gehele monstername nam 5 tot 10 seconden in beslag.

### *Filters*

Er zijn nitrocellulose filters met een poriegrootte van 0.2 en 0.45  $\mu\text{m}$  gebruikt, echter er werd geen verschil waargenomen. Tijdens deze experimenten is gebruik gemaakt van filters met een poriegrootte van 0.2  $\mu\text{m}$ .

Gecontroleerd is of er geen acetaat aan het filter bleef hangen. Als controle werd een zelfde hoeveelheid acetaat afgedraaid en ingespoten. Er werd geen verschil waargenomen, zodat geconcludeerd mag worden dat geen significante hoeveelheid acetaat aan het filter hecht.

## A4.2 Confocale Scanning Laser Microscoop (CSLM)

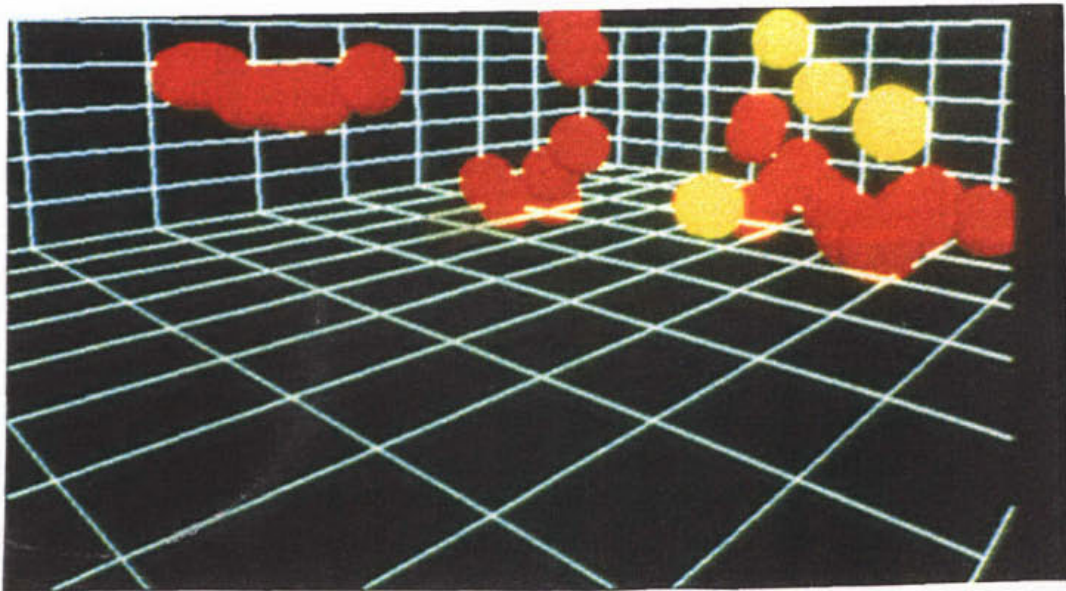
De CSLM is gebruikt voor identificatie en localisatie van organismen in een biolaag. De CSLM is ontstaan uit de behoefte om hoge resolutie opnamen te krijgen van waterige biologische objecten. De electronenmicroscoop heeft vanzelfsprekend een hoge resolutie, maar een nadeel is dat de preparaten watervrij moeten zijn. Anderzijds is het oplossend vermogen van de lichtmicroscoop beperkt. De CSLM combineert de voordelen van beiden. Om de cellen zichtbaar te maken met de CSLM moeten de cellen gekleurd worden met een fluorescerende stof. In deze experimenten is gebruik gemaakt van specifieke (gereduceerde) antilichamen voorzien van het label FITC.

In dit onderzoek is gekeken naar de eventuele mogelijkheden van de CSLM in de identificatie en localisatie van individuele cellen in artificiële biolagen. Als modelsysteem is in eerste instantie gekozen voor een "kunstmatige" biofilm, omdat natuurlijke biofilms veel te complex zijn voor dit soort inventariserende experimenten. De biofilms bestonden uit een dun laagje 0.5 % low-melting agarose (0.5 mm dik) met daarin een homogeen verdeelde suspensie van *T. pantotropha*. De cellen werden voordat ze geïmmobiliseerd werden gekleurd met FITC-gelabelde antilichamen opgewekt tegen *T. pantotropha*. Deze experimenten hebben aangetoond dat *T. pantotropha* gekleurd met FITC-gelabelde antilichamen in 3-D opnamen te visualiseren is. Figuur A14 is een voorbeeld van een stereo opname die van de agaroselaagjes gemaakt werd en figuur A15 is de drie-dimensionale weergave hiervan. Met de CSLM konden cellen tot ongeveer 10  $\mu\text{m}$  diep zichtbaar worden gemaakt, daarna nam de scherpte van de opnamen af. Dit is misschien het gevolg van verstoring veroorzaakt door de tussenliggende cellagen of van de optische eigenschappen van agarose (met name de brekingsindex). Hierbij moet bedacht worden dat de CSLM ontwikkeld is voor objecten in



een waterig milieu. Gezien deze bevindingen leek de CSLM goede mogelijkheden te bieden voor het biofilmonderzoek.

Door deze bevindingen werd besloten om verder te gaan met een meer natuurlijke biofilm. De *T. pantotropha* cellen werden homogeen verdeeld in agarosebolletjes (5 %) met een diameter van 4.9 mm. Dit systeem is fysiologisch [18], zodat getracht kan worden een relatie te leggen tussen de plaats van de cellen in een artificiële biofilm en de fysiologie van deze systemen. De bolletjes werden in een reactor als een continue cultuur gekweekt. Op verschillende tijdstippen werden bolletjes uit de reactor gehaald, gekleurd en met de CSLM



Figuur A14 CSLM-opnames van micro-organismen geïmmobiliseerd in agar.  
 (a) stereoscopische opname, (b) ruimtelijke verdeling van micro-organismen, beeld na bewerking van de stereoscopische opname.

bekeken. Op deze manier werden bolletjes met verschillende celdichtheden verkregen. Het achteraf kleuren van de cellen met FITC-gelabelde antilichamen in de agarose gaf problemen. De cellen in de agarose werden zwak gekleurd, vooral als de kolonies nog erg klein waren.



De achtergrondkleuring daarentegen bleek redelijk hoog te zijn. Door deze relatief hoge achtergrondkleuring was het niet mogelijk om met behulp van de CSLM de cellen van de achtergrond te onderscheiden. In deze gevallen zullen snel artefacten geïntroduceerd worden. Om te achterhalen wat er mis ging, zijn experimenten uitgevoerd met verschillende agaroseconcentraties (0.1 - 0.5 %) en wasbuffers (verschillende pH's en zoutconcentraties). Al deze wijzigingen hadden geen positief effect. Tijdens deze experimenten werd verder duidelijk dat de gevormde micro-kolonies al snel te groot werden. Het leek erop dat de cellen te dicht tegen elkaar aanzaten, waardoor na kleuring afzonderlijke cellen niet te zien waren, maar grote fluorescerende kolonies. De problemen met het achteraf kleuren van de cellen in de agarose werden ook niet opgelost door gebruik te maken van gereduceerde antilichamen. De *T. pantotropha* antilichamen werden 'geknipt' met papaïne. Hierdoor onstonden antilichamen die nog maar 1/3 van de oorspronkelijke grootte waren. Aan deze gereduceerde antilichamen werd het label FITC direct gekoppeld.

## A5 DISCUSSIE: Oorspronkelijke doelstellingen en evaluatie.

Het oorspronkelijk doel van het microbiologisch achtergrond onderzoek was (1) het vaststellen van principes en mechanismen in biofilm vorming en (2) het bestuderen van de vraag in hoeverre in biofilm (gehechte) bacteriën fundamenteel anders functioneren dan gesuspendeerde bacteriën. Mochten er geen verschillen gevonden worden, dan kunnen fysiologische gegevens van gesuspendeerde culturen in biofilmmodellen gebruikt worden. Het voordeel hiervan is dat van gesuspendeerde culturen veel bekend is en dat meten aan dit soort systemen veel makkelijker is dan aan biologen.

Een tweede belangrijke vraag was (3) hoe de dynamiek van (kunstmatige) mengsels van bacteriën beïnvloed wordt door het al of niet gehecht zijn van de bacteriën. Tenslotte was een afgeleid doel het verder geschikt maken van (4) kweekmethoden en (5) analyse methoden voor de studie van de kinetiek/dynamiek van de groei van bacteriën in suspensies en biofilms.

De basisprincipes van hechting (1) zijn bestudeerd met behulp van rein -en mengcultures. Voor het behandelen van (2) en (3) dient het gedrag van bacteriën in suspensies vergeleken te worden met dat in gehechte toestand in een biofilm. Een eenduidige vergelijking dient bij voorkeur te geschieden met goed gedefinieerde bacterie-systemen. Daarom is voor het beantwoorden van deze vragen gekozen voor het werken met (mengsels) van reïncultures van geschikte model-organismen.

In het voorafgaande hoofdstuk zijn de resultaten van het onderzoek behandeld. Hierin is eerst het werk met suspensies van reïncultures besproken en daarna het gedrag van bacteriën in gehechte toestand in een biofilm. In het volgende zal dit werk nu in samenhang worden besproken.

### Keuze van modelorganismen.

Als criteria voor de keuze van modelorganismen zijn gekozen

- a) bacterie is afkomstig uit een biofilm en kan in reïncultuur hechten
- b) organisme is een facultatief denitrificerende, zodat nitraat/nitriet i.p.v. van zuurstof kan worden gebruikt bij het kweken van biofilms. Hiermee wordt de gemakkelijk optredende zuurstoflimitatie in een biofilm omzeild.
- c) er dient reeds veel basis-kennis aanwezig te zijn betreffende de fysiologie van de modelorganismen in suspensie-cultures
- d) organismen zijn relevant voor een proces dat van belang is voor afvalwaterzuivering, in dit geval (nitrificatie)/denitrificatie.

*Thiosphaera pantotropha*. De keuze was op dit organisme gevallen omdat het een facultatief aerobe, denitrificerende bacterie is, die zich leent voor de studie van biofilms met een aerobe of anaerobe ademhaling. Een bijkomend voordeel van deze keuze was dat men biofilms kan bestuderen die met elektron-acceptor overmaat (nitraat) kunnen worden gekweekt, terwijl dat met zuurstof praktisch onmogelijk is. Dit organisme is uitvoerig in ons laboratorium bestudeerd, kan in reïncultuur gehecht worden gekweekt en heeft als interessante eigenschap bovendien dat het in staat is tot gecombineerde aerobe nitrificatie/denitrificatie, hetgeen interessant is voor de praktijk van de afvalwaterzuivering.

*Burkholderia G9*. Omdat *T.pantotropha* een onbeweeglijke bacterie is, werd als tweede model-organisme een beweeglijke *Burkholderia G9* gekozen. Dit organisme is eveneens een facultatief denitrificerende bacterie, afkomstig hetzelfde biofilm-type als *T.pantotropha*. Het



organisme kan eveneens goed aan oppervlakten hechten. Dit organisme was met name ook interessant omdat het organisme nitraat voornamelijk in nitriet omzet. Ophoping van nitriet is ook voor de praktijk interessant omdat ophoping hiervan tot remming van de denitrificatie naar stikstofgas kan leiden.

*Alcaligenes faecalis*, stam TUD. Dit organisme is eveneens een facultatief denitrificerend organisme dat alleen kan denitrificeren op nitriet (en dus niet op nitraat). Deze bacterie is uitvoerig op ons laboratorium onderzocht (o.a. i.v.m. lach-gas productie). Het organisme bleek zeer geschikt te kweken in een stabiele mengcultuur met *Burkholderia G9* en daarom geschikt voor het werk aan gedefinieerde mengcultures.

### Vergelijking fysiologie van *Thiosphaera pantotropha* in gehechte en niet gehechte toestand.

Uit hoofdstuk 2.2 is gebleken dat de biofilmen, die beide organismen in reiculture vormden, zeer heterogeen waren. De vergelijkende studies tussen gehechte en gesuspenderde bacteriën moest daarom beperkt blijven tot diegenen die direct relevante gegevens konden verschaffen t.a.v. de groei in biofilms. De metingen die zijn gedaan betroffen twee belangrijke parameters voor de praktijk, die met name in de modelvorming van belang zijn, nl. de maintenance (onderhouds) energie ( $m_s$ ) en de kinetische parameter  $K_s$  (affiniteitsconstante) voor acetaat, dat een belangrijke intermediair is in de afbraak van organische verbindingen in de praktijk.

In de eerste plaats is het gelukt om een ruwe vergelijking te maken tussen de maintenance (onderhouds) energie van *T. pantotropha* in gesuspenderde en gehechte toestand. Hieruit bleek dat deze niet significant verschillen. De  $m_s$  van het organisme in gesuspenderde cultures werd bepaald in continucultuur onder denitrificerende condities. Deze bleek ongeveer 1.75 mmol acetaat per gram biomassa per uur te zijn. Wanneer men dit getal gebruikt voor het berekenen van de groeisnelheden in biofilms blijkt dit getallen op te leveren die goed met directe metingen overeenkomen.

Hooijmans [18] heeft kinetische parameters (o.a.  $K_s$  waarde voor acetaat bij *T. pantotropha*) bepaald in geïmmobiliseerde systemen door zuurstofprofielen in agarose bolletjes op verschillende tijdstippen te meten. De meeste van de kinetische parameters die gevonden werden met geïmmobiliseerde cellen kwamen overeen met die van gesuspenderde cellen. Bij vergelijking van de  $K_s$  van gesuspenderde en geïmmobiliseerde cellen was er geen significant verschil. De berekende  $K_s$  (acetaat) waarden (20-38  $\mu\text{mol/l}$ ) liggen gemiddeld iets hoger, maar wel in dezelfde grootte orde van als de in dit onderzoek gemeten waarden (10-30  $\mu\text{mol/l}$ ). De methode van deze bepaling is echter in alle gevallen indirect, nl. door het meten van zuurstofopname-snelheden als functie van de acetaatconcentratie. Deze waarden blijken nu echter enorm met de waarden, die door ons zijn gemeten met de directe methode, waarbij men de acetaatconcentratie meet als functie van de groeisnelheid in de chemostaat. Deze "echte"  $K_s$  bleek ongeveer 0.1  $\mu\text{mol/l}$  acetaat te bedragen, d.w.z. twee orden van grootte lager (een factor 100-300) dan de indirecte methode.

De door ons met de directe methode gemeten  $K_s$ -acetaat bleek ook afhankelijk te zijn van de biomassaconcentratie. Wanneer de celconcentratie met een factor 10 werd verlaagd bleek de direct gemeten  $K_s$  te stijgen tot ongeveer 10 mM. Er is dus sprake van een dichtheidsafhankelijke kinetiek voor substraatgebruik.



Voor de praktijk van het mathematisch modelleren, b.v. ten behoeve van het doen van voorspellingen, heeft het bovenstaande natuurlijk twee belangrijke consequenties. In de eerste plaats dient men de  $K_s$  voor substraten direct en dus niet indirect via zuurstofmetingen te bepalen. In de tweede plaats moet men rekening houden met een "populatie-dichtheids-effect", en men dient de kinetiek dus bij de voor de vraag relevante populatiedichtheden te meten. Anders gezegd betekent dit ook dat de kinetiek van een zeer dun gezaaide populatie (gehecht of niet gehecht) een sterk afwijkende gedrag kan vertonen. Dit is met name belangrijk als men een systeem opstart. Het is niet onmogelijk dat dit verschijnsel te maken heeft met het bekende effect van de entgrootte. De praktijk heeft nl. geleerd dat het opstarten van een rein of mengcultuur veel sneller gaat met een grote dan met een kleine ent.

### **Gedrag van gesuspendeerde rein-en mengcultures: implicaties voor de praktijk van de nitrificatie/denitrificatie.**

*Thiosphaera pantotropha*. Teneinde een goede vergelijking tussen gesuspendeerde en niet gesuspendeerde (artificiële) mengsels van bacteriën te kunnen doen zijn vele kinetische gegevens van de gebruikte reïncultures een essentiële randvoorwaarde. Deze waren voor *T.pantotropha* reeds eerder verzameld voor aerobe cultures maar nog niet voor anoxische (anaerobe) cultures. De direct gemeten gegevens zijn hierboven al aan de orde geweest. Een complicatie die optrad tijdens het onderzoek was dat *T.pantotropha* ten aanzien van zijn vermogen om aerob te denitrificeren en een gecombineerde aerobe nitrificatie/denitrificatie uit te voeren niet stabiel bleek. Omdat deze activiteiten tijdens het onderzoek steeds lager leken te worden, werd de nitrificatie/denitrificatie met behulp van  $^{15}\text{N}$ -gemarkeerde verbindingen kwantitatief geverifieerd. De activiteiten waren nog wel significant en zeker ook voor de praktijk relevant, maar zeker een factor 10 lager dan vroeger gemeten. Als men de gemeten activiteiten vertaalt naar een afvalwaterzuiveringssysteem (30 g/l VSS, "Volatile Suspended Solids") dan zou men bij een dergelijke dichtheid maximaal 3 kg N per  $\text{m}^3$  per dag kunnen verwijderen. Andere op ons laboratorium onderzochte bacteriën bereiken een activiteit van gecombineerde aerobe nitrificatie /denitrificatie van een factor 5 hoger (o.a. *Alcaligenes faecalis* *stam TUD*). Eerder op ons laboratorium uitgevoerd onderzoek heeft laten zien dat men dergelijke activiteiten alleen zou kunnen bereiken bij zeer hoge C/N verhoudingen ( $> 10$ ) omdat onder die omstandigheden de autotrofe organismen zouden kunnen worden weggeconcurrerd. De relatief ongunstige concurrentiepositie van de heterotrofe nitrificeerders/denitrificeerders maakt dat toepassing van dit soort organismen alleen van toepassing zou kunnen zijn bij een bijzondere samenstelling van het afvalwater. Bij het berekenen van stikstof-balansen van aerobe systemen dient men uiteraard wel met dit aerobe nitrificatie/denitrificatie-proces rekening te houden.

### *Rein -en mengcultures van Burkholderia G9 en Alcaligenes faecalis.*

De fysiologie van *Burkholderia G9* was nog onvoldoende bekend. In een aantal chemostaat studies werden daarom de kinetische en fysiologische karakteristieken bepaald.

*Burkholderia G9* blijkt nitraat zeer efficiënt om te zetten in nitriet, maar zet de nitriet daarna slecht zeer langzaam om naar stikstofgas. Anaeroob hoopt zich dan ook veel nitriet op. Het organisme blijkt in reïncultuur zeer langzaam te groeien, terwijl het toch direct uit een denitrificerende biofilm was geïsoleerd.

*Alcaligenes faecalis TUD* is een organisme dat reeds uitvoerig is bestudeerd op ons laboratorium. Het kan niet op nitraat denitrificeren maar wel nitriet. De nitriet wordt dan tot stikstofgas en vooral ook tot lachgas, dat vervolgens weer door het eerste organisme tot moleculaire stikstof wordt gereduceerd. Aldus is een obligaat koppel van twee bacteriën verantwoordelijk voor de denitrificatie. Het bleek dat de beide organismen zeer goed in een



stabiele mengcultuur te kweken zijn. Interessant is daarbij dat in mengcultuur *Burkholderia G9* alleen energie uit de  $N_2O$  reductie verkrijgt (en dus niet uit de nitrietreductie) en dat *Alcaligenes* uitsluitend energie haalt uit de reductie van nitriet naar  $N_2O$ . Dit hangt vermoedelijk samen met het feit dat de culture acetaat-gelimiteerd is en de beide organismen, in onderlinge afhankelijkheid (mutualisme), dus om de acetaat concurreren (competitie). Voor de praktijk heeft deze kennis betekenis als het gaat om het begrijpen van het proces van denitrificatie en de dynamische veranderingen die daarin plaats kunnen vinden: Men moet er dus rekening mee houden dat denitrificatie niet noodzakelijkerwijs uitsluitend door de klassieke denitrificeerders wordt uitgevoerd, maar ook door "tandems" van het hier beschreven type, en dat dynamische veranderingen in de populatieverhoudingen ook consequenties kunnen hebben voor de rolverdeling van de verschillende organismen. Sterk fluctuaties kunnen b.v. leiden tot de ongewenste ophoping van nitriet (toxisch) en lachgas(broeikas-effect).

Gezien de experimentele problemen met het kweken van biofilmen (zie hieronder) is een verdere studie met *Burkholderia G9* en met *A. faecalis TUD* in gehechte mengcultures, mede door tijdgebrek, achterwege gebleven.

#### **Principes en mechanismen van hechting.**

Voor de studie van de fysiologie van biofilms werd gekozen voor een zeer bekende biofilm-reactor. Initiële experimenten op ons laboratorium wezen uit dat deze reactor ook voor ons doeleinde geschikt zou kunnen zijn. Dit bleek echter slechts ten dele het geval. De voor de fysiologie relevante resultaten zijn hierboven aan de orde geweest. Het onderzoek heeft laten zien dat het kweken van homogene biofilms praktisch onmogelijk is in deze reactoren. Er is echter wel meer inzicht verkregen in de wijze waarom bacteriecellen hechten en groeien en het belang van de hydrodynamica voor de vorming/opbouw van de biofilm.

De RotoTorque-reactor [9] wordt in de literatuur beschreven als een biofilmreactor, waarbij homogene biofilms gevonden worden. In de RotoTorque-reactor zijn verschillende organismen gekweekt. Zowel de beweeglijke (*B. pickettii*, *P. aeruginosa*) als de niet-beweeglijke (*T. pantotropha*) organismen waren niet in staat homogene biofilms te vormen. Om kinetische parameters te bepalen en te modelleren is het van belang dat gebruik wordt gemaakt van homogene biofilms. De gegevens die hier beschreven zijn, maken duidelijk dat de biomassa per oppervlak van een monsternameplaatje niet representatief is voor het gehele reactoroppervlak. Oftewel, de biofilmconcentraties op de verschillende plaatjes waren niet gelijk. Grote gradiënten zijn gevonden op individuele plaatjes. Omdat het niet mogelijk is representatieve biomassamonsters uit de RotoTorque-reactor te nemen is de reactor slechts in beperkte mate geschikt voor kwantitatieve fysiologische of kinetische biofilmstudies (onderhoudsenergie, substraatverzadigingsconstanten), waar het van essentieel belang is om de totale hoeveelheid actieve biomassa in de reactor te weten. Door de inhomogeniteit van de biofilms zullen bepaalde plekken dikkere biofilms bevatten dan de gemiddelde waarde. Hierdoor kunnen anaerobe zones ontstaan in aerobe biofilms, die een heel andere fysiologie bezitten. De reactor kan wel gebruikt worden voor morfologische en "black-box" biofilmstudies.

De problemen gevonden bij de RotoTorque-reactor zijn niet uniek. Ook in "flow cells" en tubulaire reactoren is het moeilijk substraatgradiënten en inhomogene afschuifkrachten ("shear") te vermijden. Experimenten met een airliftreactor op laboratoriumschaal en een fluïde-bed reactor [2] hebben ook voor grote problemen gezorgd. De biomassa hechte niet alleen aan het dragermateriaal, maar ook aan de reactorwand en in de medium- en recirculatie-slangen. De afslag van de biomassa was erg hoog. Dit leidde tot een enorme hoge biomassaconcentratie in het effluent. In deze reactoren was het ook niet mogelijk



representatieve biomassamonsters te nemen, zodat het niet mogelijk is kwantitatieve fysiologische studies in deze systemen uit te voeren. Voor de kwantitatieve vergelijking van de fysiologie en kinetische eigenschappen tussen gesuspendeerde en gehechte micro-organismen is het van essentieel belang nieuwe, meer bruikbare biofilmreactoren te ontwikkelen.

Het kweken van rein-cultures van *T.pantotropha* in een fluide bed reactor bleek eveneens onvoldoende reproduceerbare biofilms te geven. De fluide bedreactoren zijn echter op lab reeds eerder met succes toegepast op mengculturen-onderzoek. Het kweken van mengpopulaties in de BAS reactoren, in het parallel lopende onderzoek aan complexe mengcultures (deel B) is daarentegen succesvol geweest. De conclusie is dan ook dat voor de praktijk relevante werk aan biofilms bij voorkeur dient te geschieden met (complexe) mengcultures, totdat betere inzichten en methodes beschikbaar zijn om dit ook met rein- of artificiële mengpopulaties te doen.

### **Nieuwe technieken voor biofilm onderzoek:**

#### **A) Confocale Scanning Laser Microscopie**

Als afgeleid onderzoek is in samenwerking met de groep Nanninga/Woldringh (UvA) uitvoerig onderzoek gedaan naar het gebruik van de Confocale Scanning Laser Microscopie (CSLM) voor het bestuderen van niet gefixeerde preparaten. De conventionele lichtmicroscopie biedt geen mogelijkheden tot een studie van de driedimensionale structuur van een biofilm, terwijl de conventionele Elektronen-microscopie veel last heeft van artefacten, die de interpretatie van driedimensionale beelden bemoeilijken. De CSLM wordt gezien als een veelbelovende techniek die de bovenstaande problemen zou kunnen oplossen/omzeilen, omdat het hier om een methode gaat, die op levende preparaten kan worden uitgevoerd en in feite een drie-dimensionaal beeld kan geven.

Doel was met behulp van bacteriesoort-specifieke kleuringen, met name met fluorescerende antilichamen, de ruimtelijk ligging van verschillende types cellen te kunnen meten. Dit onderzoek heeft zeer vele basale problemen van de CSLM techniek aan het licht gebracht. Het blijkt mogelijk cellen in een biofilm te observeren tot een diepte van ongeveer 10 micrometer. Men kan ze dan echter meestal niet op soort onderscheiden. Hoofdconclusie is dat de voor dat doel gebruikte specifieke fluorescerende antilichamen, zelfs als ze met speciale technieken verkleind worden, veel te langzaam door de gel-structuur van de biolaag diffunderen om een efficiënte en specifieke kleuring mogelijk te maken. Er zal een apart onderzoek op dit gebied worden opgezet om de fundamentele problemen eerst uit te zoeken voordat het voor deze toepassing geschikt is.

#### **B) Techniek voor directe bepaling van in situ acetaat-concentraties**

Een laatste belangrijke techniek die is ontwikkeld betreft het snelle monsternemen van cultuurvloeistof voor de bepaling van de in situ concentratie van essentiële groeibeperkende nutriënten. Wij hebben gekozen voor de bepaling van acetaat dat zowel in het laboratorium als ook in de praktijk een zeer belangrijk substraat is. Mits men gebruik maakt van een snelle scheiding van cultuurvloeistof en biomassa, blijkt mogelijk te zijn in dichte suspensies van microorganismen ( $10^8$ - $10^{10}$  cellen/ml) de residuele acetaatconcentratie te bepalen. Men maakt dan gebruik van een biochemische methode, die van een HPLC met een speciale detector gebruik maakt, met een detectiegrens van ongeveer 0.8 micromol/l (30 microgram/liter). Met deze methode is reeds door anderen ervaring opgedaan en wij hebben hiermee de genoemde kinetische parameters kunnen bepalen. Deze aanpak leent zich ook voor het meten van lage concentraties van acetaat in afvalwaterzuiverings-systemen. Uiteraard zal daarbij een snelle monsternamen nodig zijn.



## A6 CONCLUSIES

- Met behulp van chemostaat cultures zijn een aantal kinetische parameters van groeiende suspensie cultures van het gekozen model-organisme, *Thiosphaera pantotropha*, zoals  $K_s$  en  $m_s$  nauwkeurig bepaald. Deze parameters blijken in biofilm niet in belangrijke mate af te wijken. Er zijn aanwijzingen dat dit ook voor veel andere organismen opgaat. Dit zou impliceren dat men de kinetische parameters verkregen uit metingen aan suspensie-cultures mag gebruiken voor organismen die in biofilms groeien. Uiteraard, dient men dan wel nauwkeurig de condities van de biofilm te kennen en dient men daarin ook diffusie e.d. in te betrekken.
- Metingen van de  $K_s$ -waarden toonden aan dat deze parameter bij lage populatiedichtheden ( $< 10^7$  cellen/ml) een factor 100 hoger kan worden. Bij mathematische modellering is dit derhalve een effect waarmee terdege rekening dient te worden gehouden en het betekent dus ook dat dit soort kinetische gegevens moeten worden gemeten onder voor de praktijk relevante condities.
- Nader fysiologisch onderzoek betreffende de gecombineerde aerobe nitrificatie/denitrificatie door *T.pantotropha*, o.a. met massaspectrometrie van de gevormde gassen, heeft laten zien dat deze eigenschap niet voldoende stabiel in het organisme aanwezig is. Activiteiten zijn tienmaal lager dan voorheen gerapporteerd. Andere organismen vertonen hogere activiteiten (tot een factor 5), maar de voor dit proces noodzakelijke hoge C/N-verhouding van het afvalwater maakt de toepassing van dit proces voor nitrificatie/denitrificatie minder aantrekkelijk.
- De mengpopulatie-experimenten hebben inzicht gegeven in mechanismen die in biofilms aanwezig zouden kunnen zijn. Organismen die alléén niet in staat zijn volledig te denitrificeren kunnen dit wél in elkaars aanwezigheid. Tussen de organismen *B. pickettii* G9 en *A. faecalis* is een duidelijke interactie aanwezig. Aangezien de denitrificatie effectief plaatsvindt, is het een interessante vraag in hoeverre dit tandem met succes zou kunnen concurreren met organismen die de gehele denitrificatie-route bezitten.
- De RotoTorque-reactor is een minder geschikte reactor om fysiologische en kinetische parameters aan geïmmobiliseerde systemen te meten. Het is desondanks met behulp van een denitrificerende biofilm van *T.pantotropha*-cultuur gelukt om de onderhouds-energie-coëfficiënt te bepalen.
- Door gebruikmaking van een zeer gevoelige detectiemethode van acetaat is het mogelijk gebleken de  $K_s$ -acetaat te bepalen met een directe methode, nl de concentratie acetaat als functie van de groeisnelheid in de chemostaat. Het blijkt dat deze waarden een factor 100 lager liggen dan  $K_s$ -waarden bepaald via een indirecte methode, waarbij de zuurstofconsumptiesnelheid werd gemeten als functie van de acetaatconcentratie.
- Het is niet mogelijk om homogene biofilms te verkrijgen in de RotoTorque-reactor. Howel de mengtijden in de reactor in de orde van secondes liggen treden t.g.v. de hydrodynamica grote lokale verschillen in de biofilm op.



- De CSLM biedt voorlopig beperkte mogelijkheden voor biofilmonderzoek. Men kan de ruwe driedimensionale verspreiding van microorganismen in een levende, niet gefixeerde, biofilm tot enkele tientallen micrometers diep registreren, maar het is vooralsnog niet mogelijk gebleken met specifieke kleuringen een beeld te krijgen van de verdeling van verschillende soorten. Verder onderzoek moet uitwijzen of de CSLM een bijdrage kan leveren aan de identificatie en localisatie van specifieke organismen in biofilms.







## DEELPROJECT B: PROCESKINETISCHE ASPECTEN

### B1 INTRODUCTIE

Gedurende de vierjarige onderzoeksperiode is, in nauw overleg met de begeleidingscommissie, het onderzoek, naar de proceskinetische aspecten van biofilmvorming in BAS-reactoren, uitgekristalliseerd rond een drietal thema's. Deze kunnen biofilmvorming, biofilmafslag en biofilmheterogeniteit. In de volgende paragrafen zullen deze drie thema's verder worden toegelicht. Deze drie thema's lopen als een rode draad door dit onderdeel van het rapport. In de thema's biofilmvorming en biofilmafslag komen de factoren van surplusslibproductie, de rol van gesuspendeerde microorganismen op de biofilm en de snelheid van aangroei, dikte en geometrie aan de orde. Hierin zijn zowel koolstofoxyderende als nitrificerende biofilms aan de orde gesteld en zijn de verworven inzichten van biofilmdynamica op praktijkschaal bevestigd. In het thema heterogeniteit wordt ingegaan op de microbiële samenstelling, waarbij de interactie van heterotrofe en nitrificerende microorganismen in de biofilm is bestudeerd. Daarnaast is het transport van gesuspendeerde deeltjes naar en uit de biofilm bestudeerd. In elk van deze drie thema's zijn elementen van de modelmatige beschrijving van de biofilms ontwikkeld. De ontwikkeling van een compleet wiskundig model is echter niet mogelijk gebleken door de complexiteit van het biofilmproces. Wel zijn gedurende het project de verworven inzichten over biofilmvorming en de nitrificatie-experimenten met succes toegepast in de opstart van de praktijkinstallatie bij Gist-brocades en bij de opstart van een nitrificerende pilotreactor voor nitrificatie van perswater bij de rioolwaterzuiverings-installatie in Utrecht.

#### B1.1 Biofilmvorming

Het was bij aanvang van het project niet bekend bij welke reactorcondities, met name hydraulische verblijftijd en substraatbelasting, biofilms tot ontwikkeling komen op oppervlakken. Heijnen postuleerde dat biofilmvorming optreedt bij hydraulische verblijftijden die korter zijn dan de inverse van de maximale groeisnelheid van de microorganismen. Bij langere vloeistofverblijftijden zullen de gesuspendeerde microorganismen een competitievoordeel hebben ten opzichte van gehechte microorganismen. Veel auteurs vermelden dat microorganismen hechten aan de wand van de reactor bij hydraulische verblijftijden korter dan de inverse van de maximale groeisnelheid. In biofilmresearch wordt veelal een verblijftijd ingesteld die korter is dan de inverse van de maximale groeisnelheid om gesuspendeerde microorganismen te verwijderen. De hypothese van Heijnen is tot dusver nog niet geverifieerd over een range van verblijftijden en substraatbelastingen.

De vorming van biofilms is het resultaat van verschillende processen. Hieronder vallen adsorptie en desorptie van microorganismen op het oppervlak, biofilmgroei en biofilmafslag [9]. De adsorptie van microorganismen op diverse oppervlakken is uitvoerig bestudeerd. Experimentele informatie over de ontwikkeling van geadsorbeerde microorganismen naar biofilms is schaars.

De manier waarop biofilms zich vormen op gesuspendeerde deeltjes, indien de juiste condities zijn ingesteld, is nog nauwelijks bestudeerd. De enige beschikbare informatie is verkregen door studie van vlakke biofilms in annulaire reactoren (bijv. Roto Torque-reactoren) waarin echter vooral adsorptie op verschillende oppervlakken is bestudeerd. De snelheid van aangroei en de manier waarop dit gebeurt van heterotrofe of nitrificerende biofilms op gesuspendeerde dragers is amper onderzocht.

Een ander belangrijk aspect in afvalwaterreactoren is het beïnvloeden van de



biomassaproductie. Uit systemen met gesuspendeerde biomassa is bekend dat de opbrengst afneemt bij dalen van de groeisnelheid. Dit wordt verklaard met het maintenanceconcept (met als parameter de maintenancecoëfficiënt). Het is niet goed bekend of dit concept ook geldt voor biofilmbiomassa. Hiernaast ontbreekt inzicht in de factoren die de maintenancecoëfficiënt beïnvloeden. Gezien het belang van deze parameter voor de slibproductie in het algemeen is daarom een literatuurstudie verricht op dit gebied.

## B1.2 Biofilmafslag

Biofilmafslag is gedefinieerd als het transport van delen van een bestaande biofilm naar de bulkvloeistof. Biofilmafslag is onderverdeeld in een viertal verschillende processen [10]. Begrazing is het consumeren van de buitenste laag van de biofilm door, bijv., protozoa. Erosie is de continue afslag van kleine delen van het biofilmooppervlak en wordt voornamelijk veroorzaakt door vloeistofafschuifkrachten langs het oppervlak. Schuren (abrasion) is vergelijkbaar met erosie maar wordt veroorzaakt door contact (botsingen) van de biofilm met deeltjes. Schilferen (sloughing) is het spontaan verlies van (grote) stukken biomassa uit de biofilms.

Biofilmafslag is sterk afhankelijk van de biofilmreactor. Erosie zal het dominante afslagproces zijn in biofilmreactoren zoals de roterende annulaire reactor en in diverse filters. Schuren is waarschijnlijk het bepalende mechanisme in reactoren met gesuspendeerde deeltjes, zoals de BAS-reactor en fluïde-bedreactoren. Literatuurgegevens van sterk verschillende reactorsystemen laten een dominerende rol van de biofilmafslag tijdens de biofilmvorming zien. Tijdens de vorming van biofilms in een gepakte kolom gevuld met geactiveerd kool met fenol en paranitrofenol als substraat werd respectievelijk 33% en 75% van de geproduceerde biomassa afgeslagen [40]. Tijdens de vorming van *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in een Roto Torque-reactor, bij verschillende substraatbelastingen en vloeistofafschuifkrachten, werd tussen de 85% en 95% van de geproduceerde biomassa afgeslagen [31]. Hoewel afslag een dominante factor is tijdens de biofilmvorming is er over de afslagmechanismen weinig bekend en is afslag slechts zelden bestudeerd. In dit onderzoek is nagegaan hoe de reactorgeometrie, superficiële gassnelheid, de aanwezigheid van kale drager en het wel of niet voeden van de biofilm invloed heeft op de afslag.

## B1.3 Biofilmheterogeniteit

Vrijwel alle natuurlijke biofilms bestaan uit meer dan één microorganisme en deze zijn in constante competitie voor substraat en ruimte in de biofilm. De microbiële samenstelling van de biofilm wordt voornamelijk beïnvloed door microbiële groei in de biofilm. De gradiënten van de verschillende substraten nodig voor groei bepalen de lokale groeisnelheid van de microorganismen en op deze manier de competitie in de biofilm. De biofilmdikte, en hiermee de substraatgradiënten in de biofilm, wordt sterk beïnvloed door de biofilmafslag. Op deze manier heeft afslag een belangrijke invloed op de microbiële samenstelling van de biofilm.

Door de diffusiegradiënten kunnen verschillende zones aanwezig zijn in de biofilm [54]. Simulatieprogramma's die de gelaagde groei van microorganismen kunnen beschrijven, zijn ontwikkeld [34]. Deze eendimensionale simulatieprogramma's voorspellen in het algemeen dat langzaam groeiende microorganismen, zoals nitrificerders, aanwezig zijn in de binnenste lagen van de biofilm, terwijl snelgroeiende microorganismen aan de buitenkant zitten. Zo'n gelaagde structuur kan problemen opleveren omdat de bacteriën dieper in de biofilm sterker



worden beïnvloed door diffusielimitatie dan microorganismen aan de buitenkant. De ammoniumomzetting zou dan sneller negatief worden beïnvloed door variaties in substraatbelasting. Aan de andere kant worden de langzaam groeiende microorganismen afgeschermd van de afslag aan het biofilmoppervlak door de snel groeiende microorganismen. De bestudering van de biofilmheterogeniteit wordt bemoeilijkt doordat adequate meetmethodes ontbreken. Een elegante methode is het gebruik van een microtoom waarmee biofilms in dunne laagjes met een dikte van 10-20  $\mu\text{m}$  kunnen worden gesneden. Bij het gebruik van deze methode moet de biofilmdikte goed gemeten en gecontroleerd kunnen worden, omdat voor het snijden de biofilm bevroren of in een gel geïmmobiliseerd moet worden. Een ander nadeel is dat door de meetmethode de biofilm vernietigd wordt.

Micro-elektrodes zijn in ontwikkeling sinds het einde van de jaren zeventig en ze worden veelvuldig toegepast voor de bestudering van biofilms. Deze elektrodes kunnen lokale informatie geven over substraatgradiënten in de biofilm. Op basis van deze informatie kan de verdeling van populaties in de biofilm bepaald worden. Een betrekkelijk nieuwe techniek is de confocale laser scanning microscoop (CLSM). Om dit apparaat te gebruiken voor het onderscheiden van populaties in de biofilm moeten de bacteriën gelabeld worden met, bijvoorbeeld, antilichamen die de biofilm moeten kunnen penetreren.

Een ander belangrijk aspect is het transport van microorganismen en kleine deeltjes vanuit de vloeistof naar de biofilm en het daarop volgende transport in de biofilm. Over deze transportprocessen is slechts zeer weinig bekend. De dynamica van kleine deeltjes wordt bepaald door adsorptie, afslag, groei van microorganismen en advectioneel transport in de biofilm. In bestaande biofilmmodellen vinden adsorptie en afslag uitsluitend plaats aan het biofilmoppervlak, terwijl groei en advectioneel transport plaatsvinden in de biofilm. Er is maar weinig experimenteel bewijs voor de capaciteit van de biofilmmodellen om deze transportprocessen kwantitatief te beschrijven.



## B2 MATERIALEN EN METHODEN

In dit hoofdstuk wordt kort de experimentele uitvoering van het onderzoek aangegeven. Exacte beschrijvingen staan in het proefschrift van Tijhuis [41]. Gedurende het onderzoek is gebruik gemaakt van laboratoriumschaal (2 tot 3 l) airliftreactoren met driefasenscheider, zoals schematisch weergegeven in figuur B1. De maatvoering van de reactoren komt overeen met de laboratoriumschaal-reactoren zoals gebruikt door Gist-brocades en TNO. In bijlage A staat een schematische en fotografische weergave van de reactoren en de randapparatuur zoals die gebruikt zijn tijdens de experimenten. In alle experimenten is gewerkt met een constante pH van 7, een temperatuur van 30°C en in vrijwel alle gevallen met een constante superficiële gassnelheid ( $2.0 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ). De lucht wordt onderin de kolom gedispergeerd door een bruissteentje. Dit bestaat uit een poreus steentje van gesinterd glas, dat onderaan de luchtaanvoerbuïs is bevestigd. Het steentje bevindt zich vlak boven de bodem van de reactor. Er is gewerkt met basalt (diameter 0.3 mm) als dragermateriaal in een concentratiebereik van 60 tot 150  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Dit materiaal is identiek aan het materiaal dat wordt gebruikt in de praktijkinstallatie bij Gist-brocades [13]. In het applicatiegericht onderzoek van TNO is gebruik gemaakt van lava [21, 28]. De reactoren zijn open zodat een gemengde, natuurlijke populatie zich kon ontwikkelen. Voor de heterotrofe en nitrificerende biofilmstudies is gewerkt met een modelafvalwater. Hierin is acetaat als koolstofbron gebruikt en ammonium als stikstofbron. Voor heterotrofe biofilmvorming is de reactorbelasting gevarieerd tussen 2.5 en 7.5  $\text{kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ , terwijl de nitrificatiebelasting gevarieerd is tussen 0.75 en 5  $\text{kgN}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ . Het modelafvalwater was enkele malen geconcentreerder en werd vlak voor de reactor opgemengd met kraanwater. Op deze manier kunnen de substraatbelasting en de verblijftijd onafhankelijk van elkaar gevarieerd worden. In bijlage C is de samenstelling gegeven van de media zoals gebruikt tijdens heterotrofe en nitrificerende biofilmexperimenten. Tevens is de algemene samenstelling gegeven van het medium dat gebruikt is tijdens experimenten waarbij gelijktijdig nitrificatie en organisch koolstofoxidatie plaatsvonden.

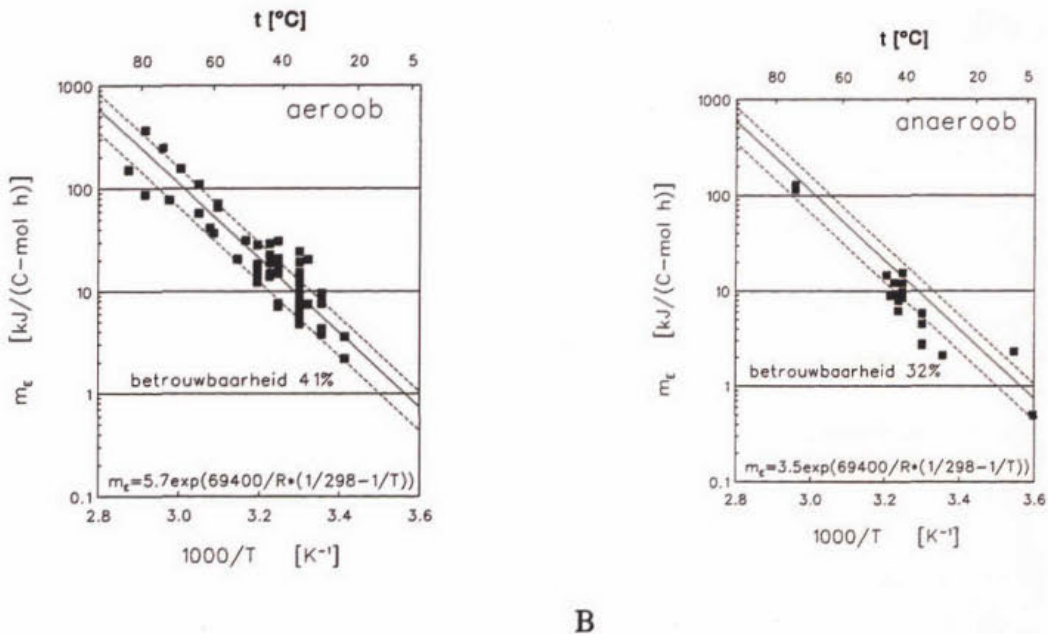
De volgende standaardanalyses zijn uitgevoerd. In de ingaande en uitgaande vloeistof: totaal organisch koolstof, acetaat, ammonium, gesuspendeerde biomassa. Aan de vaste stof is de biomassa op drager bepaald. Tevens zijn de zuurstof- en kooldioxideconcentratie in de in- en uitgaande gasstroom gemeten. Er is standaard gecheckt op het sluitend zijn van de koolstof-, stikstof- en reductiegraadbalansen ten einde te bepalen of er geen onbekende stoffen werden gevormd. De biofilmvorming is microscopisch gevolgd en geëvalueerd. In een aantal experimenten werd de activiteit van de gesuspendeerde biomassa en van de biofilmdeeltjes bepaald met een Biological Oxygen Monitor (BOM). De opstelling met de BOM staat schematisch weergegeven in bijlage B. De biofilmafslag is gevolgd door het meten van de diameter van de biofilmdeeltjes en het meten van het afgeslagen en uitgespoelde materiaal. Tevens is het afslagproces microscopisch gevolgd. Voor de bepaling van de vastestofverblijftijd is de concentratie van tracerdeeltjes op het oppervlak gemeten met een Image Analyzer gekoppeld met een UV-microscoop. Tevens is de verdeling van tracerdeeltjes in een biofilm gevolgd met een confocale scanning laser microscoop (CLSM). Voor de bepaling van de verdeling van de verschillende soorten microorganismen is gebruik gemaakt van zuurstofmicroelektrodes [18].



## B3 BIOFILMVORMING EN PRODUCTIE

## B3.1 Relatie, gebaseerd op de thermodynamica, voor de beschrijving van de maintenance Gibbs-energiebehoefte tijdens aërobe en anaërobe groei [45]

Recentelijk is een op de thermodynamica gebaseerde methode gepresenteerd voor de beschrijving van de maximale groei-yield van biomassa op elektrondonor voor willekeurige chemotrofe systemen onder aërobe, denitrificerende of anaërobe, koolstof/energie gelimiteerde condities. Het is tevens bekend dat de biomassagroei-yield een functie is van de groeisnelheid  $\mu$ . In het algemeen wordt deze afhankelijkheid beschreven met het endogene respiratieconcept van Herbert of het substraatmaintenanceconcept van Marr et al. en Pirt, of een combinatie van beide, zoals voorgesteld door Rhamkrishna et al. en Beeftink et al.. Hier wordt de maintenance-coëfficiënt beschouwd als een 'black box'-parameter die een bruikbare relatie oplevert tussen  $Y_{DX}$  en  $\mu$ . Zo'n relatie kan gebruikt worden voor de beschrijving van, bijvoorbeeld, industriële fed batch fermentaties of de slibproductie in afvalwaterzuiveringsinrichtingen. De hieronder bepaalde thermodynamische relaties zijn gebaseerd op een groot aantal gegevensbestanden uit de literatuur, die zich uitstrekken over: (1) verschillende soorten microorganismen (bacteriën, gisten, plantecellen), (2) mengcultures, (3) groei op organische koolstofbronnen en kooldioxide, (4) aërobe en anaërobe groei en (5) een temperatuurgebied van 5-75°C [45].



Figuur B2 Temperatuurafhankelijkheid van maintenance-coëfficiënten.  
A: anaëroob; B: aëroob

Het effect van de temperatuur op de Gibbs-energie-dissipatiesnelheid voor maintenance,  $m_e$  voor aërobe en anaërobe systemen is weergegeven in de figuur B2. Hoewel er een behoorlijke spreiding is, is in beide gevallen sprake van een duidelijke Arrhenius-temperatuurafhankelijkheid met een activeringsenergie van 69 kJ·mol<sup>-1</sup>. Dit betekent dat de maintenance Gibbs-energie-dissipatiesnelheid verdubbeld bij een temperatuurverhoging van 8 °C. De maintenance Gibbs-energie-dissipatiesnelheid voor anaërobe groeisystemen lijkt wat lager dan voor aërobe groeisystemen. De vergelijkingen in figuur B2 worden gegeven door:

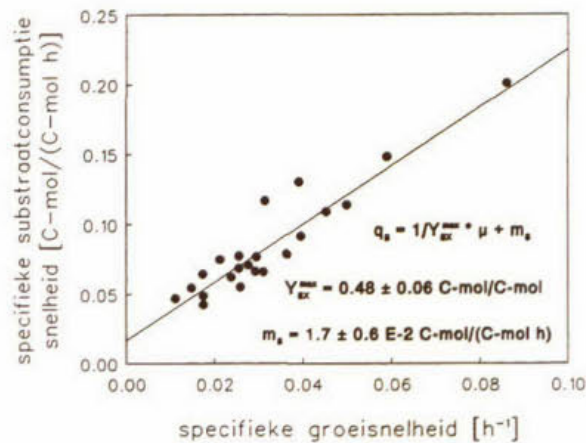


$$m_E = 5.7 \exp \left( \frac{-6.94 \times 10^4}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{298} \right) \right) \quad :a\ddot{e}roob \quad (1)$$

$$m_E = 3.3 \exp \left( \frac{-6.94 \times 10^4}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{298} \right) \right) \quad :ana\ddot{e}roob \quad (2)$$

Uit figuur B2 en de vergelijkingen blijkt dat de maintenancecoëfficiënt geen functie is van de verschillende variabelen in de gegevens bestanden: verschillende organismen (gisten, schimmels, bacteriën, plantecellen, gemengde cultures) en de verschillende elektronendonoren (heterotroof en autotroof). Uit de figuren blijkt dat de maintenance Gibbs-energiedissipatiesnelheid duidelijk afhankelijk is van de temperatuur en in mindere mate van verschillende electronenacceptoren (aëroob en anaëroob).

Voor de biofilmgroei in de airliftreactor is gevonden dat de biomassaopbrengst inderdaad een functie is van de groeisnelheid (figuur B3). De gevonden maintenancecoëfficiënt klopt uitstekend met de vermelde correlatie.



Figuur B3 Specifieke substraatconsumptiesnelheid als functie van de specifieke groeisnelheid; substraatbelasting  $5 \text{ kgCZV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ; verblijftijd 0.67 h.

### B3.2 Vorming van heterotrofe biofilms op kleine gesuspenderde dragers in airlift reactoren [46]

Om het effect van de vloeistofverblijftijd en de reactorbelasting op de vorming van heterotrofe biofilms te bestuderen is een groot aantal 'opstart-experimenten' uitgevoerd. Aan het begin van een experiment werd de reactor gevuld met kaal basalt. In deze experimentenserie werd de substraatbelasting gevarieerd tussen  $2.5$  en  $5 \text{ kgCZV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  en de hydraulische verblijftijd werd gevarieerd tussen  $2$  en  $0.25$  h. Tevens werden de experimenten gesimuleerd met het biofilmmodelleringsprogramma BIOSIM [34].

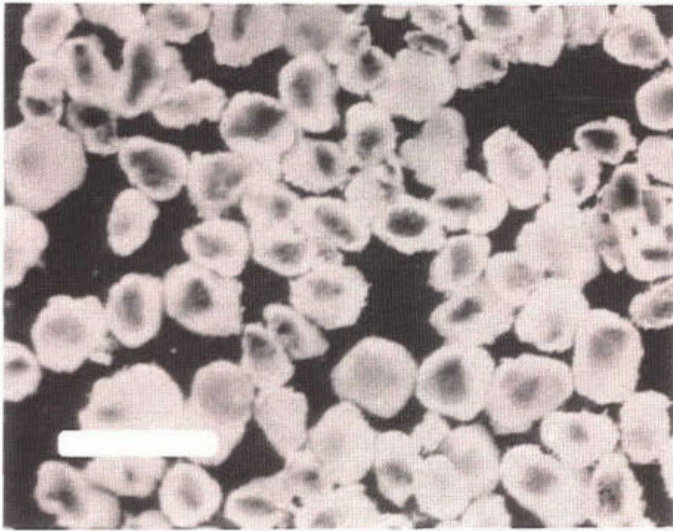
De biofilmvorming op gesuspenderde dragers werd visueel gevolgd en onderverdeeld in een drietal categorieën, figuur B4, [27].





Figuur B4 Stadia tijdens biofilmontwikkeling

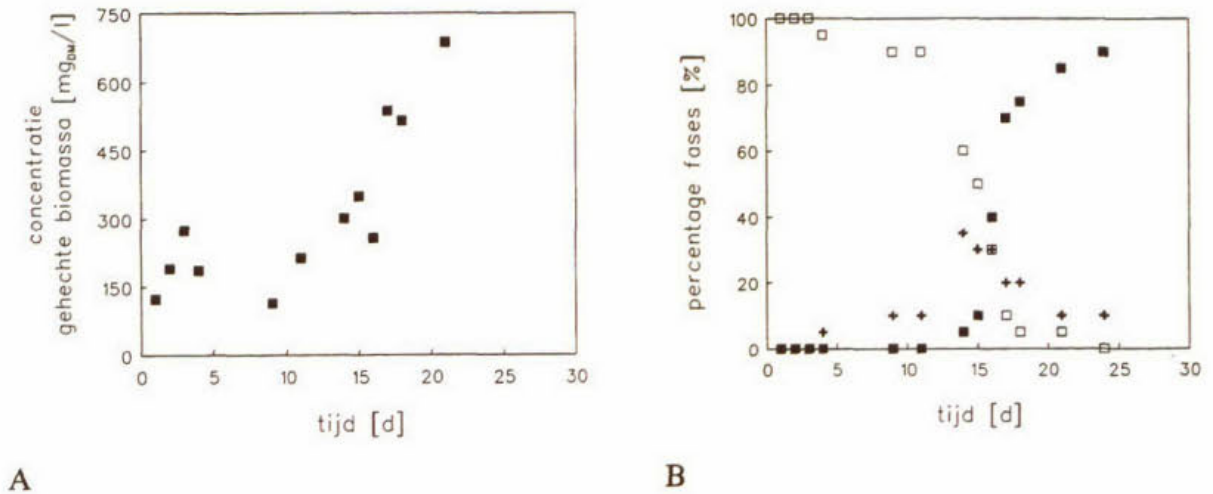
In figuur B5 is een microscopische opname gegeven van de biofilms zoals die zijn gevormd tijdens een experiment bij een korte verblijftijd, 0.67 h en een substraatbelasting van  $5 \text{ kgCZV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ .



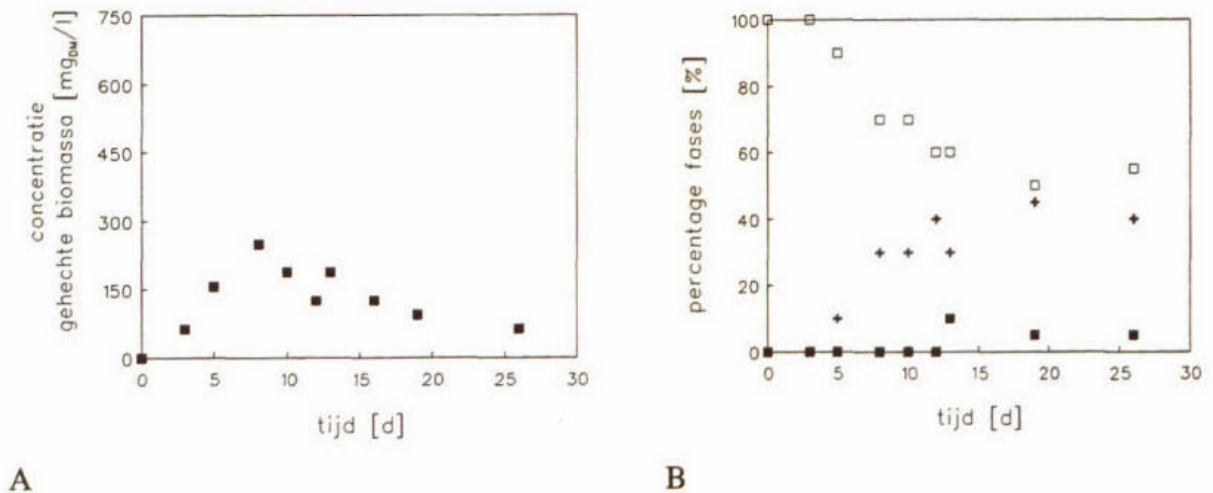
Figuur B5 Microscopische opname van heterotrofe biofilms: verblijftijd 0.67 h,  $5 \text{ kgCZV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ : diameter biofilm

De waarnemingen van deze drie fases, samen met de biomassaconcentratie tijdens twee representatieve opstartexperimenten bij een korte (1 h) en een lange verblijftijd (4 h) zijn weergegeven in de figuren B5 en B6.





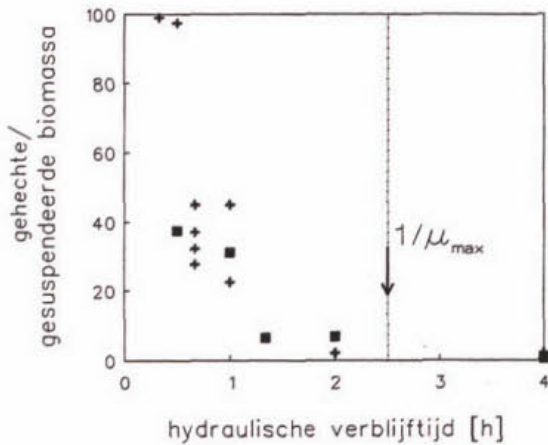
Figuur B5 Biofilmophoping op het dragermateriaal (A) en de begroeiing van het dragermateriaal (B) tijdens een representatief experiment:  $2.5 \text{ kgCZV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  en verblijftijd 1 h.  
B: □ kaal basalt, + intermediate en ■ volledig begroeide biofilm



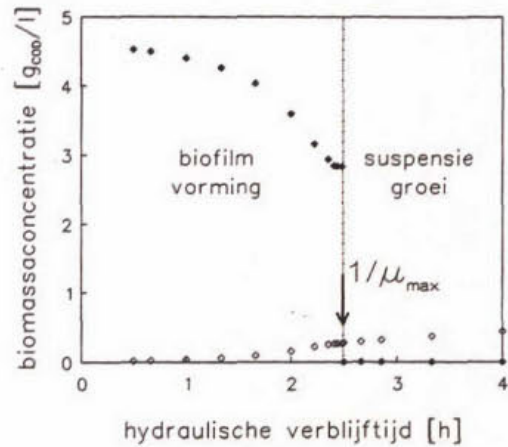
Figuur B6 Biofilmophoping op het dragermateriaal (A) en de begroeiing van het dragermateriaal (B) tijdens een representatief experiment:  $2.5 \text{ kgCZV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  en verblijftijd 4 h.  
B: □ kaal basalt, + intermediate en ■ volledig begroeide biofilm

Uit deze figuren is duidelijk dat bij lange verblijftijden (figuur B6) de biomassaconcentratie laag blijft en dat er niet tot nauwelijks biofilmvorming optreedt. Daarentegen, bij korte verblijftijden wordt een hoge biomassaconcentratie bereikt, terwijl vrijwel alle basaltdeeltjes begroeid worden met een biofilm. Opvallend was dat de biomassaconcentratie, en hiermee de biofilmdikte, op de begroeide drager vrijwel constant was tijdens de opstartperiode. Hieruit kan worden afgeleid dat de biofilmdiameter tijdens de opstart vrijwel constant is. De biomassa in de reactor neemt dus toe door de vorming van meer begroeide biofilmdeeltjes.





**Figuur 7** Verhouding van gehechte en gesuspenderde biomassa als functie van de verblijftijd  
 ■ 2,5; + 5 kgCZV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>

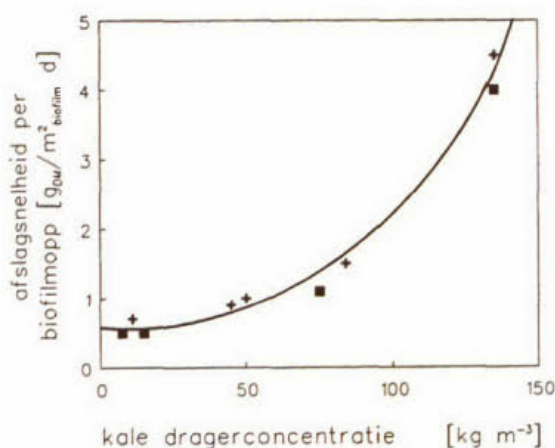


**Figuur 8** Gehechte (◆) en gesuspenderde (◇) biomassa als functie van de verblijftijd berekend met BIOSIM

In figuur B7 is de verhouding van gehechte en gesuspenderde biomassa weergegeven als functie van de verdunningssnelheid voor alle experimenten die zijn uitgevoerd. Uit deze figuur is duidelijk af te leiden dat bij hydraulische verblijftijden kleiner dan de inverse van de maximale groeisnelheid van de gesuspenderde microorganismen biofilmvorming optreedt. Dit is in overeenstemming met de hypothese van Heijnen [12]. Deze resultaten volgen ook uit modelberekeningen met het biofilmmodelleringsprogramma BIOSIM, figuur B8. Een verschil tussen de experimenten en het model is dat in het model bij lange verblijftijden biofilms afwezig zijn, terwijl in de experimenten nog een kleine hoeveelheid biomassa gehecht is aan het drageroppervlak. Waarschijnlijk is de afwezigheid van afslagkrachten op biomassa die gehecht is in holtes in het drageroppervlak de oorzaak van dit verschil. Het feit dat er ook wat biofilmvorming op kan treden bij verblijftijden langer dan de inverse van de maximale groeisnelheid geeft aan dat de  $D > \mu_{\max}$ -hypothese niet absoluut is, maar meer moet worden gezien als een richtlijn om goede biofilmvorming in een reactor te krijgen.

Het verloop van de begroeiingsfases en de biomassaconcentratie tegen de tijd is sterk niet-lineair. In figuur B5 is te zien dat de concentratie gehechte biomassa van dag 10 tot 15 maar langzaam toeneemt, terwijl daarna een snelle stijging is waar te nemen. Dit kan worden verklaard door een afnemende biomassa-afslag in de loop van het experiment door een afname van de kale dragerconcentratie, omdat er steeds meer dragermateriaal begroeid raakt. In figuur B9 is de gemeten afslagsnelheid, berekend per biofilmmoppervlak, uitgezet als functie van de aanwezige kale dragerconcentratie voor twee reactorsubstraatbelastingen.





Figuur B9 Biofilmoppervlak-specifieke afslagsnelheid als functie van de kale dragerconcentratie: (■) 2.5 kgCZV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>; (+) 5 kgCZV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>

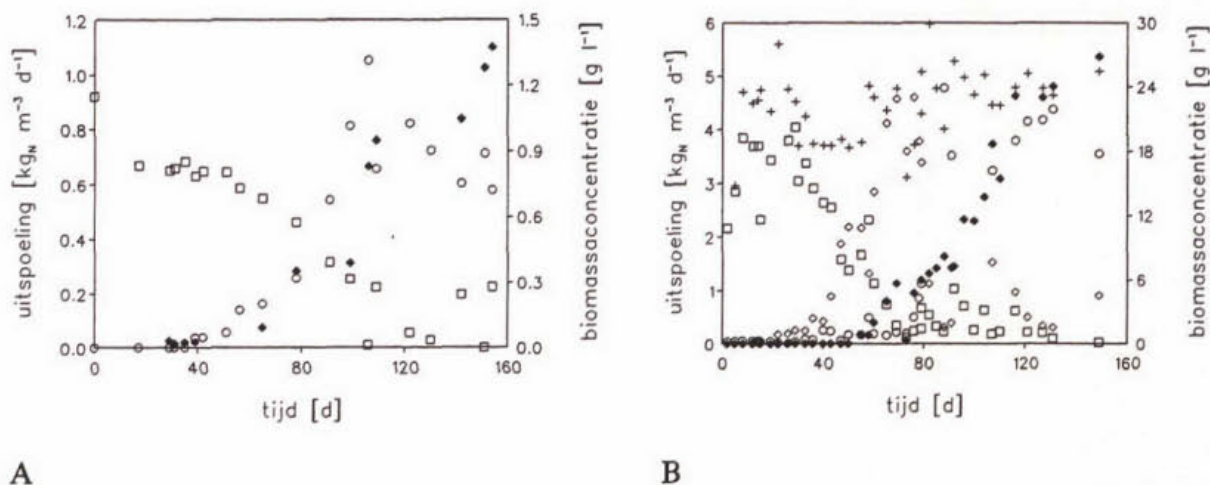
In deze figuur is duidelijk te zien dat de afslagsnelheid sterk afhankelijk is van de kale dragerconcentratie en niet van de reactorsubstraatbelasting bij 2.5 en 5 kgCZV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>. Tijdens de aangroei zorgt de hoge kale dragerconcentratie in het begin voor een hoge afslagsnelheid. Na verloop van tijd hecht zich toch wat biomassa op de drager waardoor de kale dragerconcentratie en hiermee de afslagsnelheid afneemt. De biomassaophoping wordt hierdoor versneld en de afslagsnelheid neemt verder af. Dit verklaart goed de sterke versnelling in biofilmbiomassa-ophoping. Uit deze bevindingen blijkt duidelijk dat een juiste keuze van de hoeveelheid kale drager bij de opstart van een reactor zeer veel invloed kan hebben op de snelheid van biofilmvorming. De gevonden relatie tussen afslagsnelheid en dragerconcentratie kan worden gebruikt voor de keuze van de dragerconcentratie (vergelijk ook 3.3)

### B3.3 Vorming van nitrificerende biofilms op kleine gesuspendeerde dragers in airliftreactoren [43]

Eén van de voornaamste toepassingsgebieden voor de airliftreactor ligt op het terrein van de nitrificatie. Met name de traditionele lage groeisnelheid en lage celopbrengst beperkt de capaciteit van conventionele zuiveringen tot circa 0.5 á 1 kgN·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>. Immobilisatie van de nitrificeerders in de airliftreactor kan in principe leiden tot een reactor met een stikstofcapaciteit van 5 tot 10 kgN·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>. Op basis van de succesvolle heterotrofe experimenten is onderzocht onder welke condities nitrificerende biofilms in airliftreactoren optimaal worden gevormd. In oriënterende experimenten, uitgevoerd bij een reactorsubstraatbelasting van 0.82 kgN·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> en 150 g·l<sup>-1</sup> kaal basalt, bleef de biomassaconcentratie laag en meer dan tachtig procent van het dragermateriaal bleef kaal, hoewel alle ammonium in het influent werd omgezet, figuur B10. Vergeleken met de heterotrofen-opstartexperimenten, waarbij al het beschikbare dragermateriaal begroeid raakte, is de biomassagroei per oppervlakte-eenheid in de nitrificatie-experimenten veel lager. In de heterotrofenexperimenten was de mogelijke biomassagroei per drager oppervlak 1.5 g droge stof·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> terwijl in de nitrificatie-experimenten dit getal 0.14 g droge stof·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> was door de veel lagere celyield. Op basis van de gevonden biomassa-afslagsnelheid van heterotrofe biomassa bij hoge dragerconcentratie (figuur B9) volgt dat mag worden verwacht dat er circa 4 g·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup> biomassa afslag is. De toegepaste reactorbelasting staat een maximale oppervlaktegroei toe van 0.14 g droge stof·m<sup>-2</sup>·d<sup>-1</sup>. Hieruit volgt dat waarschijnlijk biofilmaangroei van



nitrificeerders beperkt is door de te grote afslag ten opzichte van aangroei. Om een volledige begroeiing van het dragermateriaal te verkrijgen werd de biomassagroei per drageroppervlakte-eenheid verhoogd van deze waarde tot  $1.5 \text{ g droge stof} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ . Hiertoe werd de reactorsubstraatbelasting verhoogd met een factor 6 tot  $5 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ , terwijl de initiële basaltconcentratie werd verlaagd van  $150$  naar  $69 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . De ammoniumomzettingen en de biomassaconcentratie tijdens dit experiment staan weergegeven in figuur B10. Het begroeiingspatroon in de nitriferende reactor verliep analoog aan de heterotrofe reactor. Kale drager raakte begroeid tot puisterige biofilms, die uitgroeiden tot ronde biofilms.

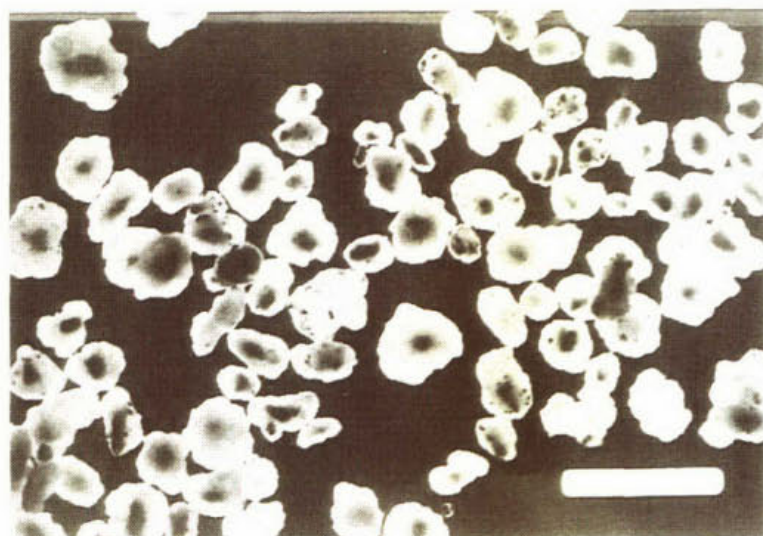


Figuur B10 Opstart van een airliftreactor met nitrificerende biofilms

A:  $0.82 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ; drager  $150 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ; B:  $5.0 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ; drager  $69 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

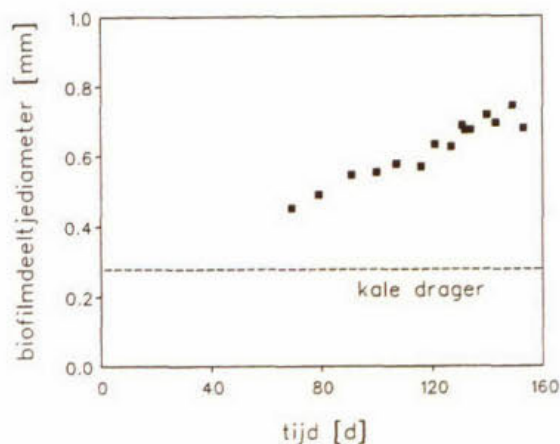
+  $\text{NH}_3$ -in- □  $\text{NH}_3$ -effluent; ◇  $\text{NO}_2^-$ -effluent; ○  $\text{NO}_3^-$ -effluent; ◆ biomassa

Vergelijking van figuur B10A en B10B maakt duidelijk dat de opstartstrategie, gebaseerd op de geëxtrapoleerde mogelijke oppervlaktegroei, succesvol was. In veertig dagen steeg de omzetting tot  $5 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  terwijl in de eerste situatie een omzetting van  $0.82 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$  pas werd bereikt na ongeveer tachtig dagen. De biomassaconcentratie van  $27 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  was bijna een factor vijftientig hoger en de fractie begroeide drager was bijna 60%. Een microscopische weergave van de nitrificerende biofilm is weergegeven in figuur B11.



Figuur B11 Microscopische opname van nitrificerende biofilms: verblijftijd 1 h,  $5 \text{ kgN}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ ;  $69 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  drager: lengte balk 4.7 mm.

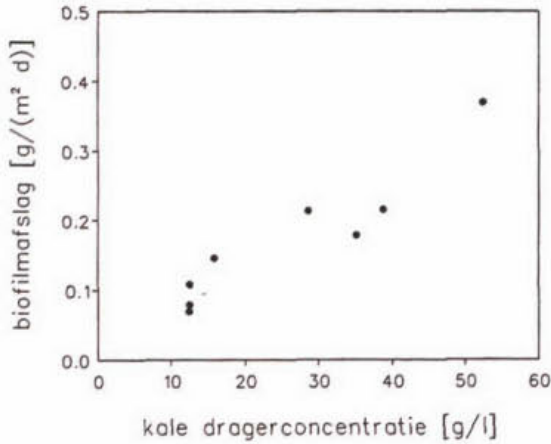
De biomassadichtheid van de biofilm bedroeg  $118 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . De nitrificatie-activiteit gedurende de opstart was vrijwel constant en ongeveer  $1 \text{ kgN}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . De diameter van de begroeide biofilmdeeltjes is weergegeven in figuur B11.



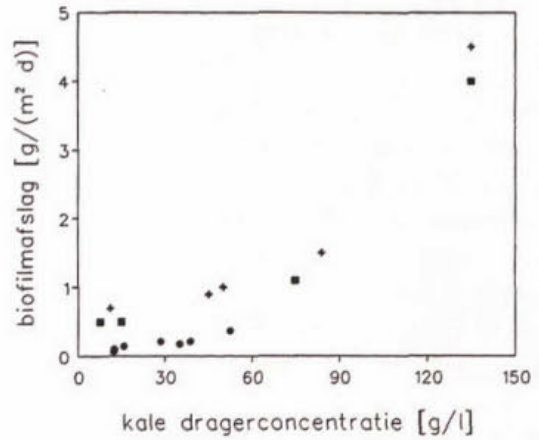
Figuur B11 Biofilmdeeltjesdiameter als functie van de tijd tijdens een nitrificatie-experiment:  $5 \text{ kgN}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ , dragerconcentratie  $69 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Deze figuur toont duidelijk aan dat tijdens de opstart de diameter van de biofilmdeeltjes toeneemt, dit in tegenstelling tot de heterotrofen-opstartexperimenten. De reden voor dit verschil is onduidelijk, maar kan samenhangen met het feit dat in de heterotrofen-opstartexperimenten vanaf de tweede dag al het substraat wordt omgezet, terwijl dit in de nitrificatie-opstartexperimenten pas na minimaal veertig dagen het geval is.





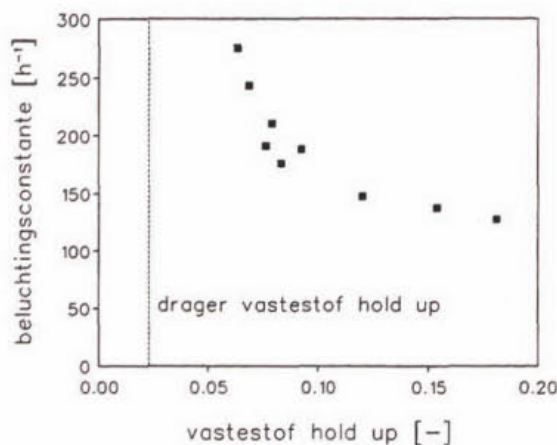
A



B

Figuur B12 Biofilmfagsnelheid als functie van de kale dragerconcentratie voor nitrificerende biofilms (A; ●) en gecombineerd met heterotrofe biofilms (B: ■ 2.5, + 5 kgCZV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>) tijdens de biomassa-aangroei

Uit de figuren B10A en B10B is duidelijk dat de biomassaconcentratie een sterk niet-lineair verloop vertoont, vergelijkbaar met de opstart onder de heterotrofe condities. Net als voor die experimenten is de afslagsnelheid per biofilmoppervlak uitgezet als functie van de kale-dragerconcentratie, figuur B12A. De afslagsnelheid is wederom duidelijk een functie van de kale-dragerconcentratie. Wanneer de afslagsnelheid van de nitrificerende biofilms wordt vergeleken met heterotrofe biofilms, figuur B12B, is het duidelijk dat bij vergelijkbare kale-basaltconcentratie de afslagsnelheid van nitrificerende biofilms veel lager is dan bij de heterotrofe biofilms. Dit is in overeenstemming met de waarneming dat de heterotrofe biofilms zeer "slap" zijn, terwijl de nitrificerende biofilms erg stevig zijn.



Figuur B13 Gas-vloeistof aëratieconstante,  $k_L a$ , als functie van de vaste stof hold-up tijdens een nitrificatie-experiment: 5 kgN·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>, dragerconcentratie 69 g·l<sup>-1</sup>

Een ander opvallend fenomeen is dat de beluchttingsconstante,  $k_L a$ , sterk afnam bij toenemende vaste stof hold-up, figuur B13. Een praktisch gevolg hiervan is dat er een optimale dragerconcentratie is in relatie tot de benodigde beluchttingsenergie.

### B3.4 Invloed van afslag, substraatbelasting en reactorschaal op de vorming van heterotrofe biofilms in airliftreactoren

Uit de voorgaande proeven, hoofdstukken 3.2 en 3.3, is het belang van de kale-dragerconcentratie en de substraatbelasting op de vormingssnelheid en dikte van de biofilms en de daaraan gekoppelde biomassaconcentratie gebleken. In beide proeven is tevens een identiek begroeiingspatroon geconstateerd. Gezien het belang van een snelle aangroei tot een hoge biomassaconcentratie van biofilms in de airliftreactor is het effect van reactor-substraatbelasting en afslag nog uitgebreider onderzocht. Tevens is gecheckt in hoeverre de waarnemingen in de laboratoriumschaalreactor overeenkomen met een praktijkinstallatie door de opstart van een airliftreactor bij Gist-brocades te volgen.

Voor een stabiele en betrouwbare operatie van de BAS-reactor is het noodzakelijk om de biomassaconcentratie en biofilmdikte te kunnen regelen. Daarom is de invloed van de opgelegde afslagkrachten en de oppervlaktesubstraatbelasting op de vorming van heterotrofe biofilms in BAS-reactoren op laboratoriumschaal verder onderzocht. De afslagkrachten zijn gevarieerd door het toepassen van verschillende initiële kale-dragerconcentraties en/of variatie van de superficiële gassnelheid. Bovendien is de dynamica van biofilmvorming tijdens het opstarten van een praktijkinstallatie (300 m<sup>3</sup>) bepaald en vergeleken met de dynamica op laboratoriumschaal (3 l). De instellingen van de uitgevoerde experimenten zijn weergegeven in tabel B1.

Tabel B1      Overzicht van de experimenten op laboratoriumschaal voor de bestudering van de invloed van de afslagkrachten op de biofilmvorming ten gevolge van de kale-dragerconcentratie en de superficiële gassnelheid

code	basalt concentratie g·l <sup>-1</sup>	superficiële gassnelheid cm·s <sup>-1</sup>
A	150	2.0
B	100	2.0
C*	50	2.0
D	50	1.1

\* Na 49.8 dagen werd de totale dragerconcentratie verhoogd tot 100 g·l<sup>-1</sup>

In tabel B2 is een overzicht gegeven van de situatie aan het eind van de experimenten samen met een tweetal experimenten van eerdere heterotrofen-opstartexperimenten, hoofdstuk 3.2.



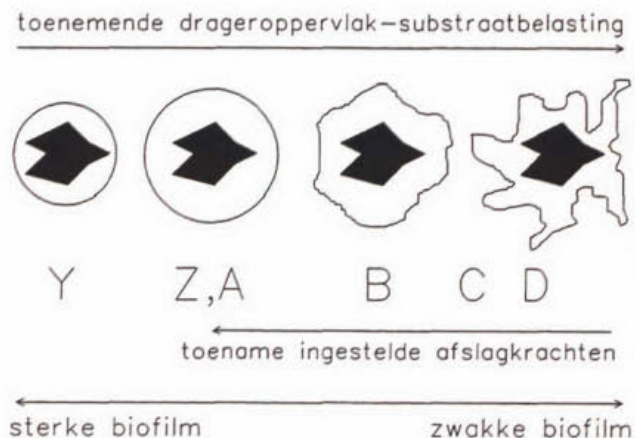
Table B2 Overzicht van de situatie aan het eind van de laboratoriumschaal experimenten  
Experiment Y en Z komen uit hoofdstuk 3.2

code		Y <sup>a</sup>	Z	A	B	C	D
substraatbelasting	kgCZV·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup>	2.5	5	5	5	5	5
superficiële luchtsnelheid	cm·s <sup>-1</sup>	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.1
dragerconcentratie	kg·m <sup>-3</sup>	150	150	150	100	50	50
fractie gevormde biomassa opgehoopt in biofilm (calculated at day 35)	%	2.8 <sup>b</sup>	2.7	2.8	1.5	1.2	1.5
tijd start biofilmvorming	d	10	9	10	7	2	2
biofilm biomassaconcentratie	kg·m <sup>-3</sup>	0.6	1.63	1.66	0.89	0.74	1.20
biomass op begroeide drager	g·kg <sub>c</sub>	4.2	11.7	13.5	13.8	16.7	29.3
percentage biofilmbegroeide drager	%	95	93	50	35	50	100
percentage kale drager	%	0	0	0	20	0	0
tijd tot aan start nitrificatie	d	-	-	31	25	46	31
biofilmgroeisnelheid aanvang nitrificatie	d <sup>-1</sup>	-	-	0.7	0.6	0.5	0.6

<sup>a</sup> hydraulische verblijftijd 1 h

<sup>b</sup> berekend tot aan dag 25: einde van dit experiment

Uit tabel B2 blijkt dat de verlaging van de dragerconcentratie (experiment Z → C) van 150 tot 50 kg·m<sup>-3</sup> en een daaraan gekoppelde verdrievoudiging van de oppervlakte substraatbelasting geen invloed heeft op de hoeveelheid biomassa per gram drager (13 tot 16 g·kg<sup>-1</sup>). De totale biomassaconcentratie in de reactor is dan ook het hoogst in het experiment met de hoogste dragerconcentratie en een lagere afslagkracht leidt niet tot meer biomassa in de biofilm.



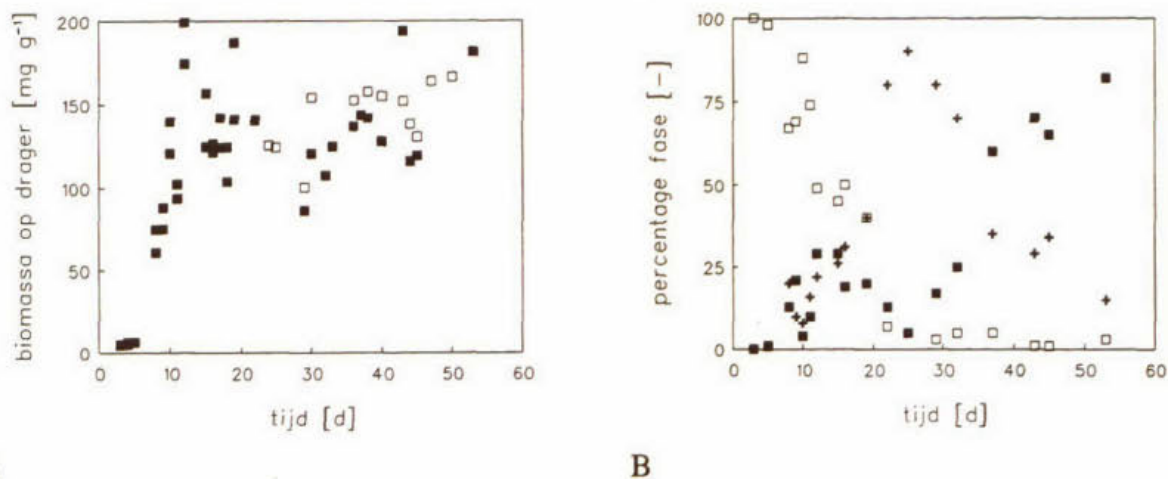
Figuur B14 Illustratie van de morfologie van de gevormde biofilms tijdens de verschillende experimenten.

De reden hiervoor is dat bij sterk verhoogde oppervlaktesubstraatbelasting en sterk verlaagde afslagkrachten de biofilmmorfologie sterk verandert. De morfologie van de gevormde biofilms is weergegeven in figuur B14. Er ontstaat een rafelige biofilm (experiment B, C en D) die moeilijk controleerbaar is in de reactor. Dit is overigens ook waargenomen bij TNO-airliftreactoronderzoek met rioolwater [28].

Uit het door ons uitgevoerde onderzoek volgt dat het verkrijgen van ronde, gladde biofilms een samenspel vergt van hoge afslagkrachten en hoge substraatbelasting. Rafelige biofilms ontstaan vooral bij een combinatie van lage afslagkrachten en zeer hoge substraatbelasting. Opmerkelijk is dat in deze proeven die lang doorliepen, er 4 tot 7 weken na opstart nitrificatie is geconstateerd. De overall biofilmgroeisnelheid op dat moment was  $0.6 \text{ d}^{-1}$ . Dit opent de mogelijkheid tot toekomstige simultane koolstof- en stikstofoxidatie in de biofilm. Deze waarnemingen staan haaks op de voorspelling van het biofilmmodel BIOSIM. In dit model is het niet mogelijk dat nitrificeerders vanuit de bulkvloei-stoffase diep penetreren in de biofilm, waarna de nitrificatiecapaciteit zich in de biofilm kan ontwikkelen. Een mogelijke verklaring voor de fenomeen ligt in een biofilmconcept waarin dynamisch gaten en kloven in de biofilm ontstaan en snel dicht groeien. Via deze kloven en gaten kunnen gesuspendeerde nitrificeerders en andere microorganismen diep in de biofilm penetreren (zie ook in 5.1)

### 3.5 Biofilmvorming in een praktijkreactor

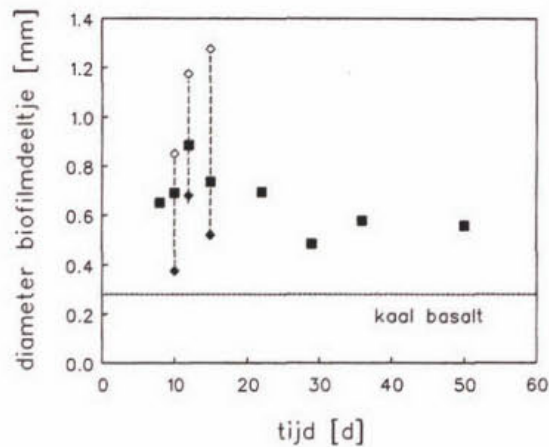
Het afvalwater in dit experiment (anaërobe zuivering,  $T = \text{circa } 35^\circ\text{C}$ , pH 7) bevatte veel residuele CZV. Het aanwezige ammonium werd niet omgezet tijdens de opstartperiode. De CZV-omzetting (inclusief sulfide) gedurende de opstart bedroeg  $19 \text{ kgCZV} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ .



Figuur B15 Biofilmvorming gedurende de opstart van een praktijkinstallatie. A: biofilm-biomassaconcentratie; B: stadia tijdens de biofilmvorming

In de figuren B15A en 15B zijn, respectievelijk, de biomassaconcentratie en de begroeiing van het basalt als functie van de tijd weergegeven. Het patroon van de begroeiing van het basalt in de praktijkinstallatie vertoont duidelijke overeenkomst met de laboratoriumschaal experimenten, vergelijk figuur B5. De biomassaconcentratie is echter veel hoger in de praktijkinstallatie bijna een factor tien. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het gemengde substraat, wat deels tot autotrofe groei leidt van sulfide-oxideerders.





Figuur B16 Biofilmdiameter (■) als functie van de tijd tijdens de opstart van een praktijkinstallatie. Voor een aantal metingen zijn twee maxima waargenomen in de deeltjesgrootteverdeling: (◆) laag maximum; (◇) hoog maximum.

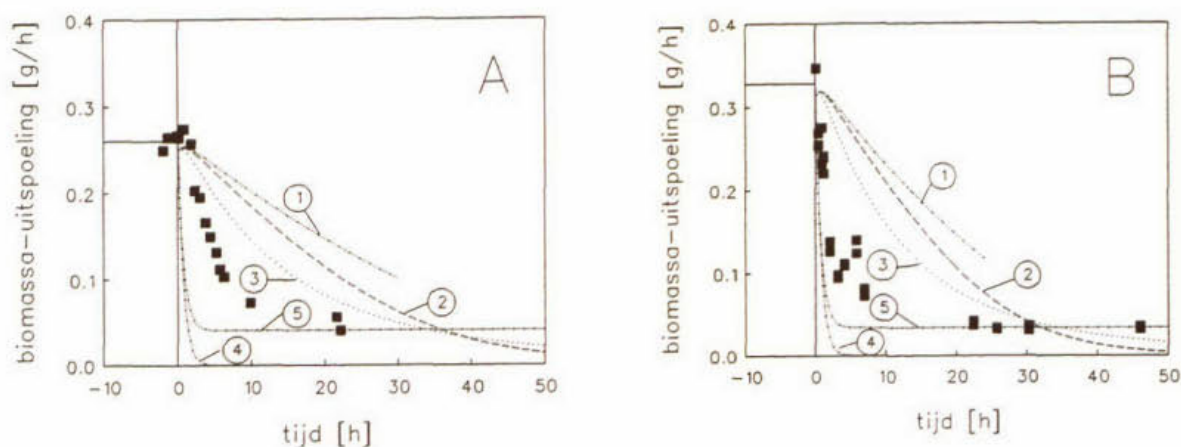
De diameter van de gevormde biofilmdeeltjes is weergegeven in figuur B16. Deze is redelijk constant, net als in de heterotrofe opstart in de laboratoriumreactor. Dit resultaat toont aan dat de kleine airliftreactoren goed vergelijkbaar zijn met de praktijkinstallatie.

## B4 BIOFILMAFSLAG

Uit de voorgaande resultaten is duidelijk geworden dat de biofilmafslag van zeer grote invloed is op de biofilmvorming. Daarom is het biofilmafslagproces nader bestudeerd. In de voorgaande proeven is de afslag steeds gemeten in groeiende systemen. Dit compliceert de studie van afslag omdat altijd geldt dat de biofilmophoping het verschil is tussen biofilmgroei en afslag. Indien de groei wordt uitgeschakeld, door geen substraat te geven, is de afslag direct te bepalen door de vermindering van de biofilm te bestuderen. Dit is uitgevoerd op een tweetal manieren (4.1 en 4.2) waarin het effect van het stoppen van de voeding aan de biofilms in een steady state situatie (4.1) en het effect van verschillende afslagfactoren (4.2) is bestudeerd.

## B4.1 Biofilmafslag in biofilm-airlift-suspensie-reactoren in afwezigheid van groei

De biofilmafslag in deze experimenten is bestudeerd door in een steady state situatie van een tweetal experimenten de substraatbelasting naar nul te brengen, terwijl de andere instellingen ongewijzigd bleven. Het was de verwachting dat de afslagsnelheid en daarmee de biomassaconcentratie in het effluent ongeveer gelijk zouden blijven, omdat de hydraulische condities en de deeltjesconcentraties niet veranderden. De gemeten biomassaconcentratie in het effluent van de twee experimenten is weergegeven in respectievelijk figuur B17A en figuur B17B.



Figuur B17 Uitspoeling van biomassa tijdens experiment S1 (A) en S2 (B). De lijnen zijn simulaties waarbij gebruik is gemaakt van correlaties uit de literatuur. De getallen verwijzen naar de correlaties in tabel B3.

In deze figuren is duidelijk te zien dat de biomassaconcentratie in het effluent (dit is de afgeslagen biomassa) na het stoppen van de voeding sterk daalt tot een vrijwel constante waarde. In tegenstelling tot de verwachtingen nam de afslagsnelheid sterk af en om deze reden is getracht deze afname te beschrijven met vergelijkingen uit de literatuur die de afslagsnelheid beschrijven. Voor veel van deze relaties wordt een bredere toepassing geclaimd dan de reactor waarvoor de vergelijking is afgeleid.



Table B3 Overzicht van de gerapporteerde afslagsnelheidsvergelijkingen [30]

code	afslagsnelheid $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$	reactortype	nummer in figuur B17	ref.
A	$k_d \cdot \rho_B \cdot \tau$	rotating drum	1	6-1
B	$k_d \cdot \rho_B \cdot L_B \cdot \tau^{0.58}$	rotating drum	2	6-7, 6-3
C	$k_d \cdot \rho_B \cdot L_B$	CSTR	2	6-4, 6-8
D	$k_d \cdot (\rho_B \cdot L_B)^2$ *	rotating drum	3	6-2, 6-14
E	$k_d \cdot \rho_B \cdot L_B^2$	-	3	6-15
F	$k_d \cdot L_B \cdot r_s$	rotating drum	4	6-5, 6-6, 6-10
G	$L_B \cdot (k_d + k_d' \cdot \mu)$ *	gepakt bed	5	6-9

\* Originele vergelijking herschikt

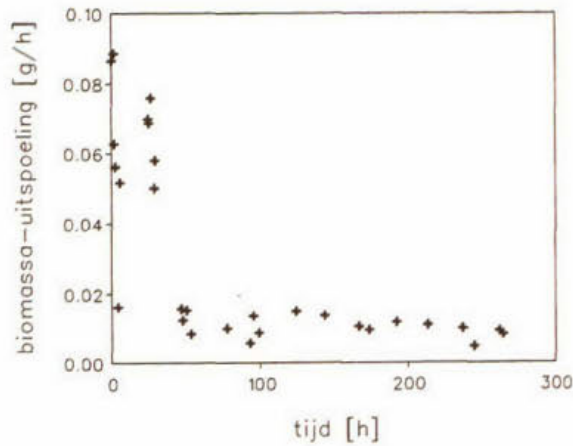
In de figuren B17A en B17B staan de gesimuleerde resultaten voor de verschillende vergelijkingen weergegeven. Het is duidelijk dat geen van de vergelijkingen een goede beschrijving geeft van de waargenomen afslagsnelheid. Het lager worden van de afslag kan veroorzaakt worden doordat de biofilm sterker wordt in de diepere regionen of doordat een rafelige, slappe buitenlaag van de biofilm wordt afgeschuurd, waarna ronde, gladde biofilms overblijven die veel minder sheargevoelig zijn. Dit sterke verval in afslagsnelheid is ook waargenomen in ander onderzoek (hoofdstuk 4.2).

#### B4.2 Effect van afslagfactoren op de biomassa-afslag van gesuspenderde, niet gevoede ronde biofilms in airliftreactoren

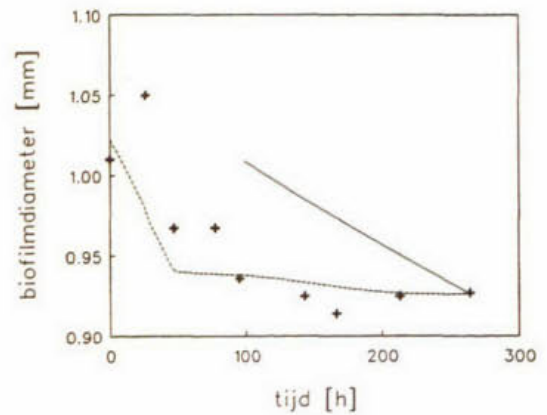
In dit onderzoek zijn de volgende factoren onderzocht:

- het afslagpatroon
- de concentratie kaal basalt
- de ruwheid van de kale drager
- de superficiële luchtsnelheid
- de ruimte onder stijgbuis en reactorbodem, waar de circulerende vloeistofstroom omkeert.
- het reactortype.

Voor dit onderzoek werd een aantal verschillende batches uit de praktijkinstallatie van Gist-brocades gehaald. Om de verschillen tussen biofilmbatches (sterkte, morfologie etc.) te elimineren werd tijdens elk experiment een zogenaamd standaardexperiment meegenomen. Hiervoor werd aan een constante hoeveelheid biofilmdeeltjes een constante hoeveelheid kaal basalt toegevoegd. Zonder kaal basalt wordt er nauwelijks biomassa afgeslagen.



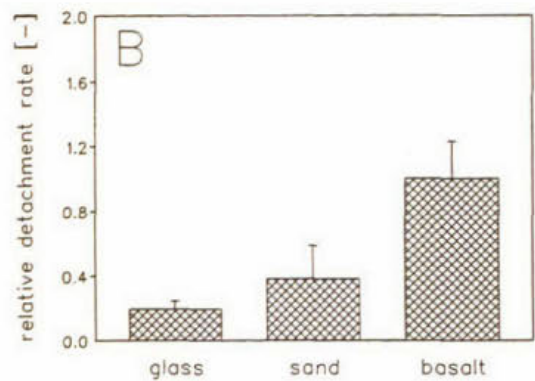
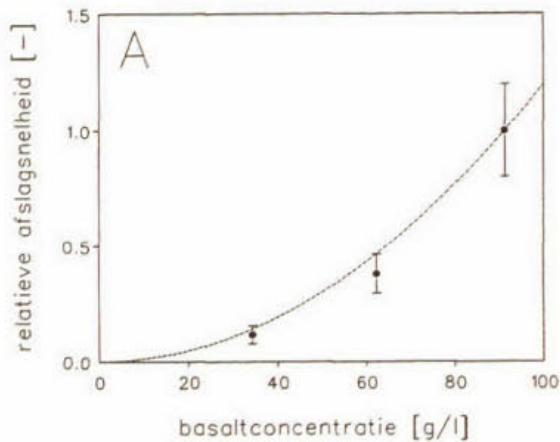
A



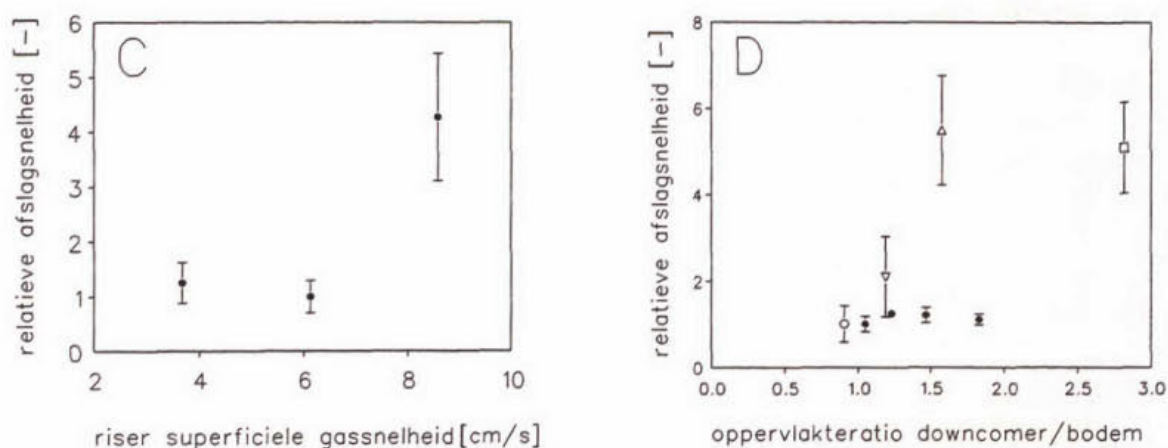
B

Figuur B18 Representatief experiment voor de bepaling van de afslagsnelheid  
A: biomassa-uitspoeling; B: biofilmdiameter

In figuur B18 zijn de resultaten van een representatief experiment weergegeven. In de afslag van biomassa zijn twee fasen te onderscheiden. In de eerste fase spoelt een grote hoeveelheid uit, hoewel de metingen een grote variatie vertonen. In de tweede fase stabiliseert de uitspoeling zich op een lager niveau. De diameter van de biofilms daalt sterk tijdens de eerste fase, terwijl in de tweede fase nauwelijks sprake is van een afname. Dit betekent dat in fase 2 de afslag vooral plaatsvindt door opbreken van biofilmdeeltjes onder invloed van botsingen, in plaats van door oppervlakte-erosie, waardoor de biofilmdiameter zou dalen.







Figuur B19 Invloed van de verschillende onderzochte afslagfactoren op de biofilmafslagsnelheid. A: basaltconcentratie; B: ruwheid kale drager; C: superficiële gassnelheid; D: ruimte onder de stijgbuis

In de figuren B19A t/m 19D zijn de resultaten weergegeven van de invloed van de basaltconcentratie, type drager, superficiële gassnelheid in de stijgbuis, en de reactorgeometrie en reactortype op de afslagsnelheid.

Er bestaat een duidelijke invloed van de basaltconcentratie op de afslagsnelheid, zoals ook in de eerdere opstartexperimenten was gevonden (3.2 tot 3.4).

Er is een duidelijke invloed van de oppervlakteruwheid van de drager op de afslagsnelheid. Glasparels, met een zeer lage oppervlakteruwheid, veroorzaakten een veel lagere afslagsnelheid dan de onregelmatige zandkorrels en zeer ruwe basaltdeeltjes.

De superficiële gassnelheid in de stijgbuis had niet veel invloed op de afslagsnelheid bij 3.7 en 6.1  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Daarentegen was de afslagsnelheid veel hoger bij een gassnelheid van 8.6  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Deze sterke verhoging van de afslagsnelheid viel samen met een verandering in het stromingsregime van een 'bubbling flow' naar 'slug flow' in de airlift reactor. Het lijkt dat met name deze verandering in regime invloed heeft op de afslagsnelheid.

Bij een vergelijking tussen vier verschillende reactoren, figuur B19D, leek er een duidelijke correlatie te zijn tussen het doorstroomde oppervlak onder de stijgbuis en de afslagsnelheid. Om deze reden werd het oppervlak onder de stijgbuis gevarieerd in vier identieke reactoren. Uit dit experiment bleek dat er geen correlatie is en dat andere, onbekende, variaties tussen de vier reactortypes de verschillen moeten verklaren.



## B5 BIOFILMHETEROGENITEIT

De huidige inzichten over de opbouw van biofilms (BIOSIM-model) leiden tot een horizontaal gelaagde structuur waarbij de vaste stof altijd naar buiten wordt geduwd. Dit betekent dat er geen vastestoftransport van buiten naar binnen wordt verondersteld. Voor de reiniging van bijv. gesuspendeerde vaste stof in biofilms zou dit betekenen dat de vaste stof nauwelijks in de biofilms wordt afgebroken. Tevens voorspellen de huidige modellen dat trage groeiers, indien ze aanwezig zijn in de biofilm, onderin de biofilm terechtkomen. Ook zouden volgens de huidige modellen nitrificeerders niet kunnen ingroeien in een bestaande puur heterotrofe biofilm. In de praktijk blijkt echter dat vaste stof wel degelijk wordt omgezet in de BAS-reactor [28] en dat er nitrificatie ontstaat in puur heterotrofe biofilms.

Daarom zijn enkele aspecten van de biofilmheterogeniteit onderzocht: de vaste-stofverblijftijd in ronde biofilms (5.1), de interactie tussen een heterotrofe populatie met een bestaande nitrificerende biofilm, en de heterogeniteit van heterotrofe en nitrificerende microorganismen in biofilms (5.2 en 5.3). De vaste-stofverblijftijd in biofilms is bepaald door aan twee afzonderlijke biofilmreactoren tracerdeeltjes toe te voegen aan het influent en vervolgens de hechting en het loslaten van deze deeltjes aan en in de biofilm te volgen.

De verdeling van heterotrofen en nitrificeerders is onderzocht door de biofilmstructuur te bekijken en de activiteit van de biofilms te meten met de biological oxygen monitor (BOM) tijdens schakeling van het medium van puur nitrificerend naar heterotroof en weer terug naar puur nitrificerend (5.2). Ook is gebruik gemaakt van een zuurstofmicro-elektrode om de nitrificerende en heterotrofe activiteit te meten in biofilms uit een TNO-laboratoriuminstallatie, die voorbezonken huishoudelijk afvalwater behandelt (5.3). Tenslotte is de heterogeniteit berekend met het BIOSIM-model voor deze laatste biofilms.

### B5.1 Vaste-stofverblijftijd in ronde biofilms in een biofilm-airlift-suspensie-reactor

Voor het bepalen van de vaste-stofverblijftijd is een tracer noodzakelijk. Deze tracer moet (i) makkelijk te onderscheiden zijn van de cellen in de biofilm, (ii) de groei en onthechting van de biofilm niet beïnvloeden en (iii) stabiel zijn gedurende het gehele experiment. Kleine latexdeeltjes, 1  $\mu\text{m}$ , waarin een fluorescerende verf is opgenomen (FMP), bleken geschikt om de vastestofverblijftijd te bepalen.

De vaste-stofverblijftijd is in een tweetal experimenten bepaald. In een tracerexperiment is een stapfunctie toegepast waarin de ophoping en penetratie van FMP's in de biofilm is gevolgd. Na het stoppen van de toevoer van FMP's is de uitspoeling van de tracerdeeltjes vanaf en uit de biofilm gevolgd. De biofilmdeeltjes waren afkomstig uit de praktijkinstallatie van Gist-brocades. Voordat de latexdeeltjes werden toegevoegd, werden de biofilmdeeltjes onder constante condities geacclimatiseerd in de airliftreactor, tabel B4.



Tabel B4 Experimentele omstandigheden en biofilmeigenschappen

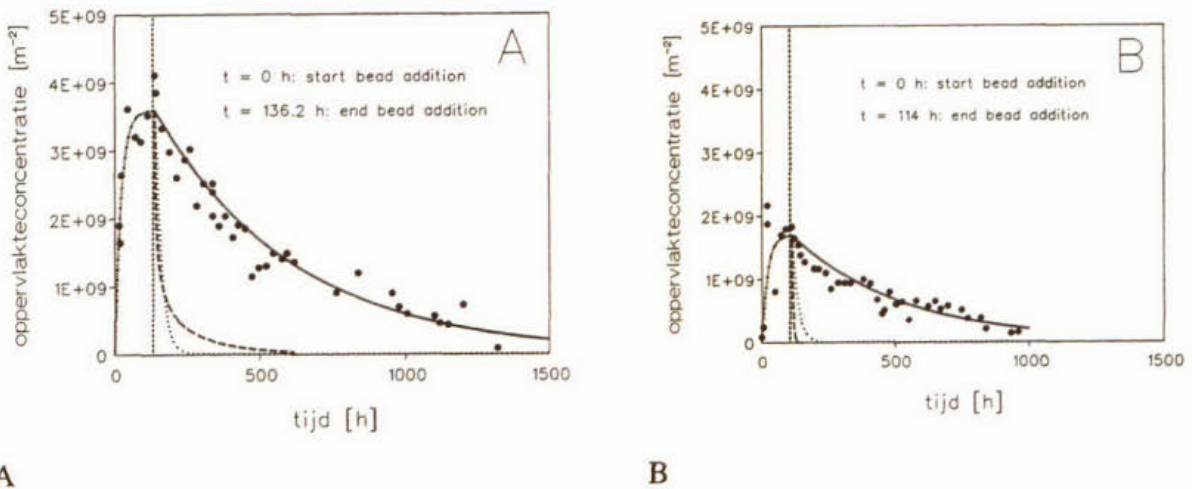
	Experiment R1	Experiment R2
<b>reactor</b>		
CZV-belasting [kgCZV/(m <sup>3</sup> d)]	5	1
N-belasting [kgN/(m <sup>3</sup> d)]	1.8	5
hydraulische verblijftijd [h]	0.67	0.67
aanvang FMP additieperiode [h]	940	500
lengte FMP additieperiode [h]	136.2	114
influent FMP concentratie [l <sup>-1</sup> ]	44 ± 16 · 10 <sup>8</sup> (0 to 5 d) 35 ± 17 · 10 <sup>8</sup> (5 to 6 d)	56 ± 22 · 10 <sup>8</sup>
<b>biofilms</b>		
totale biomassa [g droge stof]	3.58	22.0
totaal basalt [g]	45.7	8
gemiddelde biofilmdeeltjesdiameter [mm]	0.56 ± 0.13	1.41 ± 0.10
aantal biofilmdeeltjes [-]	1.44 · 10 <sup>6</sup>	1.85 · 10 <sup>5</sup>
totaal biofilmoppervlak [m <sup>2</sup> ]	1.4	1.2
bedvolume biofilms [ml]	156	442
zee fractie [mm]	0.5-0.71	1.0-1.25

Een schematische presentatie van beide biofilmdeeltjes aan het begin van de additie van tracerdeeltjes is weergegeven in figuur B20. De biofilms in experiment R1 waren snel na een hernieuwde opstart uit de praktijkinstallatie gehaald. De biofilms waren dun en rond, maar relatief ruw. De kleur van de biofilms was wit en redelijk transparant, maar een dunne donkere laag was zichtbaar vlakbij het basalt. De biofilms in experiment R2 waren van origine dikke, ronde en gladde biofilms. De kleur was donkerbruin. Tijdens de acclimatiseringsperiode vormde zich een dunne (25 µm), witte laag over de originele biofilm, waarschijnlijk bestaande uit heterotrofe biomassa.



Figuur B20 Schematische weergave van de biofilmdeeltjes aan het begin van beide experimenten: A is experiment R1, B is experiment R2.

Tijdens beide experimenten was de acetaatconversie compleet. Gedurende het gehele experiment R1 was de ammoniacconversie  $1 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (60%), maar in het begin volledig naar nitriet en aan het eind volledig naar nitraat. In experiment R2 nam de ammoniacconversie vrijwel lineair toe van verwaarloosbaar tot  $2.5 \text{ kgN} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ .



Figuur B21 Gemeten FMP-oppervlakteconcentratie tijdens (A) experiment R1 en (B) experiment R2 (rechts). Gestreepte lijn is een eerste orde fit voor hechting, de doorgetrokken lijn is een eerste orde fit voor loslaten, beide voor de bepaling van de tijdconstante. De gestippelde lijn is een dynamisch adsorptie-desorptie model en de gestreepte lijn is het BIOSIM-model voor het loslaten.

In figuur B21A en B staan de gemeten oppervlakteconcentraties van de tracerdeeltjes op het oppervlak van de biofilms.

De deeltjes hechten zeer snel aan het oppervlak, al na vijf minuten werden er gehechte FMP's aangetroffen op het oppervlak. In beide experimenten nam de FMP-concentratie op het oppervlak toe tot een stabiele waarde. De tijdconstante van deze toename was in beide experimenten gelijk (tabel B5). Hierna werd de toevoer van FMP's gestopt en de afname in concentratie gevolgd.



Tabel B5 Hechting en loslaten van de biofilmdeeltjes van de FMP's tijdens de experimenten in de BAS-reactor

	R1	R2
	totale deeltje	actieve laag
steady state oppervlakte-FMP-concentratie [ $m^{-2}$ ]	$3.6 \cdot 10^9$	$1.7 \cdot 10^9$
bulk FMP-concentratie [ $m^{-3}$ ]	$4.6 \cdot 10^{12}$	$5.9 \cdot 10^{12}$
tijdconstante hechting [h]	21	21
tijdconstante loslaten [h]	480	420
gemiddelde biomassaverblijftijd [h]	27	18

In tabel B5 is een overzicht gegeven van de verkregen resultaten tijdens de twee experimenten. De maximale FMP-concentratie op het oppervlak tijdens experiment R1 is meer dan een factor twee groter dan in R2. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt doordat het oppervlak van de biofilms tijdens experiment R1 veel ruwer was dan in R2. De tijdsconstante van het hechten van de FMP's aan het oppervlak is voor beide experimenten ongeveer gelijk, 21 h. De tijdsconstante van het loslaten van de FMP's ligt ook in dezelfde orde van grootte, rond de 450 h, maar is veel groter dan de tijdsconstante voor de hechting. Hieruit kan worden afgeleid dat het gedrag van de FMP's niet kan worden beschreven met een eenvoudig adsorptie-desorptie model, want in dat geval moeten deze tijdsconstanten voor hechting en loslaten aan elkaar gelijk zijn (figuur B21). De tijdsconstante van het loslaten is in beide gevallen veel groter dan de gemiddelde biomassaverblijftijd in de reactor. De gemiddelde biomassaverblijftijd, berekend als het quotiënt van de biomassa-uitspoeling en de biomassaconcentratie is duidelijk geen goede maat voor de actuele verblijftijd van verschillende microorganismen in de biofilm. Om deze reden is getracht om de gemeten resultaten van het loslaten te beschrijven met het biofilmmodel BIOSIM, figuur B21 [47]. Uit de figuur is duidelijk dat BIOSIM voorspelt dat de deeltjes de biofilm veel sneller verlaten dan in werkelijkheid gemeten is. Voor het goed voorspellen van het verblijf en transport van deeltjes in de biofilm zijn andere concepten voor het transport van deeltjes naar en in de biofilm noodzakelijk.

Op basis van microscopische waarnemingen met de lichtmicroscop en met de confocale scanning laser microscoop (CSLM) is de hypothese opgesteld dat er frequent gaten en kloven in de biofilm ontstaan. Via deze barsten kunnen gesuspendeerde deeltjes (nitrificerende microorganismen, tracerdeeltjes, colloïdaal materiaal) diep penetreren in de biofilm. Door de lage afslagkrachten in deze gaten, groeien de kloven snel dicht en het geadsorbeerde materiaal is hierdoor geïncorporeerd in de biofilm en kan deze niet op korte termijn verlaten.



Tabel B6      Overzicht van de gemeten variabelen in de verschillende periodes tijdens het switchexperiment

Periode	I 0-133	IIA 133-142	IIB 142-161	IIC 161-218	III 218-256
biofilmdiameter	0.75→1.1	1.1	1.1→1.4	1.2→1.3	1.3→1.2
ammoniaconversie kgN·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup>	0.5→4.5	0.8 <sup>1</sup>	0.8 <sup>1</sup>	0.8 <sup>1</sup>	0.8→2.5
CZV conversie kgCZV·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup>	0	6.85	6.85	6.85	0
biomassayield g droge stof·g <sup>-1</sup>	0.07	0.15	0.22	0.26	0.07
concentratie biomassa g d.s.·l <sup>-1</sup>	4.5→11	11	11 → 13	5 → 3.5	3.5 → 6
biofilm capaciteit stikstof kgN·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup>	- <sup>2</sup> →4.5	4.5→1.6	1.0	0.6	0.6→2.5
acetaat kgO <sub>2</sub> ·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup>	+ → 0	3	3	3	0.5
activiteit in suspensie stikstof gN·g <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	0.5	0.5→0.1	0.1	0.1	2
acetaat gO <sub>2</sub> ·g <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	NA <sup>3</sup>	2 → 4	4	4	0.5

<sup>1</sup> incl. 0.2 kgN·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> voor groei; <sup>2</sup> - laag + hoog; <sup>3</sup> NA niet beschikbaar

### B5.2 Dynamica van populaties en biofilmstructuur in de biofilm-airlift-suspensie-reactor voor koolstof- en stikstofverwijdering

Onder praktijkcondities varieert de samenstelling van het afvalwater sterk. In de meeste experimenten die zijn uitgevoerd in de laboratoriumreactoren is gewerkt met een constante samenstelling en constante verblijftijd. Om meer inzicht te krijgen in de reactie van de biofilms op sterk variërende condities is een experiment uitgevoerd waarbij werd geschakeld tussen nitrificerend medium en heterotroof medium. Tijdens deze schakelingen werd de dynamica van biofilmstructuur en populatie van nitrificerende en koolstofoxiderende biomassa in biofilms is bestudeerd. Biofilms uit de praktijkinstallatie van Gist-brocades met hoofdzakelijk koolstofoxiderende activiteit en een lage nitrificatie-activiteit zijn gebruikt als uitgangsmateriaal. Er zijn een drietal fases te onderscheiden. Gedurende de eerste fase werd de ontwikkeling van nitrificerende activiteit in de voornamelijk heterotrofe biofilms gevolgd. Hierna werd het medium geschakeld naar heterotroof medium. Dit medium bevat ammonium voor de stikstof benodigd voor groei. Na ongeveer negentig dagen werd weer teruggeschakeld naar puur nitrificerend medium.

In tabel B6 is een overzicht gegeven van de gemeten parameters tijdens de verschillende fases. Tijdens de eerste nitrificatieperiode nam de ammoniaomzetting toe van 0.5 tot 4.6 kgN·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> in ongeveer vijftig dagen. Alleen gedurende de eerste 25 dagen werd nitriet gemeten in het effluent van de reactor. Tegelijkertijd nam de biomassaconcentratie toe van 4 g·l<sup>-1</sup> tot bijna 11 g·l<sup>-1</sup>, waarbij bijna 30% van de geproduceerde biomassa in de biofilm

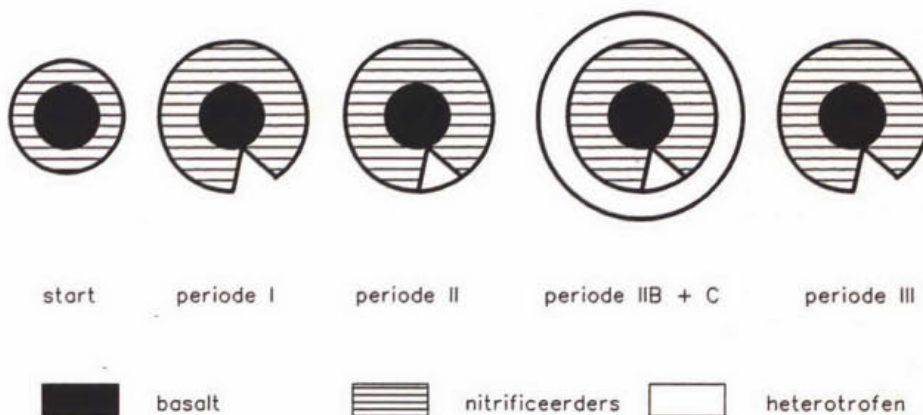


werd gehouden. De diameter van de biofilms nam toe van 0.75 naar 1.0 mm. De activiteit van de biomassa in het effluent was  $0.5 \text{ gN}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . De gemeten capaciteit van de biofilm kwamen overeen met de gemeten omzettingen in de reactor, er was dus geen extra nitrificatiecapaciteit aanwezig. In de bestaande biofilms ontstonden duidelijk microkolonies van nitrificeerders.

Op dag 133 werd het substraat omgezet van ammoniak naar acetaat,  $6.85 \text{ kgCZV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  (periode II). De ammoniakbelasting was  $0.83 \text{ kgN}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ . Binnen twee dagen werd al het acetaat omgezet, terwijl al de ammoniak gedurende de gehele periode II met meer dan 95% werd omgezet. Na een week werden scheuren in de nitrificerende biofilms opgevuld door heterotrofe biomassa. Na tien dagen (periode IIB) nam de diameter zeer snel toe van 1.1 naar 1.4 mm doordat de nitrificerende biofilm werd overgroeid door een heterotrofe laag (figuur B22). De nitrificatiecapaciteit van de biofilms en van de gesuspendeerde biomassa nam snel af. Het eerste wordt veroorzaakt door diffusielimitatie door de heterotrofe laag, het tweede doordat de nitrificeerders worden afgeschermd voor de afslag door de heterotrofenbiomassa. Omdat het biofilmvolume sterk was toegenomen werd op dag 161 de helft van de aanwezige biofilms verwijderd (periode IIC). Hierna was er sprake van een vrij stabiele situatie tot aan de volgende omschakeling van het substraat.

Na de omschakeling op dag 218 (periode III) werd de heterotrofe laag binnen twee dagen afgeschuurd. De biofilmdiameter nam af van 1.4 naar 1.2 mm en er werd weer een volledig nitrificerende biofilm verkregen. De nitrificerende activiteit herstelde zich binnen twee dagen op het niveau aan het einde van periode I.

Een zeer opmerkelijk resultaat van dit experiment is dat de nitrificeerders zich tijdens periode I in de biofilm ophoopten, terwijl de heterotrofen een nieuwe laag vormden op de nitrificerende biofilm. Dit heeft waarschijnlijk te maken met de snelle vorming van heterotrofe kolonies in de gaten van de nitrificerende biofilm, die daarna snel aansluiten en de gehele nitrificerende biofilm omsluiten. Dit toont eens te meer aan hoe de biofilm-morfologie (glad of gaten), biomassavormingssnelheid en biofilmafslag de biofilmpbouw beïnvloeden.



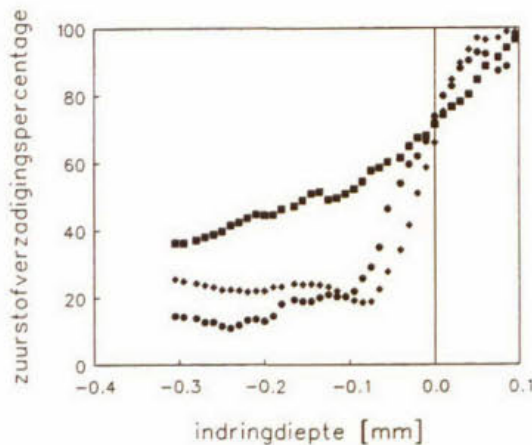
Figuur B22 Schematische weergave van de aanpak van de biofilms tijdens de verschillende fasen



### B5.3 Populatie-distributie in aërobe biofilms op kleine gesuspendeerde dragers

De interne structuur van een biofilm wordt met name beïnvloed door diffusiegradienten in de biofilm. Biofilmmodellen voorspellen in het algemeen dat langzaam groeiende microorganismen zich dieper in de biofilm bevinden dan snel groeiende microorganismen [54]. De verdeling van microorganismen in een biofilm is belangrijk voor het bedrijven van een biofilmreactor, omdat dieper in de biofilm substraatlimitatie kan optreden. In aërobe biofilms is zuurstof veelal het limiterende substraat. Voor biofilms op vlakke platen is aangetoond dat zo'n gelaagde structuur van organismen kan optreden. Biofilms op gesuspendeerde dragers worden op een andere manier gevormd dan biofilms op vlakke platen. Om deze reden is onderzocht, met behulp van zuurstofmicroelektrodes, of ook in biofilms op gesuspendeerde drager spake is van een segregatie van verschillende microorganismen.

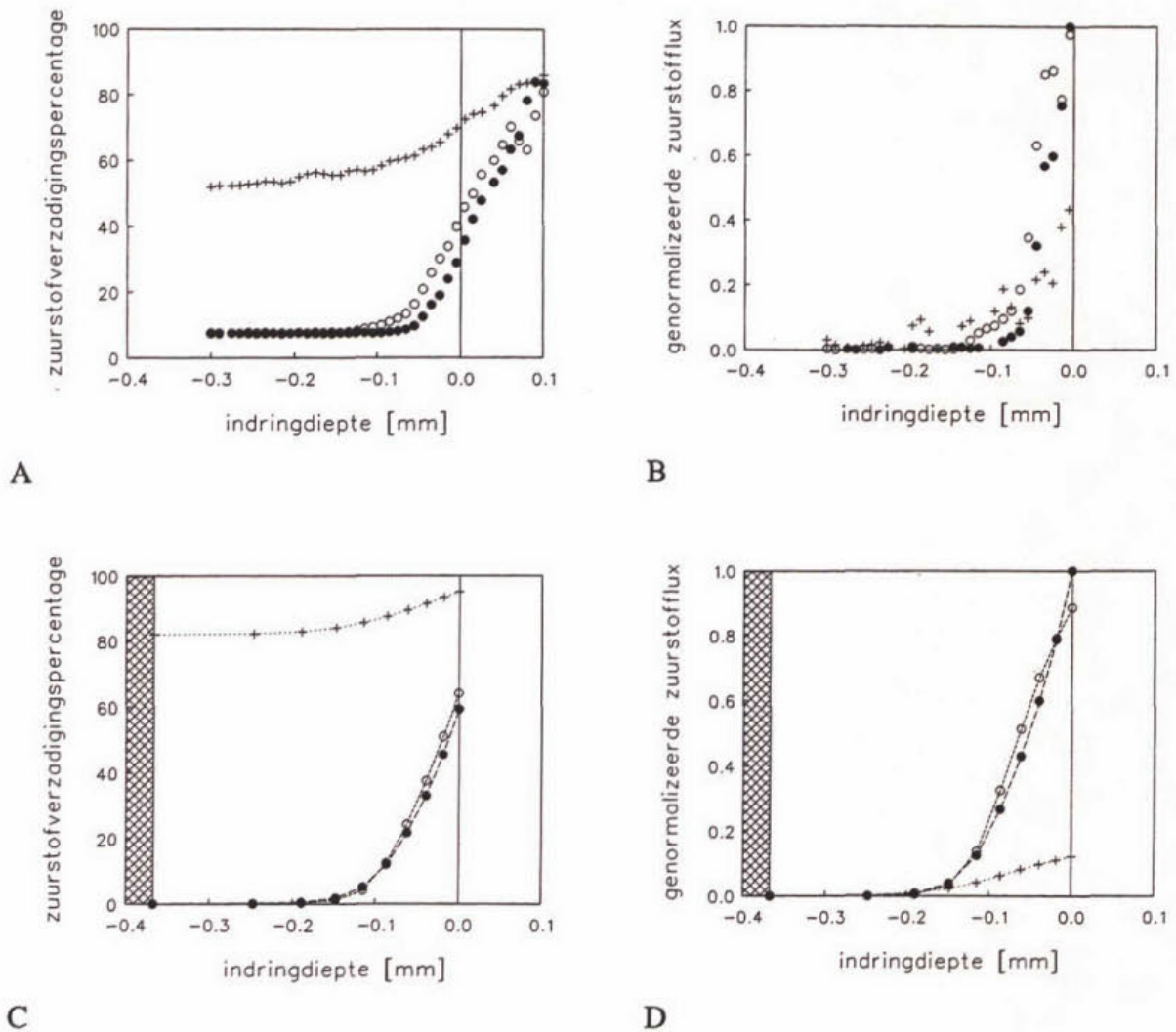
Microelektrode-metingen zijn zeer locale metingen, de tipdiameter is slechts  $10\ \mu\text{m}$ . In figuur B23 zijn metingen, onder dezelfde condities, in drie verschillende biofilmdeeltjes uit hetzelfde monster weergegeven. Uit deze figuur is duidelijk dat het zuurstofprofiel in verschillende biofilmdeeltjes sterk verschillend kan zijn. Dit geeft aan dat activiteiten, zoals gemeten in één deeltje niet direct kunnen worden vertaald in reactoractiviteiten.



Figuur B23 Zuurstofmicroelektrode-metingen onder dezelfde condities in drie verschillende biofilmdeeltjes uit dezelfde batch

Om informatie te krijgen over de populatie-distributie van heterotrofe en autotrofe bacteriën in de biofilm, werden zuurstofmicroelektrode-metingen uitgevoerd in de aanwezigheid van een overmaat ammonium of een mengsel van acetaat en ammonium (figuur B24a). De zuurstofflux door de biofilm werd berekend door de afgeleide van de zuurstofgradient te vermenigvuldigen met het doorstroomde oppervlak. Deze flux werd genormeerd door te delen door de zuurstofflux aan het biofilmpoppervlak, zie figuur B24b. Tevens is met het biofilmsimulatieprogramma BIOSIM [54] een steady state biofilm uitgerekend voor een BAS-reactor met dezelfde condities als de reactor waaruit de biofilms zijn gehaald. Het biofilmprogramma heeft voor deze biofilm de zuurstofprofielen uitgerekend onder dezelfde condities als de werkelijke zuurstofprofiel-metingen, figuur B24c. Op dezelfde manier en voor de werkelijke experimenten is voor deze gesimuleerde biofilm de zuurstofflux berekend en genormeerd, figuur B24d.





Figuur B24 A: gemeten zuurstofprofielen in biofilms; B: zuurstofflux uitgerekend met deze zuurstofprofielen; C: gesimuleerde zuurstofprofielen; D: berekende zuurstofflux voor de gesimuleerde zuurstofprofielen. Symbolen : (+) zonder substraat, (o) met ammonia (1.4 mM) en (●) ammonia en acetaat (2.0 mM)

In de figuren van de genormaliseerde zuurstofflux geeft een rechte lijn aan dat er op dat punt alleen diffusie is, zonder consumptie, terwijl een dalende lijn aangeeft dat er sprake is van diffusie en tegelijkertijd consumptie. Hoe steiler de richtingscoëfficiënt van deze lijn, des te groter is de consumptie. De simulaties en de metingen, figuur B24, wijzen op een niet-uniforme distributie van de verschillende soorten in de biofilm. De trend van de gesimuleerde en gemeten profielen is vergelijkbaar, maar het lijkt alsof in dit geval de gemeten profielen een iets grotere spreiding van de nitrificeerders en heterotrofen geven dan BIOSIM voorspelt. Dit wordt veroorzaakt doordat in echte biofilms nitrificeerders vrijwel afwezig zijn in de buitenste laag, terwijl in de simulaties wel nitrificeerders, hoewel in een lage concentratie, voorkomen in deze laag.

Uit deze metingen en de simulaties is af te leiden dat langzaam groeiende microorganismen vaker worden aangetroffen in de diepere lagen van de biofilm. Voor het ontwerpen van biofilmreactoren betekent dit dat, indien de oppervlakt-specifieke substraatbelasting een bepaalde waarde overtreft, de conversie van componenten door langzaam groeiende

microorganismen zal verminderen door zuurstofdiffusielimitatie. De actieve laag en de zuurstofflux naar de biofilm kunnen redelijk worden geschat met standaard conversie en diffusietheorie. De exacte segregatie van de verschillende soorten microorganismen kan nog niet worden bepaald.



## ALGEMENE CONCLUSIES

Hieronder worden de hoofdconclusies uit het gehele onderzoek weergegeven.

### Slibproductie

Er is eenduidig (middels massabalansen) aangetoond dat het mogelijk is om in BAS reactoren een dermate lage slib belasting op te leggen dat er een minimale slibproductie plaats vindt. In dit geval wordt het grootste deel van het substraat geoxideerd om te voorzien in de "maintenance" energie van de bacteriën. Deze maintenance energie behoefte blijkt onafhankelijk te zijn van de groeiomstandigheden (aerob, anoxisch of anaerob).

Alhoewel beperking van de slibproductie aanzienlijke voordelen kan hebben, dient men te beseffen dat dit gepaard gaat met een groot zuurstof (dus energie) verbruik. Een aerob systeem met maximale slibproductie en een slibgisting kan in dit verband wellicht meer voordelen bieden.

### Conditie biofilmvorming

Het onderzoek geeft een duidelijk inzicht in de methodiek om snel biofilms te vormen in BAS reactoren. Hierbij is met name gekeken naar (i) het effect van de hydraulische verblijftijd, deze dient korter te zijn dan de maximale groeisnelheid van de snelst groeiende organismen in het systeem (ii) het effect van afslag door kale dragers op biofilms, te grote hoeveelheden drager kunnen (m.n. bij in het geval van nitrificatie) leiden tot beperkte biofilmgroei, en (iii) de dynamiek van de biofilm vorming waarbij drie stadia worden doorlopen.

### Stabiliteit biofilms

De processen die leiden tot afslag van biofilms zijn geïnventariseerd. Deze zijn: (i) de groeisnelheid van de biofilm, actief groeiende biofilms vertonen een hogere afslag dan niet groeiende biofilms, (ii) ruwheid van het kale drager materiaal, een kale ruwe drager geeft sterk verhoogde afslag; dit wordt echter gecompenseerd door het feit dat een biofilm op een ruwe drager beter bestemd is tegen afslag, (iii) concentratie van het kale drager materiaal. Andere zaken lijken van minder belang voor het optreden van afslag, een daarvan is de vloeistofsnelheid die optreedt in de reactor.

### Stuurbaarheid biofilmvorm

De interactie tussen biomassa-productie door de biofilm (i.c. biofilm oppervlaktebelasting) en biofilm-afslag (m.n. ten gevolge van shear door aanwezige kale drager) leidt tot het ontstaan van gladde of rafelige biofilms. Dit kan met name van invloed zijn op (i) de invang van gesuspendeerde COD in de biofilm, en (ii) het uitspoelgedrag van de biofilm.

### Biofilm heterogeniteit

Biofilms lijken inherent heterogeen te zijn. Dit belemmert het onderzoek. Doordat met name de transportprocessen van opgelost danwel gesuspendeerd vrijwel niet te beschrijven zijn is microbiologisch kinetisch onderzoek vrijwel onmogelijk. Deze heterogeniteit betekent ook dat een gedetailleerde bestudering (b.v. met microelectrodes) niet zinvol is wanneer men geïnteresseerd is in het globale reactor gedrag.

In vele studies die in de literatuur worden gerapporteerd wordt de heterogeniteit van de biofilm onvoldoende onderkend. Uitspraken die worden gedaan zijn in dit licht vaak niet betrouwbaar.

### Reinculture biofilms

Reincultures geven zeer inhomogene biofilms, onafhankelijk van de bewegelijkheid van het

organisme. Het vormen van biofilms vanuit reïncultures blijkt overigens een haast onmogelijke zaak. Enerzijds wordt dit veroorzaakt doordat er geen geschikte biofilmreactor is, anderzijds kan dit komen omdat vele reïncultures worden geselecteerd op een vermogen om goed in suspensie te kunnen leven. Bij eventueel toekomstig onderzoek zou hieraan aandacht dienen te worden geschonken.

#### Methodes voor biofilmstudie

Tenslotte dient nog te worden opgemerkt dat, wellicht verrassenderwijs, de BAS-reactor een zeer geschikt instrument lijkt voor biofilmonderzoek, omdat:

- in de reactor sprake is van "ideale" menging van vloeistof en biofilmdeeltjes
- het mogelijk is om reproduceerbaar biofilmdeeltjes te bemonsteren
- het mogelijk is om de afslagsnelheid goed te meten door combinatie van de biomassa-uitspoeling en diameterbepaling
- de mechanismen van afslag en vaste-stoftransport zijn te bepalen door gebruik te maken van image analyzer en CSLM-technieken
- de populatiedynamica kan worden bestudeerd, bijvoorbeeld door het bestuderen van de interactie van heterotrofe en nitrificerende biomassa.



## TOEKOMSTIG ONDERZOEK

Het huidige onderzoek heeft duidelijk richtlijnen gegeven voor het snel opkweken van biofilms in BAS-reactoren (effect hydraulische verblijftijd, effect van afslag van kale dragers op biofilms, dynamiek in de vorm van het biofilmvormingsconcept in drie stadia) en de surplusslibproductie.

Vragen blijven echter open ten aanzien van de eigenschappen en de heterogeniteit van de gevormde biofilms. Het betreft hier met name:

- de morfologie (glad of rafelig biofilmoppervlak)
- de uiteindelijke biofilmdikte
- de populatiedistributie in de biofilm.

Het ontwerpen van BAS-reactoren wordt gehinderd door:

- slecht inzicht in de te verwachte populatiedistributie (hoeveel van welke microorganismen zitten waar in de biofilm ?)
- slecht inzicht in de vaste-stoftransportmechanismen. Dit bepaalt zowel de mogelijkheid om gesuspendeerde COD af te breken, als ook de populatieverdeling van microorganismen in de biofilm
- het ontbreken van een goede beschrijving van het afslagmechanisme. Dit is een complex samenspel tussen de reactor (superficiële luchtsnelheid, afmetingen), drager (ruwheid, dichtheid, concentratie) en de biofilms (sterkte, vorm). Hierin is de morfologie en de sterkte van de biofilm afhankelijk van de voeding en de afslagkrachten.

De afslagsnelheid en de manier van afslag bepalen in hoge mate de populatiedistributie, het vaste stoftransport en de biofilmruwheid. In toekomstig onderzoek zal de afslagsnelheid en afslagmechanismen in relatie tot de resulterende populatiedistributie, vaste-stoftransport en biofilmruwheid centraal moeten staan.





## REFERENTIES

- 1 Anoniem, 1990. Toepassing van de drie-fasen airlift reactor voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater: technologisch-economische evaluatie. Witteveen en Bos en TNO.
- 2 Arts, P.A.M., Robertson, L.A., Bos, P. & Kuenen, J.G. (1992) Growth of *Thiosphaera pantotropha* in a continuous-flow stirred tank reactor. *Wat.Sci. Tech.* 26, 2177-2180.
- 3 Bakke, R., Characklis, W.G., Turakhia, M.H., Yeh, A-I. 1990. Modeling a monopopulation biofilm system: *Pseudomonas aeruginosa*. p 487-520 In: W.G. Characklis and K.C. Marshall (eds.), *Biofilms*, Wiley, New York.
- 4 Beeftink, H.H. 1988. Geaggregeerde microorganismen: slib-op-drager technieken. VROM/WMB rapport.
- 5 Benthum, W.A.J. 1993. Vaste-stoftransport in biofilms in een biofilm airlift suspensie reactor, afstudeerverslag, vakgroep Bioprocestechnologie, Technische Universiteit Delft.
- 6 Bryers, J.D. 1984. Biofilm formation and chemostat dynamics: pure and mixed culture considerations. *Biotechnol.Bioeng.* 26: 948-958.
- 7 Bos, P., Kuenen, J.G. en Heijnen, J.J. (1988) Projectvoorstel: Aerobe biolagen op gesuspendeerde dragers ten behoeve van de waterzuivering. TU Delft, 54 pp.
- 8 Chang, H.T., Rittmann, B.E., Amar, D., Heim, R., Ehlinger, O., Lesty, Y. 1991. Biofilm detachment mechanisms in a liquid-fluidized bed. *Biotechnol.Bioeng.* 38: 499-506.
- 9 Characklis, W.G. (1990) Laboratory biofilm reactors. pp 55-89 In: W.G. Characklis and K.C. Marshall (eds.), *Biofilms*. Wiley, New York.
- 10 Gjaltema, A., Tjihuis, L., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. Detachment of biomass from suspended non-growing spherical biofilms in airlift reactors. submitted.
- 11 Gjaltema, A., Arts, P.A.M., van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G. & Heijnen, J.J. (1994) Heterogeneity of biofilms in rotating annular reactors: occurrence, structure and consequences. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 194-204.
- 12 Heijnen, J.J. 1984. Biological industrial waste-water treatment minimizing biomass production and maximizing biomass concentration. Ph.D.-dissertation Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.
- 13 Heijnen, J.J. 1987. Biologische anaërobe-aërobe afvalwaterzuivering bij Gist-brocades met de anaërobe fluïde bed en de aërobe airlift suspensie slib op drager technologie. Eindrapport 1977-1986, Gist-brocades.
- 14 Heijnen, J.J., van Dijken, J.P. 1992. In search of a thermodynamic description of biomass yields for the chemotrophic growth of microorganisms. *Biotechnol.Bioeng.* 39: 833-858.
- 15 Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Tjihuis, L. 1993. A black box mathematical model to calculate auto- and heterotrophic biomass yields based on Gibbs energy dissipation. *Biotechnol.Bioeng.* 40: 1139-1154.
- 16 Hekkelman, H.D. 1991. Activiteitsmetingen aan biofilms op kleine gesuspendeerde dragers. Afstudeerverslag, vakgroep Bioprocestechnologie, Technische Universiteit Delft.
- 17 Hijman, B. 1993. Invloed van shear op de aangroei van acetaatoxideerders op basalt in airliftreactoren. Stageverslag, vakgroep Bioprocestechnologie, Technische Universiteit Delft.
- 18 Hooijmans, C.M. 1990. Diffusion coupled with bioconversion in immobilized systems: use of an oxygen microsensor. Ph.D.-dissertation Delft University of Technology, Delft, The Netherlands
- 19 Huisman, J.L. 1993. Aangroei van nitrificerende biofilms in een biofilm airlift suspensie reactor, afstudeerverslag, vakgroep Bioprocestechnologie, Technische Universiteit Delft.
- 20 Kampf, R., Eikelboom, D.H., de Kreuk, J.F. 1987. Ontwikkeling van slib op drager systeem voor de aërobe zuivering van stedelijk afvalwater: fase 1 verkennend onderzoek in een drie-fasen airlift reactor. TNO-STORA-rapport.
- 21 Kampf, R., de Graaf, T.P., Mulder, A. 1990. First technological-economical evaluation of the application of the three-phase airlift reactor for the purification of municipal waste water. TNO research report R90/241, TNO, Delft, The Netherlands.



- 22 King, G.M. (1991) Measurement of acetate concentrations in marine pore waters by using an enzymatic approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3476-3481.
- 23 Klop, J., van de Laar, J. 1992. Biologische stikstofverwijdering met behulp van een airlift- en fluïd-bedreactor: case study 'Rotterdam Dokhaven', *Fabrieksvoorontwerp 2974*, faculteit der Scheikundige Technologie en der Materiaalkunde, Technische Universiteit Delft.
- 24 Kreikenbohm, R., Stephan, W. 1985. Application of a two-compartment model to the wall growth of *Pelobacter acidigallici* under continuous culture conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 296-301.
- 25 Kuenen, J.G., Bos, P., Heijnen, J.J. 1988. Aërobe biolagen op gesuspendeerde dragers ten behoeve van waterzuivering: dynamische aspecten van biolaagdikte, populatiesamenstelling en minimale slibproductie. projectvoorstel RWZI2000, NOVEM, STW. Technische Universiteit Delft.
- 26 van Meekeren, K-H. 1992. Biofilmvorming in airliftreactoren: groei van bacteriën op gesuspendeerde vaste dragers en ingroei van nitrificeerders in bestaande biofilms. Stageverslag, vakgroep Bioprocestechnologie, Technische Universiteit Delft.
- 27 Mulder, A., Heijnen, J.J. 1988. The effect of carrier characteristics on the biofilm development in airlift suspension reactors. p. 102-110 In: *Proceedings second Netherlands Biotechnology Congress*, H. Breteler, P.H. van Lelyveld, K.Ch.A.M. Luyben (eds.), NBV, Amsterdam.
- 28 Mulder, A., Eikelboom, D.H., Kampf, R. 1992. Ontwikkeling van een slib-op-drager-systeem voor de zuivering van stedelijk afvalwater. TNO-rapport IMW-R91/272. TNO-IMW, Delft.
- 29 van Loosdrecht, M.C.M., Tjihuis, L., Wijdieks, A.M.S., Heijnen, J.J. Population distribution in aerobic biofilms on small suspended particles. accepted for publication in *Water Sci. Technol.*
- 30 Peyton, B.M. 1992. Kinetics of biofilm detachment. Ph.D. thesis. Montana State University. Bozeman. U.S.A.
- 31 Peyton, B.M., Characklis, W.G. 1993. A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear stress on the kinetics of biofilm detachment. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 728-735.
- 32 Potze, J. 1992. Afslag van biofilms in airliftreactoren. Stageverslag, vakgroep Bioprocestechnologie, Technische Universiteit Delft.
- 33 Pluijm, J.L.P.M. 1990. De invloed van de verdunningssnelheid en de CZV-belasting op de initiële biofilmvorming in een drie-fasen airlift systeem, *Afstudeerverslag tweede fase*, Biotechnologie Delft-Leiden, Technische Universiteit Delft.
- 34 Reichert, P., Ruchti, J., Wanner, O. 1989. BIOSIM-interactive programm for the simulation of the dynamics of mixed culture biofilm systems on a personal computer. Swiss federal institute for Water Resources and Water Pollution Control EAWAG, CH-8600 Dübendorf, Switzerland.
- 35 Rekswinkel, H.G. 1993. Biofilms in airliftreactoren. *Afstudeerverslag tweede fase Biotechnological Sciences Delft-Leiden*, Technische Universiteit Delft.
- 36 Rittmann, B.E. 1982. The effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 501-506.
- 37 Rittmann, B.E. 1989. Detachment from biofilms. p. 49-58 In: *Structure and function of biofilms (Dahlem Workshops Reports)*, Characklis, W.G., Wilderer, P.A. (eds.), Life Sciences Research Report 46, John Wiley & Sons, Chichester, U.S.A.
- 38 Robertson, L.A., van Niel, E.W.J., Torremans, R.A.M. & Kuenen, J.G. (1988) Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2812-2818.
- 39 Robinson, J.A., Trulear, M.G., Characklis, W.G. 1984. Cellular reproduction and extracellular polymer formation by *Pseudomonas aeruginosa* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 1409-1417.
- 40 Speitel, G.E., DiGiano, F.A. 1987. Biofilm shearing under dynamic conditions. *J. Environ. Eng. ASCE* **113**: 464-475.
- 41 Tjihuis, L. 1994. The Biofilm Airlift Suspension reactor: biofilm formation, detachment and heterogeneity. Ph.D.-dissertation Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.

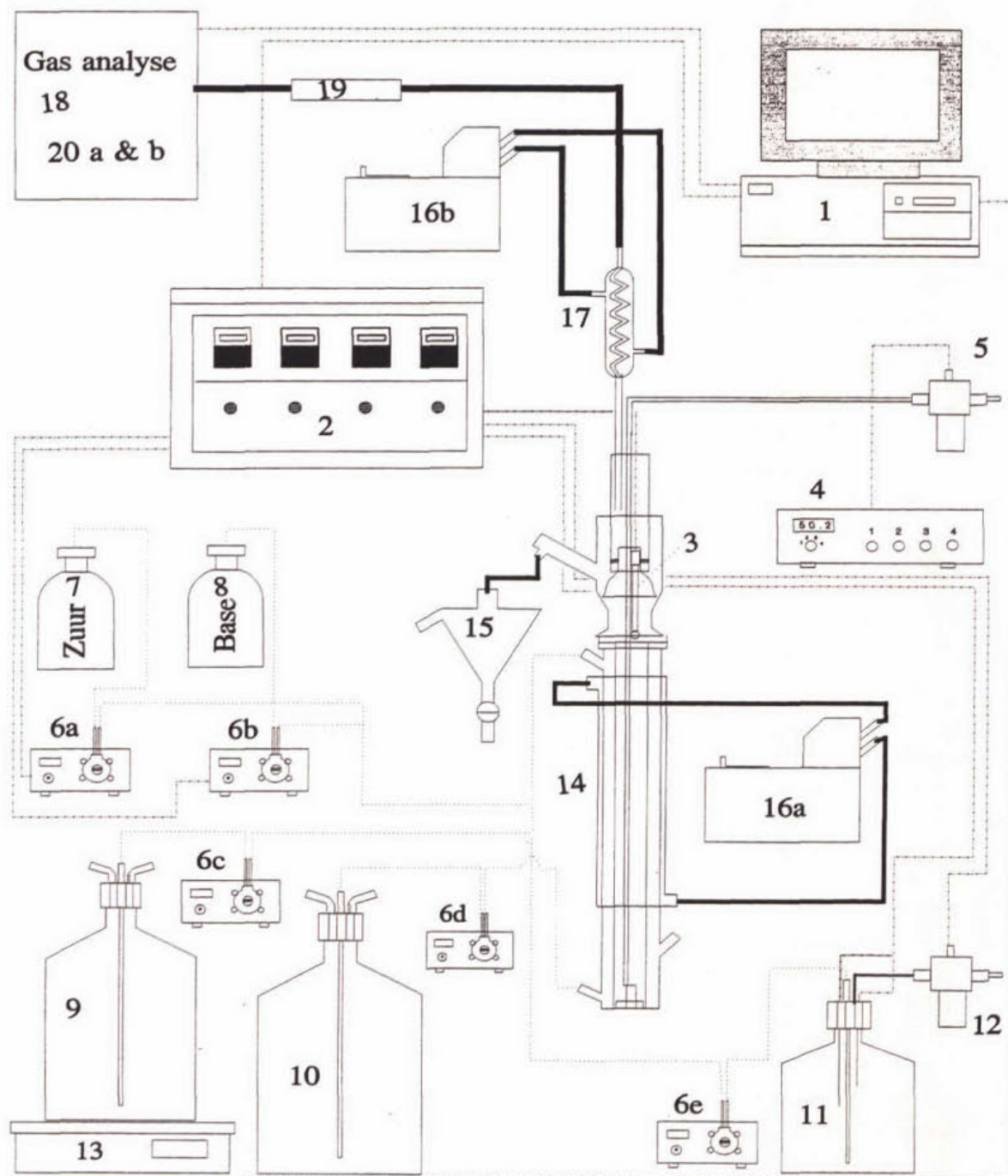


- 42 Tijhuis, L., van Benthum, W.A.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. 1994. Solids retention time in spherical biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol.Bioeng.* in press.
- 43 Tijhuis, L., Huisman, J.L., Hekkelman, H.D., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors. submitted.
- 44 Tijhuis, L., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. 1992. Nitrification with biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Water Sci.Technol.* **26**: 2207-2211.
- 45 Tijhuis, L., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. 1993. A thermodynamically based correlation for the description of maintenance requirements for heterotrophic growth. *Biotechnol.Bioeng.* **42**: 509-519.
- 46 Tijhuis, L., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. 1994. Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol.Bioeng.* **44**: 595-608.
- 47 Tijhuis, L., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. Dynamics of biofilm detachment in biofilm airlift suspension reactors. submitted.
- 48 Tijhuis, L., van der Pluym, L.P.M., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. 1992. Formation of heterotrophic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Water Sci.Technol.* **26**: 2015-2019.
- 49 Tijhuis, L., Rekswinkel, E., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. 1993. Dynamics of population and biofilm structure in the biofilm airlift suspension reactor for carbon and nitrogen removal, pp. 471-478. In: *Proceedings of the second International Conference on Biofilm reactors*, september 1993, Paris, IAWQ, CFRP, AGTHM, EWPCA.
- 50 Trulear, M.G., Characklis, W.G. 1982. Dynamics of biofilm processes. *J.Water Poll. Control Fed.* **54**: 1288-1301.
- 51 van der Graaf, A.A., Mulder, A., Slijkhuys, H., Robertson, L.A. & Kuenen, J.G. (1990) Anoxic ammonium oxidation. *Proceedings of the 5th European Congress on Biotechnology*. C. Christiansen, L. Munck, J. Villadsen, editors. Munksgaard International Publisher, Copenhagen, pp 388-391.
- 52 van Schie, B.J., van Dijken, J.P. & Kuenen, J.G. (1984) Non-coordinated synthesis of glucose dehydrogenase and its prosthetic group PQQ in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**, 133-138
- 53 van Voorneburg, F., Heide, B.A. 1985. Mogelijkheden voor slib op drager systemen voor de aërobe biologische zuivering van stedelijk afvalwater (literatuurstudie). STORA-rapport.
- 54 Wanner, O., Gujer, W. 1986. A multispecies biofilm model. *Biotechnol.Bioeng.* **28**: 314-328.
- 55 Wijdieks, A.M.S. 1993. Micro-elektrode metingen in natuurlijke bolvormige biofilms, afstudeerverslag tweede fase, Biotechnological Sciences Delft-Leiden, Technische Universiteit Delft.
- 56 Zwols, H. 1991. Biofilmvorming in drie-fasen-airlift-reactoren. Stageverslag, vakgroep Bioprocestechnologie, Technische Universiteit Delft.





## Bijlage A Experimentele opstelling van BAS-reactor met randapparatuur



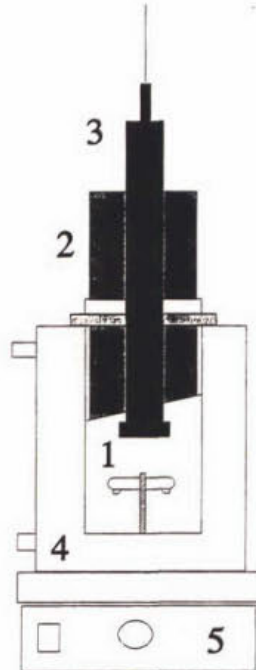
Figuur A.1 Schematische weergave van de BAS-reactor met randapparatuur

Figuur A.1 toont schematisch de opstelling van de BAS-reactor omringd door de benodigde randapparatuur. De opstelling bevat de volgende apparatuur:

1. Laser AT/12-computer, uitgerust met een PCL-718 data-acquisitie kaart van PC-LabCard en het programma Biowatch, versie 2.20, geschreven door C. Hellinga, TU Delft. Dit programma verzamelt en bewaart de volgende gegevens op (tussen haakjes staan de nummers van de apparatuur waarvan de meetwaarden afkomstig zijn): zuurstofconcentratie ingaande lucht en afgas (3), kooldioxideconcentratie ingaande lucht en afgas (3), zuurtoevoer (4), basetoevoer (4), watertoevoer (4), mediumtoevoer (12), pH (4), gasdebiet door de mass flow controller (11)
2. bioprocessor, model ADI 1020 van Applikon, Schiedam. Deze regelt de pH in de reactor en het niveau in het vat met verdunningswater. De bioprocessor is gekoppeld aan de acquisitiecomputer
3. pH-elektrode Ingold U445-S7
4. luchtdebietregelaar, model Brooks 5878
5. mass flow controller met reduceerventiel, gestuurd door luchtdebietregelaar, model 5850TR. Maximale gasdebiet is  $10 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$
- 6a. slangepomp van Masterflex aangestuurd door bioprocessor, dosering van zuur
- 6b. slangepomp van Masterflex aangestuurd door bioprocessor, dosering van loog
- 6c. Slangepomp mediumtoevoer, fabrikaat Technische Dienst TU Delft
- 6d. Slangepomp watertoevoer, fabrikaat Technische Dienst TU Delft
7. Opslagvat 1 N zoutzuur
8. Opslagvat 1 N natronloog
9. Opslagvat met geconcentreerd medium
10. Opslagvat met carbonaat-oplossing
11. Tussenopslag kraanwater
12. Magneetklep van Asco; deze wordt aangestuurd door de bioprocessor en gaat open wanneer de weerstand twee staafjes in het tussenopslagvat boven een bepaalde grens komt
13. Balans, Mettler PM30
14. BAS-reactor
15. bezinker, vangt uitgespoelde vlokvormige biomassa en (eventueel) biofilms op
- 16a. Cryostaat, Lauda PM6; deze pompt water van  $30^\circ\text{C}$  door de mantel van de BAS-reactor
- 16b. Cryostaat-waterbad met constante, instelbare temperatuur, Lauda PM6; deze pompt water van  $4^\circ\text{C}$  door de condensor van de afgasanalyse
17. condensor; deze verwijdert een groot deel van de waterdamp uit de gasstroom naar de afgasanalyse-apparatuur
18. kleppenkast, Applikon, custom made; deze schakelt afwisselend maximaal zes stromen naar de afgasanalyse-apparatuur
19. Perma Pure Dryer mini dryer membraaneenheid tussen kleppenkast en afgasanalyse-apparatuur die het laatste water aan afgas onttrekt
20. afgasanalyse-apparatuur bestaande uit:
  - a. Servomex Analyser Control Series 1100A voor paramagnetische meting van de zuurstofconcentratie
  - b. Beckman Industrial Model 870 voor meting van de kooldioxide concentratie op basis van infrarood-absorptie van kooldioxide.



Bijlage B Biological Oxygen Monitor



Figuur B.1 Schematische weergave van de Biological Oxygen Monitor

De BOM-opstelling staat schematisch weergegeven in figuur B.1 en bevat de volgende onderdelen:

1. BOM-vaatje van perspex met een roerder op een verticaal asje
2. elektrodehouder
3. elektrode (Polarographic Oxygen Sensor, POS; Orbisphere model 2111)
4. watermantel van perspex waarin het BOM-vaatje geplaatst kan worden
5. roermotor.

Bijlage C Samenstelling van de geconcentreerde media tijdens de verschillende experimenten [41]

Tabel C.1 Samenstelling van het geconcentreerde medium voor organisch koolstofoxidatie-experimenten

component	concentratie	
	[kg·m <sup>-3</sup> ]	[mM]
CH <sub>3</sub> COONa	4.5	55,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.09 als P	2,90
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04 als S	1,22
NH <sub>4</sub> Cl	0.4 als N	28,0
sporenoplossing <sup>Vishniac</sup>	0,5 ml·l <sup>-1</sup>	

Tabel C.2 Samenstelling van het geconcentreerde medium voor nitrificatie-experimenten

component	concentratie	
	[kg·m <sup>-3</sup> ]	[mM]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,00	37,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	3,67
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,30	1,22
NaHCO <sub>3</sub>	6,00	71,4
sporenoplossing <sup>Vishniac</sup>	1 ml·l <sup>-1</sup>	

Tabel C.3 Samenstelling van het geconcentreerde medium voor gecombineerde nitrificatie- en organisch koolstofoxidatie-experimenten

component	concentratie	
	[kg·m <sup>-3</sup> ]	[mM]
CH <sub>3</sub> COONa	2.6	32
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 als N	36
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.09 als P	2,87
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 als S	11,2
NaHCO <sub>3</sub>		*
sporenoplossing <sup>Vishniac</sup>	10 ml·l <sup>-1</sup>	

\* aparte stroom die 360 mmol·l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> bevat



**PUBLIKATIREEKS "TOEKOMSTIGE GENERATIE  
RIOOLWATERZUIVERINGSINRICHTINGEN RWZI 2000"<sup>1</sup>**

- 'Behandeling van stedelijk afvalwater in de toekomst'  
Een haalbaarheidsonderzoek. I Eindrapport. II Werkrapport  
RIZA, TNO-Maatschappelijke Technologie en Witteveen + Bos Raadgevende  
ingenieurs B.V.  
Juli 1986
- 'Toekomstige generatie rioolwaterzuiveringsinrichtingen; RWZI 2000'  
Onderzoeksplan  
RIZA, STORA  
Januari 1988
- 'Jaarverslag 1988'  
RIZA, STORA  
Maart 1989
- 'Slibontwatering; een voorstudie'  
TU-Delft, TU-Eindhoven  
RWZI 2000 89-01  
Januari 1989
- 'Knelpunten bij de invoering van defosfatering'  
Witteveen + Bos Raadgevende ingenieurs B.V.  
RWZI 2000 89-02  
April 1989
- 'Selectieve verwijdering van zware metalen uit ruw rioolwater met behulp van een  
magneetsysteem'  
Smit-Nijmegen, TNO-Maatschappelijke Technologie  
RWZI 2000 89-03  
Oktober 1989
- 'Verwijdering van zware metalen uit zuiveringsslib door electrolyse'  
TNO-Maatschappelijke Technologie  
RWZI 2000 89-04  
Oktober 1989

---

<sup>1</sup> Te bestellen bij:  
Hageman Verpakkers B.V., Postbus 281, 2700 AC Zoetermeer  
tel. 079-611188 / fax 079-613927

- 'Hydrolyse van zuiveringslib in combinatie met anaërobe vergisting'  
TNO-Maatschappelijke Technologie  
RWZI 2000 89-05  
Oktober 1989
  
- 'Het drogen van zuiveringslib met het Carver-Greenfieldproces'  
TNO-Maatschappelijke Technologie, Witteveen + Bos Raadgevende ingenieurs B.V.  
RWZI 2000 89-06  
December 1989
  
- 'Natte oxydatie van zuiveringslib met het Vertech-systeem'  
TNO-Maatschappelijke Technologie, Witteveen + Bos Raadgevende ingenieurs B.V.  
RWZI 2000 89-07  
December 1989
  
- 'Symposium 'RWZI 2000' d.d. 5 oktober 1989'  
RIZA, STORA  
RWZI 2000 89-08  
December 1989
  
- 'Jaarverslag 1989'  
RIZA, STORA  
RWZI 2000 90-01  
Maart 1990
  
- 'AB-systemen; een inventarisatie'  
DHV Raadgevend Ingenieursbureau BV  
RWZI 2000 90-02  
September 1990
  
- 'Vergisting van aëroob gestabiliseerd slib'  
DHV Raadgevend Ingenieursbureau BV  
RWZI 2000 90-03  
Augustus 1990
  
- 'Het afleiden van procestechnologische relaties uit bedrijfsgegevens van rwzi's'  
DHV Raadgevend Ingenieursbureau BV  
RWZI 2000 90-04  
December 1990
  
- 'Automatische regeling van het slibgehalte in beluchtingstanks'  
Adviesbureau BKH  
RWZI 2000 90-05  
September 1990



- 'Verkenning Biodenitro-Biodenipho'  
Witteveen + Bos Raadgevende ingenieurs B.V.  
RWZI 2000 90-06  
Juni 1990
  
- 'Linpor-sponsjes als dragermateriaal bij de aërobe zuivering van rioolwater'  
TNO-Maatschappelijke Technologie  
RWZI 2000 90-07  
Oktober 1990
  
- 'Jaarverslag 1990'  
RIZA, STORA  
RWZI 2000 91-01  
Maart 1991
  
- 'Deep Shaft-systemen; een inventarisatie'  
DHV Raadgevend Ingenieursbureau BV  
RWZI 2000 91-02  
Maart 1991
  
- '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
  
- 'Jaarverslag 1991'  
RIZA, STOWA  
RWZI 2000 92-01  
Maart 1992
  
- 'Vergisten van zuiveringslib; een vergelijking tussen thermofiele en mesofiele slibgisting'  
Haskoning B.V., RIZA, LU-Wageningen, DHV Water B.V.  
RWZI 2000 92-02  
Maart 1992
  
- 'First Dutch-Japanese workshop on the treatment of municipal waste water'  
8-11 april 1991, Heelsum, The Netherlands. Part I and part II.  
RIZA, STORA, TU-Delft  
RWZI 2000 92-03  
Maart 1992

- 'Biologische fosfaatverwijdering in combinatie met een korrelreactor'  
LU-Wageningen, DHV Water B.V.  
RWZI 2000 92-04  
Augustus 1992
- '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
- 'Vergaande nutriëntenverwijdering op een zeer laagbelaste actief-slibinstallatie'  
Zuiveringsschap Hollandse Eilanden en Waarden, Grontmij N.V.  
RWZI 2000 92-06  
Oktober 1992
- '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
- 'Behandeling van stedelijk afvalwater met het schachtreactorsysteem'  
V & P Waste Water Management B.V.  
RWZI 2000 92-08  
Juli 1994
- 'Stikstofverwijdering uit interne stromen op rwzi's'  
DHV Water B.V.  
RWZI 2000 92-09  
December 1992
- 'Jaarverslag 1992'  
RIZA, STOWA  
RWZI 2000 93-01  
April 1993
- 'Onderzoek demonstratie-installaties magnetische defosfatering'  
Envimag B.V.  
RWZI 2000 93-02  
April 1993



- 'Modelvorming en optimalisatie van biologische defosfatering van afvalwater. Microbiële aspecten'  
LU-Wageningen, vakgroep Microbiologie  
RWZI 2000 93-03  
November 1993
- 'Jaarverslag 1993'  
RIZA, STOWA  
RWZI 2000 94-01  
Juli 1994
- 'Fundamentele aspecten van slibontwatering'  
Deel 1: Samenvattend verslag  
Deel 2: Flocculatiemechanismen  
Deel 3: Filtratie-expressie modellering  
Deel 4: Filtratie expressie experimenten  
Deel 5: Slib-water binding  
Deel 6: Karakterisering van slibben  
Deel 7: Ontwikkeling nieuw CST-apparaat  
Deel 8: Congresbijdragen  
TU-Eindhoven, Laboratorium voor Scheidingstechnologie  
RWZI 2000 94-02  
Juli 1994
- 'Fundamenteel onderzoek vermindering slibproductie'  
VU, werkgroepen Theoretische Biologie en Microbiologie  
RWZI 2000 94-03  
September 1994
- 'Alternatieven voor de slibretentie bij hooggesuspendeerde waterzuiverings-systemen'  
DHV Water BV  
RWZI 2000 94-04  
September 1994
- 'Evaluatie en overzicht van het onderzoekprogramma RWZI 2000'  
RIZA, STOWA  
RWZI 2000 94-05  
December 1994
- 'Aërobe biofilm op gesuspendeerde drager ten behoeve van waterzuivering'  
TU-Delft, vakgroep Bioprocestechnologie  
RWZI 2000 94-06  
December 1994

