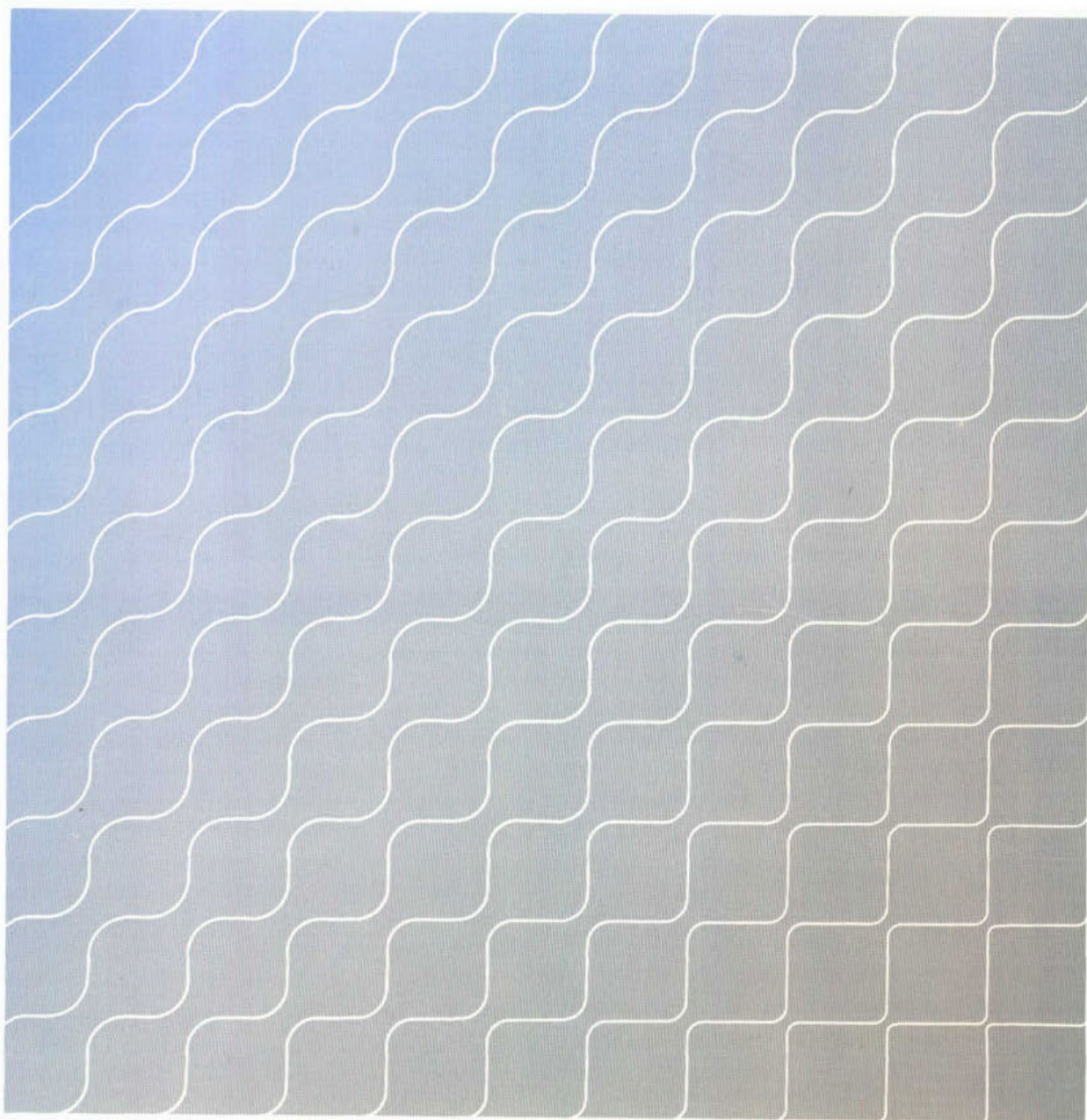




MOGELIJKHEDEN TOT OPTIMALISATIE VAN DE BIOLOGISCHE STIKSTOFELIMINATIE





**Ministerie van Volkshuisvesting,
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer**

Directoraat-Generaal Milieubeheer
Postbus 30945, 2500 GX Den Haag



Ministerie van Economische Zaken

Postbus 20101, 2500 EC 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



MOGELIJKHEDEN TOT OPTIMALISATIE VAN DE BIOLOGISCHE STIKSTOFELIMINATIE

RWZI 2000 94-09

auteur:

TU-Delft, vakgroep

Bioprocestechnologie:

ir. M.A. Pot

INHOUDSOPGAVE

	Blz.
VOORWOORD	3
SAMENVATTING	5
1. INLEIDING	7
1.1 Algemene aspecten van de stikstof-eliminatie	
1.2 Hoofdpijnen van het onderzoeksproject	
1.3 Uitvoering van het onderzoek	
2. OPTIMALISATIE VAN DE CONDITIES VOOR HETEROTROFE NITRIFICATIE DOOR <i>Thiosphaera pantotropha</i>	11
2.1 Inleiding	
2.2 Bepaling van optimale DO en effect van groeisnelheid	
2.3 Bepaling van optimale pH	
2.4 Stabiliteit van de heterotrofe nitrificatie activiteit	
2.5 Conclusies	
3. EFFECT VAN DYNAMISCHE PROCESCONDITIES OP GROEI, HETEROTROFE NITRIFICATIE EN AËROBE DENITRIFICATIE DOOR <i>Thiosphaera pantotropha</i>	27
3.1 Inleiding	
3.2 Cyclische variatie in opgeloste O ₂	
3.3 Cyclische variatie van CZV	
3.4 Conclusies dynamische experimenten	
4. DE MOGELIJKHEID VAN DE NO ₂ -ROUTE VOOR CONVENTIONELE NITRIFICATIE & DENITRIFICATIE ; EEN LITERATUURSTUDIE	49
5. EFFECT VAN RESERVESTOFVORMING OP DE (CZV/N)-VERHOUDING IN CONVENTIONELE NITRIFICATIE & DENITRIFICATIE	53
5.1 Inleiding	
5.2 Beïnvloeding van de CZV/N-verhouding in een open denitrificerende mengpopulatie door het voedingsregime	
5.3 Conclusies	
6. KINETIEK VAN RESERVESTOF-VORMING EN -CONSUMPTIE IN <i>Thiosphaera pantotropha</i>	67
6.1 Inleiding	
6.2 Effect van groeisnelheid op de kinetiek van reservestof-vorming en - consumptie in <i>Thiosphaera pantotropha</i>	
6.3 Modellerings	
6.4 Conclusies	
7. CONCLUSIES	77

SYMBOLENLIJST

79

LITERATUUR

81

VOORWOORD

In het kader van de onderzoekprogramma's RWZI 2000 (projektnummer 3224/4) en IOP Milieubiotechnologie (projektnummer 90206) is door de vakgroep Bioprocestechnologie van de Technische Universiteit Delft fundamenteel onderzoek uitgevoerd naar mogelijkheden voor verdere optimalisatie van biologische stikstofeliminatie uit afvalwater.

Onder andere is de mogelijkheid onderzocht van een één-trap proces voor de biologische stikstofeliminatie via simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie in plaats van de doorgaans opeenvolgende autotrofe aërobe nitrificatie en anaërobe denitrificatie. Gedurende dit onderzoek is vast komen te staan dat het modelorganisme *Thiosphera pantatropa* genetisch instabiel bleek te zijn en de eigenschap tot simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie had verloren. Hierdoor alsmede door de benodigde hoge CZV/N-verhouding voor aërobe denitrificatie is deze optie voor verdere optimalisatie als niet kansrijk beoordeeld en is het onderzoek voortijdig beëindigd.

Meer perspectief biedt de mogelijkheid om de hoeveelheid toe te voegen externe C-bron voor conventionele denitrificatie te verlagen door gebruik te maken van de nitriet-route en door de vorming en consumptie van reservestoffen tijdens denitrificatie te optimaliseren. De nitrietroute is bekeken aan de hand van een literatuurstudie, terwijl de rol van reservestoffen experimenteel is vastgesteld.

Het onderzoek werd begeleid door een commissie bestaande uit ir. A.W. van der Vlies (Zuiveringsschap Hollandse Eilanden en Waarden, voorzitter), ir. A.M.G.A. van Bortel (SENER), ing. J.J. Jonk (Hoogheemraadschap West-Brabant), dr. A. Klapwijk (LU-Wageningen), dr.ir. W. Pronk (DSM) en ing. G.B.J. Rijs (RIZA).

Lelystad, april 1995

Voor de Stuurgroep RWZI 2000

prof. dr. J. de Jong
(voorzitter)

SAMENVATTING

Het onderzoek naar de mogelijkheden tot optimalisatie van de biologische stikstofeliminatie is verricht volgens twee hoofdlijnen.

Ten eerste is de mogelijkheid onderzocht van simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie voor de eliminatie van stikstof uit afvalwater. Het gebruikte modelorganisme was *Thiosphaera pantotropha*. De voornaamste conclusies zijn:

- de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie door *Thiosphaera pantotropha* wordt voornamelijk beïnvloed door de zuurstofconcentratie en de groeisnelheid. Optimale condities voor dit type stikstof-eliminatie zijn $dO_2 = 50\%$ luchtverzadiging, $pH = 8$, voldoende hoge ammoniacconcentratie ($> 0,3 \text{ mM NH}_3$) en hogere groeisnelheden.
- onder dynamische condities van substraat en/of elektron-acceptor slaat *Thiosphaera pantotropha* grote hoeveelheden reservestoffen op.
- de simultane heterotrofe nitrificatie- en aërobe denitrificatie-activiteit van het model-organisme *Thiosphaera pantotropha* is genetisch instabiel.
- de simultane heterotrofe nitrificatie- en aërobe denitrificatie-activiteit is onlosmakelijk gekoppeld aan het plaatsvinden van groei. Onder optimale condities is voor aërobe denitrificatie met de huidige activiteit een zeer hoge CZV/N-verhouding noodzakelijk (71 mg-CZV/mg-N). In het verleden was beduidend minder CZV nodig voor aërobe denitrificatie (30 mg-CZV/mg-N).

Ten tweede is de mogelijke minimalisatie van de benodigde CZV/N-verhouding voor conventionele nitrificatie en denitrificatie onderzocht. Deze verhouding kan positief worden beïnvloed door te kiezen voor de nitriet-route in plaats van via nitraat en/of door de rol van reservestof-vorming en -consumptie tijdens het denitrificatie-proces te optimaliseren. De nitriet-route is bekeken m.b.v. literatuurstudie, terwijl de rol van reservestoffen experimenteel is vastgesteld. Hiertoe werd o.a. het effect van verschillende voedingsregimes tijdens de denitrificatie op de vorming en consumptie van poly- β -hydroxyboterzuur (PHB) onderzocht. Er werd er een model opgesteld dat de waargenomen vorming en vervolgens consumptie van PHB beschrijft. De voornaamste conclusies zijn:

- het stikstof-eliminatieproces via nitriet kan alleen stabiel bedreven worden als er geselecteerd wordt op de afwezigheid van nitriet-oxideerders dmv. het instellen van een voldoende hoge groeisnelheid. Het effect van inhibitie op de activiteit van nitriet-oxideerders is slechts van tijdelijke aard.
- de vorming van reservestoffen in een éénslibs aëroob/anoxisch systeem bleek niet te voorkomen, ondanks aanpassing van het voedingsregime tijdens de denitrificatie.
- het effect van het voedingsregime en reservestofvorming tijdens de denitrificatie op de biomassa-yield in een éénslibs aëroob/anoxisch systeem is nog onbegrepen.
- de vorming van PHB uit een plotselinge overmaat substraat bleek goed te beschrijven met eenvoudige kinetische relaties. Ook de vervolgens optredende PHB-consumptie kon op deze manier beschreven worden. De gebruikte kinetiek-modellen lijken sterk op de modellen die gebruikt worden om PHB-vorming en consumptie bij het fosfaat-verwijderingsproces te beschrijven.

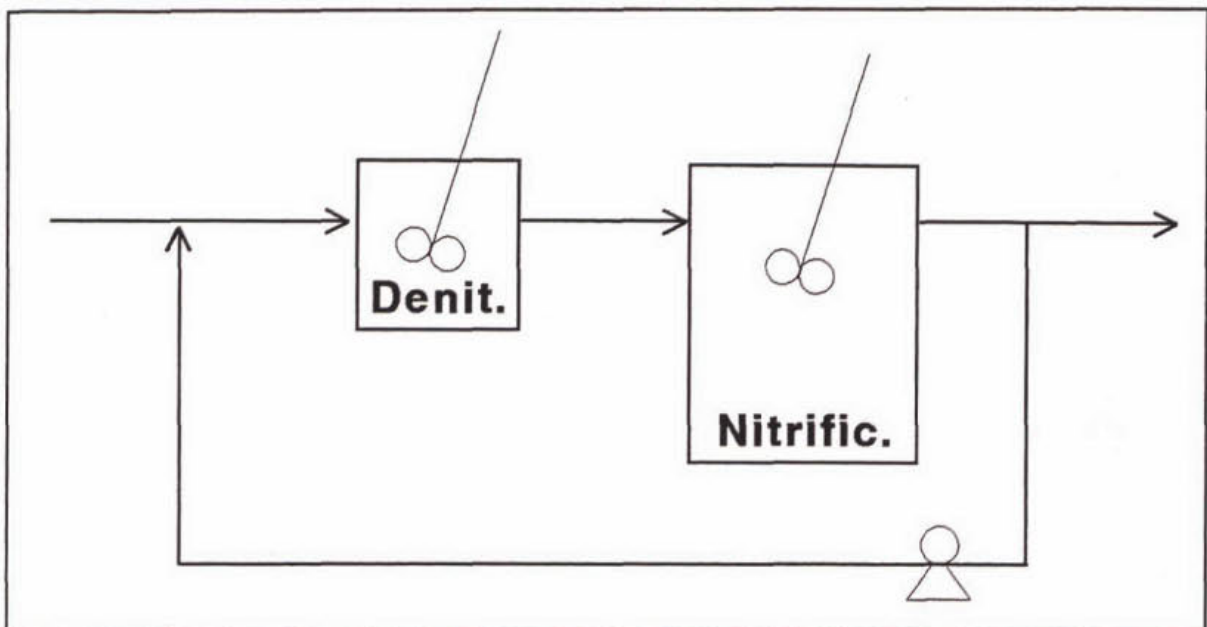
Concluderend kan gesteld worden dat toepassing van *Thiosphaera pantotropha* voor N-eliminatie in rioolzuiveringsinrichtingen niet tot de mogelijkheden behoort. Vermindering van de (CZV/N)-verhouding voor denitrificatie door gebruik te maken van de NO_2^- -route en/of door reservestof-vorming te remmen biedt wel perspectief.

1 INLEIDING

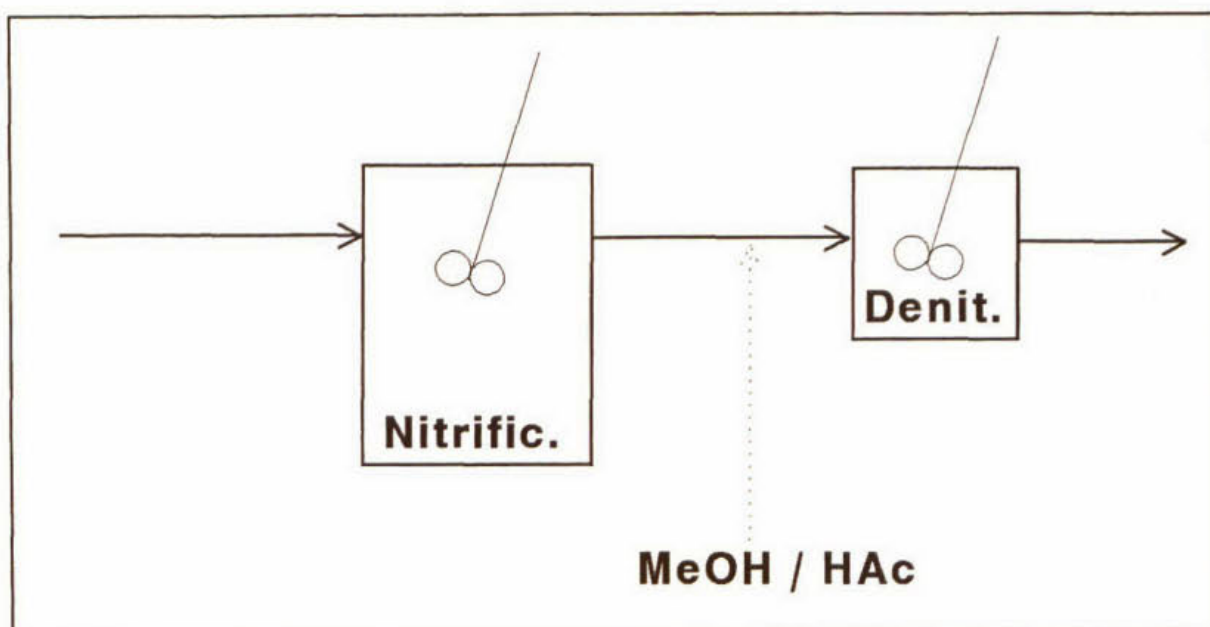
1.1 Algemene aspecten van de stikstof-eliminatie

De vaststelling van nieuwe, scherpere normen voor het stikstofgehalte van het effluent van afvalwaterzuiveringsinstallaties was de aanleiding voor hernieuwde wetenschappelijke interesse in het biologische stikstofeliminatie-proces.

Aan de vergaande verwijdering van stikstof uit afvalwater met de conventionele technieken zijn enkele problemen verbonden. Voor de oxydatie van ammonium tot nitriet en vervolgens nitraat zijn zeer laagbelaste actief-slibsystemen en dus grote reactoren noodzakelijk. In deze reactoren wordt naast ammonium ook alle elektrondonor geoxideerd. Voor de reductie van nitraat tot stikstofgas is de aanwezigheid van voldoende elektrondonor echter noodzakelijk. In conventionele systemen wordt dit bewerkstelligd door recirculatie van een groot gedeelte van het behandelde afvalwater. Dit is schematisch weergegeven in figuur 1 (voor-denitrificatie).



Figuur 1 Stikstofverwijderingsproces met voor-denitrificatie.



Figuur 2 Stikstofverwijderingsproces met na-denitrificatie.

Een andere mogelijkheid is het toedienen van elektrondonor uit externe bron (bijvoorbeeld methanol), schematisch weergegeven in figuur 2 (na-denitrificatie). Aan beide technieken zijn vaak hoge kosten verbonden. De keuze tussen deze proces-configuraties hangt onder meer af van de samenstelling van het afvalwater. Als er onvoldoende elektrondonor aanwezig is in het afvalwater om alle stikstof om te zetten in stikstofgas (te lage CZV/N-verhouding van het afvalwater) dan wordt er in het algemeen gekozen voor na-denitrificatie en het toedienen van extra elektron-acceptor. Deze situatie van CZV-tekort doet zich vaak voor, zeker nu er steeds meer biologische fosfaat-eliminatie gewenst wordt. Het fosfaateliminatie-proces vraagt eveneens CZV, waardoor er minder CZV overblijft voor stikstofeliminatie.

Voor verregaande nitrificatie is een lange slibleeftijd nodig. Dit betekent dat er grote beluchtingsbassins nodig zijn. Het toevoegen van extra CZV (wat nodig is voor verregaande denitrificatie) leidt tot meer slibproductie. De grootste kostenfactoren liggen op het gebied van:

- (i) het verbruik van extra elektrondonor voor denitrificatie; een gunstiger (CZV/N)-verhouding is gewenst.
- (ii) het gebruik van grotere reactoren wegens de benodigde langere slibleeftijd; hogere groeisnelheden zijn gewenst.
- (iii) hogere slibproductie door denitrificatie; een lagere slibproductie is gewenst.
- (iv) hogere kosten voor beluchten wegens nitrificatie; lagere zuurstofconsumptie is gewenst.

1.2 Hoofdlijnen van het onderzoeksproject

In het kader van het RWZI-2000 project 3224/4 van RWS/RIZA en STOWA en in het kader van het IOP-mbt project 90206 van SENTER werd er onderzoek verricht naar de mogelijkheden tot optimalisatie van de biologische stikstofeliminatie. In het onderzoekswerk zijn 2 hoofdlijnen onderzocht:

- (i) de toepassing van andere micro-organismen voor stikstof-eliminatie, met name *Thiosphaera pantotropha* waarmee nitrificatie en denitrificatie bij korte slibleeftijd mogelijk zou zijn en waarmee nitrificatie & denitrificatie in 1 organisme verloopt en niet, zoals in het conventionele stikstofeliminatie-proces, door 2 verschillende typen organismen (nitrificeerders en denitrificeerders).
- (ii) het verminderen van de (CZV/N)-verhouding in conventionele nitrificatie- en denitrificatie-processen, door a) gebruik te maken van de nitriet-route en b) door de reservestof-vorming te remmen.

1.2.1 Toepassen van *Thiosphaera pantotropha* voor stikstof-eliminatie

Bij het simultane heterotrofe nitrificatie- en aërobe denitrificatie-proces voor de eliminatie van stikstof-verbindingen uit afvalwater wordt er gebruik gemaakt van heterotrofe organismen die ammonium intracellulair oxyderen tot nitriet en vervolgens dit nitriet reduceren tot stikstof-gas, ook in aanwezigheid van zuurstof. Volledige stikstofverwijdering kan plaatsvinden bij een korte slibleeftijd, omdat gebruik gemaakt wordt van snelgroeïende heterotrofe organismen in plaats van de traaggroeïende autotrofe organismen van het conventionele stikstofverwijderingsproces. Het bekendste voorbeeld van een simultaan heterotroof nitrificerend en aëroob denitrificerend organisme is *Thiosphaera pantotropha*. Bij het onderzoek zijn ten eerste bepaald de condities waarbij de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie-activiteit maximaal is. Ten tweede zijn de procescondities bepaald waarbij *Thiosphaera*-achtige organismen zich in het afvalwaterzuiveringsproces ophopen in aanwezigheid van andere organismen.

1.2.2 Verminderen van de CZV/N-verhouding in conventionele nitrificatie/denitrificatie

In de praktijk wordt vaak een (CZV/N)-verhouding van 4 - 5 gram CZV per gram N gevonden. Echter, theoretisch is zonder produktie van biomassa maar 2,9 g CZV/ g NO_3^- nodig voor de reductie van nitraat tot stikstofgas. Het verschil wordt meestal in z'n geheel toegeschreven aan slibproduktie. In dit onderzoek is zijn twee aspecten onderzocht:

- (i) de mogelijkheid van de nitriet-route. Welke voordelen zijn er en welke condities zijn nodig?
- (ii) het nitrificatie/denitrificatie-proces wordt vaak uitgevoerd onder sterk dynamische condities van CZV-toevoer en elektronacceptor-aanwezigheid. Onder deze condities is het zeer wel denkbaar dat er reservestoffen worden gevormd (bijvoorbeeld poly(β -hydroxyboterzuur (PHB) of glycogeen). Het is mogelijk dat met behulp van deze reservestoffen er doorslag (of "carry over") van CZV vanuit de anoxische fase naar de aërobe fase plaatsvindt. Hierdoor kan de (CZV/N)-verhouding nadelig worden beïnvloed.

1.3 Uitvoering van het onderzoek

In dit rapport komen achtereenvolgens de volgende onderwerpen ter sprake:

- Optimalisatie van de condities voor heterotrofe nitrificatie met *Thiosphaera pantotropha* (Hfdst. 2).
- Effect van dynamische condities op de groei van *Thiosphaera pantotropha* (Hfdst. 3).
- De mogelijkheid van de NO_2^- -route voor conventionele nitrificatie & denitrificatie (Hfdst. 4).
- Effect van reservestofvorming op de (CZV/N)-verhouding in conventionele nitrificatie & denitrificatie (Hfdst. 5).
- Kinetiek van reservestof-vorming en -consumptie in *Thiosphaera pantotropha* (Hfdst. 6).

In hoofdstuk 7 worden tenslotte de resultaten geëvalueerd.

2 OPTIMALISATIE VAN DE CONDITIES VOOR HETEROTROFE NITRIFICATIE DOOR *Thiosphaera pantotropha*

2.1 Inleiding

Om de optimale procescondities voor simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie-proces te bepalen zijn er chemostaatexperimenten uitgevoerd met *Thiosphaera pantotropha* om (i) de stoechiometrische parameters, (ii) het effect van groeisnelheid en (iii) het effect van opgeloste zuurstof- en ammoniak-concentratie te bepalen.

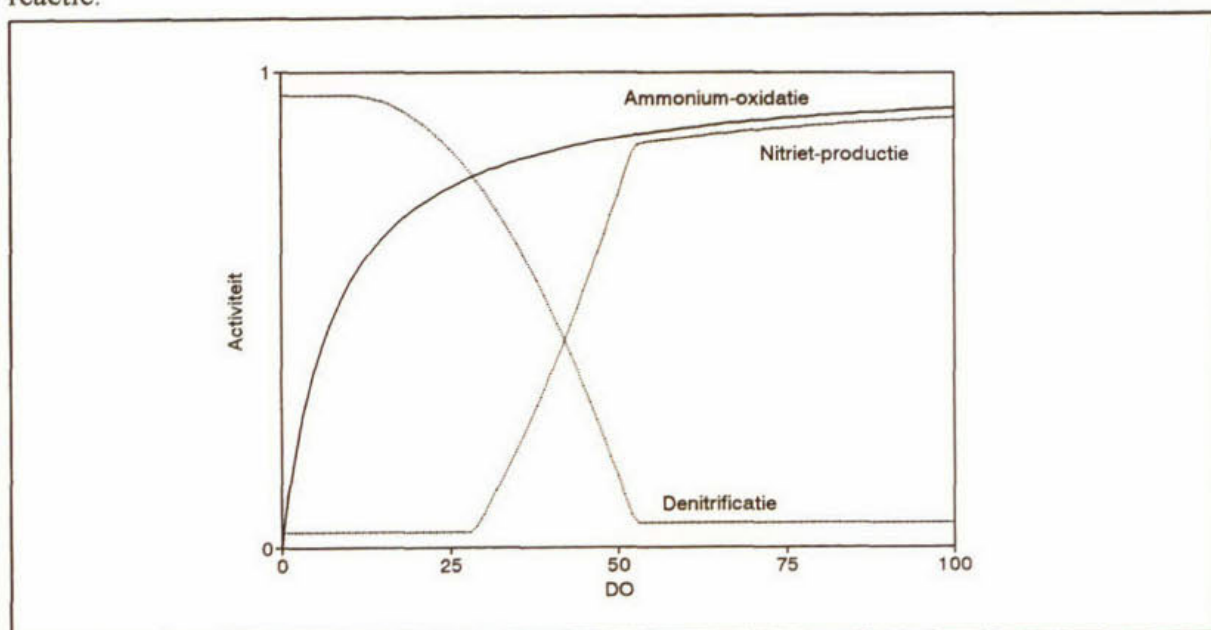
De facultatief aërobe denitrificeerder *Thiosphaera pantotropha* is genetisch sterk verwant aan *Paracoccus denitrificans* en is in minerale media in staat om zowel aëroob als anoxisch te groeien op acetaat als enige koolstof- en energie-bron, in deze opzichten is het een normaal denitrificerend organisme. *Thiosphaera pantotropha* is geïsoleerd uit een pilot scale afvalwaterzuiveringsstelsel van Gist-brocades nv te Delft (Robertson (1988), Robertson & Kuenen (1983), Robertson & Kuenen (1988), van Niel (1991)). Een bijzonderheid van *Thiosphaera pantotropha* is het vermogen om ammoniak te oxyderen (= nitrificatie). In tegenstelling tot andere, voornamelijk autotrofe ammoniak-oxideerders zoals *Nitrosomonas europaea* levert deze reactie geen energie op voor groei, maar kost zelfs energie. De oxydatie van ammoniak behoort niet tot het primaire metabolisme van *Thiosphaera pantotropha* (Castignetti (1990), Castignetti *et al* (1990), Robertson & Kuenen (1992)). Daarnaast is het organisme in staat om bij relatief hoge opgeloste zuurstofconcentraties nog met relatief hoge snelheid te denitrificeren (Robertson (1988), Bell & Richardson & Ferguson (1990), Bell & Ferguson (1991), van Niel (1991)). Tussen ongeveer 10% en 50% luchtverzadiging is de zuurstofconcentratie voldoende hoog om ammoniak-oxydatie toe te staan en laag genoeg om alle gevormde nitriet ogenblikkelijk te denitrificeren. Daarnaast wordt een deel van de totale ammoniak-omzetting veroorzaakt door ammoniak-assimilatie.

De stoechiometrie van het *Thiosphaera*-metabolisme is reeds eerder bepaald (Geraats *et al*, 1990). Het komt in grote mate overeen met dat van het veel vaker onderzochte organisme *Paracoccus denitrificans*. Om het effect van verschillende (dynamische) procescondities op de totale stikstof-eliminatie te kunnen bepalen is ook gedetailleerde kennis nodig over de kinetiek van de verschillende reacties uit het metabool gestructureerde model. Van belang zijn het effect van groeisnelheid en de concentraties van de verschillende substraten zoals ammoniak, zuurstof en acetaat op de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie activiteit. Voor validatie van het model is het van belang om het effect van groeisnelheid μ , opgeloste zuurstofconcentratie DO en pH op *Thiosphaera pantotropha* experimenteel vast te stellen.

2.2 Bepaling van optimale DO en effect van groeisnelheid

De groeisnelheid kan op verschillende manieren effect hebben op de overall activiteit van het simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces. Bij hogere groeisnelheid zal er sprake zijn van hogere actieve biomassa-concentratie (door afname van het effect van maintenance op de biomassa-yield). Tevens zal bij hogere groeisnelheid de specifieke nitrificatie-snelheid toenemen (er wordt verondersteld dat deze een stijgende functie is van de groeisnelheid). Als bij gelijkblijvende condities de groeisnelheid gevarieerd wordt, kan het effect van de groeisnelheid op de specifieke heterotrofe nitrificatie activiteit bepaald worden.

Bij hogere heterotrofe nitrificatie-activiteit wordt in de literatuur een lagere yield gevonden (Robertson (1988), Castignetti (1990)). Dit kan verklaard worden uit het feit dat heterotrofe nitrificatie energie kost en dus ten koste gaat van de biomassa-vorming. Bij autotrofe nitrificeerders is de oxydatie van ammonium tot nitriet juist de energie-leverende reactie.

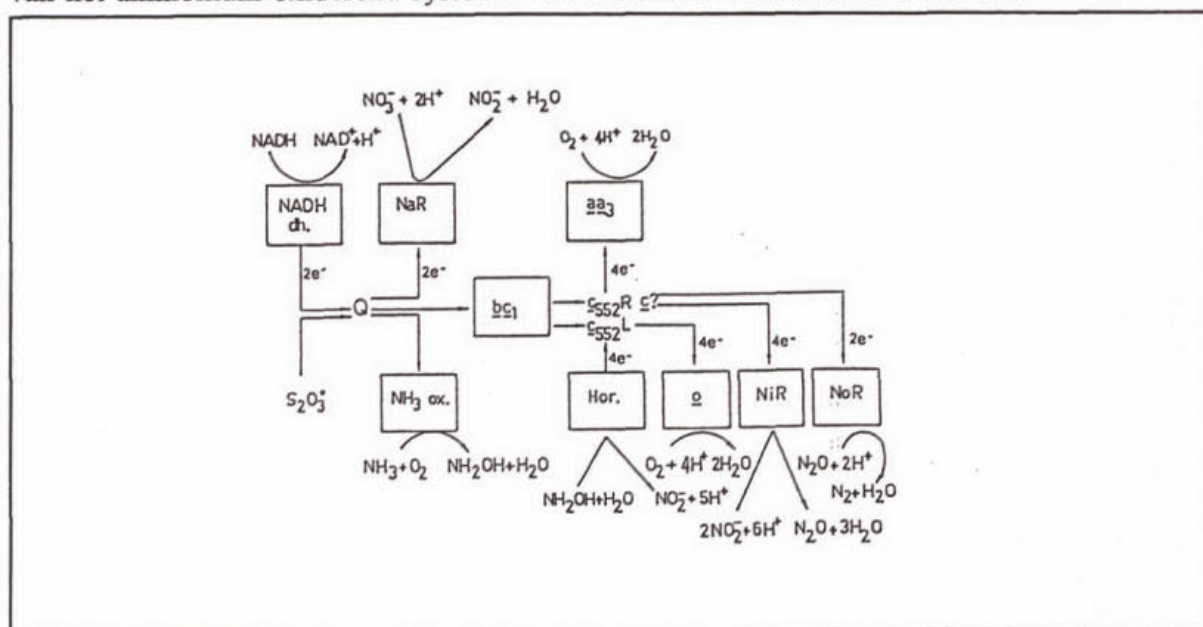


Figuur 3 Verwachte simultane heterotrofe nitrificatie- en aërobe denitrificatie-activiteit als functie van opgeloste zuurstofconcentratie.

De zuurstofconcentratie kan op verschillende manieren effect hebben op de activiteit van het simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces. Het organisme *Thiosphaera pantotropha* heeft een ammonium-monoöxygenase vergelijkbaar met dat van de autotrofe nitrificeerders. Dit enzym catalyseert de eerste stap van de nitrificatie, de vorming van hydroxylamine uit moleculair zuurstof (O_2) en ammonia (NH_3). Vervolgens wordt dit verder geoxideerd naar nitriet (NO_2^-). *Thiosphaera pantotropha* kan nitriet niet tot nitraat (NO_3^-) oxyderen. Als de concentratie zuurstof (één van de substraten) laag is, dan zal de activiteit van het ammonium-monoöxygenase laag zijn en dus zal de activiteit van het gehele simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces ook laag zijn. Bij toenemende zuurstofconcentraties zal de activiteit dus toenemen.

Een andere manier waarop de zuurstofconcentratie invloed heeft op de activiteit is door inhibitie van de denitrificatie-route. *Thiosphaera pantotropha* heeft onder de gekozen experimentele condities constitutieve denitrificatie-enzymen, dat wil zeggen dat het organisme niet de aanwezigheid van nitraat en/of de afwezigheid van zuurstof nodig heeft voor inductie van deze enzymen. Dit gegeven maakt ook aërobe denitrificatie mogelijk (Robertson (1988), Bell & Richardson & Ferguson (1990), Bell & Ferguson (1991), van Niel (1991)). Echter, bij hoge zuurstofconcentraties zal het organisme zoveel mogelijk gebruik maken van zuurstof als elektronacceptor en zo min mogelijk van nitraat of nitriet. Bij toenemende zuurstofconcentraties zal de denitrificatie-activiteit snel afnemen.

Bij hogere zuurstofconcentraties zou door het uitvallen van de aërobe denitrificatie ophoping van het intracellulair gevormde nitriet moeten plaatsvinden (figuur 3). Deze verwachte nitrietproduktie bij hoge zuurstofconcentraties werd bij voorgaande experimenten met dit organisme nooit waargenomen. Dit wijst op een vorm van regulatie van het ammonium-oxiderend systeem. Het mechanisme hiervan is onbekend.

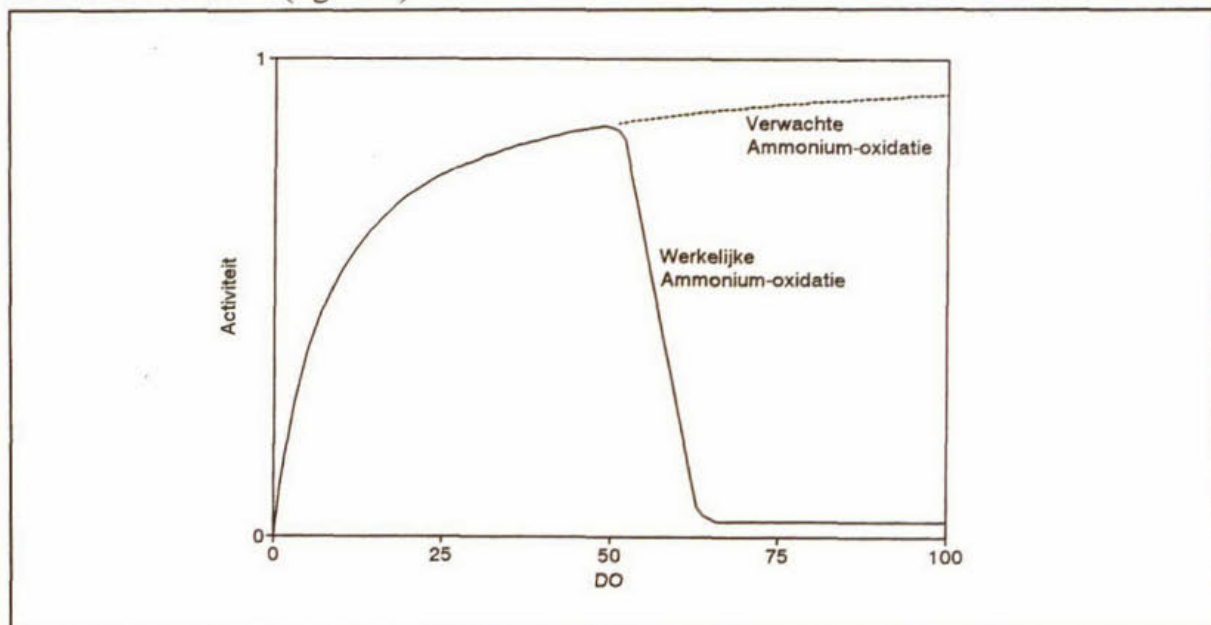


Figuur 4 Vertakte elektronentransportketen van *Thiosphaera pantotropha* (Robertson (1988)).

De vertakte elektronentransport-keten van *Thiosphaera pantotropha* komt in vele opzichten overeen met die van *Paracoccus denitrificans* (Robertson & Kuenen (1988), Hazelaar, niet-gepubliceerd). Er zijn twee terminale oxidatoren, namelijk cytochroom o en cytochroom aa₃ (figuur 5, van Spanning (1991)). Deze enzymen worden gebruikt om de elektronen die vrijkomen bij de oxydatie van NADH tot NAD⁺ over te dragen op zuurstof, waarbij water ontstaat (terminale oxydatie). Daarnaast is oxydatie van NADH mogelijk mbv. de oxidoreductases van de denitrificatie (nitraat-reductase, nitriet-reductase, N₂O-reductase). Er wordt gepostuleerd dat de terminale oxydatie-route via zuurstof een beperkte maximale capaciteit heeft, een zogenaamde 'bottleneck'. Onder sommige condities, qua zuurstofconcentratie en substraat-opnamesnelheid, is deze capaciteit onvoldoende om alle geproduceerde NADH te oxyderen. Het overschot aan NADH moet dan op een andere manier geoxideerd worden, om een tekort aan NAD⁺ te voorkomen. Een mogelijkheid is

de vorming van een gereduceerd polymeer zoals PHB. Een andere mogelijkheid is de aërobe denitrificatie van het intra-cellulair door heterotrofe nitrificatie gevormde nitriet, of de aërobe denitrificatie van extern aanwezig nitraat of nitriet.

De combinatie van deze effecten zou een optimum op moeten leveren voor het simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces als functie van de opgeloste zuurstofconcentratie (figuur 5).



Figuur 5 Werkelijke simultane heterotrofe nitrificatie- en aërobe denitrificatie-activiteit als functie van opgeloste zuurstofconcentratie.

MATERIALEN EN METHODEN

Het is experimenteel zeer moeilijk om uit ammonium geproduceerd stikstofgas direct in een chemostaat-cultuur te meten. De hoeveelheid ammonium omgezet door oxydatie dient dus bepaald te worden uit de stikstofbalans over de chemostaat. De hoeveelheid geoxideerde ammonium is het verschil tussen de totale hoeveelheid omgezette ammonium en de hoeveelheid geassimileerde ammonium. Deze indirecte bepaling van de nitrificatie-activiteit bemoeilijkt de bestudering van het proces.

Om het effect van de opgeloste zuurstofconcentratie op de heterotrofe nitrificatie-activiteit te bepalen werden er chemostaat-experimenten uitgevoerd met *Thiosphaera pantotropha* GB17 bij $dO_2 = 10\%$, 30% , 50% , 60% , 70% , en 90% luchtverzadiging. Er werd gebruik gemaakt van een mineraal medium met acetaat als koolstof- en energie-bron. De stikstofbron voor assimilatie en nitrificatie was ammonium. Er werd gemeten bij twee verschillende groeisnelheden, $0,05\text{ h}^{-1}$ en $0,15\text{ h}^{-1}$. De temperatuur was $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, de pH werd geregeld op 8,0.

Zuurstofconcentratie en verdunningssnelheid werden ingesteld en vervolgens werd gewacht op 'steady state'. Alle cultures waren acetaat-gelimiteerd, d.w.z. geen aantoonbare acetaatconcentratie in het supernatant. Elke steady state werd minstens drie maal bemonsterd. De volgende bepalingen werden bij een meting uitgevoerd: TOC(suspensie)

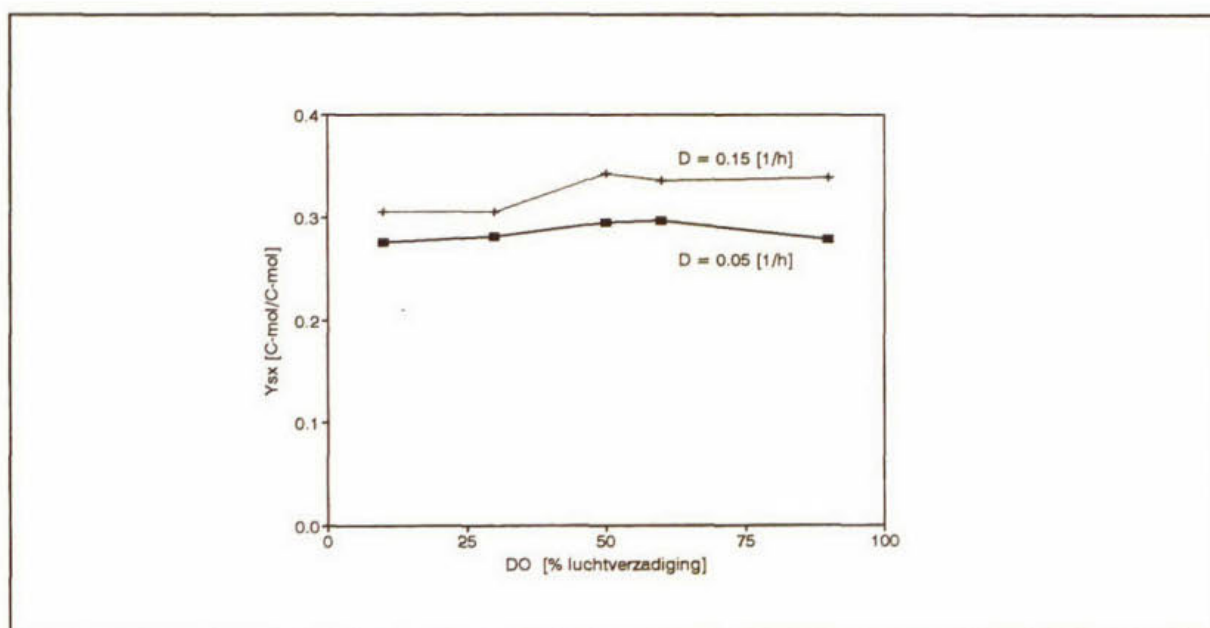
TOC(medium), NH_4^+ (supernatant), NH_4^+ (medium), optische dichtheid bij 420 nm en 660 nm en verdunningssnelheid. Elke steady state werden de cultures getest op reinheid d.m.v. uitplaten op "plate count" agar. Incidenteel werden de cultures getest op de aanwezigheid van nitriet, nitraat en lachgas (N_2O), maar dit werd nooit aangetoond. Het verlies van ammonium via de gasfase ('ammonia stripping') was niet aantoonbaar.

De chemostaat-experimenten vertonen een zekere spreiding in de ingestelde verdunningssnelheden. Per chemostaat-culture werd er gestreefd naar een meting bij $D = 0,05 \text{ [h}^{-1}\text{]}$ en een meting bij $D = 0,15 \text{ [h}^{-1}\text{]}$. De pompdebieten werden na het starten van de continu toeloop dagelijks gemeten, maar in de regel niet meer aangepast (om een steady state niet te verstoren). Daardoor kon het voorkomen dat een steady state werd verkregen bij een andere verdunningssnelheid dan de beoogde verdunningssnelheid.

RESULTATEN EN DISCUSSIE

Tabel 1 Omzettingen door *Thiosphaera pantotropha* GB17 in de chemostaat bij verschillende zuurstofconcentraties en verdunningssnelheden.

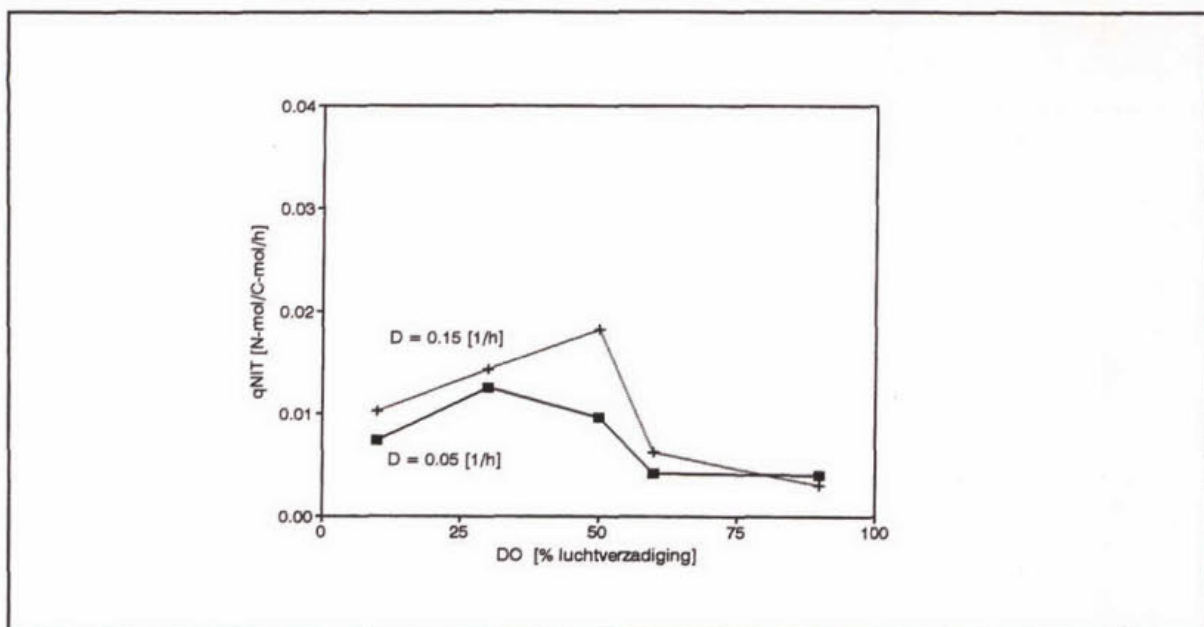
Zuurstof-concentratie [% lucht-verzadiging]	pH [-]	Ammonium-concentratie [mM]	Groei-snelheid [1/h]	Acetaat Omgezet [C-mM]	Ammonium Omgezet [mM]	Biomassa-concentratie [C-mM]
10	8.0	3.55	0.065	40.15	4.01	11.06
10	8.0	2.66	0.153	40.67	3.94	12.44
30	8.0	3.64	0.089	40.67	4.47	11.44
30	8.0	2.68	0.149	40.89	4.33	12.50
50	8.0	2.88	0.100	42.82	4.37	12.63
50	8.0	2.77	0.226	41.44	4.70	14.22
60	8.0	3.77	0.065	39.92	3.72	11.83
60	8.0	3.11	0.137	39.50	3.91	13.25
90	8.0	3.92	0.058	40.14	3.57	11.21
90	8.0	3.51	0.142	39.67	3.65	13.46



Figuur 6 Yield van *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1991) op acetaat als functie van zuurstofconcentratie, pH = 8.

In figuur 6 is de bruto yield van biomassa op acetaat weergegeven als functie van de concentratie opgeloste zuurstof in de reactor. Er is geen duidelijk verband, hoewel de yield gemiddeld lager lijkt bij lage zuurstofconcentraties (lager dan 50%). Het herkennen van een eventueel verband tussen yield en zuurstofconcentratie wordt bemoeilijkt door het variatie in de ingestelde verdunningsnelheid. Deze is wel nauwkeurig bekend per experiment, maar wijkt vaak af van de gewenste 0,05 [1/h] of 0,15 [1/h].

Incidenteel werd de elementaire samenstelling van de biomassa bepaald. De (N/C)-verhouding van *Thiosphaera pantotropha* onder deze condities was $0,240 \pm 0,10$ [N-mol/C-mol biomassa]. Deze parameter is van belang bij het opstellen van de stikstof-balans en dus bij het berekenen van de heterotrofe nitrificatie-activiteit. De heterotrofe nitrificatie-activiteit kan geschat worden door een constante samenstelling van de biomassa te veronderstellen. Deze geschatte specifieke heterotrofe nitrificatie-snelheden zijn weergegeven in figuur 7. Wat opvalt is dat er bij 50% luchtverzadiging een optimum voor de geschatte heterotrofe nitrificatie is. Het gedrag van de nitrificatiesnelheid tussen 0% en 50% luchtverzadiging (lagere snelheid bij lagere concentratie van de reactant zuurstof) zou verklaard kunnen worden door simpele verzadigingskinetiek. Boven de 50% luchtverzadiging is er nauwelijks activiteit meer, waarschijnlijk ten gevolge van een regulatie-mechanisme.



Figuur 7 Heterotrofe nitrificatie-activiteit van *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1991) als functie van zuurstofconcentratie, pH = 8.

Uit de experimenten blijkt dat de specifieke simultane heterotrofe nitrificatie & aërobe denitrificatie-snelheid onder meer beïnvloed wordt door groeisnelheid en opgeloste zuurstof-concentratie. Bij hogere heterotrofe nitrificatie-activiteit wordt een lagere yield gevonden, dit komt overeen met voorgaande experimenten met *Thiosphaera pantotropha* (Robertson, 1988). De betrouwbaarheid van de resultaten is echter matig, omdat de biomassa-samenstelling constant verondersteld is. Een kleine variatie in het stikstof-gehalte van de biomassa heeft een grote variatie in de berekende nitrificatie-snelheid tot gevolg.

Stel dat het stikstof-gehalte van *Thiosphaera pantotropha* biomassa (N/C) = 0,23 $\vee$ 0,24 $\vee$ 0,25 [N-mol/C-mol biomassa] is. De berekende heterotrofe nitrificatie bij het experiment bij D = 0,065 [1/h], DO = 10% en pH = 8,0 is dan respectievelijk $q_{\text{NIT}} = 17,3 \vee 15,9 \vee 14,4$ [$10^{-3} \cdot$ N-mol/C-mol/h]. De onnauwkeurigheid waarmee de nitrificatiesnelheid bij dit experiment bepaald wordt is ongeveer 20%.

2.3 Bepaling van optimale pH

De pH heeft invloed op de activiteit van het simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces. *Thiosphaera pantotropha* GB17 heeft een ammonium-monoöxygenase vergelijkbaar met dat van de autotrofe nitrificeerders (Robertson, 1989). Dit enzym catalyseert de eerste stap van de nitrificatie, de vorming van hydroxylamine uit moleculair zuurstof (O₂) en ammonia (NH₃). Als de concentratie ammonia (NH₃, één van de substraten) laag is, dan zal de activiteit van het ammonium-monoöxygenase laag zijn en dus zal de activiteit van het gehele simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces ook laag zijn. Bij toenemende ammoniacconcentraties zal de activiteit toenemen omdat de ammonia-concentratie sterk afhangt van de pH.

MATERIALEN EN METHODEN

Om het effect van de pH op de heterotrofe nitrificatie-activiteit te bepalen werden er chemostaat-experimenten uitgevoerd met *Thiosphaera pantotropha* GB17 bij pH = 7.0, 7.5, 8.0 en 8.5. Er werd gebruik gemaakt van een mineraal medium met acetaat als koolstof- en energie-bron. De stikstofbron voor assimilatie en nitrificatie was ammonium. Er werd gemeten bij twee verschillende groeisnelheden, $0,05 \text{ h}^{-1}$ en $0,15 \text{ h}^{-1}$. De temperatuur was 30°C , de dO_2 werd geregeld op 50% luchtverzadiging (optimale zuurstofconcentratie voor heterotrofe nitrificatie, zie hoofdstuk 2.2).

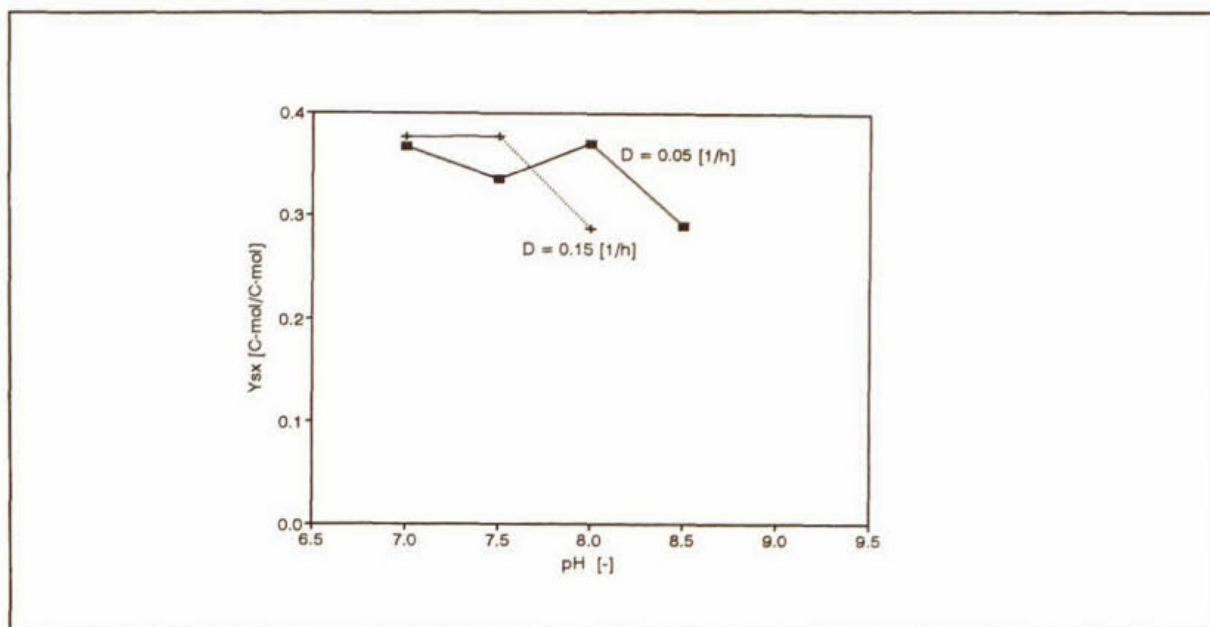
De concentratie aan ammonia in de reactor is behalve van de pH ook afhankelijk van de concentratie ammonium in het chemostaatmedium en de totale stikstofomzetting door assimilatie en nitrificatie. Er werden ook enkele experimenten uitgevoerd met afwijkende medium ammoniumconcentraties bij gelijke pH = 8,0 en zuurstofconcentratie DO = 50% luchtverzadiging (zie de tabel).

Verdunningssnelheid en pH werden ingesteld en vervolgens werd gewacht op 'steady state'. Elke steady state werd minstens drie maal bemonsterd. Dezelfde bepalingen als bij hoofdstuk 2.2 werden bij een meting uitgevoerd.

RESULTATEN EN DISCUSSIE

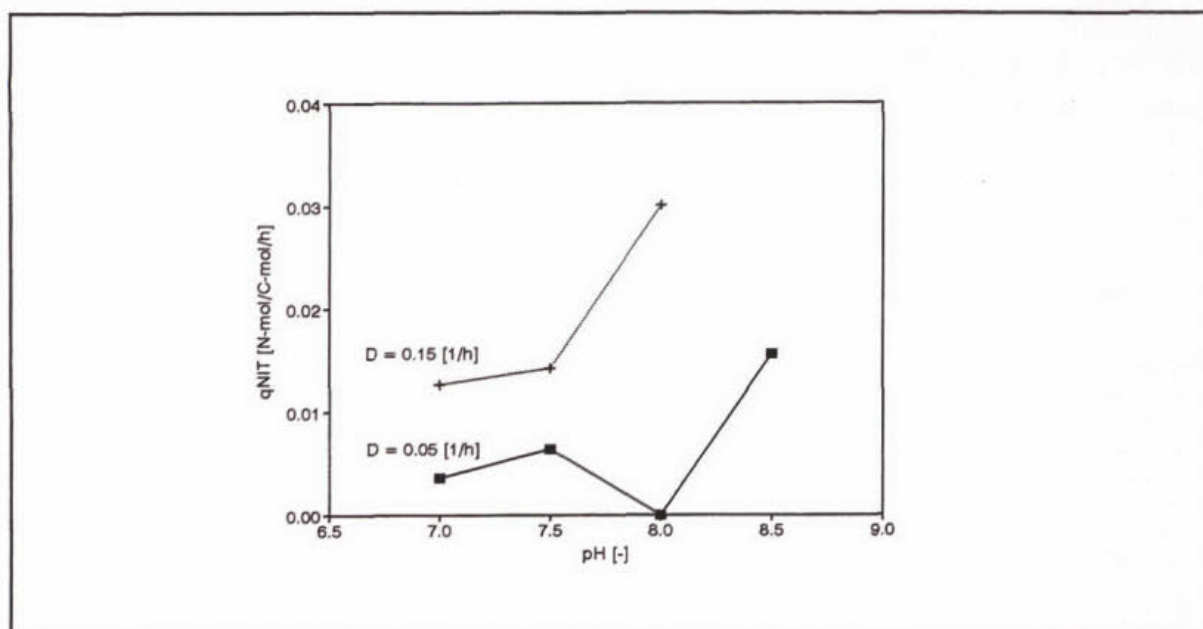
Tabel 2 Omzettingen door *Thiosphaera pantotropha* GB17 in de chemostaat bij verschillende pH, ammoniumconcentraties in het medium en verdunningssnelheden.

Zuurstof- concentratie [% lucht- verzadiging]	pH [-]	Ammonium- concentratie [mM]	Groei- snelheid [1/h]	Acetaat Omgezet [C-mM]	Ammonium Omgezet [mM]	Biomassa- concentratie [C-mM]
50	7.0	3.06	0.078	39.47	4.29	14.50
50	7.0	3.04	0.222	40.75	4.70	15.33
50	7.5	3.24	0.072	39.31	4.46	13.20
50	7.5	2.96	0.202	40.00	4.83	15.10
50	8.5	2.44	0.083	42.08	5.33	12.20
50	8.0	0.013	0.064	38.42	1.90	14.22
50	8.0	0.008	0.153	40.19	2.30	7.36
50	8.0	0.677	0.077	38.08	2.52	8.80
50	8.0	0.435	0.147	38.67	2.65	11.58
50	8.0	3.84	0.063	41.75	3.60	12.42
50	8.0	2.88	0.151	40.25	5.20	11.58
50	8.0	3.43	0.059	38.97	3.09	12.58
50	8.0	3.21	0.150	38.71	3.40	11.71



Figuur 8 Yield van *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1991) op acetaat als functie van pH, DO = 50% luchtverzadiging.

In figuur 8 is de bruto yield van biomassa op acetaat weergegeven als functie van D en pH in de reactor. Er is geen duidelijk verband, hoewel de yield gemiddeld lager lijkt bij hoge pH. Ook hier is het herkennen van een eventueel verband tussen yield en pH bemoeilijkt door het reeds eerder beschreven variatie in de ingestelde verdunningssnelheid. De heterotrofe nitrificatie-snelheid werd geschat door een constante samenstelling van de biomassa te veronderstellen. Deze zijn weergegeven in figuur 9. Wat opvalt is dat de geschatte heterotrofe nitrificatie toeneemt bij toenemende pH. Dit zou verklaard kunnen worden door simpele verzadigingskinetiek, waarbij ammonia (NH_3) het substraat voor nitrificatie is (Suzuki *et al* (1975)). Ook hier wordt dus bij hogere heterotrofe nitrificatie-activiteit gemiddeld een lagere yield gevonden.



Figuur 9 Heterotrofe nitrificatie-activiteit van *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1991) als functie van pH, DO = 50% luchtverzadiging.

Uit de resultaten blijkt dat pH = 8 optimaal is voor heterotrofe nitrificatie. Ter controle werden er additionele experimenten uitgevoerd bij DO = 50% en pH = 8. Bij deze serie experimenten werd de hoeveelheid ammonium gevarieerd. De heterotrofe nitrificatie-activiteit wordt niet beïnvloed door de concentratie ammonium, mits deze niet te laag is. Ook dit effect kan verklaard worden door aan te nemen dat ammonia (NH_3) het substraat is voor nitrificatie. Bij voorgaande experimenten werd een affiniteitsconstante van *Thiosphaera pantotropha* voor NH_3 gevonden van $K_s = 0,3 \text{ [mM]}$ (van Niel (1991)). De resultaten van de metingen bij verschillende ammonium-concentraties en gelijke pH en dO_2 voldoen aan dit beeld. Echter, de afwijkende, hoge waarde voor de biomassa yield bij ammonium-concentratie $0,013 \text{ [mmol/l]}$ kan hiermee niet verklaard worden.

Uit de experimenten blijkt dat het specifieke simultane heterotrofe nitrificatie & aërobe denitrificatie-snelheid onder meer beïnvloed wordt door groeisnelheid en ammonia-concentratie. De optimale condities voor heterotrofe nitrificatie zijn pH = 8 en $\text{dO}_2 = 50\%$ luchtverzadiging. De ammonia-concentratie moet voldoende hoog zijn ($> 0,3 \text{ mM NH}_3$) en hogere groeisnelheid gaat gepaard met hogere stikstofeliminatie-activiteit.

2.4 Stabiliteit van de heterotrofe nitrificatie activiteit

De resultaten van de voorgaande twee series chemostaatexperimenten hadden een opmerkelijk gemeenschappelijk resultaat. Er was sprake van een veel lagere activiteit dan bij alle voorgaande experimenten uitgevoerd door andere onderzoekers (Robertson, 1990, van Niel, 1991). Een mogelijke verklaring voor het verschil zou kunnen zijn het toepassen van een verkeerde biomassa-samenstelling (met name de (N/C)-ratio van de biomassa) bij de berekening van de stikstofeliminatie-activiteit. Bij de experimenten van hoofdstuk 2.2 en 2.3 was er vanuit gegaan dat de (N/C)-ratio van de biomassa en het PHB-gehalte van

de biomassa constant was. Daarom werden deze parameters in de eerste 2 reeksen experimenten slechts incidenteel bepaald. Er werd besloten om de serie chemostaatexperimenten bij verschillende zuurstofconcentraties (hoofdstuk 2.2) na 2 jaar te dupliceren. In tegenstelling tot de voorgaande experimenten zou nu bij elke metingen de (N/C)-ratio en het PHB-gehalte van de biomassa nauwkeurig bepaald worden. Hiermee kan de heterotrofe nitrificatie-activiteit met hogere nauwkeurigheid bepaald worden.

MATERIALEN EN METHODEN

Additioneel aan de metingen bij de voorgaande experimenten werden ook de samenstelling van de biomassa op CHN-basis en het gehalte aan PHB in de biomassa gemeten. Er werd gemeten bij twee verschillende groeisnelheden, $0,05 \text{ h}^{-1}$ en $0,15 \text{ h}^{-1}$. De temperatuur was 30°C , de pH werd geregeld op 8,0. De zuurstofconcentratie werd per experiment gevarieerd.

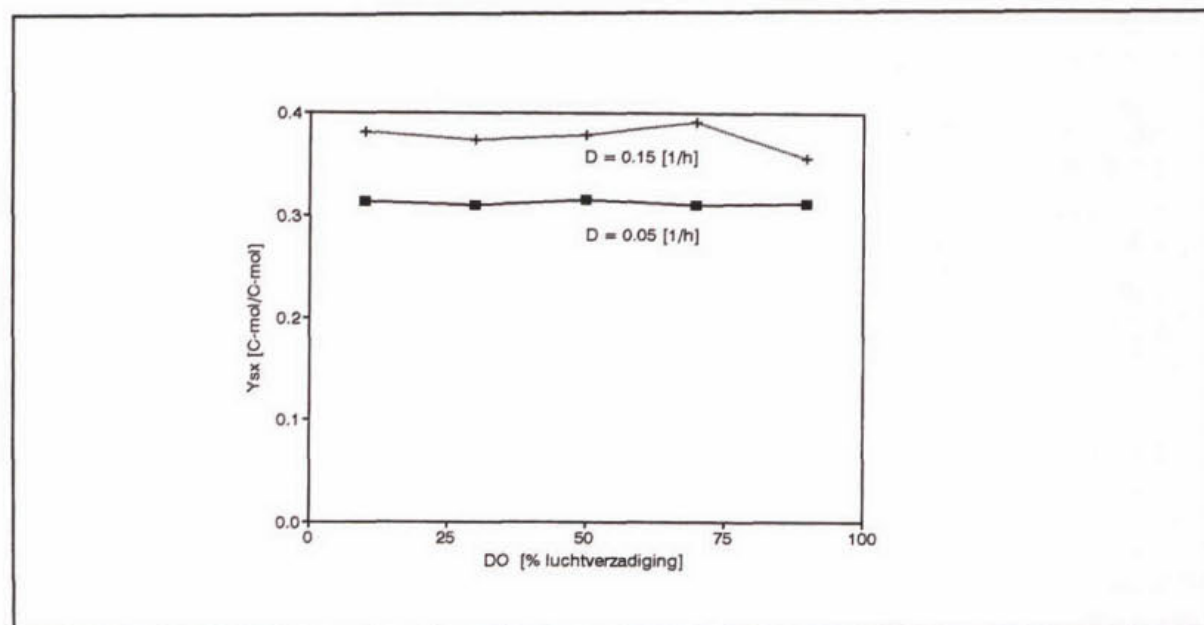
RESULTATEN EN DISCUSSIE

Tabel 3 Omzettingen door *Thiosphaera pantotropha* GB17 in de chemostaat bij constante pH en verschillende zuurstofconcentraties, ammoniumconcentraties in het medium en verdunningssnelheden.

Zuurstof- concentratie [% lucht- verzadiging]	pH [-]	Ammonium- concentratie [mM]	Groei- snelheid [1/h]	Acetaat Omgezet [C-mM]	Ammonium Omgezet [mM]	Biomassa- concentratie [C-mM]
10	8.0	3.25	0.055	42.50	3.89	13.32
10	8.0	2.62	0.155	42.33	4.59	16.11
30	8.0	2.71	0.059	42.67	3.95	13.22
30	8.0	2.88	0.168	41.83	3.61	15.64
50	8.0	3.34	0.047	42.25	3.81	13.32
50	8.0	2.67	0.152	43.00	4.96	16.29
70	8.0	3.47	0.049	42.58	3.10	13.22
70	8.0	2.72	0.140	43.25	3.80	16.92
90	8.0	3.53	0.050	41.17	3.79	12.83
90	8.0	3.10	0.119	41.75	4.48	14.86

Tabel 4 Omzettingen door *Thiosphaera pantotropha* GB17 in de chemostaat bij constante pH en verschillende zuurstofconcentraties, ammoniumconcentraties in het medium en verdunningssnelheden.

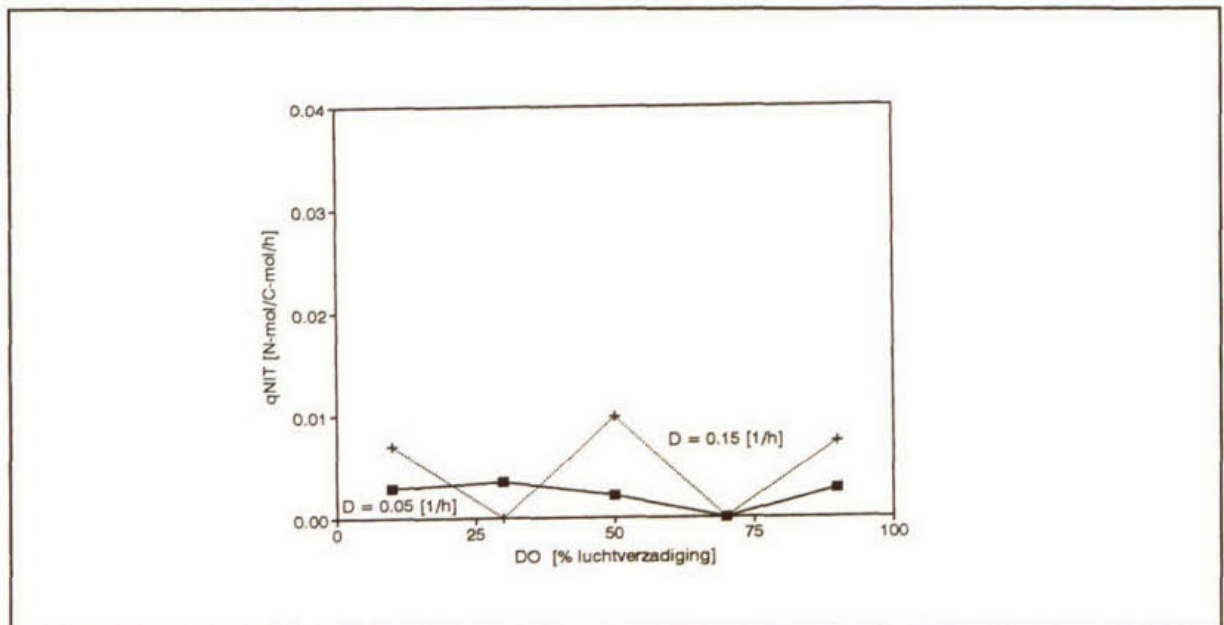
Zuurstof-concentratie [% lucht-verzadiging]	pH	Ammonium-concentratie [mM]	Groei-snelheid [1/h]	PHB-concentratie [C-mM]	(N/C)-biomassa [N-mol/C-mol]	Zuurstof-consumptie [mmol/h]
10	8.0	3.25	0.055	0.24	0.24	3.8
10	8.0	2.62	0.155	0.48	NB	7.8
30	8.0	2.71	0.059	0.42	0.24	2.5
30	8.0	2.88	0.168	0.31	0.24	7.8
50	8.0	3.34	0.047	1.93	NB	8.9
50	8.0	2.67	0.152	0.95	NB	9.1
70	8.0	3.47	0.049	0.24	0.24	2.1
70	8.0	2.72	0.140	0.36	0.24	6.6
90	8.0	3.53	0.050	0.20	0.24	6.7
90	8.0	3.10	0.119	0.24	0.24	6.7



Figuur 10 Yield van *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1993) op acetaat als functie van zuurstofconcentratie, pH = 8.

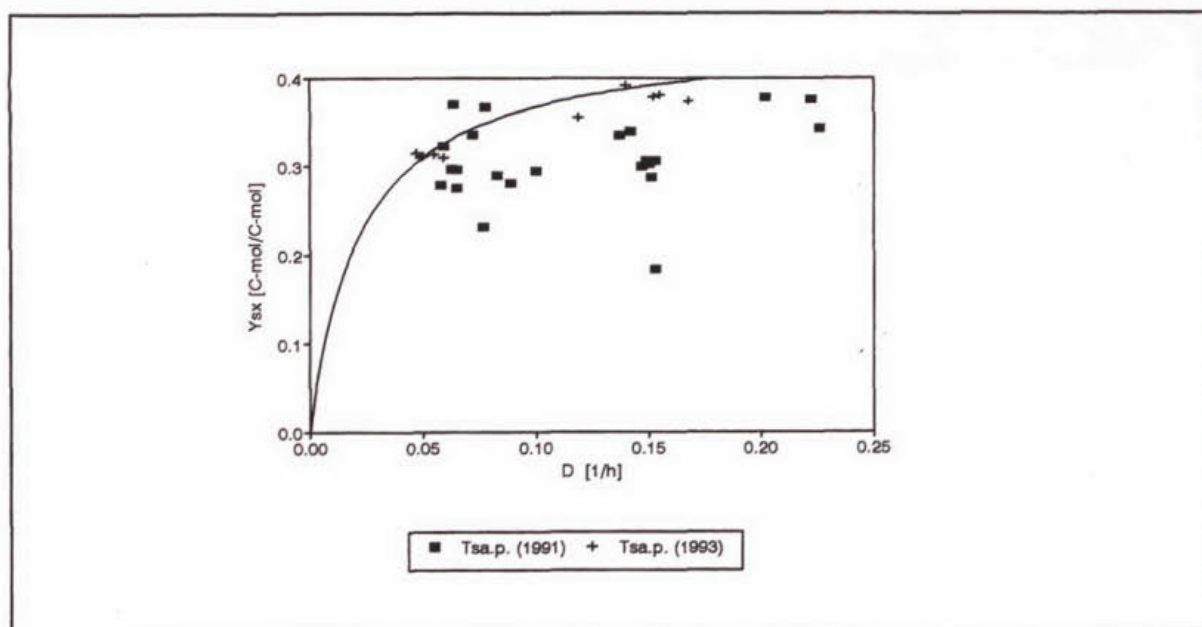
In figuur 10 is de bruto yield van biomassa op acetaat weergegeven als functie van de concentratie opgeloste zuurstof in de reactor. Er is geen verband te zien, wel valt het

verschil tussen de experimenten met $\mu = 0,05$ [1/h] en de experimenten met $\mu = 0,15$ [1/h] duidelijk op. Het verband tussen yield en groeisnelheid kan afdoende beschreven worden met een Herbert-Pirt-relatie met netto-yield $Y_{SX} = 0,45$ [C-mol/C-mol] en maintenance coëfficiënt $m_s = 0,038$ [1/h] (figuur 12).

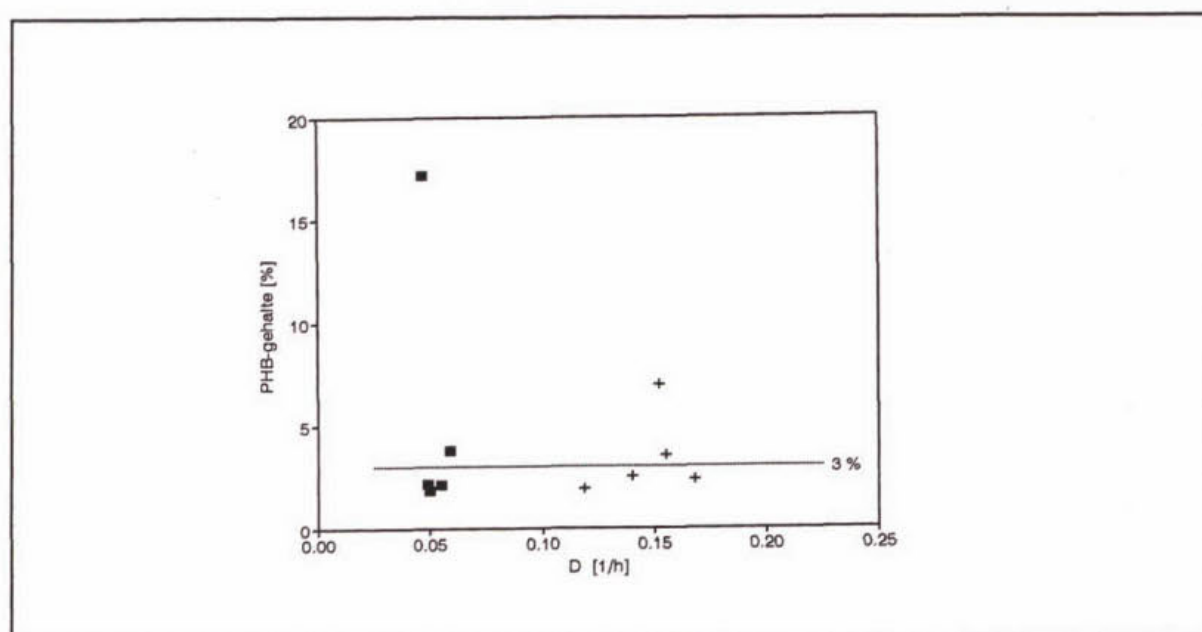


Figuur 11 Heterotrofe nitrificatie-activiteit van *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1993) als functie van zuurstofconcentratie, pH = 8.

Bij deze serie experimenten werd bij alle experimenten de elementaire samenstelling van de biomassa bepaald. Het stikstofgehalte van de steady state biomassa is $(N/C) = 0,2459 \pm 0,0007$ [N-mol/C-mol biomassa] (bij 37 bepalingen). Ook werd het PHB-gehalte van de biomassa bepaald (figuur 13). Deze is, op een enkele uitschieter na, gemiddeld slechts 3% van de droge massa. Deze PHB-fractie is nog boven de detectiegrens van de bepaling. De heterotrofe nitrificatie-snelheid kan nu nauwkeuriger bepaald worden dan bij de voorgaande experimenten. De resultaten zijn weergegeven in figuur 11. Vergeleken met hoofdstuk 2.2 en 2.3 is de heterotrofe nitrificatie-activiteit sterk gedaald. Dit blijkt ook uit de geobserveerde yield die veel hoger is dan bij eerdere experimenten (figuur 12). Dit is in overeenstemming met de eerder genoemde hypothese dat heterotrofe nitrificatie ten koste gaat van biomassa-vorming.



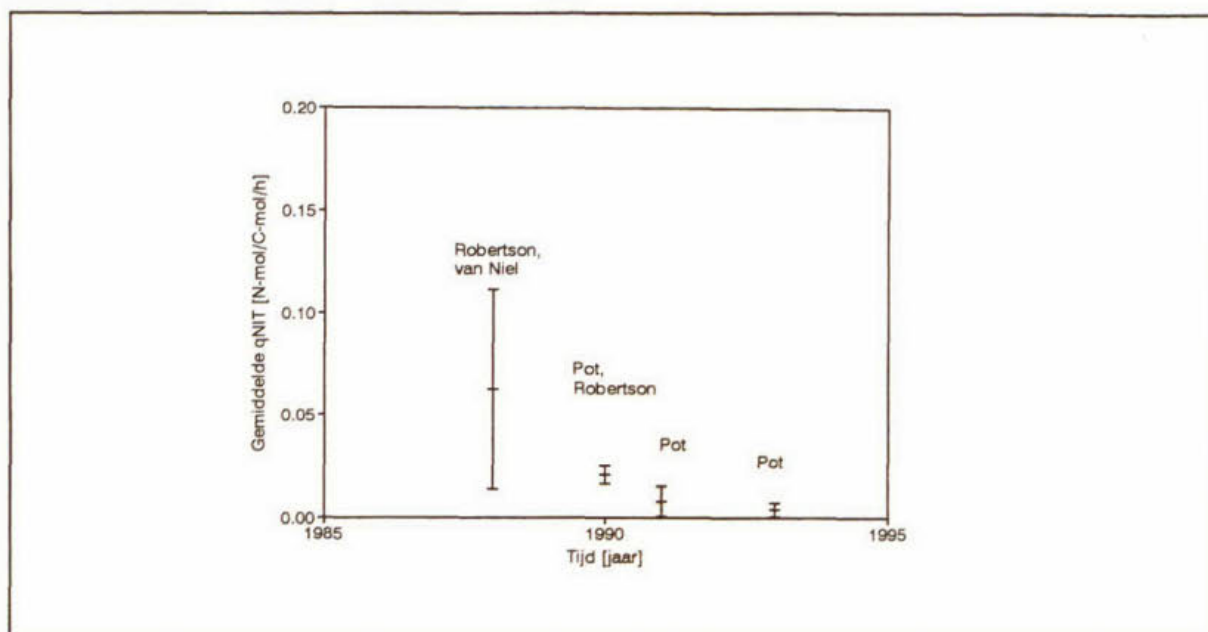
Figuur 12 Yield op acetaat van zowel *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1991) als *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1993) als functie van groeisnelheid.



Figuur 13 PHB-gehalte van *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1993) als functie van groeisnelheid.

De gebruikte organismen werden zowel in 1991 als in 1993 door de bacterie-collectie van het Kluyverlaboratorium (LMD) geïdentificeerd als *Thiosphaera pantotropha*. Een mogelijke verklaring van de afwijkende eigenschappen van het organisme is een genetische instabiliteit van de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie pathway. Dit is in overeenstemming met literatuurgegevens waarbij in recente chemostaatcultures van *Thiosphaera pantotropha* geen aërobe denitrificatie-activiteit meer werd gemeten (Thomsen

et al, 1993). De geleidelijke afname van de gemiddelde heterotrofe nitrificatie-activiteit van *Thiosphaera pantotropha* als functie van de tijd is weergegeven in figuur 14.



Figuur 14 Gemiddelde heterotrofe nitrificatie-activiteit van *Thiosphaera pantotropha* als functie van de tijd.

2.5 Conclusies

De heterotrofe nitrificatie-activiteit is een functie van groeisnelheid μ , opgeloste zuurstofconcentratie DO en pH. De optimale condities voor heterotrofe nitrificatie zijn bij pH = 8,0 en DO = 50% luchtverzadiging, voldoende hoge ammoniäconcentratie ($> 0,3$ mM NH_3) en hogere groeisnelheden. De yield van biomassa op acetaat daalt bij toenemende specifieke nitrificatie-activiteit q_{NIT} . De gemiddelde heterotrofe nitrificatie-activiteit van *Thiosphaera pantotropha* is in een tijdsbestek van 10 jaar tot bijna nul gedaald.

EFFECT VAN DYNAMISCHE PROCESCONDITIES OP GROEI, HETEROTROFE NITRIFICATIE EN AËROBE DENITRIFICATIE DOOR *Thiosphaera pantotropha*

3.1 Inleiding

Selectie van heterotrofe nitrificeerders in een afvalwaterzuiveringsproces is moeilijk omdat het simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces geen deel uitmaakt van het primaire metabolisme van een organisme. Het vermogen om ammonium te oxideren levert de heterotrofe nitrificeerders in een afvalwaterzuiveringsproces geen voordelen op in de competitie met andere organismen. In directe competitie met 'normale' heterotrofe is het vermogen tot heterotrofe nitrificatie zelfs een nadeel, omdat dit energie kost en een lagere groeiopbrengst tot gevolg heeft.

In de volgende tabel is weergegeven hoe de competitie van *Thiosphaera*-achtige organismen met andere micro-organismen in een afvalwaterzuiveringsproces beïnvloed zou kunnen worden. Voor de substraten waarover concurrentie zou kunnen plaatsvinden is aangegeven hoe de competitie in het voordeel van de heterotrofe nitrificeerders veranderd zou kunnen worden.

Tabel 5 Competitie tussen *Thiosphaera*-achtigen en andere micro-organismen.

Competitie om:	Competitie met:	Gewenste competitie-factor:
$\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$	<i>Nitrosomonas</i> -achtigen	hoge groeisnelheid
NO_2^-	<i>Nitrobacter</i> -achtigen	hoge groeisnelheid
$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	conventionele denitrificeerders (<i>Paracoccus</i> -achtigen)	cyclische variatie in opgeloste O_2
CZV	conventionele denitrificeerders en aërobe micro-organismen	cyclische variatie in CZV, leidend tot intracellulaire opslag van CZV

De strategie om heterotrofe nitrificeerders een competitief voordeel te geven boven autotrofe nitrificeerders is eenvoudig. De biomassa-verblijftijd (of slibleeftijd) moet korter zijn dan de minimale verblijftijd van de autotrofe nitrificeerders (in de orde van dagen) en langer dan de minimale verblijftijd van de heterotrofe nitrificeerders (in de orde van uren).

Een van de vraagstellingen van het project is hoe een bestaand afvalwaterzuiveringsproces zo is in te richten dat een aanzienlijk deel van de aangeboden stikstof wordt omgezet m.b.v. simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie in plaats van met de conventionele techniek. In bestaande afvalwaterzuiveringssystemen zoals oxidatiesloten en carroussels is er voor de micro-organismen sprake van voortdurend afwisselende aërobe en anaërobe periodes.

Een mogelijkheid om *Thiosphaera*-achtigen een competitief voordeel te geven boven 'normale' heterotrofe organismen is het feit dat het grootste deel van de denitrificatie-activiteit constitutief aanwezig is. Dit heeft tot gevolg dat *Thiosphaera*-achtigen relatief ongehinderd door kunnen groeien tijdens kort (minuten tot 1 uur) op elkaar volgende aërobe en anoxische condities (Robertson & Kuenen (1992), van Niel (1991)). Echter, als

de aërobe periodes van de cyclus te lang duren (ongeveer 1 verblijftijd), dan zal ook *Thiosphaera pantotropha* een gedeelte van de denitrificatie-activiteit verliezen (Hazelaar, niet-gepubliceerde resultaten).

Echter, het is niet zeker dat alleen heterotrofe nitrificeerders constitutief denitrificeerders zijn. Het is mogelijk dat onder korte, afwisselende aërobe en anoxische condities juist op constitutieve denitrificeerders geselecteerd wordt die niet het vermogen tot heterotrofe nitrificatie bezitten. Het effect van de voorgestelde korte, afwisselende aërobe en anaërobe/anoxische condities op de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie-activiteit in continue cultures van *Thiosphaera pantotropha* wordt onderzocht in hoofdstuk 3.2.

Een andere mogelijkheid om simultaan heterotroof nitrificerende en aëroob denitrificerende organismen een competitief voordeel te geven boven 'normale' heterotrofe organismen is het feit dat in *Thiosphaera pantotropha* het vermogen tot overmatige reservestof-vorming eenzelfde metabole oorzaak heeft als het vermogen tot heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie (Robertson, 1988). *Thiosphaera pantotropha* heeft het vermogen om met hoge snelheid grote hoeveelheden acetaat op te nemen en vast te leggen als poly- β -hydroxyboterzuur (PHB) (van Niel, 1990). Een strategie zou kunnen zijn om aan het begin van een discontinu proces de elektrondonor zo te doseren dat de *Thiosphaera*-achtige organismen snel grote interne concentraties reserve-stoffen opslaan. Vervolgens kan in een latere fase van het proces, in afwezigheid van externe elektrondonor, de opgeslagen hoeveelheid reserve-stoffen geoxideerd worden. Organismen die geen reserve-stoffen vormen verliezen op deze manier de competitie met de heterotrofe nitrificeerders. Het is dus zaak om op een strategisch verantwoorde manier elektrondonor aan het proces toe te voegen, dat deze alleen ten goede komt aan de heterotrofe nitrificeerders (zie hoofdstuk 3.3).

3.2 Cyclische variatie in opgeloste O₂

Er zijn experimenten uitgevoerd met *Thiosphaera pantotropha* GB17 om het effect van afwisselend hoge en lage opgeloste zuurstof-concentraties op het simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces te bepalen. Hiertoe zijn onder standaard condities (vergelijkbaar met hoofdstuk 2.) acetaatgelimiteerde continu cultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17 afwisselend belucht met lucht of met stikstofgas, de zogenoemde 'switch'-experimenten.

De facultatief aërobe denitrificeerder *Thiosphaera pantotropha* is genetisch sterk verwant aan *Paracoccus denitrificans* en is in minerale media in staat om zowel aëroob als anoxisch te groeien op acetaat als enige koolstof- en energie-bron. Tevens is het een constitutief denitrificerend organisme. Dit in tegenstelling tot *Paracoccus denitrificans* dat (vergeleken met *Thiosphaera*) grote moeite heeft met de omschakeling van aërobie naar anaërobie (Robertson & Kuenen (1992), van Niel (1991)).

De effecten van opgeloste zuurstofconcentratie op de activiteit van het simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces zijn reeds beschreven in hoofdstuk 2. Het effect van voortdurend afwisselende aërobe en anaërobe periodes is nog onbekend. Door experimenten uit te voeren met *Thiosphaera pantotropha* GB17 bij afwisselend hoge en lage opgeloste zuurstof-concentraties kan het effect daarvan op het simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces bepaald worden.

De aanwezigheid van nitraat of nitriet tijdens een 'switch'-experiment zal gedurende de onbeluchte periodes leiden tot conventionele denitrificatie door *Thiosphaera pantotropha* GB17. Conventionele denitrificatie is de reductie van extern aangeboden nitraat en/of nitriet bij lage zuurstofspanning. Het is onduidelijk wat de invloed zal zijn van deze conventionele denitrificatie-activiteit op de activiteit van de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie. Gaat conventionele denitrificatie ten koste van simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie, of zal de totale stikstofeliminatie-activiteit juist hoger zijn? Om dit te onderzoeken werden 'switch'-experimenten uitgevoerd in de aanwezigheid van nitraat en de resultaten werden vergeleken met de resultaten van 'switch'-experimenten zonder nitraat.

MATERIALEN EN METHODEN

Om het effect van de duur van de afwisselend anaërobe en aërobe periodes op de totale stikstofeliminatie-activiteit te bepalen zijn er 'switch'-experimenten uitgevoerd met *Thiosphaera pantotropha* GB17. Anaërobie in de reactor werd bewerkstelligd door het beluchten met stikstofgas. Er werd gebruik gemaakt van een mineraal medium met acetaat als koolstof- en energie-bron. De stikstofbron voor assimilatie en nitrificatie was ammonium. Er werd gemeten bij twee verschillende groeisnelheden, 0,05 h⁻¹ en 0,15 h⁻¹. De temperatuur was 20 °C ipv. 30 °C, om de rioolwater-condities beter te benaderen. De pH werd geregeld op 8,0, de zuurstofconcentratie tijdens de aërobe periode werd geregeld op 50% luchtverzadiging, de optimale condities voor heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie (Hfdst 2). De verdunningssnelheid werd ingesteld en vervolgens werd gewacht op 'steady state'. Dezelfde bepalingen als bij hoofdstuk 2. werden uitgevoerd.

Voor het bepalen van de PHB-concentratie in de biomassa werd een deel van het effluent koud opgevangen en gecentrifugeerd.

Om het effect van de aanwezigheid van nitraat of nitriet op de totale stikstofeliminatie-activiteit te bepalen werden er enkele experimenten uitgevoerd in aanwezigheid van 30 mM nitraat (NO_3^-) in het medium. Dit is voldoende om alle aanwezige acetaat te oxyderen. Additioneel werden er nitriet- en nitraat-bepaling van supernatant en van medium uitgevoerd.

Veel hinder werd ondervonden van een neerslag dat zich gedurende de experimenten ophoopte in de reactor. Dit ontstond ten gevolge van de lage temperatuur waarbij de experimenten werden uitgevoerd. Het gebruikte chemostaat-medium is oorspronkelijk ontwikkeld voor experimenten bij $T = 37^\circ\text{C}$. Een hoeveelheid van het neerslag werd opgevangen en opgelost in verdund zwavelzuur. Daarin kon geen ammonium worden aangetoond, het neerslag was dus geen struviet ($\text{Mg}(\text{NH}_4)(\text{PO}_4) \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$, oplosbaarheid 0.02 g/l) en droeg blijkbaar niet bij tot de verwijdering van ammonium uit de reactor.

Bij het overschakelen van lucht naar stikstof duurde het enige tijd voordat alle zuurstof uit de reactor is verwijderd. Het bleek 5 tot 10 minuten te duren voordat de zuurstofelektrode 0,0 % luchtverzadiging aangaf. De gemeten duur van de aërobe en anaërobe periodes in de experimenten met alleen zuurstof is weergegeven in tabel 6 en 7. De gemeten duur van de aërobe en anoxische periodes in de experimenten met zowel nitraat als zuurstof is weergegeven in tabel 8 en 9.

RESULTATEN EN DISCUSSIE

Tabel 6 Cyclische variatie in opgeloste O_2 in continu cultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17, in afwezigheid van nitraat (nm = niet gemeten).

D [1/h]	Duur aërobe periode [min]	Duur anaërobe periode [min]	Fractie aërobe tijd [-]	Acetaat- omgezet [C-mM]	Biomassa- gevormd [C-mM]	PHB- gehalte biomassa [%]	(N/C) biomassa (geschat) [-]	Stikstof omgezet totaal [mM]
0.05	-	-	1.00	40.17	14.69	3	0.24	5.44
0.15	-	-	1.00	40.08	13.77	3	0.24	5.88
0.05	15.0	5.0	0.75	38.97	14.31	22.1	0.19	4.30
0.15	15.0	5.0	0.75	39.83	13.67	14.9	0.20	3.99
0.05	17.7	12.3	0.59	39.29	13.88	nm	0.2 ²	4.58
0.15	17.7	12.3	0.59	39.42	16.92	nm	0.2 ²	4.86
0.05	23.2	51.8	0.31	23.97 ¹	7.89	nm	0.2 ²	3.11

¹ Dit experiment was niet acetaat-gelimiteerd, maar de biomassa-concentratie was wel in steady state. Ingevuld in de tabel is de gemeten acetaat-consumptie.

² De schatting voor het stikstofgehalte van de biomassa is arbitrair en komt overeen met een PHB-gehalte van de biomassa van 20%.

Tabel 7 Cyclische variatie in opgeloste O₂ in continu cultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17, in afwezigheid van nitraat.

D [1/h]	Duur aërobe periode [min]	Duur anaërobe periode [min]	Fractie aërobe tijd [-]	Actieve biomassa [C-mM]	Stikstof omgezet assimilatie [mM]	Stikstof omgezet nitrificatie [mM]	Het.Nit. activiteit aëroob ³ [10 ⁻³ ·h ⁻¹]	Het.Nit. activiteit overall ⁴ [10 ⁻³ ·h ⁻¹]
0.05	-	-	1.00	14.25	3.53	1.91	6.7	6.7
0.15	-	-	1.00	13.36	3.30	2.58	29	29
0.05	15.0	5.0	0.75	11.15	2.67	1.63	9.7	7.3
0.15	15.0	5.0	0.75	11.63	2.79	1.20	21	15
0.05	17.7	12.3	0.59	11.1 ²	2.78	1.80	14	8.1
0.15	17.7	12.3	0.59	13.5 ²	3.38	1.48	28	16
0.05	23.2	51.8	0.31	6.31 ²	1.58	1.53	39	12

³ De weergegeven heterotrofe nitrificatie-activiteit is betrokken op alleen de aërobe periode.

⁴ De weergegeven heterotrofe nitrificatie-activiteit is betrokken op de gehele cyclus.

Tabel 8 Cyclische variatie in opgeloste O₂ in continu cultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17, in aanwezigheid van nitraat (nm = niet gemeten).

D [1/h]	Duur aërobe periode [min]	Duur anoxische periode [min]	Fractie aërobe tijd [-]	Acetaat- omgezet [C-mM]	Biomassa- gevormd [C-mM]	PHB- gehalte biomassa [%]	(N/C) biomassa (geschat) [-]	Stikstof omgezet totaal [mM]
0.05	-	-	1.00	40.17	14.69	3	0.24	5.44
0.15	-	-	1.00	40.08	13.77	3	0.24	5.88
0.05	23.2	51.8	0.31	38.63	9.23	nm	0.23 ⁵	3.69
0.15	23.2	51.8	0.31	38.83	10.92	7.4	0.23	2.80

⁵ De schatting voor het stikstofgehalte van de biomassa is arbitrair en komt overeen met een PHB-gehalte van de biomassa van 7,4%.

Tabel 9 Cyclische variatie in opgeloste O₂ in continu cultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17 ,in aanwezigheid van nitraat.

D [1/h]	Duur aërobe periode [min]	Duur anaërobe periode [min]	Fractie aërobe tijd [-]	Actieve biomassa [C-mM]	Stikstof omgezet assimilatie [mM]	Stikstof omgezet nitrificatie [mM]	Het.Nit. activiteit aëroob ³ [10 ⁻³ ·h ⁻¹]	Het.Nit. activiteit overall ⁴ [10 ⁻³ ·h ⁻¹]
0.05	-	-	1.00	14.25	3.53	1.91	6.7	6.7
0.15	-	-	1.00	13.36	3.30	2.58	29	29
0.05	23.2	51.8	0.31	8.55	2.09	1.60	30	9.4
0.15	23.2	51.8	0.31	10.11	2.48	0.32	15	4.7

Tabel 10 Redox-balans in cyclische bedreven continu cultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17 ,in aanwezigheid van nitraat.

Fractie aërobe tijd [-]	Nitraat- concentratie [mM]	Nitriet- concentratie [mM]	Nitraat- omgezet [mM]	Nitriet- omgezet [mM]	Elektronen naar NO _x ⁻ [mM]	Elektronen naar zuurstof [mM]	Elektronen uit acetaat [mM]
0.31	11.6	0.0	17.9	0.0	89	29 ⁶	118
0.31	11.2	12.3	17.5	-12.3	63	49 ⁶	112

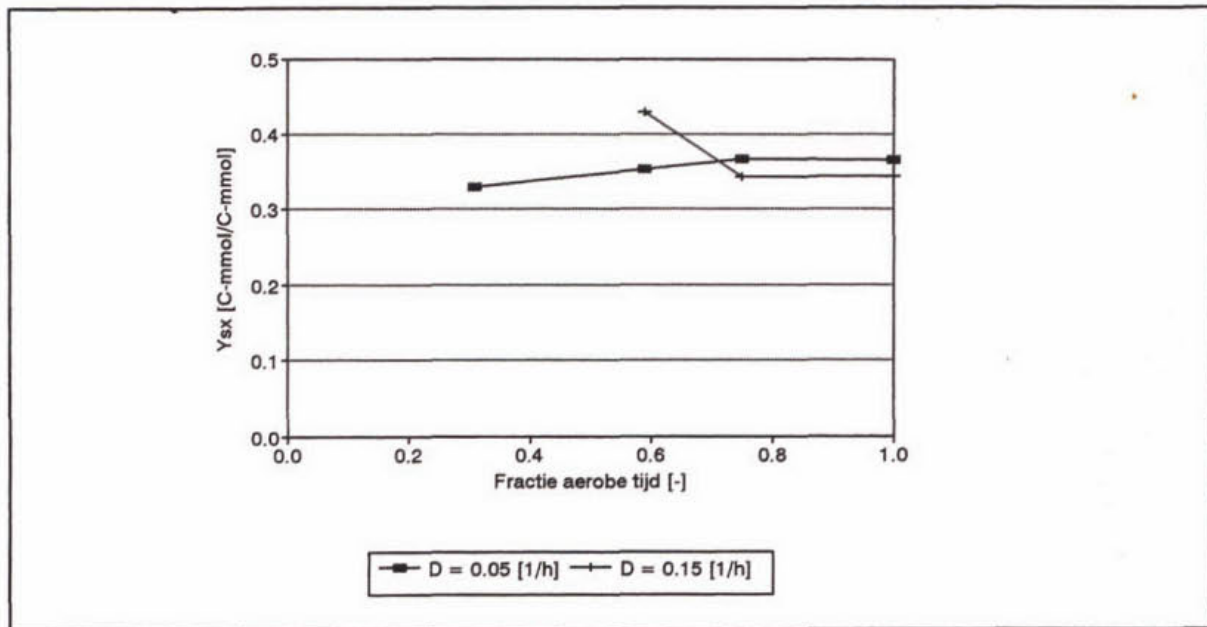
⁶ De zuurstofconsumptie is geschat uit een vereenvoudigde redox-balans (de hoeveelheden elektronen verkregen uit de oxydatie van acetaat, minus de elektronen afgestaan aan nitraat of nitriet, NO_x⁻).

Afwezigheid van nitraat in de anaërobe fase

De resultaten van de switch-experimenten wijken in enkele opzichten af van de chemostaat-experimenten uit hoofdstuk 2. De bruto yield van biomassa op acetaat is gemiddeld iets hoger dan bij de chemostaat-experimenten met vergelijkbare groeisnelheden. Wat opvalt zijn de hoge PHB-gehaltes van de biomassa, wat een verklaring is voor de hogere yields van biomassa op acetaat. De elementaire samenstelling van de biomassa werd bij deze experimenten niet bepaald en de heterotrofe nitrificatiesnelheid kan dus niet nauwkeurig bepaald worden. Er is geen duidelijk verschil tussen de ammoniumconcentraties in het effluent van de verschillende experimenten. Het afwisselen van aërobe en anaërobe periodes heeft nauwelijks effect op de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie-activiteit van *Thiosphaera pantotropha*.

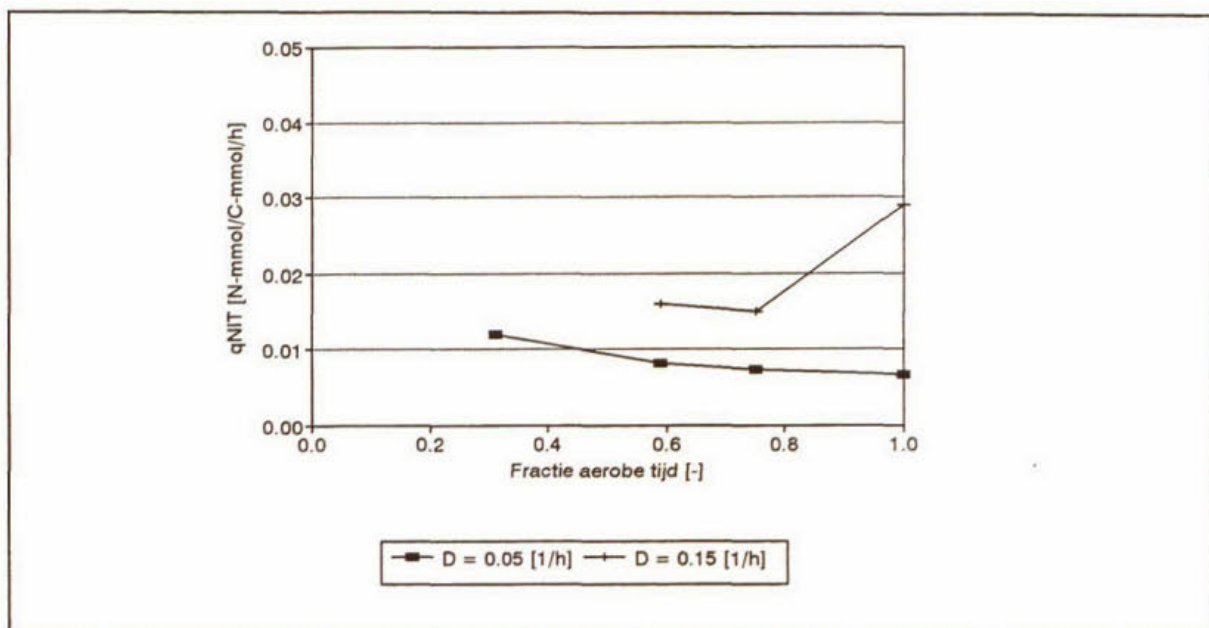
Het organisme is relatief ongevoelig voor de afwisseling van aërobe en anaërobe periodes. Tijdens de anaërobe periodes kan *Thiosphaera pantotropha* niet groeien wegens het ontbreken van een geschikte elektron-acceptor. De biomassa spoelt dus tijdens de anaërobe periodes uit de reactor. Substraat hoopt zich gedurende deze periode op in de reactor. Aan het begin van de aërobe periode is de acetaat-concentratie hoger dan in de chemostaat. De

hogere acetaat-opnamesnelheden veroorzaakt door deze hogere acetaat-concentraties hebben waarschijnlijk de hogere PHB-gehaltes van de biomassa tot gevolg (tabel 6, zie ook hoofdstuk 6).



Figuur 15 Yield van *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992) als functie van de fractie aërobe verblijftijd.

Figuur 15 toont dat de yield constant is als functie van de fractie aërobe tijd. Ook is er geen groot effect te zien op de stikstof-omzettingssnelheid (figuur 16). Bij het experiment met een aërobe fractie van 0,31 was het organisme niet meer acetaat-gelimiteerd. Waarschijnlijk duurt de anaërobe periode te lang (1 uur) en wordt het aërobe metabolisme gedeeltelijk aangepast. De aërobe verdunningssnelheid is 0,16 [1/h], ruim onder de maximale groeisnelheid $\mu_{MAX} = 0,27$ [1/h] bij $T = 20$ °C (geschat uit de groeicurve van de ent).



Figuur 16 Heterotrofe nitrificatie-activiteit van *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992) als functie van de fractie aërobe verblijftijd.

Aanwezigheid nitraat in de anaërobe fase (anoxisch)

Het afwisselen van aërobe en anoxische periodes heeft nauwelijks effect op de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie-activiteit in een continue culture van *Thiosphaera pantotropha*.

In aanwezigheid van nitraat bleef de 'switch'-culture zowel bij de lage verdunningssnelheid als bij de hoge groeisnelheid acetaat-gelimiteerd. De bruto yield van biomassa op acetaat was beduidend lager, vergeleken met de 'switch'-experimenten zonder nitraat. (gemiddeld 0,26 ipv. 0,36 [C-mol/C-mol]). De Y_{SX} met nitraat is namelijk lager dan de Y_{SX} met zuurstof. Deze daling van de yield van *Thiosphaera pantotropha* bij gebruik van andere elektronenacceptoren is eerder waargenomen (Robertson (1988), van Niel (1991)). De nitraatreductie-snelheid was gelijk in de experimenten bij lage en bij hoge verdunningssnelheid. Echter, bij de hoge verdunningssnelheid ($D = 0,15$ [1/h]) was er sprake van partiële denitrificatie tot nitriet en de ophoping van nitriet in de reactor. De lagere actieve biomassa-concentratie in de reactor heeft een hogere maximale substraat-opnamesnelheid $q_{S,max}$ tot gevolg en dus is er een groter vermogen tot vorming van PHB, vergeleken met de chemostaat.

CONCLUSIES

De kans op PHB-vorming door *Thiosphaera pantotropha* neemt toe bij hogere groeisnelheid, hogere substraat-concentraties en/of dynamische elektronacceptor-beschikbaarheid.

Er is geen duidelijk negatief effect van de cyclische variatie in opgeloste O_2 -concentratie op de heterotrofe nitrificatie-activiteit

Op basis van deze resultaten kan in toekomstig onderzoek worden nagegaan in hoeverre *Thiosphaera pantotropha* op basis van de vertoonde capaciteit voor reservestof-vorming en van de constitutieve denitrificatie-activiteit een selectief voordeel heeft onder deze dynamische condities. Met name in een systeem met andere organismen, zoals aërobe heterotrofen en conventionele denitrificeerders, die onder deze condities ook kunnen concurreren om het substraat.

3.3 Cyclische variatie van CZV-voeding

Een strategie om *Thiosphaera*-achtige organismen te doen ophopen in een afvalwaterzuiveringsproces zou kunnen zijn om aan het begin van een discontinu proces de elektrondonor zo te doseren dat de *Thiosphaera*-achtige organismen snel grote interne concentraties reserve-stoffen opslaan. Vervolgens kan in een latere fase van het proces, in afwezigheid van externe elektrondonor, de opgeslagen hoeveelheid reserve-stoffen geoxideerd worden. Organismen die geen reserve-stoffen vormen verliezen op deze manier de competitie met de heterotrofe nitrificeerders. Het is dus zaak om op een strategisch verantwoorde manier elektrondonor aan het proces toe te voegen, dat deze alleen ten goede kan komen aan de heterotrofe nitrificeerders. In hoeverre heterotrofe nitrificeerders dit beter kunnen als conventionele heterotrofe micro-organismen valt nog te bezien. Allereerst wordt er gekeken naar het effect van deze condities op de heterotrofe nitrificatie-activiteit.

Er zijn experimenten uitgevoerd met *Thiosphaera pantotropha* GB17 m.b.v. sequencing batch reactor (SBR) procesvoering. De doelstelling is het effect van dynamische condities op het simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie proces en op de reservestof-vorming te bepalen. Bij SBR-procesvoering vindt het toedienen van de reactanten (in dit geval substraat en zuurstof) discontinu plaats. De SBR-procesvoering kan gebruikt worden om een propstroom-reactor op labschaal te simuleren. Het discontinue toedienen van influent resulteert in het tijdelijk aanwezig zijn van hoge concentraties aan substraat. Door afwisselend te beluchten met lucht of met stikstof kunnen aërobe en anaërobe condities verkregen worden.

Het tijdelijk aanwezig zijn van hoge concentraties substraat kan op verschillende manieren effect hebben op de omzettingen in het systeem. Ten eerste levert een (tijdelijk) hogere substraat-concentratie een (tijdelijk) hogere groeisnelheid op. Een hogere groeisnelheid geeft in steady state aanleiding tot een hogere specifieke heterotrofe nitrificatie-snelheid (zie hoofdstuk 2.). Ten tweede kan een hoge substraat-concentratie reservestof-vorming tot gevolg hebben.

Er zijn een aantal verschillende experimentele proefopzetten toegepast. In een eerste opzet is tijdens de niet-beluchte fase alleen de luchtgift gestopt. Dit leidt tot micro-aërobe condities, waarbij zuurstofoverdracht vanuit de headspace plaatsvindt. De elektrondonor is tijdens deze micro-aërobe fase op batch-wijze gedoseerd (hoofdstuk 3.3.1).

Een tweede opzet is om na het stoppen van de luchtgift over te gaan op het doorborrelen van de reactor met stikstofgas. Er is dus geen elektronacceptor aanwezig tijdens niet-beluchte fase. Ook hier wordt de elektrondonor op batch-wijze gedoseerd. Ter controle zijn er blanco-bepalingen uitgevoerd met het organisme *Paracoccus denitrificans* dat niet in staat is tot heterotrofe nitrificatie of aërobe denitrificatie (hoofdstuk 3.3.2).

Bij de derde opzet wordt de elektrondonor tijdens de beluchte fase gedoseerd (hoofdstuk 3.3.3). Ook hier zijn er blanco-bepalingen gedaan met *Paracoccus denitrificans*.

Bij de vierde proef-opzet is het effect van de aanwezigheid van nitriet tijdens de cyclus onderzocht (hoofdstuk 3.3.4). In tabel 10 is een overzicht gegeven van de gebruikte experimentele condities.

Tabel 10 Overzicht van de gebruikte experimentele condities.

Hfdst.	Voedingsfase (toedienen acetaat)	Temperatuur [° C]	Acetaat- concentratie [C-mM]	Organisme	Verdunnings- snelheid [1/h]	Cyclus- duur [h]
3.3.1	micro-aëroob	20	40.0	<i>Thiosphaera pantotropha</i>	0.042	6
3.3.2	anaëroob	20	12.5	<i>Thiosphaera pantotropha</i>	0.056	6
3.3.2	anaëroob	30	12.5	<i>Paracoccus denitrificans</i>	0.056	6
3.3.3	aëroob	30	12.5	<i>Thiosphaera pantotropha</i>	0.056	6
3.3.3	aëroob	30	12.5	<i>Paracoccus denitrificans</i>	0.056	6
3.3.4	anaëroob	30	12.5	<i>Thiosphaera pantotropha</i>	0.083	4
3.3.4	anoxisch (nitriet)	30	12.5	<i>Thiosphaera pantotropha</i>	0.083	4

3.3.1 *Micro-aërobe voedingsfase + aërobe fase*

MATERIALEN EN METHODEN

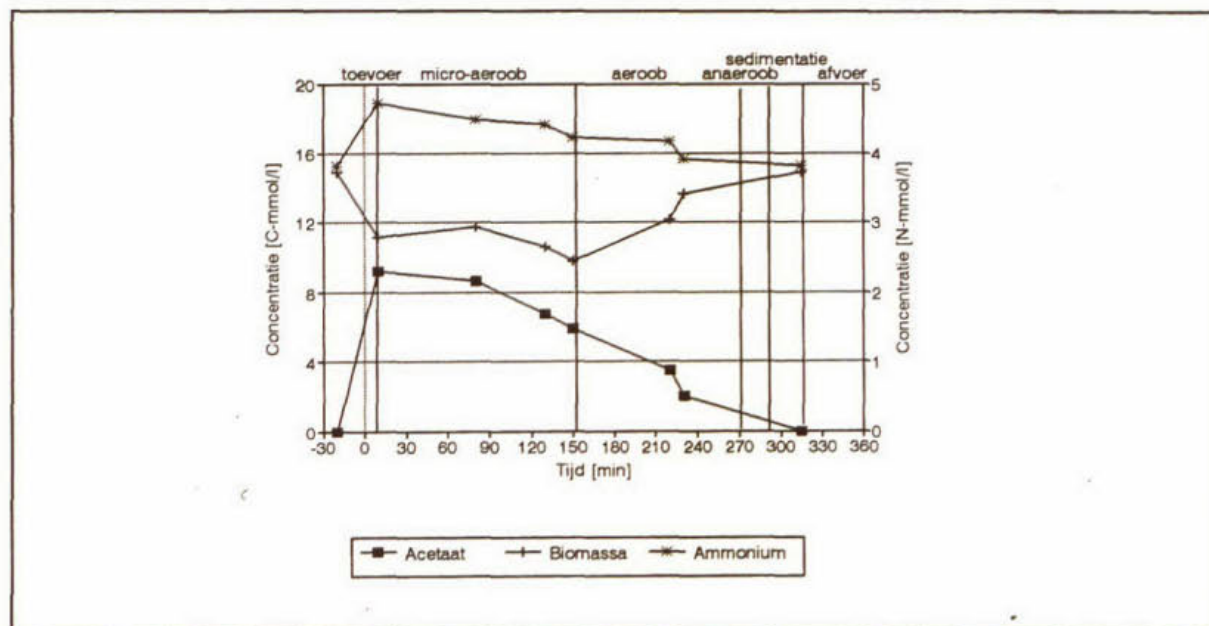
Er zijn SBR-experimenten uitgevoerd met reïncultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17. Er is gebruik gemaakt van hetzelfde standaard chemostaat-medium als in het voorgaande hoofdstukken. Het groeibeperkende substraat is acetaat (40 C-mM), stikstofbron is ammonium (7,5 mM). De temperatuur wordt geregeld op 20 °C en de pH wordt geregeld op 8,0. De opbouw van de 6 uren cyclus is als volgt:

0	-	10 min.	toevoegen influent
10	-	150 min.	niet-beluchte fase
150	-	270 min.	beluchte fase
270	-	290 min.	niet-beluchte fase
290	-	350 min.	niet-beluchte 'sedimentatie' fase
350	-	360 min.	effluent aftappen

Het systeem wordt 120 min. belucht in de 6 uren cyclus. Het totale volume is 2,0 l, het afgetapte volume is 0,5 l. De volumetrische verblijftijd is 24 uur, de verdunningssnelheid $D = 0.042 \text{ h}^{-1}$. Als er alleen groei tijdens de beluchte fase kan plaatsvinden dan bedraagt de (aërobe) groeisnelheid $\mu = 0.125 \text{ h}^{-1}$. De maximale groeisnelheid van *Thiosphaera pantotropha* bij 20 °C is $\mu_{\text{MAX}} = 0,27 \text{ [1/h]}$. De reactor wordt tijdens de anaërobe periode NIET met stikstofgas doorborreld, zodat door stofoverdracht van zuurstof vanuit de headspace er sprake is van micro-aërobe condities tijdens de voedingsfase. Voordat de cyclus voor de eerste keer wordt bemonsterd wordt er gewacht op steady state. Het criterium voor een steady state is wanneer de biomassa-concentratie in het effluent niet meer veranderd ($\pm 10\%$). In de regel duurt dit 1 week.

RESULTATEN EN DISCUSSIE

De resultaten van een cyclusmeting is weergegeven in figuur 17. Gemeten werden de concentraties van TOC en ammonium tijdens een cyclus. Bij alle experimenten is te zien dat er groei (toename van de biomassa-concentratie) optreedt, zowel tijdens de anaërobe als de aërobe fase. Deze groei gaat gepaard met opname van acetaat en met opname van ammonium voor assimilatie.



Figuur 17 Concentraties van acetaat, biomassa en ammonium in een *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992)-SBR tijdens een cyclus (**micro-aërobe voeding**).

De gemiddelde waargenomen yield van biomassa op substraat is ongeveer $16/40 = 0,4$ [C-mmol/C-mmol]. Bij een gemiddelde groeisnelheid van $\mu = D = 0.042$ [1/h] is dit hoger dan de yield in de chemostaat-experimenten. Deze hoge yield zou verklaard kunnen worden door de aanwezigheid van een reservestof in de cellen. De groei van actieve biomassa (dus zonder reservestof) vindt voornamelijk tijdens de aërobe periode plaats. Dit is ook af te leiden uit de relatief snellere ammonium-assimilatie tijdens de aërobe periodes.

Vergeleken met de chemostaat-experimenten (hoofdstuk 2) is er is geen waarneembare toename van de hoeveelheid ammonium omgezet per hoeveelheid biomassa geproduceerd. Dit duidt op het ontbreken van heterotrofe nitrificatie-activiteit.

Uit de geleidelijke afname van de acetaat-concentratie tijdens de voedingsfase bleek dat *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992) in staat was om onder 'micro-aërobe condities' (dwz. niet-meetbare opgeloste zuurstofconcentraties) acetaat op te nemen en vast te leggen als PHB. De benodigde zuurstof voor dit proces werd geleverd door diffusie uit de headspace van de reactor. Bij een experiment (figuur 17) werd het PHB-gehalte van de biomassa bepaald, vlak na het toedienen van het substraat in de anaërobe voedingsperiode ($t = 10$ min). Deze bedroeg 14,6 [gewichts%]. De totale biomassa bestaat op dat tijdstip dus uit 10,2 [C-mmol/l] actieve biomassa en 1,8 [C-mmol/l] PHB. De waargenomen daling van de totale biomassa-concentratie (op tijdstip $t = 70$ min) is dus in overeenstemming met

de consumptie van het aanwezige PHB (1,8 [C-mmol/l]). Ter vergelijking, de totaal toegevoegde hoeveelheid substraat (acetaat) per cyclus bedroeg 10,0 [C-mmol/l].

CONCLUSIES

Thiosphaera pantotropha GB17 is in staat om onder micro-aërobe condities acetaat snel op te nemen en vast te leggen als PHB. De yield van biomassa op acetaat is onder deze condities hoger dan die in chemostaat-cultures, wat logisch is gezien de vorming van PHB. Er is geen sprake van enige heterotrofe nitrificatie-activiteit onder deze condities.

3.3.2 Anaërobe voedingsfase + aërobe fase

MATERIALEN EN METHODEN

Er zijn SBR-experimenten uitgevoerd met reinkultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17 en met *Paracoccus denitrificans* LMD 22.21. Er is gebruik gemaakt van een mineraal medium met concentraties vergelijkbaar met gemiddeld huishoudelijk afvalwater. Alle CZV (400 mg/l) is aanwezig als acetaat (12,5 C-mM) en alle stikstof (75 mg/l) is aanwezig als ammonium. De temperatuur wordt geregeld op 30 °C en de pH wordt geregeld op 8,0. De opbouw van de cyclus met voeding in de anaërobe fase is als volgt:

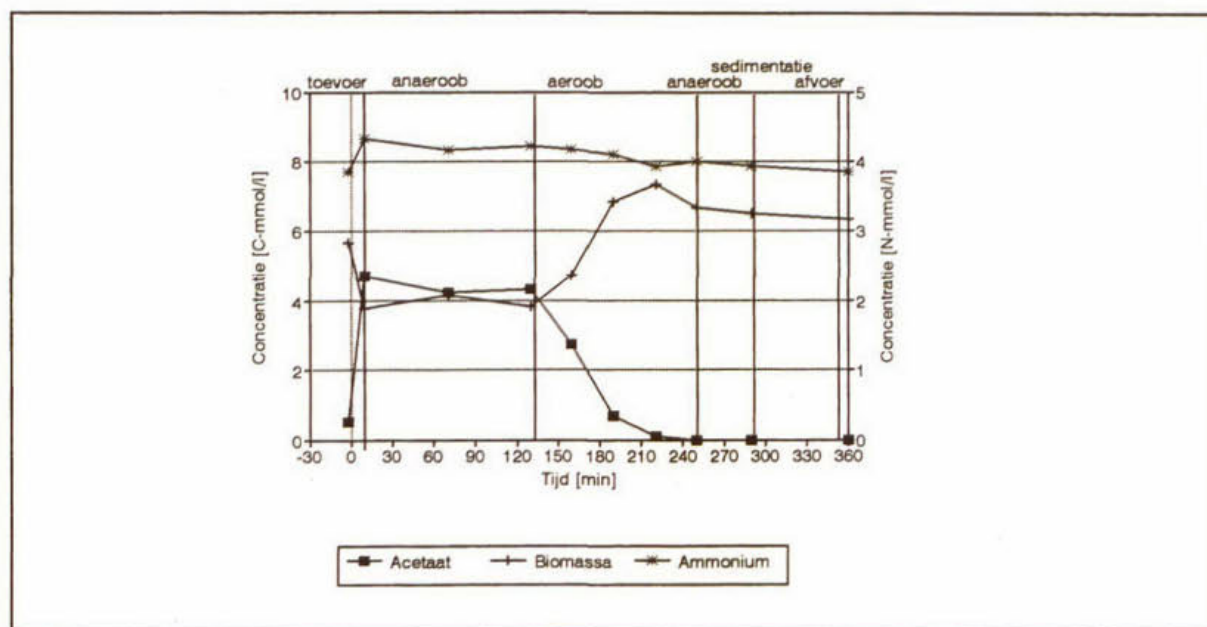
0	-	10 min.	toevoegen influent
10	-	130 min.	anaërobe fase
130	-	250 min.	aërobe fase
250	-	290 min.	tweede anaërobe fase
290	-	350 min.	'sedimentatie' fase
350	-	360 min.	effluent aftappen

Er wordt 120 min. belucht in de 6 uren cyclus. Het totale volume is 1,5 l, het afgetapte volume is 0,5 l. De volumetrische verblijftijd is 18 uur, de verdunningssnelheid $D = 0.056 \text{ h}^{-1}$. Als er alleen groei tijdens de beluchte fase kan plaatsvinden dan bedraagt de groeisnelheid minstens $\mu = 0.167 \text{ h}^{-1}$. De verschillen met de inleidende experimenten (hoofdstuk 3.3.1) zijn de afwijkende acetaat-concentratie (12,5 i.p.v. 40 [C-mmol/l]), de afwijkende ammoniumconcentratie (5,4 i.p.v. 7,5 [[mmol/l]), de afwijkende temperatuur (30 i.p.v. 20 °C) en de afwijkende hydraulische verblijftijd (18 i.p.v. 24 [h]). Gelijk bleef de cyclusduur en de duur van de aërobe fase. Er is voor een andere medium-samenstelling gekozen vanwege de doelstellingen geformuleerd in het onderzoeksproject. De CZV-concentratie (400 mg/l) en stikstofconcentratie (75 mg/l) zijn nu gelijk aan die van het gemiddelde Nederlandse huishoudelijk afvalwater (Koot, 1980).

RESULTATEN EN DISCUSSIE

Een voorbeeld van een cyclus-meting met *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992) is weergegeven in figuur 18. Gemeten werden de concentraties van TOC en ammonium tijdens een cyclus. Het valt op dat er nagenoeg geen activiteit is in de anaërobe fase. Dit is in tegenstelling tot de voorgaande experimenten, waarbij er sprake was van acetaat-opname onder micro-aërobe condities. Door het doorborrelen van de reactor met stikstofgas tijdens de anaërobe fase is er geen voor *Thiosphaera pantotropha* geschikte elektron-acceptor aanwezig. Het organisme kan geen polyfosfaat-reserves hydrolyseren om in de energie-

behoefte te voorzien. Er zijn geen fermenteerbare koolstof-verbindingen aanwezig. Zonder geschikte elektron-acceptor stopt de acetaat-opname en de groei.



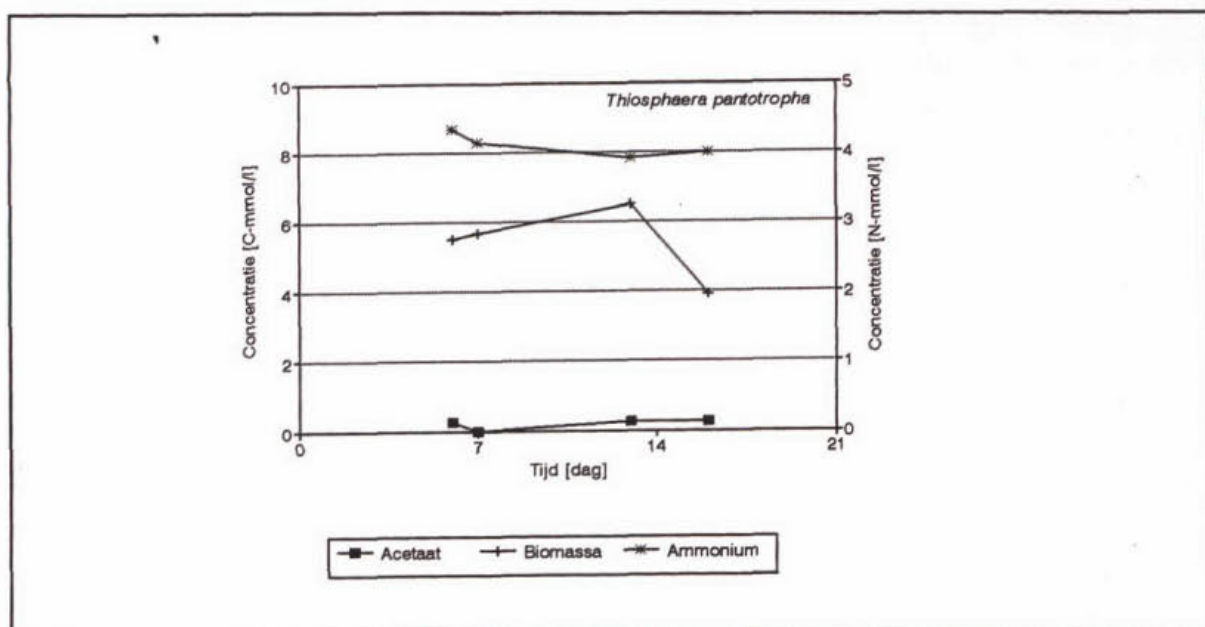
Figuur 18 Concentraties van acetaat, biomassa en ammonium in een *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992)-SBR tijdens een cyclus (anaërobe voeding).

De karakteristieke groeisnelheid bij de experimenten is hoger dan de verdunningssnelheid, namelijk de aërobe verblijftijd in de reactor, $\mu = 0,167$ [1/h]. Dit is het gevolg van de aanwezigheid van echte anaërobe periodes (geen 'micro-aërobie'). De gemiddelde waargenomen yield van biomassa op substraat is hoger dan bij de inleidende experimenten, ongeveer $6/12,5 = 0,5$ [C-mmol/C-mmol] (tegen $0,4$ [C-mmol/C-mmol] onder micro-aërobe condities).

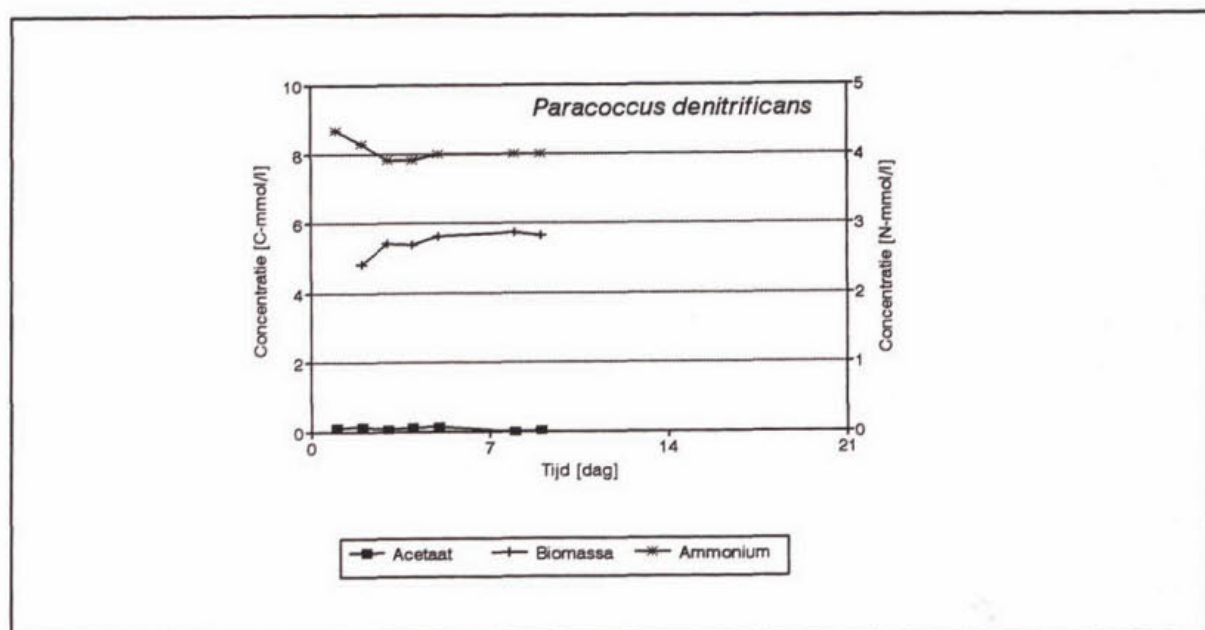
Deze waarde is hoger dan de maximale yield van *Thiosphaera pantotropha* op acetaat in continue culture ($Y_{sx} = 0,45$ [C-mmol/C-mmol], $m_s = 0,038$ [1/h]). Deze chemostaat-biomassa bestaat voor 3% uit PHB.

Het stikstofgehalte van de *Thiosphaera*-biomassa in het effluent is $(N/C) = 0,15 \pm 0,03$ [N-mol/C-mol]. Deze waarde is lager dan voor chemostaat-biomassa wegens de aanwezigheid van hogere concentraties PHB in de cel. Een schatting gebruikmakend van de gemeten (N/C)-verhouding van de biomassa levert een PHB-gehalte op van 40% van de totale biomassa.

De gemiddelde biomassaconcentratie in de SBR is $6,4$ [C-mmol/l]. Hiervan bestaat $3,9$ [C-mmol/l] uit actieve biomassa en $2,5$ [C-mmol/l] uit PHB. Per cyclus wordt er $6,25$ [C-mmol] acetaat gedoseerd. Dit wordt omgezet in ten eerste: $1,9$ [C-mmol] actieve biomassa (met een yield op acetaat van $Y_{sx} = 0,45$ [C-mmol/C-mmol]). Ten tweede: $1,3$ [C-mmol] PHB (met een geschatte "yield op acetaat" van $Y_{sp} = 0,67$ [C-mmol/C-mmol]). Deze yield van PHB op acetaat komt goed overeen met de gegevens uit hoofdstuk 6 ($Y_{sp} = 0,63$ [C-mmol/C-mmol]). Bij elkaar is dit $3,2$ [C-mmol] totale biomassa met een schijnbare bruto-yield van $0,5$ [C-mol/C-mol].



Figuur 19 Concentraties van acetaat, biomassa en ammonium in het effluent van een *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992)-SBR als functie van de tijd (anaërobe voeding).



Figuur 20 Concentraties van acetaat, biomassa en ammonium in het effluent van een *Paracoccus denitrificans* LMD 22.21-SBR als functie van de tijd (anaërobe voeding).

Er zijn geen cyclus-metingen uitgevoerd met het controle-organisme *Paracoccus denitrificans*. Wel zijn de effluent-concentraties van zowel de *Thiosphaera*-SBR (figuur 19) als de *Paracoccus*-SBR (figuur 20) gedurende de experimenten gemeten. Er is nauwelijks verschil waar te nemen tussen het effluentconcentratie-verloop van *Thiosphaera*

en van *Paracoccus*, qua yield of ammonium-omzetting. Hogere heterotrofe nitrificatie-activiteit zou volgens de theorie gepaard moeten gaan met lagere yield.

CONCLUSIES

Het doorborrelen van de reactor met stikstofgas tijdens de anaërobe fase bleek voldoende om substraat-opname tijdens deze fase te voorkomen. Tijdens de aërobe fase werd de aanwezige acetaat als volgt verdeeld: 20% naar PHB, 30% naar biomassa en 50% naar CO_2 .

Er was geen verschil te zien in de gemiddelde yield op acetaat van *Paracoccus denitrificans* en *Thiosphaera pantotropha*. De resultaten duiden erop dat ook conventionele denitrificeerders eenzelfde vermogen hebben tot reservestof-vorming als *Thiosphaera pantotropha*. Er werd geen heterotrofe nitrificatie-activiteit waargenomen in de cultures omdat er gebruik werd gemaakt van een gedegenerende *Thiosphaera pantotropha*-stam.

3.3.3 Aërobe voedingsfase + anaërobe fase

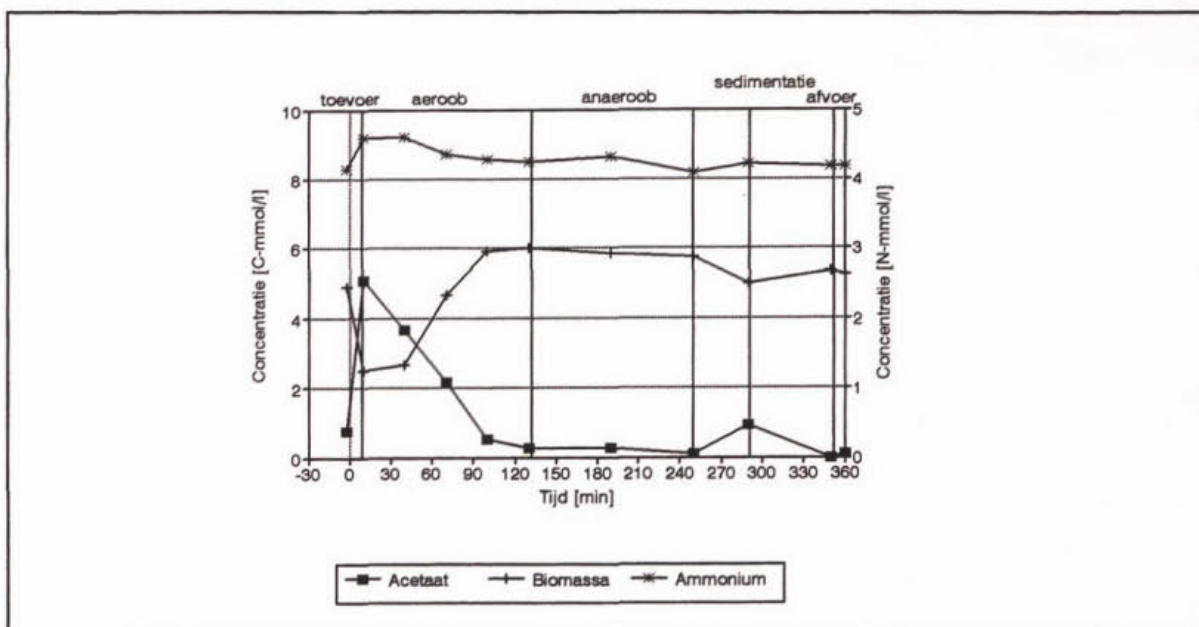
Er zijn SBR-experimenten uitgevoerd met reinkultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17 en met *Paracoccus denitrificans* LMD 22.21. Er is gebruik gemaakt van een mineraal medium met concentraties vergelijkbaar met gemiddeld huishoudelijk afvalwater. Alle CZV (400 mg/l) is aanwezig als acetaat (12,5 C-mM) en alle stikstof (75 mg/l) is aanwezig als ammonium. De temperatuur wordt geregeld op 30 °C en de pH wordt geregeld op 8,0. De opbouw van de cyclus met voeding in de aërobe fase is als volgt:

0	-	10 min.	toevoegen influent
10	-	130 min.	aërobe fase
130	-	290 min.	anaërobe fase
290	-	350 min.	'sedimentatie' fase
350	-	360 min.	effluent aftappen

Er geldt dat 120 min. wordt belucht in de 6 uren cyclus. Het totale volume is 1,5 l, het afgetapte volume is 0,5 l. De volumetrische verblijftijd is 18 uur, de verdunningssnelheid $D = 0.056 \text{ h}^{-1}$. Als er alleen groei tijdens de beluchte fase kan plaatsvinden dan bedraagt de groeisnelheid minstens $\mu = 0.167 \text{ h}^{-1}$.

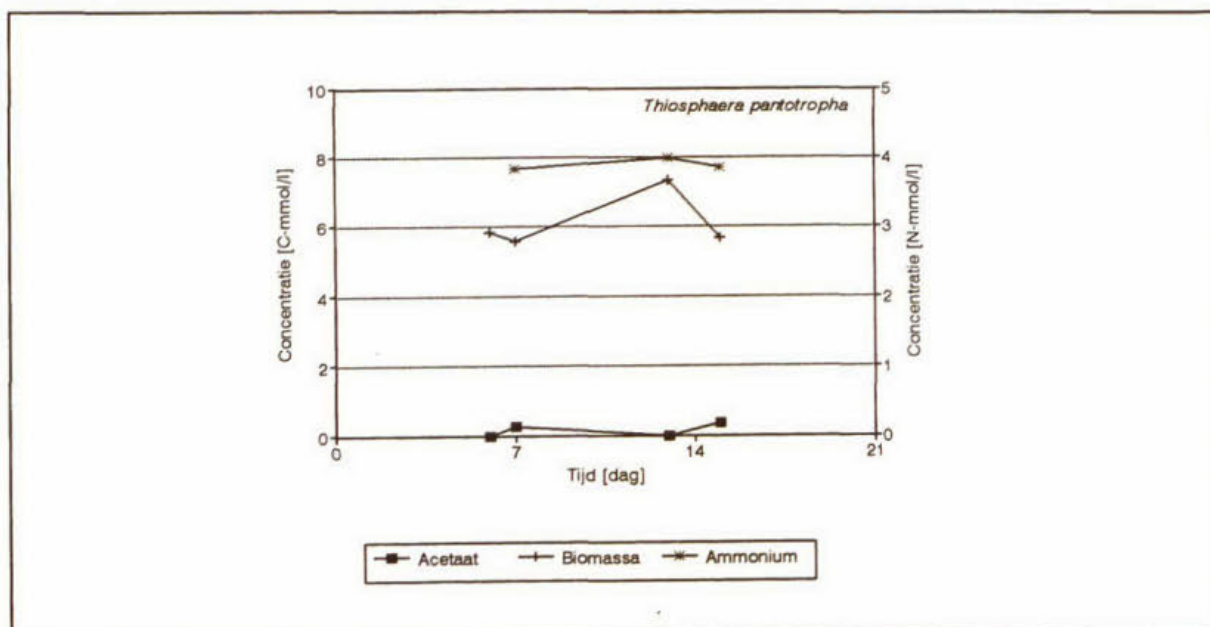
RESULTATEN EN DISCUSSIE

Een voorbeeld van een cyclus-meting is weergegeven in figuur 21. Gemeten werden de concentraties van TOC en ammonium tijdens een cyclus. Er is geen verschil in de gemiddelde waargenomen yield van biomassa op substraat te zien tussen de SBR's met voeding in de aërobe periode en SBR's met voeding in de anaërobe periode, $Y_{\text{sx}} = 0,5 \text{ [C-mmol/C-mmol]}$. Het stikstofgehalte van de *Thiosphaera*-biomassa in het effluent is gelijk aan die van de SBR's met voeding in de anaërobe periode, namelijk $(\text{N/C}) = 0.15 \pm 0.03 \text{ [N-mol/C-mol]}$. Ook hier is het geschatte PHB-gehalte van de biomassa 40%

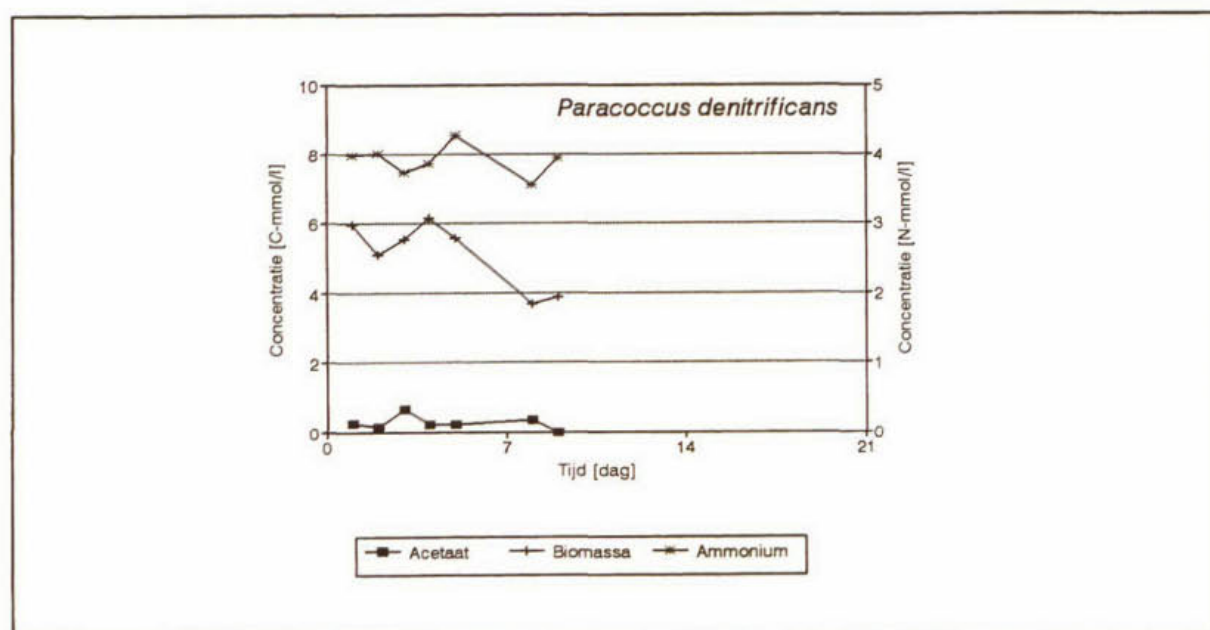


Figuur 21 Concentraties van acetaat, biomassa en ammonium in een *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992)-SBR tijdens een cyclus (aërobe voeding).

Er is geen verschil in de ammonium-opnamesnelheid te zien tussen de anaëroob gevoede SBR en de aëroob gevoede SBR. Uit de stikstofbalans blijkt dat de heterotrofe nitrificatiesnelheid te verwaarlozen is in dit systeem. Een voorbeeld voor de aëroob gevoede *Thiosphaera pantotropha*-SBR: de gemiddelde stikstof-omzetting is $5,1 - 4,0 = 1,1$ [mM], de gemiddelde totale biomassa-concentratie is $6,4$ [C-mM]. Het stikstofgehalte van de biomassa is $(N/C) = 0,15 \pm 0,03$ [N-mol/C-mol], dus voor assimilatie werd $0,15 \cdot 6,4 = 1,0$ [mM] ammonium gebruikt. Een verschil van slechts $0,1$ [mM]. Er is geen significante simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie-activiteit.



Figuur 22 Concentraties van acetaat, biomassa en ammonium in het effluent van een *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992)-SBR als functie van de tijd (aërobe voeding).



Figuur 23 Concentraties van acetaat, biomassa en ammonium in het effluent van een *Paracoccus denitrificans* LMD 22.21-SBR als functie van de tijd (aërobe voeding).

Er zijn geen cyclus-metingen uitgevoerd met het controle-organisme *Paracoccus denitrificans*. Wel zijn de effluent-concentraties van zowel de *Thiosphaera*-SBR (figuur 22) als de *Paracoccus*-SBR (figuur 23) gedurende de experimenten gemeten. Er is ook nauwelijks verschil waar te nemen tussen het effluentconcentratie-verloop van *Thiosphaera* en van *Paracoccus*, qua yield of ammonium-omzetting.

CONCLUSIES

Er was geen verschil te zien in de yield op acetaat tussen de SBR met voeding in de aërobe fase en de SBR met voeding in de anaërobe fase. Ook de gemiddelde yield op acetaat van *Paracoccus denitrificans* en *Thiosphaera pantotropha* waren nagenoeg identiek. De resultaten duiden erop dat ook conventionele denitrificeerders eenzelfde vermogen hebben tot reservestof-vorming als *Thiosphaera pantotropha*. Er werd geen heterotrofe nitrificatie-activiteit waargenomen in de cultures omdat er gebruik werd gemaakt van een gedegenerende *Thiosphaera pantotropha*-stam.

3.3.4 Anoxische voedingsfase + aërobe fase

Er zijn SBR-experimenten met *Thiosphaera pantotropha* GB17 uitgevoerd om het effect van de aanwezigheid van nitriet op de heterotrofe nitrificatie-activiteit en op de reservestofvorming te bepalen. De aanwezigheid van nitriet heeft een gunstig effect op de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie-activiteit in chemostaatcultures van *Thiosphaera pantotropha* (M.Pot, 1990).

Er is gebruik gemaakt van twee verschillende cycli. Bij beide cycli vindt de voeding plaats tijdens een niet-beluchte fase. Bij de eerste cyclus is er alleen elektron-acceptor aanwezig tijdens de aërobe fase (namelijk zuurstof). Er is geen geschikte elektron-acceptor aanwezig in de voedingsfase (anaëroob). Bij de tweede cyclus wordt er gedurende de aërobe fase een nitriet-oplossing gedoseerd. Deze wordt slechts gedeeltelijk geconsumeerd, zodat er tijdens de niet-beluchte fase ook elektron-acceptor aanwezig kan zijn. Er is dan sprake van een anoxische voedingsfase (i.p.v. een anaërobe voedingsfase).

MATERIALEN EN METHODE

Er zijn SBR-experimenten uitgevoerd met reinkultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17. Er is gebruik gemaakt van een mineraal medium met concentraties vergelijkbaar met gemiddeld huishoudelijk afvalwater. Alle CZV (400 mg/l) is aanwezig als acetaat (12,5 C-mM) en alle stikstof (75 mg/l) is aanwezig als ammonium. De temperatuur werd geregeld op 30 °C en de pH werd geregeld op 8,0, de zuurstofspanning tijdens de aërobe fase werd geregeld op 50% luchtverzadiging. Er werd gebruik gemaakt van twee 4 uren cycli die alleen verschillen in de aanwezigheid van nitriet-toeloop. De opbouw van de cyclus zonder nitriet-toeloop is als volgt:

0	-	10 min.	toevoegen influent
10	-	55 min.	anaërobe fase
55	-	165 min.	aërobe fase
165	-	230 min.	'sedimentatie' fase
230	-	240 min.	effluent aftappen

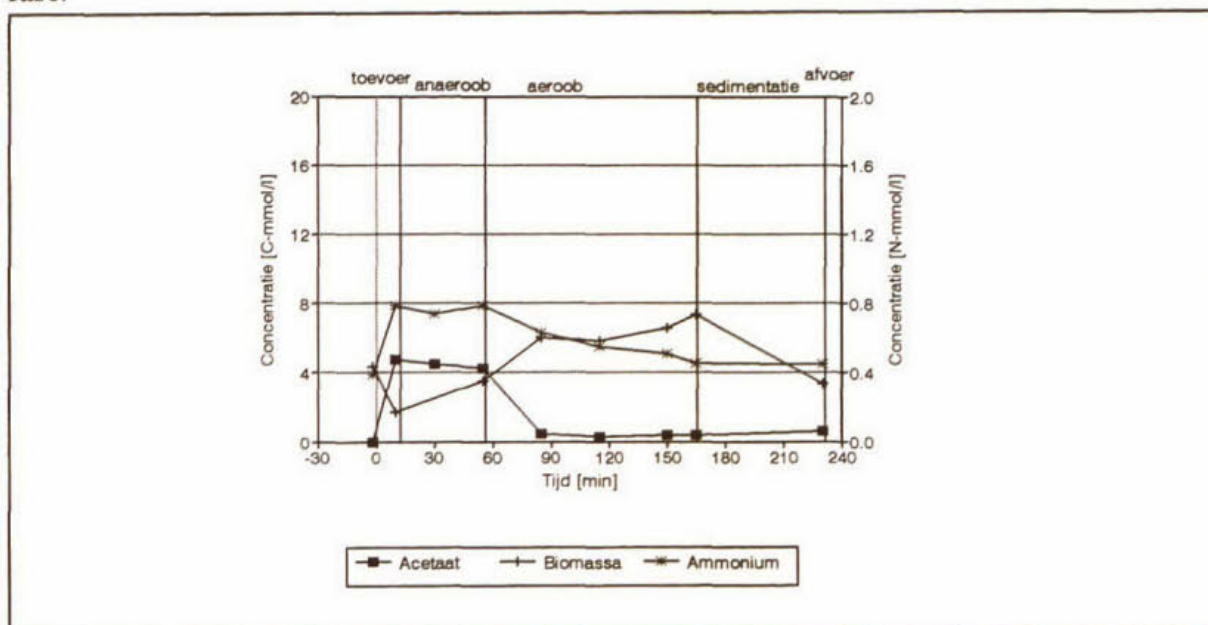
De opbouw van de cyclus met nitriet-toeloop in de aërobe fase is als volgt:

0	-	10 min.	toevoegen influent
10	-	55 min.	anaërobe fase
55	-	165 min.	aërobe fase met nitriet-toeloop
165	-	230 min.	'sedimentatie' fase
230	-	240 min.	effluent aftappen

Voor beide systemen geldt dat er 110 min. werd belucht in de 4 uren cyclus. Het totale volume is 1,5 l, het afgetapte volume is 0,5 l. De volumetrische verblijftijd is 12 uur, de verdunningssnelheid $D = 0.083 \text{ h}^{-1}$. Als er alleen groei tijdens de beluchte fase kan plaatsvinden dan moet de groeisnelheid minstens $\mu = 0.182 \text{ h}^{-1}$ bedragen. Als niet alle nitriet werd geconsumeerd aan het einde van een cyclus is het mogelijk dat er groei plaatsvindt tijdens de anaërobe voedingsfase van de volgende cyclus. Dit zal een lagere karakteristieke groeisnelheid dan $\mu = 0.182 \text{ h}^{-1}$ tot gevolg hebben.

RESULTATEN

Een voorbeeld van een meting zonder nitriet-dosering is weergegeven in figuur 24. Een voorbeeld van een meting met nitriet-dosering is weergegeven in figuur 25. Gemeten werden de concentraties van TOC, ammonium en nitriet tijdens een cyclus. Ook werd incidenteel de elementaire samenstelling en PHB-gehalte van de biomassa bepaald. Er is geen verschil waar te nemen tussen de acetaat-opname tijdens de anaërobe voedingsperiode van de SBR zonder nitriet-toeloop en de SBR met nitriet-toeloop. Ook ammonium werd niet geassimileerd in de anaërobe fase, er treed dus geen groei op in deze fase.



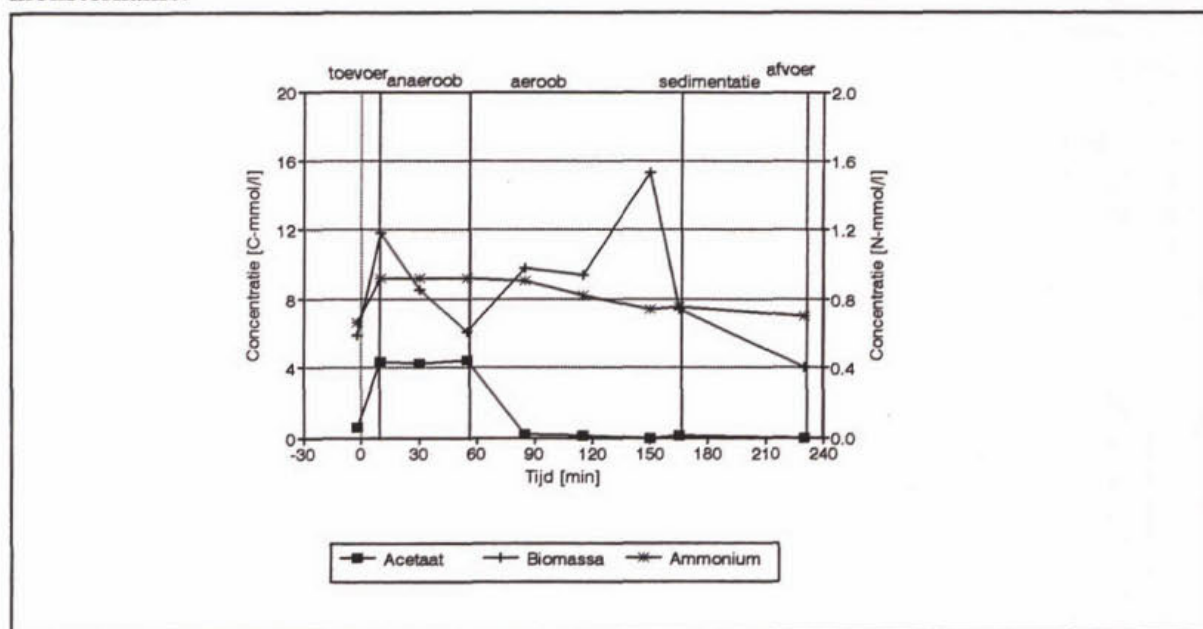
Figuur 24 Concentraties van acetaat, biomassa en ammonium in een *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992)-SBR tijdens een cyclus (anaërobe voeding, geen nitriet-toeloop).

De gemiddelde waargenomen yield van biomassa op substraat is $4/12.5 = 0.3 \text{ [C-mmol/C-mmol]}$. Bij een karakteristieke groeisnelheid van $\mu = 0.182 \text{ [1/h]}$ is dit lager dan de resultaten van de chemostaat-experimenten.

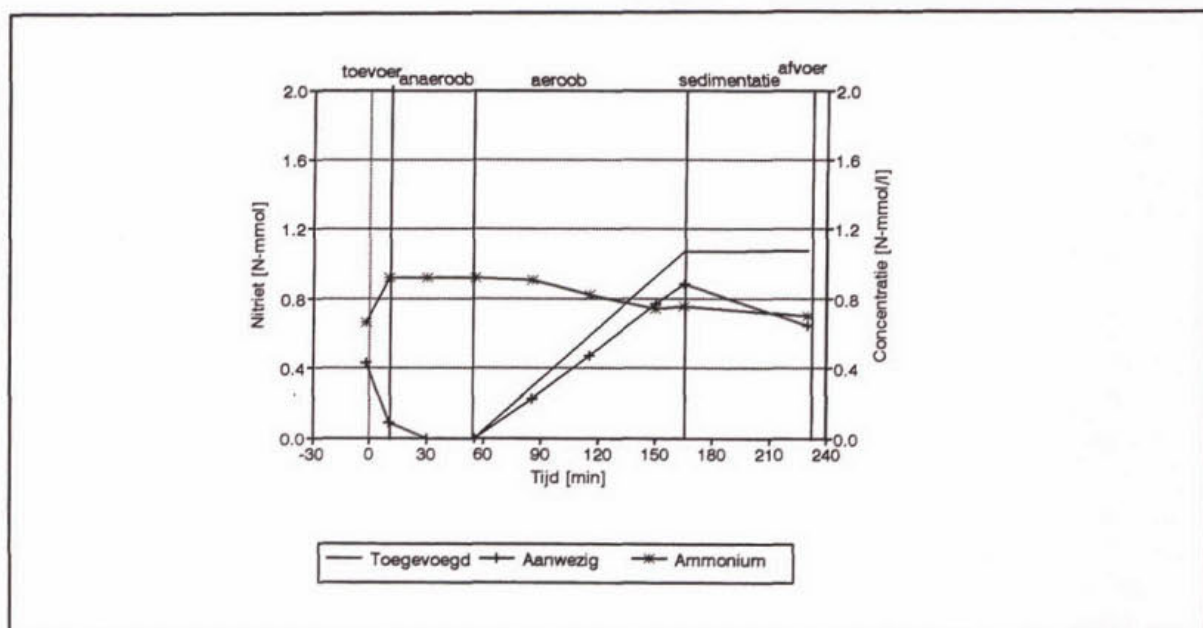
In het systeem met nitriet-toeloop is er slechts een kleine hoeveelheid nitriet aanwezig aan het begin van de anaërobe fase (0,4 mmol in 1,5 liter). Dit werd ogenblikkelijk geconsumeerd (eerste 10 tot 15 minuten van de cyclus, figuur 26). Deze hoeveelheid nitriet heeft echter geen significante opname van acetaat en/of groei tot gevolg.

In het systeem met nitriet-toeloop wordt nitriet aëroob gedenitrificeerd. Weergegeven in figuur 26 is de aan de reactor toegevoegde hoeveelheid nitriet en de gemeten hoeveelheid

nitriet. Er is gecorrigeerd voor de volumeverandering en nitriet-verwijdering door monsternamen.



Figuur 25 Concentraties van acetaat, biomassa en ammonium in een *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992)-SBR tijdens een cyclus (anoxische voeding, nitriet-toeloop).



Figuur 26 Concentraties van ammonium, aanwezig nitriet en toegevoegd nitriet in een *Thiosphaera pantotropha* GB17 (1992)-SBR tijdens een cyclus (anoxische voeding, nitriet-toeloop).

CONCLUSIES

De SBR-experimenten waren qua yield op acetaat nauwelijks te onderscheiden van de aërobe, acetaat-gelimiteerde continue cultures van *Thiosphaera pantotropha* GB17. Er kon

geen verhoogde heterotrofe nitrificatie-activiteit gedetecteerd worden in de SBR-cultures, vergeleken met de chemostaat-experimenten. Ook het doseren van nitriet-oplossing tijdens de aërobe fase gaf geen verhoogde ammonium-omzetting te zien. Echter, de aanwezigheid van nitriet tijdens de aërobe fase gaf aanleiding tot aërobe denitrificatie van nitriet tot stikstofgas, wat opmerkelijk is bij een dO_2 van 50% luchtverzadiging in een nagenoeg ideaal gemengde reactor.

Naast zuurstof (micro-aërobe experimenten) kan ook nitriet als elektron-acceptor dienen voor de productie van PHB uit acetaat tijdens de voedings-periode.

3.4 Conclusies dynamische experimenten

Thiosphaera pantotropha

De simultane heterotrofe nitrificatie- en aërobe denitrificatie-activiteit bleek verwaarloosbaar. Dit was niet het gevolg van het opleggen van dynamische condities, maar door het gebruik van een gedegenerende stam.

Er was geen acetaat-opname in de afwezigheid van een geschikte elektron-acceptor.

Het alternerend toedienen van elektron-donor en/of de elektron-acceptor stimuleerde de vorming van reservestoffen, met name PHB.

Paracoccus denitrificans

Dit 'blanco organisme' hoopt onder de gebruikte condities blijkbaar net zo snel reservestoffen op als *Thiosphaera pantotropha*.

Deze conventionele denitrificeerder bleek goed bestand tegen afwisselende aërobe en anaërobe (of anoxische) periodes, ondanks de afwezigheid van een geheel constitutief denitrificatie-apparaat zoals van *Thiosphaera pantotropha*.

Gezien de bovenstaande resultaten lijkt het onmogelijk om de voorgestelde dubbele selectie-strategie uit te voeren. Deze strategie om te selecteren op *Thiosphaera*-achtige organismen in afvalwaterzuiveringsinrichtingen bestond uit enerzijds het gebruik maken van het constitutieve denitrificatie-apparaat van *Thiosphaera pantotropha* en anderzijds het gebruik maken van het vermogen tot vorming van reservestoffen.

Ten eerste, het bezit van constitutieve denitrificatie-enzymen bleek voor *Thiosphaera pantotropha* onvoldoende voordeel op te leveren tegen de conventionele, minder constitutieve, denitrificeerder *Paracoccus denitrificans*. Ten tweede, het vermogen tot reservestof-vorming is niet uniek voor *Thiosphaera pantotropha* en kan niet gebruikt worden om op dit type organismen te selecteren. Ook de conventionele denitrificeerder *Paracoccus denitrificans* bleek dit vermogen te bezitten.

4. DE MOGELIJKHEID VAN DE NO₂-ROUTE VOOR CONVENTIONELE NITRIFICATIE & DENITRIFICATIE ; EEN LITERATUURSTUDIE

Nitrificatie en denitrificatie van afvalwater zijn goed bestudeerde processen in de context van de conventionele afvalwaterzuivering. Veelal wordt hiervoor een proces met twee reactoren (of reactorruimtes) gebruikt. Indien geconcentreerde stromen behandeld dienen te worden zijn er een aantal aspecten sterk afwijkend:

- de hogere concentraties zijn vaak inhiberend.
- er treden sterke pH effecten op.
- de temperatuur is hoger. De afvalstromen zelf zijn veelal warm (deelstroom uit de slibbehandeling of industrieel water). Daarnaast leidt verwijdering van 1 gr ammonium per liter tot een temperatuurstijging van globaal 10-15 °C.
- CZV voor de denitrificatie dient apart te worden toegevoerd omdat deze stromen vaak nauwelijks (of veel te weinig) CZV bevatten.

Wanneer nitrificatie gevolgd door denitrificatie met dosering van elektrondonor (CZV) in gescheiden reactoren wordt uitgevoerd, is het (in het geval van geconcentreerde stromen) niet noodzakelijk om water te recirculeren over beide reactoren om de aanwezige CZV optimaal te benutten. Recirculatie is echter wel nodig om de pH in het totale proces in de hand te houden zonder grote hoeveelheden base of zuur te hoeven doseren (1 g ammonium resulteert in 0.15 mol zuurproductie tijdens nitrificatie). Menging (en neutralisatie) kan gebeuren door (slib en) water over de twee aparte reactoren te recirculeren. Hetzelfde kan ook bereikt worden door in één reactor aërobe en anoxische periodes af te wisselen. Een enkele intermitterend beluchte reactor heeft de volgende voordelen boven twee aparte reactoren:

- (i) door aërobie en anaërobie snel af te wisselen kunnen de concentraties van ammonium, nitriet en nitraat laag blijven. Dit voorkomt inhiberende concentraties van de verbindingen.
- (ii) een eenvoudige regeling van het beluchtingsregime middels bv. een redox-elektrode of zuurstofsensor is mogelijk. Sturing van recirculatie stromen is complexer door de tijdvertraging die in de regelactie aanwezig is.
- (iii) de kosten van één reactor liggen veelal lager dan die van twee reactoren met recirculatie.
- (iv) minder energie verbruik door pompen.
- (v) ten slotte vindt er in het proces een grote warmteproductie plaats. Bij twee gescheiden reactoren zullen de processen op verschillende temperatuur werken. In grote reactoren kan dit aanleiding geven tot temperatuurgradienten.

Een doelstelling van het onderzoek is het verlagen van de benodigde CZV/N-ratio in stikstofverwijderingsprocessen. Een lagere CZV/N-ratio zal resulteren in:

- lagere kosten door een lagere CZV-dosering
- een verminderde surplusslib-productie

Een mogelijkheid om dit te bereiken is om de stikstofverwijdering over nitriet te laten lopen ipv. nitraat, hetgeen resulteert in een verlaagde CZV-behoefte, zuurstofverbruik, slibgroei en warmte-productie.

De potentiële voordelen van deze vorm van N-eliminatie worden reeds lange tijd onderkend. In de tabel worden de verschillen nogmaals weergegeven (mede gebaseerd op Wiesmann, 1994).

Tabel 11 Vergelijking van stikstofeliminatieproces via nitraat en via nitriet.

			Nitraat route	Nitriet route
CZV behoefte	exclusief groei	(kgCZV/kgN)	2.9	1.7
	inclusief groei	(kgCZV/kgN)	5.2	3.1
Slibproductie	autotrofen	(kgVSS/kgN)	0.19	0.15
	heterotrofen	(kgVSS/kgN)	2.1	1.2
	totaal	(kgVSS/kgN)	2.3	1.4
Zuurstofverbruik	exclusief groei	(kgO ₂ /kgN)	4.6	3.4
	inclusief groei	(kgO ₂ /kgN)	4.3	3.2
Warmteproductie	exclusief groei	(kJ/gN)	60	43

Voor het onderzoek naar de stikstofeliminatie-route via nitriet zijn de volgende drie processen relevant:

1. ammonium oxidatie $\text{NH}_3 + 1,5 \text{ O}_2 \text{ ----> HNO}_2$
2. nitriet oxidatie $\text{HNO}_2 + 0,5 \text{ O}_2 \text{ ----> HNO}_3$
3. nitriet/nitraat reductie $\text{HNO}_x + y \text{ CZV ----> } 0,5 \text{ N}_2 + z \text{ CO}_2$

Er zijn in de literatuur diverse onderzoeken te vinden om te komen tot een stabiel proces via de nitriet route:

- (i) Inhibitie van de nitriet-oxideerders door (i) het laten ophopen van hydroxylamine (NH₂OH) (Alleman (1984), Yang (1992)), (ii) verhoogde vrije ammonia-concentraties (NH₃) door verhoging van de pH en/of de ammonium-concentratie (Anthonisen (1976), Turk (1987, 1989), de Bruin (199*), Abeling (1992)) (iii) door verhoogde concentraties salpeterig zuur (HNO₂) middels verlaging van de pH (Alleman (1985), Anthonisen (1976), Turk (1987, 1989)). Al deze ingrepen helpen slechts op korte termijn, het blijkt dat in langere termijn studies (enkele dagen tot weken) zich een populatie ophoopt die geen last meer heeft van de inhibitie (Verstraete (1977), Alleman (1984), Turk (1989), de Bruin(199*)). Dit laatste onderstreept de noodzaak om dergelijke experimenten met open slibcultures uit te voeren.
- (ii) Inhibitie van de nitriet-oxideerders door toevoeging van specifieke inhibitors, bijvoorbeeld chloraat en/of chloriet (Turk (1989), Voets (1975), Zacherl (1985)). Dit is uiteraard geen goede oplossing in de praktijk.
- (iii) Uitspoeling van nitriet-oxideerders op basis van een lagere groeisnelheid dan nitraat-oxideerders, dwz. optimaliseren van de slibleeftijd (Beccari (1979), Turk (1989), Balmelle (1992), Antoniou (1990), Randall (1984)). In alle studies wordt een lagere groeisnelheid voor nitriet-oxideerders gevonden. Deze is veelal 30-50 % verschillend, voldoende om selectie op te bedrijven. Het verschil in maximale groeisnelheid is een functie van de temperatuur. Bij hogere temperatuur (T > 10 °C) wordt het verschil in maximale groeisnelheid tussen ammonium-oxideerders en nitriet-oxideerders groter (Hunink (1992)). Echter, bij lagere temperaturen (T < 10

°C) is het mogelijk dat nitriet-oxideerders sneller groeien dan ammonium-oxideerders. Dit is waarschijnlijk de verklaring voor de resultaten van oa. Wiesmann (1993).

Hierbij moet opgemerkt worden dat in feite de aërobe slibleeftijd bepalend is voor het uitspoelen van nitrificeerders. Deze kan op twee manieren beïnvloed worden via de spuislibstroom en via de lengte van de aërobe fase. Daarnaast kan door het instellen van een pH, zuurstofspanning etc getracht worden de nitriet-oxideerders verder in hun groei te remmen.

- (iv) Uitspoelen van de nitriet-oxideerders door wegnemen van het substraat nitriet dmv. de competitie met denitrificeerders. Een mogelijke uitvoering is het inlassen van 'interne denitrificatie' periodes tijdens de nitrificatie (van Faasen (1976), Turk (1989)). De optimale procesomstandigheden voor de reductie van nitriet lijken te kunnen verschillen van die voor de reductie van nitraat (Akunna (1993), Wilderer (1987), Nakajima (1984a, 1984b)).
- (v) Uitspoelen van de nitriet-oxideerders door wegnemen van het substraat zuurstof dmv. de competitie met ammonium-oxideerders. Een mogelijke uitvoering is het verlagen van de opgeloste zuurstofconcentratie (Turk (1989), Hanaki (1990a, 1990b)). Er is slechts een referentie gevonden waar een K_s voor zuurstof voor zowel *Nitrosomonas* als *Nitrobacter* onder dezelfde experimentele omstandigheden is bepaald, resp. $0,016 \mu\text{M}$ en $0,062 \mu\text{M}$ (Laudelout *et al* 1976). Dit geeft aan dat de zuurstofspanning gebruikt kan worden voor het competitief bevoordelen van de ammonium oxidatie over de nitriet-oxidatie. Onafhankelijke bepalingen van de K_s voor zuurstof voor ammonium en nitriet oxidatie met mengpopulaties zijn ons echter niet bekend.

Geconcludeerd kan worden dat N-eliminatie via de nitrietroute het best kan worden verkregen via de uitspoeling van nitriet-oxideerders. Dit eventueel ondersteund door verlaging van zuurstof of nitriet concentratie's waardoor de groeisnelheid van nitriet oxideerders extra afneemt. Selectie op slibleeftijd zal leiden tot relatief korte (aërobe) slibleeftijden. De slibproductie zal hierdoor hoger zijn dan bij een langere slibleeftijd. Dit wordt echter ruimschoots gecompenseerd door de vermindering tgv. het gebruik van nitriet i.p.v. nitraat als elektronenacceptor.

Het meeste onderzoek is uitgevoerd bij "normale" temperaturen 10-20 °C en met huishoudelijk afvalwater. Voor geconcentreerde stromen dient ivm de grote warmteproductie gedacht te worden aan 30-40 °C. Dit heeft niet alleen een directe invloed op de biologische processen (Quinlan (1986), Antoniou (1990)) maar ook op de voor de kinetiek belangrijke dissociatie van nitriet en ammoniak.

Van bovenvermelde opties lijkt met name de regulatie van de slibleeftijd tot een stabiele procesvoering te kunnen leiden, zeker wanneer dit gecombineerd kan worden met het reeds vanaf de opstart van het systeem wegnemen van nitriet door de denitrificeerders. Verlaging van de zuurstofspanning lijkt ook mogelijkheden te bieden. Dit kan echter leiden tot productie van N_2O (Kugelman (1991a, 1991b)).

In toekomstig onderzoek zal moeten worden onderzocht of het bij de vermelde temperaturen mogelijk is een stabiel proces te voeren waarbij nitriet het voornaamste intermediair is. Hierbij zal als stuurparameter gelden (i) slibleeftijd, (ii) snelheid van afwisseling aërobie/anaërobie, (iii) opgeloste zuurstofspanning in de aërobe fase. Bij de

uitvoering van experimenten zal aandacht moeten worden geschonken aan het mogelijk optreden van ongewenste intermediären. Getracht moet worden een kinetiek-model op te stellen dat de nitrificatie/denitrificatie als functie van slibleeftijd, concentraties van NH_4^+ , pH, NO_x^- , en O_2 , en de temperatuur beschrijft.

Op basis van de resultaten van deze literatuurstudie is inmiddels een semi-technisch onderzoek gestart door de TU Delft, vakgroep Bioprocestechnologie in samenwerking met het zuiveringsschap Hollandse Eilanden en Waarden naar stikstofverwijdering via de nitrietroute uit het rejectiewater van het slibverwerkingsbedrijf Sluisjesdijk. Er is gekozen voor een continu doorstroomde reactor zonder biomassa-retentie, vanwege:

- (i) de goede beheersbaarheid van de slibleeftijd als essentiële stuurparameter. In een continu doorstroomde reactor zonder biomassa-retentie kan de slibleeftijd goed ingesteld worden, de biomassa-verblijftijd is namelijk gelijk aan de hydraulische verblijftijd. In een biofilm reactor is het niet goed mogelijk om de biomassa-verblijftijd nauwkeurig in te stellen.
- (ii) de werktuigbouwkundige eenvoud van slechts 1 reactor zonder bezinker en de afwezigheid van grote recirculatiestromen.
- (iii) afwezigheid van opschaalrisico's door de keuze van de ideaal gemengde tank.

5. EFFECT VAN RESERVESTOFVORMING OP DE (CZV/N)-VERHOUDING IN CONVENTIONELE NITRIFICATIE & DENITRIFICATIE

5.1 Inleiding

In dit hoofdstuk wordt het aspect van reservestofvorming bestudeerd op de benodigde CZV/N-verhouding voor denitrificatie. Een van de doelstellingen van het onderzoek is het ontwikkelen van een afvalwaterzuiveringsproces dat efficiënt gebruik maakt van CZV voor denitrificatie. Een maat voor de efficiëntie van een stikstofverwijderingsproces is de CZV/N-verhouding. Deze kan sterk in ongunstige zin worden beïnvloed indien het slib tijdens de denitrificatie-fase CZV als reservestof opslaat en vervolgens transporteert naar de aërobe fase. Er moet dus gestreefd worden naar minimalisatie van de aërobe oxidatie van de voor denitrificatie bestemde hoeveelheid CZV.

De normale (CZV/N)-verhouding voor nitrificatie & denitrificatie via nitraat kan als volgt berekend worden. Er wordt juist voldoende CZV (bijvoorbeeld acetaat) gedoseerd om alle stikstof om te zetten in stikstofgas. Bij volledige stikstof-eliminatie wordt 5 C-mol acetaat geoxideerd per 4 mol NO_3^- gereduceerd. De (theoretische) minimale CZV/N-verhouding is dus 2.857 mgCZV/mg NO_3^- -N. Echter wordt er in de praktijk tijdens denitrificatie ook biomassa gevormd. De extra hoeveelheid CZV die voor groei nodig is hangt af van de groeisnelheid van de organismen. De minimale CZV/N van 2.857 kan alleen benaderd worden in afvalwaterzuiveringsystemen met zeer lage groeisnelheid en/of zeer hoge biomassa-concentratie. Stel dat het denitrificerende organisme *Paracoccus denitrificans* is. Bij voldoende hoge groeisnelheid is de yield met nitraat ongeveer 0.24 g biomassa per g CZV. Het restant, 0.7 g CZV wordt geoxideerd met nitraat. De CZV/N is dan 4.1 mgCZV/mg NO_3^- -N.

Ter vergelijking, voor de stikstofeliminatie-route via nitriet wordt minimaal 3 C-mol acetaat geoxideerd per 4 mol NO_2^- gereduceerd. De (theoretische) minimale CZV/N-verhouding is dus 1.714 mgCZV/mg NO_2^- -N. Nemen we dezelfde yield aan voor *Paracoccus denitrificans*, 0.24 g biomassa per g CZV, dan wordt de CZV/N-verhouding 2.4 mgCZV/mg NO_2^- -N.

Ook de simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie door *Thiosphaera pantotropha* verloopt (intra-cellulair) via nitriet. Echter, het berekenen van een minimale (CZV/N)-verhouding is niet relevant, omdat onder optimale condities slecht 30% van de aanwezige stikstof wordt geëlimineerd, de rest wordt geassimileerd. Dit levert onder optimale condities (Hfdst. 1) een CZV/N op van 31 C-mol acetaat per mol N geëlimineerd, oftewel 71 mg-CZV/mg-N.

Als tijdens het stikstof-eliminatieproces een deel van de anoxisch gedoseerde hoeveelheid CZV naar de aërobe fase wordt getransporteerd en daar wordt geoxideerd, zal dit de CZV/N doen toenemen. Dit transport van CZV van anoxische naar aërobe fase, 'het doorslaan van CZV', kan het gevolg zijn van over-dosering of van het aanwezig zijn van reservestoffen zoals PHB of glycogeen in het slib. Als bij volledige stikstof-eliminatie 20% van de gedoseerde hoeveelheid CZV aëroob wordt geoxideerd, dan zal de CZV/N niet 4.1

zijn maar 4.9 mgCZV/mgNO₃-N. Voor de route via nitriet zal de CZV/N dan niet 2.4 zijn maar 2.9 mgCZV/mgNO₂-N.

Er zijn duidelijke aanwijzingen dat de vorming en consumptie van reservestoffen een belangrijke rol speelt in actief slib-installaties (Kountz & Forney (1959), Speece (1973), Takii (1977a, 1977b), Daigger (1982), Wilderer (1986)). In veel processen wordt de CZV puls-gewijs/propstroom-gewijs toegevoegd in de anoxische fase. Hierdoor kunnen opslag-processen worden gestimuleerd (Alleman (1980), Shao (1989), Oles (1991)). Dit leidt tot een tragere denitrificatie snelheid op het opgeslagen substraat (Dorn (1987)) en gedeeltelijke doorslag en oxidatie van substraat in aërobe periodes. Dit leidt tot extra zuurstofconsumptie en slibproductie. Onder optimale condities is een CZV/N verhouding van 2.9 mgCZV/mgNO₃-N mogelijk, in de praktijk wordt echter vaak een noodzakelijke verhouding van 4-5 aangehouden (zie het rekenvoorbeeld in Hfdst. 4; mede gebaseerd op gegevens van Wiesmann (1994)). In de literatuur komen soms nog veel ongunstigere CZV/N-verhoudingen voor, bijvoorbeeld bij Shao en Jenkins, 6,0-6,7 mgCZV/mgNO₃-N (Shao (1989)). De directe oorzaak van hoge CZV/N ratio's is overigens niet eenduidig in de literatuur terug te vinden.

Bij continue dosering van CZV tijdens de denitrificatie blijft de substraat-concentratie laag. Men zou verwachten dat onder deze condities geen reservestofvorming plaatsvindt en dat het substraat direct geoxideerd wordt. Helaas gaat het optreden van voortdurend lage substraat-concentraties vaak gepaard met het ontstaan van licht slib (Wanner (1987), Shao (1989), Casey (1992, 1993)).

Het mengpatroon in een afvalwaterzuiveringsreactor (en het lokaal of incidenteel voorkomen van hoge substraat-concentraties) kan grote invloed hebben op de vorming van reservestoffen. In compleet gemengde reactoren zal er de minste aanleiding tot de vorming van reservestoffen zijn. In reactoren met substraatgradienten (bv. propstroomreactoren) zal het slib vaak substraat opslaan als reservestof. Ook een niet constante substraat-aanvoer zal leiden tot reservestof-vorming. Het belang van reservestof-vorming in relatie tot denitrificatie ligt in de volgende overwegingen:

- Verbruik van (toegevoegd) CZV dient bij voorkeur plaats te vinden in de anoxische fase. De vorming van reserve-stoffen in de anoxische (contact-)periode kan ongunstig zijn, omdat er kans is op transport van (intern opgeslagen) CZV naar de aërobe fase. Netto resultaat van dit transport van CZV naar de aërobe fase is dus dat er minder nitraat en/of nitriet wordt omgezet in de anoxische fase per eenheid CZV (hogere CZV/N-verhouding). Een ander nadeel is dat denitrificatie op reservestoffen trager verloopt.
- De vorming en vervolgens afbraak van reserve-stoffen tijdens een afvalwater-zuiveringsproces kan ook een gunstig effect hebben op de slibproductie. Stel dat CZV niet rechtstreeks door het organisme wordt gebruikt voor de produktie van nieuwe biomassa, maar voor de produktie van een intracellulaire reservestof. Bij de vorming van deze reservestof door het organisme worden energie-equivalenten geïnvesteerd. Thermodynamisch gezien kunnen niet alle energie-equivalenten die besloten zitten in de reserve-stof teruggewonnen worden door het organisme. Netto resultaat is dat er minder energie beschikbaar is voor de produktie van nieuwe biomassa. Dit betekend een lagere groeiopbrengst en dientengevolge lagere CZV-behoefte voor denitrificatie.

Het totale effect van reservestof-metabolisme op de (CZV/N)-verhouding is door deze tegengestelde effecten niet direct voorspelbaar. Gezien de discrepantie tussen de (CZV/N)-ratio's uit de afvalwaterzuiveringspraktijk (5-7) en de (CZV/N)-ratio's op basis van reinculture-gegevens (3-4) lijkt er een rol voor reservestoffen en doorslag te zijn weggelegd. Ten einde het belang hiervan vast te stellen zullen in dit hoofdstuk denitrificatie-experimenten worden besproken waarin substraat pulsgewijs (veel reservestofvorming) of continu (weinig reservestofvorming) wordt toegevoegd.

5.2 Beïnvloeding van de CZV/N-verhouding in een open denitrificerende mengpopulatie door het voedingsregime

In deze studie wordt het effect van twee verschillende CZV-doserings-regimes bestudeerd middels twee systemen die uitsluitend verschillen in de manier waarop CZV wordt gedoseerd.

Er is gewerkt met sequencing batch reactoren (SBR) die middels een anoxische/aërobe cyclus werden bedreven. Aangezien de aandacht alleen gevestigd was op denitrificatie werd het nitraat aan het medium toegevoegd. In het ene systeem werd het CZV (in de vorm van acetaat) als een puls aan het begin van de anoxische fase ingebracht (omstandigheden vergelijkbaar met een **propstroom-reactor**).

In het andere systeem werd acetaat gedurende de gehele anoxische periode toegevoerd. Dit verschil in dosering leidt ertoe dat in het eerste geval het acetaat voornamelijk bij een hoge concentratie wordt opgenomen, terwijl in het tweede geval acetaat nooit meetbaar aanwezig is in het systeem (vergelijkbaar met een **compleet gemengde reactor**).

De hypothese is dat een hoge CZV-concentratie aan het begin van de anoxische fase aanleiding geeft tot reservestofvorming. Een lage CZV-concentratie tijdens de gehele anoxische fase zal dit niet doen maar kan aanleiding geven tot licht slib (Shao & Jenkins (1989)). Door het meten van de reservestof-concentratie van het slib en de omgezette hoeveelheid nitraat tijdens het proces kan worden bepaald welk effect dit heeft op de (CZV/N)-verhouding.

MATERIALEN EN METHODEN

Gebruik wordt gemaakt van twee identieke anoxisch/aëroob sequencing batch reactoren. De voeding vindt plaats a) pulsgewijs aan het begin van de anoxische periode (SBR-puls), of b) geleidelijk gedurende de gehele anoxische periode (SBR-continu). De cyclusduur bedroeg 4 uur, de duur van de anoxische periode bedroeg 120 min, de duur van de aërobe periode bedroeg 120 min. Afgetapte volume was 1 l, het totale volume 2 l.

De opbouw van de 4 uren cyclus van de continu-gevoedde SBR was als volgt:

0	-	10 min.	mengen bezonken slib
10	-	20 min.	influent erbij
20	-	120 min.	anoxisch fase + acetaat-dosering
120	-	209 min.	aërobe fase
209	-	210 min.	spuislib aftappen
210	-	225 min.	"sedimentatie"
225	-	240 min.	effluent aftappen

De opbouw van de 4 uren cyclus van de puls-gevoedde SBR:

0	-	10 min.	mengen bezonken slib
10	-	20 min.	influent erbij + acetaat-dosering
20	-	120 min.	anoxisch fase
120	-	209 min.	aërobe fase
209	-	210 min.	spuislib aftappen
210	-	225 min.	"sedimentatie"
225	-	240 min.	effluent aftappen

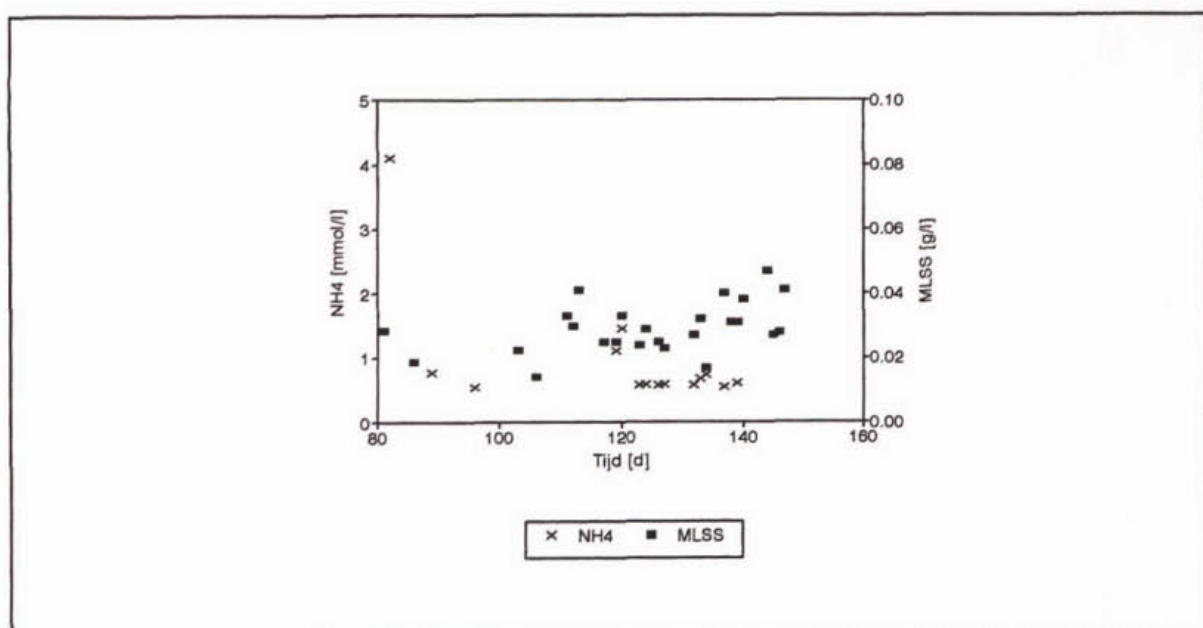
Het systeem wordt 90 min. belucht in de 240 min. cyclus. Het totale volume is 2,0 l, het afgetapte volume is 1,0 l. De hydraulische verblijftijd is 8 uur, de verdunningssnelheid D is 0.125 h^{-1} .

Er wordt gebruik gemaakt van slib (open mengpopulatie). De slibleeftijd wordt ingesteld op 8 dagen d.m.v. een slib-afvoerpomp die aan het einde van de aërobe fase een hoeveelheid slib aftapt (namelijk 2 liter in 8 dagen). De aërobe slibleeftijd is 3 dagen. De pH is 7,0 en de temperatuur is 20°C . Er wordt gebruik gemaakt van een kunstmatig afvalwater met acetaatconcentratie 400 [CZV-mg/l] (12,5 [C-mM]), ammoniumconcentratie 21 [N-mg/l] (1,5 [mM]) en nitraatconcentratie 112 [N-mg/l] (8 [mM]).

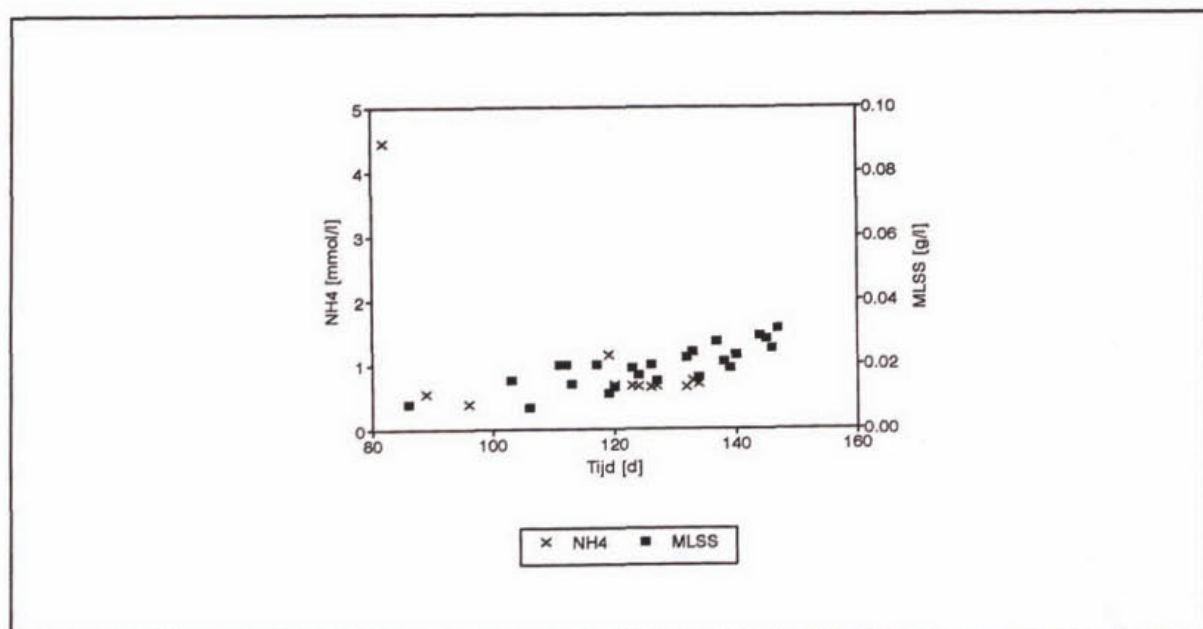
Gemeten wordt de TOC (total organic carbon = total carbon - inorganic carbon) in slibsuspensies, supernatant (heldere vloeistof na centrifugatie) en media. Gemeten wordt de nitriet/nitraat/ammonium-concentratie in supernatant en media. On line wordt gemeten de CO_2 concentratie in ingaande en uitgaande gasstroom en de opgeloste zuurstofconcentratie in de reactor. Respiratiesnelheden worden mbv. een BOM (biological oxygen monitor) en mbv. DO-elektrodes in de reactoren gemeten. De MLSS, VSS en PHB-concentratie van de biomassa wordt dagelijks gemeten. De elementaire samenstelling van de biomassa wordt twee-wekelijks bepaald. Redoxpotentiaal wordt mbv. ORP-elektrodes in de reactoren gemeten. De slibvolume-index (SVI) wordt dagelijks bepaald volgens NEN 6624 (NNI (1982)).

RESULTATEN EN DISCUSSIE

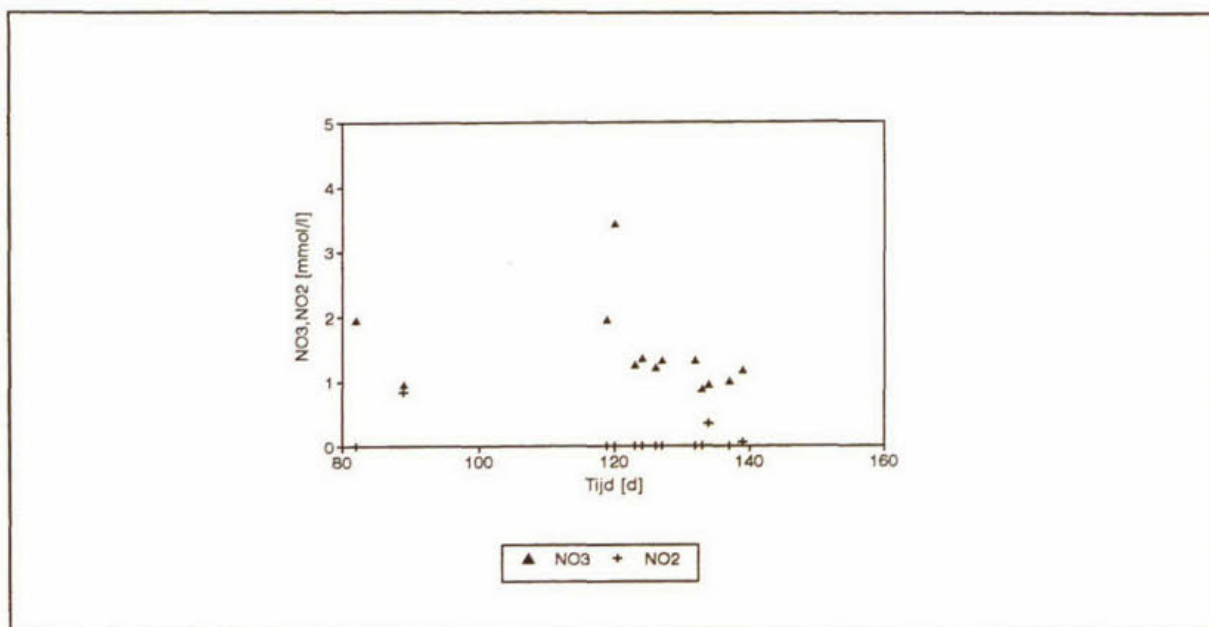
In de figuren 27 t/m 30 zijn de effluent-concentraties van ammonium, nitraat, nitriet en biomassa (MLSS) weergegeven als functie van de tijd. Er is sprake van een zekere variatie in de gemeten concentraties. Een deel van de variatie is het gevolg van verstoringen ten gevolge van monsternamen. Ook calamiteiten zoals overstromingen, uitvallen van pH-regeling en het leegmaken van het medium-vat hebben een langdurig effect op de variatie in de meetresultaten.



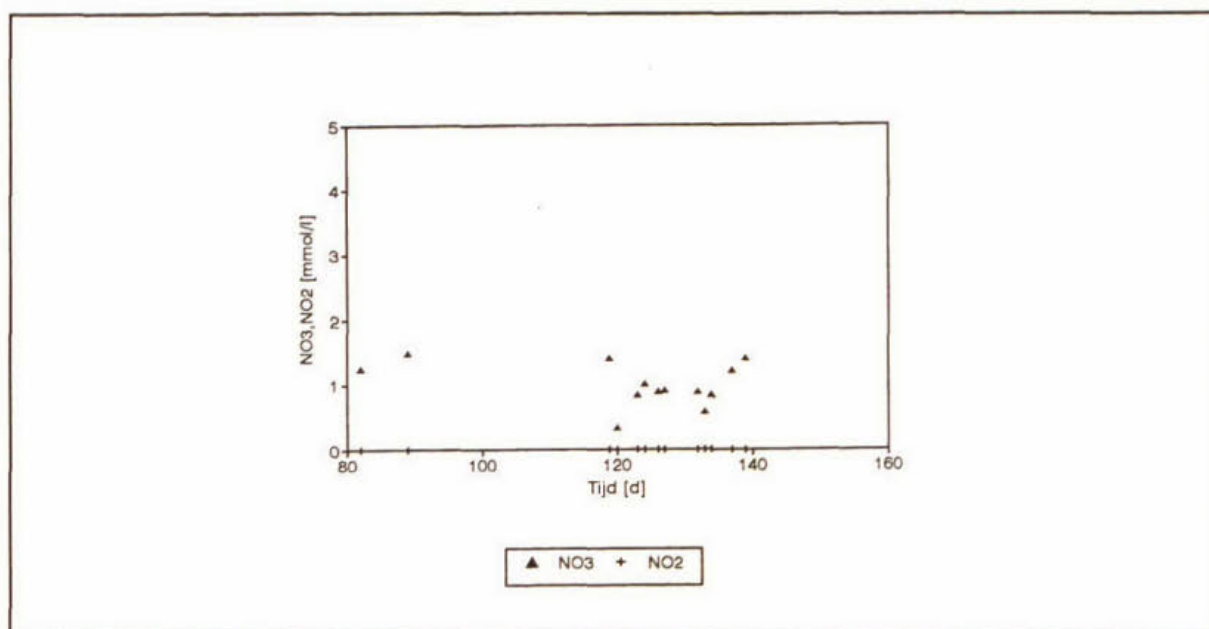
Figuur 27 Concentratie van ammonium en biomassa in het effluent van SBR-continu als functie van de tijd.



Figuur 28 Concentratie van ammonium en biomassa in het effluent van SBR-puls als functie van de tijd.



Figuur 29 Concentratie van nitraat en nitriet in het effluent van SBR-continu als functie van de tijd.

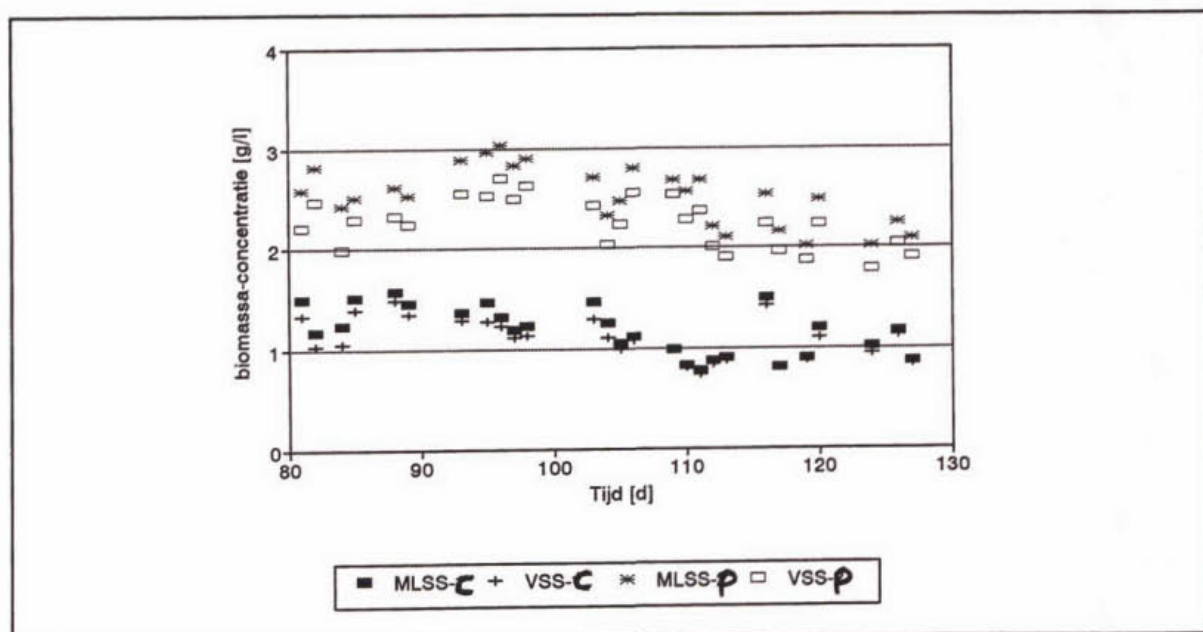


Figuur 30 Concentratie van nitraat en nitriet in het effluent van SBR-puls als functie van de tijd.

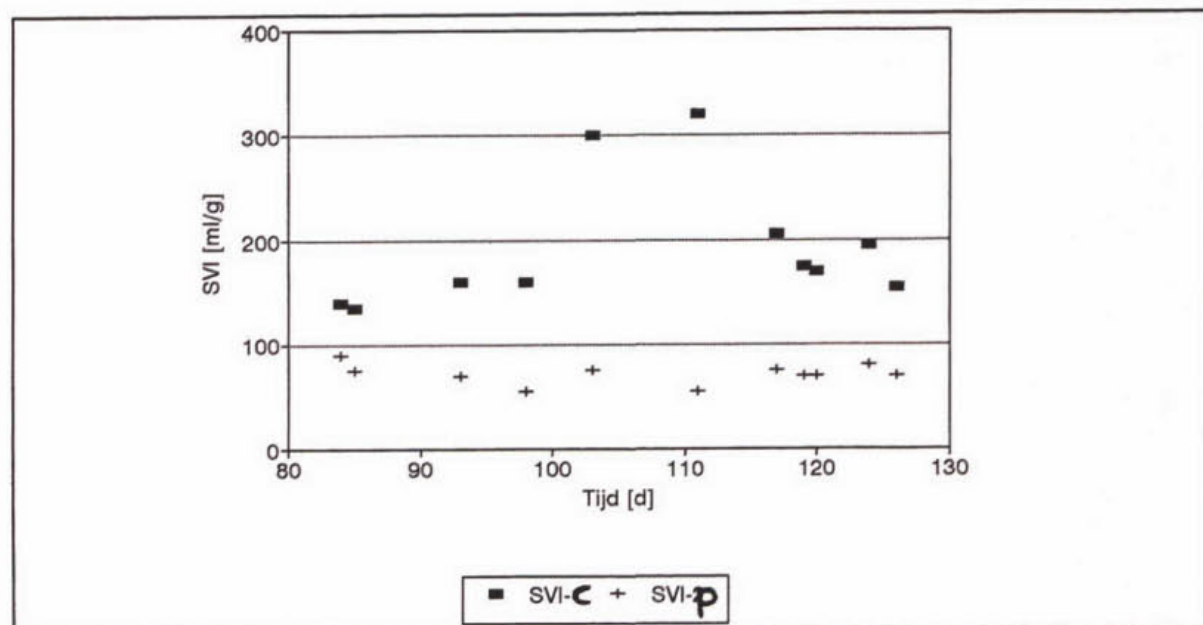
In de figuren 31 en 32 is te zien dat een deel van de biomassa de reactor verlaat als 'suspended solids' via het effluent. De slijbleeftijd is dus lager dan de ingestelde 8 dagen. Door een verschil in slijbeigenschappen vindt er een verschillende uitspoeling plaats. Dit leidt tot een effectieve slijbverblijftijd (SRT) van 4,8 dagen in de continu gevoedde SBR en 6,7 dagen in de puls-gevoedde SBR (zie tabel 12).

De molmassa van het slib is in beide systemen $25,15 \pm 0,05$ [g VSS/C-mol], de fractie stikstof in de biomassa $(N/C)_{bio}$ is 0.21 [N-mol/C-mol] en de gemiddelde reductiegraad γ_x is 4.18.

Er treed een drastisch verschil op tussen de biomassa-concentraties in de twee systemen. De biomassa-concentratie in de continu gevoedde reactor is 1.1 [g VSS/l], tegen 2.2 [g/l] in de puls-gevoedde reactor.



Figuur 31 Biomassa-concentratie in SBR-continuu en SBR-puls als functie van de tijd.

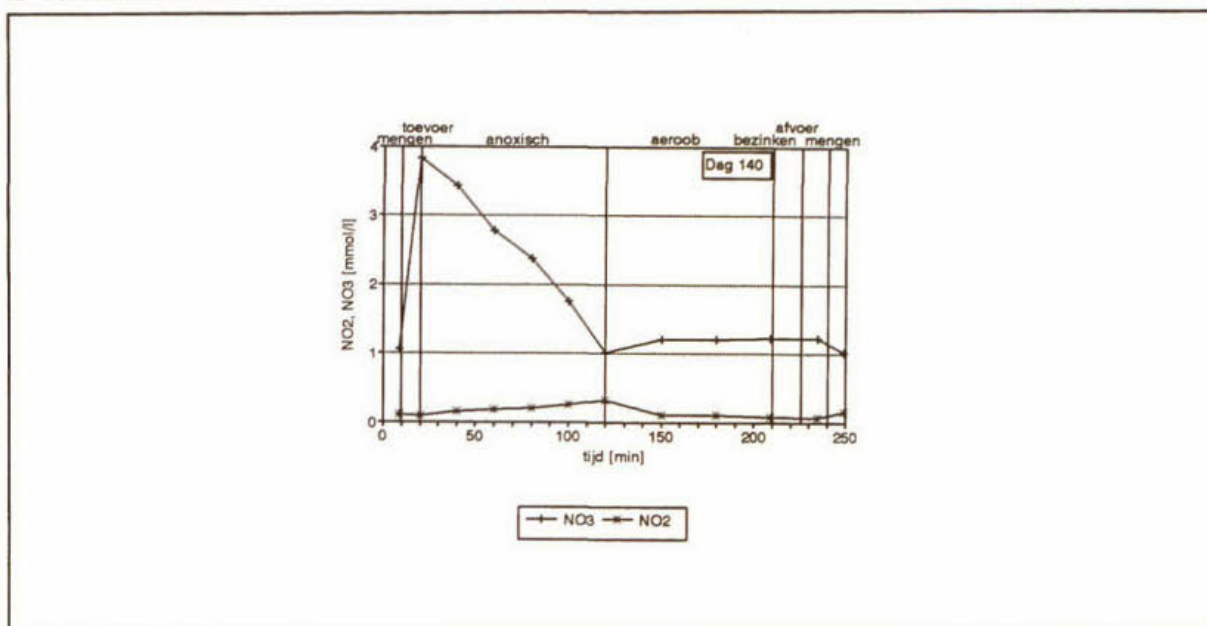


Figuur 32 Slibvolume-index (SVI) in SBR-continuu en SBR-puls als functie van de tijd.

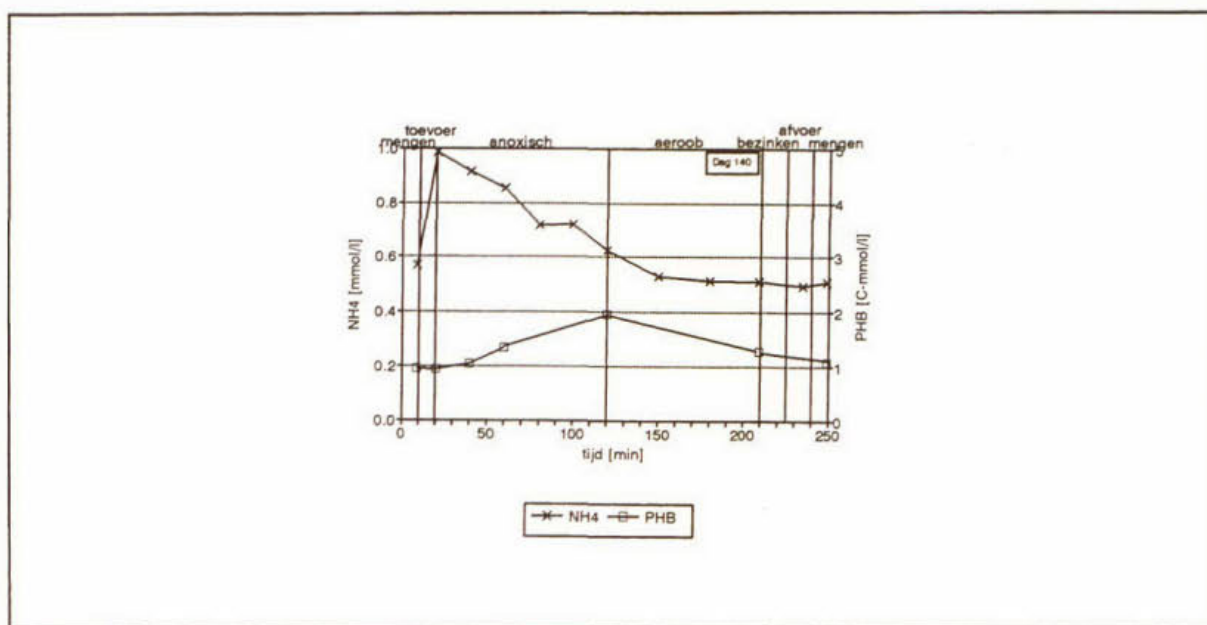
In figuur 32 is een duidelijk verschil te zien tussen de SVI's van de continu gevoedde reactor en van de puls-gevoedde reactor. Dit verschil in de gemiddelde slibvolume-index, 204 ml/g tegen 69 ml/g, is in lijn met de voortdurend zeer lage acetaat-concentratie in de

continu gevoedde SBR. Een slib met slibvolume-index hoger dan 150 ml/g wordt beschouwd als licht slib. De verwachte filamenteuze organismen in het slib bleven echter uit. Qua morfologie lijkt het slib uit de continu gevoedde SBR veel op dat van de puls gevoedde SBR. Afwijkend is de aanwezigheid van bloemkool-achtige vergroeiingen op de slib-vlokken van de continu gevoedde SBR, deze zijn geheel afwezig bij de puls gevoedde SBR. Dit duidt op de aanwezigheid van *Zoogloea*-achtige organismen (Handleiding voor microscopisch slibonderzoek, STORA, 1979).

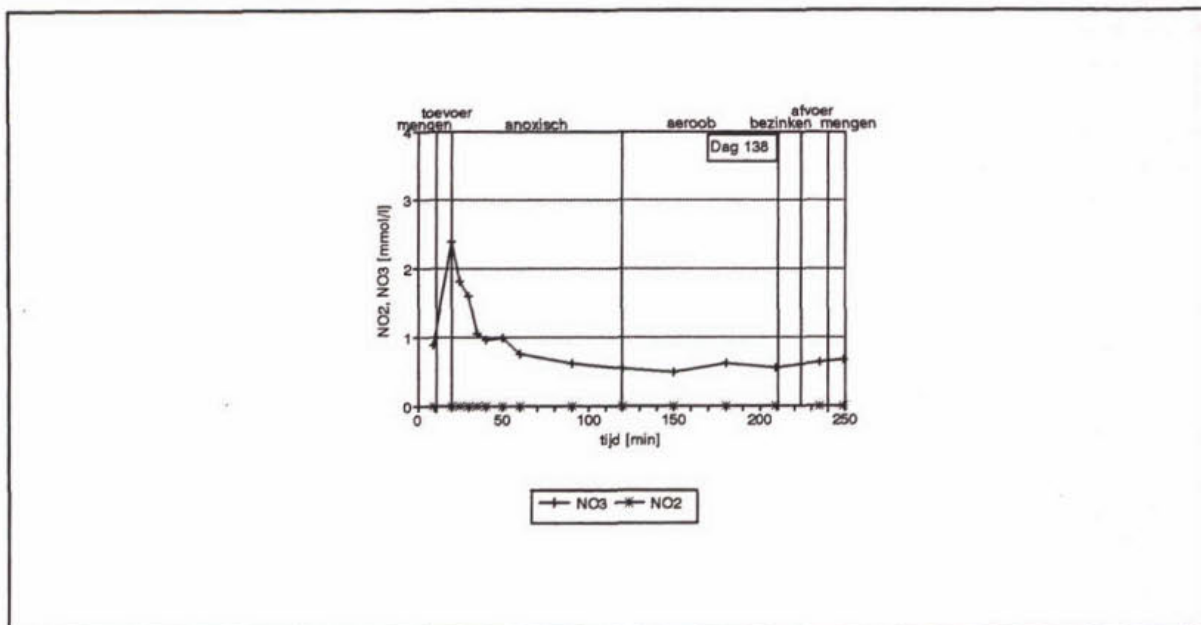
In het effluent van de continu gevoedde reactor is nitriet aantoonbaar, gemiddeld 0,24 [mmol/dag] (0,56 mgN/l). De gemiddelde nitriet-productie door de puls-gevoedde reactor is verwaarloosbaar.



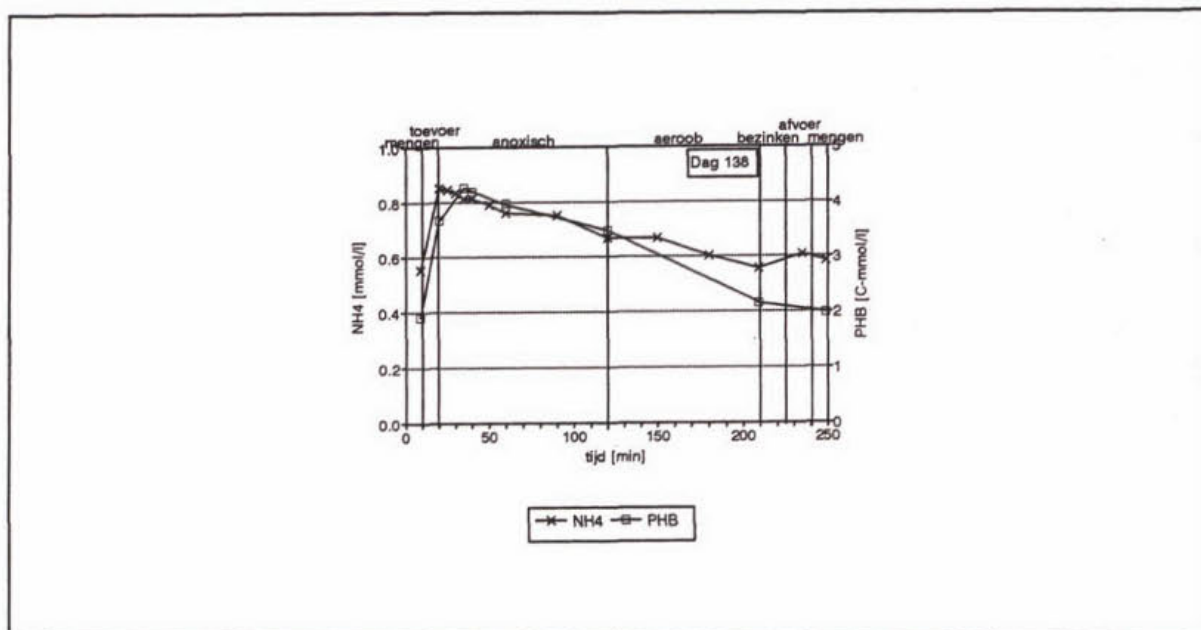
Figuur 33 Concentraties van nitraat en nitriet in SBR-continuu tijdens een cyclus.



Figuur 34 Concentraties van ammonium en PHB in SBR-continuu tijdens een cyclus.



Figuur 35 Concentraties van nitraat en nitriet in SBR-puls tijdens een cyclus.



Figuur 36 Concentraties van ammonium en PHB in SBR-puls tijdens een cyclus.

In de figuren 33 t/m 36 zijn twee voorbeelden gegeven van cyclus-metingen. De beginconcentraties van de gemeten cyclus komen overeen met de beginconcentraties van de volgende cyclus (meting op tijdstip 249 min. = 9 min. in de volgende cyclus) hetgeen wijst op het in een stabiele situatie bevinden van de proces. Wat opvalt zijn de verschillen tussen de PHB-profielen in de continu gevoedde reactor en de puls-gevoedde reactor.

Continu gevoedde SBR

In figuur 33 is te zien hoe tijdens de anaërobe periode ten gevolge van het doseren van acetaat (6,25 [C-mM] acetaat in 100 min) de nitraatconcentratie met een constante snelheid daalt (met 3 [mM] nitraat in 100 min). Dit gaat gepaard met groei (te detecteren uit de ammonium-assimilatie, figuur 34) en met PHB-vorming. De PHB-concentratie in de reactor neemt tijdens de anaërobe fase met een constante snelheid toe, hoewel er geen sprake is van enige limitatie. Alle nutrienten zijn in voldoende mate aanwezig. Er wordt geen PHB in de anaërobe fase geoxideerd. Tijdens de aërobe fase neemt de PHB-concentratie weer af.

Puls-gevoedde SBR

In figuur 35 is te zien hoe tijdens de anoxische periode ten gevolge van plotseling toedienen van acetaat (6,25 [C-mM] acetaat tussen tijdstip 10 en 20 min.) de nitraatconcentratie snel afneemt. Dit gaat gepaard met snelle toename van de PHB-concentratie. Nadat de acetaat is verbruikt daalt de PHB-concentratie en daalt ook de nitraat-opnamesnelheid. In tegenstelling tot de continu-gevoedde SBR wordt een gedeelte van de gevormde PHB al in de anoxische fase geoxideerd. Ammonium-assimilatie (en biomassa-vorming) vinden zowel in de anoxische als in de aërobe fase plaats.

Het is mogelijk op sluitende balansen op te stellen over het gehele zuiveringsproces, zowel voor de continu gevoedde reactor als voor de puls-gevoedde reactor. De koolstof-balans sluit met een gemiddelde afwijking van minder dan 5%, de reductiegraad-balans sluit met een gemiddelde afwijking van minder dan 10% (betrokken op het aantal elektronen). Echter, wanneer geprobeerd wordt om mbv. de resultaten van de cyclus-metingen balansen over de anoxische of over de aërobe periodes op te stellen, blijkt dat tot grotere afwijkingen te leiden. Met name de koolstof- en reductiegraad-balansen over de aërobe periode van de continu gevoedde reactor zijn niet sluitend te krijgen, een gemiddelde afwijking van meer dan 20%.

In tabel 12 staat een overzicht van de gemiddelde karakteristieken voor beide systemen, van de periode van dag 86 tot dag 148.

Tabel 12 Overzicht verschillen tussen SBR-c en SBR-p

		Continu gevoedde SBR	Puls-gevoedde SBR
<u>Slibeigenschappen:</u>			
slibleeftijd	[dag]	4.8 ± 0.6	6.7 ± 0.4
SVI	[ml/g]	204 ± 62	69 ± 9
SS-effluent	[mg/l]	29 ± 8	19 ± 6
MLSS	[g/l]	1.1 ± 0.2	2.5 ± 0.3
VSS	[g/l]	1.1 ± 0.2	2.2 ± 0.3
gloeirest	[%]	94.1	89.7
<u>C-balans:</u>			
slib-productie	[C-mmol/dag]	8.6	13.2
acetaat-consumptie	[C-mmol/dag]	75.0	75.0
CO ₂ -productie	[C-mmol/dag]	66.6 ± 4.8	61 ± 17
CO ₂ -prod.(anaëroob)	[C-mmol/dag]	52.2 ± 3.0	57.6 ± 4.2
CO ₂ -prod.(aëroob)	[C-mmol/dag]	14.4 ± 5.4	7.2 ± 4.2
<u>PHB:</u>			
PHB (t=1)	[C-mM]	0.8 ± 0.1	2.1 ± 0.6
PHB (t=120)	[C-mM]	1.6 ± 0.1	3.3 ± 0.8
PHB (t=210)	[C-mM]	1.2 ± 0.1	2.6 ± 0.8
<u>Electronenacceptors:</u>			
NO ₃ ⁻ -consumptie	[mmol/dag]	40.8 ± 1.2	42.6 ± 1.8
NO ₂ ⁻ -productie	[mmol/dag]	0.24 ± 0.66	0.00 ± 0.06
O ₂ -consumptie ¹	[mmol/dag]	11 ± 10	8.4 ± 1.3
(CZV/N)-verhouding	[mgCZV/mgN]	4.21	4.02

¹ De zuurstofconsumptie-gegevens zijn berekend uit de resultaten van respiratie-metingen.

Het is mogelijk op sluitende koolstofbalansen op te stellen over beide reactoren, wat geïllustreerd kan worden met het feit dat de mbv. de koolstofbalans berekende yields overeen komen met de yields berekend uit de totaal geproduceerde hoeveelheid biomassa (zie tabel 13). SBR Continu is de continu gevoedde reactor, SBR Puls is de puls-gevoedde reactor.

Tabel 13 Biomassa yield in continu en puls-gevoedde SBR.

SBR	Acetaat IN	CO ₂ UIT	Biomassa (via balans)	Yield (via balans)	Yield (via slib- productie)	Biomassa (via slib- productie)	CZV/N ratio
	[C-mmol dag ⁻¹]	[C-mmol dag ⁻¹]	[C-mmol dag ⁻¹]	[C-mol C-mol ⁻¹]	[C-mol C-mol ⁻¹]	[C-mmol dag ⁻¹]	[mgCZV mgN ⁻¹]
Continu	75.0	66.6	8.4	0.11	0.11	8.6	4.21
Puls	75.0	61.0	14.0	0.19	0.18	13.2	4.02

Het verschil in yield wordt niet veroorzaakt door het verschil in slibleeftijd, want het systeem met de hoogste slibleeftijd heeft de hoogste yield. Dit blijkt uit een vergelijking met de yields die door het IAWQ Model No. 1 berekend worden.

Tabel 14 Vergelijking van de yields met IAWQ Model No. 1

SBR	Slibleeftijd	Gemeten Yield	IAWQ Yield ²
	[dag]	[gVSS·gCZV ⁻¹]	[gVSS·gCZV ⁻¹]
Continu	4.8	0.086	0.169
Puls	6.7	0.149	0.130

² De in het IAWQ model gebruikte maximale yield is $Y_m = 0,67$ [gVSS-CZV/gCZV], de afsterf-factor $k_d = 0,62$ [dag⁻¹].

De gemeten yield in de puls reactor komt aardig overeen met de yield berekend met het IAWQ model. De yield in de continu reactor wijkt echter sterk af. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn de aanwezigheid van een gereduceerde reservestof in het slib van de continu reactor. Het slib werd getest op de aanwezigheid van glycogeen en op de overmatige aanwezigheid van lipide, maar geen van beide reservestoffen werd aangetroffen. Wel is de O₂-consumptie en de CO₂-productie tijdens de aërobe periode veel hoger in de continue reactor, wat op de aanwezigheid van een nog onbekende gereduceerde reservestof zou kunnen duiden.

Slechts een gedeeltelijke verklaring voor het feit dat de continu gevoedde SBR een lagere yield heeft dan de puls-gevoedde SBR kan de zeer lage acetaat-concentratie in de continu gevoedde reactor zijn. Bij beide systemen is er nooit acetaat waargenomen in de aërobe fase. Bij de continu gevoedde (SBR-1 = SBR-c) is er tevens nooit acetaat aangetoond in de anoxische voedingsfase. Voor opname van acetaat bij zeer lage concentratie is waarschijnlijk een transportmechanisme noodzakelijk dat meer energie nodig heeft dan het conventionele acetaat transportmechanisme dat bij hogere acetaatconcentratie actief is. Dit verschil (van maximaal 1 mol ATP extra per mol acetaat) is echter marginaal bij de hoeveelheid energie die de oxidatie van acetaat de cel oplevert (8 mol ATP per mol acetaat).

Bij de continu gevoedde reactor wordt 6,8 [mM] nitraat (minus nitriet) omgezet met 12.5 [C-mM] acetaat. De CZV/N-verhouding is 1,84 [C-mol/N-mol] oftewel 4,21 [mgCZV/mgN]. Bij de puls-gevoedde reactor wordt 7,10 [mM] nitraat omgezet met 12.50 [C-mM] acetaat. De CZV/N-verhouding is 1,76 [C-mol/N-mol] oftewel 4,02 [mgCZV/mgN]. Het theoretisch minimum (als er geen slib wordt geproduceerd) is 2,857 [mgCZV/mgN]. De gevonden CZV/N zijn veel lager dan die uit de afvalwater-zuiveringspraktijk. De reden is onbekend.

Er werd verwacht dat door continue dosering van de elektron-donor tijdens denitrificatie er geen, of minder PHB-vorming zou plaatsvinden. De CZV/N-verhouding zou dan lager (gunstiger) zijn. Echter, niet de continu gevoedde reactor, maar de puls-gevoedde reactor had een lagere (CZV/N)-verhouding. Dit klopt ook met de waarneming dat in de puls-gevoedde reactor er in de aërobe fase veel minder C-oxidatie optreedt.

De oorspronkelijke hypothese was dat reservestof-vorming wordt gestimuleerd door de wijze van voeding van elektronendonor. Puls-voeding zou moeten leiden tot meer reservestof-vorming dan continu-voeding. De resultaten duiden erop dat beide systemen aanleiding geven tot reservestof-vorming. Waarschijnlijk is het feit dat er een substraat-

loze periode is (géén voeding tijdens de aërobe periode) veel meer bepalend voor selectie van microorganismen die reservestoffen maken.

De hypothese dat lage substraat-concentraties tot licht slib leiden bleek correct. De slechte slibvolume-index (hoger dan 150 ml/g) werd veroorzaakt door *Zoogloea*-achtige organismen, die karakteristiek zijn voor licht slib in hoogbelaste systemen (STORA, 1979). De belasting van de reactor is inderdaad hoog (0,5 tot 1,1 gCZV/g actieve biomassa /dag). Hierbij moet aangetekend worden dat normaal zuiveringsslib voor een groot deel uit inert materiaal bestaat. Dit leidt ertoe dat dus de actieve biomassa-concentratie lager is en de CZV-belasting per hoeveelheid actieve biomassa hoger wordt.

CONCLUSIES

In beide systemen vindt PHB-productie en -consumptie plaats. De reden is niet de aanwezigheid van puls- of continu-voeding tijdens de anoxische periode, maar juist de afwezigheid van voeding tijdens de aërobe periode die waarschijnlijk selecteert op organismen die reservestoffen ophopen.

De PHB-profielen in de continu reactor en in de puls reactor zijn sterk verschillend.

In de continue reactor is sprake van een zeer lage yield, die duidelijk afwijkt van het IAWQ model. Een relatief groot deel van de aanwezige CZV wordt aëroob geoxideerd met zuurstof, i.p.v. anoxisch met nitraat. Dit leidt tot een hogere (CZV/N)-verhouding. In de puls reactor is er sprake van een normale yield en een lagere O_2 -consumptie. De (CZV/N)-verhouding is dus lager.

Een mogelijke verklaring voor de lage yield in de continue reactor is wellicht de hogere energie-behoefte voor acetaat-assimilatie bij zeer lage acetaat-concentraties. Onverklaard is de hoge O_2 -consumptie in de continue reactor.

De gevonden (CZV/N)-verhoudingen zijn beduidend lager dan de waarden uit de literatuur voor mengcultures. Er is in de praktijk dus ruimte voor verbetering.

6.1 Inleiding

In het voorgaande hoofdstuk is gebleken dat reservestofvorming een belangrijke rol kan spelen bij afvalwaterzuiveringsprocessen. Met name in systemen waarbij de micro-organismen op cyclische wijze het substraat (puls of continu) krijgen toegediend. Niettemin is er weinig bekend over de factoren die een rol spelen bij de vorming en consumptie van reservestoffen in afvalwaterzuiveringssystemen. In de gebruikelijke actief slib modellen voor CZV en N-eliminatie wordt de produktie en consumptie van reservestoffen verwaarloosd. In reiculture-experimenten wordt gewoonlijk alleen naar reservestof-ophoping gekeken onder groeigelimiteerde condities. Groei op reservestoffen, of vorming daarvan, tijdens niet-gelimiteerde condities (zoals in pulsgevoedde afvalwaterzuiveringsprocessen) wordt niet of nauwelijks bestudeerd. Het gevolg is dat er geen kinetische expressie bekend is die de opslag of consumptie van reservestoffen adequaat beschrijft. In dit hoofdstuk wordt een studie naar de vorming en consumptie van PHB beschreven.

PHB (poly- β -hydroxyboterzuur) is een universeel voorkomende microbiële reservestof, een in de cel opgeslagen polymeer dat kan dienen als koolstof- en energiebron (Doi (1990)). Sommige bacteriën zijn in staat om bij overmaat substraat grote hoeveelheden PHB op te hopen (tot 50% van het celgewicht). Wanneer het externe substraat is uitgeput kunnen de organismen vervolgens het intern opgeslagen PHB voor groei en energievoorziening gebruiken. Het is waarschijnlijk dat PHB de belangrijkste reservestof is in afvalwaterzuiveringsprocessen waarbij het slib voornamelijk de lagere vetzuren gebruikt als koolstof- en energie-bron. Een voorbeeld van een proces waarin PHB een belangrijke rol speelt is het fosfaat-verwijderingsproces (Smolders, 1995). Kennis over de vorming en consumptie van PHB kan zeer relevant zijn voor het begrijpen van afvalwater-zuiveringsprocessen.

Om tot een adequate biokinetische beschrijving te komen van PHB-produktie en -consumptie worden er reiculture-experimenten uitgevoerd. De verkregen inzichten moeten worden getoetst en geverifieerd in een open mengpopulatie voor nitrificatie/denitrificatie. Uiteindelijk zullen de verwachtingen aangaande optimale CZV/N-verhouding in andere actief slib systemen getest moeten worden.

Een reiculture van een bacterie met hoge PHB-ophopingscapaciteit is een geschikt systeem om reservestof-vorming en -consumptie onder niet-gelimiteerde condities in detail te kunnen onderzoeken. Om onder goed gedefinieerde (begin)condities te kunnen meten wordt gebruik gemaakt van steady state, koolstof-gelimiteerde chemostaat-cultures. Aan deze systemen wordt een verstoring aangebracht in de vorm van het pulsgewijs toedienen van een overmaat van het groei-limiterende substraat (van Niel *et al* (1991), Pagni (1992)). Tevens wordt op hetzelfde moment de reguliere mediumtoeloop en afvoer stopgezet, zodat er een batch-systeem ontstaat. Alle componenten noodzakelijk voor groei zijn tijdens het puls-experiment in voldoende mate aanwezig. Er is geen sprake van stikstof-, fosfaat- of zuurstof-limitatie, in tegenstelling tot de gebruikelijke condities bij industriële PHB-vormingsprocessen (Doi (1990), Anderson & Dawes (1990)).

6.2 Effect van groeisnelheid op de kinetiek van reservestof-vorming en -consumptie in *Thiosphaera pantotropha*

MATERIALEN EN METHODEN

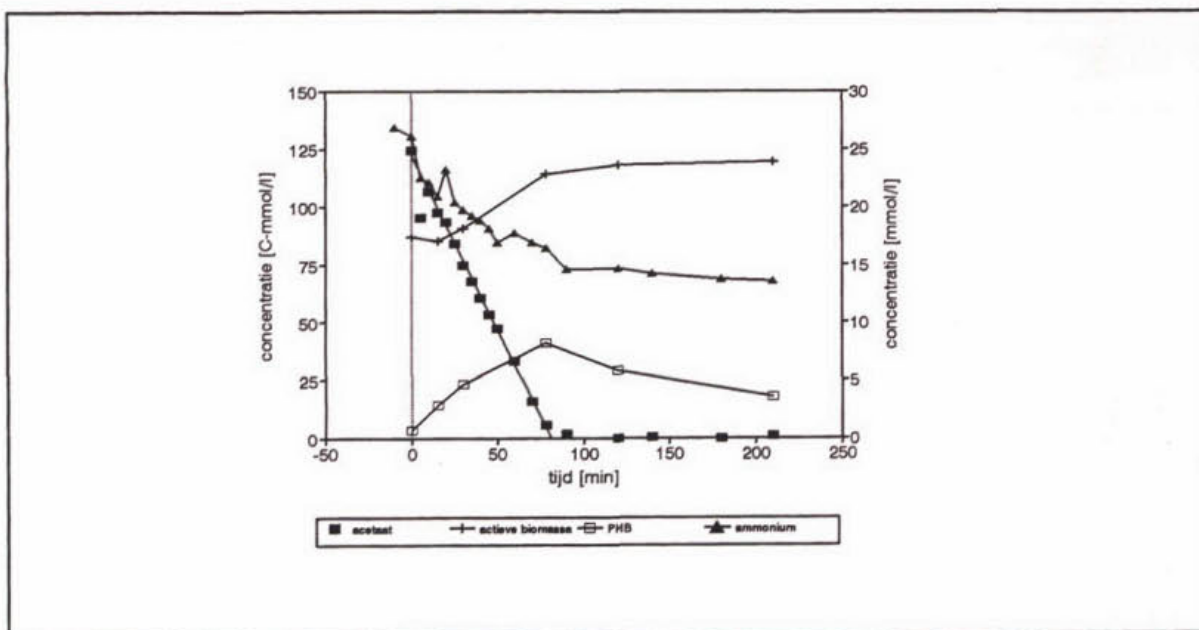
Er wordt gebruik gemaakt van acetaat-gelimiteerde continue cultures van het organisme *Thiosphaera pantotropha* GB17, de pH is 7,0, de temperatuur is 37 °C. Het gebruikte minerale medium heeft de volgende samenstelling: de substraatconcentratie van het medium is 160 [C-mM] acetaat, ammonium-, fosfaat- en sporen-ionen zijn in overmaat aanwezig. Op tijdstip $t = 0$ wordt de continu toeloop gestopt en het batch substraat toegevoegd. De maximale concentratie in de reactor na het toedienen van de substraatpuls is 40 [C-mM].

Gemeten wordt TOC (total organic carbon = total carbon - inorganic carbon) in celsuspensies, supernatant en media. Gemeten wordt nitriet/nitraat/ammonium in supernatant en media. On line wordt de zuurstofconcentratie in ingaande en uitgaande gasstroom en de opgeloste zuurstofconcentratie in de reactor gemeten. Respiratiesnelheden worden mbv. BOM (biological oxygen monitor) en mbv. DO-elektrode in de reactor gemeten. De PHB-concentratie en de elementaire samenstelling van de biomassa wordt gemeten.

Er is getracht de invloed te bepalen van de voorgaande groeisnelheid op het PHB-metabolisme, dmv. het meten van PHB-vorming en vervolgens PHB-consumptie door biomassa gegroeid met verschillende groeisnelheden. Er zijn duplo experimenten uitgevoerd bij de volgende groeisnelheden, $\mu = 0,05 / 0,10 / 0,20$ en $0,30 \text{ [h}^{-1}\text{]}$. De biomassa heeft in steady state de volgende experimenteel vastgestelde gemiddelde samenstelling $\text{CH}_{1,77}\text{N}_{0,24}\text{O}_{0,44}$. Het gemiddelde gehalte aan PHB in steady state is 3% van het drooggewicht. De hoeveelheid actieve biomassa in de reactor wordt berekend door de totale hoeveelheid biomassa te verminderen met de hoeveelheid PHB in de reactor. De totale hoeveelheid biomassa wordt bepaald met TOC, de hoeveelheid PHB in de reactor wordt berekend m.b.v. het PHB-gehalte van de totale biomassa.

RESULTATEN

Een voorbeeld van een puls-experiment is weergegeven in figuur 37. Uitgezet zijn de concentraties van ammonium, PHB, actieve biomassa en substraat in de reactor. Na het toedienen van de acetaat-puls op het tijdstip $t=0$ [min] vindt onmiddellijk acetaat-consumptie plaats. Dit gaat gepaard met groei (toename in de biomassa-concentratie, ammonium-assimilatie) en PHB-vorming. Wanneer de acetaat-concentratie voldoende laag is (gemiddeld lager dan 4 [C-mmol]) begint PHB-consumptie. Bij het experiment in figuur 37 is dat na 78 minuten. De groei (toename in de actieve biomassa-concentratie, ammonium-assimilatie) tijdens de PHB-consumptie-fase is minder snel dan bij de PHB-produktie-fase.



Figuur 37 PHB-productie, gevolgd door PHB-consumptie door *Thiosphaera pantotropha* LMD 94.21 t.g.v. acetaatpuls.

In tabel 14 is voor 11 experimenten de totale omzettingen aan acetaat en ammonium in de reactor tijdens de PHB-productiefase weergegeven. In tabel 14 is voor 11 experimenten de totale omzettingen aan acetaat en ammonium in de reactor tijdens de PHB-consumptiefase weergegeven. In tabel 14 is de term PHB de fractie van de gedoseerde hoeveelheid acetaat die als PHB wordt vastgelegd, de term Biomassa is de fractie van de gedoseerde hoeveelheid acetaat die als biomassa wordt vastgelegd. Ook is aangegeven hoe lang de PHB-productie-fase duurde en hoe lang er werd doorgegaan met de PHB-consumptie-fase. De groeisnelheid is de groeisnelheid in de voorgaande steady state. Voor elk experiment geldt dat de koolstof-balans en redox-balans kloppen. Deze balansen zijn opgesteld m.b.v. continue meting van O_2 -consumptie en CO_2 -productie in de gasfase.

Tabel 14 Omgezet tijdens PHB-productie-fase

Experiment	Groeisnelheid [1/h]	Tijds- duur [min]	Acetaat [C-mmol]	Ammonium [mmol]	PHB ¹ [%]	Biomassa ¹ [%]
9	0.05	94	121.65	13.15	18.2	35.5
10	0.05	78	118.79	9.75	31.7	22.8
11	0.05	85	117.96	9.14	24.5	20.3
12	0.05	84	124.17	9.96	29.0	25.8
14	0.05	107	118.46	15.29		
6	0.10	48	84.15	7.29	37.6	18.6
13	0.10	58	117.08	6.45	44.5	12.0
7	0.20	49	119.53	10.99	18.8	29.7
15	0.20	48	122.98	11.05	23.2	20.8
8	0.30	50	119.18	14.25	8.7	38.7
16	0.30	52	117.23	16.85	1.6	45.9

In tabel 15 is de term Biomassa de fractie van de maximaal aanwezige hoeveelheid PHB + de resterende hoeveelheid acetaat die als biomassa wordt vastgelegd.

Tabel 15 Omgezet tijdens PHB-consumptie-fase

Experiment	Groeisnelheid [1/h]	Tijds- duur [min]	Acetaat [C-mmol]	Ammonium [mmol]	PHB [C-mmol]	Biomassa ² [%]
9	0.05	86	1.50	1.33	13.73	32.9
10	0.05	132	5.54	2.85	23.39	18.8
11	0.05	95	3.21		16.56	70.1
12	0.05	96	4.35	3.10	21.05	55.1
14	0.05	123	4.23	1.06	21.50	39.4
13	0.10	122	3.90	4.33	34.32	48.2
15	0.20	122	6.50	2.68	24.90	60.7
16	0.30	88	5.69	0.06	3.65	46.1

Wat opvalt is dat bij lagere groeisnelheid relatief meer acetaat naar PHB lijkt te gaan tijdens de PHB-vormingsfase. Er is een optimum bij $\mu = 0,1$ [1/h]. In reële afvalwater-zuiveringsinstallaties is er sprake van lagere groeisnelheden, de vorming van reservestoffen zou onder deze condities een nog belangrijkere rol kunnen spelen.

Uit tabel 14 en 15 kan de volgende tendens worden gehaald: de substraatopname-snelheid lijkt bij $\mu \geq 0.1$ constant te zijn. Het opgenomen acetaat wordt aangewend voor groei, waarbij de groeisnelheid afhangt van de groeisnelheid in de voorgaande steady state. Het restant van het substraat wordt omgezet in PHB. Bij lagere μ lijkt de specifieke substraatopnamesnelheid af te nemen. Deze is echter nog steeds groter dan de behoefte voor groei. Het overschot aan substraatopname wordt weer omgezet in PHB.

¹ Ten opzichte van de gedoseerde hoeveelheid acetaat.

² Ten opzichte van geconsumeerde hoeveelheid acetaat en PHB.

In de PHB-consumptiefase valt op dat PHB-consumptie start op een moment dat er nog acetaat in de reactor aanwezig is. Tijdelijk is er sprake van groei op twee verschillende substraten, namelijk acetaat en PHB (mixotrofie). Er is geen duidelijke verband tussen de groeisnelheid in steady state en de groeisnelheid tijdens de PHB-consumptiefase. Wel valt op dat de groei van actieve biomassa op het intern opgeslagen substraat trager gaat als de groei op acetaat in de PHB-productie-fase.

Op basis van deze bevindingen is een eenvoudige modelstructuur ontwikkeld voor het beschrijven van de PHB-productiefase en de PHB-consumptiefase.

6.3 Modelling

PHB-productiefase

Om de omzettingen tijdens de pulsexperimenten nauwkeurig te kunnen beschrijven wordt er aangenomen dat de biomassa uit twee compartimenten met vaste samenstelling bestaat, namelijk uit actieve biomassa ($\text{CH}_{1,77}\text{N}_{0,24}\text{O}_{0,44}$) en uit PHB ($\text{CH}_{1,5}\text{O}_{0,5}$). Groei is de toename van actieve biomassa. De fractie PHB van de totale biomassa (op C-mol basis) wordt X_{PHB} genoemd, de fractie actieve biomassa (op C-mol basis) is $(1-X_{\text{PHB}})$.

Tijdens de eerste fase van het puls-experiment wordt de overmaat substraat geconsumeerd en vindt groei en produktvorming plaats (PHB-productiefase). Dit kan beschreven worden mbv. een lineaire vergelijking voor substraat-consumptie, groei, PHB-vorming en maintenance:

$$-q_s = (1/Y_{\text{SX}}^{\text{MAX}}) \cdot \mu + (1/Y_{\text{SP}}^{\text{MAX}}) \cdot q_{\text{P}}^{\text{produktie}} + m_s \quad (6.1)$$

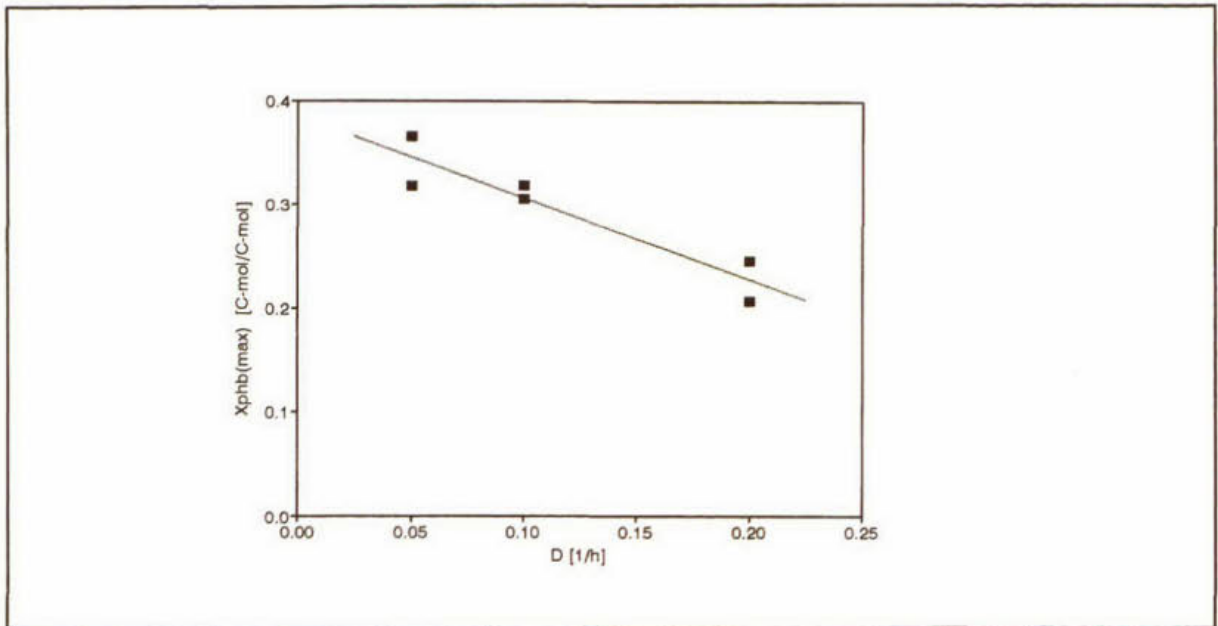
Alle specifieke activiteiten zoals μ , q_s en $q_{\text{P}}^{\text{produktie}}$ zijn betrokken op de actieve biomassa-concentratie. Tijdens het experiment worden substraatopname, PHB-produktie en groei gemeten. De maximale groeiopbrengst ($Y_{\text{SX}}^{\text{MAX}}$) en de maintenance coëfficiënt (m_s) kunnen worden geschat uit de steady state gegevens voordat de acetaat puls aan het systeem wordt gegeven. De maximale yield van PHB op acetaat ($Y_{\text{SP}}^{\text{MAX}}$) kan met behulp van het metabool model voor *Thiosphaera pantotropha* berekend worden uit de steady state gegevens. Uit het verloop van de concentraties in de produktie-fase kan dan q_s en q_{P} berekend worden. Met behulp van vergelijking 6.1 volgt dan de groeisnelheid μ . De groeisnelheid μ wordt ook direct gemeten uit de toename van de actieve biomassa-concentratie. Uit het verloop van de substraat-opnamesnelheid en de PHB-vormingssnelheid kan een kinetische vergelijking voor deze processen worden afgeleid.

Met behulp van een metabool gestructureerde model voor *Thiosphaera pantotropha* (Geraats *et al* (1990), Pot (niet-gepubliceerde gegevens), van Leeuwen (1994)) kunnen de onbekende stoechiometrische coëfficiënten berekend worden. De maximale steady state yield van biomassa op acetaat ($Y_{\text{SX}}^{\text{MAX}}$) is 0,45 [C-mol biomassa /C-mol acetaat]. De maintenance op acetaat (m_s) is 0,038 [1/h] (zie hoofdstuk 2).

Met behulp van het metabole model kan de maintenance op ATP berekend worden, $m_{\text{ATP}} = 0,094$ [1/h] (Roels (1983)). Uit de yield van biomassa op acetaat volgt de P/O-ratio, $\text{P/O} = 1,73$ [mol ATP/mol NADH]. Met deze gegevens kan de maximale yield van PHB op acetaat $Y_{\text{SP}}^{\text{MAX}} = 0,632$ [C-mol PHB /C-mol acetaat] bepaald worden.

De waarnemingen tijdens de PHB-productiefase kunnen met de volgende globale modelstructuur beschreven worden:

Gedurende de gehele PHB-productie-fase geldt dat de substraat-opnamesnelheid constant is en onafhankelijk van de groeisnelheid in steady state $q_s = q_{s,max} = 0,96 \pm 0,14$ [1/h]. De PHB-vormingssnelheid is tijdens een experiment alleen afhankelijk van X_{PHB} , de fractie PHB in de cel. Een bruikbare kinetiek-relatie is $q_p = q_{p,max} (1 - X_{PHB}/X_{PHB,max})$ met een constante $q_{p,max} = 0,58 \pm 0,12$ [1/h]. De PHB-productie wordt trager naarmate het PHB-gehalte het maximale PHB-gehalte nadert. Het maximale PHB-gehalte van de cel, $X_{PHB,max}$ is een zwakke (dalende) functie van de groeisnelheid in steady state (figuur 38).



Figuur 38 Maximale PHB-gehalte van *Thiosphaera pantotropha* LMD 94.21 (tijdens PHB-productiefase) als functie van de groeisnelheid.

PHB-consumptiefase

Wanneer het gedoseerde substraat geconsumeerd is zal PHB geconsumeerd worden als koolstof- en energie-bron en zal er groei plaatsvinden (PHB-consumptiefase). Tijdens de PHB-consumptiefase van het puls-experiment zijn de volgende parameters uit de lineaire vergelijking voor PHB-consumptie, groei en maintenance te bepalen:

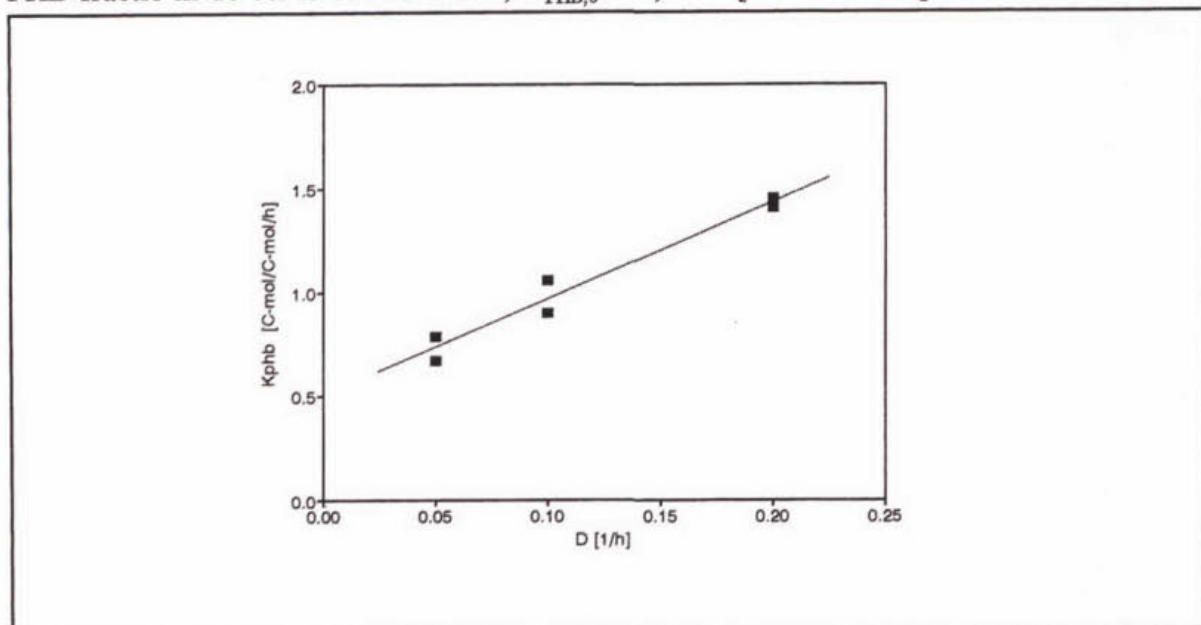
$$-q_p^{\text{consumptie}} = (1/Y_{PX}^{\text{MAX}}) \cdot \mu + m_s \quad (6.2)$$

Met behulp van de bekende stoichiometrie van *Thiosphaera pantotropha* zijn de volgende parameters berekend, de maintenance op PHB (m_p) is 0.023 [1/h] en de maximale yield van biomassa op PHB (Y_{PX}^{MAX}) is 0,717 [C-mol biomassa /C-mol PHB]. De PHB-consumptiesnelheid wordt direct gemeten uit de afname van de PHB-concentratie. Met behulp van vergelijking 6.2 kan dan de groeisnelheid μ berekend worden. De groeisnelheid μ wordt ook direct gemeten uit de toename van de actieve biomassa-concentratie.

De waarnemingen tijdens de PHB-consumptiefase kunnen met het volgende kinetiekmodel beschreven worden:

Gedurende de PHB-productie-fase geldt dat de PHB-consumptiesnelheid een functie is van X_{PHB} , de fractie PHB in de cel. Een bruikbare kinetiek-relatie is $-q_p = K_{PHB} (X_{PHB} - X_{PHB,0})$.

De PHB-consumptie wordt trager naarmate het PHB-gehalte het minimale PHB-gehalte nadert. K_{PHB} is een functie van de groeisnelheid in steady state (figuur 39) en de minimale PHB-fractie in de cel is een constante, $X_{PHB,0} = 0,0434$ [C-mol/C-mol].



Figuur 39 Snelheidsconstante voor PHB-consumptie door *Thiosphaera pantotropha* LMD 94.21 (tijdens PHB-consumptiefase) als functie van de groeisnelheid.

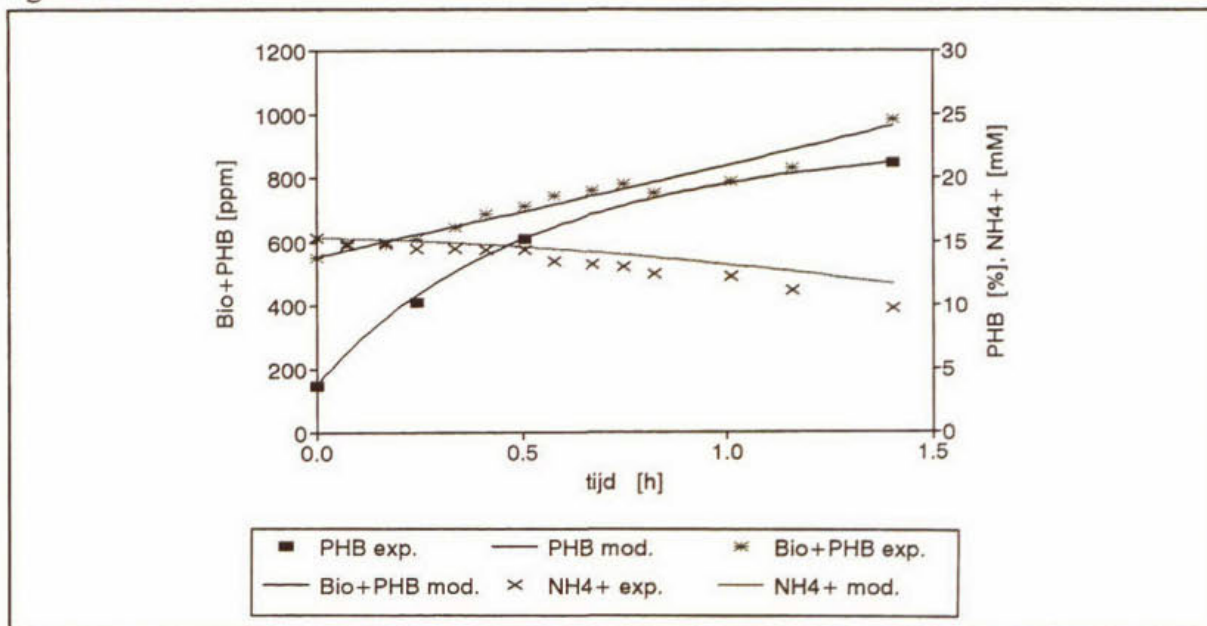
In tabel 16 is een overzicht gegeven van de gebruikte biokinetische parameters in voor de afvalwaterzuivering relevante eenheden.

Tabel 16 Gebruikte biokinetische parameters

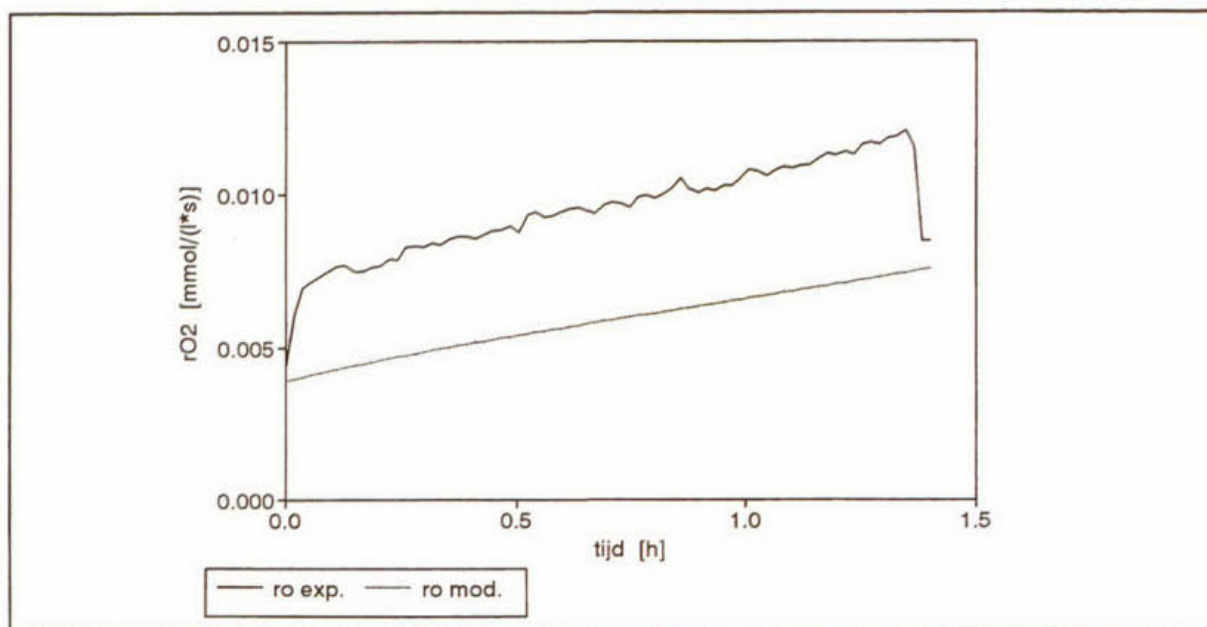
Parameter	Symbool	Waarde	Eenheid	Waarde	Eenheid
Biomassa-yield op acetaat	Y_{SX}^{MAX}	0,45	[C-mol/C-mol]	0,34	[gVSS/gCZV]
Biomassa-yield op PHB	Y_{PX}^{MAX}	0,72	[C-mol/C-mol]	0,80	[gVSS/gPHB]
PHB-yield op acetaat	Y_{SP}^{MAX}	0,63	[C-mol/C-mol]	0,42	[gPHB/gCZV]
Maximale acetaat-opnamesnelheid	$q_{S,max}$	0,96	[h ⁻¹]	30,7	[gCZV/gVSS/d]
Maximale PHB-vormingssnelheid	$q_{P,max}$	0,58	[h ⁻¹]	12,5	[gPHB/gVSS/d]
Minimaal PHB-gehalte van de biomassa	$X_{PHB,0}$	0,04	[C-mol/C-mol]	0,04	[gPHB/gVSS]
Maximaal PHB-gehalte van de biomassa	$X_{PHB,max}$	(zie figuur 6.2)			
Snelheidsconstante voor PHB-consumptie	K_{PHB}	(zie figuur 6.3)			

DISCUSSIE

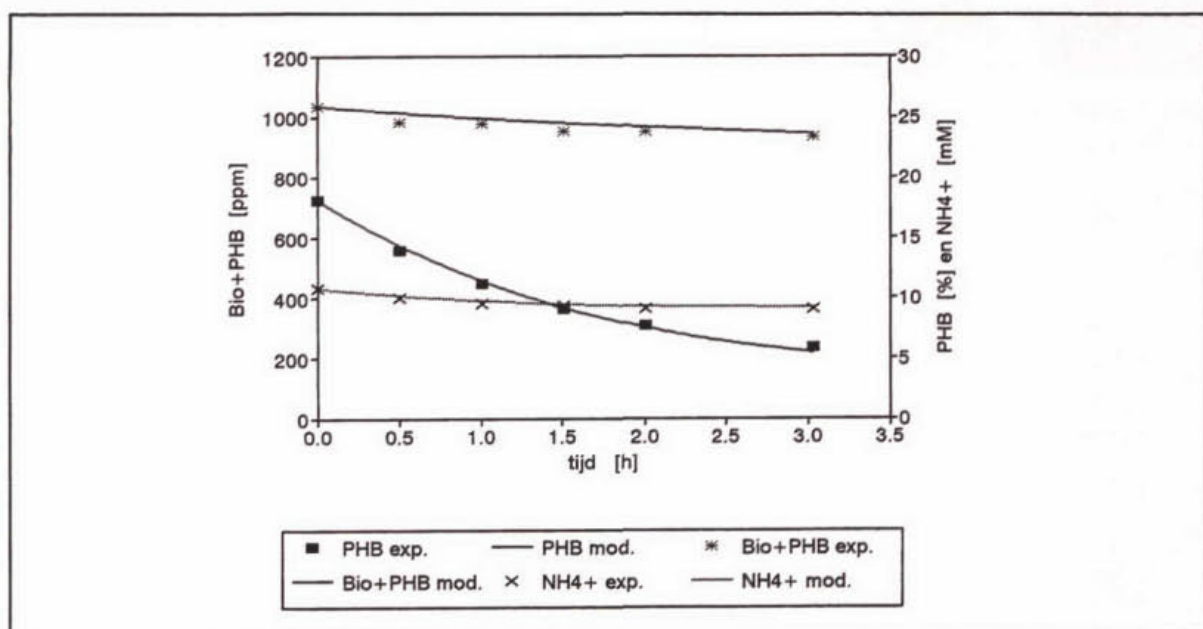
Er is een grote overeenkomst tussen het model en de experimenten, wat blijkt uit de figuren 40 t/m 43.



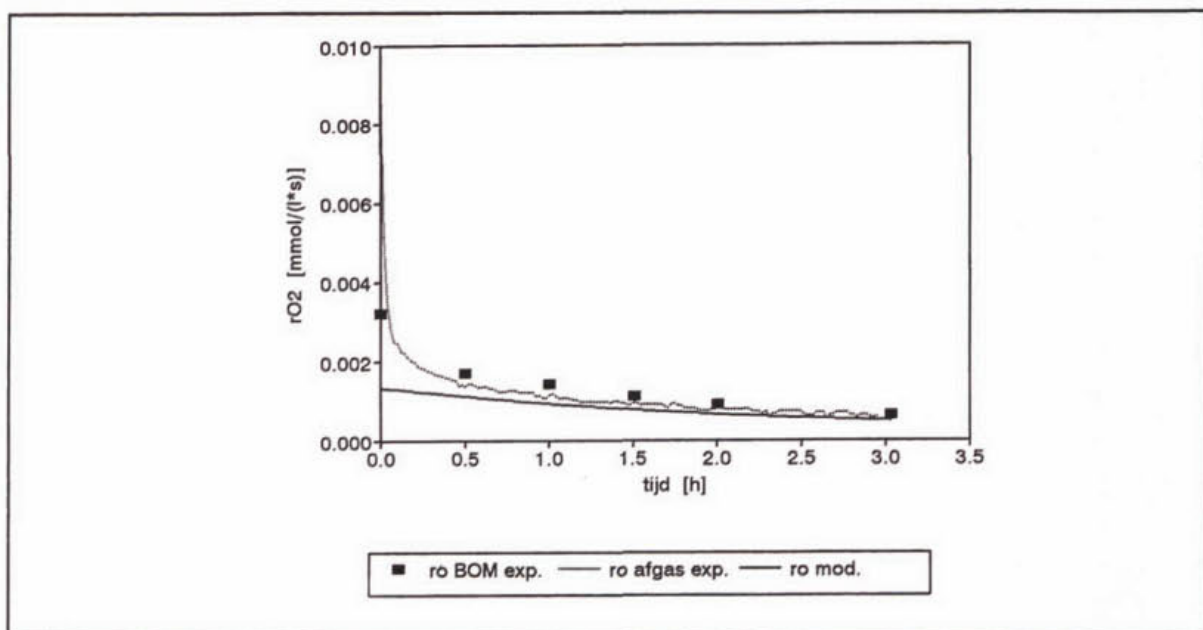
Figuur 40 Overeenkomst tussen meetwaarden en modelvoorspelling van de concentraties in een *Thiosphaera pantotropha* LMD 94.21-culture tijdens de PHB-productiefase.



Figuur 41 Overeenkomst tussen meetwaarden en modelvoorspelling van de zuurstofconsumptie door een *Thiosphaera pantotropha* LMD 94.21-culture tijdens de PHB-productiefase.



Figuur 42 Overeenkomst tussen meetwaarden en modelvoorspelling van de concentraties in een *Thiosphaera pantotropha* LMD 94.21-culture tijdens de **PHB-consumptiefase**.



Figuur 43 Overeenkomst tussen meetwaarden en modelvoorspelling van de zuurstofconsumptie door een *Thiosphaera pantotropha* LMD 94.21-culture tijdens de **PHB-consumptiefase**.

Er zijn overeenkomsten tussen de hierboven besproken modelstructuur en de PHB-kinetiek in fosfaat-verwijderende cultures (Smolders, (1995)).

Het maximale PHB-gehalte van de biomassa is hoger naarmate de groeisnelheid in de voorgaande steady state lager is. Dit is van belang voor afvalwaterzuiveringsprocessen, waar de gemiddelde groeisnelheid laag is en hoge substraat-concentraties voor kunnen komen.

6.4 Conclusies

Op basis van pulsrespons-metingen zijn er eenvoudige kinetische relaties afgeleid die de produktie van PHB door *Thiosphaera pantotropha* uit een plotselinge overmaat acetaat beschrijven. Ook de vervolgens optredende PHB-consumptie door *Thiosphaera pantotropha* kon worden beschreven.

Dit onderzoek had tot doel om het biologische stikstof-eliminatieproces te optimaliseren. Hiertoe is zowel gekeken naar de mogelijkheid om simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie toe te passen, als naar de mogelijkheden om de (CZV/N)-verhouding te verminderen binnen de conventionele nitrificatie/denitrificatie-processen.

Simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie

De mogelijke toepassing van simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie voor de eliminatie van stikstof uit afvalwater is onderzocht aan de hand van het gebruikte modelorganisme *Thiosphaera pantotropha*. De simultane heterotrofe nitrificatie- en aërobe denitrificatie-activiteit van dit organisme werd voornamelijk beïnvloed door de zuurstofconcentratie en de groeisnelheid. De optimale condities voor simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie bleek bij $dO_2 = 50\%$ luchtverzadiging en $pH = 8$ te zijn.

De gemiddelde activiteit is laag en niet los te koppelen van het plaatsvinden van groei. Onder optimale condities wordt slechts 30% van de omgezette ammonium geoxideerd, 70% wordt geassimileerd en komt in het surplus-slib terecht. Dit komt neer op een CZV/N-verhouding van 71 mg-CZV per mg-N gedenitrificeerd, wat voor de nederlandse situatie met doorgaans CZV-tekort in het te behandelen afvalwater een ernstig nadeel betekend voor de toepassing van simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie in afvalwaterzuiveringsprocessen.

Ook bleek dat de simultane heterotrofe nitrificatie- en aërobe denitrificatie-activiteit van het modelorganisme *Thiosphaera pantotropha* genetisch instabiel was. Over een periode van 10 jaar daalde de activiteit van de reiculture tot bijna nul.

De gebruikte strategie om de selectie van *Thiosphaera*-achtige organismen in afvalwaterzuiveringsinstallaties te bewerkstelligen bestond uit twee onderdelen. Ten eerste, er moest gebruik gemaakt worden van het constitutieve denitrificatie-apparaat van *Thiosphaera pantotropha*, door anoxische en aërobe periodes af te wisselen. Ten tweede moest er gebruik gemaakt worden van het vermogen tot vorming van reservestoffen, door elektrondonor-arme periodes af te wisselen met elektrondonor-rijke periodes.

Het opleggen van dynamische condities van elektron-acceptor en/of elektron-donor aan cultures van *Thiosphaera pantotropha* had geen verhoging van de simultane heterotrofe nitrificatie- en aërobe denitrificatie-activiteit tot gevolg. Wel bleek dat de gebruikte dynamische condities de vorming (en consumptie) van reservestoffen, met name PHB, stimuleerde.

De voorgestelde dubbele strategie om te selecteren op *Thiosphaera*-achtige organismen in afvalwaterzuiveringsinrichtingen bleek niet toepasbaar. Ten eerste, het bezit van constitutieve denitrificatie-enzymen bleek voor *Thiosphaera pantotropha* onvoldoende voordeel op te leveren tegen een conventionele, minder constitutieve, denitrificeerder zoals *Paracoccus denitrificans*. Ten tweede, het vermogen tot reservestof-vorming is niet uniek voor *Thiosphaera pantotropha*, maar ook vele andere organismen, waaronder de

conventionele denitrificeerder *Paracoccus denitrificans* en de onderzochte open mengpopulaties bleken dit vermogen te bezitten.

Minimalisatie van de CZV/N voor conventionele nitrificatie & denitrificatie

De mogelijke minimalisatie van de benodigde CZV/N-verhouding voor conventionele nitrificatie en denitrificatie werd onderzocht. Hiervoor is een literatuurstudie gedaan naar de mogelijkheid van de nitriet-route voor stikstof-eliminatie. Alsmede de rol van reservestof-vorming en -consumptie tijdens het denitrificatie-proces is onderzocht.

Uit literatuuronderzoek bleek dat het stikstof-eliminatieproces via nitriet alleen stabiel bedreven kan worden als er geselecteerd wordt op de afwezigheid van nitriet-oxideerders d.m.v. het instellen van een voldoende hoge groeisnelheid. De groeisnelheid mag echter niet te hoog zijn, dit om voldoende ammonium-oxideerders in het systeem te houden.

Het effect van inhibitie op de activiteit van de nitriet-oxideerders, bijvoorbeeld door hoge NH_3 of HNO_2 concentraties of lagere O_2 -concentraties is slechts van tijdelijke aard. Door adaptatie van deze organismen aan de nieuwe condities zal de nitrietoxidatie-activiteit terugkeren in het slib.

Ook denitrificatie kan een rol spelen bij het stabiel bedrijven van het stikstof-eliminatieproces via nitriet door ervoor te zorgen dat nitriet niet ter beschikking komt van de nitriet-oxideerders. Als nitrificatie en denitrificatie elkaar met hoge frequentie opvolgen dan zal de competitie om nitriet gewonnen worden door de denitrificeerders. Echter, als er door verstoringen toch nitriet ophoopt dan keren de nitriet-oxideerders terug in het slib.

De rol van reservestof-vorming en -consumptie tijdens het denitrificatie-proces is onderzocht. Hiertoe werd het effect van verschillende voedingsregimes tijdens de denitrificatie op de vorming en consumptie van reservestoffen in een éénslib aëroob/anoxisch systeem onderzocht. De vorming van PHB en dus het doorslaan van elektrondonor naar de aërobe fase bleek niet te voorkomen, zowel met continue als met pulsgewijze voeding van de elektrondonor tijdens de anoxische fase. In tegenstelling tot wat verwacht werd, bleek het systeem met de continue voeding de hoogste (ongunstigste) CZV/N-verhouding te hebben.

Er is meer onderzoek nodig om de oorzaken en gevolgen van reservestofvorming in afvalwaterzuiveringsprocessen te verklaren en te beheersen.

De vorming van PHB door *Thiosphaera pantotropha* uit een plotselinge overmaat substraat bleek goed te beschrijven met eenvoudige kinetische relaties. Ook de vervolgens optredende PHB-consumptie en groei door *Thiosphaera pantotropha* kon met eenvoudige kinetische relaties beschreven worden. Deze relaties zijn analoog aan die gebruikt worden om groei op PHB bij de biologische defosfatering te beschrijven.

SYMBOLENLIJST

NH_4^+	concentratie van ammonium in de reactor
(N/C)	gehalte stikstof van de biomassa (uit de elementanalyse)
q_s	specifieke substraat-opnamesnelheid
q_P	specifieke PHB (produktie/consumptie)-snelheid
μ	specifieke groeisnelheid
Y_{SX}	groeiopbrengst op acetaat
Y_{SP}	PHB-opbrengst op acetaat
m_s	maintenance coëfficiënt
Y_{PX}	groeiopbrengst op PHB
X_{PHB}	fractie PHB van totale biomassa [C-mol/C-mol]
R	fractie stikstof in actieve biomassa [N-mol/C-mol]
r	fractie stikstof in totale biomassa [N-mol/C-mol]
q_{NT}	specifieke nitrificatiesnelheid
C_X	actieve biomassa-concentratie
μ	groeisnelheid

LITERATUUR

Abeling, U, Seyfried, CF, (1992), Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater-nitrogen removal via nitrite, Wat. Sci. Tech., **26**, 1007-1015.

Akunna, JC, Bizeau, C, Moletta, R, (1993), Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol, Wat. Res., **27**, 1303-1312.

Alleman, JE, Irvine, RL, (1980), Storage-induced denitrification using sequencing batch reactor operation, Wat.Res., **14**, 1483-1488.

Alleman, JE, (1984), Elevated nitrite occurrence in biological wastewater treatment systems, Wat.Sci.Technol., **17**, 409-419.

Anderson, AJ, Dawes, EA, (1990), Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates., Microbiol.Rev., **54**, 450-472.

Anthonisen, AC, Loehr, RC, Prakasam, TBS, Srinath, EC, (1976), Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, J.Wat.Poll.Contr.Fed., **48**, 835-852.

Antoniou, P, Hamilton, J, Koopman, B, Jain, R, Holloway, B, Lyberatos, G, Svoronos, SA, (1990), Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria, Wat. Res., **24**, 97-101.

Balmelle, B, Nguyen, KM, Capdeville, B, Cornier, JC, Deguin, A, (1992), Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification, Wat. Sci. Tech., **26**, 1017-1025.

Beccari, M, Marani, D, Ramadori, R, (1979), A critical analysis of nitrification alternatives, Wat.Res., **13**, 185-192.

Bell, LC, Richardson, J, Ferguson, SJ, (1990), Periplasmatic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropha*. FEBS Letters. **265**: 85-87.

Bell, LC, Ferguson, SJ, (1991), Nitric and nitrous oxide reductase are active under aerobic conditions in cells of *Thiosphaera pantotropha*. Biochem. J. **273**: 423-427.

Boon, B, Laudelout, H, Kinetics of nitrite oxidation by *Nitrobacter winogradskyi*, Biochem.J., (1962), **85**, 440-447.

de Bruin, J, Klapwijk, A, (199*), Free ammonia inhibition of nitrification at adapted sludge in an SBR for the treatment of pig manure, Landbouwniversiteit Wageningen, to be published.

Casey, TG, Wentzel, MC, Loewenthal, RE, Ekama, GA, Marais, GvR, (1992), A hypothesis for the cause of low F/M filament bulking in nutrient removal activated sludge systems, Wat. Res., **26**, 867-869.

- Casey, TG, Wentzel, MC, Ekama, GA, Loewenthal, RE, Marais, GvR, (1993), An Hypothesis for the Causes and Control of Anoxic-Aerobic (AA) Filament Bulking in Nutrient Removal Activated Sludge Systems, Proceedings First International Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, Paris, France, september 1993.
- Castignetti, D, (1990), Biochemical examination of the heterotrophic nitrifier-denitrifier *Thiosphaera pantotropha*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **58**: 283-289.
- Castignetti, D, Palutis, D, Turley, J, (1990), An examination of proton translocation and energy conservation during heterotrophic nitrification. *FEMS Microbiol. Letters*. **66**: 175-182.
- Daigger, GT, Grady, CPL, (1982), The dynamics of microbial growth on soluble substrates, *Wat.Res.*, **16**, 365-382.
- Doi, Y, (1990) *Microbial Polyesters*, VCH Weinheim, blz. 1-88.
- Dorn, E, (1987), Poly- β -hydroxybüttersäure als wasserstoffdonator bei der denitrification, *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft*, Band 96, Forschungs- und Entwicklungsinstitut für Industrie- und Siedlungswasserwirtschaft, Stuttgart.
- van Faasen, HG, (1976), Optimalisering van de biologische zuivering van kalverdrijfmest in een actief-slibstelsysteem, *H₂O*, **9**, nr. 20, 416-419.
- Geraats, SGM, Hooijmans, CM, van Niel, EWJ, Robertson, LA, Heijnen, JJ, Luyben, KChAM, Kuenen, JG, (1990), The use of a metabolically structured model in the study of growth, nitrification and denitrification by *Thiosphaera pantotropha*. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 921-930.
- Hanaki, K, Wantawin, C, Ohgaki, S, (1990a), Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor, *Wat. Res.*, **24**, 289-296.
- Hanaki, K, Wantawin, C, Ohgaki, S, (1990b), Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor, *Wat. Res.*, **24**, 297-302.
- Heijnen, JJ, van Loosdrecht, MCM, (1990), Onderzoek naar de mogelijkheden om simultane heterotrofe nitrificatie en aërobe denitrificatie toe te passen in de afvalwaterzuivering, Projectvoorstel BT3027, vakgroep Bioprocestechnologie, faculteit STM, TU Delft.
- Hunik, JH, (1993), Engineering aspects of nitrification with immobilized cells, proefschrift Landbouwniversiteit Wageningen.
- Koot, ACJ, (1980), Behandeling van afvalwater, Uitgeverij Waltman, Delft, blz. 58.

Kountz, RR, Forney jr, C, (1959), Metabolic energy balances in a total oxidation activated sludge system., *Sewage and Industrial Wastes.*, **31**, 819-826.

Kučera, I, Boublikova, P, Dadák, V, (1984), Amperometric assay of activity and pH-optimum of N_2O reductase of *Paracoccus denitrificans.*, *Coll. Czechoslovak Chem. Commun.*, **49**, 2709-2712.

Kugelman, IJ, Spector, M, Harvilla, A, Parees, D, (1991a). Aerobic Denitrification in Activated Sludge., *Proceedings Env. Eng. Specialty Conference*, Reno, Nevada, July 1991.

Kugelman, IJ, Spector, M, (1991b). A New Process for Utilization of Aerobic Denitrification., *Proceedings WEF*, New Orleans, LA, 1992.

Laudelot, H, Lambert, R, Pham, ML, (1976), Influence du pH et de la pression partielle d'oxygène sur la nitrification., *Ann.Microbiol. (Inst.Pasteur).*, **127A**, 367-382.

Nakajima, M, Hayamizu, T, Nishimura, H, (1984a), Effect of oxygen concentration on the rates of denitrification and denitrification in the sediments of an eutrophic lake, *Wat. Res.*, **18**, 335-338.

Nakajima, M, Hayamizu, T, Nishimura, H, (1984b), Inhibitory effect of oxygen on denitrification and denitrification in sludge from an oxidation ditch, *Wat. Res.*, **18**, 339-343.

Nederlands Normalisatie-instituut, (1982), NEN 6624, Bepaling van de slibvolume-index (s.v.i.), Delft.

van Niel, EWJ, Robertson, LA, Kuenen, JG, (1991) Rapid poly- β -hydroxybutyrate production by *Thiosphaera pantotropha* in the presence of excess acetate, blz. 79-89 proefschrift E.W.J. van Niel

van Niel, EWJ, (1991) Nitrification by heterotrophic denitrifiers and its relationship to autotrophic nitrification, proefschrift TU Delft.

Oles, J, (1991), Verfahren zur dimensionierung von SBR-anlagen zur nitrifikation und denitrifikation, proefschrift TU Hamburg-Harburg.

Pagni, M, Beffa, T, Isch, C, Aragno, M, (1992), Linear growth and poly(β -hydroxybutyrate) synthesis in response to puls-wise addition of the growth-limiting substrate to steady-state heterotrophic continuous cultures of *Aquaspirillum autotrophicum.*, *J.Gen.Microbiol.*, **138**, 429-436.

Quinlan, AV, (1986), Optimum temperature shift for *Nitrobacter winogradskyi*, *Wat.Res.*, **20**, 611-617.

Randall, CW, Buth, D, (1984), Nitrite build-up in activated sludge resulting from temperature effects, *J.Wat.Pollut.Control Fed.*, **56**, 1039-1044.

- Rittmann, BE, Langeland, WE, (1985), Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches, J.Wat.Pollut.Control Fed., **57**, 300-308.
- Robertson, LA, (1988), Aerobic denitrification and heterotrophic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria, Ph.D. thesis, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.
- Robertson, LA, Kuenen, JG, (1983), *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium. J. Gen. Microbiol. **129**: 2847-2855.
- Robertson, LA, Kuenen, JG, (1988), Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha* - oxygen uptake and enzyme studies. J. Gen. Microbiol. **134**: 857-863.
- Robertson, LA, Kuenen, JG, (1992), The effect of electron acceptor variations on the behaviour of *Thiosphaera pantotropha* and *Paracoccus denitrificans* in pure and mixed cultures. FEMS Microbiol. Ecology. **86**: 221-228.
- Roels, JA, (1983), Energetics and kinetics in biotechnology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Shao, YJ, Jenkins, D, (1989), The use of anoxic selectors for the control of low F/M activated sludge bulking, Wat.Sci.Tech., **21**, 609-619.
- Smolders, GJ, (1995), proefschrift TU Delft.
- van Spanning, RJM, (1991), Genes involved in respiration of *Paracoccus denitrificans*, Ph.D. thesis, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands.
- Speece, RE, Engelbrecht, RS, Aukamp, DR, (1973), Cell replication and biomass in the activated sludge process, Wat.Res., **7**, 361-374.
- STORA, (1979), Handleiding voor microscopisch slibonderzoek, STORA, Rijswijk, blz. 55.
- STOWA, (1995), STOWA-rapport over onderzoek naar stikstofverwijdering uit rejectiewater op de locatie Sluisjesdijk, in press.
- Suzuki, I, Dular, U, Kwok, SC, (1975), Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts., J.Bacteriol., **120**, 556-558.
- Takii, S, (1977a), Accumulation of reserve polysaccharide in activated sludges treating carbohydrate wastes, Wat.Res., **11**, 79-83.
- Takii, S, (1977b), Bacterial characteristics of activated sludges treating carbohydrate wastes, Wat.Res., **11**, 85-89.

Thomsen, JK, Lonsmann Iversen, JJ, Cox, RP, (1993), Interactions between respiration and denitrification during growth of *Thiosphaera pantotropha* in continuous culture, FEMS Microbiology Letters, **110**, 319-324.

Turk, O, (1986a), The feasibility of a shortened pathway for nitrogen removal for highly nitrogenous wastes, proefschrift University of British Columbia.

Turk, O, Mavinic, DS, (1986b), Preliminary assesment of a shortcut in nitrogen removal from waste water, Can.J.Civ.Engng., **13**, 600-605.

Turk, O, Mavinic, DS, (1987), Selective inhibition: a novell concept for removing nitrogen from highly nitrogenous wastes, Envir.Technol.Lett., **8**, 419-426.

Turk, O, Mavinic, DS, (1989), Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia, Wat. Res., **23**, 1383-1388.

Verstraete, W, Vanstaen, H, Voets, JP, (1977), Adaptation to nitrification of activated sludge systems treating highly nitrogenous waters, J.Wat.Pollut.Control Fed., **47**, 394-398.

Voets, JP, Vanstaen, H, Verstraete, W, (1975), Removal of nitrogen from highly nitrogenous wastewater, J.Wat.Pollut.Control Fed., **47**, 394-398.

Wanner, J, Chudoba, J, Kucman, J, Proske, L, (1987), Control of activated sludge filamentous bulking - VII. Effect of anoxic conditions, Wat. Res., **21**, 1447-1451.

Wilderer, PA, Schroeder, ED, (1986), Anwendung des Sequencing Batch Reactor (SBR)-verfahrens zur biologischen abwasserreinigung, Hamburger Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, No.4, Gesellschaft zur förderung und entwicklung der umwelttechnologien an der TU Hamburg-Harburg, Hamburg.

Wilderer, PA, Jones, WL, Dau, U, (1987), Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite, Wat. Res., **21**, 239-245.

Yang, L, Alleman, JE, (1992), Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture, Wat. Sci. Tech., **26**, 997-1005.

Zacherl, B, (1985), Microbiologische untersuchungen zur wirkung von nitrifikationshemmstoffen auf ausgewählte bacterien des stickstoffkreislaufes, proefschrift TU München.

Wiesmann, U, (1994), Biological nitrogen removal from wastewater, Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology, vol. 51, edited by A. Fiechle, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

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

- '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

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

- 'Hydrolyse van zuiveringsslib in combinatie met anaërobe vergisting'
TNO-Maatschappelijke Technologie
RWZI 2000 89-05
Oktober 1989
- 'Het drogen van zuiveringsslib met het Carver-Greenfieldproces'
TNO-Maatschappelijke Technologie, Witteveen + Bos Raadgevende ingenieurs B.V.
RWZI 2000 89-06
December 1989
- 'Natte oxydatie van zuiveringsslib 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 Biotenitro-Biotenipho'
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 zuiveringsslib; een vergelijking tussen thermofiele en mesofiele slibgis-ting'
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

- 'Het uittesten van de filtratie-expressiecel in de praktijk'
TU-Eindhoven, Laboratorium voor Scheidingstechnologie
RWZI 2000 94-07
December 1994
- 'Modelvorming en optimalisatie van biologische defosfatering van afvalwater;
modellering'
TU-Delft, vakgroep Bioprocestechnologie
RWZI 2000 94-08
Januari 1995
- 'Mogelijkheden tot optimalisatie van de stikstofeliminatie'
TU-Delft, vakgroep Bioprocestechnologie
RWZI 2000 94-09
Januari 1995