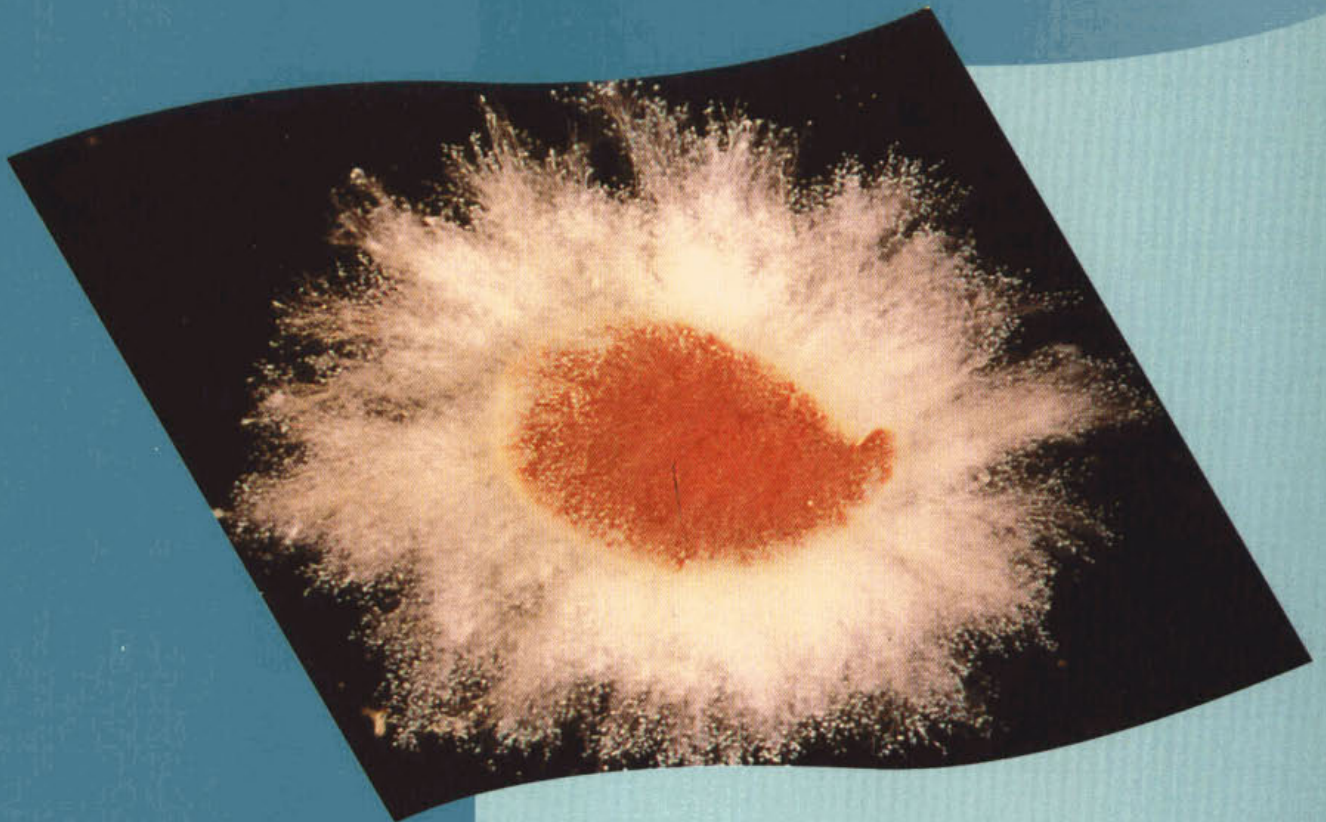


1997-11\_dynamisch-gedrag

**stowa**

richting Toegepast Onderzoek Waterbeheer

## Dynamisch gedrag van geïmmobiliseerde nitrificerende micro-organismen



97

11

**Dynamisch gedrag van geïmmobiliseerde  
nitrificerende micro-organismen**

97 11

Arthur van Schendelstraat 816  
Postbus 8090, 3503 RB Utrecht  
Telefoon 030 232 11 99  
Fax 030 232 17 66

Publicaties en het publicatie-  
overzicht van de STOWA kunt u  
uitsluitend bestellen bij:  
*Hageman Verpakkers BV*  
Postbus 281  
2700 AC Zoetermeer  
o.v.v. ISBN- of bestelnummer en  
een duidelijk afleveradres.  
ISBN 90.74476.77.5

## Inhoud

Inhoud	1
Ten geleide	3
Samenvatting	5
1 Inleiding	7
1.1 Achtergrond onderzoek	7
1.2 State of the art	9
1.2.1 Spontane immobilisatie (biofilms)	9
1.2.2 Kunstmatig geïmmobiliseerde cellen	10
1.3 Doelstelling van het onderzoek	12
2 Modellen	15
2.1 Inleiding	15
2.2 Pseudo-homogene groei-model	18
2.3 Kolonie-expansie-model	21
2.4 Multi-species model	24
2.5 Gebruik van dynamische modellen voor een rationeel reactorontwerp	26
2.5.1 Transportsnelheden	27
2.5.2 Omzettingssnelheden	27
2.5.3 Ontwerp-specifieke snelheden	27
2.5.4 Reactorontwerp	28
3 Materialen en methoden	31
3.1 Kweken van gesuspendeerde cellen	31
3.2 Immobilisatie	31
3.3 Kweken geïmmobiliseerde cellen	32
3.4 Ammonium-, nitriet-, en nitraatbepalingen	32
3.5 Activiteitsmeting	32
3.6 Macroscopische zuurstofconsumptiesnelheid	33
3.7 Afsterving van <i>Nitrosomonas europaea</i>	33
3.8 Celkleuringen	33
3.8.1 Fluoresceinediacetaat (FDA)	33
3.8.2 Lissaminegroen	34
3.9 Karakterisering dragermaterialen	34
3.9.1 Oplosbaarheid	34
3.9.2 Gelsterkte	34
3.9.3 Groei	36
4 Effect van temperatuurveranderingen op nitrificatie	37
4.1 Inleiding	37
4.2 Temperatuureffect op modelparameters	37
4.3 <i>Nitrobacter agilis</i>	38
4.3.1 Modelvalidatie: opstarttijd als functie van temperatuur	39
4.3.2 Modelvalidatie: dynamisch gedrag	41
4.3.3 Temperatuurgevoeligheidsanalyse	42
4.4 <i>Nitrosomonas europaea</i>	43
4.5 Coïmmobilisatie	45
4.6 Gebruik van dynamische modellen voor een rationeel reactorontwerp	46

5 Dynamisch gedrag van geïmmobiliseerde <i>Nitrosomonas europaea</i> : effect van afsterving cellen	49
5.1 Inleiding	49
5.2 Afsterving biomassa	49
5.3 Effect van afsterving van biomassa op de dynamiek van geïmmobiliseerde cellen	51
5.4 Modevaluatie	53
6 Eigenschappen en selectiecriteria van dragermaterialen voor toepassing van geïmmobiliseerde cellen voor de zuivering van afvalwater	59
6.1 Inleiding	59
6.2 Oplosbaarheid	61
6.3 Biologische afbreekbaarheid	62
6.4 Mechanische stabiliteit	63
6.5 Diffusiecoëfficiënten	68
6.6 Milde immobilisatieprocedure	69
7 Nitrificatie van huishoudelijk afvalwater met geïmmobiliseerde bacteriën	71
7.1 Inleiding	71
7.2 Nitrificerende bacteriën geïmmobiliseerd in PCS	71
8 Discussie	77
8.1 Inleiding	77
8.2 Mogelijkheden van bioreactoren met geïmmobiliseerde cellen in de afvalwaterzuivering	78
8.3 Gebruik van compacte bioreactoren met geïmmobiliseerde cellen bij steeds wisselende omstandigheden	80
8.4 Economische haalbaarheidsstudie	83
8.5 Perspectieven van geïmmobiliseerde cellen voor de milieutechnologie	85
9 Symbolenlijst	87
10 Literatuur	89
11 Produkten	97

## Ten geleide

In het kader van het onderzoekprogramma RWZI 2000 (projectnummer 3234/3) en de NOVEM Stimuleringsregeling Milieutechnologie (projectnummer 51230/0910) is in de periode 1991 - 1996 onderzoek verricht aan het dynamisch gedrag van geïmmobiliseerde nitrificerende micro-organismen door de vakgroep "Levensmiddelentechnologie, sectie proceskunde" van de Landbouwniversiteit Wageningen. Het projectteam bestond uit mw.ir. E.J.T.M. Leenen, dr.ir. R.H. Wijffels en prof. dr.ir. J. Tramper.

Voorgaand onderzoek (het promotie-onderzoek van ir. R.H. Wijffels) aan fundamentele aspecten van de groei van geïmmobiliseerde cellen, modelontwikkeling en modelvalidaties gaven vertrouwen in het praktisch nut van geïmmobiliseerde nitrificerende micro-organismen voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater.

Ten behoeve van de ontwikkeling van deze toepassing in de praktijk diende het onderhavige promotie-onderzoek van ir. E.J.T.M. Leenen, waar de nadruk is komen te liggen op specifieke problemen bij het ontwerpen van compacte zuiveringsinrichtingen, op de variërende afvalwatertemperaturen, het effect van de variërende stikstofbelasting en de stabiliteit van het dragermateriaal. Onder andere is daartoe een dynamisch reactormodel ontwikkeld en getoetst waar de effecten van de temperatuur, de variërende stikstofbelasting en de afsterving van de op het dragermateriaal gehechte nitrificeerders, in zijn opgenomen.

Voor gebruik onder de omstandigheden in huishoudelijk afvalwater moet het dragermateriaal robuust, resistent, goed koloniseerbaar en goed diffundeerbaar zijn. Uit enkele 'candidaat'-materialen kwam polyethyleenglycol (PEG) als de meest geschikte grondstof voor de dragende bolletjes naar voren. Het proces met de geïmmobiliseerde nitrificeerders is een veelbelovende optie voor toekomstige compacte zuiveringssystemen.

Het onderzoek werd begeleid door een commissie bestaande uit ir. A.W. van der Vlies (voorzitter), mw.dr. M.M.A. Ferdinandy, ir. B.A. Heide, mw.ir. S. Houtman, dr.ir. M.C.M. van Loosdrecht en ir. P.C. Stamperius.

Utrecht, maart 1997

De directeur van de STOWA

drs. J.F. Noorthoorn van der Kruijff



## Samenvatting

Het project "dynamisch gedrag van geïmmobiliseerde nitrificerende micro-organismen" is gestart na uitgebreid onderzoek aan fundamentele aspecten van groei van geïmmobiliseerde cellen. In voorgaand onderzoek zijn dynamische wiskundige modellen ontwikkeld. Deze modellen en modelvalidaties hebben voldoende basis gegeven aan het praktische nut van geïmmobiliseerde cellen. Dit project kan gezien worden als een tussenstap van basisonderzoek naar toepassing. Ingegaan wordt op de specifieke problemen bij het ontwerpen van compacte waterzuiveringsinrichtingen, met name het effect van variërende stikstofbelasting en afvalwatertemperatuur. Tevens is ingegaan op de stabiliteit van dragermaterialen in huishoudelijk afvalwater.

Bij de zuivering van afvalwater veranderen de procescondities continu. Zuiveringsinrichtingen moeten zo ontworpen worden dat deze fluctuaties geen negatief effect hebben op de effluentkwaliteit. In voorgaand onderzoek waren dynamische modellen ontwikkeld, die het gedrag van geïmmobiliseerde cellen beschreven vanaf het opstarten tot de pseudo-evenwichtssituatie. Het effect van fluctuaties, zoals bijvoorbeeld in de watertemperatuur of de stikstofbelasting zijn in dit project onderzocht. Hiertoe zijn de dynamische modellen uitgebreid door voor de individuele parameters, welke gevoelig zijn voor temperatuur, een temperatuurrelatie toe te voegen. De modellen werden gevalideerd door geïmmobiliseerde nitrificerende bacteriën te kweken in een airlift-loopreactor bij verschillende temperaturen tussen 5 en 30°C. Het effect van temperatuurwisselingen werd bestudeerd door tijdens de kweek de temperatuur te verhogen of te verlagen. De geïmmobiliseerde cellen zijn minder gevoelig voor temperatuursveranderingen dan gesuspendeerde cellen. Wanneer de temperatuur van 30°C naar 5°C verlaagd werd, was de capaciteit nog 60% van de capaciteit bij de optimale temperatuur. Het effect van fluctuaties in de stikstofbelasting bleek ingewikkelder. In het nitrificatieproces met geïmmobiliseerde cellen wordt slechts een gedeelte van de gelbollen gebruikt omdat er zich een substraatgradiënt over de bollen ontwikkelt. Alleen de buitenste laag van de gelbollen zal actief zijn. Indien de belasting in de reactor verhoogd wordt, dringt substraat verder in de gelbollen door. Indien de in diepere lagen aanwezige cellen leven, zal de piekbelasting opgevangen worden. Indien deze cellen dood zijn, zal deze piekbelasting niet opgevangen worden en resulteert dus een verhoogde effluentconcentratie. Om inzicht te krijgen in de mate van afsterving en de omstandigheden waarbij dit gebeurt, zijn de afsterfsnelheden van nitrificeerders in afwezigheid van zuurstof of ammonia bepaald en toegevoegd aan de dynamische modellen. Het bleek dat indien ammonia afwezig was de cellen sneller afsterven dan wanneer zuurstof afwezig was. Dit betekent dat indien de ammoniumconcentratie in het influent laag is de zuurstofconcentratie verlaagd dient te worden om de mate van afsterving te minimaliseren. Ook werd duidelijk dat afhankelijk van het feit of een piekbelasting regelmatig voorkomt (minder afsterving van biomassa) nieuwe piekbelastingen al dan niet goed opgevangen kunnen worden. In het algemeen kan geconcludeerd worden dat geïmmobiliseerde cellen relatief ongevoelig zijn voor temperatuurwisselingen en regelmatige piekbelastingen.

Een van de meest kritische punten van het systeem en in eerder onderzoek nog niet aan de orde geweest, is de ontwikkeling van stabiele dragermaterialen. In vorig onderzoek en in de studies aan het effect van fluctuaties werd gebruik gemaakt van algiinaat en carrageen. Deze materialen zijn echter niet geschikt voor gebruik in huishoudelijk afvalwater; ze zijn biologisch afbreekbaar, lossen op wanneer niet de juiste tegenionen aanwezig zijn en zijn slijtagegevoelig. Voor de ontwikkeling van nieuwe materialen zijn daarom enkele criteria

opgesteld waaraan deze materialen zouden moeten voldoen. Deze criteria waren: niet oplosbaar, niet biologisch afbreekbaar, niet slijtagegevoelig, hoge diffusiecoëfficiënten, eenvoudige immobilisatieprocedure, hoog overlevingspercentage van de cellen na immobilisatie, minimale hechting van andere organismen en liefst een lage kostprijs. In dit onderzoek stonden de eerste drie criteria centraal. Een vergelijkende studie werd uitgevoerd. Een viertal synthetische materialen was potentieel geschikt: polyvinylalcohol (PVA), polycarbamoylsulfonaat (PCS), polyethyleenglycol (PEG) en polyethyleenoxide (PEO). Deze materialen (behalve PEO) zijn alle in de literatuur beschreven. Immobilisatie in PVA bleek echter niet effectief; de overleving van cellen was nagenoeg nihil doordat de immobilisatiecondities niet mild waren. PCS is geschikt, maar heeft ook een aantal belangrijke nadelen: het is slechts beperkt beschikbaar, heeft een ingewikkelde immobilisatieprocedure en relatief lage diffusiecoëfficiënten. PEG wordt reeds op grote schaal toegepast in afvalwaterzuiveringen door Hitachi in Japan en wordt momenteel ook door Degrémont in Frankrijk onderzocht. In dit onderzoek is een aanzet gemaakt een PEG-achtig gel te produceren in samenwerking met Holland Biomaterials Group in Enschede. Dit heeft geresulteerd in een chemisch gecrosslinkt polyethyleenoxide (PEO). In toekomstige projecten bij de sectie Proceskunde zal meer aandacht besteed worden aan PEO. In dit project is tevens een aanzet gemaakt om de slijtagegevoeligheid van een materiaal te kunnen bepalen. 'Materiaalmoetheid' ten gevolge van herhaaldelijk botsen of het continu onderhevig zijn aan afschuifkrachten veroorzaakt slijtage. PEG en PEO hebben nauwelijks last van die herhaaldelijke botsingen en afschuifkrachten.

Een experiment met geïmmobiliseerde nitrificerende bacteriën is uitgevoerd in voorbehandeld huishoudelijk afvalwater. Een probleem bij dit onderzoek was de beschikbaarheid van een stabiel dragermateriaal. Aangezien op dat moment alleen PCS (in kleine hoeveelheden) beschikbaar was, is dit gebruikt. Groei van geïmmobiliseerde nitrificeerders werd gevonden en relatief hoge nitrificatiecapaciteiten werden behaald ( $1-3 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reactor}} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Op de gelbollen ontwikkelde zich, gedurende het experiment, een film van ciliaten. Deze hadde geen negatief effect op de nitrificatiecapaciteit, maar verhoogden eerder de capaciteit. Waarschijnlijk doordat de uit de bollen gestoten nitrificeerders zich hechtten aan de stelen van de ciliaten en daar verder groeiden.

De toepassingsmogelijkheden van nitrificatie met geïmmobiliseerde cellen werden onderzocht. Hiertoe werd het ontwerp van een nitrificerende reactor vergeleken met het ontwerp van een beluchtingstank van een actief-slibstelsel. Vooral het effect van een verlaagde temperatuur ( $7^{\circ}\text{C}$ ) en het effect van een piekbelasting zijn vergeleken. Het proces met geïmmobiliseerde cellen is een veelbelovende optie om aan de wensen van de toekomstige zuiveringsinrichtingen te voldoen. Een compacte reactor kan gebruikt worden door de hoge biomassaconcentratie en korte verblijftijden. Het proces is relatief ongevoelig voor fluctuaties in afvalwatertemperatuur en regelmatig voorkomende piekbelastingen.

De kosten voor productie van geïmmobiliseerde cellen zullen naar alle waarschijnlijkheid ruimschoots gecompenseerd te worden door de verminderde kosten voor de bouw van een kleinere reactor.

Het proces met geïmmobiliseerde nitrificeerders is goed beschreven in ontwikkelde modellen en deze kunnen dan ook gebruikt worden om een proces te ontwerpen en om te bepalen welke parameters belangrijk zijn om te meten en te regelen.



# 1 Inleiding

## 1.1 Achtergrond onderzoek

Nutriëntenemissies in oppervlaktewater kunnen resulteren in algenbloei. De laatste jaren worden in de Noordzee en andere mariene milieu's schuimvorming, zuurstofdepletie en toxische effecten van algen op mosselen en andere schelpdieren waargenomen. Met name stikstoflozingen zijn in dit verband ongewenst omdat de stikstofverbindingen limiterend zijn voor groei van algen (Ibrek *et al.* 1990, Underdal *et al.* 1988, Wyatt 1979, Zevenboom *et al.* 1990).

Stikstofverwijdering kan bewerkstelligd worden door nitrificatie en denitrificatie bij de biologische zuivering van afvalwater. Met name nitrificatie is daarin een problematisch proces, omdat de groeisnelheid van nitrificerende micro-organismen erg laag is. Onder optimale omstandigheden is de deeltijd van nitrificerende bacteriën ongeveer 15 uur. Het risico bestaat dat nitrificerende bacteriën overgroeid worden door heterotrofe bacteriën en uit de reactor spoelen, vanwege de veel kortere delingstijd van heterotrofe micro-organismen (20-40 minuten). Onder niet optimale omstandigheden is dit risico zelfs nog groter. Bij lage temperaturen zal een ander mengsel van heterotrofe bacteriën zich ontwikkelen die nauwelijks langzamere groeisnelheden hebben dan de populatie die zich bij optimale omstandigheden ontwikkelt. Nitrificatie wordt bij lage temperaturen door dezelfde populatie uitgevoerd als bij optimale temperaturen. De groeisnelheid van nitrificerende bacteriën is echter veel lager bij lage temperaturen. De delingstijd zal toenemen tot 150-200 uur bij 5°C. Om deze reden is het moeilijk om nitrificerende bacteriën vast te houden in actief slib systemen gedurende de winter (Barnes en Bliss 1983, Knowles *et al.* 1965).

De nitrificatiecapaciteit kan verbeterd worden door de biomassaverblijftijd onafhankelijk van de vloeistofverblijftijd toe te laten nemen. Dit kan bewerkstelligd worden door immobilisatie van bacteriën. Immobilisatie van micro-organismen kan gedefinieerd worden als het zodanig beperken van de bewegingsvrijheid van de microbiële cellen dat deze gemakkelijk in een bioreactor kunnen worden gehouden, zelfs wanneer de omstandigheden dusdanig zijn dat vrij gesuspendeerde cellen uit zouden spoelen.

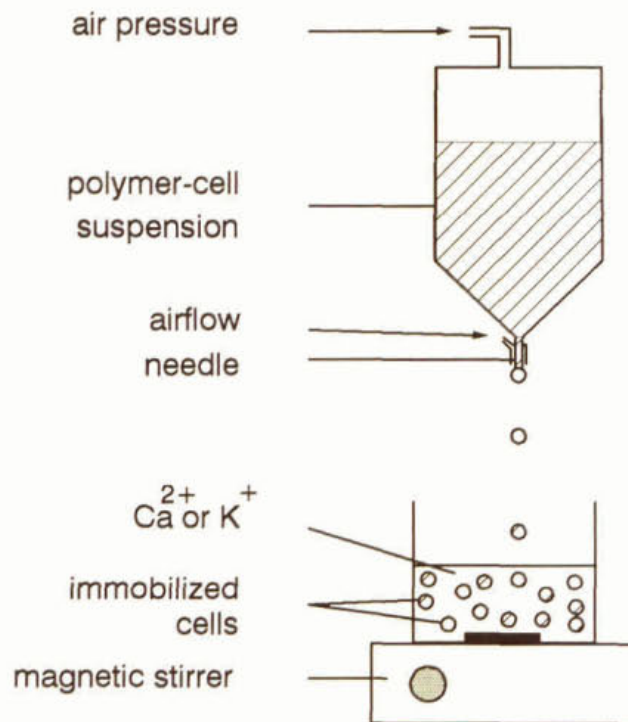
Cruciaal bij elke immobilisatieprocedure is dat de cellen hun gewenste functie blijven behouden en dat vanuit een mechanisch, fysisch, chemisch en biologisch gezichtspunt een voldoende stabiel systeem wordt verkregen.

Sommige micro-organismen hebben de neiging zich te hechten aan oppervlakken en immobiliseren zich op die manier zelf. Een dergelijke hechting kan de basis zijn voor een goedkope en effectieve immobilisatietechniek. Hiervan is tot nu toe met name in de waterzuivering gebruik gemaakt in biofilmreactoren, waar reeds veel ervaring mee is opgedaan. Een nadeel van deze methode is, dat relatief veel tijd nodig is om zo'n film op te bouwen en dat uitspoeling van biomassa aanzienlijk kan zijn.

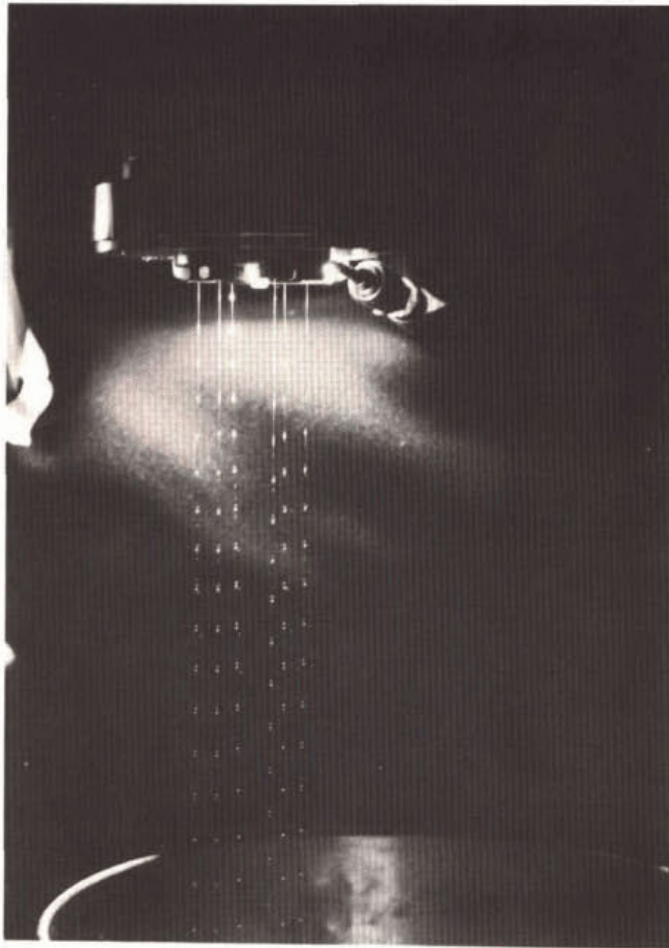
Insluiting van cellen in polymere gelen is in het algemeen een goed gedefinieerde vorm van immobilisatie, die bovendien onafhankelijk is van ceileigenschappen. Fysische insluiting van cellen in een polymere matrix is een van de meest toegepaste immobilisatietechnieken (kader 1).

### Kunstmatige immobilisatie

Een van de meest toegepaste technieken van kunstmatige immobilisatie is insluiting in gelen. De natuurlijke gelen worden in het algemeen tot geschikte biokatalysatorbolletjes gemaakt door de cellen te suspenderen in een waterige oplossing van het polymere pre-gel en het mengsel druppelsgewijs te extruderen in een oplossing die gelying induceert (Woodward 1988). In het geval van algiinaat en carrageen zijn dit respectievelijk oplossingen van  $\text{Ca}^{2+}$  en  $\text{K}^+$  (figuur 1.1). Het is mogelijk deze extrusietechniek op te schalen door gebruik te maken van een resonantienozzle. In dat geval wordt de oplossing door een klein gaatje geperst en de ontstane straal opgebroken in kleine druppeltjes door de straal in trilling te brengen. Op deze manier kunnen 200-700 bollen per seconde gemaakt worden (Hulst et al. 1985). Recentelijk is de techniek verder opgeschaald door de vibratie op zes stralen tegelijk toe te passen (figuur 1.2) (Hunik en Tramper 1993).



Figuur 1.1: Schematische weergave van druppelsgewijze extrusie van algiinaat of carrageen in een  $\text{CaCl}_2$ - of  $\text{KCl}$ -oplossing waarin gelying plaats vindt (Hulst *et al.* 1985)



Figuur 1.2: Foto van het opbreken van een straal met een debiet van 23,8 liter/uur. De nozzlediameter is 0,8 mm en de frequentie is  $151 \text{ s}^{-1}$  (Hunik en Tramper 1993).

## 1.2 State of the art

### 1.2.1 Spontane immobilisatie (biofilms)

Het oxydatiebed is het meest toegepaste systeem met geïmmobiliseerde cellen. Een oxydatiebed is een percolatiefilter van poreuze dragermaterialen waarop zich een biofilm ontwikkelt. In eerste instantie werd lavasteen als dragermateriaal gebruikt, dat echter een beperkt extern oppervlak heeft ( $100 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ ). In een tweede generatie oxydatiebedden worden plastic ringen toegepast met een specifiek oppervlak van  $100\text{-}300 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ . Ondanks dat het specifiek oppervlak van deze filters beperkt is wordt het systeem op grote schaal toegepast en is er veel praktijkervaring met deze systemen verkregen. Kennis van dit waterzuiveringssysteem is echter voornamelijk empirisch.

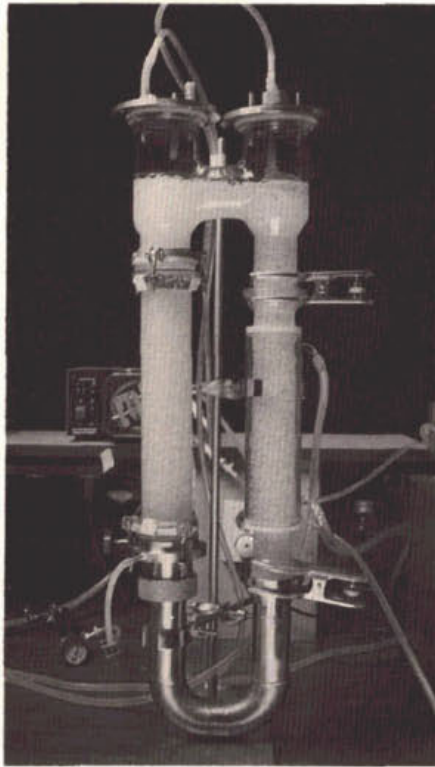
Een systeem met een vergelijkbaar specifiek oppervlak is de 'rotating biological contactor'. In een 'rotating biological contactor' is de biofilm gehecht aan schijven. Een groot aantal van die schijven is dicht op elkaar geschakeld op een centrale as die ronddraait in de reactor. De schijven zijn gedeeltelijk gedompeld in het afvalwater. Doordat de as langzaam roteert wordt de biomassa afwisselend blootgesteld aan lucht en afvalwater.

Zowel oxydatiebedden als 'biological rotating contactors' hebben een beperkte capaciteit als gevolg van het geringe specifieke oppervlak van de drager. Biofilmreactoren met veel hogere capaciteit hebben een veel groter specifiek oppervlak doordat van kleine deeltjes als dragermateriaal gebruik gemaakt wordt (bijvoorbeeld zand). Voorbeelden van dergelijke compacte systemen zijn gepakt-bed en gefluidiseerd-bed reactoren. Deze reactoren zijn dus gevuld met kleine deeltjes waarop een biofilm groeit. Het specifiek oppervlak in deze reactoren is ongeveer  $3000 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ . Belucht afvalwater beweegt door het bed. De capaciteit in deze systemen wordt beperkt door de overdracht van zuurstof van de gasfase naar de vloeistoffase waardoor vaak zuurstofdepletie over de lengte van de reactor voorkomt. In geval van gefluidiseerd bed reactoren kan zuurstofoverdracht verbeterd worden door lucht in de kolom te blazen waardoor een drie-fasenreactor ontstaat (Rittmann 1987, Denac *et al.* 1983, Black 1986, Tanaka *et al.* 1981, Venkatasubramanian *et al.* 1983). Vergelijkbare capaciteiten worden bereikt in gefluidiseerd bed reactoren met een daalbuis, zogenaamde airlift loop reactoren, die een veel beter gedefinieerde vloeistofstroom hebben (Heijnen *et al.* 1991).

### 1.2.2 Kunstmatig geïmmobiliseerde cellen

Geïmmobiliseerde celreactoren met natuurlijk gehechte biomassa zijn in beperkte mate beheersbaar en de achterliggende mechanismen van hechting en loslaten van een biofilm zijn niet volledig begrepen. Een beter gedefinieerd en goed beheersbaar systeem wordt verkregen door biomassa kunstmatig te immobiliseren. Om meer van de mechanismen van het proces te begrijpen kan gebruik gemaakt worden van reïncultures die geïmmobiliseerd worden in geldeeltjes met bekende diffusiecoëfficiënten en bekende geometrie.

Kunstmatig geïmmobiliseerde cellen vormen een alternatief voor biofilmsystemen. Het systeem werd geïntroduceerd voor denitrificatie door Mattiasson *et al.* (1981), Nilsson en Ohlson (1982 a,b) en Nilsson *et al.* (1980). Vervolgens zijn dergelijke systemen gebruikt voor nitrificatie in laboratorium studies door Kokufuta *et al.* (1982), Van Ginkel *et al.* (1983), Tramper en De Man (1986), Tramper en Grootjen (1986), Lewandowski *et al.* (1987), Ariga *et al.* (1987), Myoga *et al.* (1991), Tada *et al.* (1990), Tanaka *et al.* (1991), De Gooijer *et al.* (1991, 1992), Hunik *et al.* (1994a,b), Wijffels *et al.* (1991, 1994, 1995a,b,c, 1996) Wijffels en Tramper (1989, 1995), Uemoto en Saiki (1996), Leenen *et al.* (1996a,b,c), Rostron *et al.* (1996), Chudoba *et al.* (1996) en Willke en Vorlop (1996). In figuur 1.3 is een laboratoriumschaal reactor met geïmmobiliseerde cellen afgebeeld. Recentelijk zijn de eerste processen op grotere schaal gebouwd. Door Hitachi is onder meer een reactor opgestart met een volume van  $750 \text{ m}^3$  met in polyethyleenglycol deeltjes geïmmobiliseerd actief slib ten behoeve van nitrificatie van huishoudelijk afvalwater. Het proces is tot nu toe 5 jaar operationeel stabiel gebleken (Tanaka *et al.* 1991, 1996, Emori *et al.* 1996) (figuur 1.4 en 1.5). De Europese rechten van dit proces zijn in handen van Degremont (Chudoba *et al.* 1996).



Figuur 1.3: Labschaal airlift loop reactor (volume 3,4 liter) met in carrageen geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea*



Figuur 1.4: Demonstratiereactor (volume 750 m<sup>3</sup>) met in polyethyleenglycol geïmmobiliseerd nitrificerend slib bij de rioolwaterzuivering van Takimoshita. Persoon bij reactor is Dr. Emori, de projectleider van het PEGASUS project van Hitachi.



Figuur 1.5: Polyethyleenglycol deeltjes uit de demonstratiereactor met daarin geïmmobiliseerd nitrificerend slib.

### 1.3 Doelstelling van het onderzoek

Onderzoek bij de sectie Proceskunde van de Landbouwniversiteit aan nitrificatie en denitrificatie met geïmmobiliseerde micro-organismen is gestart in 1982. In de afgelopen 10 jaar is een vijftal projecten uitgevoerd waar in zijn algemeenheid de achterliggende mechanismen van deze processen bestudeerd zijn. De modelbeschrijvingen die voortgekomen zijn uit dit onderzoek vormen een stevige basis voor het ontwerp van compacte bioreactoren waarin verdunde afvalstromen bij korte procestijden behandeld kunnen worden.

Het eindrapport "dynamisch gedrag van geïmmobiliseerde nitrificerende micro-organismen" behandelt onderzoek uitgevoerd in de laatste fase van deze serie projecten. Dynamische wiskundige modellen zijn in de verschillende projecten ontwikkeld. In dit laatste project wordt ingegaan op de waarde van deze modellen in reactoren waar de randvoorwaarden continu aan verandering onderhevig zijn. Ingegaan wordt op specifieke problemen bij het ontwerp van compacte waterzuiveringsinrichtingen:

1. Effect van temperatuurveranderingen op nitrificatie
2. Dynamisch gedrag van geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea*: effect van afsterving cellen
3. Eigenschappen en selectiecriteria van dragermaterialen voor toepassing van geïmmobiliseerde cellen voor de zuivering van afvalwater
4. Nitrificatie van huishoudelijk afvalwater met geïmmobiliseerde bacteriën

In het voorgaande onderzoek werd gebruik gemaakt van carrageen als dragermateriaal. Carrageen is echter gevoelig voor slijtage en biologisch afbreekbaar. Aangetoond wordt in dit onderzoek dat er zeer stabiele dragermaterialen beschikbaar zijn die toegepast kunnen worden voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater.

Dit rapport behandelt niet alleen de eindfase van dit onderzoek. Er wordt ook aandacht besteed aan de resultaten van andere projecten om een duidelijk overzicht te geven van onderzoek en mogelijkheden van nitrificatie met geïmmobiliseerde bacteriën.





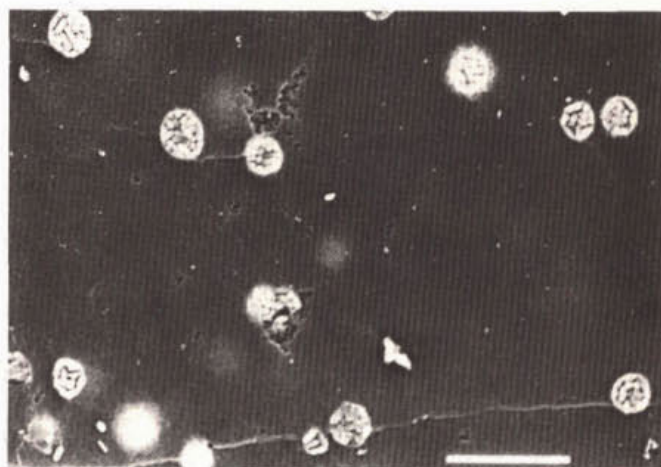
## 2 Modellen

### 2.1 Inleiding

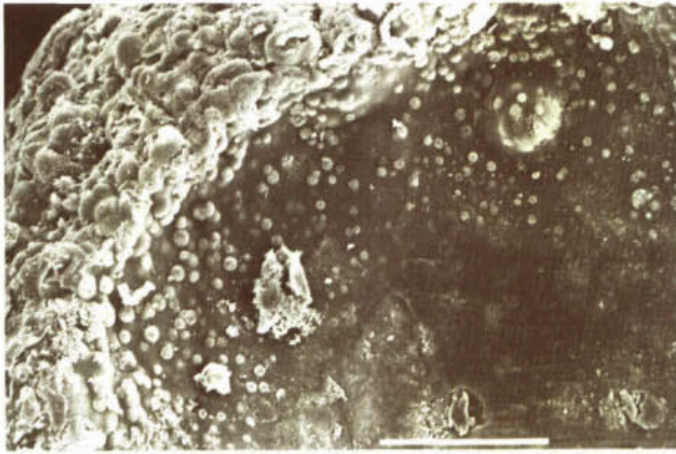
Processen met geïmmobiliseerde cellen zijn complex omdat stoftransport, substraatomzetting en groei simultaan plaatsvinden. Wiskundige modellen kunnen het inzicht in dergelijke complexe processen sterk vergroten. Ontwikkelde modellen zijn niet alleen belangrijk om inzicht te vergroten, maar vormen ook een belangrijk gereedschap om bioreactoren mee te kunnen ontwerpen en sturen.

Micro-organismen die ingesloten zijn in gelbolletjes met behoud van activiteit kunnen gecultiveerd worden in bioreactoren. De geïmmobiliseerde cellen groeien in het dragermateriaal en zullen microkolonies vormen (Willaert en Baron 1993) die voor zichzelf ruimte creëren in het gel door te expanderen en druk uit te oefenen op de matrix waarin ze ingesloten zijn (Stewart en Robertson 1989). Dit kan resulteren in uitstulping van kolonies door het oppervlak en op het moment dat de door de kolonie uitgeoefende kracht groter is dan de sterkte van het gel in eruptie van kolonies (Salmon 1989, Wijffels *et al.* 1994).

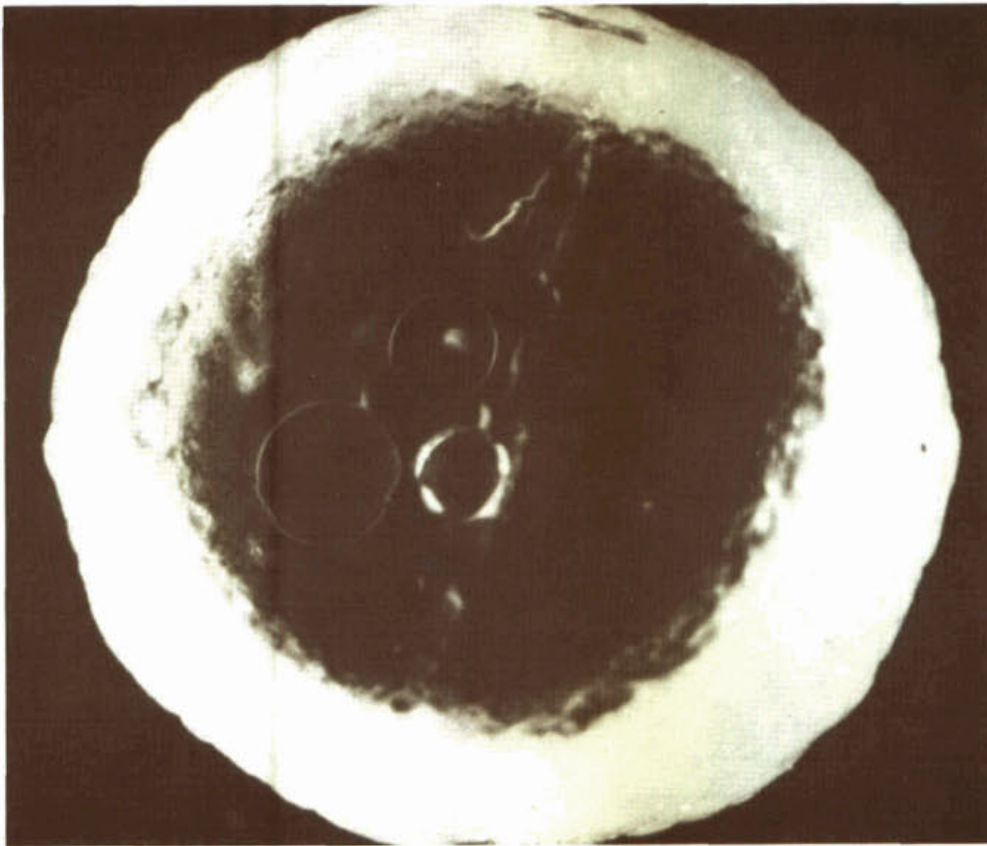
Behalve deze effecten zijn er effecten van diffusielimitatie. Initieel is de biomassaconcentratie erg laag. De kleine kolonies die gevormd zijn hebben dezelfde grootte over de gehele bol (Wijffels en Tramper 1989). Dit is geïllustreerd in figuur 2.1. Ten gevolge van groei zal de biomassaconcentratie toenemen en zal diffusielimitatie een rol spelen resulterend in een heterogene verdeling van biomassa over de bollen (figuur 2.2): bij het oppervlak van de bollen worden grotere kolonies gevormd dan in het centrum van de bollen. Uiteindelijk zullen de kolonies zodanig expanderen dat ze samensmelten (figuur 2.3) en een dichte biofilm vormen.



Figuur 2.1: Scanning-electronenmicroscopische opname van een doorsnede van carrageenbol met microkolonies van *Nitrosomonas europaea* (maatstreep 10  $\mu\text{m}$ ) (Wijffels en Tramper 1995).

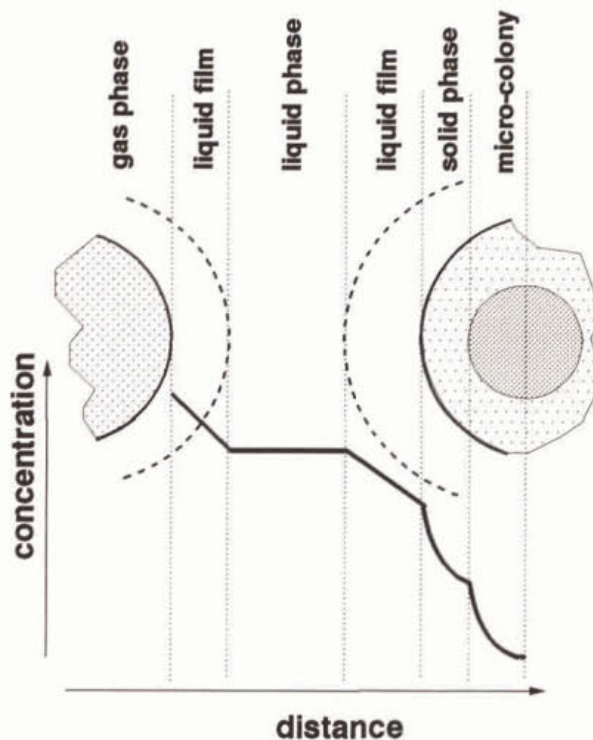


Figuur 2.2: Scanning-electronenmicroscopische opname van een doorsnede van carrageenbol met microkolonies van *Nitrosomonas europaea* (maatstreep 10  $\mu\text{m}$ ) (Wijffels en Tramper 1995). Een gradiënt in koloniediameter is duidelijk zichtbaar.



Figuur 2.3: Lichtmicroscopische opname van een doorsnede van carrageenbol met microkolonies van *Nitrosomonas europaea* (doorsnede bol 2 mm). Microkolonies smelten na verloop van tijd samen tot een interne biofilm (monster na 200 dagen cultivatie).

Processen met geïmmobiliseerde cellen zijn complex doordat verschillende processen geïntegreerd plaatsvinden. Dit wordt geïllustreerd voor een aërobe omzetting met zuurstof als limiterend substraat in figuur 2.4. Zuurstof wordt aan de reactor toegevoerd door middel van luchtbellen. Zuurstof wordt door diffusie getransporteerd van de gasfase naar de vloeistoffase door een stagnant vloeistoflaagje om de gasbel heen (diffusie in de stagnante laag in de gasfase is in het algemeen snel). De vloeibare fase wordt als ideaal gemengd beschouwd. Vanuit de vloeistoffase wordt zuurstof over een stagnant vloeistoflaagje om de vaste fase heen naar het geloppervlak getransporteerd, ook weer door diffusie; vervolgens vindt transport door het gel en in de microkolonies plaats en tot slot wordt zuurstof door de nitrificerende micro-organismen verbruikt.



Figuur 2.4: Schematische voorstelling van zuurstoftransport van de gasfase naar geïmmobiliseerde cellen die zuurstof verbruiken

Optimaal ontwerp van bioreactoren is moeilijk omdat diverse processen simultaan plaats vinden. Een efficiënt instrument om met al deze processen rekening te houden is regime analyse. Met behulp van regime-analyse kan de snelheidsbeperkende stap geïdentificeerd worden. Hunik *et al.* (1994b) hebben regime-analyse toegepast op geïmmobiliseerde cellen door de karakteristieke tijden van gas/vloeistofoverdracht, zuurstofuitputting in de gasbellen, vloeistof/vaste-stofoverdracht, menging en kinetiek van geïmmobiliseerde cellen te vergelijken. Karakteristieke tijd wordt gedefinieerd als de verhouding tussen capaciteit en debiet. Capaciteit is de beschikbare hoeveelheid substraat voor transport of omzetting bij de bestaande procescondities. Het debiet is de snelheid van transport of conversie.

Karakteristieke tijden kunnen gebruikt worden om een bioreactor optimaal te ontwerpen. Indien bijvoorbeeld de karakteristieke tijd voor zuurstoftransport van de gas- naar de vloeistoffase veel groter is dan overdracht van vloeibare naar vaste fase kan het ontwerp geoptimaliseerd worden door gas/vloeistofoverdracht te vergroten.

Karakteristieke-tijdberekeningen zijn in de literatuur beschreven voor overdracht van de gas- naar vloeistoffase en vloeistof- naar vaste fase (Roels 1983, Sweere *et al.* 1987, Hunik *et al.* 1994b). De karakteristieke tijd voor omzetting door biomassa kan bepaald worden met behulp van de biomassaconcentratie, de substraatconcentratie en de kinetische parameters (Roels 1983). In het geval van geïmmobiliseerde cellen is dit echter complexer, omdat substraat- en biomassaconcentraties variëren als functie van de plaats in de geldeeltjes. Om karakteristieke tijden voor conversie van geïmmobiliseerde cellen te bepalen moet diffusielimitatie meegenomen worden.

In de hieronder beschreven modellen worden verschillende vormen van diffusielimitatie opgenomen. Uiteindelijk worden deze modellen gebruikt om karakteristieke tijden te berekenen.

Dynamische modellen van het geïmmobiliseerde-celproces worden beschreven. In deze modellen vormt groei en sterfte van cellen het dynamische gedeelte. Concentratieprofielen over de dragermaterialen en fluxen van substraten, producten en biomassa worden beschreven als functie van de operationele tijd.

Drie typen dynamische modellen worden beschreven:

1. een model waarbij interne en externe diffusielimitatie beschouwd worden: pseudo-homogeen groeimodel
2. een model waarbij tevens diffusielimitatie over microkolonies beschouwd wordt: kolonie-expansiemodel
3. een model waarbij meerdere soorten micro-organismen beschouwd worden: multi-species model

## 2.2 Pseudo-homogeen groeimodel

Modellen waarin simultane reactie en diffusie in geïmmobiliseerde cellen opgenomen zijn, zijn reeds vaak beschreven. De meeste van die modellen houden echter geen rekening met groei en er wordt een homogene verdeling van biomassa aangenomen. In werkelijkheid zullen cellen echter groeien en biomassa zal heterogeen verdeeld zijn over het dragermateriaal. Recentelijk is een aantal dynamische modellen ontwikkeld waarin groei opgenomen is (Nakasaki *et al.* 1989, Salmon 1989, Monbouquette *et al.* 1990, Sayles en Ollis 1989, De Gooijer *et al.* 1991, 1992, Willaert 1993, Wolffberg en Sheintuch 1993, Hunik *et al.* 1994a, Wijffels *et al.* 1991, 1995b, Willaert and Baron 1994). De meeste van die modellen hebben een vergelijkbare basis:

- I. transport vindt plaats door radiale diffusie
- II. een biomassagradiënt ontwikkelt zich ten gevolge van groei aan de rand van de bollen en sterfte in het centrum
- III. intern en extern stoftransport wordt in beschouwing genomen
- IV. een maximale biomassaconcentratie wordt gedefinieerd

Alle modellen zijn gebaseerd op algemene vergelijkingen van kinetiek van micro-organismen en transport van substraat. Dit betekent dat ze gebruikt kunnen worden voor alle processen met geïmmobiliseerde cellen met bekende kinetiek. Hier wordt alleen het model van De Gooijer *et al.* (1991) met de experimentele evaluatie zoals die beschreven is door Wijffels *et al.* (1991) behandeld.

Een differentiële massa balans over een gelbolletje waarin simultane diffusie en consumptie van substraat plaats vindt is gegeven door:

$$D_{e,s} \left( \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dS}{dr} \right) \right) = r_s \quad (1)$$

met als randvoorwaarden:

$$S = S_s \quad \text{op} \quad r = r_b$$

$$\frac{dS}{dr} = 0 \quad \text{op} \quad r = 0 \quad \text{of op} \quad r = r_f$$

Extern stoftransport voor berekening van de oppervlakteconcentratie wordt gegeven door:

$$S'_s = S_b - \frac{D_e}{k_{t,s}} \left. \frac{dS}{dr} \right|_{r=r_b} \quad (2)$$

Vergelijkingen (1) en (2) worden iteratief opgelost door  $r_f$  of  $S_f$  te variëren totdat  $S_s$  en  $S'_s$  aan elkaar gelijk zijn. De macroscopische substraatconsumptie ( $r_s$ ) wordt vaak beschreven met een Monod-achtige vergelijking. De Gooijer *et al.* (1991) gebruiken de vergelijking die door Beeftink *et al.* (1990) voorgesteld is:

$$r_s = \frac{\mu}{Y_{xs}} X + mX \left( \frac{S}{K_s + S} \right) \quad (3)$$

In de door Beeftink *et al.* (1991) gegeven vergelijking wordt bij hoge substraatconcentraties in het onderhoud van micro-organismen voorzien door substraatopname. Indien er geen substraat aanwezig is, zal de behoefte aan onderhoudsenergie aanleiding geven tot een afname van de hoeveelheid biomassa (vergelijking 4).

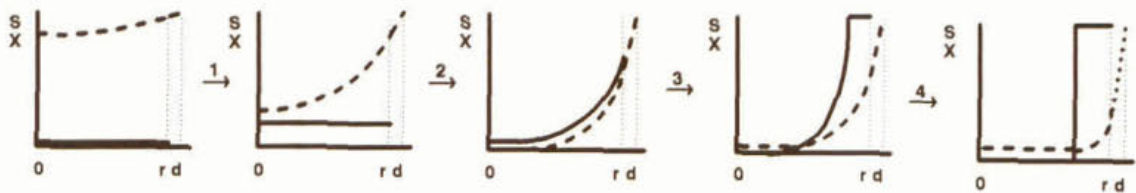
Om numerieke oplossing van deze vergelijkingen mogelijk te maken wordt groei van biomassa en substraatconsumptie apart berekend. Deze benadering is juist indien de tijdschaal voor groei veel langer is dan de tijdschaal voor substraatomzetting (Karel en Robertson 1989, Wanner en Gujer 1986, Annachatre en Khanna 1987, Benefield en Molz 1985, Capdeville *et al.* 1992, Jones *et al.* 1993, Toda en Sato 1985).

Zowel voor *Nitrosomonas* als voor *Nitrobacter* is de tijdschaal voor groei aanzienlijk groter dan voor substraatconsumptie. Dit betekent dat indien de tijd gediscretiseerd wordt, aangenomen kan worden dat er een pseudo steady state substraatprofiel over het deeltje is ( $dS/dt = 0$ ) binnen één tijdstap. Binnen een tijdstap kan vergelijking (1) dan opgelost worden met een tweede-orde Runge-Kutta methode resulterend in een substraatconcentratieprofiel over het bolletje. Met behulp van dit profiel kan vervolgens een nieuwe biomassadistributie berekend worden:

$$r_x = \mu X - mY_{xs}X \left( 1 - \frac{S}{K_s + S} \right) \quad (4)$$

Toepassing van deze vergelijkingen zou uiteindelijk leiden tot een oneindig hoge concentratie van biomassa in het buitenste schillette van het bolletje. Om deze reden wordt de biomassaconcentratie beperkt tot een maximale biomassaconcentratie (Toda en Sato 1985, Sayles en Ollis 1989, Monbouquette *et al.* 1990, Nakasaki *et al.* 1989, De Gooijer *et al.* 1991, Willaert 1993). De maximale biomassaconcentratie kan experimenteel bepaald worden (Wijffels *et al.* 1991, Hunik *et al.* 1994a) of berekend worden op basis van pakking van cellen (Willaert 1993). Indien de maximale biomassaconcentratie is bereikt zullen cellen toch doorgroeien en zullen uit het dragermateriaal lekken (Sayles en Ollis 1989, Monbouquette *et al.* 1990, Monbouquette en Ollis 1988, Chen en Huang 1988, Wijffels *et al.* 1995b).

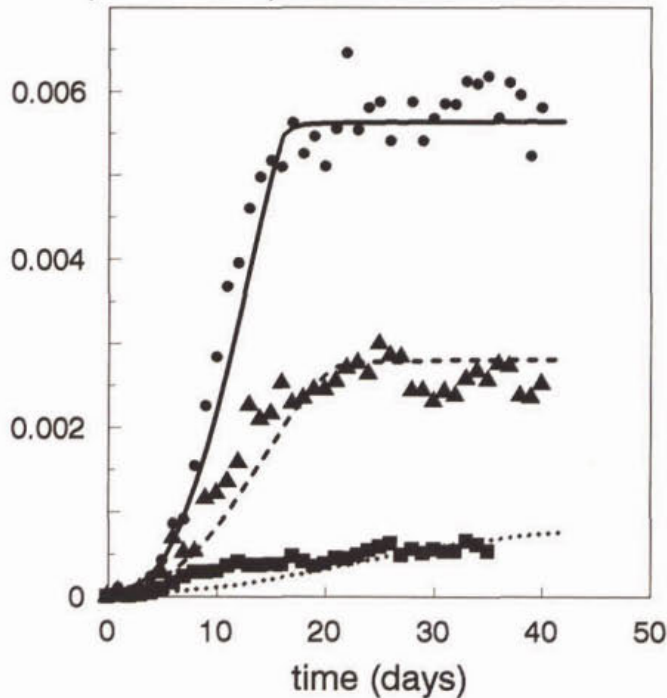
Een typisch resultaat van dit model is gegeven in figuur 2.5. De ontwikkeling van biomassa- en substraatprofielen van net na immobilisatie tot oneindig lang kweken is afgebeeld. Vier fasen zijn te onderscheiden. In de eerste fase is er bijna geen diffusielimitatie met als gevolg dat de biomassaconcentratie homogeen toeneemt. In de tweede fase is groei heterogeen en raakt het substraat in het centrum van het deeltje uitgeput. Substraatuitputting in het centrum resulteert in negatieve groei in fase 3 terwijl in de buitenste schillen de biomassaconcentratie maximaal is. Uiteindelijk zal er in fase 4 een homogene film met maximale biomassaconcentratie ontstaan juist onder het oppervlak van de gelbolletjes.



Figuur 2.5: Typische modelresultaten van het pseudo-homogeen groeimodel. Substraat- (—) en biomassa concentratie (----) als functie van de straal ( $r$ ) op verschillende tijdstippen

Het model is gevalideerd door in carrageen geïmmobiliseerde *Nitrobacter agilis* te kweken in continu doorstroomde airlift loop reactoren (Wijffels *et al.* 1991). Zuurstof was het limiterende substraat. Modelresultaten werden vergeleken met experimenteel bepaalde omzettingssnelheden bij drie verschillende zuurstofconcentraties in de vloeistoffase. Tevens werden biomassaprofielen en substraatprofielen (in afzonderlijke experimenten, Wijffels *et al.* 1995c) vergeleken met de modelresultaten. Zoals figuur 2.6 laat zien, beschrijft het model de experimentele resultaten uitstekend.

macroscopic oxygen-consumption  
rate ( $\text{mol. m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ )



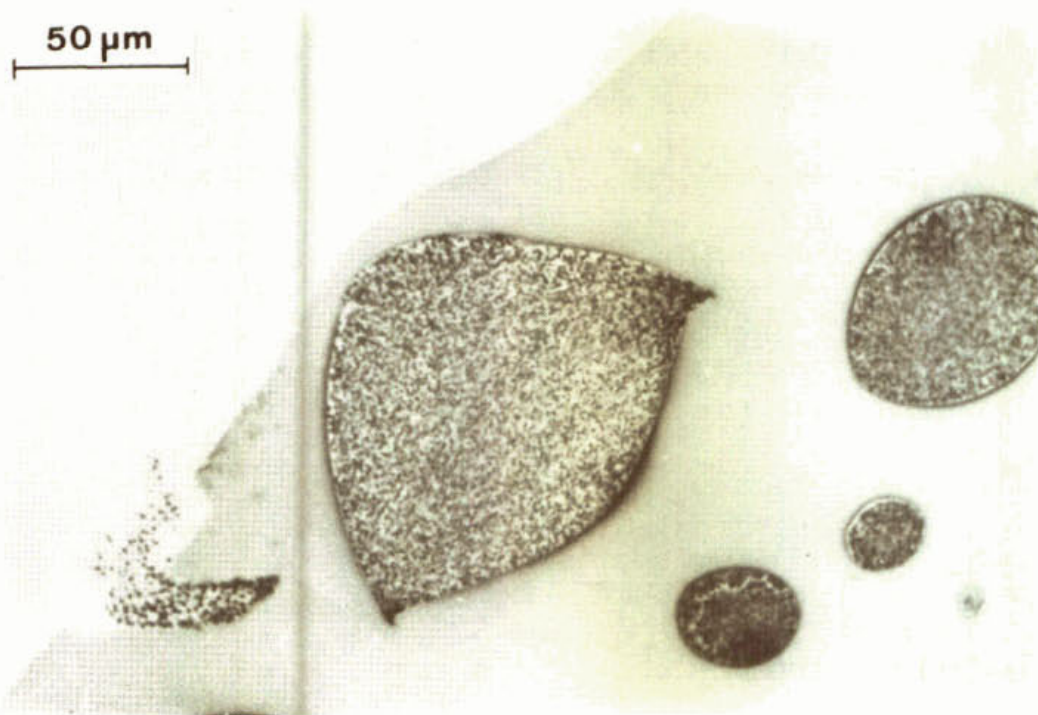
Figuur 2.6: Experimentele evaluatie van het pseudo-homogene groeimodel. Macroscopische consumptiesnelheid bij drie verschillende zuurstofconcentraties in de vloeibare fase zijn gegeven. Experimentele waarden zijn weergegeven met meetpunten en modelvoorspellingen met de lijnen. Experimenten zijn uitgevoerd bij zuurstofconcentraties van  $0,012 \text{ mol. m}^{-3}$  (■, ....),  $0,038 \text{ mol. m}^{-3}$  (▲, ---) en  $0,08 \text{ mol. m}^{-3}$  (●, —).

Verdere evaluatie met geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* heeft aangetoond dat experimentele resultaten niet altijd goed beschreven werden door het model (Wijffels *et al.* 1994). Gebleken is dat bij lage initiële biomassaconcentraties de microkolonies zo groot worden dat diffusielimitatie over de microkolonies ook een rol kan spelen. Om deze reden is in het vervolgonderzoek het kolonie-expansiemodel ontwikkeld (Wijffels *et al.* 1995b).

### 2.3 Kolonie-expansiemodel

Direct na immobilisatie is de biomassaconcentratie meestal laag en de individuele cellen zijn in het algemeen willekeurig verdeeld over het dragermateriaal. Groei resulteert in vorming van expanderende microkolonies. Als gevolg van transportlimitaties groeien de kolonies bij het oppervlak van het dragermateriaal sneller dan in het centrum. Expanderende kolonies juist onder het oppervlak zullen uiteindelijk het oppervlak raken en uit de bol groeien (Stewart en Robertson 1989). Het is aangetoond dat in sommige gevallen diffusielimitatie over de grotere expanderende microkolonies een significante rol speelt (Wijffels *et al.* 1995b).

Om diffusielimitatie over microkolonies op te nemen in dynamische groeimodellen wordt groei voorgesteld als expansie van microkolonies en niet zoals in het pseudo-homogeen groeimodel als een homogene toename van biomassa in schillen van de gelbol op verschillende afstanden van het centrum van de bollen. Groei door kolonie-expansie is beschreven door Salmon (1989) en De Gooijer *et al.* (1992). Dezelfde differentiaalvergelijkingen gelden als bij het pseudo-homogeen groeimodel (vergelijking 1) en groei vindt plaats volgens vergelijking (4). Vergelijking (4) wordt echter niet toegepast per schil maar per microkolonie waarvan het centrum op vaste afstand van het centrum van het gelbolletje blijft. Biomassa in de gelbollen bestaat dus uit een verzameling van microkolonies met verschillende straal. De straal van die kolonies wordt bepaald door hun radiale positie. Kolonies op dezelfde radiale positie in de bol zullen dus dezelfde straal hebben. Aangenomen wordt dat expanderende kolonies die met  $1/3$  van hun volume buiten het oppervlak van de gelbol stulpen volledig uitgestoten zullen worden. Figuur 2.7 laat zien dat die uitstulping ook werkelijk plaats vindt (Wijffels *et al.* 1994). De uitstulping met een factor  $1/3$  is arbitrair gekozen en zal in werkelijkheid afhankelijk zijn van de elasticiteit van het gel.



Figuur 2.7: Kolonie-eruptie uit een gelbolletje.

Substraatconcentratieprofielen over de gelbolletjes worden op een vergelijkbare manier berekend als in het pseudo-homogeen groeimodel, behalve dat er een effectiviteitsfactor voor diffusielimitatie in de microkolonies ( $\eta(r_c)$ ) (de waargenomen omzettingssnelheid gedeeld door de snelheid die waargenomen zou worden bij afwezigheid van diffusielimitatie) aan toegevoegd is:



$$D_{e,s} \left( \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dS}{dr} \right) \right) = \eta(r)_c r_s \quad (5)$$

Berekening van substraatconsumptiesnelheid in combinatie met extern stoftransport is ook hetzelfde als in het pseudo-homogeen groeiemodel.

De kolonie-effectiviteitsfactor wordt voor iedere schil in het gelbolletje (in totaal 500) bij de lokale substraatconcentratie berekend. Aangenomen is bij die berekening dat de kolonies bolvormig blijven en dat de biomassadichtheid in zo'n kolonie ( $X_c$ ) constant is. De substraatconcentratie aan het kolonie/gel-grensvlak is niet constant. Ter vereenvoudiging wordt echter aangenomen dat deze dat wel is en gelijk is aan de concentratie in de schil waar het centrum van de kolonie is gesitueerd.

De effectiviteitsfactor is gedefinieerd als:

$$\eta(r)_c = \frac{r_{s,a}^c}{r_{s,t}^c} \quad (6)$$

De waargenomen substraatconsumptiesnelheid,  $r_{s,a}^c$ , wordt berekend met behulp van een differentieële massabalans over een kolonie waar simultane diffusie en omzetting plaatsvindt:

$$D_{e,c} \left( \frac{1}{\rho^2} \frac{d}{d\rho} \left( \rho^2 \frac{dS}{d\rho} \right) \right) = r_{s,a}^c \quad (7)$$

De theoretische substraat consumptiesnelheid,  $r_{s,t}^c$ , wordt berekend met:

$$r_{s,t}^c = \left( \frac{\mu_{\max}}{Y_{xs}} + m \right) X_c \left( \frac{S_i}{K_s + S_i} \right) \quad (8)$$

Zoals reeds aangegeven, wordt aangenomen dat groei plaatsvindt door middel van expansie van kolonies. Kolonie-expansie wordt berekend met (Wijffels *et al.* 1995b):

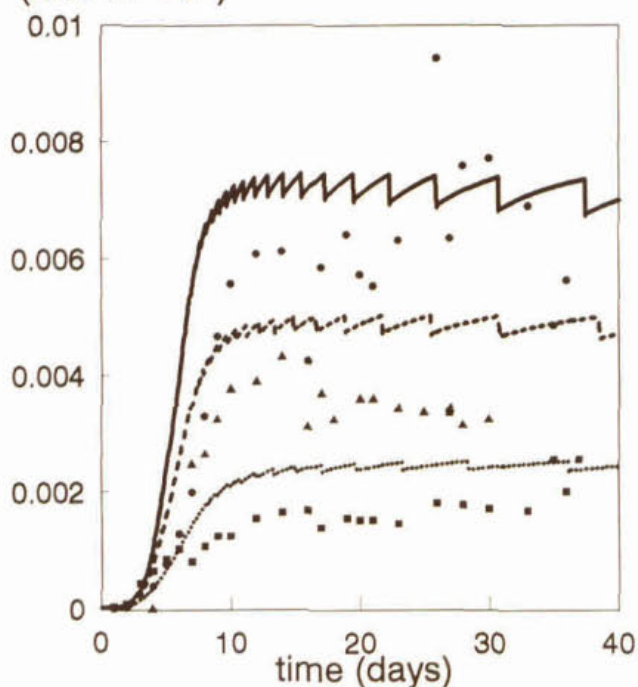
$$\rho_{c,t(i)}^r = \rho_{c,t(i-1)}^r e^{\left( \frac{1}{3} \left( \eta(r)_c \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} - m Y_{xs} \left( 1 - \frac{\eta(r)_c S}{K_s + S} \right) \right) \Delta t \right)} \quad (9)$$

waardoor de straal van de kolonies afhankelijk is van de radiale positie van de kolonie in het gelbolletje.

In geval van het kolonie-expansiemodel is het niet noodzakelijk een maximale biomassa-concentratie te definiëren. Kolonies zullen blijven groeien totdat uitstoot plaatsvindt of totdat expansie beperkt wordt door diffusielimitatie over de microkolonies.

Het kolonie-expansiemodel is gevalideerd met in carrageen geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* die continu gekweekt werden in airlift-loopreactoren. Resultaten zijn gegeven in figuur 2.8. Model- en experimentele resultaten blijken bij drie verschillende zuurstofconcentraties in de vloeistoffase goed met elkaar overeen te komen. De zaagtand in de modelvoorspellingen kan verklaard worden door eruptie van microkolonies.

macroscopic oxygen-consumption rate  
(mol. m<sup>-3</sup>. s<sup>-1</sup>)



Figuur 2.8: Experimentele evaluatie van het kolonie-expansiemodel. Macroscopische consumptiesnelheid bij drie verschillende zuurstofconcentraties in de vloeistoffase zijn gegeven. Experimentele waarden zijn weergegeven met meetpunten en modelvoorspellingen met de lijnen. Experimenten zijn uitgevoerd bij zuurstofconcentraties van 0,04 mol. m<sup>-3</sup> (■, ....), 0,08 mol. m<sup>-3</sup> (▲, ---) en 0,12 mol. m<sup>-3</sup> (●, —).

Indien de beginbiomassaconcentratie hoog is is het niet noodzakelijk diffusielimitatie over microkolonies op te nemen. In dat geval kan het veel eenvoudiger pseudo-homogeen groeiemodel gebruikt worden.

## 2.4 Multi-species model

Hunik *et al.* (1994a) hebben een dynamisch model ontwikkeld dat de groei en substraatconsumptie beschrijft van twee soorten micro-organismen die gecoïmmobiliseerd zijn in gelbollen. De organismen, *Nitrosomonas europaea* en *Nitrobacter agilis* oxideren achtereenvolgens ammonium en nitriet tot nitriet en nitraat. Elk substraat (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> of O<sub>2</sub>) kan in principe limiterend zijn voor de groei van die organismen.

In het model wordt het gelbolletje verdeeld in 250 schilletjes en in elk schilletje worden uniforme omstandigheden aangegeven. Binnen elke schil van het bolletje wordt het meest limiterende substraat bepaald. Het meest limiterende substraat is het substraat met de laagste waarde van

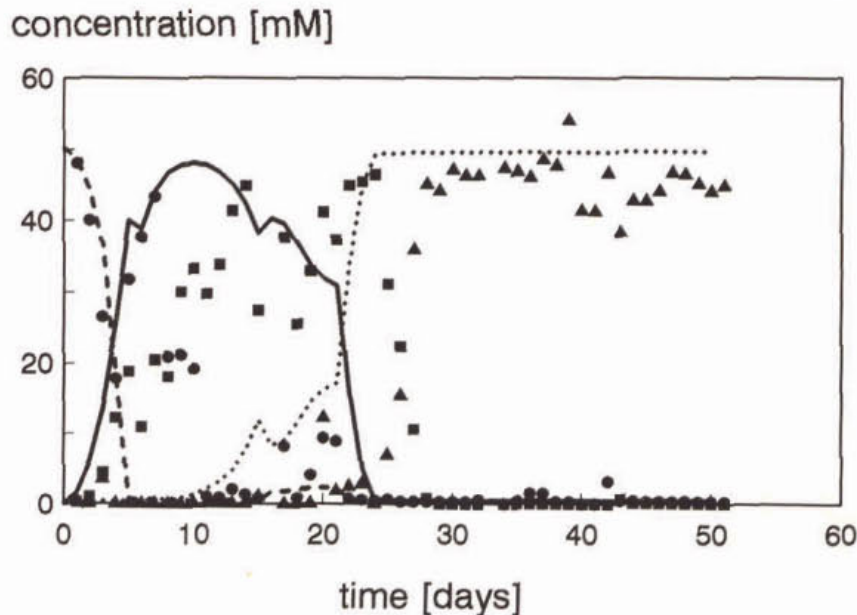
$$\frac{S_n}{S_n + K_{s,n}} \quad (11)$$

De substraatconcentratie als functie van de radiale positie in het gelbolletje wordt beschreven met:

$$D_{e,g} \left( \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{dS_n}{dr} \right) \right) = r_{s,n} \quad (11)$$

Het biologische gedeelte van het model wordt beschreven met de vergelijkingen voor substraatconsumptie en biomassaproductie volgens vergelijkingen (3) en (4). Omzetting van het niet-limiterende substraat is afgeleid van de stoichiometrie van de reactievergelijkingen.

De substraatconcentratieprofielen in de gelbollen kunnen berekend worden door vergelijking (3) in vergelijking (11) te substitueren. De resulterende vergelijking wordt opgelost met een 'Backwards in Time and Centred in Space' (BTCS) algoritme voor partiële differentiaalvergelijkingen (Press *et al.* 1988). Het model berekent ammonium-, nitriet-, nitraat-, zuurstof- en biomassaconcentratieprofielen over de gelbolletjes. In een continu bedreven reactor met bekende verdunningssnelheid, hoeveelheid dragermateriaal en influentconcentratie kan de effluentconcentratie van elke component berekend worden. Op deze manier is dit experiment ook gevalideerd. Figuur 2.9 laat zien dat in een continu bedreven airlift-loopreactor met in carrageen gecoïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* en *Nitrobacter agilis* de voorspelde en gemeten effluentconcentraties goed met elkaar overeen komen.



Figuur 2.9: Vergelijking van experimentele en modelresultaten van  $\text{NH}_4^+$  (--●--),  $\text{NO}_2^-$  (··■··) and  $\text{NO}_3^-$  (··▲··), in een continu bedreven airlift-loopreactor met gecoïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*

## 2.5 Gebruik van dynamische modellen voor een rationeel reactorontwerp

De hierboven beschreven modellen geven voldoende juiste beschrijvingen van het functioneren van geïmmobiliseerde cellen. Bij het ontwerp van reactoren met geïmmobiliseerde cellen moet echter met meer dan alleen het gedrag van de gelbolletjes rekening gehouden worden. In een bioreactor dienen factoren als menging en zuurstoftransport van de gasfase naar de vloeistoffase ook in beschouwing genomen te worden. De gegeven dynamische modellen dienen daarom geïntegreerd te worden in een reactormodel om een reactor optimaal te kunnen ontwerpen. Het zal duidelijk zijn dat vele factoren in principe het gehele proces kunnen beïnvloeden. Zoals reeds aangegeven in de inleiding van dit hoofdstuk vormt regime-analyse een effectief instrument om al deze factoren op elke schaal op hun waarde te schatten. Met regime-analyse kan de snelheidsbepalende stap bepaald worden. Hunik *et al.* (1994b) hebben dit gedaan voor geïmmobiliseerde cellen.

Vergelijkingen voor de berekening van karakteristieke tijden zullen gegeven worden en aan de hand van een voorbeeld wordt zo'n analyse geïllustreerd. Drie typen karakteristieke tijden zullen behandeld worden:

1. karakteristieke tijden van transportsnelheden: stoftransport van de gas naar vloeibare fase en vloeibare naar vaste fase
2. karakteristieke tijden van omzettingssnelheden: omzettingssnelheden van de geïmmobiliseerde cellen
3. ontwerpspecifieke karakteristieke tijden: uitputting van de gasbel, gasbelverblijftijd, menging en vloeistofverblijftijd

Karakteristieke tijden voor transportsnelheden en omzettingssnelheden kunnen direct vergeleken worden. Indien de karakteristieke tijd van één van die processen significant hoger is, is dat proces snelheidsbepalend. Het totale proces kan dan geoptimaliseerd worden door die specifieke stap te optimaliseren.

Ontwerpspecifieke karakteristieke tijden kunnen niet direct vergeleken worden met karakteristieke tijden voor transport en omzetting. Ontwerpspecifieke karakteristieke tijden zijn voorwaardescheppend voor de andere karakteristieke tijden; berekening van karakteristieke tijden voor transport en omzetting zijn alleen betrouwbaar indien geen uitputting van gasbellen plaatsvindt of indien de mengtijd kort genoeg is. Indien de uitputtingstijd van de gasbellen veel korter is dan de gasbelverblijftijd zal de gas/vloeistofoverdracht kleiner zijn dan gesuggereerd op basis van de karakteristieke tijd berekeningen. In dat geval is duidelijk de verblijftijd van de gasbel de beperkende factor en is het zinvol de hoogte van de reactor te reduceren. Indien de hydraulische verblijftijd in de orde van grootte of lager is dan de mengtijd betekent dit dat de reactor niet als ideaal gemengd beschouwd kan worden wat resulteert in substraatgradiënten over de reactor. In dat geval zullen de karakteristieke tijden voor omzetting onjuist berekend zijn, omdat daarbij een homogene verdeling van substraat in de vloeistoffase aangenomen wordt.

In geval van geïmmobiliseerde cellen zijn er drie fasen aanwezig; de gas, vloeistoffase en vaste fase. Karakteristieke-tijdberekeningen dienen altijd gebaseerd te zijn op dezelfde fase om waarden met elkaar te kunnen vergelijken. Het meest eenvoudige is uit te gaan van de vloeibare fase. Hunik *et al.* (1994b) berekende hiervan uitgaande op de volgende manier karakteristieke tijden:

### 2.5.1 transportsnelheden

- zuurstofoverdracht van de gas- naar vloeibare fase ( $\tau_{lg}^0$ ):

$$\tau_{lg}^0 = \frac{1}{k_{lg} \cdot a_{lg}} \quad (12)$$

- overdracht van de vloeibare naar vaste fase ( $\tau_{ls}$ ):

$$\tau_{ls} = \frac{1}{k_{ls} \cdot a_{ls}} \quad (13)$$

Voor elk substraat kan  $\tau_{ls}$  berekend worden.

### 2.5.2 omzettingssnelheden

- substraatomzetting door gesuspenderde cellen ( $\tau_{kin}$ ):

De karakteristieke tijd  $\tau_{kin}$  voor substraatomzetting door vrije cellen wordt bepaald door de biomassaconcentratie, de substraatconcentratie en de kinetische parameters (Roels 1983):

$$\tau_{kin} = \frac{S}{\left( \frac{\mu_{max} \cdot X}{Y} \right) \cdot \left( \frac{S}{K_S + S} \right)} \quad (14)$$

De situatie in gelbollen is gecompliceerder omdat de substraat- en biomassaconcentraties variëren met de radiale positie in de gelbollen. Het is onmogelijk een overall karakteristieke tijd voor transport of omzetting in zo'n situatie te definiëren. Om deze reden leidde Hunik *et al.* (1994b) de volgende karakteristieke tijd voor geïmmobiliseerde cellen af ( $\tau_{conv}$ ):

$$\tau_{conv} = \frac{S_s}{k_{ls} \cdot a_{ls} \cdot (S_b - S_s)} \quad (15)$$

De oppervlakteconcentratie is niet eenvoudig te meten. Deze concentratie kan echter berekend worden met de hierboven beschreven dynamische modellen. In het hier gebruikte voorbeeld wordt het model voor geïmmobiliseerde cellen gebruikt (multi-species model). De oppervlakteconcentratie is berekend in steady state na 50 dagen kweken.

### 2.5.3 ontwerp-specifieke snelheden

- zuurstofuitputting van de gasbel ( $\tau_{ex}^0$ )

$$\tau_{ex}^0 = \frac{H}{k_{lg} \cdot a_g} \quad (16)$$

$\tau_{ex}^0$  is gebaseerd op de gasfase, omdat uitputting van deze fase bekeken wordt.

- gasbelverblijftijd ( $\tau_{ret}^{gas}$ )

In dit voorbeeld wordt een airlift-loopreactor ontworpen. De gasbelverblijftijd in een airlift loop reactor wordt berekend met de verhouding van de reactorhoogte en de stijgsnelheid van de gasbel (ongeveer 0,25 m/s, Heijnen en Van 't Riet 1984). De werkelijke waarde van  $\tau_{ret}^{gas}$  zal iets lager zijn dan berekend indien vloeistofcirculatie in de reactor meegenomen wordt.

- mengtijd ( $\tau_{mix}$ )

In een airlift-loopreactor wordt de mengtijd berekend uit de vloeistofcirculatielijktijd ( $\tau_{circ}$ ) zoals gegeven is door Verlaan (1987):

$$\tau_{mix} = (4 \text{ to } 7) \cdot \tau_{circ} \quad (17)$$

De waarde van  $\tau_{circ}$  kan eenvoudig gemeten worden in een bestaande reactor of berekend worden uit een bekend reactorontwerp (Verlaan 1987).

- vloeistofverblijftijd ( $\tau_{ret}^{liq}$ ):

De vloeistofverblijftijd ( $\tau_{ret}^{liq}$ ) is de reciproke waarde van de verdunningssnelheid.

#### 2.5.4 reactorontwerp

Regime-analyse werd toegepast voor nitrificatie met gecoïmmobiliseerde cellen in een continu bedreven airlift loop reactor. De capaciteit in de reactor was  $2 \times 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{dag}^{-1}$ , de ammonium-N concentratie in het influent 28 mg/l en het rendement van omzetting 75%. Een 'ruw' ontwerp van een reactor met 25% bollen van een diameter van 2 mm resulteerde in een volume van de reactor van  $278 \text{ m}^3$  (Hunik *et al.* 1994b). De verhouding tussen hoogte van de riser en diameter was 10 : 1 en tussen de diameters van riser en downcomer 2 : 1. Resultaten van de karakteristieke-tijdberekeningen voor dit ontwerp zijn gegeven in tabel 2.1. Karakteristieke tijden voor de verschillende omzettingssnelheden zijn in dezelfde orde van grootte. Snelheden van omzetting en transport zijn eveneens in dezelfde orde van grootte. In die zin is het ontwerp optimaal. De karakteristieke tijd voor gas/vloeistof overdracht is in geringe mate hoger wat aangeeft dat deze stap snelheidsbepalend is. Het ontwerp van de reactor zou verder geoptimaliseerd kunnen worden door deze stap te optimaliseren.

Met betrekking tot de ontwerpspecifieke karakteristieke tijden kan opgemerkt worden dat het proces hier ook optimaal is, omdat de gasfase niet uitgeput raakt ( $\tau_{ex}^{O_2} > \tau_{gas}^{ret}$ ) en de reactor voldoende gemengd is ( $\tau_{mix} > \tau_{liq}^{ret}$ ). Geconcludeerd kan worden dat de snelheid van het proces gelimiteerd wordt door de zuurstofoverdracht.

Tabel 2.1: Karakteristieke tijden voor transport, omzetting en ontwerp-specifieke karakteristieke tijden voor nitrificatie met gecoïmmobiliseerde cellen (Hunik *et al.* 1994b)

Karakteristieke tijden (s)	
<b>Transport snelheden</b>	
$\tau_{lg}^{O_2}$	98-38
$\tau_{ls}^{O_2}$	35
$\tau_{ls}^{NH_4}$	42
<b>Omzettingssnelheden</b>	
$\tau_{conv}^{NH_4}$	61
$\tau_{conv}^{NO_2}$	26
$\tau_{conv}^{O_2}$	11
<b>Ontwerp-specifieke snelheden</b>	
$\tau_{ex}^{O_2}$	78
$\tau_{gas}^{ret}$	20
$\tau_{mix}$	180-160
$\tau_{liq}^{ret}$	1200

De parameters voor gas/vloeistof transport ( $H$ ,  $k_{lg}$ ) zijn verkregen uit Heijnen en Van 't Riet (1984). Een gas hold-up van 0,02-0,05 werd aangenomen op basis van Verlaan (1987) en Chisti (1989). Kinetische parameters werden verkregen van Hunik *et al.* (1994a). Waardes van mengtijden werden gehaald uit Van 't Riet en Tramper (1991) en Verlaan (1987).





## 3 Materialen en methoden

### 3.1 Kweken van gesuspenderde cellen

*Nitrosomonas europaea* werd gekweekt in een chemostaat van 3 dm<sup>3</sup> bij een verdunnings-snelheid van  $3,47 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  bij 30°C. Het kweekmedium bevatte per m<sup>3</sup> gedemineraliseerd water: 19,0 mol (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,21 mol MgSO<sub>4</sub>; 5 mol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 mol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 mmol CaCl<sub>2</sub>; 9 mmol FeSO<sub>4</sub> en 0,5 mmol CuSO<sub>4</sub>. De pH werd geregeld op 7,4 met 7 M NaHCO<sub>3</sub>.

*Nitrobacter agilis* werd gekweekt in een chemostaat van 3 dm<sup>3</sup> bij een verdunnings-snelheid van  $3,5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  bij 30°C. Het kweekmedium bevatte per m<sup>3</sup> gedemineraliseerd water: 14,5 mol NaNO<sub>2</sub>; 0,2 mol MgSO<sub>4</sub>; 5 mol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7,6 mol Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mmol Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0,015 mmol ZnSO<sub>4</sub>; 0,016 mmol CuSO<sub>4</sub> en 5 mmol CaCl<sub>2</sub>. Per mol nitriet werd 0,02 mol NaHCO<sub>3</sub> toegevoegd. The pH werd gesteld op 7,8 met behulp van 2 M KOH.

### 3.2 Immobilisatie

De celsuspensie werd gecentrifugeerd gedurende 10 minuten bij 16300 g en 5 °C en gewassen met 15,4 mM NaCl. Een 3 % κ-carrageenanoplossing (Genugel X0828, A/S Kobenhavns Pektinfabrik, DK Lille Skensved) werd gemengd met de gewassen celsuspensie. De eindconcentratie carrageen was 2,6 %.

Immobilisatie werd uitgevoerd met de druppeltechniek of de resonantienozzle (Hulst *et al.* 1985) bij 35°C. Druppels werden opgevangen in 0,75 M KCl met daarop een laagje decaan bij 5°C. Gelering vond plaats in de KCl oplossing.

Bovenstaande methode werd standaard toegepast. Een aantal andere immobilisatiemethoden zijn eveneens gebruikt:

#### *Carrageen met gom*

Arabische, xanthaan of locust bean gom werden gemengd met carrageen. De totale polymeerconcentratie was 3%. Extrusie werd uitgevoerd met de druppeltechniek.

#### *Carrageen met Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*

Carrageendruppels werden opgevangen in een geroerde 0,15 M Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> oplossing. Gevormde bollen werden 15 minuten in deze oplossing uitgehard.

#### *Ca- en Ba-Ca-alginaat*

Een 2% alginaatsuspensie werd geëxtrudeerd volgens de druppelmethode. De gevormde druppels werden opgevangen in 0,2 M CaCl<sub>2</sub> of een oplossing bestaande uit 0,08 M CaCl<sub>2</sub> en 0,02 M BaCl<sub>2</sub> en uitgehard gedurende 2 uur.

#### *Poly(carbamoylsulfonaat) (PCS)*

Een suspensie van 40% PCS werd gemengd met 0,5 M CaCl<sub>2</sub> tot een concentratie van 10% PCS. De suspensie werd gedruppeld in 0,75% alginaatoplossing (pH 8,5). Een calciumlaagje werd om de PCS druppels gevormd als gevolg van ionotrope gelering van het alginaat. De druppels PCS geleerden vervolgens langzaam als gevolg van de iets verhoogde pH. Na gelering van PCS werd het alginaatlaagje opgelost in 0,1 M Nafosfaatbuffer.

Bij immobilisatie van cellen werd de pH van de PCS oplossing net voor toevoeging van de celsuspensie op 6,5 gebracht.

#### *Polyvinylalcohol (PVA)*

PVA werd geproduceerd volgens twee methoden:

- afwisselend bevriezen en ontdooien

Een 8 of 10% PVA oplossing werd gedruppeld in vloeibare stikstof. De bevroren druppels werden langzaam ontdooid bij 4 °C. De vries-dooistappen werden een aantal malen herhaald. Invriezen gebeurde in de volgende stappen bij -30 °C.

- boorzuurmethode

Een 10% PVA oplossing werd gedruppeld in een verzadigde boorzuroplossing (pH 4). De druppels werden hierin gedurende 24 uur uitgehard. Tevens werd gelying uitgevoerd in een verzadigde borax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) oplossing.

#### *Polyethyleenglycol (PEG)*

Kleine deeltjes werden beschikbaar gesteld door Hitachi Plant Engineering and Construction Co., Tokyo, Japan.

Tevens werd een methode ontwikkeld in samenwerking met Holland Biomaterials Group BV in Enschede.

### **3.3 Kweken van geïmmobiliseerde cellen**

Geïmmobiliseerde cellen werden gekweekt in continu doorstroomde airlift-loopreactoren met een volume van 3,5 dm<sup>3</sup>. Het kweekmedium was identiek aan de media in 3.1, behalve dat de natriumzouten werden vervangen door kaliumzouten en er werd 10,8 mM KCl toegevoegd om carrageen te stabiliseren. Tevens werd de ammonium- of nitrietconcentratie gevarieerd. Ammonium werd toegevoegd in de vorm van  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in plaats van  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Onder standaardcondities vond cultivatie bij 30°C plaats. De temperatuur werd gevarieerd bij bestudering van temperatuureffecten.

Bij het kweken van *Nitrosomonas europaea* vond pH regeling plaats (pH 7,4) door titratie met 7 M  $\text{KHCO}_3$ .

De zuurstofconcentratie werd geregeld door stikstof en lucht of lucht en zuivere zuurstof te mengen. Op deze manier kon de zuurstofspanning in de reactor geregeld worden zonder de superficiële gassnelheid te veranderen (Wijffels *et al.* 1991).

### **3.4 Ammonium-, nitriet- en nitraatbepalingen**

Ammonium, nitriet en nitraat werden spectrofotometrisch bepaald volgens Standard Methods (Greenberg *et al.* 1985) met behulp van een autoanalyser (Skalar 5100).

### **3.5 Activiteitsmeting**

De concentratie van *Nitrosomonas europaea* en *Nitrobacter agilis* zijn vaak te laag om te meten met een directe methode. Het is gebleken dat de meest gevoelige methode hiervoor meting van maximale respiratiesnelheid is via meting van de activiteit in een Biological Oxygen Monitor (BOM). Een BOM is een reactorvaatje dit afgesloten wordt met een zuurstofelectrode waarmee de afname van de zuurstofconcentratie in de tijd gemeten

wordt. De specifieke activiteit van *Nitrosomonas europaea* is  $0,01 \text{ mol O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Wijffels *et al.* 1995b) en van *Nitrobacter agilis*  $0,007 \text{ mol O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Wijffels *et al.* 1991).

De activiteit werd gemeten in een vaatje van  $8 \text{ cm}^3$  waaraan een bekende hoeveelheid celsuspensie of een bekend aantal gelbollen en  $4 \text{ cm}^3$  fosfaatbuffer (75 mM, pH 7,5) werden toegevoegd. De temperatuur werd geregeld op  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  en de suspensie werd verzadigd met lucht. In geval de activiteit groter dan  $0,002 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{gel}} \cdot \text{s}^{-1}$  was werd zuivere zuurstof in plaats van lucht gebruikt om diffusielimitatie te voorkomen. Het reactorvaatje werd afgesloten met een zuurstofelectrode die de afname in zuurstofspanning ten gevolge van respiratie als functie van de tijd volgde.

Door een kleine opening werd bij meting aan *Nitrosomonas europaea*  $100 \mu\text{l}$  4M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  toegevoegd en bij *Nitrobacter agilis*  $100 \mu\text{l}$  4M  $\text{NaNO}_2$ .

### 3.6 Macroscopische zuurstofconsumptiesnelheid

De macroscopische zuurstofconsumptiesnelheid is de actuele omzettingssnelheid bij de procescondities in de bioreactor uitgedrukt als de hoeveelheid zuurstof die per hoeveelheid gel per tijdseenheid geconsumeerd wordt. De macroscopische zuurstofconsumptiesnelheid werd bepaald aan de hand van de gebruikte hoeveelheid ammonium in het geval van *Nitrosomonas europaea* en nitriet in geval van *Nitrobacter agilis*. De gebruikte hoeveelheid ammonium en nitriet werden via de stoichiometrie van de nitrificatiereactie omgerekend in een zuurstofverbruik. Voor de oxidatie van 1 mmol ammonium is 1,5 mmol zuurstof nodig en voor oxidatie van 1 mmol nitriet is 0,5 mmol  $\text{O}_2$  nodig.

### 3.7 Afsterving van *Nitrosomonas europaea*

*Nitrosomonas europaea* werd gekweekt in een batchcultuur van  $3 \text{ dm}^3$ . De ammoniumconcentratie op tijdstip 0 was 75 mM. De pH werd geregeld op 7,5 met 7 M  $\text{NaHCO}_3$ .

Om biomassa-afsterving in afwezigheid van zuurstof te bepalen werd nadat 67% van het ammonium was omgezet stikstofgas toegevoegd in plaats van lucht. Vervolgens werden monsters genomen waarvan de activiteit gemeten werd in een Biological Oxygen Monitor. Afsterving werd tevens gemeten in afwezigheid van ammonium. Op het moment dat alle ammonium verbruikt was werd de activiteit als functie van de tijd gemeten.

Afsterving werd tevens gemeten met behulp van kleuringsmethoden. Hiertoe werd onderscheid gemaakt tussen levende cellen (fluoresceinediacetaat) en dode cellen (lissaminegroen). Door beide kleuringen simultaan toe te passen kan met een fluorescentiemicroscoop de verhouding tussen levende en dode cellen in een preparaat bepaald worden.

## 3.8 Celkleuringen

### 3.8.1 Fluoresceinediacetaat (FDA)

Levende cellen werden gelabeld met fluoresceinediacetaat (FDA).

Een geconcentreerde oplossing van 0,5 % FDA in aceton werd bewaard bij  $20^\circ\text{C}$ . Direct voor gebruik werd de oplossing 25x verdund in groeimedium.

Gesuspendeerde cellen werden gekleurd door een druppel FDA-oplossing te mengen met een druppel celsuspensie en het preparaat te observeren met een fluorescentiemicroscoop.

bij UV-licht. Levende cellen lichten op als groen/geel en dode cellen zijn niet zichtbaar. Geïmmobiliseerde cellen werden gekleurd door 0,5 ml FDA oplossing toe te voegen aan 10 gelbolletjes. Na 5 minuten werden de gelbollen gesneden met een scheermesje en plakjes werden geobserveerd met een fluorescentiemicroscop onder UV-licht. Levende cellen kleurden groen/geel en dode cellen bleven onzichtbaar. Voordat deze methode toegepast werd, werden incubatietijden en FDA concentraties geoptimaliseerd door deze te variëren. Incubatietijden van 1, 5 en 30 minuten en 0,2, 0,5 en 1 ml FDA oplossing werden getest. De uiteindelijk toegepaste combinatie bleek het meest optimaal te zijn.

### 3.8.2 Lissaminegroen

Dode cellen werden gelabeld met lissaminegroen.

Een oplossing van 0,2 % lissaminegroen in groeimedium werd bewaard bij  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Gesuspendeerde cellen werden gekleurd door een druppel van de lissaminegroen-oplossing te mengen met een druppel celsuspensie. Na enkele minuten werden preparaten geobserveerd met een lichtmicroscop. Levende cellen bleven kleurloos en dode cellen werden groen gekleurd.

Geïmmobiliseerde cellen werden gekleurd door 0,5 ml lissaminegroen-oplossing aan 10 bollen toe te voegen. Na ongeveer 5 minuten werden de gelbollen gesneden en geobserveerd met een lichtmicroscop. Levende cellen bleven kleurloos en dode cellen werden groen gekleurd. Voordat deze methode toegepast werd, werden incubatietijden en lissaminegroen concentraties geoptimaliseerd door deze te variëren. Incubatietijden van 1, 5 en 30 minuten en 0,2, 0,5 en 1 ml lissaminegroen-oplossing werden getest. De uiteindelijk toegepaste combinatie bleek optimaal te zijn.

## 3.9 Karakterisering van dragermaterialen

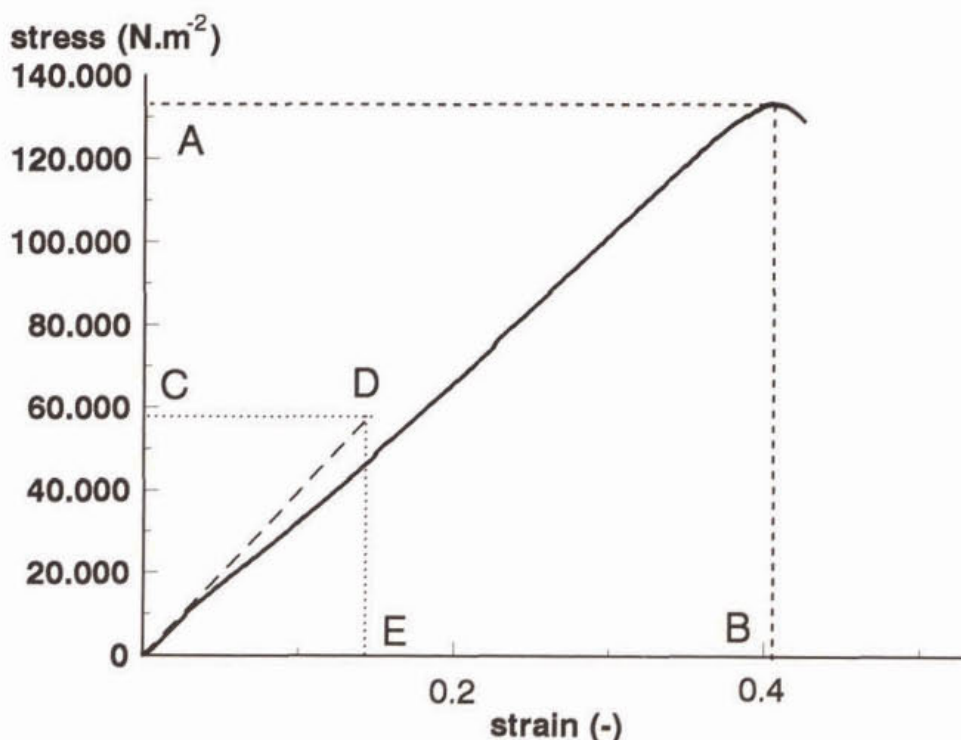
### 3.9.1 Oplosbaarheid

De oplosbaarheid van alginaat werd getest in oplossingen met verschillende concentraties  $\text{CaCl}_2$  en  $\text{NaCl}$ , Ca-fosfaat en Na-fosfaat. Tevens werd de oplosbaarheid gemeten in huishoudelijk afvalwater (proefhal Milieutechnologie Bennekom).

Gelbollen (niet alleen alginaat) werden in contact gebracht met het afvalwater en continu geschud. Dagelijks werd het afvalwater verversd. De diameter van de gelbollen werd gevolgd in de tijd. Experimenten werden uitgevoerd in afvalwater met en zonder toevoeging van 0,0025 M  $\text{NaN}_3$  om een uitspraak te kunnen doen over de biologische afbreekbaarheid van het geteste gelmateriaal.

### 3.9.2. Gelsterkte

Reologische eigenschappen werden bepaald door middel van samendrukken of uit elkaar trekken van gelblokjes. Een voorbeeld van een stress-strain curve verkregen in een drukexperiment is gegeven in figuur 3.1.



Figuur 3.1: Stress-strain curve van een compressietest met 3% carrageen. De compressiesnelheid was  $3 \times 10^{-5} \text{ m. s}^{-1}$ .

De mechanische eigenschappen die uit dergelijke experimenten verkregen kunnen worden zijn (van Vliet *et al.* 1991):

- breekkracht (A): kracht per oppervlakte waarop de kracht wordt uitgeoefend nodig om een gelblokje te breken. Breekkracht wordt uitgedrukt in  $\text{N/m}^2$
- vervorming bij breuk (B): relatieve vervorming bij breuk
- elasticiteitsmodulus (C/E): de reciproke waarde van de vervorming per uitgeoefende hoeveelheid kracht bij kleine vervorming

Samendrukken werd uitgevoerd met een 2000 N load cell (constante snelheid  $3 \times 10^{-5} \text{ m. s}^{-1}$ ). De weerstand van het materiaal werd geregistreerd. Samendrukking vond plaats totdat de blokjes braken.

Trekkrachtmetingen werden bestudeerd met een trekapparaat zoals beschreven door Muscat *et al.* (1993). Het gelblokje werd uit elkaar getrokken met een constante snelheid ( $2,1 \times 10^{-5} \text{ m. s}^{-1}$ ) en de weerstand van het materiaal werd geregistreerd.

Het effect van herhaaldelijke compressies werd uitgevoerd met oscillatiemetingen. Monsters werden samengedrukt met een snelheid van  $30 \text{ mm. min}^{-1}$  totdat de blokjes 75% vervormden. Het indrukken werd 998x herhaald per monster.

Slijtage werd gemeten in bellenkolommen met een diameter van 10 cm en een hoogte van 1 m. De kolommen werden gevuld met 6,45 l 0,134 M KCl oplossing met desinfectant en 560 ml gelbolletjes. De reactoren werden belucht met een debiet van  $1 \text{ m}^3. \text{ uur}^{-1}$ . Slijtage werd gemeten door de concentratie aan suikers in oplossing te volgen in de tijd (gedurende 17 dagen). De suikerconcentratie werd gemeten volgens de fenol/sulfiet-methode van Dubois (1956). De hoeveelheid suikers in oplossing kon omgerekend worden naar een afname in diameter.

### 3.9.3 Groei

Groei in gelmaterialen werd bepaald door na immobilisatie het gelmateriaal in een batchcultuur te brengen met groeimedium. De batchcultuur werd belucht en groei werd aangetoond aan de hand van ammonium-, nitriet- en nitraatanalyses.

## 4 Effect van temperatuurveranderingen op nitrificatie

### 4.1 Inleiding

Het in hoofdstuk 2 beschreven pseudo-homogeen groei-model is onderworpen aan een parametergevoeligheidsanalyse. Het effect van verandering van elke individuele parameter op de macroscopische consumptiesnelheid is onderzocht door simulaties bij die verschillende waarden uit te voeren. Uit deze parametergevoeligheidsanalyse bleek dat parameters als de straal van de bol en vloeistof/vaste-stof-overdrachtscoëfficiënt belangrijk waren. De gevoeligheid op de macroscopische consumptiesnelheid voor variatie van andere parameters bleek veel geringer. Het effect van een verandering van de maximale specifieke groeisnelheid bleek slechts in geringe mate de omzettingssnelheid te beïnvloeden. Als gevolg van immobilisatie is het proces vrijwel ongevoelig voor de kinetiek van de micro-organismen en veel gevoeliger voor veranderingen in transportsnelheden (De Gooijer *et al.* 1991).

Nitrificatie is een proces dat sterk gevoelig is voor veranderingen in temperatuur, omdat de specifieke groeisnelheid bij verlaging van temperatuur aanzienlijk afneemt. Doordat nitrificatie met geïmmobiliseerde micro-organismen veel minder afhankelijk is van de specifieke groeisnelheid wordt verwacht dat dit proces veel stabiel is onder winterse omstandigheden dan een proces met gesuspendeerde bacteriën. De snelheid van nitrificatie met geïmmobiliseerde bacteriën wordt veel meer bepaald door de snelheid van diffusie. Diffusie is veel minder gevoelig voor temperatuurverlagingen dan de specifieke groeisnelheid.

Het effect van temperatuurverlaging op de nitrificatiecapaciteit werd onderzocht aan de hand van de ontwikkelde modellen door voor elke parameter een afhankelijkheid van temperatuur in te bouwen. Vervolgens werden simulaties uitgevoerd bij verschillende temperaturen en werden modelresultaten experimenteel geverifieerd. In het kader van dit project is het temperatuureffect op geïmmobiliseerde *Nitrobacter agilis* cellen onderzocht. In een samenwerkingsproject met het Norwegian Institute of Water Research in het kader van het EG programma STEP is tevens gekeken naar het effect van temperatuur op geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* cellen en gecoïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* en *Nitrobacter agilis* cellen. Resultaten van dit onderzoek worden kort gerapporteerd.

Resultaten van alle uitgevoerde experimenten zijn gebruikt om een reactor voor nitrificatie van huishoudelijk afvalwater bij 7°C te ontwerpen. Dit ontwerp zal vergeleken worden met het ontwerp dat uitgevoerd is in hoofdstuk 2. Het enige verschil in uitgangsomstandigheden is dat in hoofdstuk 2 uitgegaan is van een temperatuur van 30°C.

### 4.2 Temperatuureffect op modelparameters

De meeste parameters van de in hoofdstuk 2 beschreven modellen zijn gevoelig voor temperatuurveranderingen. Effect van temperatuurveranderingen wordt in de verschillende modellen geïmplementeerd door temperatuurafhankelijke relaties voor de parameters in te bouwen.

Alle parameters worden beschouwd als snelheidsconstanten die middels een Arrheniusvergelijking afhankelijk zijn van de temperatuur:

$$Z^T = z^\infty \cdot e^{\left(\frac{-E_a}{R \cdot T}\right)} \quad (18)$$

Gegevens voor temperatuurrelaties zijn voornamelijk afkomstig uit literatuur. Het effect van temperatuur op de diffusiecoëfficiënt van zuurstof in carrageen is experimenteel bepaald (Wijffels *et al.* 1995a). Resultaten van de literatuurstudie zijn uitgebreid beschreven in Leenen *et al.* (1996c) en Hunik *et al.* (1994b). Resultaten zijn samengevat in tabel 4.1 waar de berekende parameterwaarden bij 30 en 7 °C zijn gegeven.

Tabel 4.1: Model parameters bij 7 en 30°C (Ns = *Nitrosomonas*, Nb = *Nitrobacter*)

parameter	waarde bij 30°C	waarde bij 7°C	dimensie
<b>CONVERSIE</b>			
$\mu_{max}^{Ns}, \mu_{max}^{Nb}$	$1,59 \cdot 10^{-5}; 1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-6}; 2,3 \cdot 10^{-6}$	$s^{-1}$
$m^{Ns}, m^{Nb}$	$9,4 \cdot 10^{-4}; 2,2 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-4}; 6,4 \cdot 10^{-4}$	$molN.(kg\ biom.)^{-1}.s^{-1}$
$Y^{Ns}, Y^{Nb}$	$1,66 \cdot 10^{-3}; 0,58 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-3}; 0,58 \cdot 10^{-3}$	$(kg\ biom.). molN^{-1}$
$K_S^{NH_4, Ns}$	$1,25 \cdot 10^{-3}$	$1,16 \cdot 10^{-4}$	$mol.dm^{-3}$
$K_S^{O_2, Ns}$	$5,05 \cdot 10^{-6}$	$9,3 \cdot 10^{-7}$	$mol.dm^{-3}$
$K_S^{NO_2, Nb}$	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$mol.dm^{-3}$
$K_S^{O_2, Nb}$	$17,0 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-6}$	$mol.dm^{-3}$
			$mol.dm^{-3}$
<b>TRANSPORT gas-vloeistof</b>			
$k_{lg}(O_2)$	$4,4 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$	$m.s^{-1}$
$H$	39	25	$m^3.m^{-3}$
$d_b$	$6 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	m
<b>TRANSPORT vloeistof-vaste stof</b>			
$k_{ls} N-comp; O_2$	$2,65 \cdot 10^{-5}; 3,13 \cdot 10^{-5}$	$1,41 \cdot 10^{-5}; 1,75 \cdot 10^{-5}$	$m.s^{-1}$
$R_p$	$1 \cdot 10^{-3}$		m
$\varepsilon_x$	0,25		[-]
$\omega$	$8,4 \cdot 10^{-4}$	$1,66 \cdot 10^{-3}$	$N.s.m^{-2}$
$D_w N-comp; O_2$	$2,2 \cdot 10^{-9}; 2,83 \cdot 10^{-9}$	$1,1 \cdot 10^{-9}; 1,55 \cdot 10^{-9}$	$m^2.s^{-1}$
$D_{e,R} N-comp; O_2$	$1,9 \cdot 10^{-9}; 2,05 \cdot 10^{-9}$	$1,0 \cdot 10^{-9}; 1,2 \cdot 10^{-9}$	$m^2.s^{-1}$

### 4.3 *Nitrobacter agilis*

Het effect van lage temperaturen op de capaciteit van geïmmobiliseerde *Nitrobacter agilis* werd onderzocht met behulp van het pseudo-homogeen groeimodel waarin vergelijkingen, die het verband tussen temperatuur en de waarde van de parameter beschrijven, zijn



opgenomen. Modelresultaten werden gevalideerd in een continu doorstroomde airlift-loopreactor bij verschillende temperaturen. Hierbij werd het effect van opstarttemperatuur en het effect van een temperatuurverandering na evenwicht in macroscopische consumptiesnelheid bestudeerd. In dit onderzoek werd altijd gewerkt met een constante zuurstofconcentratie in de vloeistoffase. Gas/vloeistoftransport werd niet meegenomen. Temperatuurverlaging zou op dit proces een positieve invloed hebben, omdat bij lage temperatuur de zuurstofverzadigingsconcentratie hoger is.

Tevens werd met behulp van een temperatuurgevoelighedsanalyse de snelheidsbepalende parameter geïdentificeerd.

#### 4.3.1 Modelvalidatie: opstarttijd als functie van temperatuur

Geïmmobiliseerde *Nitrobacter agilis* cellen werden gekweekt in airlift-loopreactoren bij 30, 15, 11 en 6°C. De gemeten omzettingssnelheden (macroscopische zuurstofconsumptiesnelheid) werden vergeleken met de modelvoorspellingen (figuur 4.1).

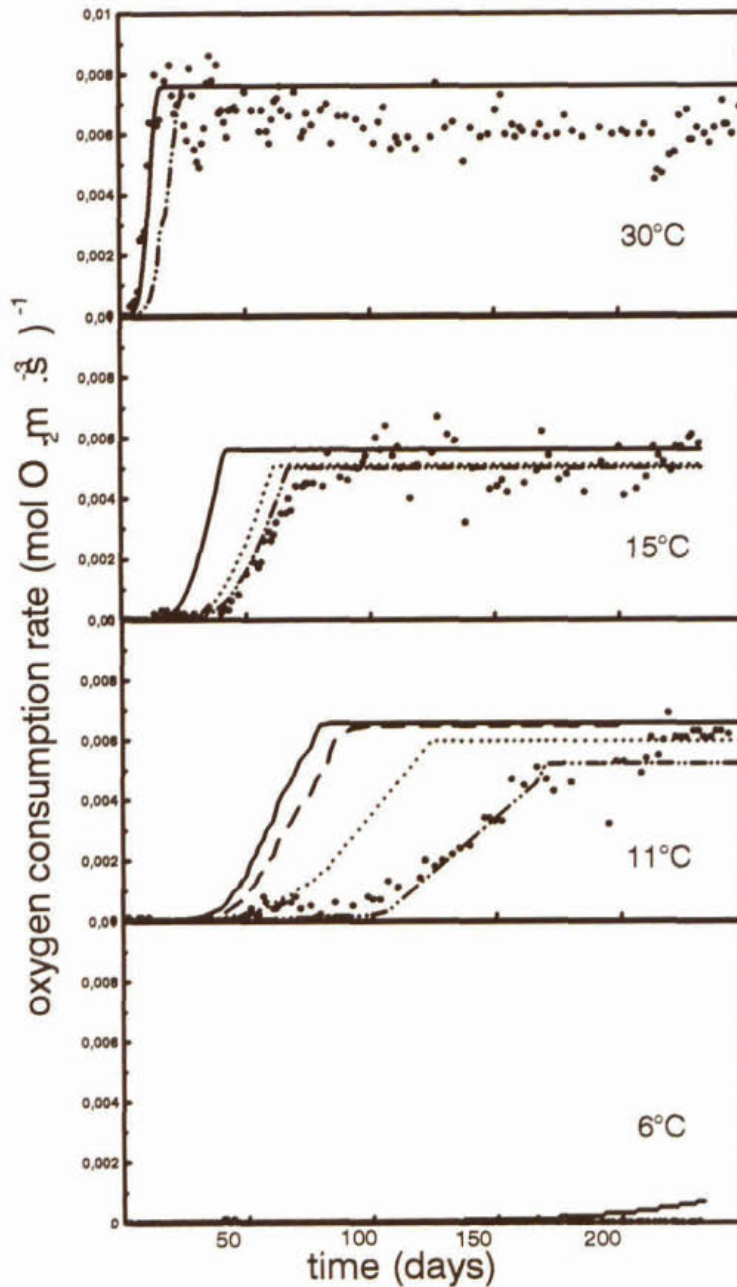
Figuur 4.1 laat zien dat in de steady state experimentele resultaten in het algemeen goed overeen kwamen met de modelresultaten, maar dat de opstartfase niet goed voorspeld werd. Bij 30 °C kwam de opstartfase goed overeen met het voorspelde verloop, terwijl de uiteindelijk bereikte capaciteit iets lager was dan verwacht. Bij lagere temperaturen was het precies andersom. De uiteindelijk bereikte capaciteiten kwamen goed overeen met de voorspelde waarden, maar de opstartfase werd onvoldoende door het model beschreven. Bij 15 °C werd de maximale macroscopische zuurstofconsumptiesnelheid bereikt na ongeveer 70 dagen, terwijl voorspeld werd dat die bereikt zou worden na 50 dagen. Bij 11 °C was dit effect nog duidelijker. In het experiment werd de maximale capaciteit bereikt na 250 dagen terwijl het model berekende dat dit na 80 dagen reeds bereikt zou zijn. Bij 6 °C bleek het niet mogelijk te zijn om het nitrificatieproces op te starten. Zowel modelresultaten als experimentele resultaten lieten zeer lage nitrificatiesnelheden zien na bijna een jaar groei.

Verschillen tussen modelresultaten en experimentele resultaten kunnen verklaard worden aan de hand van de snelheid waarmee de biomassaconcentratie toenam in de opstartfase. De groeisnelheid is in deze fase de snelheidsbepalende parameter (zie temperatuurgevoelighedsanalyse). De in het model gebruikte waarden van de groeisnelheid zijn gebaseerd op waarden die gevonden zijn in de literatuur. Bij 30 °C gaf de gebruikte parameterwaarde bevredigende modelvoorspellingen. Bij lagere temperaturen is de gevoeligheid van het model voor bepaalde parameters anders. Onnauwkeurigheden in de waarden van de parameters kunnen een veel groter effect hebben op de macroscopische consumptiesnelheid bij deze andere procescondities. In figuur 4.1 is aangegeven, dat indien de maximale specifieke groeisnelheid 20 of 40% lager zou zijn, de modelvoorspellingen in de opstartfase veel beter overeenkomen met de experimentele resultaten. Tevens is het mogelijk dat de afwijking veroorzaakt werd door een overschatting van de initiële biomassaconcentratie. De initiële biomassaconcentratie is bij de gebruikte lage concentraties moeilijk met grote nauwkeurigheid te bepalen. In figuur 4.1 is geïllustreerd dat een onderschatting met een factor 2 resulteert in het verschuiven van de tijd waarna steady state bereikt wordt.

De waargenomen gevoeligheid voor temperatuurverandering in de opstartfase was in overeenstemming met de verwachtingen. Onder deze omstandigheden is het proces veel gevoeliger voor de groeisnelheid en dus veel gevoeliger voor temperatuurveranderingen.

De uiteindelijke capaciteit die echter bereikt wordt, is veel minder afhankelijk van de temperatuur, omdat het proces dan diffusiegelimiteerd is. Dit werd zowel door het model

als door de uitgevoerde experimenten aangetoond. De capaciteit bij 11 en 15 °C was meer dan 80 % van de capaciteit bij 30 °C. Om deze reden is het efficiënter (experimenteel en in de praktijk) het proces bij hogere temperatuur op te starten en na verloop van tijd de temperatuur te verlagen.

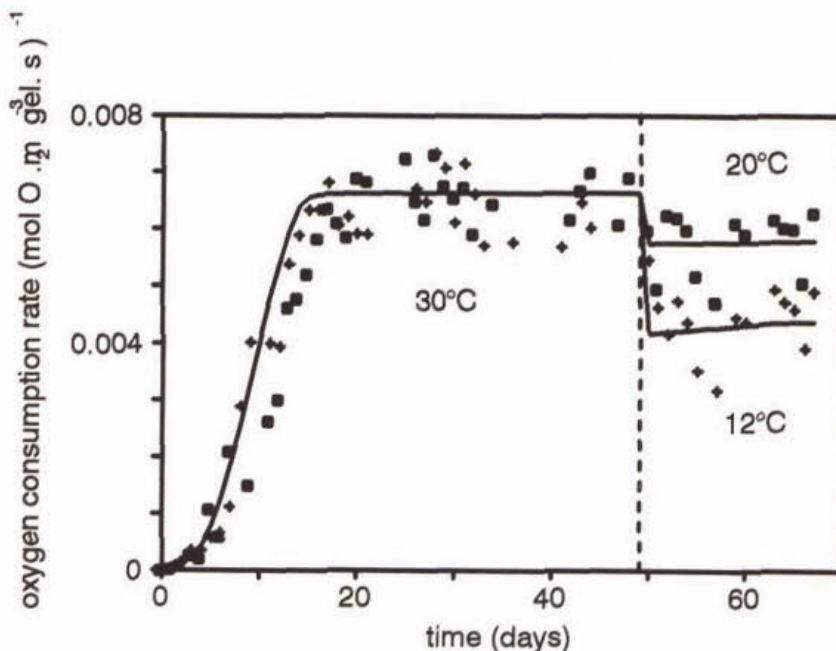


Figuur 4.1: Experimentele (punten) en modelresultaten (lijn) van de macroscopische consumptiesnelheid van geïmmobiliseerde *Nitrobacter agilis* bij 6, 11, 15 en 30°C. Stippellijn en streep-stippellijn geven de modelresultaten weer bij een maximale specifieke groeisnelheid die respectievelijk 20 en 40% lager is dan standaard. De streepjeslijn geeft modelresultaten weer bij een initiële biomassaconcentratie die 2x lager is.

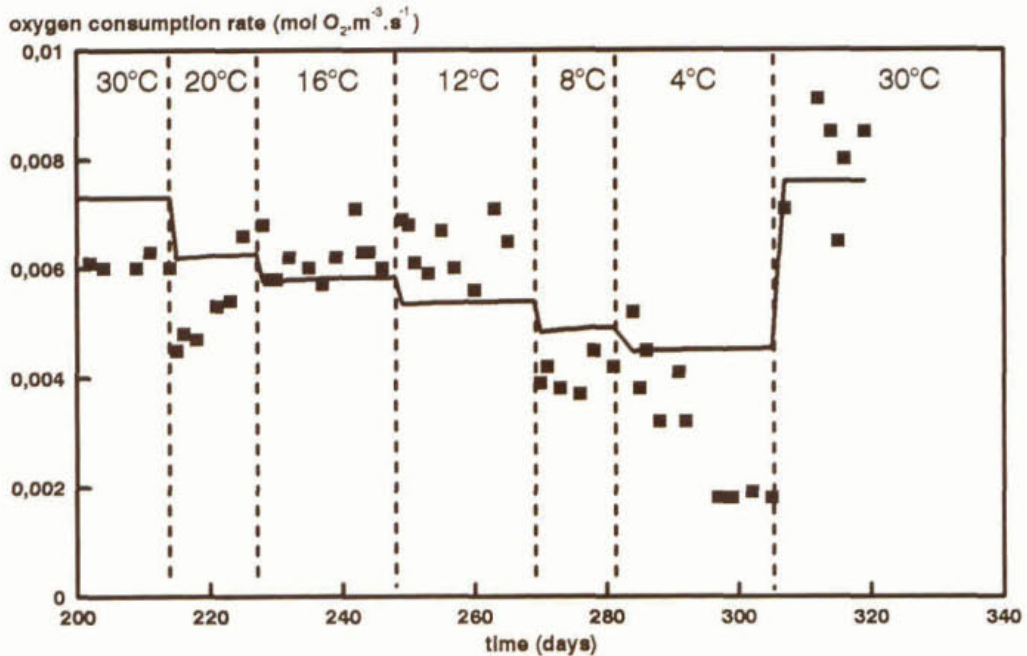
### 4.3.2 Modelvalidatie: dynamisch gedrag

Airlift-loopreactoren met geïmmobiliseerde *Nitrobacter agilis* cellen werden opgestart bij 30 °C. Na 48 dagen werd de temperatuur verlaagd tot respectievelijk 20 en 12 °C. Experimentele resultaten en modelvoorspellingen van beide reactoren zijn gegeven in figuur 4.2. Uit figuur 4.2 blijkt dat het model de experimenten goed beschrijft, zowel in de opstartfase (bij 30 °C) als na verlagen van de temperatuur. Tevens is duidelijk dat het proces zich direct aanpaste aan de nieuwe situatie en dat de capaciteit van de reactor nauwelijks afnam bij lagere temperatuur.

In een tweede experiment werd de temperatuur na opstart bij 30°C na 215 dagen verlaagd naar achtereenvolgens 20, 16, 12, 8 en 4°C, waarna de temperatuur weer verhoogd werd naar 30°C. In dit experiment werd het percentage zuurstof in de reactor constant gehouden met als gevolg dat de zuurstofconcentratie bij het verlagen van de temperatuur iets toenam. Hiermee werd rekening gehouden bij de modelberekeningen. Resultaten van dit experiment zijn gegeven in figuur 4.3. Tot 12 °C bleek de capaciteit nagenoeg constant. In deze fase werden negatieve effecten van temperatuurverlaging op de bacteriële activiteit volledig gecompenseerd door diffusielimitatie en verbeterde zuurstofoverdracht vanuit de gasfase. Bij 4 en 8 °C nam de capaciteit duidelijk meer af terwijl het model een veel kleinere afname voorspelde. Bij 8°C is de capaciteit echter nog steeds meer dan 60% van de capaciteit bij 30 °C.



Figuur 4.2: Experimentele (punten) en modelresultaten (lijn) van de macroscopische consumptiesnelheid van geïmmobiliseerde *Nitrobacter agilis*. Na 48 dagen kweken bij 30°C werd de temperatuur verlaagd tot respectievelijk 12 en 20 °C.

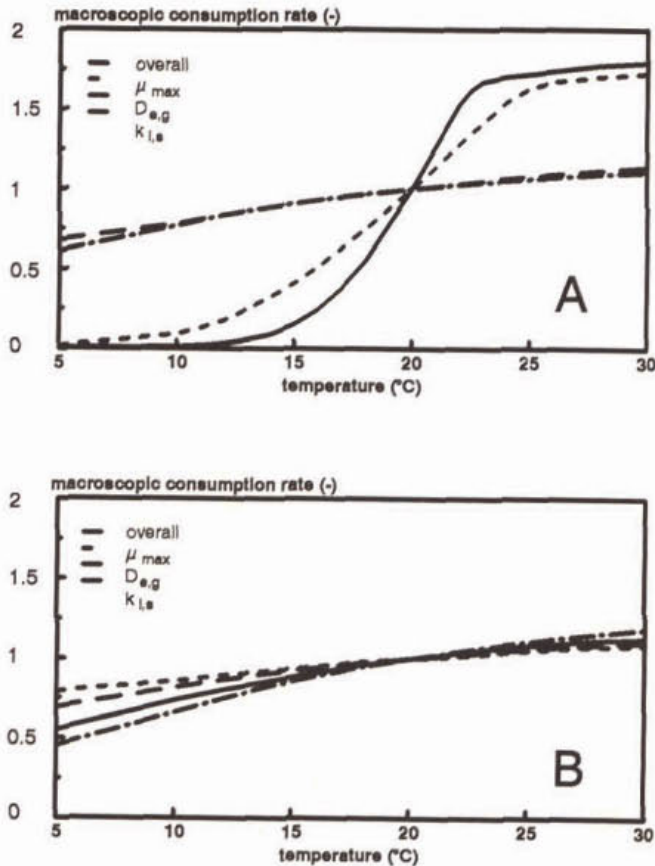


Figuur 4.3: Experimentele (punten) en modelresultaten (lijn) van de macroscopische consumptiesnelheid van geïmmobiliseerde *Nitrobacter agilis*. Na 215 dagen kweken bij 30°C werd de temperatuur stapsgewijs verlaagd tot 20, 16, 12, 8 en 4 °C en weer verhoogd tot 30 °C.

#### 4.3.3 Temperatuurgevoeligheidsanalyse

Om de parameters die de temperatuurgevoeligheid van het totale proces bepalen te kunnen identificeren werd een temperatuurgevoeligheidsanalyse uitgevoerd. De voorspelde nitrificatiecapaciteit van het proces, berekend met een model waarin alle parameters afhankelijk van de temperatuur werden gemaakt, bij temperaturen die varieerden van 5 tot 30°C, werd vergeleken met modelresultaten waarbij telkens slechts één parameter afhankelijk gemaakt was van de temperatuur. De zuurstofconcentratie in de vloeistoffase werd constant gehouden (0.116 mol. m<sup>-3</sup>) en resultaten werden met elkaar vergeleken in de dynamische fase (nog niet volledig gekoloniseerde gelbollen 15 dagen na opstarten) en in evenwicht.

Figuur 4.4 laat zien dat in de opstarttijd (15 dagen) het verloop van de nitrificatiecapaciteit, als functie van de temperatuur berekend door het model waarin alle parameters temperatuurafhankelijk zijn, vrijwel gelijk is aan de modelvoorspellingen waarbij alleen de maximale specifieke groeisnelheid temperatuurafhankelijk is gemaakt. Hieruit blijkt dat in de dynamische fase de gevoeligheid van het totale proces voor de temperatuur met name bepaald wordt door het effect van de temperatuur op de maximale specifieke groeisnelheid. In steady state blijkt het effect van de maximale specifieke groeisnelheid op het proces veel kleiner te zijn. Geen van de parameters heeft een doorslaggevend effect op de temperatuurgevoeligheid van het totale proces wat aangeeft dat een reactor met geïmmobiliseerde cellen vrij ongevoelig is voor temperatuurveranderingen.



Figuur 4.4: Temperatuurgevoeligheidsanalyse in de dynamische fase van geïmmobiliseerde *Nitrobacter agilis* (A) en in steady state (B). De voorspelde zuurstofconsumptiesnelheid is uitgezet als functie van de temperatuur.

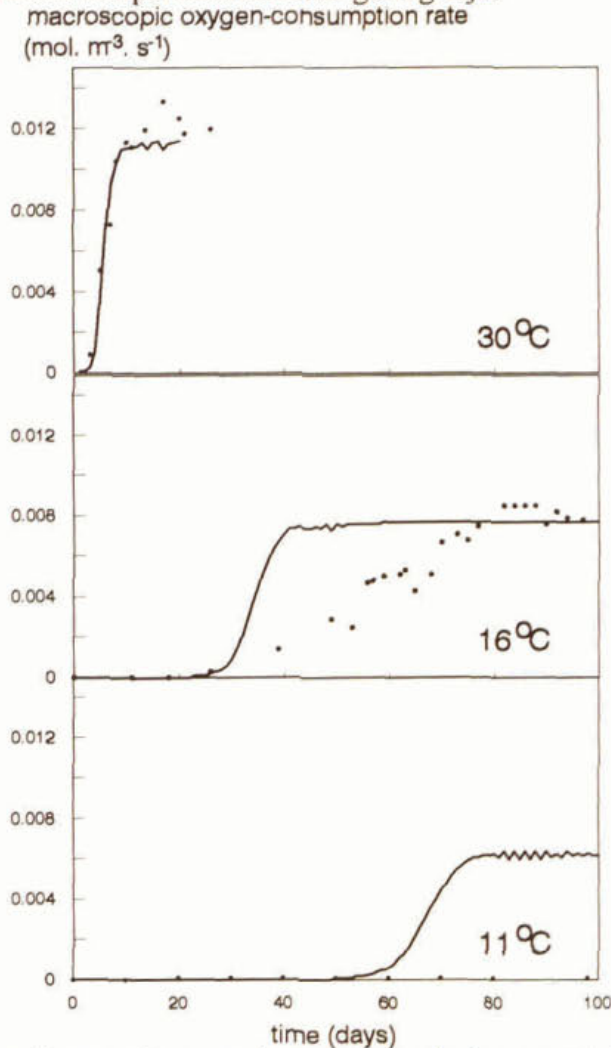
#### 4.4 *Nitrosomonas europaea*

Temperatuurafhankelijke relaties zijn ook ingevoerd in het kolonie-expansiemodel.

Het model werd gevalideerd met geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* cellen. In een eerste serie van experimenten werd opgestart bij verschillende temperaturen tussen 11 en 30°C en bij een tweede serie experimenten werd bij optimale temperatuur opgekweekt waarna de temperatuur geleidelijk verlaagd werd tot 4°C.

Resultaten waarbij het effect van opstarten geïllustreerd wordt, zijn gegeven in figuur 4.5. Evenals bij *Nitrobacter agilis* komen in dit geval modelvoorspellingen niet geheel overeen met experimentele resultaten. Alleen bij 30°C kwamen model- en experimentele resultaten goed overeen. Bij 16 °C werd de evenwichtscapaciteit goed voorspeld, maar het tijdstip waarop evenwicht bereikt werd onderschat. Bij 11°C bleek het niet mogelijk experimenteel

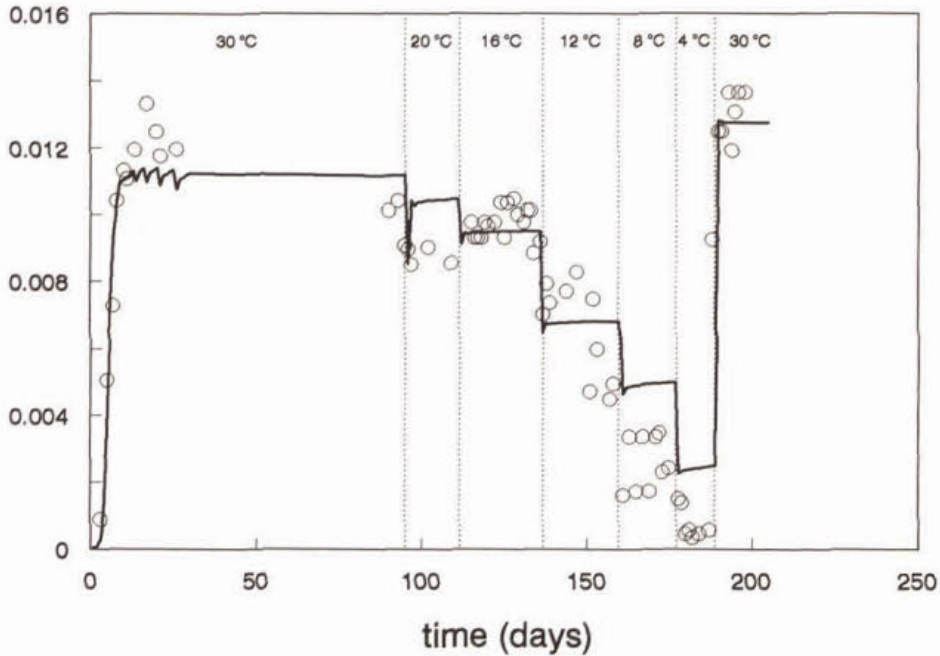
enige activiteit te vinden. De evenwichtscapaciteit die gevonden werd bij 16°C was slechts in geringe mate lager dan bij 30°C en komt dus overeen met de verwachting dat ten gevolge van immobilisatie temperatuureffecten gering zijn.



Figuur 4.5: Effect van temperatuur op de macroscopische zuurstofconsumptiesnelheid van in carrageen geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* cellen. Cultivatie vond plaats in airlift loopreactoren bij 30 °C, 16 °C and 11 °C

In een tweede experiment werden airlift-loopreactoren met geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* cellen opgestart bij 30 °C. Nadat steady state in omzetting was bereikt, werd de temperatuur verlaagd naar 20, 16, 12, 8 and 4 °C. Elke situatie werd gehandhaafd totdat een nieuwe steady state bereikt werd. Aan het einde van het experiment werd de temperatuur opnieuw verhoogd tot 30 °C om de begin- en eindcapaciteit met elkaar te vergelijken. Resultaten van modelvoorspellingen en experimenten zijn gegeven in figuur 4.6. Uit deze figuur blijkt dat model- en experimentele resultaten goed met elkaar overeen kwamen. Het proces past zich direct aan de veranderende temperatuur aan. De capaciteit van het proces wordt weliswaar kleiner ten gevolge van een temperatuurverlaging, echter in beperktere mate dan voor vrije cellen. Tevens is het duidelijk dat het proces gevoeliger is voor temperatuurverlagingen bij temperaturen lager dan 10 °C dan bij temperaturen hoger dan 15 °C.

macroscopic oxygen-consumption rate  
(mol. m<sup>3</sup>. s<sup>-1</sup>)



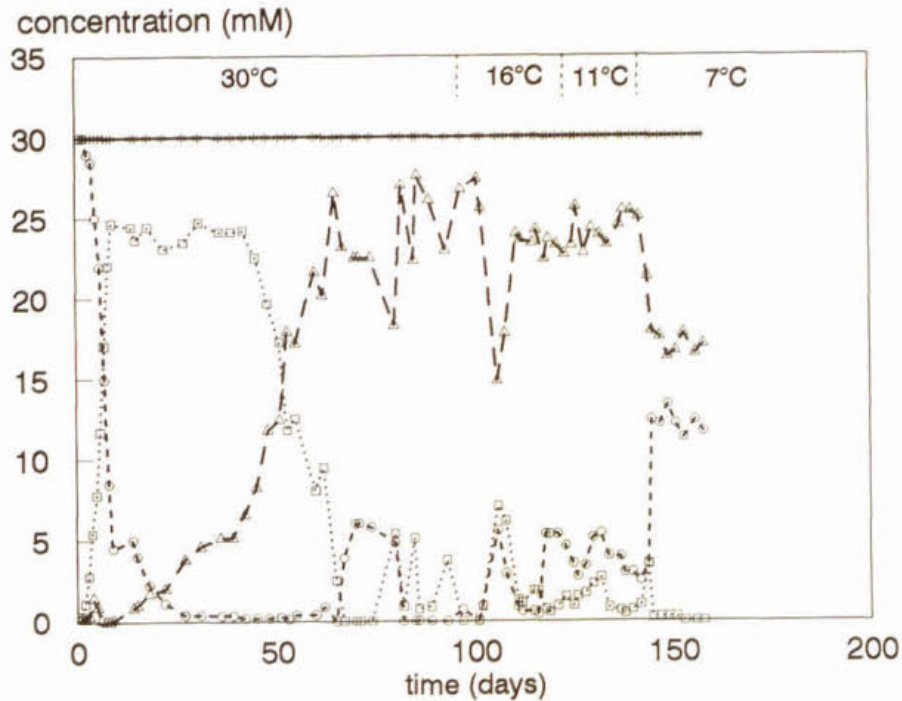
Figuur 4.6: Nitrificatiecapaciteit van in carrageen geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* (uitgedrukt als macroscopische zuurstofconsumptiesnelheid) bij verschillende temperaturen. De experimentele resultaten worden voorgesteld door symbolen, terwijl modelvoorspellingen aangegeven worden met de lijn.

#### 4.5 Coïmmobilisatie

*Nitrosomonas europaea* en *Nitrobacter agilis* werden gecoïmmobiliseerd in carrageen. Reactoren werden opgestart bij optimale temperatuur en na verloop van tijd werd de temperatuur verlaagd. Experimentele resultaten werden vergeleken met modelresultaten. Hiertoe werden temperatuurrelaties aan het multi-species model toegevoegd.

Als voorbeeld worden de resultaten van een proces uitgevoerd bij een constante zuurstofconcentratie van 50% luchtverzadiging gegeven figuur 4.7). De toegepaste verdunningsnelheid was  $4,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .

De reactor werd opgestart bij 30 °C. Ammonium werd omgezet in nitriet. Accumulatie van nitriet resulteerde in groei van *Nitrobacter agilis* die na ongeveer 75 dagen nitriet volledig omzette in nitraat. Na 100 dagen werd de temperatuur stapsgewijs verlaagd tot achtereenvolgens 16, 11 en 7 °C. Uit figuur 4.7 blijkt dat tot 11°C temperatuurverlaging geen aanleiding gaf tot ophoping van nitriet of ammonium. Bij 7°C is er een geringe ophoping van ammonium. De nitrietconcentratie bleef altijd laag.



Figuur 4.7: Effect van temperatuur op de verlaging van de ammonium- ( $\circ$ ), nitriet- ( $\square$ ) en nitraat- ( $\Delta$ ) concentratie in een reactor met een verdunningsnelheid van  $4,6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  en een zuurstofconcentratie van 50 % luchtverzadiging. De influent-ammoniumconcentratie is weergegeven met (\*).

#### 4.6 Gebruik van dynamische modellen voor een rationeel reactorontwerp

In hoofdstuk 2 is met behulp van regime-analyse aangegeven hoe een nitrificatieproces optimaal ontworpen kan worden. De beschreven modellen werden in deze regime-analyse toegepast. Als slot van dit hoofdstuk wordt een reactor met geïmmobiliseerde cellen ontworpen voor nitrificatie bij 7 °C en vergeleken met een ontwerp bij 30 °C.

Als voorbeeld was een afvalwaterstroom in Noorwegen genomen. De concentratie ammonium in het afvalwater was 28 mg N/l. De capaciteit was  $2 \times 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{dag}^{-1}$  (Ødegaard *et al.* 1990). De te ontwerpen reactor diende 75% van het aanwezige ammonium om te zetten. De dimensies van de reactoren, verdunningsnelheden bij beide temperaturen zijn gegeven in tabel 4.2.

Voor details van de regime-analyse van dit proces wordt verwezen naar Hunik *et al.* (1994b).



Tabel 4.2: Reactorontwerp

---

	volume (m <sup>3</sup> )	verd. snelh. (s <sup>-1</sup> )	influent NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mM)	temperatuur (°C)
lage temperatuur	833	2.8 x 10 <sup>-4</sup>	2	7
optimale temperatuur	278	8.3 x 10 <sup>-5</sup>	2	30

---



## 5 Dynamisch gedrag van geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea*: effect van afsterving cellen

### 5.1 Inleiding

Bij de zuivering van rioolwater veranderen procescondities continu. In hoofdstuk 4 is het effect van temperatuurveranderingen beschreven. In hoofdstuk 5 komt verandering van de stikstofbelasting aan de orde. De ontwikkelde dynamische modellen worden hiervoor in een dynamisch proces gebruikt. Met behulp van deze modellen kan geëvalueerd worden of veranderingen in stikstofbelasting door het proces opgevangen kunnen worden. Dit kunnen zowel effecten op lange termijn zijn als het opvangen van piekbelastingen.

In het nitrificatieproces met geïmmobiliseerde cellen wordt slechts een gedeelte van de gelbollen gebruikt omdat er zich een substraatgradiënt over de bollen ontwikkelt. Alleen de buitenste laag van de gelbollen zal actief zijn. Indien de belasting in de reactor verhoogd wordt zal substraat verder in de gelbollen dringen. Indien de in diepere lagen aanwezige cellen leven zal de piekbelasting opgevangen worden. Indien deze cellen dood zijn zal de piekbelasting niet opgevangen worden en resulteert een piekbelasting in een verhoogde effluentconcentratie. Gradiënten in levende biomassa bestaan niet alleen over de gelbollen, maar ook over de microkolonies.

In dit hoofdstuk wordt in eerste instantie afsterving als gevolg van afwezigheid van substraat gemeten. Gemeten afsterfssnelheden worden opgenomen in de dynamische modellen. Tot slot wordt de afsterving als gevolg van substraatlimitatie in de gelbollen gemeten en wordt gedemonstreerd wat het effect is van afsterving op het dynamisch gedrag van geïmmobiliseerde cellen. Alle metingen werden verricht aan *Nitrosomonas europaea*.

### 5.2 Afsterving van biomassa

In alle gebruikte modellen is negatieve groei mogelijk via vergelijking:

$$r_x = \mu X - mY_{xs} X \left( 1 - \frac{S}{K_s + S} \right) \quad (4)$$

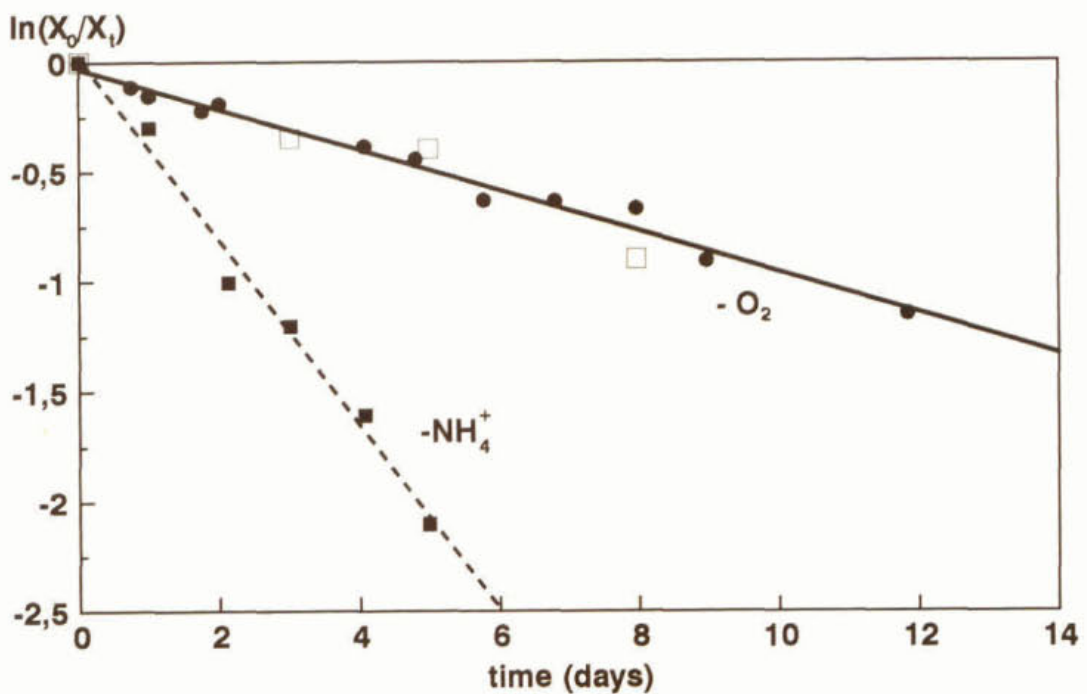
De afstervingsterm ( $mY_{xs}$ ) werd verondersteld constant te zijn, onafhankelijk van het feit of zuurstof of de stikstofbron het limiterende substraat was. In dit onderzoek is de afstervingsterm voor beide situaties bepaald.

Indien de substraatconcentratie 0 is, wordt vergelijking (4) vereenvoudigd tot:

$$r_x = -mY_{xs} X \Rightarrow \ln \frac{X_t}{X_0} = -mY_{xs} t \quad (19)$$

Afsterving van *Nitrosomonas europaea* is gemeten door aan gesuspenderde cellen het verlies aan activiteit te meten als gevolg van afwezigheid van zuurstof of ammonium. Resultaten zijn gegeven in figuur 5.1. In afwezigheid van substraat neemt de activiteit van *Nitrosomonas europaea* af. De afstervingsnelheid in afwezigheid van ammonium blijkt veel groter te zijn dan in afwezigheid van zuurstof. In afwezigheid van zuurstof was de afstervingsnelheid  $1,1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  (7% van  $\mu_{\max}$ ) en in afwezigheid van ammonium

$5,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  (31% van  $\mu_{\text{max}}$ ). Om te controleren of verlies aan activiteit een goede maat voor afstervingsnelheid is, zijn tevens fluoresceïnediacetaat (FDA) en lissaminegroen kleuringen uitgevoerd. Het kleurloze FDA wordt getransporteerd door intacte celmembranen en wordt in levende cellen door esterases omgezet in fluoresceïne dat geel kleurt onder UV licht (dode cellen bevatten geen esterases). Lissaminegroen passeert alleen membranen die niet intact zijn en kleurt vervolgens de celinhoud. Lissaminegroen-positieve cellen zijn met behulp van lichtmicroscopie te zien. Met FDA kunnen derhalve levende cellen gekleurd worden en met lissaminegroen dode cellen. Uit figuur 5.1 blijkt dat de afname van activiteit evenredig is aan de afname van levende cellen volgens de FDA/lissaminegroenkleuring.



Figuur 5.1: Afstervingsnelheid van een *Nitrosomonas europaea* celsuspensie in afwezigheid van zuurstof of ammonium (●, ■ resultaten uit activiteitsmetingen; □ resultaten van de FDA/lissamingroenkleuring)

*Nitrosomonas europaea* blijkt veel gevoeliger te zijn voor een tekort aan ammonium dan voor een tekort aan zuurstof.

Uit de literatuur zijn weinig gegevens bekend over afsterving van reïnculturen van nitrificerende bacteriën. Wijffels *et al.* (1995b) vond een afname van  $1,36 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  in de activiteit van *Nitrosomonas europaea* in afwezigheid van zuurstof. Laudelout *et al.* (1968) geven halfwaardetijden van *Nitrosomonas europaea* en *Nitrobacter agilis* in de range van 30-160 uur, wat overeenkomt met een afstervingsnelheid tussen  $1,2 \times 10^{-6}$  en  $6,4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . De afstervingsnelheden varieerden in dit onderzoek als gevolg van verschillende zuurstofconcentraties. Ook in het onderzoek van Laudelout *et al.* (1968) werden verschillen gevonden in afstervingsnelheden bij afwezigheid of aanwezigheid van zuurstof of ammonium. Uit het onderzoek van Keen en Prosser (1987) kunnen afstervingsnelheden

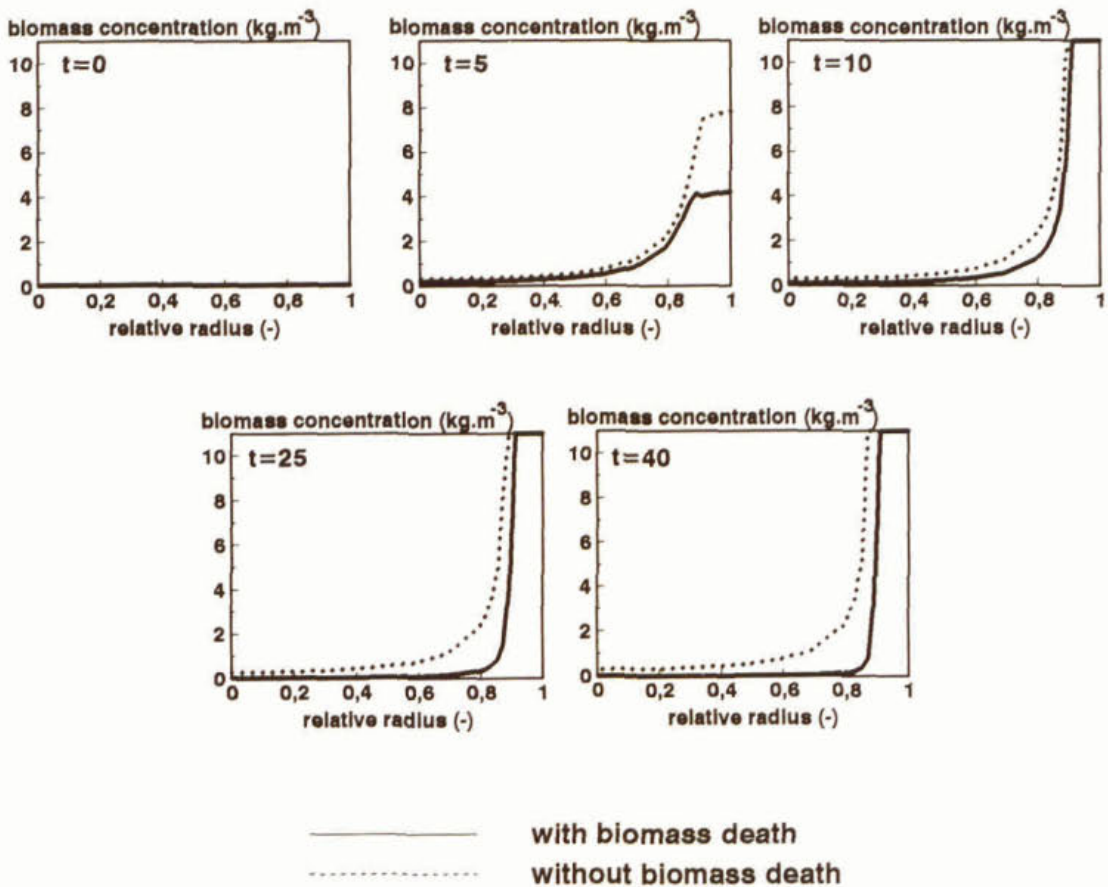
tussen  $2,88 \times 10^{-6}$  en  $7,35 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  voor *Nitrosomonas europaea* afgeleid worden. Waarden uit dit onderzoek komen ook overeen met resultaten gevonden in nitrificerend actief slib. Barnes en Bliss (1983) rapporteerden waarden tussen  $0,5 \times 10^{-6}$  en  $1,2 \times 10^{-6}$ . Emori *et al.* (1996) vonden een afstervingsnelheid van  $2,31 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  voor in polyethyleenglycol geïmmobiliseerd actief slib.

### 5.3 Effect van afsterving van biomassa op de dynamiek van geïmmobiliseerde cellen

De gemeten afstervingsnelheden werden geïmplementeerd in de beschikbare modellen. In dit geval werd de dynamiek bestudeerd aan de hand van het multi-speciesmodel waarbij de concentratie aan *Nitrobacter agilis* 0 verondersteld werd. Dit model had de voorkeur boven het pseudo-homogeen groei-model en het kolonie-expansiemodel, omdat het multi-speciesmodel met verschillende limiterende substraten tegelijkertijd kan werken. Het effect van afsterving op de dynamiek werd gedemonstreerd door simulaties met afsterving (in 5.2 beschreven) en zonder afsterving met elkaar te vergelijken.

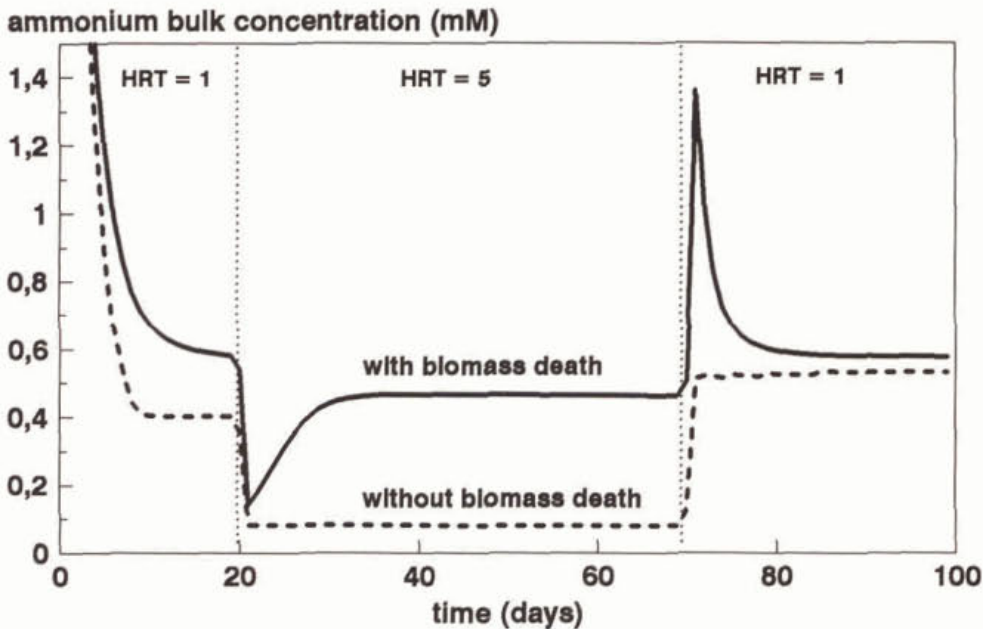
Het effect van afsterving op de ontwikkeling van een biomassaconcentratieprofiel is geïllustreerd in figuur 5.2. Gedurende groei ontwikkelt zich een profiel. Cellen vlak onder het oppervlak van de gelbollen (relatieve straal = 1) hebben een hoge specifieke groeisnelheid omdat de substraatconcentratie daar hoog is en cellen in het centrum van de bollen (relatieve straal = 0) hebben minder substraat en groeien daarom langzamer. Simulaties waarin het effect van afsterving is opgenomen laten een langzamere toename in de biomassaconcentratie zien dan de simulaties waarbij de afstervingsnelheid gelijk aan 0 verondersteld is. Na enkele dagen groei is de substraatconcentratie in het centrum van de bollen bijna 0 met als gevolg dat groei in het centrum nauwelijks plaatsvindt. Indien er geen sprake is van afsterving blijven de cellen in het centrum aanwezig; indien afsterving opgenomen is, leidt dit tot een geleidelijke afname van de biomassaconcentratie in het centrum. Dit kan consequenties hebben voor de dynamiek van het totale systeem. Indien de ammoniumconcentratie in de vloeistoffase verhoogd wordt, zal het substraat verder de bollen in diffunderen. Gelbollen die in de diepere lagen nog actieve biomassa hebben zullen dit ammonium omzetten. Dit wil zeggen dat indien de biomassa-afsterving in diepere lagen gering is het totale systeem piekbelastingen beter kan opvangen dan wanneer de afstervingsnelheid groot is. In dat laatste geval wordt de verhoogde belasting pas opgevangen na groei van cellen. In het hier geïllustreerde voorbeeld bleek de totale biomassaconcentratie na 40 dagen kweken  $84 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  te zijn indien geen afsterving meegenomen werd en  $50 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$  indien afsterving wel werd meegenomen. De macroscopische consumptiesnelheid was in beide situaties echter ongeveer gelijk, nl. respectievelijk  $0,0065$  en  $0,0063 \text{ mol O}_2 \cdot \text{m}^{-3}_{\text{gel}} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Het effect van afsterving op de kwaliteit van het effluent is geïllustreerd in figuur 5.3. Bij deze simulatie werd uitgegaan van een reactor die belast werd met 3 mM ammonium. De zuurstofconcentratie in de reactor bedroeg 0,12 mM. Na 20 dagen kweken werd de hydraulische verblijftijd verhoogd van 1 tot 5 uur en na 70 dagen weer verlaagd tot 1 uur.



Figuur 5.2: Modelvoorspellingen van de ontwikkeling van een biomassaconcentratieprofiel over een gelbolletje met en zonder biomassa-afsterving. De simulaties zijn uitgevoerd met een influent-ammoniumconcentratie van 5 mM, een zuurstofconcentratie in de reactor van 0.12 mM en een hydraulische verblijftijd van 1 uur.

In de eerste periode is de groeisnelheid lager indien er tevens afsterving plaatsvindt en dientengevolge neemt de ammoniumconcentratie in het effluent langzamer af en zal uiteindelijk een klein beetje hoger blijven dan in de situatie waarbij geen afsterving meegenomen wordt. Na verlaging van de hydraulische verblijftijd wordt bijna alle ammonium omgezet. In het geval dat biomassa-afsterving echter een rol speelt, zal de verminderde toevoer van ammonium leiden tot een afname van de biomassaconcentratie en zal de ammoniumconcentratie in het effluent geleidelijk weer hoger worden. In het hier gekozen voorbeeld is de ammoniumconversie zonder afsterving 95%, terwijl indien afsterving meegenomen wordt uiteindelijk een conversie van 80% bereikt wordt. Na het opnieuw verlagen van de hydraulische verblijftijd reageert het systeem waarin afsterving niet plaatsvindt instantaan op de nieuwe situatie en wordt dezelfde conversie bereikt als vóór verhoging van de hydraulische verblijftijd. Indien afsterving wel plaatsvindt, blijkt dat na verlaging van de hydraulische verblijftijd er niet voldoende biomassa aanwezig is om het verhoogde aanbod aan ammonium op te vangen en zal eerst groei moeten plaatsvinden. Dit laatste systeem blijkt na 7 dagen de verlaagde hydraulische verblijftijd opgevangen te hebben.



Figuur 5.3: Modelvoorspellingen van de effluent-ammoniumconcentraties bij een verandering van de hydraulische verblijftijd met en zonder afsterving van biomassa. De simulaties zijn uitgevoerd met een influent-ammoniumconcentratie van 3 mM en een zuurstofconcentratie in de reactor van 0,12 mM. Na 20 dagen werd de hydraulische verblijftijd verhoogd van 1 uur naar 5 uur en na 70 dagen weer verlaagd naar 1 uur.

## 5.4 Modevaluatie

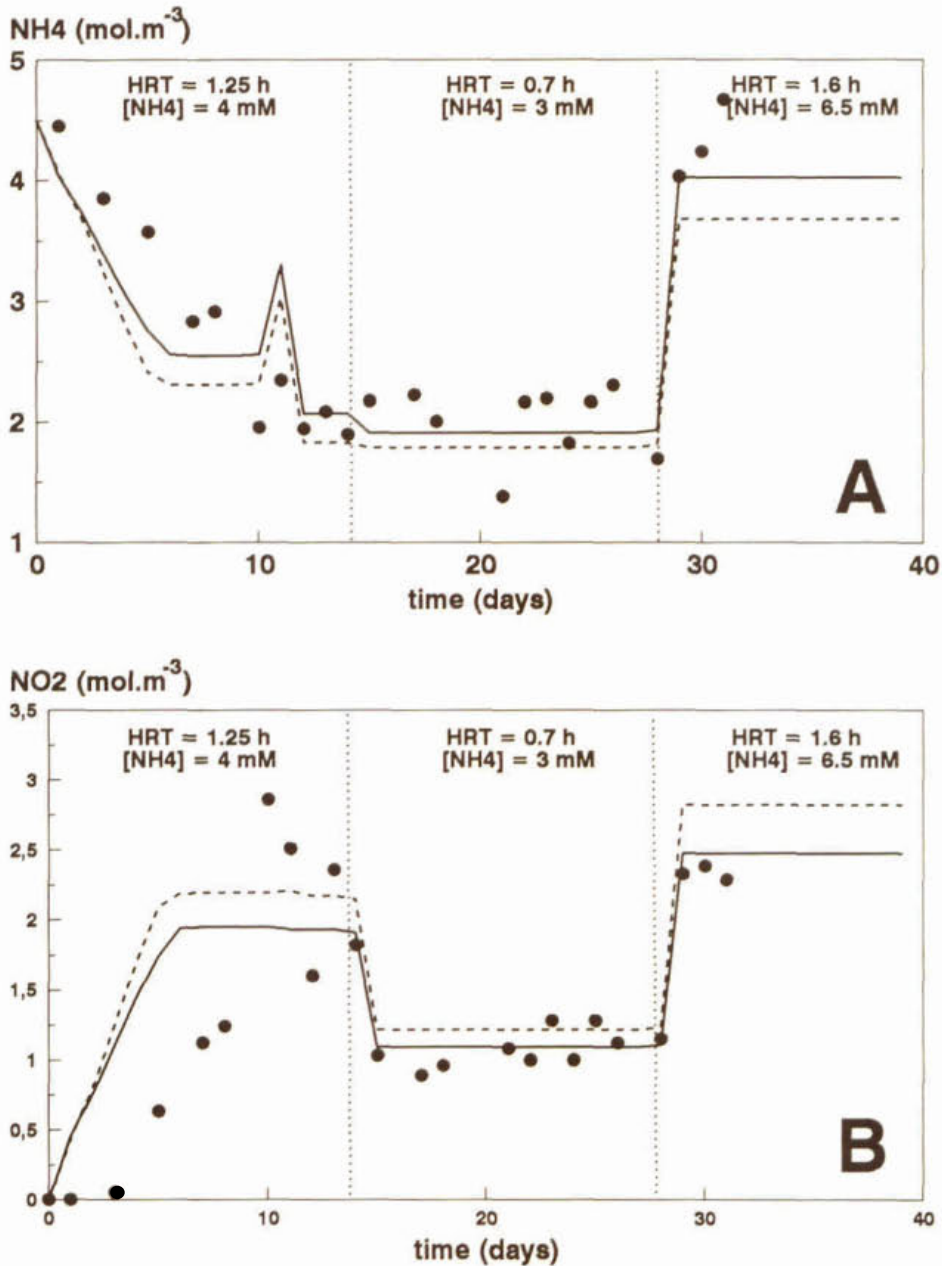
In 5.3 zijn de resultaten gegeven van de modelberekeningen waarbij afsterving van biomassa was opgenomen, zoals die in suspensie was gemeten. De simulaties hebben duidelijk aangetoond dat afsterving van biomassa een belangrijke parameter is voor de dynamiek van het systeem. In het vervolg van dit onderzoek is het beschreven model experimenteel gevalideerd met geïmmobiliseerde cellen.

Hiertoe werd *Nitrosomonas europaea* geïmmobiliseerd en continu gekweekt in een airlift-loopreactor. De reactor werd opgestart met influent met een concentratie van 4 mM ammonium. De hydraulische verblijftijd was 1,25 uur. Na 10 dagen werd de concentratie ammonium verhoogd naar 5,25 mM en na 11 dagen weer teruggebracht naar 4 mM. Na 14 dagen werd de ammoniumconcentratie verlaagd naar 3 mM en de hydraulische verblijftijd verlaagd naar 0,7 uur. Tot slot werd na 28 dagen de ammoniumconcentratie verhoogd naar 6,5 mM en de verblijftijd verhoogd naar 1,6 uur.

Ammonium- en nitrietconcentraties in het effluent werden vergeleken met modelresultaten. Hierbij werden simulaties uitgevoerd met en zonder afsterving. Tevens werd als functie van de tijd met behulp van FDA/lissaminegroenkleuringen gekeken naar de aanwezigheid van dode en levende cellen.

In figuur 5.4 zijn in het effluent gemeten nitriet- en ammoniumconcentraties vergeleken met de modelsimulaties. De eerste 8 dagen is er een verschil tussen gesimuleerde en gemeten waarden. Waarschijnlijk is de hoeveelheid biomassa op  $t = 0$  overschat. De biomassaconcentratie was op dat moment zo laag dat de bepaling moeilijk nauwkeurig was uit te voeren. Na die 8 dagen komen model- en berekende resultaten wel goed overeen. Uit

de resultaten blijkt dat het proces instantaan reageerde op de opgelegde veranderingen. Modelberekeningen waarbij afsterving meegenomen is komen beter overeen met de experimentele data dan wanneer geen afsterving meegenomen is. Met name na 28 dagen, na verhoging van de ammoniumconcentratie in het influent, is dit effect duidelijk waarneembaar. Ammonium- en nitrietconcentraties worden in dat geval respectievelijk duidelijk onderschat en overschat door het model zonder afsterving en goed beschreven door het model waarin afsterving opgenomen is.



Figuur 5.4: Gemeten (datapunten) en berekende (lijnen) ammonium- (A) en nitriet- (B) concentraties in het effluent. De getrokken lijn geeft de modelresultaten weer met afsterving van biomassa en de stippellijn zonder afsterving.



De levensvatbaarheid van de cellen en de ontwikkeling van een biomassaprofiel over de gelbolletjes werd microscopisch gevolgd met behulp van de FDA/lissaminegroenkleuringstechnieken.

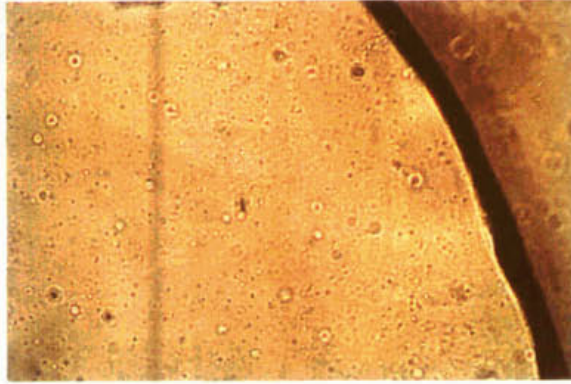
In figuur 5.5 zijn representatieve afbeeldingen van coupes van gelbolletjes afgebeeld. In figuur 5.6 zijn deze foto's schematisch weergegeven. De afbeeldingen aan de linkerkant zijn het resultaat van de lissaminegroenkleuring. De gekleurde cellen zijn derhalve dood. De afbeeldingen aan de rechterkant zijn het resultaat van de FDA-kleuring. De zichtbare cellen zijn derhalve levend.

Gedurende de eerste 4 dagen was de biomassa homogeen verdeeld over de gelbolletjes. Alle cellen waren levend. Na 7 dagen kon duidelijk een biomassaprofiel waargenomen worden. In de buitenste laag ontwikkelde zich een laag van ongeveer 125  $\mu\text{m}$  met kolonies met een diameter van ongeveer 11  $\mu\text{m}$ . De kolonies in het centrum waren duidelijk kleiner. Alle cellen bleken na 7 dagen levend te zijn. De volgende dagen werd het biomassaconcentratieprofiel steeds steiler en na 10 dagen was 90% van de geobserveerde biomassa levend. Net onder het oppervlak van de bolletjes hadden zich kolonies met een diameter van ongeveer 25  $\mu\text{m}$  ontwikkeld. Na 13 dagen groeiden deze kolonies uit tot kolonies met een diameter van 30  $\mu\text{m}$ . In een laag van ongeveer 80  $\mu\text{m}$  waren kolonies met een diameter groter dan 10  $\mu\text{m}$  aanwezig.

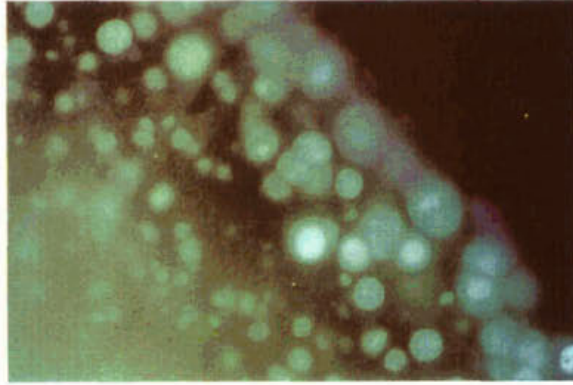
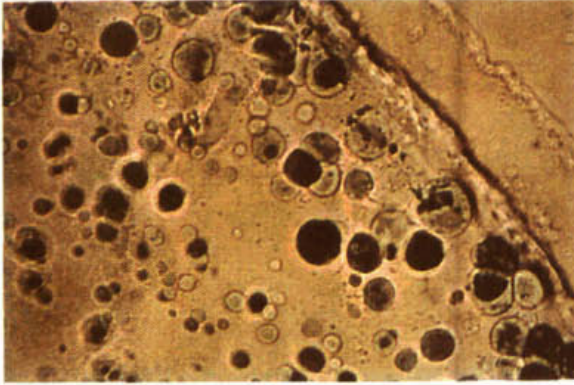
Na 14 dagen bleek ongeveer 60% van de waargenomen hoeveelheid biomassa levend te zijn. Levende cellen werden alleen waargenomen aan de rand van de bolletjes. Biomassa in het centrum bleek niet in staat te zijn FDA om te zetten (ten gevolge van esterase-activiteit) en accumuleerden lissaminegroen (ten gevolge van kapotte celmembranen). Alle cellen in het centrum van de bolletjes bleken dus dood te zijn. Na 17 dagen bleek de fractie levende cellen nog verder afgenomen te zijn (25%). Ook cellen vlak onder het oppervlak bleken af te sterven. Na 22 dagen was nog slechts 10-15% van de cellen levend. Na 28 dagen werd de ammoniumconcentratie in het influent verhoogd. Dit resulteerde in de ontwikkeling van meer levende cellen vlak onder het oppervlak (80%). Op dat moment is bijna geen biomassa meer aanwezig in het centrum van de bolletjes. Afsterving heeft daar duidelijk plaats gevonden en de dode cellen waren gelyseerd.

De gemeten dikte van de actieve cellaag in de bolletjes werd vergeleken met de berekende cellaag met het model waarin afsterving opgenomen was. Figuur 5.7 laat duidelijk zien dat gesimuleerde en gemeten waarden goed overeen komen.

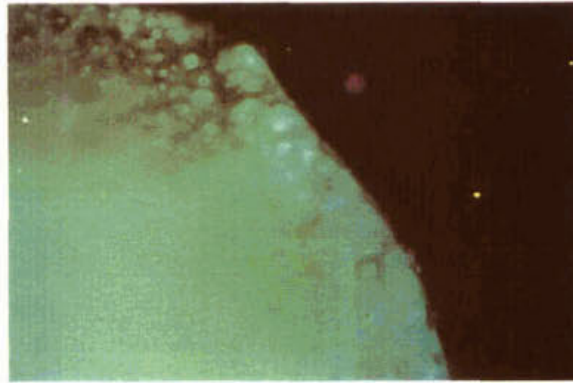
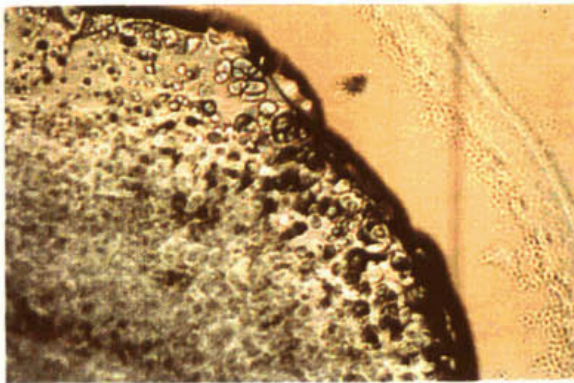
Figuur 5.5: (zie volgende pagina) Microscopische opnames van coupes van carrageenbolletjes met geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* op dag 4, 10, 14, 17 en 30. Links is het resultaat van lissaminegroenkleuring (gekleurde cellen zijn dood). Rechts is het resultaat gegeven van FDA-kleuring (levende cellen).



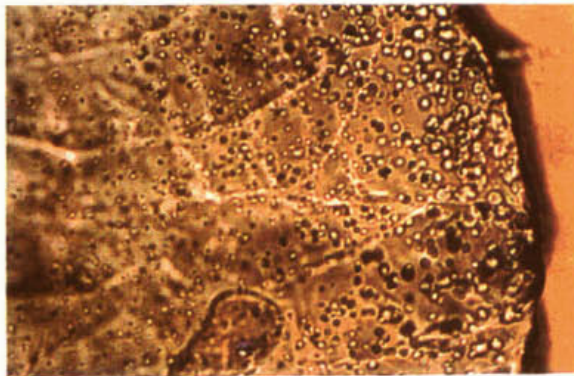
day 4  
 100  $\mu$ m



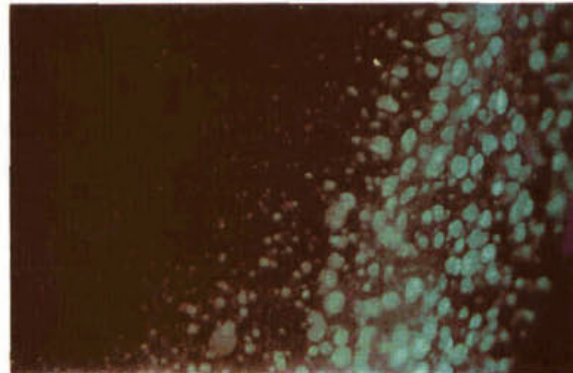
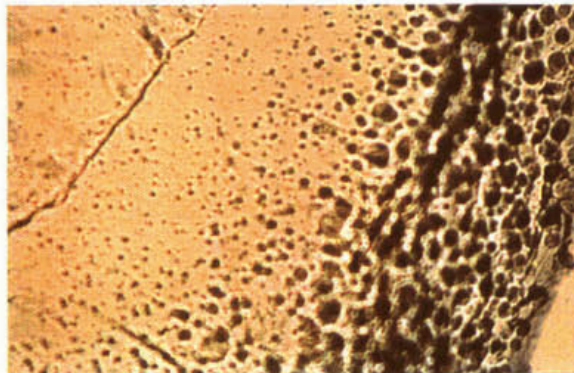
day 10  
 10  $\mu$ m



day 14  
 100  $\mu$ m



day 17  
 100  $\mu$ m



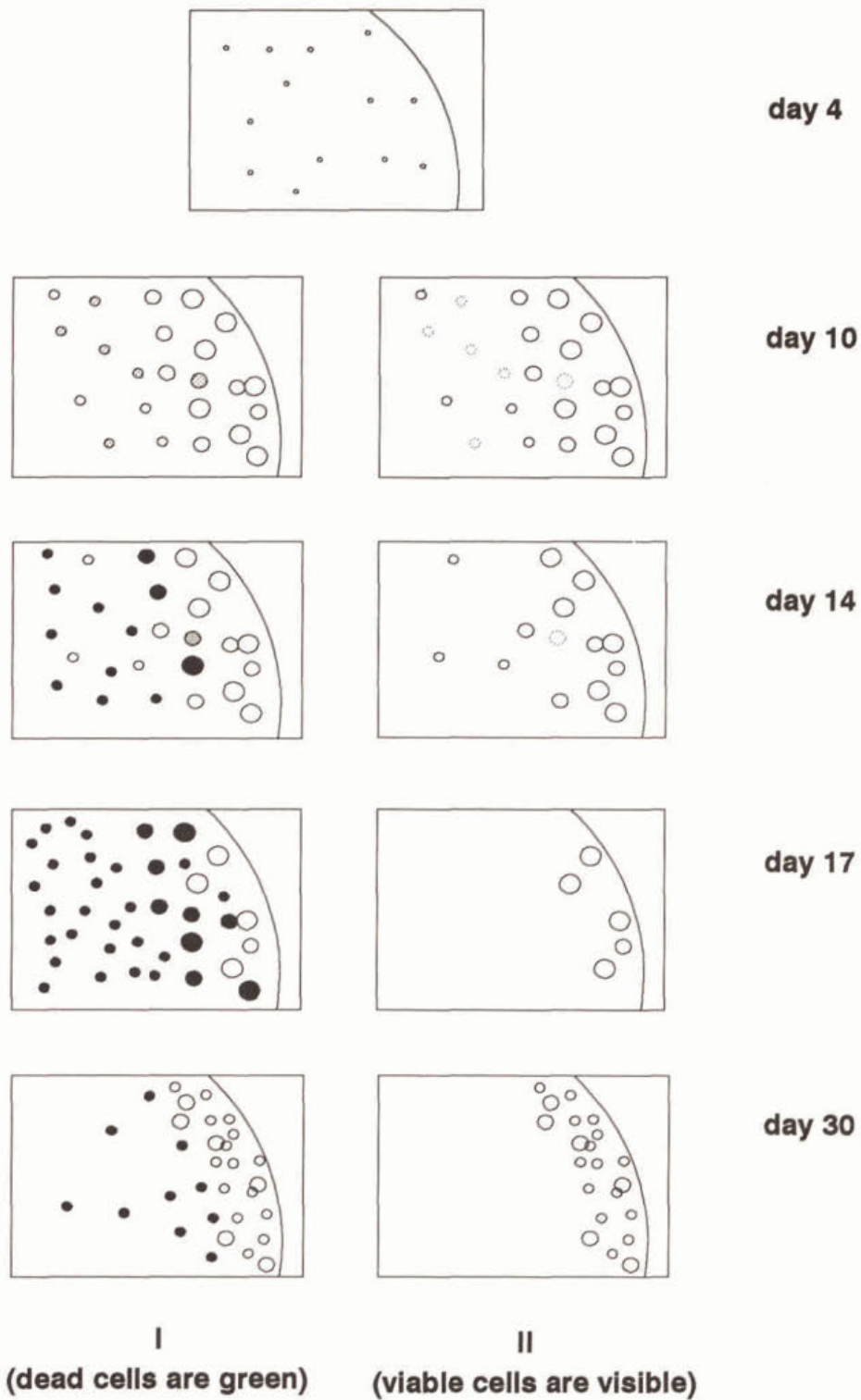
day 30  
 200  $\mu$ m

I

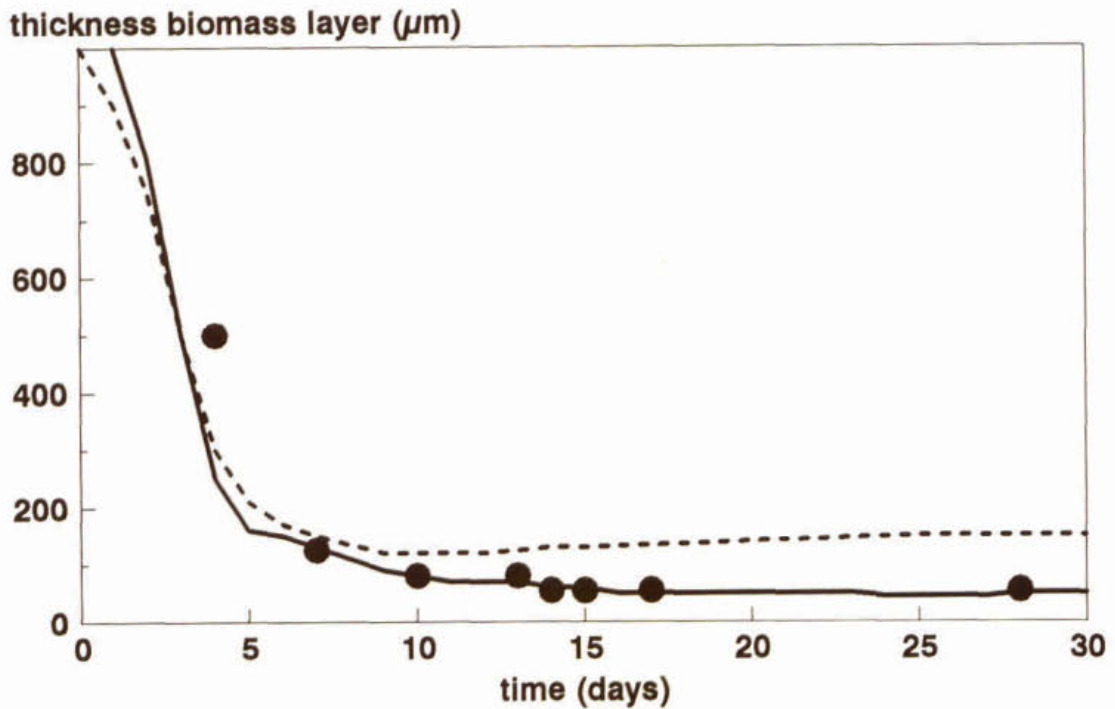
(dead cells are dark)

II

(viable cells are fluorescent)



Figuur 5.6: Schematische weergave van microscopische opnames van coupes van carra-geenbolletjes met geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* op dag 4, 10, 14, 17 en 30. Links is het resultaat van lissaminegroenkleuring (gekleurde cellen zijn dood). Rechts is het resultaat gegeven van FDA-kleuring (levende cellen).



Figuur 5.7: Dikte van laag biomassa net onder het oppervlak van de gelbolletjes. Datapunten representeren de gemeten waarden. De lijn betreft een modelsimulatie waarbij rekening gehouden is met afsterving van cellen; de gestippelde lijn een modelsimulatie waarbij geen afsterving plaatsvindt.

De resultaten laten duidelijk zien dat celdood ten gevolge van afwezigheid van substraat voorkomt. Het blijkt tevens dat afsterving goed beschreven wordt door de ontwikkelde modellen. Er is aangetoond dat afsterving van groot belang is voor de dynamiek van het proces. Bij het ontwerp van processen dient rekening gehouden te worden met continu veranderende omstandigheden. Het hier gepresenteerde model helpt het inzicht in die dynamiek te vergroten. Het is daarom zeer nuttig gebruik te maken van de ontwikkelde modellen.

## 6 Eigenschappen en selectiecriteria van dragermaterialen voor toepassing van geïmmobiliseerde cellen voor de zuivering van afvalwater

### 6.1 Inleiding

Nitrificatie van afvalwater in compacte bioreactoren is mogelijk met behulp van geïmmobiliseerde cellen. Dit werd reeds aangegeven in het rapport van Witteveen & Bos (1991) waarin een proces met in gel geïmmobiliseerde cellen vergeleken werd met actief-slib-systemen voor de behandeling van huishoudelijk afvalwater. Er werd geconcludeerd dat produktiekosten van alginaatbolletjes gecompenseerd werden door de kostenbesparing ten gevolge van de constructie van een kleinere reactor indien de gelbolletjes stabiel bleven gedurende een periode van minimaal 2 maanden.

Het voorgaande modelonderzoek werd uitgevoerd met bollen gemaakt van natuurlijke polymeren zoals carrageen en alginaat. Deze materialen zijn niet geschikt voor toepassing in afvalwater omdat ze afbreekbaar zijn (Østgaard *et al.* 1993a,b) en oplosbaar zijn in afvalwater omdat de stabiliserende tegenionen ( $K^+$  en  $Ca^{2+}$ ) in onvoldoende mate aanwezig zijn (Smidsrød en Skjåk-Bræk 1990). Bovendien werd slijtage van deze materialen bij de hoge afschuifkrachten die aanwezig zijn in bioreactoren van grote schaal waargenomen (Hunik 1993). In de literatuur zijn verschillende synthetische prepolymeren beschreven die na polymerisatie of cross-linking sterke gelen vormen die in elk medium stabiel blijven. Het nadeel van deze gelen is dat polymerisatie of cross-linking in aanwezigheid van biomassa plaatsvindt en dat het milieu ongunstig is voor de aanwezige biomassa. Afsterfing van meer dan 90% is gerapporteerd voor polyacrylamide en epoxyharsen (Sumino *et al.* 1992a, Tanaka *et al.* 1991).

Het doel van de nu volgende studie is een dragermateriaal te selecteren dat de gewenste eigenschappen heeft voor gebruik in rioolwaterzuiveringsinrichtingen. Een vergelijkende studie met verschillende dragermaterialen (natuurlijke en synthetische) is uitgevoerd. Zowel literatuur- als experimentele resultaten zijn in deze studie gebruikt.

De stabiliteit van dragermaterialen is een essentiële factor voor toepassing van geïmmobiliseerde cellen. Daarnaast moeten cellen in staat zijn de immobilisatieprocedure te overleven en te groeien in de drager. Gewenste eigenschappen van dragermaterialen voor immobilisatie van nitrificerende bacteriën zijn:

- onoplosbaar in afvalwater
- niet biologisch afbreekbaar
- grote mechanische stabiliteit
- hoge diffusiecoëfficiënten
- milde immobilisatieprocedure
- eenvoudige immobilisatieprocedure
- goedkoop.

In deze studie is een aantal natuurlijke (alginaat, carrageen) en synthetische dragermaterialen (polyvinylalcohol, polycarbamoylsulfonaat, polyethyleenglycol) met elkaar vergeleken. Samenstelling en herkomst van de verschillende dragermaterialen worden hieronder iets uitgebreider toegelicht:

## **Carrageen**

Carrageen is een polymeer dat uit zeewier geïsoleerd wordt. Het bestaat uit 1,3 gebonden D-galactose-4-sulfaat en 1,4 gebonden 3,6-anhydro-D-galactose-2-sulfaateenheden. De gelsterkte neemt toe met het gehalte aan 3,6-anhydro-D-galactose-2-sulfaat (Ainsworth en Blanshard 1978). Toevoeging van gom (Audet *et al.* 1990, Arnaud *et al.* 1989) of  $Al^{3+}$  (Chamy *et al.* 1990) kunnen het carrageengel versterken.

## **Alginaat**

Alginaat wordt evenals carrageen uit zeewier gewonnen. Alginaat is opgebouwd uit D-manuronzuur- en L-guluronzuureenheden. De verhouding tussen beide groepen bepaalt de sterkte van het gel. De guluronzuurgroepen vormen als het ware holtes in het gel waar interactie met  $Ca^{2+}$  of andere divalente kationen plaatsvindt. De sterkte van het gel neemt toe naarmate de lengte van de guluronzuurgroepen en het aantal guluronzuurgroepblokken toenemen. Het gehalte guluronzuur in alginaat is afhankelijk van het soort zeewier waaruit alginaat gewonnen wordt en welk deel van het zeewier (stam, blad e.d.). Alginaat is derhalve verkrijgbaar in verschillende kwaliteiten (Martinsen *et al.* 1989, Smidsrød en Skjåk-Bræk 1990).

## **Polyvinylalcohol (PVA)**

Polyvinylalcohol is gebruikt voor immobilisatie van verschillende soorten bacteriën. Het gel kan gevormd worden door cross-linking onder invloed van boorzuur (Hashimoto en Furukawa 1987, Wu en Wisecarver 1992), door herhaald vriezen en dooien (Ariga *et al.* 1987, Myoga *et al.* 1991, Asano *et al.* 1992), door fosforilering (Chen en Liu 1994) of foto-crosslinking (Ichijo 1990). De meeste cross-link methodes van PVA zijn niet erg mild (bijvoorbeeld bij de boorzuurmethode is de pH gedurende vrij lange tijd gelijk aan 4) wat kan leiden tot verlies aan activiteit.

## **Polycarbamoylsulfonaat (PCS)**

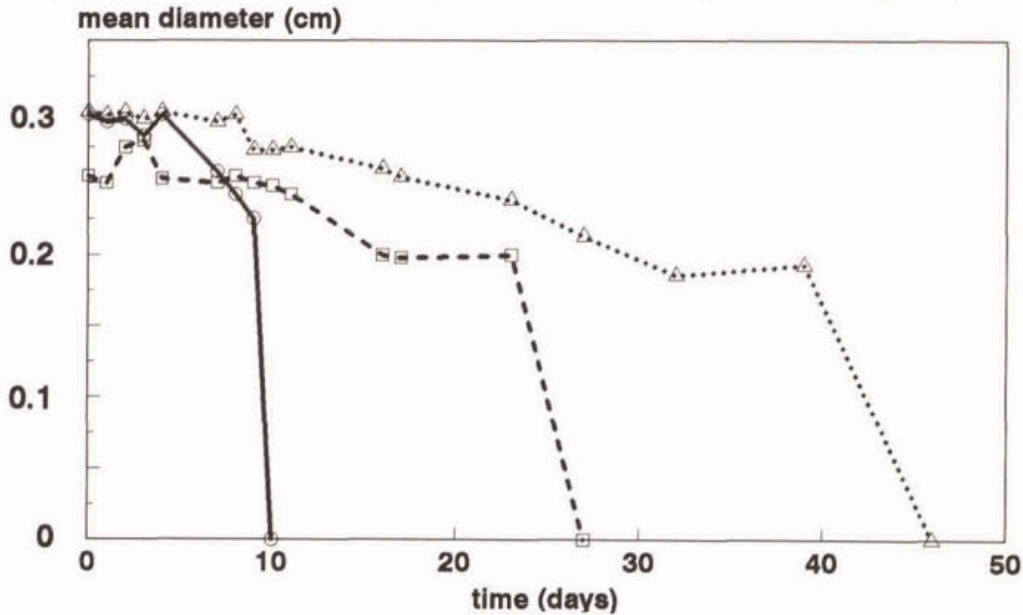
Polyurethaan is een sterk gel. De monomeren zijn echter zeer giftig. Vorlop *et al.* (1992) hebben een veel minder toxisch urethaanhydrogel ontwikkeld. Gedurende polymerisatie worden de toxische isocyanaatgroepen geblokkeerd en het minder toxische poly(carbamoylsulfonaat) gel (PCS) wordt verkregen. In PCS werd een activiteitsbehoud van 99% aangetoond na immobilisatie door Willke *et al.* (1994).

## **Polyethyleenglycol (PEG)**

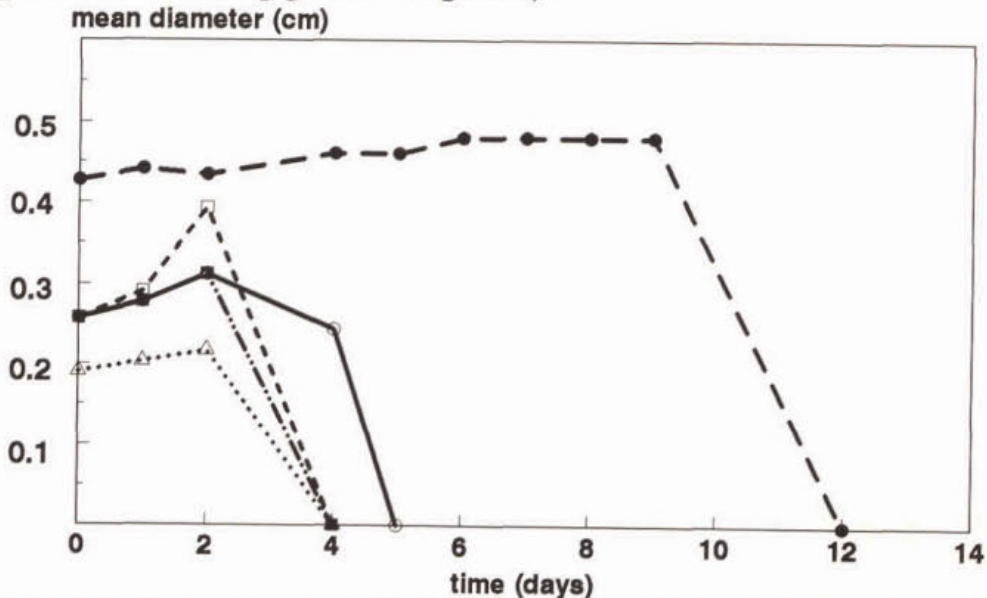
Een combinatie van verschillende polyethyleenglycol(PEG)-prepolymeren werd gebruikt door Tanaka *et al.* (1991) en Sumino *et al.* (1992b) om nitrificerend slib te immobiliseren. De cellen worden beschermd tegen de cross-link reagentia door een macromoleculair coagulens. De verkregen PEG-pellets bleken stabiel te zijn bij langdurig gebruik voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater (Tanaka *et al.* 1991, 1996, Emori *et al.* 1996).

## 6.2 Oplosbaarheid

Ca-alginaat bleek binnen enkele dagen op te lossen in huishoudelijk afvalwater. Door gebruik te maken van een combinatie van  $\text{Ca}^{2+}$  en  $\text{Ba}^{2+}$  als tegenionen en van alginaat met een hoog guluronzuurgehalte kunnen weliswaar wat stabilere alginaatbollen geproduceerd worden, echter onvoldoende voor gebruik bij de zuivering van huishoudelijk afvalwater (figuur 6.1). Dit geldt ook voor carrageen waaraan wel of geen gom toegevoegd is (figuur 6.2).



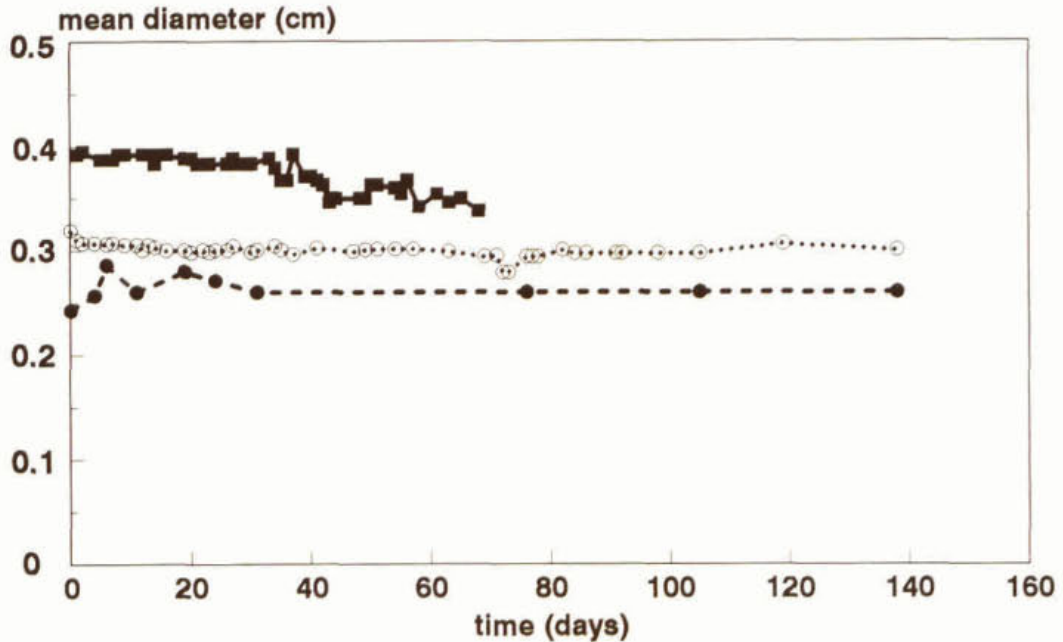
Figuur 6.1: Stabiliteit van Ba-Ca-alginaatgelbolletjes met verschillende guluronzuurgehalten in huishoudelijk afvalwater. De gemiddelde diameter van de gelbolletjes is uitgezet (○ laag, □ gemiddeld en Δ hoog guluronzuurgehalte).



Figuur 6.2: Stabiliteit van carrageengelbolletjes in huishoudelijk afvalwater. De gemiddelde diameter van de gelbolletjes is uitgezet (○ zuiver carrageen, □ carrageen met  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ , Δ carrageen met arabische gom, ● carrageen met xanthaangom, ■ carrageen met locust bean gom).

De oplosbaarheid van PCS, PVA en polyacrylamide werden ook getest. Figuur 6.3 laat zien dat de gelbolletjes intact blijven in huishoudelijk afvalwater. In geval van PVA werd ook regelmatig de breuksterkte gemeten gedurende de blootstelling aan rioolwater. De breuksterkte bleef constant, wat aangeeft dat er niets in het materiaal veranderde gedurende dit experiment.

De stabiliteit van PEG is in dit onderzoek niet getest. Emori *et al.* (1996) en Tanaka *et al.* (1996) hebben onomstotelijk aangetoond dat PEG gedurende lange tijd stabiel blijft in afvalwater.



Figuur 6.3: Oplosbaarheid van synthetische gellen in huishoudelijk afvalwater. Gemiddelde diameter van gelbolletjes als functie van de tijd (○ PVA, ● PCS, ■ polyacrylamide).

### 6.3 Biologische afbreekbaarheid

Het gebruikte dragermateriaal mag niet biologisch afbreekbaar zijn. Indien dit het geval is, zal zich bij de behandeling van rioolwater op een gegeven moment een organisme ontwikkelen dat het gel afbreekt. Bij de oplosbaarheidsexperimenten werd in geen van de gevallen afbraak van gelbolletjes waargenomen. Er werden geen verschillen gemeten tussen de metingen met en zonder toevoeging van  $\text{NaN}_3$ . Dit is echter geen bewijs dat de geteste dragermaterialen absoluut niet afbreekbaar zouden zijn.

Østgaard *et al.* (1993a,b) hebben aangetoond dat alginaat en carrageen biologisch afbreekbaar zijn. Om deze reden alleen al zijn alginaat of carrageen ongeschikt voor gebruik in rioolwaterzuiveringsinrichtingen.

Biodegradatie van de geteste synthetische gellen is niet aangetoond in de literatuur. Zoals reeds eerder aangegeven wordt PEG reeds 5 jaar succesvol gebruikt voor nitrificatie van huishoudelijk afvalwater zonder dat biologische afbraak van het materiaal waargenomen is (Tanaka *et al.* 1996, Emori *et al.* 1996).



PCS is een derivaat van polyurethaan. Polyurethaan wordt eveneens reeds toegepast bij de zuivering van afvalwater zonder dat degradatie waargenomen werd (Sumino *et al.* 1992a, Stormo en Crawford 1992).

Asano *et al.* (1992) en Myoga *et al.* (1991) hebben PVA-bolletjes, geproduceerd door herhaald vriezen en dooien, gebruikt voor de behandeling van afvalwater zonder dat afbraak van het materiaal gerapporteerd werd.

#### 6.4 Mechanische stabiliteit

Uit eerder onderzoek is gebleken dat gelbolletjes in airlift-loopreactoren gevoelig zijn voor slijtage (Hunik 1993). Ten gevolge van vloeistofstroming langs de bolletjes en botsingen tussen bolletjes en de wand erodeert het oppervlak van die bolletjes langzaam.

De mechanische stabiliteit van dragermateriaal is afhankelijk van de reologische eigenschappen. Slijtage van gelbolletjes wordt in sterke mate bepaald door die reologische eigenschappen. De breekkracht en de elasticiteit zijn belangrijke eigenschappen voor de karakterisering van de fragiliteit/sterkte van een gel. De breekkracht is de maximale kracht die een gel kan weerstaan voordat breuk optreedt. De elasticiteit is een maat voor de vervormbaarheid bij een bepaalde kracht.

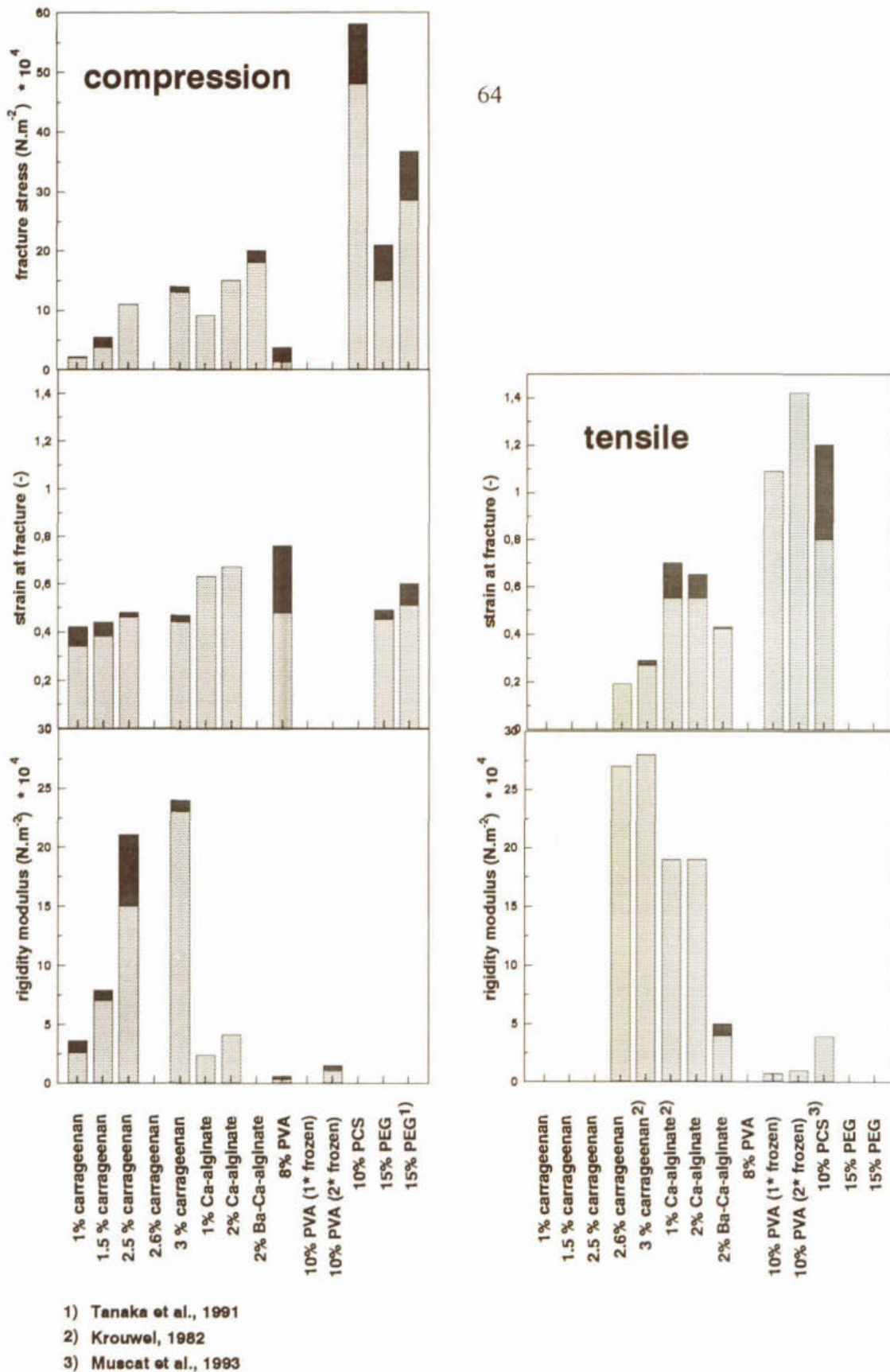
De eigenschappen van een gel hangen sterk samen met de ruimtelijke opbouw van het netwerk. Indien een kracht op een gel uitgeoefend wordt, wordt die kracht verdeeld over de ketens in de richting van de uitgeoefende kracht. In elke keten ontstaat dan een reactiekracht en zal de afstand tussen twee deeltjes of knooppunten in een netwerk veranderen. Deze afstandsverandering hangt nauw samen met de gemeten vervorming of rek. De elasticiteitsmodulus is een maat hiervoor. Deze wordt gedefinieerd door de kracht, die op het materiaal wordt uitgeoefend, te delen door de vervorming van het materiaal bij deze kracht.

Wanneer een homogeen blokje ideaal elastisch materiaal uitgerekt of samengedrukt wordt, betekent dit dat er een hoeveelheid energie in opgeslagen wordt. Indien er een scheur ontstaat/groeit zal de spanning over de scheur tot 0 dalen, maar ook de spanning in de directe omgeving relaxeren. Er komt dus energie vrij. Deze energie wordt gebruikt voor vorming van een nieuw oppervlak en (soms) warmte. Uit de breekkracht kan de energie nodig voor deze breuk berekend worden.

Met behulp van deze parameters kan bepaald worden of een materiaal bros, plastisch of sterk is. Een materiaal is:

- bros indien de breekkracht groot is en de elasticiteitsmodulus groot
- plastisch indien de breekkracht klein is en de elasticiteitsmodulus groot
- sterk indien de breekkracht groot is en de elasticiteitsmodulus klein

In deze studie is in eerste instantie aangenomen dat een dragermateriaal stabiel is indien de kracht waarbij breuk optreedt (fracture stress) groot is, wanneer de vervorming bij breuk (strain at fracture) groot is en wanneer de elasticiteitsmodulus (rigidity modulus) laag is. Deze eigenschappen zijn bepaald voor de verschillende gelen met compressie- en rektesten. De resultaten daarvan zijn gegeven in figuur 6.4.



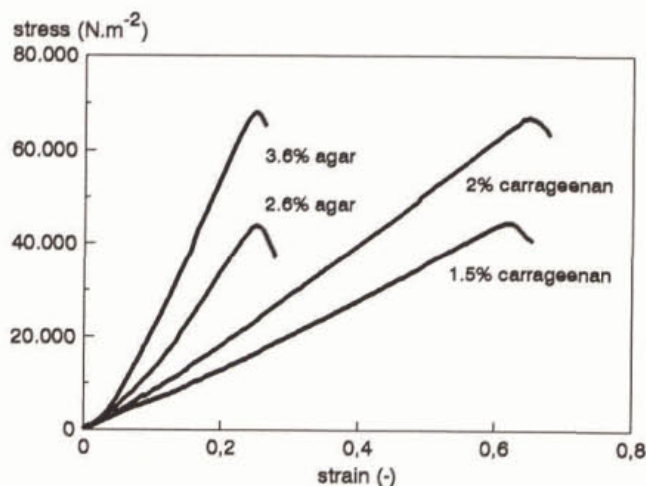
Figuur 6.4: Reologische eigenschappen van dragermaterialen: kracht waarbij breuk optreedt (fracture stress), de vervorming bij breuk (strain at fracture) en de elasticiteitsmodulus (rigidity modulus). De linker figuren representeren metingen op basis van compressietesten en de rechter op basis van rektesten. Het zwarte blokje geeft het verschil aan tussen laagste en hoogste gemeten waarden.

Uit figuur 6.4 blijkt dat de kracht waarbij breuk optreedt en de elasticiteitsmodulus toenemen bij hogere polymeerconcentraties (resultaten carrageen). De polymeerconcentratie heeft echter nauwelijks effect op de vervorming bij breuk. De weerstand die een gel uitoefent ten gevolge van een toenemende opgelegde kracht neemt weliswaar toe, maar de vervormbaarheid van het gel neemt af bij toenemende polymeerconcentratie. Om deze reden is het moeilijk te concluderen of bij toename van de polymeerconcentratie ook de sterkte van het gel toeneemt.

Uit figuur 6.4 blijkt verder dat alle natuurlijke dragermaterialen vergelijkbare reologische eigenschappen hebben op Ba-Ca-alginaat met een hoog guluronzuurgehalte (high G) na. Hunik (1993) toonde aan dat carrageenbolletjes gevoelig waren voor slijtage. Aangezien alle natuurlijke gellen vergelijkbare reologische eigenschappen hebben wordt verwacht dat al deze materialen slijtagegevoelig zijn. Ba-Ca-alginaat zal waarschijnlijk wat minder gevoelig zijn voor slijtage.

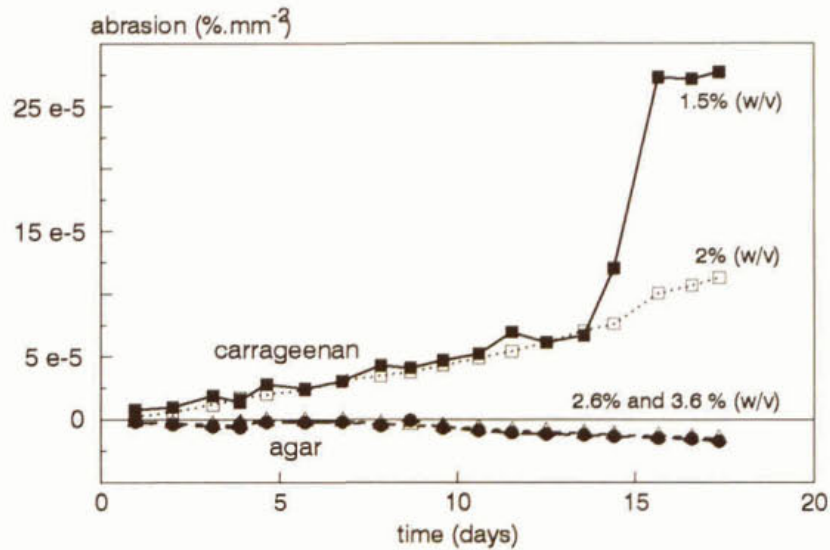
Alle synthetische dragermaterialen blijken bij hogere krachten te breken, hebben een grotere vervorming bij breuk en een lage elasticiteitsmodulus (betekent dat ze elastischer zijn). Het was zelfs moeilijk om PVA überhaupt te breken. Verwacht wordt dan ook dat de synthetische dragermaterialen veel minder gevoelig zullen zijn voor slijtage bij toepassing in bioreactoren op PEG na. De breukkracht van PEG is slechts in geringe mate hoger dan die van Ba-Ca-alginaat. Desalniettemin wordt PEG reeds op grote schaal toegepast. Gedurende 5 jaar continu gebruik in een reactor van 750 m<sup>3</sup> is geen slijtage waargenomen (Emori *et al.* 1996). Wellicht zijn toch nog andere reologische eigenschappen van belang voor slijtage. Om deze reden zijn slijtage-experimenten uitgevoerd.

Verwacht werd dat gelbolletjes met gelijke breukkracht, maar verschillende breukenergie (oppervlak onder curve figuur 6.1) een verschillende gevoeligheid voor slijtage zouden hebben. Gellen met een kleiner oppervlak onder de curve zouden gevoeliger zijn voor slijtage. Om deze reden is gezocht naar twee dragermaterialen met dezelfde breukkracht maar een verschil in breukenergie. Figuur 6.5 laat zien 3,6% agar en 2% carrageenan en 2,6% agar en 1,5% carrageenan op die manier vergeleken konden worden. Verwacht werd dat carrageen in beide gevallen minder snel zou slijten.



Figuur 6.5: Kracht nodig om gellen te breken als functie van de elasticiteitsmodulus. De oppervlakte onder de curven is een maat voor de breukenergie.

De resultaten van de slijtage-experimenten zijn gegeven in figuur 6.6. Uit figuur 6.6 blijkt dat in beide gevallen carrageen sneller slijt dan agar en dit is dus in tegenspraak met de verwachting.

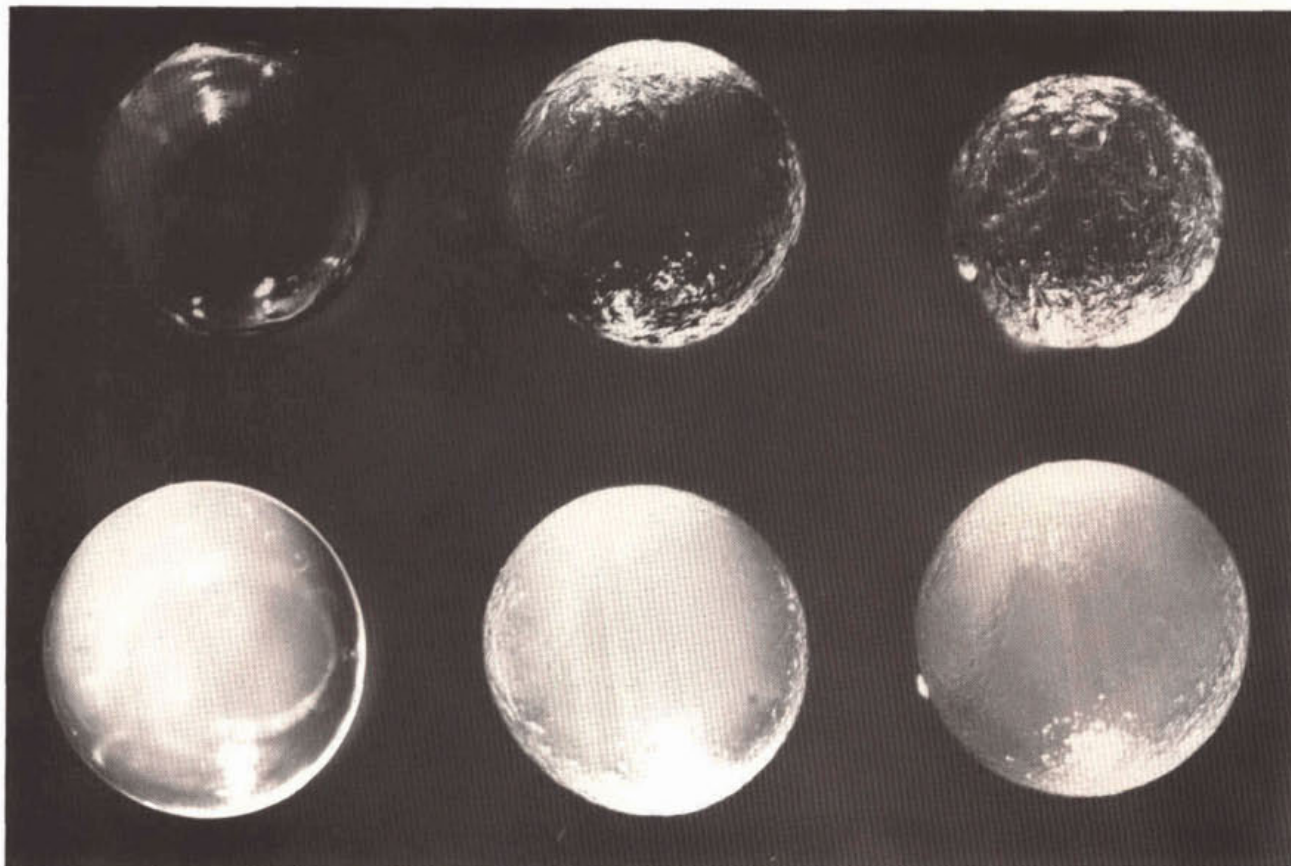


Figuur 6.6: Slijtage van dragermaterialen als functie van de tijd.

De resultaten van figuur 6.6 worden bevestigd door foto's van de gelbolletjes die gegeven zijn in figuur 6.7. Foto's zijn genomen bij aanvang van het experiment, na 10 dagen en bij het einde van het experiment. De bovenste bolletjes zijn carrageenbolletjes en onderaan zijn agarbolletjes afgebeeld. Hieruit blijkt dat het oppervlak van carrageen sterk geërodeerd is, terwijl het oppervlak van agar nog vrij gaaf is, wat aangeeft dat in tegenstelling tot de verwachting carrageen sneller slijt dan agar.

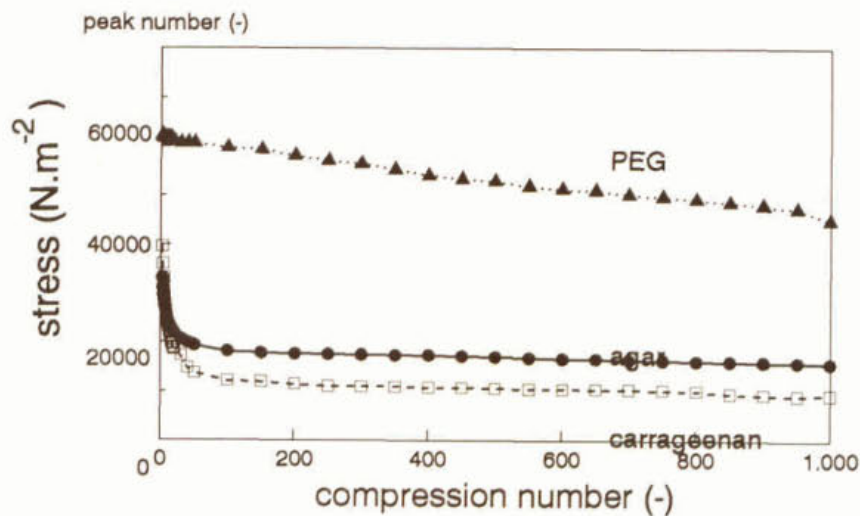
De gelbollen werden voor en na het experiment ook getest op hun reologische eigenschappen. Hieruit bleek dat de kracht waarmee bolletjes braken afnam gedurende het slijtage-experiment. Deze kracht nam duidelijk meer af bij carrageen dan bij agar. Dit wil zeggen dat na herhaaldelijke botsingen in de bioreactor of door het continu onderhevig zijn aan afschuifkrachten gelbolletjes zwakker worden en dat sommige materialen hier meer gevoelig voor zouden zijn dan andere. Materialen die minder onderhevig zijn aan deze 'materiaalmoetheid' zouden dan geschikter zijn voor gebruik in bioreactoren.

Het effect van 'materiaalmoetheid' is getest door gelblokjes herhaaldelijk in te drukken en de weerstand ten opzichte van de opgelegde kracht te meten. Blokjes werden hiertoe 998x ingedrukt. Figuur 6.8 laat zien dat zoals verwacht de weerstand van carrageen veel meer afneemt dan die van agar en dat carrageen gevoeliger is voor slijtage dan agar.



Figuur 6.7: Foto's van het oppervlak van carrageenbolletjes (boven) en agarbolletjes (onder) vóór het slijtageexperiment (links), na 10 dagen (midden) en aan het einde van het slijtageexperiment (rechts).

De uitgevoerde testen geven aan dat de belangrijkste reologische parameter voor slijtage van gelbolletjes de weerstand na herhaalde malen belasten is. Op deze manier kan aangetoond worden of gelbolletjes gevoelig zouden zijn voor slijtage. De beste manier om te laten zien dat dit inderdaad een goede parameter is, is door dit te testen met PEG. PEG is immers gedurende een periode van 5 jaar reeds gebruikt op pilot plant schaal (Emori *et al.* 1996) en bleek op basis van breukkrachtmetingen een vergelijkbare sterkte te hebben als de natuurlijke dragermaterialen. In figuur 6.8 zijn de resultaten gegeven van deze metingen. Geconcludeerd kan worden dat PEG zo stabiel is, omdat dit materiaal niet gevoelig blijkt te zijn voor 'materiaalmoetheid'.



Figuur 6.8: Weerstand van gelmateriaal in een oscillerende compressietest.

## 6.5 Diffusiecoëfficiënten

Transport van substraat in het dragermateriaal is een belangrijke parameter voor celgroei en substraat omzetting na immobilisatie. De effectieve diffusiecoëfficiënten die gerapporteerd werden in de literatuur voor glucose en zuurstof zijn gebruikt voor deze analyse.

Diffusiecoëfficiënten in de natuurlijke dragermaterialen (carrageen en algiनात) bleken vergelijkbaar. Voor zuurstof werden waarden tussen  $1,6$  en  $2,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  gevonden (Wijffels *et al.* 1995a, Hulst *et al.* 1989, Adlerkreutz 1986, Kurosawa *et al.* 1989, Tanaka *et al.* 1984) en voor glucose  $0,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Ter vergelijking, de diffusiecoëfficiënten voor zuurstof en glucose in water zijn respectievelijk  $2,83 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Wise en Houghton 1966) en  $0,67 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (Weast 1979).

Bij synthetische dragermaterialen zijn de verschillen wat groter. In synthetische dragermaterialen wordt vaak gebruik gemaakt van hogere polymeerconcentraties om sterke gellen te verkrijgen wat de diffusiecoëfficiënten negatief beïnvloedt. PVA blijkt een iets lagere diffusiecoëfficiënt te hebben voor zuurstof ( $0,7$ - $1,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , Renneberg *et al.* 1988), maar dezelfde voor glucose (Ariga *et al.* 1987) als de natuurlijke dragers. In PCS is de diffusiecoëfficiënt van glucose wat lager ( $0,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , Muscat *et al.* 1993) dan in natuurlijke gellen. Van PEG zijn geen gegevens bekend. Verwacht wordt dat de diffusiecoëfficiënt hier niet lager is, omdat bij vrij lage polymeerconcentraties gewerkt kan worden.

In het algemeen kan geconcludeerd worden dat diffusiecoëfficiënten in natuurlijke gellen hoger zijn dan in synthetische gellen. Gerapporteerde verschillen zijn echter niet erg groot. Bij de selectie van dragermaterialen is het belangrijk de diffusiecoëfficiënten voor het substraat en het product in het proces te bepalen.

## 6.6 Milde immobilisatieprocedure

Geïmmobiliseerde cellen dienen de immobilisatieprocedure te overleven. Bij natuurlijke gellen is reeds vele malen aangetoond dat de procedure mild is. Nitrificerende cellen overleven de milde procedures en zijn in staat te groeien in deze dragermaterialen (Van Ginkel *et al.* 1983, Tramper en De Man 1986, Tramper en Grootjen 1986, Hunik *et al.* 1994a,b, Wijffels *et al.* 1991, 1994, 1995a,b,c, 1996, Wijffels en Tramper 1989, 1995, Uemoto en Saiki 1996, Leenen *et al.* 1996a,b, Rostron *et al.* 1996).

Productie van synthetische gellen is in het algemeen minder makkelijk uit te voeren onder milde condities.

*Nitrosomonas europaea* bleek na immobilisatie echter te kunnen groeien in PCS (zie hoofdstuk 7).

Immobilisatie in PVA bleek meestal niet goed te werken. Zowel bij de boorzuurmethode als de herhaaldelijk vries-dooimethode bleek het niet mogelijk reïncultureren van *Nitrosomonas europaea* met behoud van activiteit te immobiliseren. Uitgebreid onderzoek aan toevoeging van cryoprotectants gedurende immobilisatie gaf eveneens geen bevredigende resultaten. Vanuit de literatuur is bekend dat immobilisatie in PVA van nitrificerend actief slib wel werkt (Willke en Vorlop 1995, Ariga *et al.* 1987, Myoga *et al.* 1991).

Zoals reeds eerder is aangegeven is PEG succesvol toegepast ten behoeve van nitrificatie van huishoudelijk afvalwater (Tanaka *et al.* 1991, 1996, Emori *et al.* 1996). Het proces is tot nu toe 5 jaar operationeel stabiel gebleken. In samenwerking met Holland Biomaterials Group in Enschede wordt gewerkt aan de ontwikkeling van een geschikt PEG-gel.





## 7 Nitrificatie van huishoudelijk afvalwater met geïmmobiliseerde bacteriën

### 7.1 Inleiding

Een experiment werd uitgevoerd om te laten zien dat nitrificatie met geïmmobiliseerde bacteriën niet alleen in een mineraal medium uitgevoerd kan worden maar ook in huishoudelijk afvalwater. Een praktisch probleem bij dit experiment was de beschikbaarheid van een in afvalwater stabiel dragermateriaal. Er zijn verschillende pogingen ondernomen een stabiele drager in handen te krijgen voor dit experiment. Er zijn in de literatuur verschillende potentieel geschikte dragermaterialen beschreven. Dit betekent echter niet dat deze materialen direkt voor handen zijn. Geprobeerd is om parallel PCS, PVA en PEG ter beschikking te krijgen. Produktiemethoden van beschreven materialen zijn echter niet alle beschikbaar. Als voorbeeld kan genoemd worden het door Hitachi ontwikkelde PEG. Zij hebben gedurende 10 jaar via trial and error een stabiel dragermateriaal gevonden. De tijd van het onderzoek was te kort om dit ook te kunnen doen. Om deze reden is uitgegaan van bestaande beschreven materialen (PVA), zijn contacten gelegd met instituten die over stabiele dragermaterialen beschikken (PCS en PEG) en is in samenwerking met een laboratorium dat gespecialiseerd is in de ontwikkeling van polymeren een dragermateriaal ontwikkeld (PEG).

Het in de literatuur beschreven PVA bleek met reïnculturen van nitrificerende bacteriën geen positieve resultaten op te leveren.

Contacten zijn er geweest met Dr. Emori van Hitachi in Japan en Prof. Vorlop van het FAL in Duitsland om van hun dragermaterialen gebruik te kunnen maken. Dr. Emori was bereid PEG beschikbaar te stellen voor metingen aan stabiliteit van dragermaterialen. Het geleverde eindproduct kon echter niet gebruikt worden voor immobilisatie van bacteriën. Prof. Vorlop heeft PCS beschikbaar gesteld. Onderzoek met geïmmobiliseerde bacteriën van huishoudelijk afvalwater is met PCS uitgevoerd. Het was echter niet mogelijk om over grote hoeveelheden van dit dragermateriaal te beschikken omdat Prof. Vorlop zelf een proces met geïmmobiliseerde nitrificerende bacteriën wil ontwikkelen.

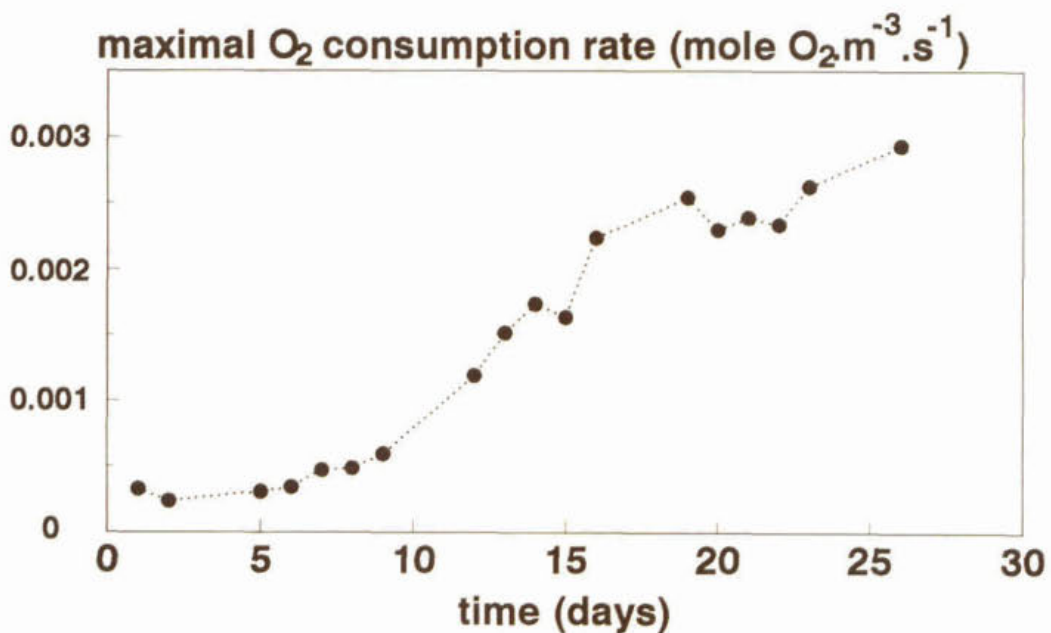
In samenwerking met Holland Biomaterials Group wordt momenteel nog steeds gewerkt aan de ontwikkeling van een dragermateriaal op basis van PEG. Op het moment van schrijven van dit rapport (zomer 1996) was dit materiaal nog niet beschikbaar voor experimenten in huishoudelijk afvalwater. Onderzoek aan dit dragermateriaal wordt voortgezet in een project in samenwerking met Unilever en Holland Biomaterials Group en medegefinancierd in het kader van het PBTS programma biotechnologie ten behoeve van productie van aromastoffen.

### 7.2 Nitrificerende bacteriën geïmmobiliseerd in PCS

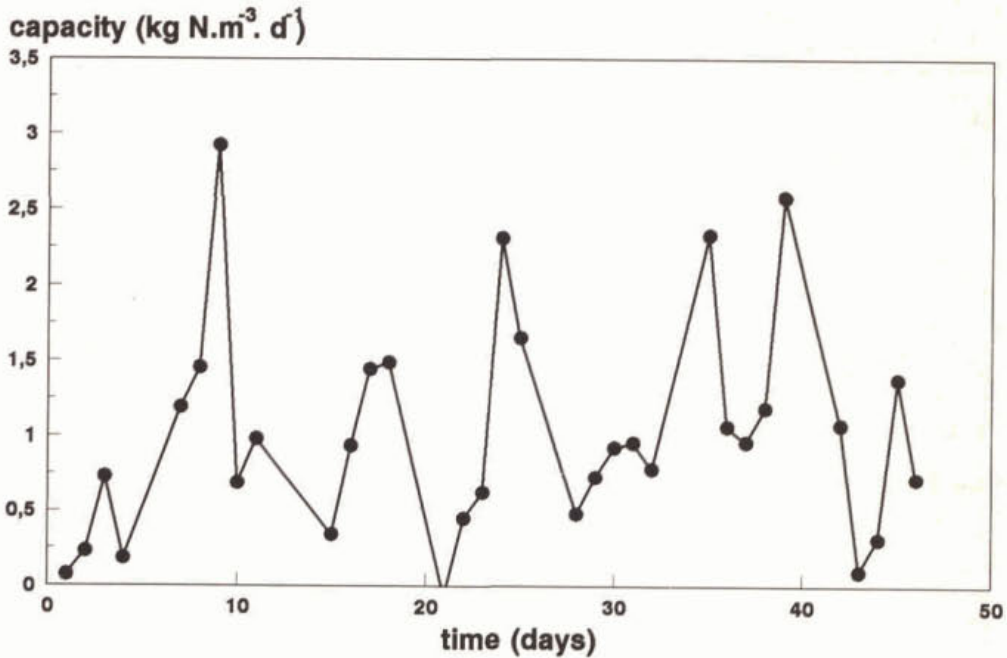
De gecoïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* en *Nitrobacter agilis* zijn in eerste instantie gedurende 3 weken gekweekt in mineraal medium. *Nitrosomonas europaea* bleek goed te groeien, terwijl *Nitrobacter agilis* achterbleef. Dit komt omdat initieel relatief veel *Nitrosomonas europaea* aanwezig was.

Na drie weken werden de geïmmobiliseerde nitrificerende bacteriën belast met voorbehandeld huishoudelijk afvalwater. Het betrof hier effluent van een reactor in de proefhal van

de vakgroep Milieutechnologie in Bennekom waaruit CZV gedeeltelijk verwijderd was (100 mg/l). De maximale nitrificatiesnelheid van de geïmmobiliseerde *Nitrosomonas europaea* gedurende het experiment in afvalwater is weergegeven in figuur 7.1. Uit deze figuur blijkt duidelijk dat *Nitrosomonas europaea* groeit en actief is in dit afvalwater. De macroscopische nitrificatie-activiteit is weergegeven in figuur 7.2. In dit experiment is slechts bij één verblijftijd (ca. 20 min.) gewerkt met een kleine hoeveelheid gelbollen (7%). Tijdens dit experiment zijn in de proefhal in Bennekom vele storingen geweest, waardoor het influent niet altijd van dezelfde kwaliteit was. De behaalde capaciteit is mede hierdoor niet optimaal. Optimalisatie van dit proces (verblijftijd, gelbelading, enz.) heeft niet plaatsgevonden.



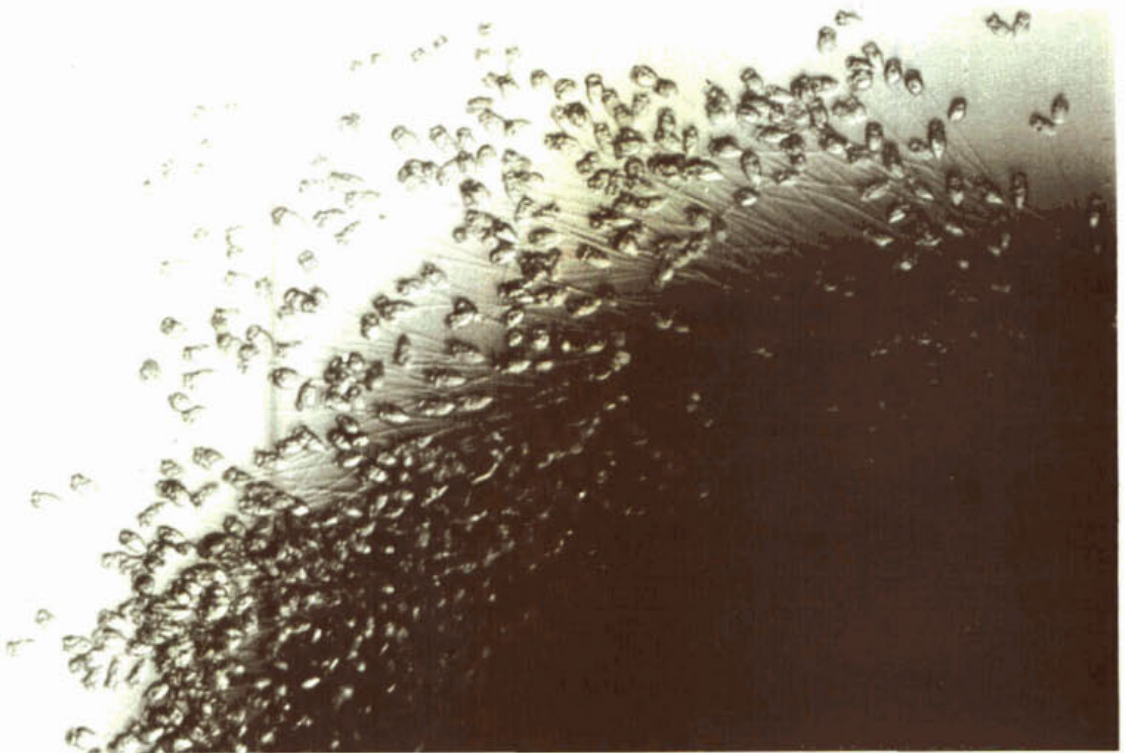
Figuur 7.1: Toename van de activiteit van *Nitrosomonas europaea* geïmmobiliseerd in PCS belast met voorgezuiverd huishoudelijk afvalwater. De activiteit is een maat voor de biomassaconcentratie.



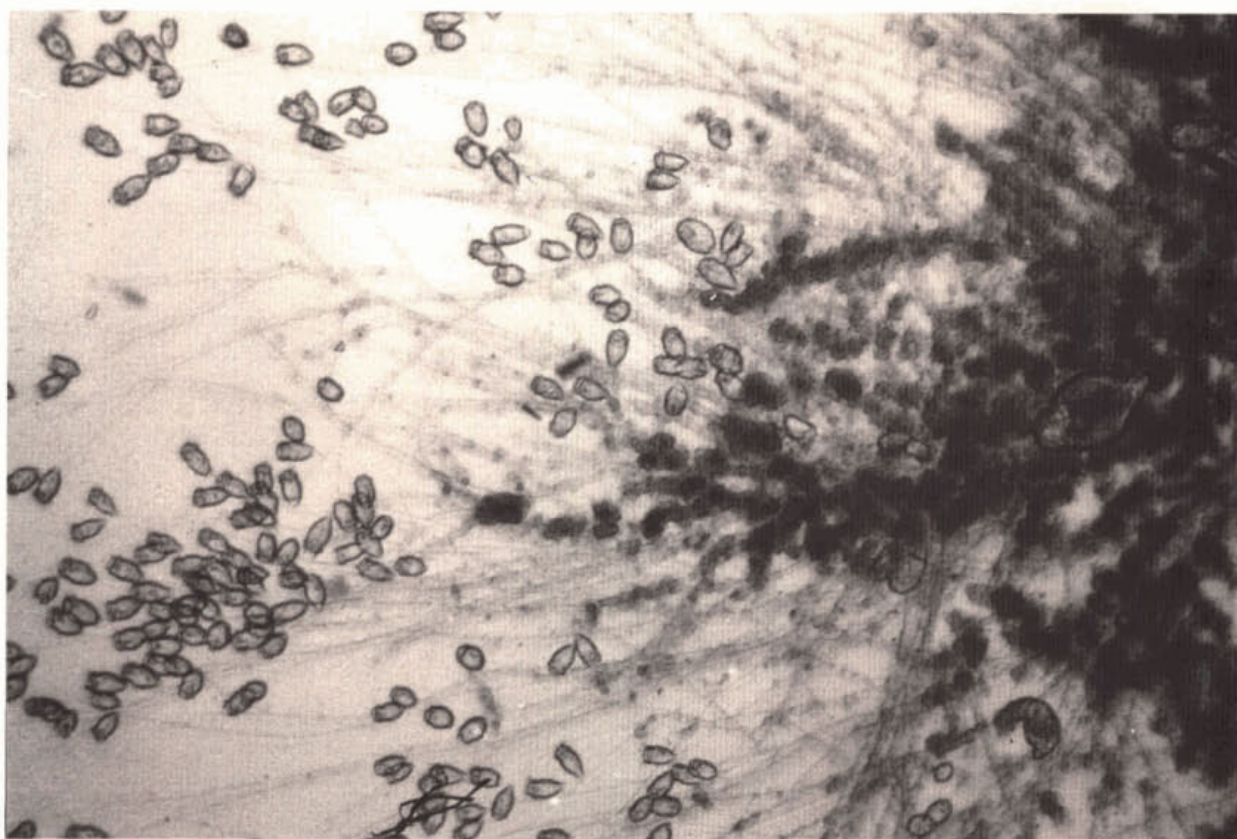
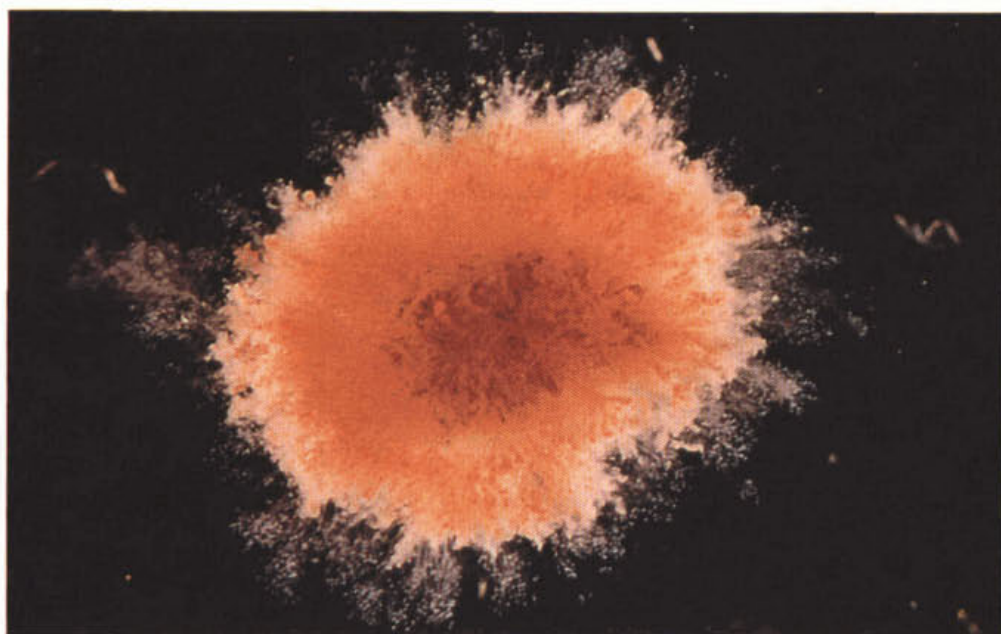
Figuur 7.2: Omzettingssnelheid van *Nitrosomonas europaea* geïmmobiliseerd in PCS belast met voorgezuiverd huishoudelijk afvalwater.

Tijdens het experiment werd na verloop van tijd een witte film op de bolletjes waargenomen. Op basis van CZV metingen van in- en effluent werd geconcludeerd dat in de biofilm geen CZV verwijderd werd.

De biofilm bleek te bestaan uit ciliaten (figuur 7.3). Sessiele ciliaten komen ook vaak voor in laag belaste actief-slibsystemen (Stora 1979). Deze organismen voeden zich met micro-organismen. Door de hechting van ciliaten op het boloppervlak ontstaat een harige, vrij open, biofilm. Na enkele weken werd de biofilm op de bollen rood (figuur 7.4). Uit microscopisch onderzoek bleek dat op de stelen van de ciliaten micro-organismen hechtten. Activiteits-experimenten (BOM) met als substraat acetaat werden uitgevoerd met deze bollen. Er werd geen zuurstofconsumptie gevonden. Daarna zijn activiteitsexperimenten uitgevoerd met bollen met en zonder biofilm; het substraat was ammonium. De maximale zuurstofconsumptie van bollen zonder biofilm was gemiddeld ca.  $1.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$  en met biofilm ca.  $4.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$ . Uit deze gegevens blijkt dat de uit de bollen gestoten nitrificeerders hechten aan de ciliaten en daar verder groeien.



Figuur 7.3: Boloppervlak van een PCS-bol met daarop ciliaten; A: overzicht, B: detailopname.



Figuur 7.4: Boloppervlak van een PCS bol met daarop ciliaten waaraan nitrificerende bacteriën gehecht zijn; A: overzicht, B: detailopname.

Aan het einde van het experiment is de reactor weer gevoed met mineraal medium en dan verdwijnt langzamerhand de biofilm, zodat 'schone' PCS-bollen ontstaan.



## 8 Discussie

### 8.1 Inleiding

Dit project is gestart na uitgebreid onderzoek aan fundamentele aspecten van groei van geïmmobiliseerde cellen. Als modelorganismen waren daarbij gekozen voor nitrificerende bacteriën.

Voorgaand onderzoek heeft voldoende basis gegeven om het praktische nut van geïmmobiliseerde cellen aan te tonen. Het hier beschreven onderzoek kan gezien worden als een tussenstap van basisonderzoek naar toepassing. Belangrijke hindernissen die toepassing van geïmmobiliseerde cellen in de weg staan zijn in dit onderzoek aan de orde geweest:

1. Bij de zuivering van rioolwater veranderen de procescondities continu. Zuiveringsinrichtingen moeten daarom zo ontworpen worden dat deze fluctuaties geen negatief effect hebben op de effluentkwaliteit. In voorgaand onderzoek waren dynamische modellen ontwikkeld, die het gedrag van geïmmobiliseerde cellen beschreven vanaf het opstarten tot de pseudo-evenwichtssituatie. Het effect van fluctuaties in bijvoorbeeld de temperatuur of substraatconcentraties was niet onderzocht. Dit is in dit onderzoek nader bekeken voor temperatuur (hoofdstuk 4) en stikstofbelastingen (hoofdstuk 5).

In het geval van een temperatuurverlaging is duidelijk gedemonstreerd dat bij een verlaging van 30 naar 5°C de capaciteit nog steeds minimaal 60% is van de capaciteit bij de optimale temperatuur. Het opvangen van piekbelastingen bleek wat ingewikkelder, omdat de cellen in het centrum van de bollen langzaam afsterven als gevolg van een lage belasting. Dit betekent dat afhankelijk van het feit of een piekbelasting regelmatig voorkomt nieuwe piekbelastingen al dan niet goed opgevangen kunnen worden. Indien ammonium limiterend is, blijkt de afstervingsnelheid hoger te zijn dan wanneer zuurstof limiterend is.

In het algemeen kan geconcludeerd worden dat geïmmobiliseerde cellen relatief ongevoelig zijn voor temperatuurwisselingen en regelmatige piekbelastingen. Beide effecten zijn beschreven in de voor dit project ontwikkelde wiskundige dynamische modellen, die de dynamiek goed beschrijven. De ontwikkelde modellen vormen dan ook belangrijke hulpmiddelen voor het ontwerpen van installaties.

2. Een van de meest kritische punten van het systeem en wat in eerder onderzoek niet aan de orde is geweest, is de ontwikkeling van stabiele dragermaterialen. In ons voorgaande onderzoek werd gebruik gemaakt van alginaat en carrageen. Dit waren modelmaterialen voor het onderzoek en ongeschikt voor toepassing in huishoudelijk afvalwater. Het ontwikkelen van nieuwe stabiele dragermaterialen bleek niet eenvoudig te zijn. In het hier beschreven onderzoek hebben twee criteria centraal gestaan voor de introductie van nieuwe dragermaterialen: het dragermateriaal diende intact te blijven in huishoudelijk afvalwater en niet onderhevig te zijn aan slijtage.

Wat het eerste punt betreft bleken vier geteste synthetische dragermaterialen geschikt te zijn: polyvinylalcohol (PVA), polycarbamoylsulfonaat (PCS), polyethleenglycol (PEG) en polyethyleenoxide (PEO). In de literatuur werden alle materialen (behalve PEO) reeds beschreven. Wat het tweede punt betreft bleek 'materiaalmoetheid' ten gevolge van herhaaldelijke botsingen of het continu onderhevig zijn aan afschuifkrachten slijtage te veroorzaken. PEG en PEO bleken nauwelijks last te hebben van die herhaaldelijke botsingen of afschuifkrachten.

PVA bleek een geschikt dragermateriaal. De effectiviteit van immobilisatie had echter

beperkingen, vanwege de weinig milde immobilisatiecondities.

PCS bleek een geschikt dragermateriaal. De beperkte beschikbaarheid van het materiaal, de ingewikkelde immobilisatieprocedure en de relatief lage diffusiecoëfficiënten vormen echter de nadelen van dit systeem.

PEG is het enige materiaal dat reeds op uitgebreide schaal getest is door Hitachi in Japan. Momenteel is ook Degremont in Frankrijk bezig met dit materiaal. In dit onderzoek is een aanzet gemaakt een PEG-achtig gel te produceren in samenwerking met Holland Biomaterials Group in Enschede. Dit heeft geresulteerd in chemisch gecrosslinkt polyethyleenoxide (PEO). In toekomstige projecten met geïmmobiliseerde cellen bij de sectie Proceskunde zal zeker meer aandacht besteed worden aan PEO.

## 8.2 Mogelijkheden van bioreactoren met geïmmobiliseerde cellen in de afvalwaterzuivering

De mogelijkheden van geïmmobiliseerde cellen bij de zuivering van afvalwater zijn onderzocht (Tabel 8.1). In deze tabel zijn de wensen voor nieuwe zuiveringen gegeven en vergeleken met de karakteristieken van een actief-slibproces en een proces met geïmmobiliseerde cellen.

Reactoren met geïmmobiliseerde cellen zijn in het algemeen relatief compact. Dit wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de hoge biomassaconcentratie en de daarbij behorende korte verblijftijden in de reactor. Volgens berekeningen met de ontwikkelde dynamische modellen kan hierdoor het volume van een bioreactor met geïmmobiliseerde cellen ongeveer 100x kleiner zijn dan dat van een conventionele actief-slibinstallatie.

Ook wordt, volgens de modellen, in geïmmobiliseerde systemen ongeveer 2 maal zo weinig slib per kg  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  geproduceerd dan in een actief-slibinstallatie. Dit wordt veroorzaakt door de aanwezige biomassa in het centrum van het bolletje, die een geringe hoeveelheid substraat gebruikt om in zijn onderhoud te kunnen voorzien; er vindt daar geen groei plaats.

Meestal zijn de beluchtingstanks in een actief-slib installatie ondiep (laag en breed). Dit ontwerp is ongunstig voor zuurstofoverdracht. In de industrie worden geoptimaliseerde reactoren gebruikt met een veel lagere energiebehoefte (0,4 - 0,5 kWh.kg<sup>-1</sup>O<sub>2</sub>; Heijnen en Van Loosdrecht). Toekomstige zuiveringsinrichtingen zullen zodanig ontworpen moeten worden dat de energiebenutting optimaal en de energiebehoefte minimaal is. Airlift-reactoren en bellenzuilen hebben een relatief hoge energiebehoefte. Echter, de zuurstofoverdracht is hoog wat resulteert in een goede energiebenutting.

Een ander mogelijk voordeel van het toepassen van geïmmobiliseerde cellen is dat compacte reactoren met een klein grondoppervlak wordt gebruikt. Hierdoor is bedekken om emissie van geur, lawaai en aerosolen tegen te gaan relatief gemakkelijk en goedkoop. In Nederland is dit een groot voordeel vanwege de relatief hoge grondprijzen.

Geïmmobiliseerde cellen zijn uitgebreid bestudeerd en beschreven in dynamische modellen. Deze modellen kunnen worden gebruikt om een proces te ontwerpen en om te bepalen welke parameters belangrijk zijn om te meten en te regelen. Processen met geïmmobiliseerde cellen zijn hierdoor flexibel (hoofdstuk 4 en 5).

Reactoren met geïmmobiliseerde nitrificerende cellen zijn een interessante optie om aan de wensen van de toekomstige zuiveringsinrichtingen te voldoen.



Tabel 8.1: Wensen voor toekomstige waterzuiveringsinrichtingen vergeleken met een actief-slibproces en een proces met geïmmobiliseerde cellen.

	Actief-slib	Geïmmobiliseerde cellen	Gewenst
Hoodzakelijk verwijdering van	organisch materiaal, stikstof- en fosfaathoudende componenten	organisch materiaal, stikstof- en fosfaathoudende componenten, xenobiotica	alle verontreinigingen
Volume beluchtingstank [m <sup>3</sup> .(1000 i.e.) <sup>-1</sup> ] <sup>§</sup>	100-500 <sup>//</sup>	2-6 <sup>#</sup>	zo klein mogelijk
Biomassa concentratie (g.l <sup>-1</sup> )	1-6	1-60 <sup>*,#</sup>	zo hoog mogelijk
Verblijftijd in beluchtingstank (h)	4-10	0,5-4 <sup>#, @</sup>	zo kort mogelijk
Slib productie (kg/kg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)	0,2 <sup>&amp;</sup>	0,05-0,10 <sup>***</sup>	0
Operationele flexibiliteit	laag	hoog	hoog
Energiebehoefte (kWh.kg <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )	0,7-1,5 <sup>&amp;</sup>	0,5-1,3 <sup>^</sup>	zo min mogelijk

<sup>§</sup> i.e.= inwoners equivalenten

<sup>#</sup> berekend met de ontwikkelde modellen

<sup>\*</sup> Heijnen *et al.*, 1990

<sup>@</sup> Takeshima *et al.*, 1993; Sumino *et al.*, 1992<sup>b</sup>

<sup>&</sup> Tchobanoglous, 1979

<sup>^</sup> Riet van 't en Tramper, 1991

<sup>\*\*</sup> Tijhuis *et al.*, 1994

<sup>//</sup> gemiddelde waarde van verschillende actief-slibinstallaties

### 8.3 Gebruik van compacte bioreactoren met geïmmobiliseerde cellen bij steeds wisselende omstandigheden

Het gebruik van geïmmobiliseerde cellen voor de zuivering van afvalwater is vergeleken met bestaande systemen. Dit is gedaan met behulp van simulaties van de modellen die in dit project ontwikkeld zijn.

De dynamiek van het proces is onderzocht door te kijken naar het effect van temperatuurveranderingen en het effect van wisselende belastingen. Riolwaterzuiveringsinrichtingen worden meestal aan de 'veilige kant' gedimensioneerd. Bij het ontwerp van een nieuwe generatie compacte reactoren zal ook een veiligheidsmarge in acht dienen te worden genomen. Indien gebruik wordt gemaakt van geïmmobiliseerde cellen is intrinsiek reeds een veiligheidsmarge aanwezig: ten gevolge van diffusielimitatie wordt slechts een gedeelte van het dragermateriaal gebruikt. Het centrum van de gelbollen wordt niet gebruikt. Indien omstandigheden in een bioreactor ongunstiger zijn dan gemiddeld, bijvoorbeeld ten gevolge van lage temperaturen of ten gevolge van een piekbelasting zal biomassa aanwezig in het centrum van die gelbolletjes de klap opvangen. Dit is gedemonstreerd in tabel 8.2. Hierin wordt het ontwerp van een nitrificerende reactor met geïmmobiliseerde cellen vergeleken met dat van een actief-slibstelsysteem met en zonder 50% retourslib. Uitgegaan is van een gemiddelde capaciteit van  $2 \cdot 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  met een influentconcentratie van  $3,5 \text{ mol NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-3}$  ( $=63 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) bij  $30^\circ\text{C}$ . De berekeningen van de geïmmobiliseerde cellen zijn gedaan met de in dit onderzoek ontwikkelde modellen en de berekeningen van het actief-slibstelsysteem m.b.v. ontwerpregels volgens Barnes en Bliss (1983).

In het bovenste gedeelte van tabel 8.2 is het effect van een lage temperatuur ( $7^\circ\text{C}$ ) weergegeven. Als de temperatuur in een actief-slibstelsysteem daalt van  $30^\circ\text{C}$  naar  $7^\circ\text{C}$  moeten het aëratievolume en de verblijftijd in de tank met een factor 8 vergroot worden om een effluent met  $0,5 \text{ mol NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-3}$  ( $=9 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) te behouden. Als gebruik wordt gemaakt van geïmmobiliseerde nitrificerders hoeft het volume slecht 1,2 maal vergroot te worden. Dit wordt veroorzaakt doordat het proces niet biomassa-gelimiteerd is maar diffusie-gelimiteerd. Dit laatste is minder temperatuurgevoelig dan de activiteit van de cellen (zie hoofdstuk 4).

In het onderste gedeelte van tabel 8.2. is het effect van een piekbelasting weergegeven. Bij een piekbelasting van  $6 \cdot 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  (3 maal hoger dan gemiddelde belasting) moet de nitrificerende reactor in een actief-slibstelsysteem met eenzelfde factor vergroot worden (met en zonder retourslib). Het volume van de nitrificatietank met geïmmobiliseerde cellen hoeft echter slechts 2 maal vergroot te worden. Indien de influent-ammoniumconcentratie plotseling stijgt tot  $6 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$  ( $108 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) en de eis voor het effluent hetzelfde blijft, moeten de nitrificatietank in een actief-slibstelsysteem en de verblijftijd beiden met een factor 2 vergroot worden. Indien geïmmobiliseerde cellen gebruikt worden hoeven beiden slechts met een factor 1,33 vergroot te worden. Geïmmobiliseerde cellen zijn minder gevoelig voor piekbelastingen dan een actief-slibstelsysteem.

Tabel 8.2: Ontwerp van een nitrificatietank voor een actief-slibstelsysteem en een proces met geïmmobiliseerde cellen.

**Ontwerp gegevens:**

gemiddelde capaciteit:	$2 \cdot 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$
$\text{NH}_4^+$ influent:	$3,5 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} (= 63 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1})$
temperatuur:	$30^\circ\text{C}$
piekcapaciteit:	$6 \cdot 10^4 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$
piek $\text{NH}_4^+$ influent:	$6 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$
$\text{NH}_4^+$ effluent:	$0,5 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$

	Actief 30°C	slib* 7°C	Geïmmob. 30°C	cellen# 7°C
$\text{NH}_4^+$ effluent ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ )	0,5	0,5	0,5	0,5
Verblijftijd (uur)	42	351	0,75	0,9
Volume ( $\text{m}^3$ )	35000	293000	625	750
	met 50% retourslib			
$\text{NH}_4^+$ effluent ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ )	0,5	0,5		
Verblijftijd (uur)	28	231		
Volume ( $\text{m}^3$ )	23800	195000		
	piek cap.	piek $\text{NH}_4^+$	piek capaciteit	piek $\text{NH}_4^+$
$\text{NH}_4^+$ influent ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ )	3,5	6	3,5	6
$\text{NH}_4^+$ effluent ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ )	0,5	0,5	0,5	0,5
Verblijftijd (uur)	42	84	0,75	1
Volume ( $\text{m}^3$ )	$10,5 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^4$	1250	833
	met 50% retourslib			
$\text{NH}_4^+$ effluent ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$ )	0,5	0,5		
Verblijftijd (uur)	28	55		
Volume ( $\text{m}^3$ )	$7 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^4$		

Actief-slib systeem: Biomassaconcentratie:  $4000 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$   
 Percentage nitrificeerders:  $5\% (= 200 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3})$   
 $\text{NH}_4^+$  oxidatiesnelheid:  $8,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$   
 (=  $120 \text{ mg } \text{NH}_4^+ \cdot \text{g}^{-1} \text{ nitrificeerders} \cdot \text{d}^{-1}$ )

Geïmmobiliseerde cellen:  
 Initiële concentratie nitrificeerders:  $4 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{gel}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reactor}}$   
 Concentratie nitrificeerders aan 't eind:  $58 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{gel}} = 14,5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reactor}}$

\* berekend volgens Barnes and Bliss, 1983.

# berekend met de ontwikkelde dynamische modellen.

Indien deze fluctuaties regelmatig voorkomen in een zuivering zullen de geïmmobiliseerde cellen zich snel aanpassen (zie figuur 8.1.a). De capaciteit en de effluentkwaliteit zullen gewaarborgd blijven. Indien deze fluctuaties echter niet regelmatig voorkomen, maar om de paar maanden zal het systeem langzamer reageren (zie figuur 8.1.b). Dit wordt veroorzaakt door afsterving van biomassa (zie hoofdstuk 5). De afstervingsnelheid is hoger indien ammonium het limiterende substraat is dan indien zuurstof limiterend is. Als de influent-ammoniumconcentratie laag is zal een verlaging van de zuurstofconcentratie in het systeem leiden tot een verminderde afsterving van de aanwezige cellen (hoofdstuk 5).

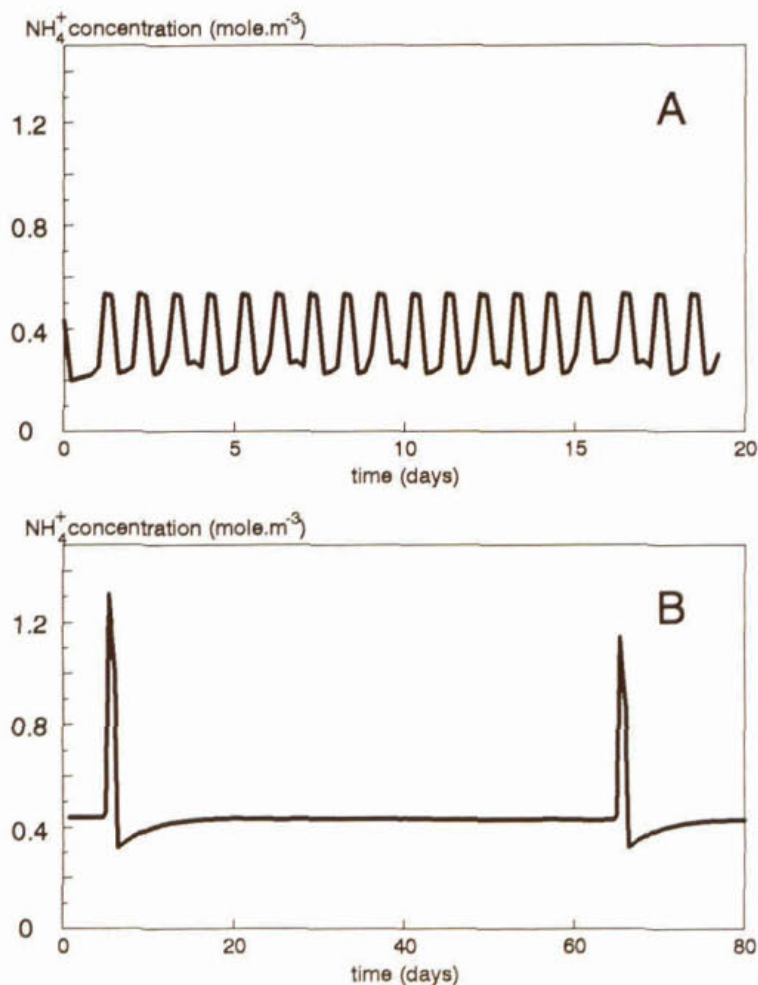


Figure 8.1: Effect van fluctuaties in de influent-ammoniumconcentratie op de effluentconcentratie. a) dagelijks fluctuaties, b) fluctuaties een keer per 2 maanden. (verblijftijd = 1 uur, gemiddelde influentconcentratie =  $3,5 \text{ mol NH}_4^+.\text{m}^{-3}$ , piekconcentratie =  $6 \text{ mol NH}_4^+.\text{m}^{-3}$ ).

De in dit project ontwikkelde modellen bleken de dynamiek van het nitrificatieproces met geïmmobiliseerde cellen heel goed te beschrijven. De ontwikkelde modellen vormen dan ook belangrijke hulpmiddelen voor het ontwerpen van installaties, zoals is weergegeven in tabel 8.2.

## 8.4 Economische haalbaarheidsstudie

Aan het begin van dit project is een theoretische haalbaarheidsstudie uitgevoerd door Witteveen en Bos. Op dat moment waren alleen gegevens van in alginaat of carrageen geïmmobiliseerde cellen in synthetische media bekend. Een bestaande actief-slib installatie (100.000 inwonerequivalenten;  $0,15 \text{ kg BZV} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{drooggewicht}} \cdot \text{d}^{-1}$ ) waarvan de nitrificatiecapaciteit verhoogd moest worden werd gekozen om geïmmobiliseerde nitrificerende cellen te vergelijken met een bestaande actief-slibstelsysteem. De nitrificatiecapaciteit werd verhoogd door een vergroting van het aëratievolume of door een proces met geïmmobiliseerde nitrificeerders voor of na de aërietank te plaatsen. De totale kosten voor deze aanpassingen werden vergeleken. Het proces met geïmmobiliseerde cellen bestond uit een airlift-loopreactor met nitrificerende micro-organismen ingesloten in alginaat. De gelbollen voor aantenen of vervanging werden in een aparte unit geproduceerd.

Uitgegaan werd van een capaciteit van  $2 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reactor}} \cdot \text{d}^{-1}$  indien de airliftreactor voor de aërietank werd geplaatst en een capaciteit van  $1 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{reactor}} \cdot \text{d}^{-1}$  indien deze na de aërietank werd geplaatst. Dit laatste werd gedaan om rekening te houden met de mogelijke hechting van heterotrofe organismen, welke met de ingesloten nitrificeerders zouden kunnen concurreren om zuurstof, zodat de capaciteit daalt.

De kosten bestonden uit de investeringskosten (bouwkosten, financiering, omzetbelasting, voorbereidingskosten en diversen), bedrijfskosten (personeel, overhead, onderhoud en energie), afschrijving van elektromechanisch gedeelte (15 jaar) en de afschrijving van het civieltechnische gedeelte (30 jaar). Een stijging in de energiekosten van 9% per jaar en een inflatie van 5% is meegenomen in de berekeningen. De totale looptijd van het project werd op 30 jaar beraamd.

Twee varianten werden doorgerekend: het dragermateriaal werd iedere 2 maanden of iedere 2 jaar vervangen. In tabel 8.3 zijn de relatieve besparingen van de verschillende mogelijke uitbreidingen van de nitrificatiecapaciteit van een actief-slibstelsysteem met elkaar vergeleken. Geconcludeerd werd dat de kosten om alginaatbolletjes te produceren ruimschoots gecompenseerd werden door de lagere kosten voor de constructie van een kleinere reactor, indien het dragermateriaal langer dan 2 maanden stabiel blijft. Indien de geïmmobiliseerde cellen na de beluchtingstank worden geplaatst zijn de relatieve besparingen het grootst (Witteveen en Bos, 1991). In deze studie zijn grondprijzen niet meegerekend. In Nederland zijn deze prijzen echter hoog; het gebruik van compacte reactoren, met het daaraan gekoppelde verminderde ruimtebeslag, kan daarom extra financiële voordelen hebben.

Tabel 8.3 De relatieve besparingen van verschillende ontwerpen voor uitbreiding van de beluchtingsruimte van een actief-slibinstallatie.

		relatieve besparing (%)
Actief slib met vergroot beluchtingsvolume		- referentie
Geïmmobiliseerde cellen na de beluchtingstank	nieuw support 1 x 2 maanden	+6
	nieuw support 1 x 2 jaar	+12
Geïmmobiliseerde cellen vóór de beluchtingstank	nieuw support 1 x 2 maanden	0
	nieuw support 1 x 2 jaar	+8

Aangezien deze haalbaarheidsstudie aan het begin van dit project is uitgevoerd was het ontwerp op de toenmalig aanwezige gegevens gebaseerd. Momenteel is echter bekend dat het inderdaad mogelijk om in huishoudelijk afvalwater nitrificatie met geïmmobiliseerde cellen te bewerkstelligen en dat hoge capaciteiten haalbaar zijn (tot  $6 \text{ kg N.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ ). Dit resulteert in hogere relatieve besparingen.

Tevens werd in de studie uitgegaan van alginaat als immobilisatiemateriaal. Indien een synthetisch dragermateriaal wordt gebruikt met een langere levensduur en ongeveer dezelfde kostprijs zullen de berekende besparingen hoger uitvallen. In tabel 8.4 zijn de geschatte kosten van alginaat vergeleken met de kosten van het stabiele chemisch gecrosslinkte polyethyleenoxide-gel.

Tabel 8.4 De geschatte kosten van alginaat en chemisch gecrosslinkt polyethyleenoxide-gelen.

	alginaat*	polyethyleen oxide <sup>#</sup>
prijs grondstof (fl.kg <sup>-1</sup> )	20-50	10-25
prijs m <sup>3</sup> gel (fl)	600-1000	300-750 <sup>§</sup>

\* 2-3% (w/v) alginaat gel

<sup>#</sup> 10% (w/w) gecrosslinkt polyethyleenoxide-gel ---> gel zwelt ongeveer 3-4 maal na crosslinking ---> 2-4% (w/v) polymeer in gezwollen gel.

<sup>§</sup> deze prijzen zijn onder voorbehoud, aangezien de prijs van het crosslinken nog niet bekend is.

Uit deze tabel volgt dat de grondprijs van polyethyleenoxide lager is dan van alginaat. Echter de uiteindelijke prijs van het polyethyleenoxide is nog niet helemaal zeker. Het polyethyleenoxide moet nog behandeld worden (gecrosslinkt), waardoor verwacht wordt dat de uiteindelijke prijs van het gel vergelijkbaar is met die van een alginaatgel. Het polyethyleenoxide-gel heeft echter veel betere karakteristieken: het lost niet op, is niet biologisch afbreekbaar en slijt niet. De levensduur van dit gel is daarom lang en de mogelijke kostenbesparing dus hoog.

## 8.5 Perspectieven van geïmmobiliseerde cellen voor de milieutechnologie

Het onderzoek heeft aangetoond dat er mogelijkheden zijn voor het gebruik van geïmmobiliseerde cellen in de milieutechnologie. Dit blijkt uit de vele ontwikkelingen op dit gebied. Op het vorig jaar georganiseerde congres 'Immobilized Cells: Basics and Applications' kwamen vele milieutechnologische toepassingen van geïmmobiliseerde cellen aan de orde, zoals: fosfaatverwijdering, accumulatie van zware metalen, afbraak van gechlloreerde koolwaterstoffen en biomonitoring.

In Japan wordt nitrificatie met geïmmobiliseerde cellen al op grote schaal uitgevoerd. De gerapporteerde volumetrische capaciteit is laag (ongeveer  $0,25-0,30 \text{ kg N.m}^{-3}_{\text{reactor}} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Dit wordt veroorzaakt door de relatief lage pelletconcentratie in het systeem en de lage biomassaconcentratie in het gelpellet. Indien de hoeveelheid gelpellets verhoogd zou worden tot 25% van het reactorvolume en de verblijftijd in de reactor verlaagd zou worden kan de capaciteit theoretisch verhoogd worden tot  $0,8 - 3 \text{ kg N.m}^{-3}_{\text{reactor}} \cdot \text{d}^{-1}$ . Het gebruikte PEG-pellet vertoonde een lange levensduur; de nitrificatiecapaciteit is reeds stabiel gedurende enkele jaren.

Het moge duidelijk zijn dat de resultaten van een toekomstgericht onderzoekprogramma als RWZI 2000 niet altijd rechtstreeks zullen leiden tot direct toepasbare oplossingen voor de alledaagse praktijkproblemen van een rioolwaterzuiveringsinrichting. Geïmmobiliseerde cellen dienen na afronding van het RWZI 2000 programma verder onderzocht te worden met als doel ze te implementeren in toekomstige generaties rwzi's.





## 9 Symbolenlijst

a	specifiek oppervlak van een bol	(m <sup>-1</sup> )
a <sub>g</sub>	specifiek oppervlak van een gasbel	(m <sup>2</sup> .m <sup>-3</sup> gasfase)
a <sub>lg</sub>	oppervlak van het vloeistof/gas grensvlak	(m <sup>2</sup> .m <sup>-3</sup> vloeistoffase)
a <sub>ls</sub>	oppervlak van het vast/vloeistof grensvlak	(m <sup>2</sup> .m <sup>-3</sup> vloeistoffase)
d <sub>b</sub>	gasbeldiameter	(m)
D <sub>e,g</sub>	effectieve diffusiecoëfficiënt in het gel	(m <sup>2</sup> . s <sup>-1</sup> )
D <sub>e,c</sub>	effectieve diffusiecoëfficiënt in de microkolonie	(m <sup>2</sup> . s <sup>-1</sup> )
E <sub>a</sub>	activeringsenergie	(J. mol <sup>-1</sup> )
H	Henry coëfficiënt	(m <sup>3</sup> . m <sup>-3</sup> )
k <sub>l,s</sub>	substraatoverdrachtscoëfficiënt in de filmlaag rond de vaste fase	(m. s <sup>-1</sup> )
k <sub>l,g</sub>	gas/vloeistof overdrachtscoëfficiënt	(m. s <sup>-1</sup> )
K <sub>s</sub>	Monod constante	(mol. m <sup>-3</sup> )
K <sub>s,n</sub>	Monod constante component n	(mol. m <sup>-3</sup> )
m	maintenance coëfficiënt	(mol. kg <sup>-1</sup> . s <sup>-1</sup> )
r	afstand van het centrum van een bolletje	(m)
r <sub>b</sub>	straal van de bol	(m)
r <sub>c</sub>	straal microkolonie	(m)
r <sub>s,a</sub> <sup>c</sup>	werkelijke substraatconsumptiesnelheid in kolonies	(mol. m <sup>-3</sup> . s <sup>-1</sup> )
r <sub>s,t</sub> <sup>c</sup>	theoretische substraatconsumptiesnelheid in kolonies	(mol. m <sup>-3</sup> . s <sup>-1</sup> )
r <sub>f</sub>	afstand van het centrum van de bol waar de substraatconcentratie verwaarloosbaar is	(m)
r <sub>s</sub>	macroscopische substraatconsumptiesnelheid	(mol. m <sup>-3</sup> . s <sup>-1</sup> )
r <sub>s,n</sub>	macroscopische substraatconsumptiesnelheid component n	(mol. m <sup>-3</sup> . s <sup>-1</sup> )
r <sub>x</sub>	biomassagroeiensnelheid	(kg. m <sup>-3</sup> . s <sup>-1</sup> )
R	gasconstante	(J. mol <sup>-1</sup> . K <sup>-1</sup> )
S	substraatconcentratie	(mol. m <sup>-3</sup> )
S <sub>n</sub>	substraatconcentratie component n	(mol. m <sup>-3</sup> )
S <sub>b</sub>	substraatconcentratie in de vloeibare fase	(mol. m <sup>-3</sup> )
S <sub>f</sub>	substraatconcentratie in het centrum van het bolletje	(mol. m <sup>-3</sup> )
S <sub>i</sub>	substraatconcentratie aan het kolonie/gel grensvlak	(mol. m <sup>-3</sup> )
S <sub>s</sub>	substraatconcentratie aan het oppervlak van de bol	(mol. m <sup>-3</sup> )
S' <sub>s</sub>	substraatconcentratie aan het oppervlak van de bol, indien rekening gehouden wordt met externe diffusielimitatie	(mol. m <sup>-3</sup> )
t	tijd	(s)
t <sub>end</sub>	eind tijd van simulatie	(s)
T	temperatuur	(K)
X	biomassaconcentratie	(kg. m <sup>-3</sup> )
X <sub>0</sub>	biomassaconcentratie op t = 0	(kg. m <sup>-3</sup> )
X <sub>c</sub>	biomassaconcentratie in microkolonies	(kg. m <sup>-3</sup> )
X <sub>max</sub>	maximale biomassaconcentratie	(kg. m <sup>-3</sup> )
X <sub>t</sub>	biomassaconcentratie op tijdstip t	(kg. m <sup>-3</sup> )
Y <sub>xs</sub>	yieldcoëfficiënt	(kg. mol <sup>-1</sup> )
Z <sup>1</sup>	parameterwaarde bij temperatuur T	
Z <sup>∞</sup>	Arrheniusconstante	

$\mu$	specifieke groeisnelheid	(s <sup>-1</sup> )
$\mu_{\max}$	maximale specifieke groeisnelheid	(s <sup>-1</sup> )
$\mu(r)$	specifieke groeisnelheid bij straal $r$	(s <sup>-1</sup> )
$\Delta t$	stapgrootte tijd voor groei biomassa	(s)
$\eta(r)_c$	effectiviteitsfactor in microkolonies bij straal $r$	(-)
$\rho$	afstand van centrum van de kolonie	(m)
$\rho_c$	koloniestraal	(m)
$\rho_{c,t(i)}^r$	koloniestraal bij $r$ op tijdstip = $i$	(m)
$\rho_x$	koloniedichtheid	(kg. m <sup>-3</sup> )
$\rho_{x,Nb}$	koloniedichtheid <i>Nitrobacter</i>	(kg. m <sup>-3</sup> )
$\rho_{x,Ns}$	koloniedichtheid <i>Nitrosomonas</i>	(kg. m <sup>-3</sup> )
$\rho_f$	afstand van centrum van de kolonie waar de substraat-concentratie verwaarloosbaar is	(m)
$\theta$	drogestofgehalte per cel	(kg)
$\tau_{lg}^O$	karacteristieke tijd voor zuurstofoverdracht van gas naar vloeistoffase	(s)
$\tau_{ls}$	karacteristieke tijd voor substraatoverdracht van vloeistof- naar vaste fase	(s)
$\tau_{kin}$	karacteristieke tijd voor substraatomzetting	(s)
$\tau_{conv}$	karacteristieke tijd voor substraatomzetting in het gelbolletje	(s)
$\tau_{ex}^O$	karacteristieke tijd voor uitputting gasbel	(s)
$\tau_{ret}^{liq}$	karacteristieke tijd voor vloeistofverblijftijd	(s)
$\tau_{ret}^{gas}$	karacteristieke tijd voor gasbelverblijftijd	(s)
$\tau_{mix}$	karacteristieke tijd voor menging vloeistoffase	(s)
$\tau_{circ}$	karacteristieke tijd voor vloeistofcirculatie in een airlift-loopreactor	(s)

## 10 Literatuur

- Adlerkreutz P.** (1986) Oxygen supply to immobilized cells: 5. Theoretical calculations and experimental data for the oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with oxygen or p-benzoquinone as electron acceptor. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 223-232
- Ainsworth P.A., Blanshard J.M.V.** (1978) The interdependence of molecular structure and strength of carrageenan/carob gels Part I. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 11, 279-282
- Annachatre A.P., Khanna P.** (1987) Unsteady-state biofilm kinetics. *J. Env. Eng.* 113, 429-433
- Ariga O., Takagi H., Nishizawa H., Sano Y.** (1987) Immobilization of microorganisms with PVA hardened by iterative freezing and thawing. *J Ferment Technol* 65 (6): 651-658
- Arnaud J.P., Lacroix C., Choplin L.** (1989) Effect of lactic fermentation on the rheological properties of k-carrageenan/locust bean gum mixed gels inoculated with *S. thermophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1403-1408
- Asano H., Myoga H., Asano M., Toyao M.** (1992) Nitrification treatability of whole microorganisms immobilized by the PVA freezing method. *Wat. Sci. Technol.* 26, 2397-2400
- Audet P., Paquin C., Lacroix C.** (1990) Batch fermentations with a mixed culture of lactic acid bacteria immobilized separately in k-carrageenan/locust bean gum gel beads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 662-668
- Barnes D., Bliss P.J.** (1983) Biological control of nitrogen in wastewater treatment. E. & F.N. Spon, London, 146 p.
- Beefink H.H., Van Der Heijden R.T.J.M., Heijnen, J.J.** (1990) Maintenance requirements: energy supply from simultaneous endogenous respiration and substrate consumption. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 73, 203-210
- Benefield L., Molz F.** (1985) Mathematical simulation of a biofilm process. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 921-931
- Black G.M.** (1986) Characteristics and performance of immobilised cell reactors. In: *Process engineering aspects of immobilised cell systems* (Webb, C., Black, G.M., Atkinson, B., eds.) The Institution of Chemical Engineers, Warwickshire, 1986, 75-86
- Capdeville B., Nguyen K.M., Rols J.L.** (1992) Biofilm modelling: structural, reactional and diffusional aspects. In: *Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. (eds.) Biofilms-Science and Technology.* Eds.: Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, p. 251-276
- Chamy R., Nunez M.J., Lema L.M.** (1990) Optimization of the hardening treatment of *S. cerevisiae* bioparticles. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 52-59
- Chen K.C., Huang C.T.** (1988) Effects of the growth of *Trichosporon cutaneum* in Ca-alginate gel beads upon bead structure and oxygen transfer characteristics. *Enzyme. Microb. Technol.* 10, 284-292
- Chen K.-C., Liu Y.-F.** (1994) Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 79-83
- Chisti M.Y.** (1989) *Airlift bioreactors*, Elsevier science publishers, Essex, England
- Chudoba P., Pujol R., Emori H., Bourdelot J.C., Rovel J.M.** (1996) Comparison of a system using immobilized microorganisms with a conventional activated sludge process for wastewater treatment. In: *R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) Immobilized cells: basics and applications.* Elsevier Science, pp. 710-717
- De Gooijer C.D., Wijffels R.H., Tramper J.** (1991) Growth and substrate consumption

of *Nitrobacter agilis* cells immobilized in carrageenan. Part 1: Dynamic modelling. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 224-231.

**De Gooijer C.D., Wijffels R.H., Tramper J.** (1992) Dynamic modelling the growth of immobilized nitrifying bacteria: biofilm development. In: Melo *et al.* Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, pp. 291-296

**Denac M., Uzman S., Tanaka H., Dunn I.J.** (1983) Modeling of experiments on biofilm penetration effects in a fluidized bed nitrification reactor. *Biotechnol Bioeng.* 25: 1841-1861

**Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.** (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytic Chemistry* 28(3), 350-356.

**Emori H., Mikawa K., Hamaya M., Yamaguchi T., Tanaka K., Takeshima T.** (1996) PEGASUS: innovative biological nitrogen removal process using entrapped nitrifiers. In: R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) *Immobilized cells: basics and applications*. Elsevier Science, pp. 546-555

**Greenberg A.E., Trussel R.R., Clesceri L.S.** (1985) Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th ed., American Public Health Association, Washington DC

**Hashimoto S., Furukawa K.** (1987) Immobilization of activated sludge by PVA-boric acid method. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 52-59

**Heijnen J.J., Mulder A., Weltevrede R., Hols J., Van Leeuwen H.L.J.M.** (1991) Large scale anaerobic-aerobic treatment of complex industrial waste water using biofilm reactors. *Wat Sci Tech* 23: 1427-1436

**Heijnen J.J., Van 't Riet K.** (1984) Mass transfer, mixing and heat transfer phenomena in low viscosity bubble column reactors. *Chem. Eng. J.* 28, B21-B42

**Heijnen J.J., Van Loosdrecht M.C.M.** (1990) Biofilm kan hoofdrol spelen in aërobe afvalwaterzuivering. *Procestehnologie*, 29-33

**Hulst A.C., Tramper J., Van 't Riet K., Westerbeek J.M.M.** (1985) A new technique for the production of immobilized biocatalyst in large quantities. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 870-876

**Hulst A.C., Hens H.J.H., Buitelaar R.M., Tramper J.** (1989) Determination of the effective diffusion coefficient of oxygen in gel materials in relation to gel concentration. *Biotechnol. Techn.* 3, 199-201

**Hunik J.H.** (1993) Engineering aspects of nitrification with immobilized cells. PhD thesis Wageningen Agricultural University

**Hunik J.H., Tramper J.** (1993) Large-scale production of  $\kappa$ -carrageenan droplets for gel beads production: theoretical and practical limitations of size and production rate. *Biotechn. Progr.* 9: 186-192

**Hunik J.H., Bos C.G., Van den Hoogen M.P., De Gooijer C.D., Tramper J.** (1994a) Co-immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* cells: validation of a dynamic model for simultaneous substrate conversion and growth in  $\kappa$ -carrageenan beads. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1153-1163.

**Hunik J.H., Tramper J., Wijffels R.H.** (1994b) A strategy to scale-up nitrification processes with immobilized nitrifying cells. *Bioprocess. Eng.* 11, 73-82.

**Ibrek H.O., Molvaer J., Faafing B.** (1990) Nutrient loading to Norwegian coastal waters, and it's contribution to the pollution of the North Sea. In: Proceedings International Conference on North Sea Pollution, 10-14 September 1990, Amsterdam, the Netherlands. IAWPRC/EWPCA/NVA, p 455-471

- Ichijo H., Nagasawa J., Yamauchi A.** (1990) Immobilization of biocatalysts with poly(vinylalcohol) supports. *J. Biotechnol.* 14, 169-178
- Jones W.L., Dockery J.D., Vogel C.R., Sturman P.J.** (1993) Diffusion and reaction within porous packing media: a phenomenological model. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 947-956
- Karel S.F., Robertson C.R.** (1989) Cell mass synthesis and degradation by immobilized *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 337-356
- Keen G.A., Prosser J.I.** (1987) Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 147: 73-79
- Knowles G., Downing A.L., Barrett M.J.** (1965) Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture, with the aid of an electronic computer. *J Gen Microbiol* 38: 263-278
- Kokufuta E., Matsumoto W., Nakamura I.** (1982) Immobilization of *Nitrosomonas europaea* cells with polyelectrolyte complex. *Biotechnol Bioeng* 24: 1591-1603
- Krouwel P.G.** (1982) Immobilized cells for solvent production. Ibe and ethanol fermentations. PhD thesis Delft University
- Kurosawa H., Matsumura M., Tanaka H.** (1989) Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 926-932
- Laudelout H., Simonart P.C., Van Droogenbroeck R.** (1968) Calorimetric measurement of free energy utilization by *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Arch Microb* 63: 256-277
- Leenen E.J.T.M., Boogert A.A., Van Lammeren A.A.M., Tramper J., Wijffels R.H.** (1996a) Quantitative characterization of viability and growth dynamics of immobilized nitrifying cells. In: R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) *Immobilized cells: basics and applications*. Elsevier Science, pp. 341-348
- Leenen E.J.T.M., Dos Santos V.A.P.M., Tramper J., Wijffels R.H.** (1996b) Characteristics and selection criteria of support materials for immobilization of nitrifying bacteria. In: R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) *Immobilized cells: basics and applications*. Elsevier Science, pp. 202-212
- Leenen E.J.T.M., Van Boxtel A.M.G.A., Englund G., Tramper J., Wijffels R.H.** (1996c) Effect of low temperatures on immobilized *Nitrobacter agilis* cells in air-lift loop reactors. Submitted for publication
- Lewandowski Z., Bakke R., Characklis W.G.** (1987) Nitrification and autotrophic denitrification in calcium alginate beads. *Wat Sci Tech* 19: 175-182
- Martinsen A., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O.** (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate in gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 79-89
- Mattiasson B., Ramstorp M., Nilsson I., Hahn-Hagerdal B.** (1981) Comparison of the performance of a hollow fibre microbe reactor with a reactor containing alginate entrapped cells, denitrification of water using *Pseudomonas denitrificans*. *Biotechnol Lett* 3: 561-566
- Monbouquette H.G., Ollis D.F.** (1988) Structured modelling of immobilized cell kinetics and RNA content. In: Moo-Young M., *Bioreactor Immobilized Enzymes & Cells, fundamentals and applications*, Elsevier Applied Science, London
- Monbouquette H.G., Sayles G.D., Ollis D.F.** (1990) Immobilized cell biocatalyst activation and pseudo-steady-state behavior: model and experiment. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 609-629
- Muscat A., Beyersdorff J., Vorlop K.-D.** (1993) Poly(carbamoylsulphonate), a material for immobilization; synthesis, diffusion- and mechanical properties. *Biotechnol. Techn.* 7, 591-596

- Myoga H., Asano H., Nomura Y., Yoshida H.** (1991) Effects of immobilization conditions on the nitrification treatability of entrapped cell reactors using PVA freezing method. *Wat Sci Tech* **23**: 1117-1124
- Nakasaki K., Murai T., Akiyama T.** (1989) Dynamic modelling of immobilized cell reactor: application to ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 1317-1323.
- Nilsson I., Ohlson S.** (1982a) Columnar denitrification of water by immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells. *Eur J Appl Biotechnol* **14**: 86-90
- Nilsson I., Ohlson S.** (1982b) Immobilized cells in microbial nitrate reduction. *Appl Biochem Biotechnol* **7**: 39-41
- Nilsson I., Ohlson S., Haggstrom L., Molin N., Mosbach K.** (1980) Denitrification of water using immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* **10**: 261-274
- Ødegaard H., Paulsrud B., Bilstad T., Pettersen J.E.** (1990) Norwegian strategies in the treatment of municipal wastewater towards the reduction of nutrient discharges to the North Sea. In: North Sea pollution, technical strategies for improvement, pp 355-366. Amsterdam, The Netherlands. IAWPRC/EWPCA/NVA
- Østgaard K., Knutsen S.H., Dyrset N, Aasen I.M.** (1993a) Production and characterization of guluronate lyase from *Klebsiella pneumoniae* for applications in seaweeds biotechnology. *Enzyme Microbiol. Technol.* **15**, 756-763
- Østgaard K., Wangen B.F., Knutsen S.H., Aasen I.M.** (1993b) Large scale production and purification of  $\kappa$ -carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora* for applications in seaweeds biotechnology. *Enzyme Microbiol. Technol.* **15**, 326-333
- Press W.H., Flannery B.P., Teukolsky S.A., Vetterling W.T.** (1988) Numerical recipes: the art of scientific computing, Cambridge University Press, Cambridge, New York
- Renneberg R., Sonomoto K., Katoh S., Tanaka A.** (1988) Oxygen diffusivity of synthetic gels derived from prepolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1-7
- Rittmann B.E.** (1987) Aerobic biological treatment. *Env Sci Technol* **21**: 128-136
- Roels J.A.** (1983) Energetics and kinetics in biotechnology. Amsterdam, The Netherlands. Elsevier Biomedical Press
- Rostron W.M., Stuckey D.C., Young A.A.** (1996) Treatment of high strength ammonia wastewaters using immobilized biomass. In: R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) *Immobilized cells: basics and applications*. Elsevier Science, pp. 703-709
- Salmon P.M.** (1989) Mass transport phenomena in reactors containing entrapped enzymes or bacterial cells. PhD thesis Stanford University, USA
- Sayles G.D., Ollis D.F.** (1989) Periodic operation of immobilized cell systems: analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **34**, 160-170
- Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.** (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnol.* **8** (3) 71-78
- Stewart P.S., Robertson C.R.** (1989) Microbial growth in a fixed volume: studies with entrapped *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 34-40
- Stora** (1979) Handleiding voor microscopisch slibonderzoek. Rijswijk
- Stormo K.E., Crawford R.L.** (1992) Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. *Appl. Environm. Microbiol.* **58**, 727-730
- Sumino T., Nakamura H., Mori N., Kawaguchi Y., Tada M.** (1992a) Immobilization of nitrifying bacteria in porous pellets of urethane gel for removal of ammonium nitrogen from waste-water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 556-560
- Sumino T., Nakamura H., Mori N., Kawaguchi Y.** (1992b) Immobilization of nitrifying bacteria by polyethylene glycol prepolymer. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 37-42

- Sweere A.P.J., Luyben K.Ch.A.M., Kossen N.W.F.** (1987) Regime analysis and scale-down: tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme Microbiol. Technol.* 9, 386-398.
- Tada M., Kimata T., Mori N., Emori H.** (1990) Nitrogen removal systems using immobilized microorganisms in synthetic resin. *Hitachi Review* 39 (6): 379-386
- Takeshima M., Kimata T., Mori N., Emori H.** (1993) "Pegasus", an innovative high-rate BOD and nitrogen removal process for municipal wastewater. 66th WEF Annual Conference
- Tanaka H., Uzman S., Dunn I.J.** (1981) Kinetics of nitrification using a fluidized sand bed reactor with attached growth. *Biotechnol Bioeng* 23: 1683-1702
- Tanaka H., Matsamura M., Veliky I.A.** (1984) Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 53-58
- Tanaka K., Tada M., Kimata T., Harada S., Fujii Y., Mizuguchi T., Mori N., Emori H.** (1991) Development of new nitrogen removal system using nitrifying bacteria immobilized in synthetic resin pellets. *Wat Sci Tech* 23: 681-690
- Tanaka K., Sumino T., Nakamura H., Ogasawara T., Emori H.** (1996) Application of nitrification by cells immobilized in polyethylene glycol. In: R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) *Immobilized cells: basics and applications*. Elsevier Science, pp. 622-632
- Tchobanoglous G.** (1979) Wastewater engineering: treatment, disposal, reuse. McGraw-Hill series in water resources and environmental engineering. Metcalf & Eddy, Inc., 920 p
- Tijhuis L., Rekswinkel H.G., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J.** (1994) Dynamics of population and biofilm structure in the biofilm airlift suspension reactor for carbon and nitrogen removal. *Wat. Sci. Tech.* 29
- Toda K., Sato K.** (1985) Simulation study on oxygen uptake rate of immobilized growing microorganisms. *J. Ferment. Technol.* 63 (3), 251-258
- Tramper J., De Man A.W.A.** (1986) Characterization of *Nitrobacter agilis* immobilized in calcium alginate. *Enzyme Microb Technol* 8: 472-476
- Tramper J., Grootjen D.R.J.** (1986) Operating performance of *Nitrobacter agilis* immobilized in carrageenan. *Enzyme Microb Technol* 8: 477-480
- Uemoto H., Saiki H.** (1996) Behavior of immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans* in tubular gel for nitrogen removal in wastewater. In: R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) *Immobilized cells: basics and applications*. Elsevier Science, pp. 695-702
- Underdal B., Skulberg O.M., Dahl E., Aune T.** (1988) Disastrous bloom of *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae) in Norwegian Coastal Waters 1988 - Mortality in Marine Biota. *AMBIO* 18: 265-270
- Van Ginkel C.G., Tramper J., Luyben K.Ch.A.M., Klapwijk A.** (1983) Characterization of *Nitrosomonas europaea* immobilized in calcium alginate. *Enzyme Microb Technol* 5: 97-303
- Van 't Riet K., Tramper J.** (1991) Basic bioreactor design, Marcel Dekker Inc, New York, USA
- Van Vliet T., Lucisano M., Casiraghi E.** (1991) Inventory of test methods. In: Rheology and fracture properties of cheese. Bulletin of the international dairy federation 268, 16-25
- Venkatasubramanian K., Karkare S.B., Vieth W.R.** (1983) Chemical engineering analysis of immobilized-cell systems. *Appl Biochem Bioeng* 4: 311-349
- Verlaan P.** (1987) Modelling and characterization of an airlift-loop reactor. PhD Thesis.

Wageningen Agricultural University, The Netherlands

- Vorlop K.-D., Muscat A., Beyersdorff J.** (1992) Entrapment of microbial cells within polyurethane hydrogel beads with the advantage of low toxicity. *Biotechnol. Techn.* 6, 483-488
- Wanner O., Gujer W.** (1986) A multispecies biofilm model. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 314-328
- Weast R.C.** (1979) CRC Handbook of chemistry and physics. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA, F-62
- Willaert R.** (1993) Reaction and diffusion in gel immobilised cell systems. PhD thesis Vrije Universiteit Brussel, Belgium
- Willaert R., Baron G.** (1993) Growth kinetics of gel-immobilized yeast cells studied by on-line microscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 347-352
- Willaert R.G., Baron G.V.** (1994) Effectiveness factor calculation for immobilised growing cell systems. *Biotechnol. Techniques.* 8, 695-700
- Willke B., Willke T., Vorlop K.-D.** (1994) Poly(carbamoylsulphonate) as a matrix for whole cell immobilization - Biological characterization. *Biotechnol. Techn.* 8, 623-626
- Willke T., Vorlop K.-D.** (1996) Nitrification in PVAL beads: influence of pH and temperature on nitrite oxidation. In: R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) *Immobilized cells: basics and applications*. Elsevier Science, pp. 718-724
- Wise D.L., Houghton G.** (1966) The diffusion coefficients of ten slightly soluble gases in water at 10-60 °C. *Chem. Eng. Sci.* 21, 999-1010
- Witteveen & Bos** (1991) Technisch-economische verkenning van zuivering met geïmmobiliseerde nitrificerende bacteriën
- Wolffberg A., Sheintuch M.** (1993) Density distribution of growing immobilized cells. *Chem. Eng. Science* 48, 3937-3944
- Woodward J.** (1988) Methods of immobilization of microbial cells. *J. Microbiol. Meth.* 8: 91-102
- Wu K.-Y.A., Wisecarver K.D.** (1992) Cell immobilization using PVA crosslinked with boric acid. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 447-449
- Wyatt T.** (1979) *Developments in Marine Biology vol. 1 - Toxic Dinoflagellate Blooms*. D.L. Taylor, H.H. Seliger (eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 263-268
- Wijffels R.H., Tramper J.** (1989) Performance of growing *Nitrosomonas europaea* cells immobilized in  $\kappa$ -carrageenan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 108-112.
- Wijffels R.H., De Gooijer C.D., Kortekaas S., Tramper J.** (1991) Growth and substrate consumption of *Nitrobacter agilis* cells immobilized in carrageenan: part 2. model evaluation. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 232-240.
- Wijffels R.H., Schepers A.W., Smit M., De Gooijer C.D., Tramper J.** (1994) Effect of initial biomass concentration on the growth of immobilized *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 153-157.
- Wijffels R.H., Englund G., Hunik J.H., Leenen E.J.T.M., Bakketun Å., Günther A., Obón de Castro J.M., Tramper J.** (1995a) Effects of diffusion limitation on immobilized nitrifying microorganisms. *Biotechnol Bioeng.* 45: 1-9
- Wijffels R.H., De Gooijer C.D., Schepers A.W., Beuling E.E., Mallée L.R., Tramper J.** (1995b) Growth of immobilized *Nitrosomonas europaea*: implementation of diffusion limitation over microcolonies. *Enzyme Microb. Techn.* 17: 462-471
- Wijffels R.H., Eekhof M.R., De Beer D., Van Den Heuvel J.C., Tramper J.** (1995c) Pseudo-steady-state oxygen concentration profiles in an agar slab containing growing *Nitrobacter agilis*. *J. Fermentation and Bioengineering* 79 (2): 167-170



**Wijffels R.H., Tramper J.** (1995) Nitrification by immobilized cells. *Enzyme Microb. Techn.* 17: 482-492

**Wijffels R.H., De Gooijer C.D., Tramper J.** (1996) Gel immobilised cell systems: part 2. In: R.G. Willaert, G.V. Baron, L. De Backer (eds.) *Immobilised living cell systems: modelling and experimental methods*. John Wiley and Sons Ltd. pp. 215-236

**Zevenboom W., Rademaker M., Colijn F.** (1990) Exceptional algal blooms in Dutch North Sea waters. In: *Proceedings International Conference on North Sea Pollution*, 10-14 September 1990, Amsterdam, the Netherlands. IAWPRC/EWPCA/NVA, p. 473-486



## 11. Produkten

### Publikaties

Wijffels R.H., Leenen E.J.T.M., Tramper J. Possibilities of nitrification with immobilized cells in waste-water treatment: model or practical system ?, *Wat. Sci. Tech.* (1993) **27**: 233-240.

Wijffels R.H., Englund G., Hunik J.H., Leenen E.J.T.M., Bakketun Å., Günther A., Obon de Castro J., Tramper J. Effects of diffusion limitation on immobilized nitrifying microorganisms at low temperatures, *Biotech. Bioeng.* (1995) **45**: 1-9.

Leenen E.J.T.M., Martins dos Santos V.A.P., Grolle K.C.F., Tramper J., Wijffels R.H. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment, *Water Res.* (1996) **30**: 2895-2996.

Leenen E.J.T.M., Van Boxtel A.M.G.A., Englund G., Tramper J., Wijffels R.H. Reduced temperature sensitivity of immobilized *Nitrobacter agilis* cells caused by diffusion limitation, accepted for publication in *Enzyme Microb. Techn.*

Leenen E.J.T.M., Boogert A.A., Van Lammeren A.A.M., Tramper J., Wijffels R.H. Dynamics of artificially immobilized *Nitrosomonas europaea*: effect of biomass death, submitted for publication in *Biotechn. Bioeng.*

Leenen E.J.T.M. Koens L.A., De Graaf S.C., Engbers G.H.M., Tramper J., Wijffels R.H. Artificially immobilized microorganisms for nitrification of wastewater, submitted for publication in *J. Ferment. Bioeng.*

Martins dos Santos V.A.P., Leenen E.J.T.M., Rippol M.M., Van der Sluis C., Van Vliet T., Tramper J., Wijffels R.H. Relevance of rheological properties of gel beads for their mechanical stability in bioreactors, submitted for publication in *Biotech. Bioeng.*

Leenen E.J.T.M., Tramper J., Wijffels R.H. Nitrification by artificially immobilized cells: model and practical system!, submitted for publication in *Water Res.*

Leenen E.J.T.M. Nitrification by artificially immobilized cells: model or practical system? (1997), proefschrift Landbouwniversiteit Wageningen.

### Proceedings

Leenen E.J.T.M., Tramper J., Wijffels R.H. High rate nitrification with artificially immobilized nitrifying bacteria, ICHIME-Environmental technology (1994) Brighton 4-6 july: 52-54.

Leenen E.J.T.M., Santos V.A., Tramper J., Wijffels R.H. Stability of carrier materials for (waste)water treatment, *Polymer Preprints* (1994) **35**: 81-82.

Leenen E.J.T.M., Boogert A.A., Van Lammeren A.A.M., Tramper J., Wijffels R.H. (1996a) Quantitative characterization of viability and growth dynamics of immobilized nitrifying cells. In: R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) *Immobilized cells: basics and applications*. Elsevier Science, pp. 341-348

Leenen E.J.T.M., Dos Santos V.A.P.M., Tramper J., Wijffels R.H. (1996) Characteristics and selection criteria of support materials for immobilization of nitrifying bacteria. In: R.H. Wijffels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper (eds.) *Immobilized cells: basics and applications*. Elsevier Science, pp. 202-212

Leenen E.J.T.M., Boogert A.A., Van Lammeren A.A.M., Tramper J., Wijffels R.H. (1996) Dynamics of artificially immobilized *Nitrosomonas europaea*: effect of biomass decay. In: International Workshop on Bioencapsulation, sept 22-25, Potsdam, Germany, T34.

