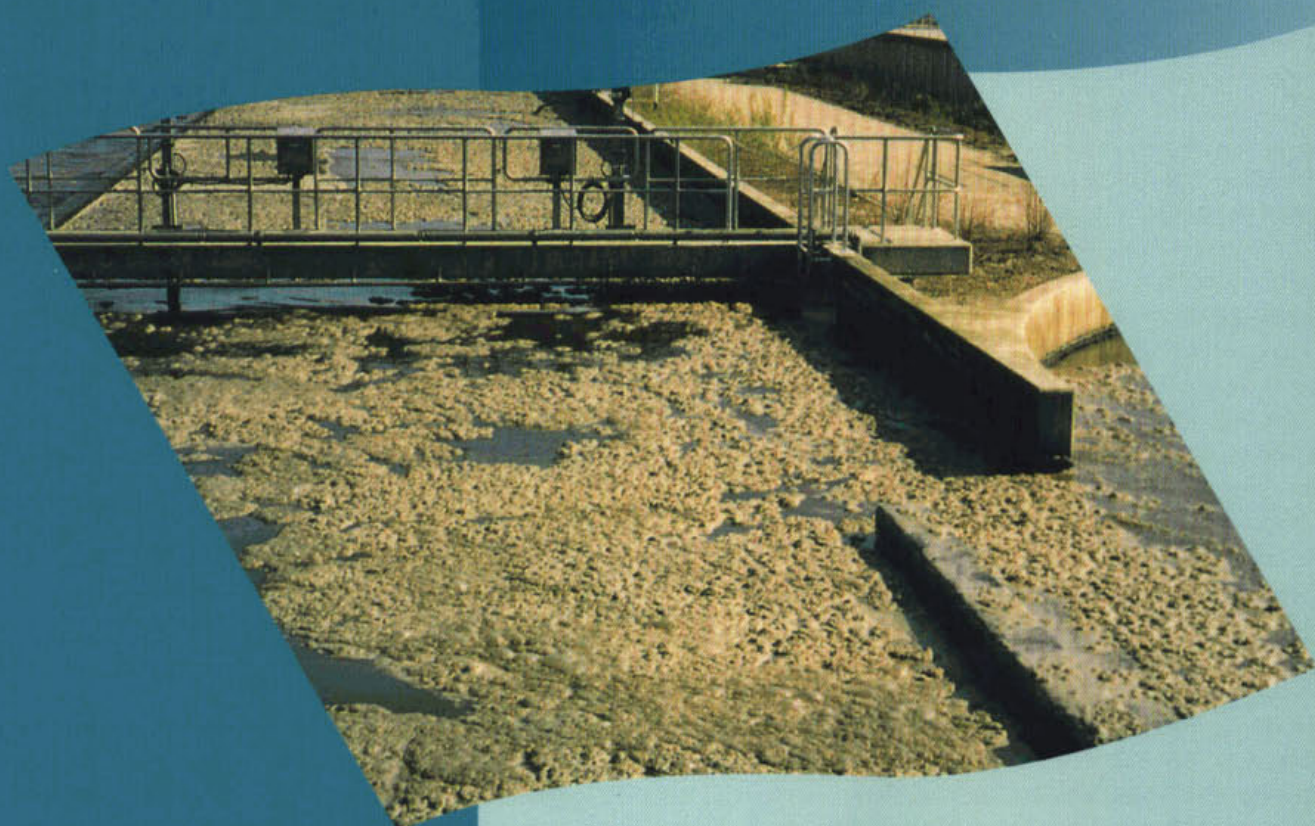


## Stikstofverwijdering bij lage BZV/N-verhouding

### Simultane nitrificatie/denitrificatie onder micro-aërofiele condities?



97

w 07



## Stikstofverwijdering bij lage BZV/N-verhouding

*Simultane nitrificatiedenitrificatie  
onder micro-aërofiele condities?*

97

W 07

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  
tel. 079 - 361 11 88  
fax 079 - 361 39 27  
o.v.v. ISBN- of bestelnummer en  
een duidelijk afleveradres.  
ISBN 90.74476.97.X

## Ten geleide

Na omzetting van organische en anorganische stikstof door micro-organismen naar ammonium, is nitrificatie en denitrificatie *de* klassieke route voor stikstofverwijdering. De nitrificatie - de oxydatie van ammonium naar nitraat - is een uniek biochemisch proces, waarvoor naar verwachting geen alternatieven zullen zijn.

Anders ligt dit voor de denitrificatie, waarvoor bij de klassieke route een koolstofbron als elektronen-donor nodig is. In theorie is een BZV/N-verhouding van 2 in de aanvoer van de beluchtingstank voldoende voor een volledige denitrificatie, hoewel de praktijk veiligheidshalve een verhouding van 3 à 4 aanhoudt.

Door verschillende oorzaken kan in een zuiveringsproces de BZV/N-verhouding te laag zijn, zodat voor een goede stikstofverwijdering extra koolstofbron gedoseerd moet worden, een kostenverhogende factor, mede door de toenemende slibproductie.

Het thans voorliggende verslag geeft het onderzoek weer naar de mogelijkheid om stikstof te verwijderen via de route van de simultane nitrificatie/denitrificatie onder micro-aërofiële omstandigheden. De experimenten tonen aan de stikstofverbindingen en ook nitriet volledig omgezet worden in nitraat. Er wordt echter geen stikstof geproduceerd. Denitrificatie onder deze specifieke omstandigheden vindt dus niet plaats, waardoor deze route om bij lage BZV/N-verhouding stikstof te verwijderen afvalt.

Het onderzoek werd door het bestuur van de STOWA opgedragen aan TNO Milieu, Energie en Procesinnovatie, afdeling Milieubiotechnologie, die daarbij samenwerkte met de Vakgroep Microbiologie van de VU Amsterdam (projectteam bestaande uit ir. D.H. Eikelboom, dr.ir. R.T. van Houten en dr. H.W. van Verseveld). Het project werd namens de STOWA begeleid door een commissie bestaande uit ir. C. Kerstens (voorzitter), ir. M.M.A. Bentvelsen, ir. B.A. Bult, mw. dr. M.M.A. Ferdinandy, dr.ir. A. Klapwijk, ing. A.A.J.C. Schellen, ir. P.C. Stamperius en ir. A. Mulder (technisch secretaris).

Utrecht, augustus 1997

De directeur van de STOWA

drs. J.F. Noorthoorn van der Kruijff



# 1. Inleiding

## Probleemstelling

De verwijdering van stikstofverbindingen uit afvalwater vindt doorgaans in twee stappen plaats. Eerst wordt ammonium door autotrofe micro-organismen omgezet in nitraat. Daarna wordt het nitraat omgezet in stikstofgas. Bij de omzetting van nitraat tot moleculair stikstof door heterotrofe organismen zijn organische koolstofverbindingen (BZV) nodig. Deze koolstof dient met name als elektronendonor voor de reductie van nitraat tot stikstofgas, en in beperktere mate als bouwstof voor de groei van micro-organismen.

De verhouding koolstof/stikstof in stedelijk afvalwater kan soms zo laag zijn dat stikstofverwijdering via dit conventionele biologische proces niet mogelijk is. Men kan in dergelijke gevallen koolstofbron toevoegen zoals methanol. Nadelen van deze methode zijn de hoge kosten en het mogelijk verminderd zuiveringsresultaat. Wellicht kennen andere, alternatieve stikstofverwijderingstechnieken deze nadelen niet.

Het 'ANAMMOX'-proces en de 'nitriet-route' zijn mogelijke opties om een vergaande stikstofverwijdering te realiseren zonder dat extra koolstofbron toegevoegd hoeft te worden. Het 'ANAMMOX'-proces is gebaseerd op de anaërobe ammoniumoxidatie volgens:



Dit proces biedt interessante mogelijkheden voor de stikstofverwijdering omdat minder zuurstof nodig is voor de nitrificatie. Bovendien is voor de denitrificatie door het gebruik van ammonium geen andere elektronendonor nodig.

De nitriet-route gaat uit van een dusdanige regeling van de bestaande nitrificatie dat deze kan worden gestopt bij het intermediair nitriet. Nitriet wordt dan achtereenvolgens gedenitrificeerd tot stikstofgas. De voordelen van dit proces zijn ook een verminderde zuurstofbehoefte bij nitrificatie en een verminderde behoefte aan elektronendonor. De toepassingsmogelijkheden van bovengenoemde twee processen zijn voornamelijk echter onduidelijk. Vandaar dat beide processen onderwerp zijn van nadere studie. (STOWA, 1996; STOWA, 1997).

In 1995 is bij een promotie-onderzoek aan de VU in Amsterdam vastgesteld dat met stedelijk afvalwater actief slib gekweekt kan worden waarin nitrificerende micro-organismen onder micro-aërobiele omstandigheden tevens denitrificeren. Mogelijk kan deze interessante ontdekking worden uitgewerkt tot een duurzame technologie voor de verwijdering van stikstof uit afvalwater, zonder toevoeging van een externe koolstofbron.

## Doelstelling

Door TNO en de VU is een onderzoeksprogramma gestart naar de mogelijkheden van simultane nitrificatie/denitrificatie onder micro-aërobiele omstandigheden. Het in dit verslag beschreven onderzoek heeft betrekking op dit programma. De doelstellingen van het project zijn derhalve:

- onderzoeken van de reproduceerbaarheid van de in het proefschrift aan de VU A'dam vermelde waarnemingen.
- onderzoek naar de vraag of de voor het proces benodigde micro-organismen tot de normale slibpopulatie behoren dan wel door speciale selectie-omstandigheden moeten worden verkregen.

## Werkwijze

Het onderzoek is gestart met controle-experimenten waarbij is onderzocht of de gecombineerde nitrificatie en denitrificatie opnieuw kan worden aangetoond. Daartoe is actief slib van vier verschillende locaties getest:

- slib uit een pilot-oxidatiesloot voor huishoudelijk afvalwater, op het terrein van TNO-Delft
- slib uit een rwzi met een UCT-configuratie met vergaande N-verwijdering (Holten)
- slib uit een rwzi met een Rotaflow-configuratie, maar met vergaande N-verwijdering (Leiden ZW)
- slib uit een pilot-membraanbioreactor van de firma Triqua met vergaande N-verwijdering op verhoudingsgewijs N-rijk afvalwater (percolatie-water vuilstort)

Van iedere slibsoort is het actief-slib overgebracht in een bench-scale reactor van 1,2 L zoals gebruikt tijdens het promotie-onderzoek van Muller aan de VU Amsterdam, waarna diverse experimenten zijn uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 2.

Daarnaast zijn twee ophopingscultures ingezet met volledige biomassa-retentie. Hiermee is gedurende het onderzoek getracht de langdurige ophoping, zoals die in het onderzoek van Muller in een membraanbioreactor is uitgevoerd, te simuleren.

Verder is onderzoek gedaan met enkele mengcultures van *Nitrosomonas europaea* en *Nitrobacter winogradskii* om te onderzoeken of hiermee ook simultane nitrificatie/denitrificatie kan worden aangetoond.

## 2. Achtergrond

### *Conventionele systemen*

Conventionele actief-slib-systemen voor stikstofverwijdering bestaan meestal uit reactoren met verschillende zuurstofconcentraties of een enkele reactor waarin alternerend aërobe en anoxische fasen in tijd of plaats worden ingesteld.

De autotrofe nitrificeerders die bij de nitrificatie zijn betrokken zijn *Nitrosomonas* spp. en *Nitrobacter* spp. Het eerste geslacht oxideert ammonium in twee stappen via de ademhalingsketen tot nitriet:



Eén paar elektronen uit de tweede reactie wordt gebruikt in de eerste reactie. Het andere paar wordt gebruikt voor de reductie van  $\text{CO}_2$  en energie-genererend elektronentransport. Tijdens het elektronentransport reduceert zuurstof naar water volgens:



Voor de reductie van  $\text{CO}_2$  worden elektronen gebruikt voor het genereren van reducerend vermogen (NAD(P)H) via 'reversed electron flow'. Omdat de  $\text{CO}_2$ -reductie een zeer klein percentage is van het totale elektronentransport is de overall reactie bij benadering:



Vervolgens wordt het gevormde nitriet geoxideerd door *Nitrobacter* spp. volgens:





Ook hier zijn weer elektronen betrokken bij de NAD(P)H vorming, nodig voor CO<sub>2</sub>-reductie. Daarnaast is een nitrietreductase geïsoleerd, die mogelijk als elektronenacceptor fungeert onder anoxische condities. Wanneer de elektronen via het cytochroom c oxidase naar zuurstof gaan, is de netto reactie:



Voor de bovengenoemde reacties, die nodig zijn voor energieproductie, wordt verondersteld dat ze alleen optreden in aanwezigheid van zuurstof. Immers, zuurstof wordt geconsumeerd. In overeenstemming hiermee blijkt de activiteit van nitrificeerders bij lage zuurstofconcentraties sterk af te nemen.

De denitrificatie wordt uitgevoerd door een verscheidenheid aan heterotrofe bacteriën die nitraat in plaats van zuurstof gebruiken als elektronenacceptor. De complete nitraatademhaling verloopt volgens:



De benodigde elektronen worden onttrokken aan de aanwezige oxideerbare koolstofverbindingen. Omdat de energie-opbrengst uit denitrificatie lager is dan de energie-opbrengst uit de reductie van zuurstof, vindt denitrificatie in de praktijk alleen onder anoxische of zuurstoflimiterende omstandigheden plaats.

#### Alternatieven

In tegenstelling tot deze conventionele nitrificatie- en denitrificatieroutes, zijn ook andere processen in de literatuur gerapporteerd. Ammonium en nitraat kunnen bijvoorbeeld onder anaërobe omstandigheden tegelijk worden omgezet naar stikstofgas (Van de Graaf *et al.*, 1990; Mulder *et al.*, 1995). Hierop is het 'ANAMMOX'-proces gebaseerd.

Ook zijn er micro-organismen beschreven die in aanwezigheid van zuurstof kunnen denitrificeren. Hieronder zijn heterotrofe soorten, zoals *Alcaligenes* sp. (Krul, 1976) en *Paracoccus denitrificans* (= *Thiosphaera pantotropha*, Robertson en Kuenen, 1990) die een aërobe denitrificeerder en een heterotrofe denitrificeerder is, maar ook autotroof kan nitrificeren.

Autotrofe *Nitrosomonas* spp. zijn onder oxische en anoxische omstandigheden in staat om N<sub>2</sub>O en NO te vormen door de reductie van nitriet (Poth en Focht, 1985; Remde en Conrad, 1990; Ritchie en Nicolas, 1972). Stikstofproductie is reeds eenmaal aangetoond voor *Nitrosomonas* sp., geïsoleerd uit riviersediment hoogbelast met stikstofverbindingen (Poth, 1986). Echter, de algemeen gebruikte *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 vormde N<sub>2</sub>O. Hieruit blijkt dat volledige denitrificatie door ammoniumoxideerders niet algemeen voorkomend is. De meeste in de literatuur vermelde resultaten tonen een omgekeerd evenredige relatie tussen de NO- en N<sub>2</sub>O-productiesnelheden en de opgeloste zuurstofconcentratie. (Goreau *et al.*, 1980; Lipschultz *et al.*, 1981; Poth en Focht, 1985; Stüven *et al.*, 1992). Bij de optimale zuurstofconcentratie van ca. 0,15 - 0,3 mg/L wordt door een marien organisme 10% van het gevormde nitriet gereduceerd naar N<sub>2</sub>O (Goreau *et al.*, 1980), terwijl door een organisme geïsoleerd uit de bodem 2,5% naar N<sub>2</sub>O en 3,8% naar NO wordt gereduceerd.

Onder anoxische omstandigheden wordt nitriet niet chemolithotroof verademd (Abeliovich en Vonshak, 1992; Hynes en Knowles, 1984; Stüven *et al.*, 1992), maar NO en N<sub>2</sub>O kunnen wel worden gevormd onder mixotrofe omstandigheden. Hieruit kan worden geconcludeerd dat onder zuurstoflimitatie de denitrificatie-activiteit van *Nitrosomonas* spp. aanzienlijk kan zijn.

Het denitrificerend vermogen van *Nitrobacter* spp. is minder uitgebreid bestudeerd. De meeste stammen zijn onder aërobe omstandigheden niet in staat om te denitrificeren. (Bock *et al.*, 1992; Freitag *et al.*,



1987; Hynes en Knowles, 1984). Sommige stammen kunnen groeien in zuurstofloze batchcultures die worden gevoed met pyruvaat, ammonium en nitraat (Freitag *et al.*, 1987). Tijdens deze experimenten worden pyruvaat en nitraat geconsumeerd, terwijl ammonium accumuleert en  $N_2O$  ontwijkt.  $NO$ , dat soms bij lage zuurstofconcentraties wordt geproduceerd, is mogelijk betrokken bij de NADH vorming (Bock *et al.*, 1992; Freitag en Bock, 1990).

Tijdens het onderzoek van Muller (Muller, 1994) is in laboratoriumexperimenten met volledige slibretentie de nitrificatie-snelheid als functie van de opgeloste zuurstofconcentratie bepaald. Hiermee werd beoogd vast te stellen of nitrificatie, waarvoor zuurstof nodig is, en denitrificatie, die verondersteld wordt slechts in afwezigheid van zuurstof op de treden, tegelijkertijd kunnen plaatsvinden.

Zoals te verwachten, nam tijdens de experimenten de nitrificatiesnelheid af bij een lagere zuurstofconcentratie. Naast nitrificatie vond ook denitrificatie plaats, want er werd stikstofgas gevormd. Deze vorming van stikstofgas is gemeten middels nauwkeurige analyses op een Massaspectrometer. De denitrificatie trad alleen op als er zuurstof en ammonium werden verbruikt. Deze waarnemingen duiden er op dat een nitrificeerder denitrificeerde, hetgeen opmerkelijk is omdat denitrificatie gewoonlijk wordt uitgevoerd door heterotrofe micro-organismen. Het meest waarschijnlijke is dat de oxidatie van ammonium werd gekoppeld aan de reductie van nitriet. De denitrificatie-snelheid als fractie van de nitrificatie-snelheid was het hoogst (58%) bij een zuurstofconcentratie van 0,1 mg/L. Bij een zuurstofconcentratie van 0,4 mg/L en hoger werd 20% van de hoeveelheid geoxideerd ammonium omgezet in stikstofgas. Daarentegen werd er bij een lage zuurstofconcentratie (0,05 mg/L) nauwelijks genitrificeerd en niet gedenitrificeerd.

Vergelijkbare resultaten zijn gevonden door Bock (Bock *et al.*, 1995). In hun experimenten werd aangetoond dat *Nitrosomans europaea* en *Nitrosomonas eutropha* onder zuurstof-limitatie gelijktijdig kunnen nitrificeren en denitrificeren. Daarbij werd naast zuurstof ook nitriet als elektronacceptor gebruikt. De simultane nitrificatie denitrificatie leidde tot de vorming van significante hoeveelheden  $N_2O$  en  $N_2$ . In mengcultures van *N. europaea* en verschillende chemoorganotrofe bacteriën werd de vorming van deze gasvormige stikstofverbindingen sterk beïnvloed door het onder zuurstof-limitatie groeiende organisme. Echter, de experimenten van Bock *et al.* werden uitgevoerd in aanwezigheid van een koolstofbron voor denitrificatie (lactaat en acetaat). Er is dus geen sprake van een simultane lithotrofe nitrificatie/denitrificatie. Daarnaast werd in hun experimenten een 'nitrogen-loss' waargenomen, die werd verondersteld te zijn veroorzaakt door de productie van  $N_2O$  en stikstofgas. Deze gasvormige stikstofverbindingen zijn echter niet gemeten.

Aangezien zowel de experimenten van Muller als die van Bock (Bock *et al.*, 1995) eenmalig zijn uitgevoerd en het gebruikte slib uit Muller's experimenten niet is bewaard, lag het voor de hand om de reproduceerbaarheid van deze experimenten te onderzoeken. In opdracht van de STOWA is daarom het onderhavige onderzoek uitgevoerd.

### 3. Materialen en methoden

#### *Slibent.*

Er zijn vier soorten entmateriaal gebruikt voor de nitrificatie/denitrificatie-experimenten. De eerste soort komt van de oxidatiesloot op het TNO-Zuidpoldercomplex. Deze installatie nitrificeert met een specifieke snelheid van circa  $90 \text{ g-NO}_3\text{-N/m}^3\text{.dag}$  (ca.  $90 \text{ mmol-NO}_3\text{-N/g.h.}$ ). De denitrificatiecapaciteit in aanwezigheid van substraat bedraagt circa  $70 \text{ }\mu\text{mol-N/g.h.}$  De endogene denitrificatiecapaciteit is circa  $35 \text{ }\mu\text{mol-N/g.h.}$

De tweede ent komt uit de rwzi uit Holten. De nitrificatie-activiteit aldaar bedroeg ten tijde van de monsternamen circa  $45 \text{ g NO}_3\text{-N/m}^3\text{.dag}$  (circa  $70 \text{ mmol NO}_3\text{-N/g.h.}$ ).

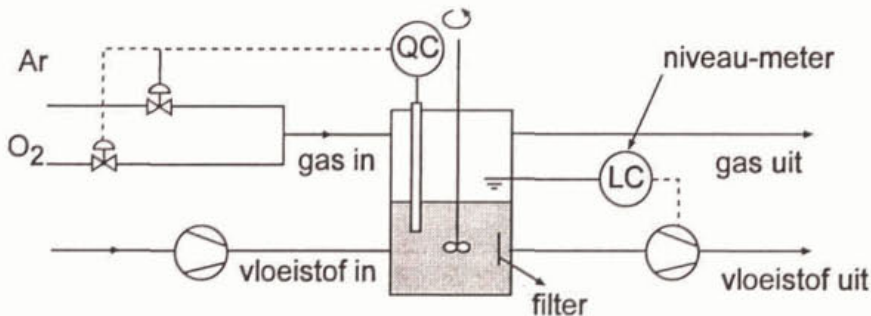
De derde ent is afkomstig van de RWZI Leiden ZW. Deze installatie vertoont een goede nitrificatie van circa  $50 \text{ g NO}_3\text{-N/m}^3\text{.dag}$  (circa  $70 \text{ mmol NO}_3\text{-N/g.h.}$ ).



De laatste ent komt uit een pilot membraanbioreactor van de firma Triqua. Deze reactor behandelt percolatiewater van een vuilstort met een lage C/N verhouding van circa 3/2. De gemiddelde nitrificatie-activiteit bedraagt circa 70 mmol NO<sub>3</sub>-N/g.h.

#### Reactorconfiguratie en kweekcondities.

De gebruikte fermentoren hebben een vloeistofwerkvolume van 1,2 liter. Een schematische weergave is gegeven in Figuur 1.



**Figuur 1.** Schema van de experimentele opstelling

De slibenten zijn gewassen met effluent van de oxidatiesloot op het TNO-Zuidpoldercomplex en ingedikt tot 1,2 liter slurries met een droge stofgehalte van circa 20 g/L, en aan de reactoren toegevoegd. Het organische-stofgehalte van het slib was circa 75%. Door middel van een 0,2 mm filter voor de effluent-afvoer van de fermentor werd volledige biomassaretentie verkregen. Bij continue bedrijfsvoering was de HRT 12 h. De experimenten zijn uitgevoerd bij een temperatuur van zowel 18 °C als 30 °C, en pH 7,0. De fermentoren zijn gevoed met synthetisch medium met 5 mM ammonium.

De gasfase werd samengesteld met twee mass flow controllers voor respectievelijk argon en zuurstof, met een totaal debiet van 10-15 L/h.

#### Ophopingen.

Er zijn twee ophopingen ingezet in fermentoren met volledige biomassaretentie. Eén is gevoed met synthetisch medium (5 mM ammonium), de ander met influent (= rioolwater) van de oxidatiesloot op het TNO-Zuidpoldercomplex. De ophopingen zijn verder onder dezelfde experimentele condities uitgevoerd.

#### Rein- en mengcultures.

Er zijn twee typen experimenten uitgevoerd in fermentoren met volledige biomassaretentie:

1) reïncultures van *Nitrosomonas europaea*, en 2) mengcultures van *Nitrosomonas europaea* en *Nitrobacter winogradskii*. Beide typen werden aëroob en onder ammonium-limiterende condities gekweekt.

#### Experimentele opzet en analyses.

De slibslurries werden twee dagen batch gekweekt om de endogene ademhaling te stabiliseren. Na toedienen van een 5 mM ammoniumpuls werd de proef batchgewijs vervolgd, danwel de fermentor continu geschakeld met het medium met 5 mM ammonium. Gelijktijdig werd met de gasfasesamenstelling de opgeloste zuurstofconcentratie per experiment ingesteld op een waarde van 0,2, 0,8 of 1,7 mg/L O<sub>2</sub>.

Door regelmatige monsternamen van 5 mL reactorinhoud respectievelijk effluent, werden spectrofotometrisch de ammonium-, nitraat- en nitrietconcentraties gemeten. De exacte samenstelling



van de gasfase werd met een massa-spectrometer bepaald. De gemeten gassen zijn: N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, Ar, CO<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>.

Om de maximale ammoniumomzettingssnelheid te berekenen is aangenomen dat:

- slechts één soort ammonium oxideert naar nitriet;
- groei van de nitrificerende populatie nihil is;
- er voor groei geen Kjeldahl-stikstof wordt verbruikt of vrijgemaakt.

Omdat tijdens de continue experimenten het kweekvolume en vloeistofdebiet constant werden gehouden, kan de ammoniumomzettingssnelheid worden berekend uit:

$$C_t = C_{in} - r/D + (C_0 - C_{in} + r/D) \cdot e^{-Dt} \quad \text{voor } C_t \gg C_{Monod}$$

Voor de batchproeven geldt:

$$C_t = C_0 - r \cdot t \quad \text{voor } C_t \gg C_{Monod}$$

De maximale snelheid wordt bereikt bij voldoende hoge ammoniumconcentratie.

#### 4. Resultaten en Discussie

Uit de resultaten van de vele batch- en continue experimenten met vers slib blijkt dat de nitrificatie goed verloopt, met een gemiddelde nitrificatie-capaciteit van 20-45 µmol-N/g.h, afhankelijk van de ingestelde zuurstofconcentratie (respectievelijk 0,2, 0,8 en 1,7 mg/L). Ook nitriet wordt volledig omgezet in nitraat. Echter, bij *geen enkel* experiment kon stikstofproductie worden aangetoond. De resultaten van een representatief experiment staan vermeld in Tabel 1. De gegevens in Tabel 1 laten duidelijk zien dat met de gebruikte nauwkeurige analysetechnieken een sluitende massabalans wordt verkregen.

*Tabel 1. Batchgewijs uitgevoerd nitrificatie-experiment met slib uit oxidatiesloot TNO-Zuidpolder. Slibconcentratie is 18 g d.s./L. De opgeloste zuurstofconcentratie bedraagt 0,2 mg/L en de pH 7.0.*

tijd (uren)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mM)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mM)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	N <sub>2</sub> (ppm)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -consumptiesnelheid (µmol N/g d.s. per uur)
0.0	4.80	0.00	0.00	0	--
0.5	4.54	0.01	0.24	0	24
1.0	4.10	0.03	0.66	0	41
1.5	3.64	0.04	1.12	0	43
2.0	3.33	0.06	1.41	0	29
2.5	2.92	0.08	1.80	0	38
3.0	2.54	0.08	2.17	0	35
3.5	2.10	0.02	2.64	0	41
4.0	1.69	0.03	3.05	0	38
4.5	1.32	0.05	3.40	0	34
5.0	0.95	0.03	3.82	0	32

Ook de experimenten met slib uit twee ophopingen die op het laboratorium reeds 9 maanden instonden, vertoonden geen enkele stikstofproductie. Wel vond een goede nitrificatie plaats met een specifieke snelheid van circa 45 mmol-N/g.h. De conclusie die hieruit kan worden getrokken is dat met de onderzochte slibsoorten de experimenten van Muller niet reproduceerbaar zijn.



Rein- en mengcultures werden behandeld als bovengenoemde batch- en continue experimenten. Alle cultures vertoonden een uitstekende nitrificatie-activiteit. Alle aangeboden (limiterende) ammonium werd omgezet in nitriet (*Nitrosomonas europaea*), dan wel nitraat (mengcultuur). Na pulsen met ammonium kon ook hier geen enkele stikstofvorming worden gemeten.

De vraag is nu uiteraard waarom dat zo is. Allereerst is gebleken dat tijdens de gas-analyses in de MassaSpectrometer (MS) CO<sub>2</sub> in het afgas van de fermentor in de MS voor 4.07% wordt 'gekraakt' tot CO. Aangezien CO ook een mol-massa van 28 heeft, is geen onderscheid te maken tussen CO en N<sub>2</sub>. Aangezien het afgas van de fermentor CO<sub>2</sub> bevat kan zodoende een schijnbare 'stikstofproductie' worden waargenomen. Na correctie voor deze systematische fout kan bij de experimenten in dit onderzoek geen stikstofproductie meer worden aangetoond. Muller heeft tijdens zijn experimenten niet gecorrigeerd voor CO-vorming. Echter, wanneer de ruwe data van Muller worden omgerekend blijkt de door hem gemeten stikstofproductie weliswaar circa 25-50% lager te zijn dan in het proefschrift is vermeld, maar niet alle gevormde stikstof kan hieruit worden verklaard. Het lijkt erop dat kennelijk toch enige simultane nitrificatie/denitrificatie is opgetreden.

Specifieke selectie van micro-organismen in de membraanbioreactor tijdens de experimenten van Muller lijkt mogelijk, maar ligt niet voor de hand. Immers, bij de experimenten zoals beschreven in de Materialen en Methoden sectie is ook gebruik gemaakt van slib uit een goed nitrificerende membraanbioreactor. Deze MBR heeft reeds 1 jaar genitrificeerd en zou in principe ook genoeg selectiedruk op de microbiële populatie hebben uitgeoefend om de gezochte organismen op te hopen. Dit is niet het geval. Het slib uit de MBR van Triqua vertoonde geen enkele simultane nitrificatie/denitrificatiecapaciteit.

De enige resterende mogelijkheid is dat niet de juiste groeiomstandigheden zijn gecreëerd voor de micro-organismen die al of niet toevallig wel aanwezig waren in de MBR van Muller. Dat de simultane nitrificatie/denitrificatie op kan treden is bevestigd door onafhankelijke experimenten van Bock *et al.* (1995). In hun experimenten blijkt dat *Nitrosomonas europaea* en *Nitrosomonas eutropha* onder zuurstoflimitatie simultaan kunnen nitrificeren en denitrificeren, echter in aanwezigheid van een koolstofbron (lactaat en acetaat). Hierbij wordt op grond van een niet-sluitende massabalans verondersteld dat significante hoeveelheden N<sub>2</sub>O en N<sub>2</sub> worden gevormd ('nitrogen loss', deze is echter niet geanalyseerd!). Tijdens deze experimenten werd naast zuurstof ook nitriet als elektronenacceptor gebruikt.

Het zou kunnen dat in de experimenten van Muller toch voldoende endogeen koolstof beschikbaar is geweest waardoor genoemde waarnemingen zijn gedaan. Dit argument wordt ondersteund door metingen die tijdens het hierboven omschreven experiment (zie Tabel 1) zijn uitgevoerd. Na hongeren, en voor de toevoeging van het ammonium, is de endogene respiratiesnelheid gemeten. Deze bedroeg 0,25 mmol O<sub>2</sub>/g VSS.h en is vergelijkbaar met gangbare waarden voor de endogene ademhaling van normaal belast actief slib (0,2 - 0,3 mmol O<sub>2</sub>/g VSS.h, zie onder andere Spanjers, 1993). De door Muller gerapporteerde lage waarde van 0,025 mmol O<sub>2</sub>/g VSS.h is mogelijk te verklaren uit het feit dat zijn metingen zijn uitgevoerd met slib uit een membraanbioreactor die geruime tijd extreem laag is belast (0,03 kg CZV/kg MLSS.d) waardoor geen productie van surplus slib optrad.

Daarnaast blijkt uit experimenten van Bock dat in meng-cultures van *Nitrosomonas* sp. en chemo-organotrofe organismen, de mate van simultane nitrificatie/denitrificatie sterk afhankelijk te zijn van het soort heterotrofe organisme dat aanwezig is. Op grond van hun bevindingen is echter niet duidelijk vast te stellen onder welke omstandigheden een geschikte mengcultuur kan worden verkregen.

Vooralsnog lijkt het er op dat bovengenoemd proces niet op grote schaal voorkomt en selectie en groei van genoemde micro-organismen onder zeer specifieke omstandigheden dienen plaats te vinden.



## 5. Conclusies

De conclusies van voorgaand onderzoek zijn dat:

- de resultaten van Muller deels kunnen worden verklaard door een schijnbare 'stikstofproductie', veroorzaakt door CO-vorming in de MassaSpectrometer;
- de experimenten van Muller met de onderzochte vier slibsoorten niet kunnen worden gereproduceerd;
- vervolgonderzoek naar het onderhavige onderwerp derhalve niet zinvol wordt geacht;
- met de gekoppelde MassaSpectrometer-fermentor een nauwkeurige experimentele opstelling beschikbaar is, waarmee goed sluitende nitrificatie-/denitrificatiebalansen kunnen worden gemaakt.

## 6. Referenties

- Abeliovich, A. en A. Vonshak. 1992. Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. Arch. Microbiol. **158**: 267-270.
- Bock, E., Koops, H.-P., Ahlers, B. en H. Harms. 1992. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. pp. 414-430. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and K.-H. Schleiffer (eds.). The Prokaryotes, Springer Verlag, New York.
- Bock, E. Schmidt, I. Stüven, R. en D. Zart. 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Arch. Microbiol. **163**:16-20.
- Freitag, A. en E. Bock. 1990. Energy conservation in *Nitrobacter*. FEMS Microbiol. Lett. **66**:157-162.
- Goreau, T.J., Kaplan, W.A., Wofsy, S.C., McElroy, M.B., Valois, F.W. en S.W. Watson. 1980. Production of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and N<sub>2</sub>O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. Appl. Environ. Microbiol. **40**:526-532.
- van der Graaf, A.A., Mulder, A., Slijkhuys, H. Robertson, L.A. en J.G. Kuenen. 1990. Anoxic ammonium oxidation, pp. 388-391. In: C. Christiansen, L. Munck en J. Villadsen (ed.), Proceedings of the 5<sup>th</sup> European congress on biotechnology. Munksgaard International Publisher, Copenhagen, Denmark.
- Hynes, R.K. en R. Knowles. 1984. Production of nitrous oxide by *Nitrosomonas europaea*: effects of acetylene, pH and oxygen. Can. J. Microbiol. **30**:1397-1404.
- Krul, J.M. 1976. Dissimilatory nitrate and nitrite reduction under aerobic conditions by an aerobically and anaerobically grown *Alcaligenes* sp. and by activated sludge. J. Appl. Bacteriol. **40**:245-260.
- Lipschultz, F., Zafiriou, O.C., Wofsy, S.C., McElroy, M.B., Valois, F.W. en S.W. Watson. 1981. Production of NO and N<sub>2</sub>O by soil nitrifying bacteria. Nature **294**:641-643.
- Mulder, A., van der Graaf, A.A., Robertson, L.A. en J.G. Kuenen. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. FEMS Microbiol. Ecol. **16**:177-184.
- Muller, E.B. 1994. Bacterial energetics in aerobic wastewater treatment. Ph.D. thesis. VU Amsterdam.
- Poth, M. en D.D. Focht. 1985. <sup>15</sup>N kinetic analysis of N<sub>2</sub>O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. Appl. Environ. Microbiol. **49**:1134-1141.
- Poth, M. 1986. Dinitrogen production from nitrite by a *Nitrosomonas* isolate. Appl. Environ. Microbiol. **52**:957-959.
- Spanjers, H. 1993. Respirometry in activated sludge. Proefschrift L.U. Wageningen, Wageningen.
- Remde, A. en R. Conrad. 1990. Production of nitric oxide in *Nitrosomonas europaea* by reduction of nitrite. Arch. Microbiol. **154**:187-191.
- Ritchie, G.A.F. en D.J.D. Nicolas. 1972. Identification of the sources of nitrous oxide produced by oxidative and reductive processes in *Nitrosomonas europaea*. Biochem. J. **126**:1181-1191.
- Robertson, L.A. en J.G. Kuenen. 1990. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. Antonie van Leeuwenhoek **57**:139-152.



- STOWA.** 1996. Verwijdering van ammonium uit het slibgistingwater met het ANNAMOX-proces. STOWA-rapport 96-21.
- STOWA.** 1997. Stikstofverwijdering bij lage BZV/N. Deelrapport TU-Delft. Concept STOWA-rapport.
- Stüven, R. Vollmer, M. en E. Bock.** 1992. The impact of inorganic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. Arch. Microbiol. **158**:439-443.



