

MASTER

De invloed van de dichloormethaan- en stikstofconcentratie op de groeikinetiek van Hyphomicrobium

Kajbic, A.F.

Award date:
1995

[Link to publication](#)

Disclaimer

This document contains a student thesis (bachelor's or master's), as authored by a student at Eindhoven University of Technology. Student theses are made available in the TU/e repository upon obtaining the required degree. The grade received is not published on the document as presented in the repository. The required complexity or quality of research of student theses may vary by program, and the required minimum study period may vary in duration.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

TECHNISCHE UNIVERSITEIT EINDHOVEN
FACULTEIT SCHEIKUNDIGE TECHNOLOGIE
VAKGROEP CHEMISCHE PROCESKUNDE

De invloed van de dichloormethaan- en stikstofconcentratie op
de groeikinetiek van *Hyphomicrobium*.

Afstudeerverslag : A.F. Kajbic
Afstudeerhoogleraar : Prof. dr. ir. P.J.A.M. Kerkhof
Afstudeercoaches : Ir. R.M.M. Diks
Prof. ir. S.P.P. Ottengraf

Eindhoven, augustus 1991

SAMENVATTING

Voor het reinigen van gassen kan een biotricklingfilter worden toegepast. De verontreiniging wordt afgebroken door micro-organismen die een biolaag kunnen vormen aan de pakking van het filter. Voor dichloormethaanafbraak wordt het micro-organisme *Hyphomicrobium* toegepast.

De activiteit van de micro-organismen in de biolaag wordt onder andere bepaald door de substraat- (dichloormethaan) en de stikstof- (ammonium) concentratie in de vloeistoffase van het filter. Doel van het onderzoek is de invloed van deze concentraties op de groeikinetiek van de micro-organismen te onderzoeken. Dit is gedaan voor een reïncultuur GJ21 en een kolomcultuur *Hyphomicrobium*. Daarnaast is ook gekeken naar de deactivering van de micro-organismen bij langdurige afwezigheid van substraat. Deze experimenten zijn als batchproeven verricht met micro-organismen in suspensie waarbij de substraatafbraak tegen de tijd is gevolgd.

De invloed van de dichloormethaanconcentratie op de groeikinetiek, bij overmaat stikstof, kan met het Monod-model worden beschreven. De Monod-constante K_s voor de reïncultuur ligt in de orde van $10\mu\text{M}$ en voor de kolomcultuur in de orde van $15\mu\text{M}$.

De invloed van de stikstofconcentratie, bij overmaat dichloormethaan, op de substraatafbraaksnelheid wordt bij aanwezigheid van stikstof beschreven door het model van Pirt waar zowel groei als maintenance van micro-organismen worden gemodelleerd. Bij afwezigheid van stikstof zal substraatafbraak slechts worden veroorzaakt door maintenance van micro-organismen. Door deactivering van de micro-organismen zal tevens de activiteit van de bacterie-suspensie dalen. Het twee-fasen-model beschrijft dan de substraatafname van de bacterie-suspensie. In de eerste fase van dit model als $N > 0$, treedt ongelimiteerde groei op en in de tweede fase als $N = 0$ treedt maintenance en deactivering van micro-organismen op. Dit model beschrijft de substraatafname goed bij afwezigheid van stikstof in de suspensie (2^{de} fase). De gevonden waarden voor de maintenance-coëfficiënt en de deactiveringsconstante nemen af bij dalende stikstofconcentratie in de beginoplossing. Dit kan worden verklaard door adaptatie van micro-organismen in de tijd aan te nemen.

De deactivering van de micro-organismen is nader onderzocht en kan worden beschreven door een eerste orde proces met een deactiveringsconstante k_d die bij afwezigheid aan substraat en overmaat stikstof gelijk is aan 0.075 dag^{-1} . Bij langdurige afwezigheid van substraat blijft de activiteit van de suspensie op een hoger niveau en over een langere tijd gehandhaafd dan wordt beschreven met het eerste orde proces. Dit kan worden verklaard door verborgen groei van micro-organismen aan te nemen.

0	<u>Inhoudsopgave</u>	
	Samenvatting	
0	Inhoudsopgave	1
1	Inleiding	3
2	De head-space-methode	7
3	De bepaling van de Monod-constante K_s bij dichloormethaanafbraak door <i>Hyphomicrobium</i>	8
3.1	Theorie	8
3.2	Werkwijze	11
3.3	Resultaten en discussie	12
3.4	Invloed van de Monod-constante op de conversie in een biotricklingfilter	20
3.5	Conclusies	23
4	De bepaling van de deactiveringsconstante k_2 voor <i>Hyphomicrobium</i>	24
4.1	Theorie	24
4.2	Werkwijze	28
4.3	Resultaten en discussie	29
4.4	Toepassingen van de deactiveringsconstante bij de karakterisering van de biolaag	35
4.4.1	De bepaling van de evenwichtsdikte van de biolaag	35
4.4.2	De bepaling van de minimale tijd waarin een biotricklingfilter kan dichtgroeien	38
4.4.3	De bepaling van de kritische substraatconcentratie voor biolaagvorming	39
4.5	Conclusies	40
5	De dichloormethaanafbraak door <i>Hyphomicrobium</i> bij stikstoflimitatie	41
5.1	Theorie	41
5.2	Werkwijze	45
5.3	Resultaten en discussie	46
5.4	Conclusies	65
6	Algemene conclusies	66
7	Symbolenlijst	68
8	Literatuurlijst	71

Bijlagen

B-1	Gebruikte apparatuur	74
B-2	Samenstelling standaard Groningen-medium	75
B-3	Samenstelling aangepast Groningen-medium	76
B-4	Afleiding twee-fasen-model	77

Chloor-Fluor-Koolwaterstoffen, CFK's, worden sinds de vijftiger jaren gebruikt in de industrie als o.a. oplosmiddel, koelvloeistof of vulmiddel in schuim. Reden van toepassing is de combinatie van goede fysische eigenschappen zoals warmtegeleidbaarheid of soortelijke warmte en de chemische eigenschappen als stabiliteit en inertheid [5].

Dichloormethaan (CH_2Cl_2) is een CKF dat toepassing vindt als o.a. oplosmiddel en ontvettingsmiddel [21].

In de beginjaren tachtig is steeds duidelijker geworden dat CFK's door hun grote stabiliteit slechts beperkt worden afgebroken in de lagere luchtlagen (atmosfeer). Afbraak van deze stoffen vindt vooral plaats in de hogere luchtlagen (stratosfeer) onder invloed van ozon. Door afname van ozon in de stratosfeer wordt echter minder UV-licht opgevangen en komt meer UV-licht op het aardoppervlak waardoor de kans op huidziekten en huidkanker toeneemt. Daarnaast zijn deze stoffen ook schadelijk bij direct contact.

Dichloormethaan is verdacht carcinogeen. Bij inademen en opname in het lichaam kan het zenuwcellen aantasten. Bij hoge concentraties wordt zelfs de lever beschadigd.

Mede om bovengenoemde redenen is de industrie verplicht het productieniveau van CFK's, waar mogelijk, te verlagen en vervangers te zoeken voor de meest stabiele verbindingen (Montreal UNEP protocol, KWS-2000).

De emissies kunnen op verschillende wijzen worden verminderd. Dit kan gebeuren door naverbranding van gassen bij 1500 K gevolgd door quenching met water. Dit proces is echter duur en de kans op het ontstaan van dioxines is aanwezig.

Een andere mogelijkheid tot reiniging is adsorptie van CFK's aan actieve kool. Het rendement van reiniging daalt echter bij lage concentraties aan verontreiniging.

Enkele CFK's kunnen echter ook microbiologisch worden afgebroken. Het micro-organisme *Hyphomicrobium* is bijvoorbeeld in staat dichloormethaan af te breken. Het gebruikt deze stof dan als enig koolstof- en energiebron. Op technische schaal wordt microbiologische reiniging toegepast in biofilters en biotricklingfilters.

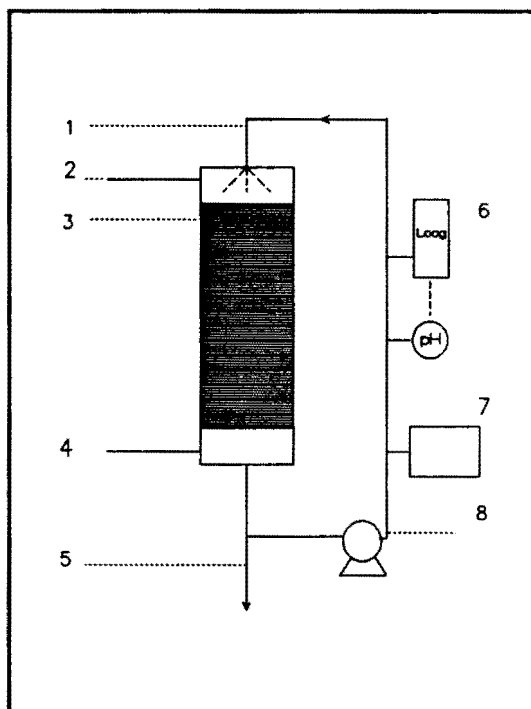
Bij een biofilter wordt een gasstroom door een vochtig compostbed geleid dat micro-organismen bevat waarbij de te verwijderen component oplost in de vloeistoffase. De micro-organismen zijn in staat deze stof uit de vloeistof op te nemen en af te breken mits er voldoende andere voedingsstoffen zoals stikstof en fosfaat in het bed aanwezig zijn. De anorganische voedingsstoffen kunnen naar behoefte worden toegevoegd aan het bed. De afvalstoffen die bij de afbraakreacties vrijkomen worden afgegeven aan de vloeistoffase in het bed. De niet vluchtige afvalstoffen blijven in het bed achter en kunnen de activiteit van het bed verlagen [3].

In een biotricklingfilter worden de afvalstoffen wel weggenomen en zal er daardoor geen daling in activiteit kunnen optreden. Een biotricklingfilter kan als volgt worden voorgesteld (figuur 2-1).

Figuur 2-1 :

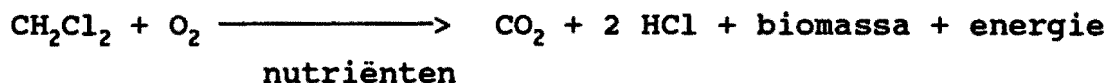
Schematische voorstelling van een biotricklingfilter

- 1 recirculatie vloeistofstroom
- 2 gasuitlaat
- 3 gepakt bed
- 4 gasinvoer
- 5 spui
- 6 pH-regeling
- 7 nutriënten-toevoer
- 8 circulatiepomp



Het biotricklingfilter bestaat uit een gepakt bed (3) waarin een gas- (4) en vloeistofstroom (1) met elkaar in contact worden gebracht. Bij dit contact zal de in het gas te verwijderen component, zoals dichloormethaan, oplossen in het water. De vloeistof bevat micro-organismen die in staat zijn deze stof af te breken. Voor dichloormethaan kan de afbraakreactie als volgt vereenvoudigd worden weergegeven:

Hyphomicrobium



Bij voldoende dichloormethaan en nutriënten in de voedingsstroom zullen de micro-organismen zich kunnen vermenigvuldigen; ze hechten zich aan het gepakte bed. Er ontstaat dan een biolaag aan het bedoppervlak. Door de naar beneden druppelende vloeistof zal de biolaag worden voorzien van de nodige voedingsstoffen, zoals ammoniumsulfaat en kaliumfosfaat, die worden toegevoegd via de nutriënt-stroom (7), zodat de micro-organismen zich kunnen ontwikkelen. De geproduceerde afvalstoffen worden afgegeven aan de gasfase en vloeistoffase. Door neutralisatie van de afvalstoffen (HCl door NaOH) kunnen constante condities in het bed worden gehandhaafd. Door recirculatie van de vloeistofstroom gaan er geen voedingsstoffen en biomassa verloren. Dode biomassa en andere verontreinigingen in de vloeistoffase worden gespuid uit het systeem (5), zodat er geen ongewenste reacties kunnen plaatsvinden.

De activiteit van micro-organismen in het bed wordt door verschillende factoren beïnvloed. Zo zal het micro-organisme Hyphomicrobium bij lage pH (pH=3.5) niet actief zijn en bij hoge pH (pH=9) zelfs deactiveren [10]. Keukenzout kan groei belemmeren en bij hoge concentraties (>600mM) stopt deze zelfs [7]. Ook de substraat en nutriëntconcentraties hebben invloed op de activiteit. De groeisnelheid van micro-organismen zal

tot een maximum toenemen bij stijgende concentraties [12]. Het is daarom belangrijk de kinetiek van substraatafbraak door micro-organismen goed te beschrijven zodat een optimaal model voor het ontwerpen van een biotricklingfilter kan worden ontwikkeld. In het kader van dit onderzoek is daarom gekeken naar de invloed van de dichloormethaan- en de stikstofconcentratie in de vorm van ammoniumsulfaat op de groeikinetiek van het micro-organisme *Hyphomicrobium* dat gebruikt wordt in operationele biotricklingfilters voor de reiniging van gassen die verontreinigd zijn met dichloormethaan. Dit is gedaan met een reïncultuur *Hyphomicrobium* GJ21 en een cultuur afkomstig uit een operationeel biotricklingfilter.

Daarnaast is de activiteit van het filter ook afhankelijk van de dikte van de biolaag. De dikte wordt namelijk beïnvloed door groei en deactivering van micro-organismen. Het is belangrijk naast de groeisnelheid van micro-organismen ook de deactiveringssnelheid te kennen om een uitspraak te kunnen doen over de dikte van de biolaag onder bepaalde condities. Daarom is de deactiveringsconstante van de micro-organismen bepaald bij langdurige afwezigheid van substraat.

Bij afwezigheid van stikstof in de suspensie zal deactivering van micro-organismen optreden ondanks de aanwezigheid van substraat. Voor een goede beschrijving van de substraatafbraak is daarom het twee-fasen model opgesteld waarbij deactivering van micro-organismen in het model is meegenomen.

Tenslotte is er ook gekeken naar de relevantie van de gevonden parameters bij het ontwerpen van een biotricklingfilter.



2 De head-space-methode

Voor de beschrijving van de groeikinetiek op substraat en de activiteit van micro-organismen in batchproeven is de substraatconcentratie gevolgd tegen de tijd. Dit is gedaan via de head-space-methode.

Bij deze methode wordt de substraatconcentratie in de gasfase tijdens het experiment gevolgd tegen de tijd. De experimenten zijn uitgevoerd in gedeeltelijk met vloeistof gevulde gesloten flessen met monsterpunt ($V_1=30\%$ van V_{totaal}). Via dit monsterpunt is het mogelijk een monster van de gasfase in de flessen te nemen, zonder dat het systeem wordt verstoord.

Het substraat, aanwezig in de monsterflessen, is een vluchtige stof die zich zal verdelen over de gas- en vloeistoffase. Er stelt zich een evenwicht in tussen gas- en vloeistofconcentratie waarbij geldt:

$$m = \frac{C_g}{C_l} \quad (2-1)$$

- met :
- m = verdelingscoëfficiënt
 - C_g = substraatconcentratie in de gasfase
(molDCM/l)
 - C_l = substraatconcentratie in de vloeistoffase
(molDCM/l)

De substraatconcentratie van het monster kan met een gaschromatograaf worden bepaald. Hiertoe wordt met een injectiespuit een monster genomen van de gasfase in de monsterflessen, de head-space van het systeem, dat vervolgens wordt geïnjecteerd in een gaschromatograaf. Het signaal dat de gaschromatograaf geeft is een maat voor de hoeveelheid substraat in de gasfase. Met een standaard die een bekende hoeveelheid substraat bevat kan worden bepaald wat de substraatconcentratie in de gasfase is.

3 De bepaling van de Monod-constante K_s bij
dichloormethaanafbraak door Hyphomicrobium

3.1 Theorie

Bij het ontwerpen van een biotricklingfilter, toegepast bij het reinigen van gassen, dient de reactiekinetiek van de afbraakreacties van de te verwijderen stoffen bekend te zijn om een optimaal filter te ontwikkelen. In de ontwerpmodellen wordt vaak aangenomen dat de kinetiek van de substraatafbraak, door micro-organismen, van nulde orde is. Wordt er echter gewerkt bij lage substraatconcentraties dan zal de kinetiek van de afbraakreactie veranderen.

Door Monod [12] is de volgende vergelijking voor de reactiekinetiek voorgesteld voor microbiële groei:

$$-r_s = \frac{\mu}{Y_s} * X$$

(3-1)

waarin: $-r_s$ = substraatafnamesnelheid (molDCM/(l*h))
 μ = microbiële groeisnelheid (h^{-1})
 Y_s = yield-coëfficiënt voor dichloormethaan
(g droge stof(DS)/molDCM)
 X = biomassaconcentratie (g droge stof(DS)/l)

In deze afleiding is aangenomen:

- * dat de hoeveelheid actieve biomassaconcentratie X proportioneel is met de hoeveelheid enzym.
- * dat de hoeveelheid biomassa die gevormd wordt (ΔX) evenredig is met de substraatafname (ΔS) ongeacht de substraatconcentratie ($\Delta X/\Delta S=Y_s$).

De groeisnelheid μ is als volgt afhankelijk van de substraatconcentratie:

$$\mu = \mu_{\max} * \frac{S}{S + K_s} \quad (3-2)$$

met: μ_{\max} = maximale microbiële groeisnelheid (dag⁻¹)
 S = substraatconcentratie (molDCM/l)
 K_s = Monod-constante voor substraat (molDCM/l)

Vergelijking 3-1 kan dan worden omgeschreven tot:

$$-r_s = \frac{\mu_{\max}}{Y_s} * \frac{S}{S + K_s} * X \quad (3-3)$$

In een batchstelsel geldt voor de biomassaproductie:

$$-Y_s * \frac{dS}{dt} = \frac{dX}{dt} \quad (3-4)$$

Na integratie van vergelijking 3-4 met randvoorwaarden $t=0 \Rightarrow S=S_0$ en $X=X_0$ volgt voor de biomassaconcentratie:

$$X = X_0 + Y_s(S_0 - S) \quad (3-5)$$

Na invullen van vergelijking 3-5 in vergelijking 3-3 volgt:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y_s} * \frac{S}{S+K_s} * (X_0 + Y_s(S_0 - S)) \quad (3-6)$$

Met de randvoorwaarde $t=0 \Rightarrow S=S_0$ volgt tenslotte na integratie:

$$\ln\left(\frac{\frac{X_0 + S_0 - S}{Y_s}}{\frac{X_0}{Y_s}}\right) + \frac{K_s}{\frac{X_0 + S_0}{Y_s}} * \ln\left(\left(\frac{X_0 + S_0 - S}{Y_s}\right) * \left(\frac{S_0}{S}\right)\right) = \mu_{\max} * t \quad (3-7)$$

Deze vergelijking beschrijft de substraatconcentratie tegen de tijd voor groeiende micro-organismen waarbij een toename van biomassa optreedt [9].

Als er gebruik wordt gemaakt van een dik geënte cultuur, dat wil zeggen $X_0 \gg Y_s * S_0$, kan de biomassaconcentratie constant worden verondersteld tijdens de substraatafbraak ($X_0 \gg \Delta X$).

Vergelijking 3-7 vereenvoudigt dan tot:

$$\frac{S}{S_0} - 1 + \frac{K_s}{S_0} * \ln \frac{S}{S_0} = - \frac{X_0 * \mu_{max}}{Y_s * S_0} * t = - K_{obs} * t \quad (3-8)$$

Met: $K_{obs} = \frac{X_0 \mu_{max}}{Y_s * S_0} \quad (h^{-1})$

3.2 Werkwijze

De Monod-constante is bepaald voor twee verschillende Hyphomicrobium-cultures, namelijk een reincultuur (GJ21) en een culture, opgekweekt uit biomassa afkomstig uit een operationeel biotricklingfilter voor het verwijderen van dichloormethaan. De laatste culture bevat naast Hyphomicrobium ook andere, niet nader gespecificeerde, micro-organismen.

Voor de bepaling van de Monod-constante zijn beide cultures onder gelijke omstandigheden opgekweekt. In een fles van 1168 ml is 500 ml Groningen-medium gedaan. (samenstelling zie bijlage B-2). Dit medium bevat de anorganische voedingsstoffen die nodig zijn voor de groei van micro-organismen. Aan deze oplossing is 5ml bacterie-suspensie toegevoegd. Deze bacterie-suspensie is verkregen uit een voorkweek van de cultures. Vervolgens is de substraat-concentratie in de suspensie op 1mM dichloormethaan gebracht. De gesloten flessen zijn geschud in een schudmachine (387 rpm) bij een temperatuur van $T = 300$ K. Er wordt zo een goede stofoverdracht van dichloormethaan en zuurstof verkregen van de gasfase naar de vloeistoffase en de daarin gesuspendeerde micro-organismen. Als alle dichloormethaan door de micro-organismen is omgezet, is een suspensie verkregen die opgekweekt is uit 1mM substraat (1 mM suspensie). De gebruikte voorkweek is op gelijke wijze gekweekt uit micro-organismen afkomstig van een voedingsbodem (reincultuur) en uit de vloeistoffase van een operationele biotricklingfilter (kolomcultuur).

Voor de bepaling van de Monod-constante is gebruik gemaakt van de gekweekte bacterie-cultures. Per experiment is 50 ml van de suspensie in een schudfles van 132 ml gedaan waaraan een bekende hoeveelheid dichloormethaan variërend van 21 tot 2670 $\mu\text{molDCM/l}$ is toegevoegd. Vervolgens is via de head-space-methode (hoofdstuk 2) de afbraak van het substraat in de schudfles gevolgd. De zuurgraad tijdens de proeven blijft constant ($\text{pH} = 6.9 \pm 0.1$).

3.3 Resultaten en discussie

De vloeistofconcentraties van het substraat waarmee in de verschillende experimenten gewerkt is, worden als volgt berekend:

$$S_o = \frac{Q_o}{V_l + m \cdot V_g} \quad (3-9)$$

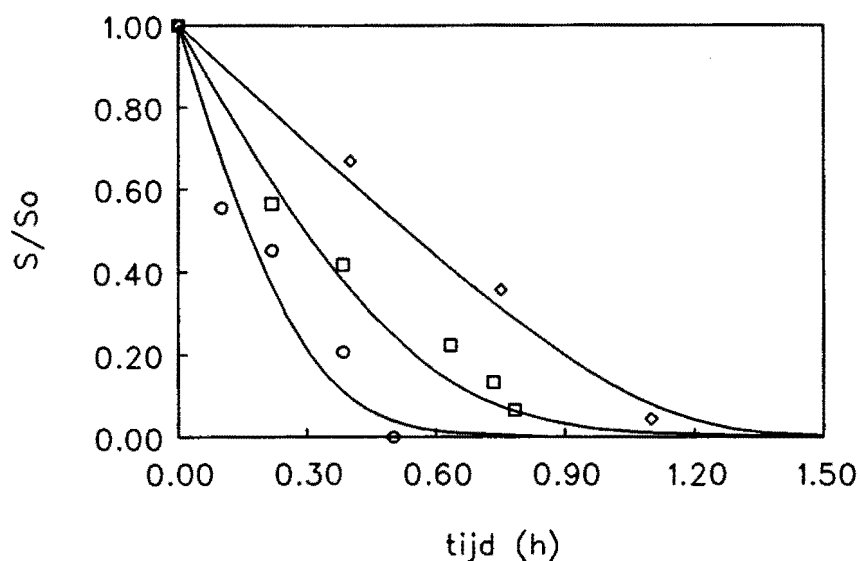
met: S_o = substraatconcentratie in vloeistoffase
(molDCM/l)
 Q_o = hoeveelheid toegevoegd substraat aan het
systeem (molDCM)
 V_l = vloeistofvolume (l)
 V_g = gasvolume (l)
 m = verdelingscoëfficiënt

De verdelingscoëfficiënt is berekend uit de volgende experimentele relatie (Bron: R.M.M. Diks)

$$m = \frac{e^{(6.625 - \frac{3817}{T})}}{R \cdot T} = 0.09 \quad (3-10)$$

met: R = $8.205 \cdot 10^{-5}$ atm/molK
 T = 300 K

De gemeten dichloormethaanconcentraties zijn, voor de monsters van de reincultuur, dimensieloos uitgezet tegen de tijd in figuur 3.1 en figuur 3.2.

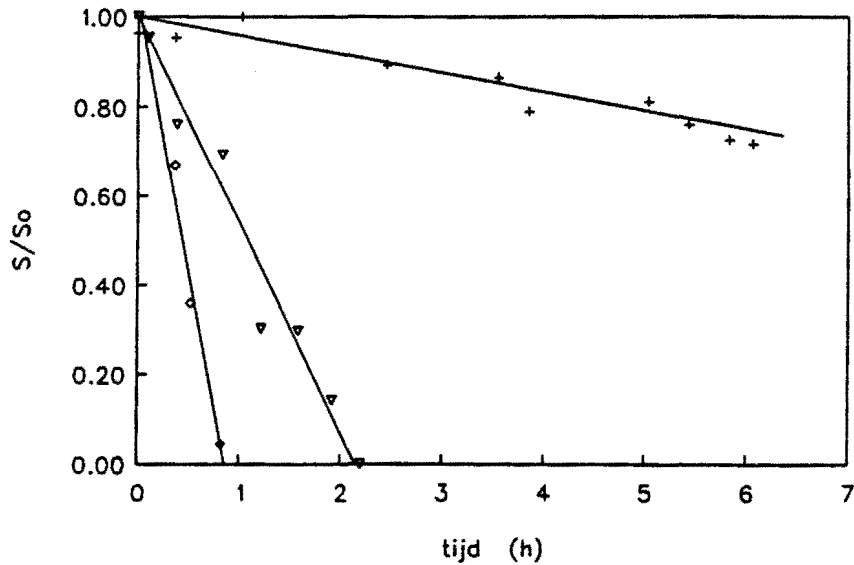


○: $S_0 = 21.4 \mu\text{M}$ □: $S_0 = 42.8 \mu\text{M}$ ◇: $S_0 = 107 \mu\text{M}$

Figuur 3.1:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd in afbraakproeven voor een reincultuur *Hyphomicrobium* GJ21 geënt met veel biomassa. Experimentele data en vergelijking 3-8.

In figuur 3.1 is het verloop van de substraatconcentratie tegen de tijd uitgezet voor de reincultuur *Hyphomicrobium* GJ21 bij lage substraatconcentraties. Het blijkt dat de substraatafnamesnelheid per experiment niet constant is maar afneemt tegen de tijd. Dit effect, dat duidt op Monod-kinetiek, is het best zichtbaar bij $S_0=21.4 \mu\text{M}$. Het gemeten verloop kan worden beschreven met vergelijking 3-8.



◇: $S_0 = 107 \mu\text{M}$ ▽: $S_0 = 214 \mu\text{M}$ +: $S_0 = 2670 \mu\text{M}$

Figuur 3.2:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd in afbraakproeven voor een reïncultuur *Hyphomicrobium* GJ21 geënt met veel biomassa. Experimentele data en vergelijking 3-11.

Figuur 3.2 toont de substraatconcentratie tegen de tijd voor de experimenten met een hoge substraatconcentratie. Bij deze experimenten blijkt dat de substraatafnamesnelheid constant is in de tijd. Dit duidt op een nulde-orde reactiekinetiek ($S \gg K_s$). Vergelijking 3-8 kan dan worden vereenvoudigd tot:

$$\frac{S}{S_0} = 1 - \frac{X_0 \cdot \mu_{\max}}{Y_S \cdot S_0} \cdot t = 1 - K_{\text{obs}} \cdot t \quad (3-11)$$

met: $X_0 \cdot \mu_{\max} / Y_S = K_{\text{obs}} \cdot S_0$

De experimenten zijn verricht met gelijke suspensie waarbij geldt dat $\mu_{\max} \cdot X_0 / Y_S$ constant is. Met behulp van de experimenten met hoge substraatconcentratie, $S_0 = 107, 214$ en $2670 \mu\text{M}$, kan deze constante $\mu_{\max} \cdot X_0 / Y_S$ worden bepaald uit de hellingen van de afbraakcurven (figuur 3-2). De resultaten zijn verwerkt in tabel 3-1. De invloed van de Monod-constante op de afbraaksnelheid is dan nog niet merkbaar. De gemiddelde waarde van deze constante wordt vervolgens

toegepast bij de bepaling van de Monod-constante met vergelijking 3-8. Met het analyse programma SAS is de optimale Monod-constante bepaald voor de afzonderlijke experimenten met een niet lineaire fit-procedure op basis van vergelijking 3-8. De berekende waarden voor de Monod-constante zijn ook opgenomen in tabel 3-2.

Tabel 3.1: De constante $\mu_{\max} * X_0 / Y_s$ voor een dik geënte reïncultuur *Hyphomicrobium* GJ21

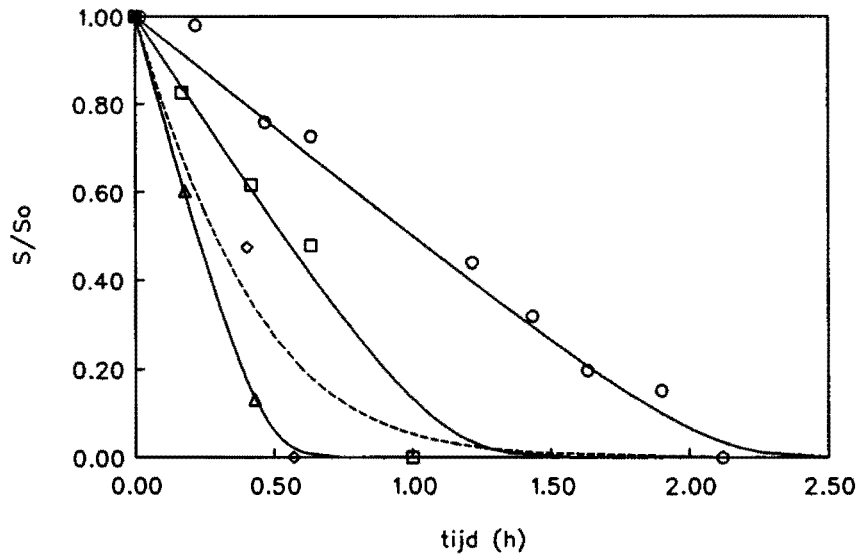
S_0 $\mu\text{molDCM/l}$	K_{obs} h^{-1}	standaard deviatie %	$\mu_{\max} * X / Y_s$ $\mu\text{molDCM/lh}$
107	0.87	13	93.6
214	0.46	9	99.6
2670	0.05	20	126
$\mu_{\max} * X / Y_s$ (gem)			106

Tabel 3.2: De Monod-constante K_s voor een dik geënte reïncultuur *Hyphomicrobium* GJ21.

S_0 $\mu\text{molDCM/l}$	K_{obs} h^{-1}	K_s / S_0 (-)	standaard deviatie %	K_s $\mu\text{molDCM/l}$
21.4	4.98	0.55	24	11.7
42.8	2.49	0.43	12	18.3
107	1.00	0.07	29	7.4
214	0.50	0.04	75	8.8

Het blijkt dat de constante $\mu_{\max} * X_0 / Y_s$ naar een maximum toegaat. De gevonden waarden voor de Monod-constante liggen rond 10 μM . De standaard deviatie neemt voor de bepaling van de Monod-constante toe bij stijgende substraatconcentratie. Het wordt namelijk bij deze experimenten moeilijker de invloed van de Monod-constante op de substraatafbraaksnelheid waar te nemen en de constante te bepalen. Bij het experiment met $S_0 = 2670 \mu\text{M}$ was dit zelfs met het gebruikte analysepakket niet mogelijk.

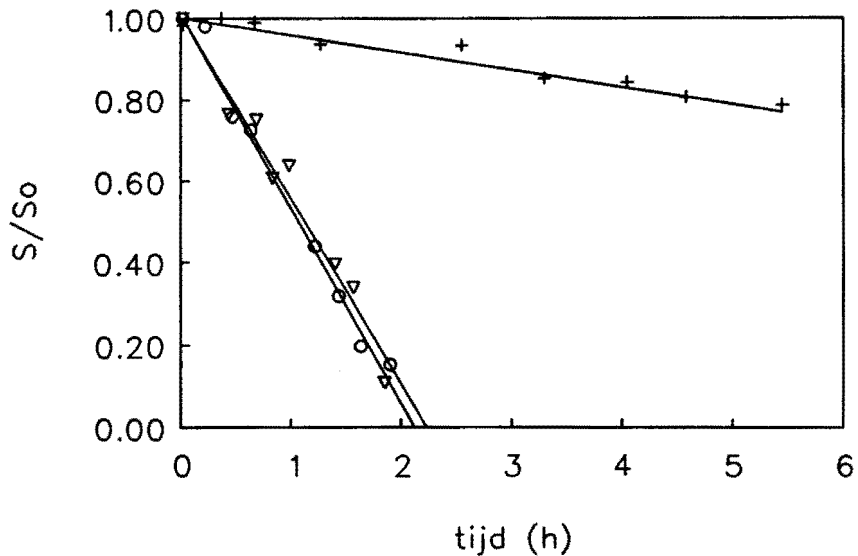
Op gelijke wijze kunnen de resultaten van de experimenten met de kolomcultuur worden verwerkt. Figuur 3.3 toont de substraatconcentratie tegen de tijd voor experimenten met een lage beginconcentratie terwijl in figuur 3-4 de resultaten van de experimenten met hoge substraatconcentraties staan uitgezet.



◇ : $S_0 = 21.4 \mu\text{M}$ △ : $S_0 = 42.8 \mu\text{M}$ □ : $S_0 = 107 \mu\text{M}$ ○ : $S_0 = 214 \mu\text{M}$

Figuur 3.3:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd in afbraakproeven voor een kolomcultuur *Hyphomicrobium* met veel biomassa geënt. Experimentele data en vergelijking 3-8.



o: $S_0 = 214 \mu\text{M}$ ∇ : $S_0 = 267 \mu\text{M}$ + : $S_0 = 2670 \mu\text{M}$

Figuur 3.4:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd in afbraakproeven voor een kolomcultuur *Hyphomicrobium* met veel biomassa geënt.

Experimentele data en vergelijking 3-11

Met respectievelijk vergelijking 3-8 en 3-11 zijn de Monod-constante en specifieke activiteit bepaald. De resultaten van de bepaling van de constante $\mu_{\max} * X_0 / Y_S$ worden in tabel 3-3 en de resultaten van de bepaling van de Monod-constanten K_S worden in tabel 3-4 gegeven.

Tabel 3.3: De constante $\mu_{\max} * X_0 / Y_S$ voor een dik geënte kolomcultuur *Hyphomicrobium*.

S_0 $\mu\text{molDCM/l}$	K_{obs} h^{-1}	standaard deviatie %	$\mu_{\max} * X / Y_S$ $\mu\text{molDCM}/(\text{l} * \text{h})$
214	0.48	4	103
267	0.46	9	123
2670	0.04	10	116
$\mu_{\max} * X / Y_S$ (gem)			114

Tabel 3.4: De Monod-constanten K_s voor een dik geënte kolomcultuur *Hyphomicrobium*

S_0 $\mu\text{molDCM/l}$	K_{obs} h^{-1}	K_s/S_0 (-)	standaard deviatie %	K_s $\mu\text{molDCM/l}$
21.4	5.35	1.50	31	32.1
42.7	2.67	0.14	21	6.1
107	1.07	0.05	80	5.7
214	0.53	0.07	29	15.4

Ook voor de experimenten voor de kolomcultuur blijkt uit de waarden in tabel 3-3 dat de constante $\mu_{\text{max}} * X_0 / Y_s$ naar een maximum gaat.

De Monod-constante ligt in de orde van 15 μM . De standaard deviatie van deze waarden is groot. Dit wordt onder andere veroorzaakt door het klein aantal meetpunten per experiment die gebruikt zijn om de Monod-constante te bepalen.

De constante $\mu_{\text{max}} * X_0 / Y_s$ gaat naar een maximale waarde toe bij hoge substraatconcentraties omdat dan nulde orde kinetiek gaat gelden ($K_s \ll S$) en de groeisnelheid wordt maximaal. Als dit opgaat dan moet de maximale specifieke activiteit μ_{max} / Y_s in deze experimenten overeen komen met de specifieke activiteit bepaald bij eerdere experimenten.

Daar tijdens deze experimenten is uitgegaan van cultures met veel biomassa, waarbij de biomassatoename te verwaarlozen is tijdens het experiment ($X_0 \gg \Delta X$), mag worden gesteld dat de biomassaconcentratie gelijk is aan de biomassaconcentratie die bereikt is bij de kweek van de cultures. Er geldt voor deze cultures:

$$X = Y_s * S_0 \quad \Rightarrow \quad X = (0.17 * 85) * 10^{-3} \frac{gDS}{l} \quad (3-10)$$

De specifieke activiteit μ_{\max}/Y_s voor de gebruikte cultures is dan gelijk aan $\mu_{\max} * X_o / Y_s * 1 / (Y_s * S_o)$

Voor de gebruikte cultures geldt dan:

$$(\mu_{\max}/Y_s)_{\text{rein}} = 0.62 \text{ gDS}/(\text{gDCM} \cdot \text{h})$$

$$(\mu_{\max}/Y_s)_{\text{kolom}} = 0.67 \text{ gDS}/(\text{gDCM} \cdot \text{h})$$

Voor eerdere experimenten geldt:

$$(\mu_{\max}/Y_s) = 0.11/0.17 = 0.64 \text{ gDS}/(\text{gDCM} \cdot \text{h})$$

De specifieke activiteit voor beide cultures komt overeen met de eerder bepaalde specifieke activiteit voor *Hyphomicrobium*. Er mag dan worden aangenomen dat de maximale specifieke activiteit in deze experimenten is bereikt en dat het geoorloofd is de gevonden constante $\mu_{\max} * X_o / Y_s$ te gebruiken bij de bepaling van de Monod-constante.

De Monod-constante is reeds eerder bepaald onder afwijkende condities. Er is daarbij gebruik gemaakt van dun geënte cultures waarbij tijdens de experimenten wel toename van biomassa is opgetreden. De Monod-constanten die bij deze metingen zijn gevonden liggen tussen 3 en 7 μM (Bron: Diks R.M.M.). Het verschil tussen de grootte van de Monod-constanten van beide metingen kan worden veroorzaakt door de verschillende meetmethoden.

3.4 Invloed van de Monod-constante op de conversie in een biotricklingfilter

De Monod-constante K_s heeft invloed op de kinetiek van de afbraakreacties in een operationeel biotricklingfilter waardoor de prestatie en de conversie van het filter wordt beïnvloed. Atkinson heeft een set vergelijkingen afgeleid waarmee de substraatflux naar de biolaag als functie van de grensvlakconcentratie wordt gegeven. Er is bij deze beschrijving aangenomen dat de afbraakreacties van substraat in de biolaag volgens Monod-kinetiek verlopen.

De gevonden vergelijkingen zien er als volgt uit:

$$\frac{N^*}{N^*_{\max}} = \Lambda * \left(\frac{K_3 * C}{1 + K_3 * C} \right) \quad (3-12)$$

waarin:

$$\Lambda = 1 - \left[\left(\frac{\tanh(K_2 * \delta)}{K_2 * \delta} \right) * \left(\frac{\Phi_p}{\tanh \Phi_p} - 1 \right) \right] \quad \text{voor } \Phi_p \leq 1 \quad (3-13)$$

$$\Lambda = \frac{1}{\Phi_p} - \left[\left(\frac{\tanh(K_2 * \delta)}{K_2 * \delta} \right) * \left(\frac{1}{\tanh \Phi_p} - 1 \right) \right] \quad \text{voor } \Phi_p \geq 1 \quad (3-14)$$

en

$$\Phi_p = \left[\frac{(K_2 * \delta) * (K_3 * C)}{\sqrt{2 * (1 + K_3 * C)}} \right] * \frac{1}{\sqrt{K_3 * C - \ln(1 + K_3 * C)}} \quad (3-15)$$

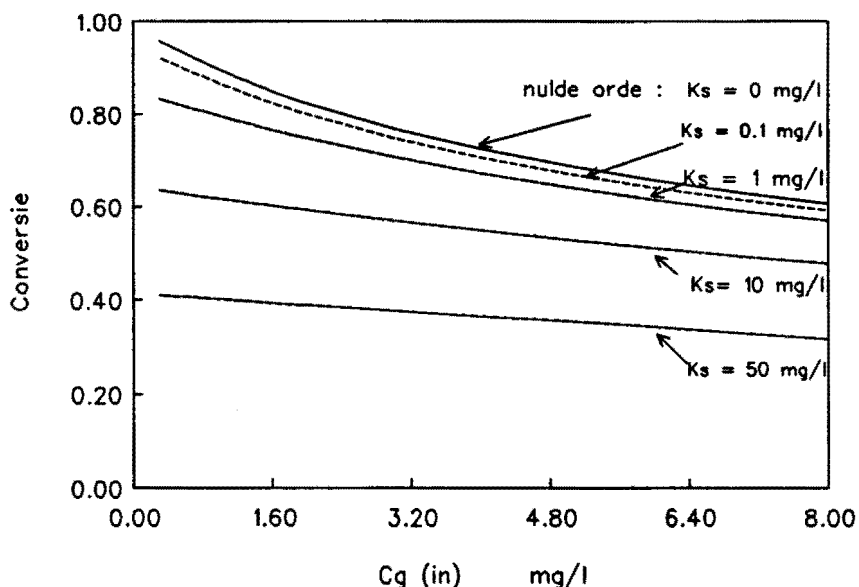
met: N^* = substraatfluxsnelheid (mol/(m²*h))
 N^*_{\max} = maximale substraatfluxsnelheid (mol/(m²*h))
 Λ = effectiviteitsfactor
 K_2 = 1^{ste}-orde Thiele-modulus (m⁻¹)
 K_3 = reciproce Monod-constante (1/molDCM)
 C = grensvlakconcentratie (molDCM/l)
 δ = biolaagdikte (m)

Aannemende dat de substraatconcentratie in de vloeistoffen in het biotricklingfilter door recirculatie van de vloeistoffen over de hele kolom gelijk is (UCM-model) en dat de flux naar de vlakke biolaag wordt gegeven door bovengenoemde vergelijkingen, dan is nu nagerekend welke effecten de grootte van de Monod-constante heeft op de uiteindelijk te behalen conversie in het biotricklingfilter [4].

Hiervoor zijn de volgende waarden gebruikt:

$\delta = 250$ (μm), $D = 4 \cdot 10^{-6}$ (m^2/h), $a = \text{benat oppervlak} = 200$ (m^2/m^3), $h = 4$ (m), $EC_{\text{max}} = 301$ ($\text{g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$).

De resultaten zijn weergegeven in figuur 3-5



Figuur 3.5:

Conversie tegen de ingangs-gasconcentratie bij variërende Monod-constanten.

Uit figuur 3-5 blijkt dat de Monod-constante en dus de orde van de reacties de conversie sterk beïnvloedt. De conversie daalt bij stijgende substraatconcentratie aan de ingang van de kolom. Bij stijging van de Monod-constante daalt de conversie. Boven 1 mg/l blijkt de conversie sterk af te nemen en dit effect wordt versterkt als de substraatconcentratie toeneemt. Er mag worden geconcludeerd dat de bepaalde Monod-constante, $K_s = 0.85$ mg/l, weinig tot geen invloed heeft op de conversie in een biotricklingfilter. Het is daarom geoorloofd om de kinetiek van de dichloormethaanaafbraak in een biotricklingfilter door *Hyphomicrobium* te modelleren als een nulde orde proces.

3.5 Conclusies

De groeikinetiek van micro-organismen voor dichloormethaanafbraak kan goed worden beschreven met het Monod-model.

Beide cultures hebben een overeenkomstige specifieke activiteit en Monod-constante. Eventuele infecties van de reincultuur hebben weinig invloed op de microkinetiek ten aanzien van de dichloormethaanafbraak door het micro-organisme *Hyphomicrobium* GJ21.

De gevonden Monod-constanten zijn dermate laag dat er weinig invloed op de conversie in het biotricklingfilter gering mag worden verondersteld. Het is geoorloofd de kinetiek van dichloormethaanafbraak door *Hyphomicrobium* te modelleren als een nulde orde proces.

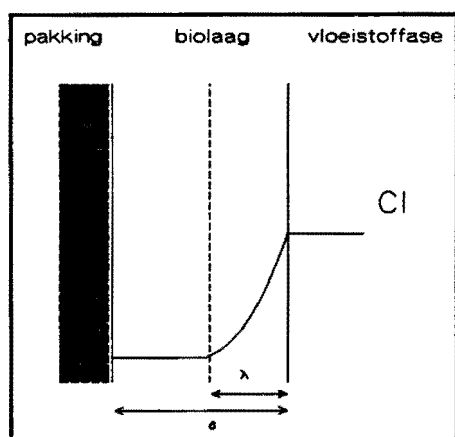
4 De bepaling van de deactiveringsconstante k_2 voor Hyphomicrobium

4.1 Theorie

De afbraak van dichloormethaan in een biotricklingfilter vindt hoofdzakelijk plaats in een biofilm van micro-organismen, van hoofdzakelijk Hyphomicrobium, die zich op de pakking van het filter hebben gehecht. Door groei van de micro-organismen in de biofilm zal deze laag in de tijd toenemen in dikte. Uit onderzoek is echter gebleken dat de prestatie van het filter onder constante condities (constante C_l , v_l , v_g , pH, enz) na verloop van tijd geen verandering in activiteit meer vertoont [6]. Ook is gebleken dat de biofilm een bepaalde dikte aanneemt die afhankelijk lijkt van de organische belasting, terwijl er voor een biolaag in steady-state gebleken is dat alle dichloormethaan uiteindelijk wordt omgezet naar CO_2 en er netto geen biomassa wordt gevormd. Daar groei wel degelijk is aangetoond in de biolaag, zijn er waarschijnlijk compenserende processen aan de gang. Er heerst dan blijkbaar biologisch evenwicht.

Groei = Afsterving + Endogene respiratie + Predatie

Hierbij wordt uitgegaan van een homogene biolaag waarin zowel groei als afsterving naast elkaar voorkomen.



Figuur 4-1: Schets van de biolaag aan een pakingsdeeltje

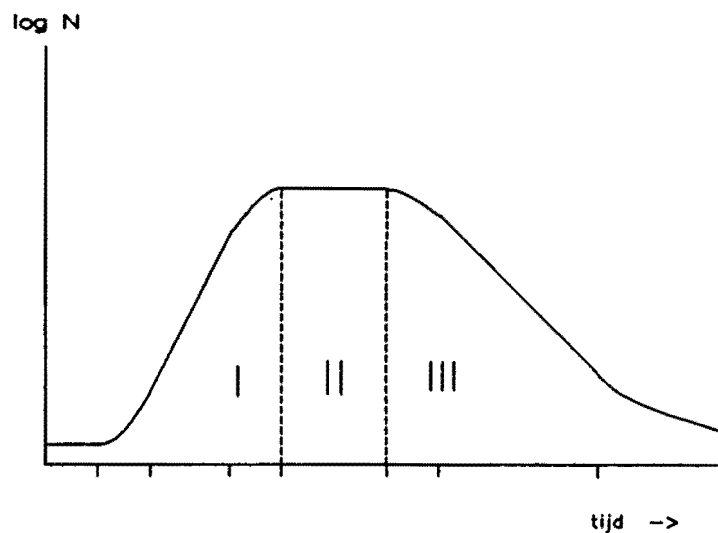
- δ = biolaag
- λ = deel van de biolaag waar geen diffusielimitatie optreedt (groeizone).
- $\delta - \lambda$ = deel van de biolaag waar wel diffusielimitatie optreedt (afsterfzone).

Door diffusielimitatie kan niet de hele biolaag worden voorzien van substraat. Er ontstaan dan twee zones in de biolaag (figuur 4-1). In de zone waar voldoende substraat aanwezig is (λ) zullen de micro-organismen in de biolaag hun activiteit kunnen behouden en zal groei optreden (groeizone). In de zone waar gebrek is aan substraat ($\delta-\lambda$), zal de activiteit van de biolaag dalen en zullen de micro-organismen in de biolaag afsterven (afsterfzone). Onder steady-state condities zullen de zones in dikte gelijk blijven.

Om een goede voorstelling te krijgen van de samenstelling en de dikte van de biolaag is het belangrijk om o.a. de snelheid van deactivering van de micro-organismen in de biolaag te kennen.

Het groeigedrag van micro-organismen

Voor een batchcultuur van micro-organismen worden de volgende groeistadia onderscheiden (zie figuur 4-2).



Figuur 4-2: Groeicurve van een bacterie-cultuur.

Aantal bacteriën tegen de tijd.

- I = aanloopfase + groeifase
- II = stationairefase
- III = afsterffase

In de aanloop- en groeifase(I) worden rustende micro-organismen geconfronteerd met verbeterde leefomstandigheden. Tijdens de aanloopfase neemt het aantal bacteriën nagenoeg niet toe omdat ze zich moeten aanpassen aan deze veranderde omstandigheden. Ze schakelen hun metabolismen om van een rustende toestand, waarin alleen energie wordt verbruikt voor de meest essentiële stofwisselingsprocessen, naar een actieve toestand waarin tevens groei mogelijk is. De duur van de aanloopfase is afhankelijk van het medium, de aard en de leeftijd van de bacterie-ent [14,20]

Na deze aanloopfase volgt de groeifase waarin de micro-organismen zich beginnen te vermenigvuldigen. De groeisnelheid neemt toe tot de maximale groeisnelheid wordt bereikt. De biomassaconcentratie in de tijd wordt dan als volgt beschreven:

$$X = X_0 * e^{\mu_{max} * t} \quad (4-1)$$

met X = biomassaconcentratie op $t=t$ (gDS/l)
 X_0 = biomassaconcentratie op $t=0$ (gDS/l)
 μ_{max} = maximale microbiële groeisnelheid (dag^{-1})
 t = tijd (dag)

Na verloop van tijd zal de groeisnelheid afnemen als gevolg van een dalende substraatconcentratie. Door een tekort aan substraat zal afsterving gaan optreden. Wanneer groei en afsterving in het systeem elkaar gaan compenseren blijft het aantal actieve micro-organismen constant (stationaire fase). De micro-organismen zullen dan in toenemende mate hun celvoorraden moeten aanspreken en de afsterfsnelheid zal toenemen (afsterffase).

In de afsterffase (III) wordt celafname meestal als een eerste orde proces beschreven.

$$X = X_{\max} * e^{-k_2 * t} \quad (4-2)$$

met k_2 = deactiveringsconstante (dag⁻¹)
 X_{\max} = maximale biomassaconcentratie (gDS/l)

Door de biomassaconcentratie in de tijd te meten kan de deactiveringsconstante k_2 worden gevonden. Als de biomassaconcentratie evenredig is aan de activiteit van de bacterie-suspensie kan, via activiteitmetingen van een suspensie bij afwezigheid van substraat in de tijd, ook de deactiveringsconstante worden bepaald.

4.2 Werkwijze

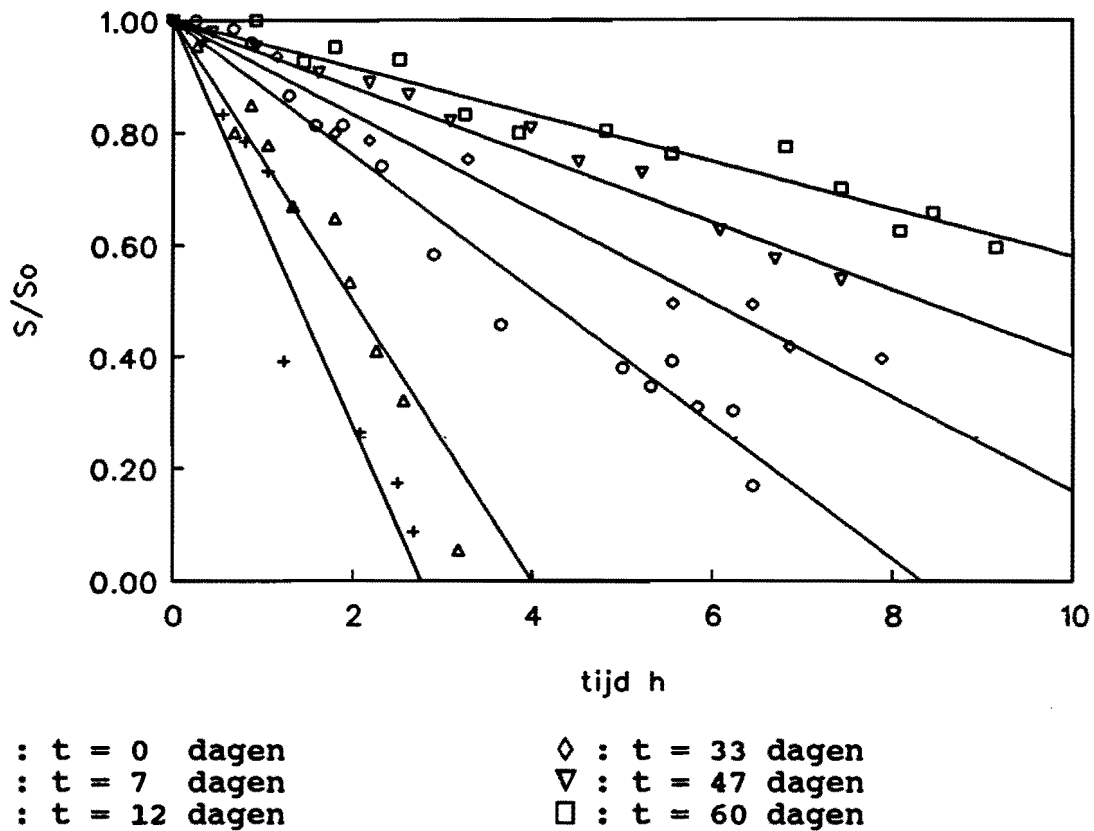
Voor de bepaling van de deactiveringsconstante k_2 is gebruik gemaakt van een actieve bacterie-suspensie. Deze bacterie-suspensie is in een schudfles van 1168 ml gekweekt in 500 ml Groningen-medium (zie: bijlage 2 voor samenstelling medium) uit 5ml ent, van een reincultuur *Hyphomicrobium* GJ21 suspensie gekweekt op 1mM dichloormethaan, op 1mM dichloormethaan als substraat. Tijdens deze kweek zijn geen limiterende factoren zoals te lage pH ($\text{pH}_{(t=0)}=7.6$, $\text{pH}_{\text{eind}}=6.9$) of te laag zuurstofgehalte opgetreden.

Nadat alle dichloormethaan is afgebroken, is de cultuur belucht en vervolgens in een schudmachine geplaatst. Deze schudt met een toerental van 120 rpm bij kamertemperatuur ($T=295$ K). Vanaf dat moment is tegen de tijd de activiteit van de bacterie-suspensie gemeten.

Hiertoe is steeds 50ml van de suspensie genomen uit de schudfles waarna de activiteit is gemeten. De resterende suspensie is enkele minuten belucht, zodat er geen zuurstoftekort is ontstaan. Dit experiment is over een periode van 60 dagen 10 keer uitgevoerd. De activiteit is bepaald door de afname van de dichloormethaanconcentratie ($S_0=0.315\text{mM}$) te meten tegen de tijd via de head-space-methode (zie hoofdstuk 2). De gevonden activiteit is uitgedrukt in $\text{molDCM}/(1*\text{h})$. Deze proeven zijn verricht in een schudmachine, die schudt met 387 rpm, bij een pH=6.9 en een temperatuur van 300 K.

4.3 Resultaten en discussie

In figuur 4.3 is de substraatafname tegen de tijd uitgezet voor 50 ml van de bacterie-suspensie op 6 verschillende tijdstippen.



Figuur 4-3:

Activiteit van een *Hyphomicrobium* GJ21-suspensie bij afwezigheid van substraat.

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd met $S_0 = 0.3$ mM.

Het blijkt dat de substraatconcentratie lineair afneemt met de tijd van de activiteitsmeting, zelfs na 60 dagen. Dit geeft aan dat tijdens de activiteitsmeting geen grote toename van biomassa optreedt ($X_0 \gg \Delta X$).

De helling van de lijnen door de meetpunten geeft de activiteit van het monster op dat tijdstip. Uit figuur 4-3 blijkt dat de activiteit afneemt in de tijd.

De gevonden substraatafname, tijdens de activiteitsmetingen, wordt veroorzaakt door actieve micro-organismen die het substraat gebruiken. Voor de substraatafbraak geldt:

$$\frac{-dS}{dt} = v = K_{obs} * X \quad (4-3)$$

met: $-dS/dt=v$ = afbraaksnelheid substraat=activiteit
(molDCM/(l*h))

X = biomassaconcentratie (gDS/l)

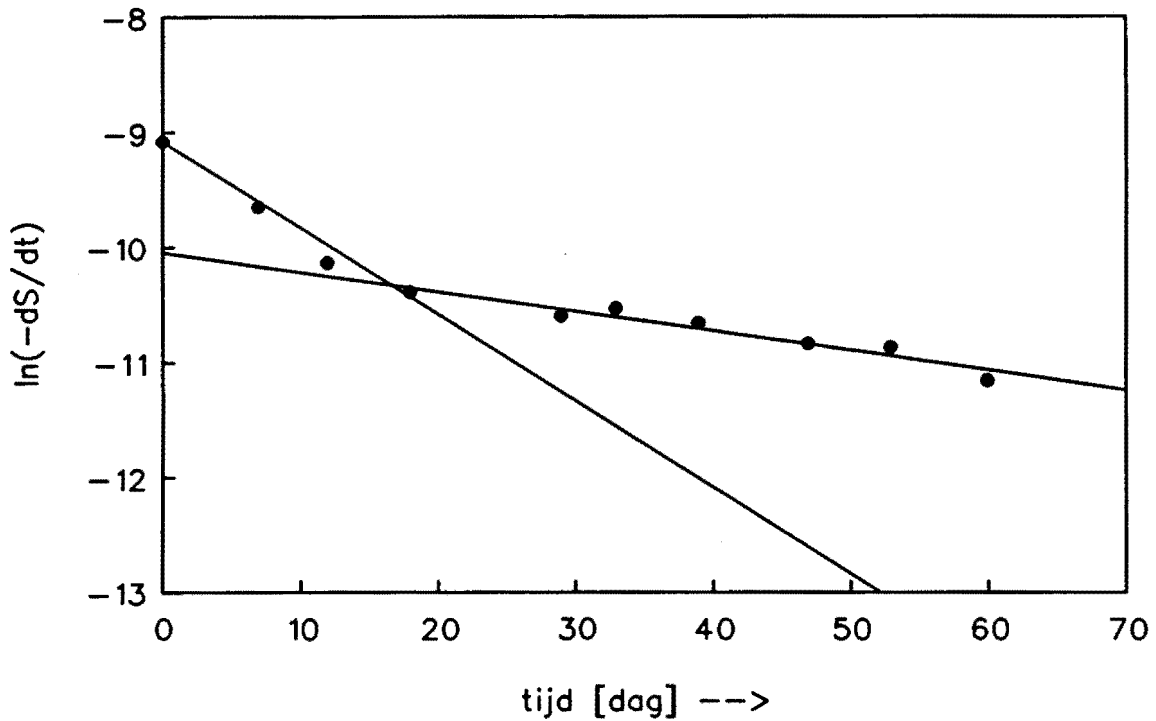
K_{obs} = waargenomen reactiesnelheidsconstante
(molDCM/(gDS*h))

$$= \frac{\mu}{Y_s} * \frac{S}{S+K_s} + M \quad \text{met } K_s \ll S$$

Uit vergelijking 4-2 en vergelijking 4-3 volgt:

$$-\frac{dS}{dt} = K_{obs} * X_0 * e^{-k_2 * t} \quad (4-4)$$

Door de gemeten activiteit logaritmisch uit te zetten tegen de tijd kan de deactiveringsconstante k_2 uit de helling van de te verwachte rechte worden bepaald. De gemeten activiteiten zijn uitgezet tegen de tijd in figuur 4.4.



Figuur 4-4:

Activiteitscurve van een *Hyphomicrobium* GJ21-suspensie bij $T=300$ K en $S_0=0.3$ mM dichloormethaan.

Substraatafbraaksnelheid of activiteit tegen de tijd met $v_0 = 1.14 \cdot 10^{-4}$ molDCM/(l*h).

De activiteit neemt af tegen de tijd. Voor de eerste 20 dagen van het experiment wordt de activiteitafname goed beschreven door vergelijking 4-4. De deactiveringsconstante k_2 is dan gelijk aan:

$$k_2 = 0.075 \text{ dag}^{-1} \quad \text{met een standaard deviatie van 9\%}$$

De deactiveringsconstante komt overeen met waarden gevonden voor andere micro-organismen. Voor micro-organismen in actief slib die opgekweekt zijn in een glucose oplossing geldt $0.03 < k_2 < 0.20 \text{ dag}^{-1}$ [17,18].

Uit figuur 4-3 blijkt verder dat na 20 dagen de daling van de activiteit gaat afwijken van het logaritmisch verloop. Dit kan worden verklaard door aan te nemen dat de micro-organismen hun metabolismen aanpassen aan de nieuwe omstandigheden. Zo zullen de actieve micro-organismen in staat zijn biogeen materiaal, dat beschikbaar komt door afsterving van andere micro-organismen, te gebruiken voor enzym-productie. De actieve micro-organismen blijven dan langer in leven en de activiteit blijft op een hoger nivo behouden voor lange tijd. Dit verschijnsel wordt verborgen groei genoemd (cryptic growth [15]). Toch neemt de activiteit na 20 dagen af en de deactiveringsconstante daalt dan tot:

$$k_2 = 0.018 \text{ dag}^{-1} \quad \text{met een standaard deviatie van } 16\%$$

Bij bovenstaande interpretatie is aangenomen dat de activiteit in de suspensie als functie van de tijd daalt doordat het aantal actieve micro-organismen in het medium afneemt in de tijd terwijl de activiteit per cel constant blijft.

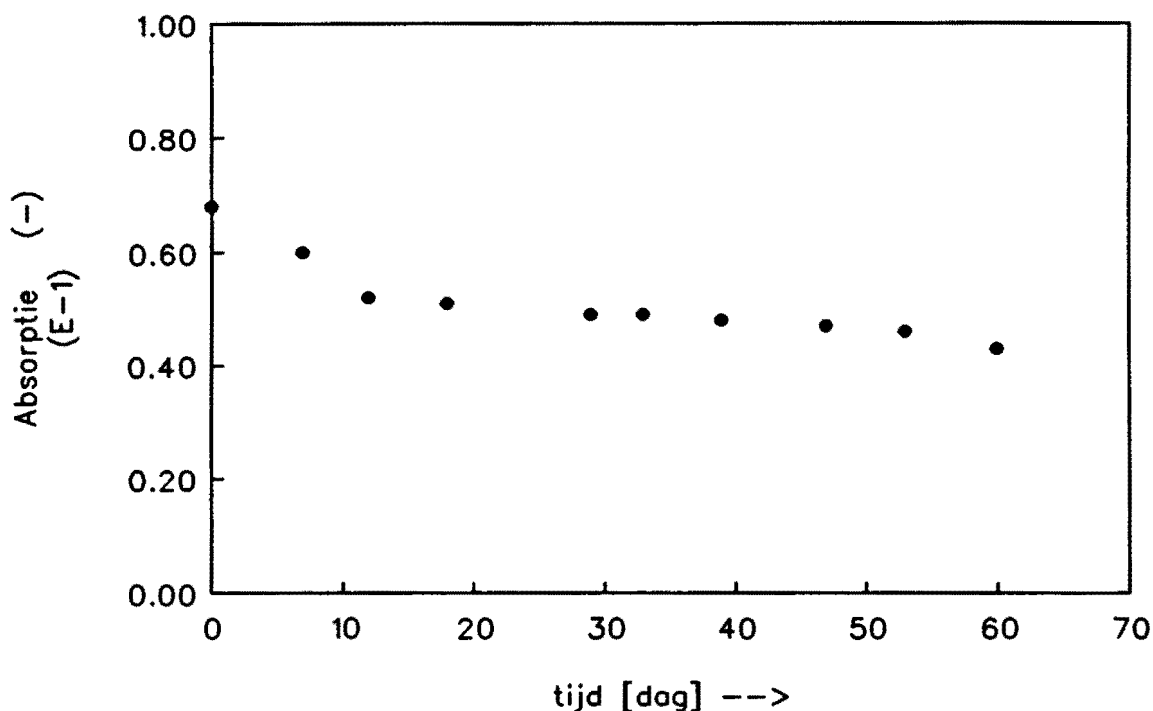
Na 60 dagen is de activiteit van de bacterie-suspensie gedaald tot 15% van de begin activiteit. Als bovenstaande aanname gerechtvaardigd is, dan zou er nog 15% van de oorspronkelijke hoeveelheid micro-organismen aanwezig in de suspensie moeten zijn. In de literatuur [15] worden veel lagere waarden genoemd ($\pm 4\%$) voor het uiteindelijk aantal micro-organismen dat overblijft. Dit verschil kan wellicht op drie manieren worden verklaard:

- 1 het aantal bacteriën dat in een systeem kan overleven is afhankelijk van de soort bacterie en het systeem.
- 2 het uiteindelijke aantal bacteriën in de suspensie zal nog verder dalen. De uiteindelijke rustfase is in dit experiment nog niet bereikt.
- 3 de activiteit per cel daalt in de tijd.

De specifieke activiteit μ_{\max}/Y_s van de micro-organismen kan worden bepaald aan het begin van het experiment ($t=0$). Er geldt namelijk $v_o = \mu_{\max} * X_o / Y_s = 1.14 * 10^{-4}$ (molDCM/(l*h)). Er volgt dan voor de specifieke activiteit $\mu_{\max}/Y_s = 0.67$ molDCM/(l*h) met $X_o = Y_s * S_o = 0.17 * 10^{-3}$ (gDS/l)

Dit komt overeen met de specifieke activiteit die bij eerdere experimenten zijn gemeten (zie o.a. hoofdstuk 3). De bacterie-cultuur waarmee gewerkt is komt dus overeen met eerder gebruikte cultures.

Naast de specifieke activiteit is eveneens de optische dichtheid van de monsters bepaald. Deze is weergegeven in figuur 4.5.



Figuur 4-5:

Optische dichtheid tegen de tijd voor de bacterie-suspensie.

De optische dichtheid bij een golflente van $\lambda'=450$ nm mag bij lage absorptie ($O.D.<1$) representatief geacht worden voor het aantal deeltjes in de suspensie mits er geen flocculatie optreedt.

Uit figuur 4.5 blijkt dat na een lichte afname in de eerste 20 dagen de optische dichtheid nagenoeg constant blijft ofwel dat het aantal deeltjes in de oplossing gelijk blijft. Het is echter niet mogelijk een onderscheid te maken tussen actieve micro-organismen en niet actieve organismen.

4.4 Toepassingen van de deactiveringsconstante k_2 bij de karakterisering van de biolaag

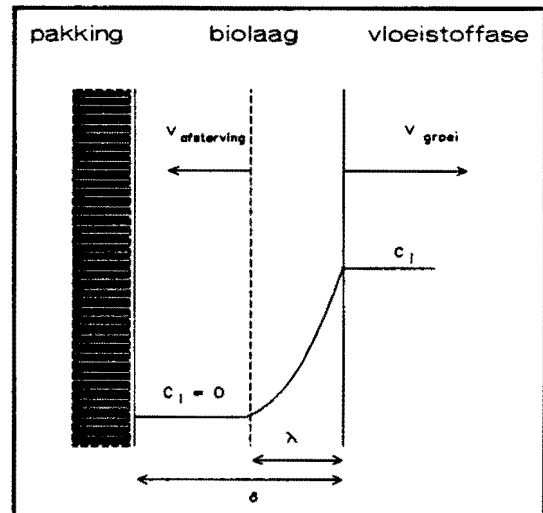
4.4.1 De bepaling van de evenwichtsdikte van een biolaag

De dikte van de biolaag (δ) in een biotricklingfilter wordt bij stationaire condities bepaald door twee essentiële processen in de biolaag namelijk groei en afsterving. Onder steady-state condities stelt zich een evenwicht in tussen dichloormethaan-afbraak en CO_2 -productie. Er wordt verondersteld dat de biolaag dan kan worden opgedeeld in twee homogene vlakke zones, een actieve zone (λ) en een niet actieve zone ($\delta - \lambda$) (zie figuur 4-7) [6].

In de actieve zone (λ) is voldoende substraat aanwezig ($C_1 > 0$). Micro-organismen zullen dan groeien en deze zone zal in dikte toenemen. Dit is weergegeven in figuur 4-7 (v_{groei}).

Figuur 4.7:

Groei en afsterving in een biolaag. Groei treedt op in zone (λ), afsterving treedt op in zone ($\delta - \lambda$)



Aangenomen wordt dat in de actieve zone van de biolaag slechts groei optreedt, dat de biolaag zich slechts in de richting loodrecht op het oppervlak van de pakking verplaatst en dat de micro-organismen over de hele actieve zone maximaal actief zijn (nulde orde).

Voor de snelheid waarmee de dikte van de actieve zone toeneemt geldt:

$$V_{(groei)} = \frac{k_o * \lambda * Y_s}{\rho_b} \quad (4-5)$$

met: $V_{(groei)}$ = groeisnelheid van het actieve deel van de biolaag (m/h)
 k_o = volumetrische reactiesnelheidsconstante (g/(m³*h))
 ρ_b = dichtheid biomassa (gDS(biomassa)/m³)
 λ = dikte van de actieve zone van de biolaag (m)
 Y_s = yield-coëfficiënt voor dichloormethaan (gDS/gDCM)

In de niet actieve zone ($\delta - \lambda$) is geen substraat aanwezig, $C_1 = 0$. De activiteit van de micro-organismen neemt af en de micro-organismen zullen afsterven. De dikte van deze zone neemt hierdoor af. Er geldt dan :

$$V_{(afname)} = (\delta - \lambda) * k_2 \quad (4-6)$$

met: $V_{(afname)}$ = afnamesnelheid van de dikte van de niet actieve zone van de biolaag (m/h)
 δ = totale biolaagdikte (m)

Hierbij wordt aangenomen dat de activiteit per micro-organisme constant blijft en dat de dode biomassa wordt weggenomen uit de biolaag door predatie, lyse of uitspoeling zodat de dikte van deze zone van de biolaagdiameter werkelijk kan afnemen.

In een stationair werkend biotricklingfilter lijkt er een evenwicht te ontstaan [6] waarbij de biolaagdikte lijkt constant te blijven. Er geldt dan $v_{\text{groei}} = v_{\text{afsterving}}$. De evenwichtsbiolaagdikte δ_{ev} kan dan als volgt worden beschreven:

$$\delta_{\text{ev}} = \lambda \left(1 + \left(\frac{k_o \cdot Y_s}{k_2 \cdot \rho_b} \right) \right) \quad (4-7)$$

De dikte van de actieve zone van de biolaag (λ) kan met de volgende vergelijking worden afgeschat.

$$\lambda = \frac{EC}{k_o \cdot a} \quad (4-8)$$

met: EC = eliminatie-capaciteit van een biotricklingfilter
 onder steady-state condities ($\text{g}/(\text{m}^3_{\text{kolom}} \cdot \text{h})$)
 a = benat oppervlak kolom (m^2/m^3)

De eliminatie-capaciteit is experimenteel bepaald in een biotricklingfilter ($40 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$) [6] en de reactiesnelheidsconstante k_o ($40800 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$) is bepaald uit batchproeven met biomassa uit een operationeel biotricklingfilter.

Onder standaard condities ($C_{\text{g (in)}} = 1.2 \text{ g}/\text{m}^3$, $EC = 40 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$, $v_g = 200 \text{ m}/\text{h}$, $v_l = 7 \text{ m}/\text{h}$, $\text{pH}=8$ en $C_{\text{NaCl}} = 300 \text{ mM}$) kan de volgende biolaagdikte worden bepaald met $a = 180 \text{ m}^2/\text{m}^3$, $Y_s = 0.17 \text{ gDS}/\text{gDCM}$, $k_2 = 3.12 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ en $\rho_b = 70000 \text{ g}/\text{m}^3$.

$$\delta_{\text{ev}} = 180 \quad (\mu\text{m})$$

Onder deze condities is, met zeer veel spreiding, een biolaagdikte van $160 \mu\text{m}$ gemeten [6].

Het is dus mogelijk een redelijke afschatting te geven van de biolaagdikte in een operationeel biotricklingfilter.

4.4.2 De bepaling van de minimale tijd waarin een biotricklingfilter kan dichtgroeien

Indien er geen biomassa afsterft in een biotricklingfilter zal de biomassa-hoeveelheid toenemen. Dit gaat door totdat alle ruimten tussen de pakkingsdeeltjes zijn dichtgegroeid. Het biotricklingfilter is dan verstopt en er kan dan geen gasreiniging meer plaatsvinden. De tijd waarin een kolom kan dichtgroeien wordt als volgt weergegeven:

$$\tau = \frac{d}{V_{(groei)}} \quad (4-11)$$

met: τ = minimale tijd waarin een biotricklingfilter kan dichtgroeien (h)
 d = karakteristieke afstand tussen pakkingsdeeltjes (m)

Bij standaardcondities geldt, dat bij een groeisnelheid van $v_{groei} = 1$ ($\mu\text{m/h}$) en een afstand tussen de pakkingsdeeltjes van $d = 0.01$ (m), het biotricklingfilter in 430 dagen zal dichtgroeien.

Er is aangenomen dat er geen afsterving en afspoeling van de biofilm zal optreden. Als deze processen wel voorkomen zal de biolaag minder snel aangroeien en zal het langer duren voordat de kolom zal dichtgroeien. Verder is aangenomen dat er geen vezelstructuren tussen de pakkingsdeeltjes worden gevormd. Dit kan namelijk verstopping van het biotricklingfilter versnellen.

De biotricklingfilters die gebruikt zijn voor de afbraak van dichloormethaan met *Hyphomicrobium* zijn bij eerder verrichte experimenten niet dichtgegroeid. Wel is de kolom dichtgegroeid met micro-organismen als aceton is toegevoegd aan het gasmengsel [2].

4.4.3 De bepaling van de kritische substraatconcentratie voor biolaagvorming

De dikte van een biolaag wordt onder andere bepaald door de substraatconcentratie. Bij lage substraatconcentratie hebben de micro-organismen een lage activiteit en zijn dan niet in staat een biolaag te vormen. Door Rittmann en McCarty [18,19] is onderzocht onder welke minimale substraatconcentratie in de vloeistoffase nog een biolaag kan worden gevormd op de pakking. De volgende vergelijking is door hen opgesteld:

$$S_{\min}(l) = K_s * \left(\frac{\frac{2 * k_2}{\mu_{\max}}}{2 - \frac{2 * k_2}{\mu_{\max}}} \right) \quad (4-12)$$

Er is aangenomen dat bij lage concentraties geen biolaag wordt gevormd. Ook wordt afspoeling van biomassa van de pakking verwaarloosd.

Bij een groeisnelheid van $\mu_{\max}=2.6$ (dag⁻¹), een deactiveringsconstante van $k_2=0.075$ (dag⁻¹) en een Monod-constante van 10 ($\mu\text{molDCM/l}$) zal de minimale substraatconcentratie $S_{\min}(l)$ 25 (mg/m^3) bedragen.

Voor een biotricklingfilter wordt aangenomen dat de substraatconcentratie in de vloeistof constant is over de hele kolom (UCM-model). Bij een conversie van 90 % en een verdelingscoëfficiënt van $m=0.09$ zal de minimale ingangconcentratie voor het gas $C_{g(\text{in})}=22.5$ (mg/l) moeten zijn om een biolaag te kunnen vormen.

De concentraties die worden toegepast in operationele biotricklingfilters zijn meestal groter ($300 < C_{g(\text{in})} < 3000$ mg/l). Er treden dan geen belemmeringen op voor het ontstaan van een biolaag.

4.5 Conclusies

De afname van de activiteit van een actieve bacterie-suspensie (eerste 20 dagen) kan goed worden beschreven met een eerste orde proces (vergelijking 4-4). De deactiveringsconstante k_2 bedraagt dan 0.075 dag^{-1} met een standaard deviatie van 9%.

De deactiveringsconstante van *Hyphomicrobium* GJ21 komt overeen met overeenkomstige micro-organismen afkomstig uit actief slib.

De activiteit voor een bacterie-cultuur blijft over lange tijd, op een hoger niveau, als voorspeld met vergelijking 4-4, gehandhaafd. Dit wordt wellicht veroorzaakt door verborgen groei. De deactiveringsconstante k_2 daalt dan naar $k_2 = 0.018 \text{ dag}^{-1}$ met een standaard deviatie van 16 %.

5 De dichloormethaanafbraak door Hyphomicrobium bij stikstoflimitatie

5.1 Theorie

Voor de beschrijving van de groeikinetiek van micro-organismen op een bepaald substraat wordt in het algemeen uitgegaan van de Monod-vergelijking:

$$-r_s = \frac{\mu}{Y_s} * X \quad (3-1)$$

Als naast de dichloormethaanconcentratie S ook de stikstofconcentratie N invloed heeft op de groeisnelheid van micro-organismen dan beschrijft de volgende relatie de groeisnelheid:

$$\mu = \mu_{\max} * \left(\frac{S}{S + K_S}\right) * \left(\frac{N}{N + K_N}\right) \quad (5-1)$$

met: N = stikstofconcentratie (molN/l)

K_N = Monod-constante voor stikstoflimitatie (molN/l)

Met vergelijking 5-1 kan vergelijking 3-1 worden herschreven tot:

$$-r_s = -\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y_s} * \left(\frac{S}{S + K_S}\right) * \left(\frac{N}{N + K_N}\right) * X \quad (5-2)$$

In dit model is aangenomen dat dichloormethaan slechts gebruikt wordt voor groei van biomassa. De micro-organismen zullen echter bij tekort aan stikstof substraat blijven afbreken voor het instandhouden van hun essentiële metabolismen zoals productie van DNA en RNA. Dit proces wordt maintenance genoemd. Als groei van micro-organismen optreedt mag maintenance worden verwaarloosd. Bij daling van de groeisnelheid, door gebrek aan stikstof, mag maintenance echter niet meer worden verwaarloosd en gaat het model van

Pirt [17] gelden. In dit model wordt substraatafbraak bepaald door groei ($\mu \cdot X / Y_s$) en maintenance ($M \cdot X$) van micro-organismen [7,17]. Er geldt dan:

$$-r_s = -\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y_s^*} \cdot \left(\frac{S}{S + K_s}\right) \cdot \left(\frac{N}{N + K_N}\right) \cdot X + M \cdot X \quad (5-3)$$

met Y_s^* = yield-coëfficiënt voor substraat, aangepast voor maintenance (gDS/molDCM)

De stikstofconsumptie kan op overeenkomstige wijze met de Monod-vergelijking worden beschreven.

$$-r_N = -\frac{dN}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y_N} \cdot \left(\frac{S}{S + K_s}\right) \cdot \left(\frac{N}{N + K_N}\right) \cdot X \quad (5-4)$$

met $-r_N$ = stikstofafnamesnelheid (molN/(l*h))
 Y_N = yield-coëfficiënt voor stikstof (gDS/molN)

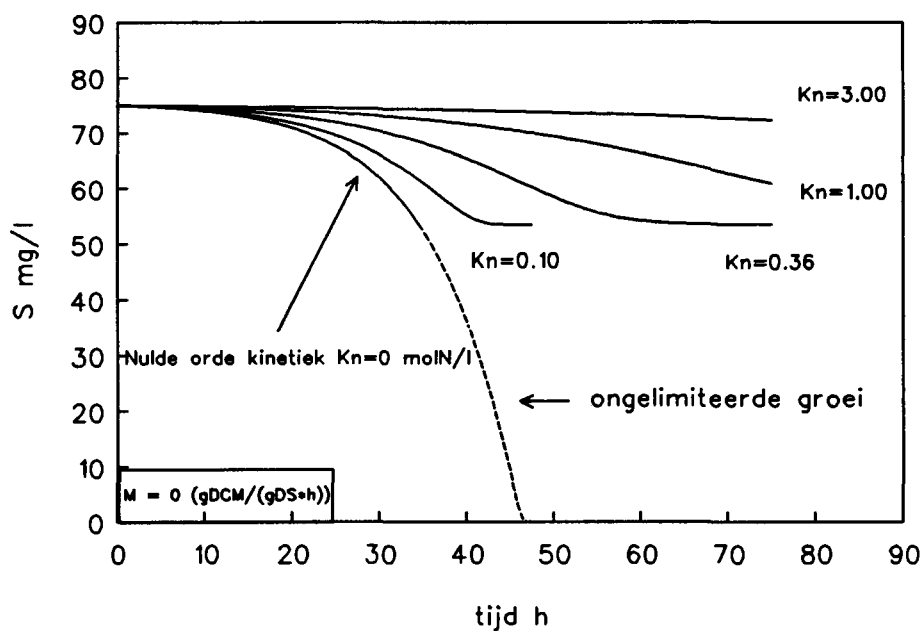
Hierbij wordt verondersteld dat stikstof slechts gebruikt wordt voor groei van biomassa.

De toename van de biomassaconcentratie kan als volgt worden uitgedrukt:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{S + K_s}\right) \cdot \left(\frac{N}{N + K_N}\right) \cdot X \quad (5-5)$$

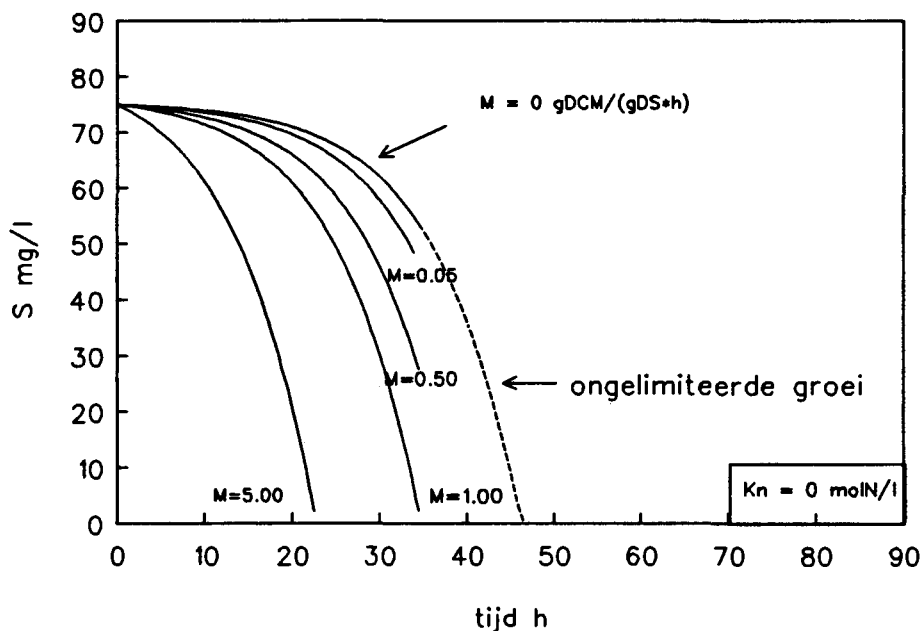
Met de vergelijkingen 5-3, 5-4 en 5-5 kan de substraatafname worden beschreven voor groeiende micro-organismen bij stikstofafname.

Bij stijgende Monod-constante voor stikstof (K_N) zal de substraatafnamesnelheid afnemen (zie figuur 5-1). Als er geen maintenance optreedt zal de dichloormethaan-concentratie afnemen tot nagenoeg alle stikstof is omgezet in biomassa. Daarna treedt geen afname meer op.



Figuur 5-1: Invloed van de Monod-constante op de substraatafnamesnelheid in een batchcultuur.

Bij een toenemende maintenance-coëfficiënt neemt de substraatafnamesnelheid toe (figuur 5-2).



Figuur 5-2: Invloed van de maintenance-coëfficiënt op de substraatafnamesnelheid in een batchcultuur.

Als $K_N \ll N$ en $K_S \ll S$ dan geldt nulde orde reactiekinetiek in substraat en stikstof. De substraatconcentratie kan dan als functie van de tijd worden berekend met vergelijking 5-6.

$$\frac{S}{S_0} = 1 - \frac{(e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1)}{(e^{\mu_{\max} \cdot t_e} - 1)} \quad (5-6)$$

met: t_e = tijd waarbij alle substraat verbruikt is (h)

(afleiding zie bijlage B-4)

5.2 Werkwijze

Voor het onderzoek naar het groeigedrag van het micro-organisme *Hyphomicrobium* bij verschillende lage stikstofconcentraties is gebruik gemaakt van een reincultuur GJ21 en een cultuur afkomstig uit een operationeel biotricklingfilter.

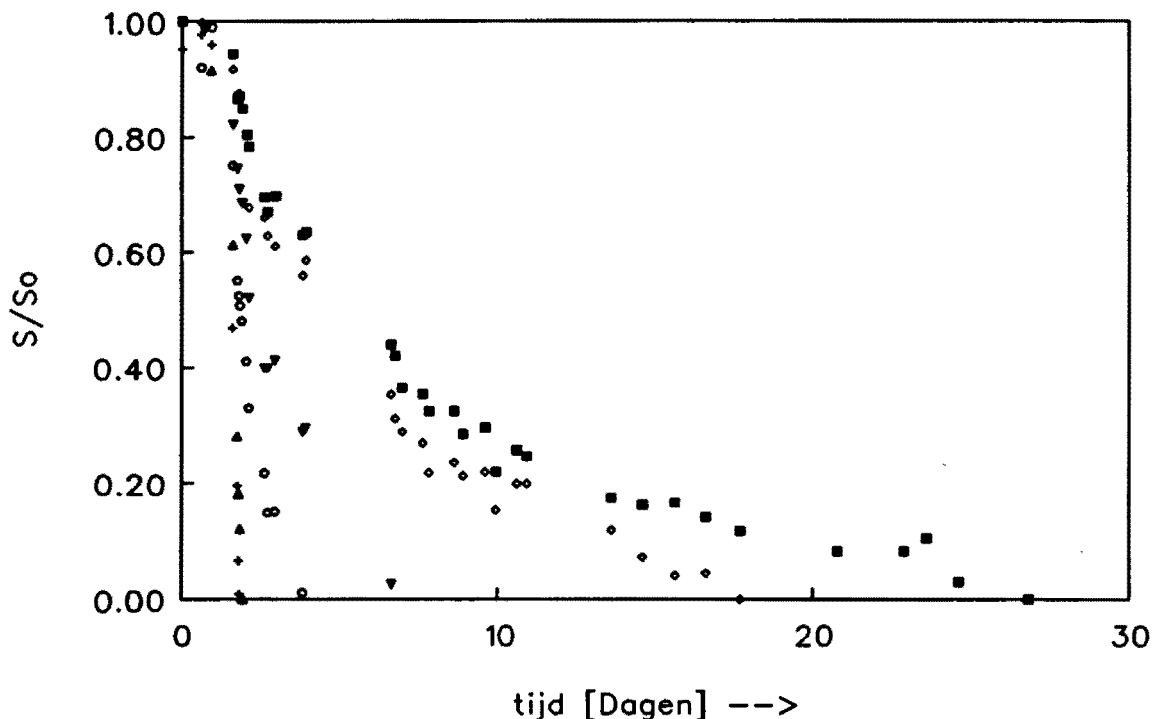
De proeven zijn verricht in gesloten schudflessen van 315 ml met daarin 100 ml stikstof-vrij voedingsmedium (samenstelling zie bijlage B-3) en een substraatconcentratie van 1 mM dichloormethaan. Deze oplossing is geënt met 1ml bacterie-suspensie (opgekweekt uit 1mM dichloormethaan). Hieraan is een bekende hoeveelheid ammoniumsulfaat toegevoegd, zodat de concentraties aan ammonium in oplossing varieerden van 0.010 mM tot 0.215 mM ammonium. De substraatafname van deze monsters is tegen de tijd via de head-space-methode gevolgd.

De experimenten zijn verricht in een schudmachine (387 rpm) bij $T = 300 \text{ K}$ en een $\text{pH}_{(t=0)} = 7.6$

Nadat alle substraat is omgezet is het ammonium-gehalte van het monster bepaald volgens NEN-norm 6472.

5.3 Resultaten en discussie

Van een reïncultuur *Hyphomicrobium* GJ21 is het gemeten verloop van de substraat-concentratie in de suspensie dimensieloos uitgezet tegen de tijd in figuur 5-3. De stikstof-koolstof-verhoudingen (N/C-verhouding) aan het begin van het experiment zijn gevarieerd tussen $0.013 < N/C < 0.215$ molN/molC.



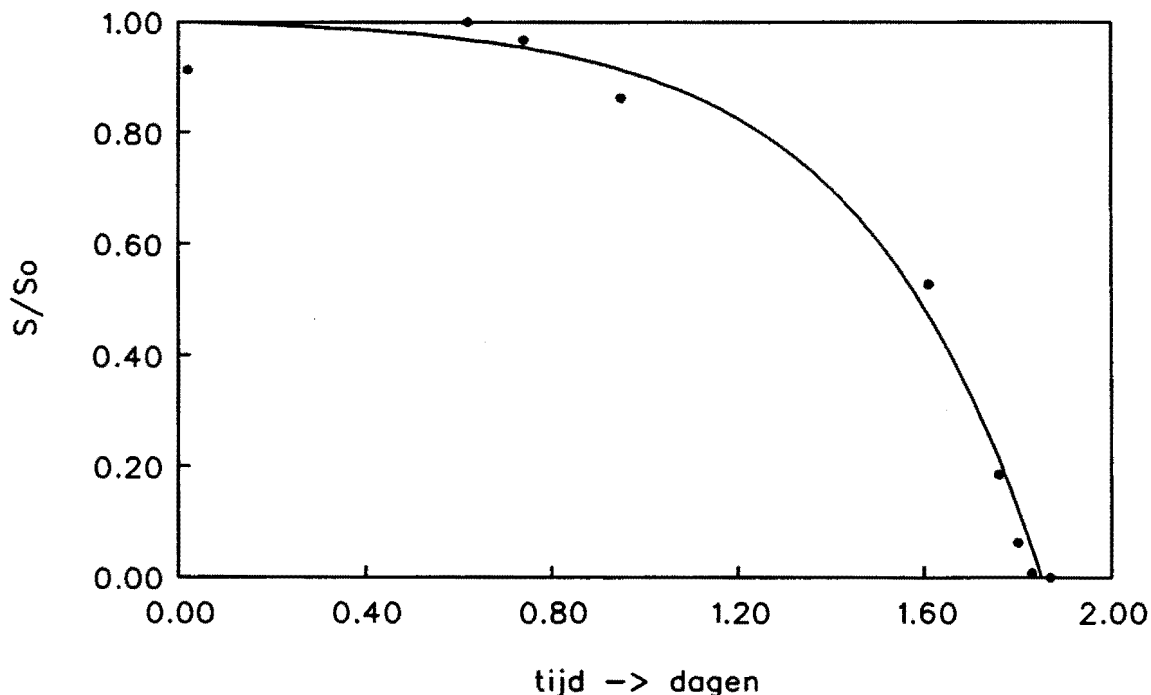
+ : N/C = 0.215 o : N/C = 0.031 ◊ : N/C = 0.015
▲ : N/C = 0.094 ▼ : N/C = 0.021 ■ : N/C = 0.013

Figuur 5.3:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd voor een *Hyphomicrobium* GJ21 reïncultuur bij 6 verschillende stikstof-koolstof-verhoudingen bij $T = 300$ K, $pH_{(t=0)} = 7.6$.

In figuur 5-3 is te zien dat bij overmaat stikstof ($N/C=0.215$) het substraat binnen 2 dagen wordt afgebroken (zie ook figuur 5-4). Bij de overige experimenten blijkt de substraatafnamesnelheid af te nemen in de tijd.

Bij een N/C-verhouding van 0.215 is het volgende verloop voor de substraatconcentratie gevonden (figuur 5-4).



Figuur 5.4:

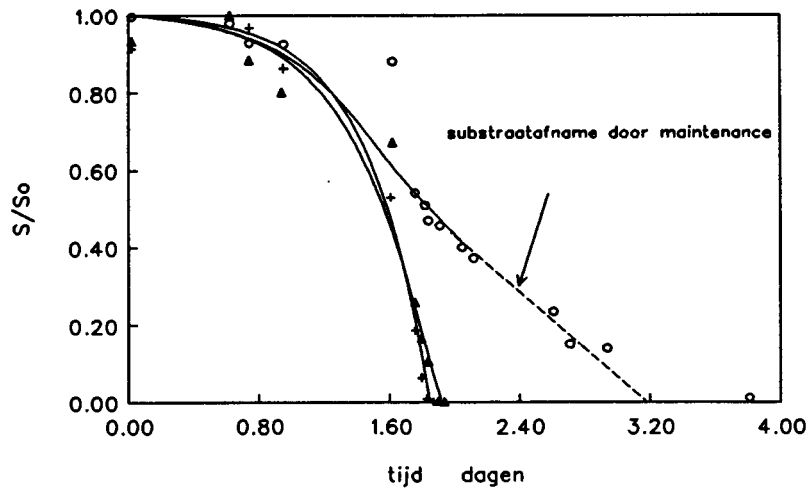
Dimensieloze substraat concentratie tegen de tijd voor een *Hyphomicrobium* GJ21 reïncultuur bij een N/C-verhouding van 0.215. Experimentele data en vergelijking 5-6.

Bij overmaat dichloormethaan en stikstof treedt ongelimiteerde groei van micro-organismen op. De substraatconcentratie kan dan worden beschreven met vergelijking 5-6. De μ_{\max} en t_e zijn bepaald met het analysepakket SAS met een nonlineaire fit-procedure. Er volgt dan:

$$\begin{aligned} \mu_{\max} &= 2.63 \text{ dag}^{-1} && \text{met een standaard deviatie van } 14 \% \\ t_e &= 1.85 \text{ dag} && \text{met een standaard deviatie van } 1 \% \end{aligned}$$

De experimenten waar geen overmaat stikstof aanwezig was, $N/C < 0.09$, worden beschreven met de vergelijkingen 5-3, 5-4 en 5-5. De invloed van de Monod-constante en maintenance op de substraatafnamesnelheid wordt merkbaar. Voor het bepalen van de Monod-constante K_M en maintenance-coëfficiënt M zijn de substraatconcentraties tegen de tijd bepaald met een Runge-Kutta benadering met bovengenoemde vergelijkingen. De bekende constanten in deze benadering zijn: de maximale microbiële groeisnelheid ($\mu_{max} = 2.63 \text{ dag}^{-1}$), de Monod-constante ($K_S = 10 \mu\text{M}$), de yield-coëfficiënten ($Y_S^* = 0.23 \text{ gDS/gDCM}$ (aangepast voor maintenance), $Y_N = 0.16 \text{ gNH}_4/\text{gDS}$ (bron: Diks R.M.M.)), de temperatuur ($T = 300 \text{ K}$), de begin dichloormethaanconcentratie ($S_0 = 1 \text{ mM}$) en de ammonium-concentratie aan het begin van het experiment (per experiment verschillend).

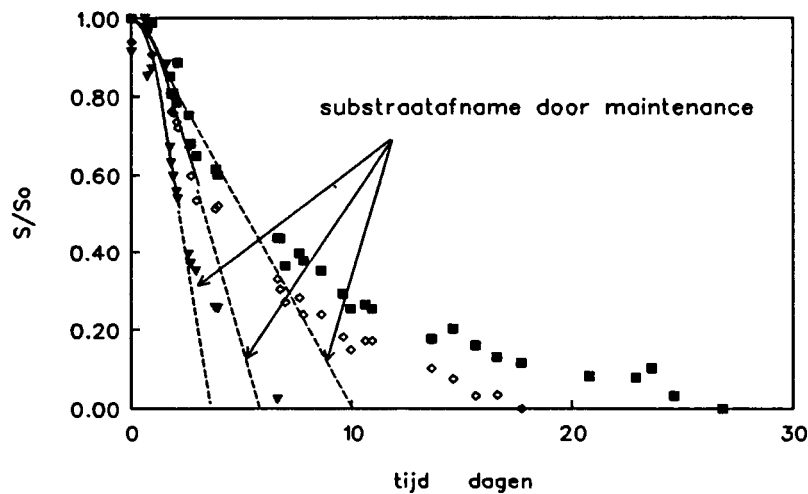
De concentraties worden met een tijdsinterval van 0.5 h berekend totdat geldt: $S=0$, $N=0$ of $t > 75\text{h}$. Dan wordt de berekening beëindigd. Per experiment is de optimale Monod-constante K_M en de maintenance-coëfficiënt M afgeschat. In figuur 5-5 en 5-6 zijn de experimentele data en de berekende substraatconcentraties tegen de tijd uitgezet.



+ : N/C = 0.215 ▲ : N/C = 0.094 ○ : N/C = 0.031

Figuur 5-5:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd voor experimenten met N/C-verhoudingen van 0.215, 0.094 en 0.031 voor een reincultuur Hyphomicrobium GJ21. Experimentele data en berekende waarden via vergelijking 5-3, 5-4 en 5-5.



▼ : N/C = 0.021 ◇ : N/C = 0.015 ■ : N/C = 0.013

Figuur 5-6:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd voor experimenten met een N/C-verhouding van 0.021, 0.015 en 0.013 voor een reincultuur Hyphomicrobium GJ21. Experimentele data en berekende waarde via vergelijking 5-3, 5-4 en 5-5.

In figuur 5-5 en 5-6 is te zien dat de experimenten de eerste 2 dagen goed worden beschreven door bovengenoemde vergelijkingen. Verder blijkt dat voor de experimenten met lage stikstofconcentratie de beschrijving van de substraatconcentratie wordt beëindigd voordat $S=0$ en $t=75h$ (=3.125 dag). Dit wijst erop dat de stikstofconcentratie naar nul nadert en dat alle stikstof is verbruikt voor biomassatoename. Bij deze experimenten blijft de substraatafnamesnelheid constant na dit tijdstip ($t > 2$ dagen), zoals aangegeven wordt door de stippellijnen in figuur 5-5 en 5-6, of neemt af, zoals is gemeten bij de experimenten met $N/C = 0.021, 0.015$ en 0.013 (figuur 5-6).

De waarden van maintenance-coëfficiënt M en de Monod-constante K_N die zijn afgeschat per experiment zijn opgenomen in tabel 5-1.

Tabel 5-1: Monod-constante K_N en maintenance-coëfficiënt M bepaald met vergelijking 5-3, 5-4 en 5-5 voor variërende N/C -verhouding, voor een reincultuur *Hyphomicrobium* GJ21.

N/C molN/molC	K_N $\mu\text{molN/l}$	M gDCM/(gDS*dag)
0.094	5.6	7.2
0.031	5.6	8.2
0.021	5.6	9.1
0.015	5.6	7.2
0.013	5.6	7.2
Gemiddelde waarde	5.6	7.7

Met deze beschrijving kan slechts een ordegrrootte van de constanten worden aangegeven. Het blijkt echter dat voor beide constanten voor alle experimenten overeenkomstige waarden worden gevonden.

Als alle stikstof verbruikt is verandert de substraatafnamesnelheid. De micro-organismen wijzigen hun metabolismen waardoor de maintenance-coëfficiënt M zal veranderen. Daarnaast kan tevens afsterving van micro-organismen optreden door gebrek aan stikstof, ondanks het aanwezige dichloormethaan. Voor de beschrijving van de substraatafname bij afsterving van micro-organismen is het zogenaamde twee-fasen-model opgesteld.

In het twee-fasen-model wordt de substraatafname beschreven door twee achtereenvolgende processen namelijk groei van micro-organismen als $N > 0$ (fase 1) en maintenance van micro-organismen als $N = 0$ (fase 2). In het eerste deel van het twee-fasen-model, als geldt $N > 0$, wordt nulde orde kinetiek voor dichloormethaan en stikstof verondersteld. De substraatafname wordt dan beschreven door vergelijking 5-6.

In het tweede deel van het twee-fasen-model, als $N = 0$, zal de substraatafname slechts worden veroorzaakt door maintenance van micro-organismen. Er geldt dan:

$$-\frac{dS}{dt} = M * X \quad (5-7)$$

Het aantal actieve micro-organismen zal afnemen ondanks de aanwezigheid van substraat. Voor de biomassa concentratie geldt dan:

$$-\frac{dX}{dt} = k_2 * X \quad (5-8)$$

Met de randvoorwaarde $t = t_{(N=0)} \Rightarrow X = X_{\max}$ volgt na integratie voor vergelijk 5-8:

$$X = X_{\max} * e^{-k_2 * (t - t_{(N=0)})} \quad (5-9)$$

De maximale biomassaconcentratie kan numeriek worden bepaald met vergelijking 5-3, 5-4 en 5-5.

De maximale biomassaconcentratie kan ook analytisch worden bepaald. Hiertoe wordt een vereenvoudiging in dit model aangebracht door nulde orde groeikinetiek voor micro-organismen ten aanzien van substraat en stikstof aan te nemen als $N > 0$. Dan geldt vergelijking 5-6. Als alle stikstof verbruikt is geldt deze vereenvoudiging niet meer.

Het tijdstip $t_{N=0}$, waarop alle stikstof is verbruikt, kan als volgt worden berekend. De hoeveelheid dichloormethaan die is verbruikt voor biomassa-toename is gelijk aan $(N_0 * v_N) / Y_S$. Er wordt hierbij uitgegaan van de biomassasamenstelling van $C_5H_7NO_2P_{1/30}$, waarbij v_N de stoichiometrische verhouding is tussen koolstof en stikstof. Als alle N verbruikt is geldt:

$$\frac{S_{(N=0)}}{S_0} = 1 - X = 1 - \frac{v_N * N_0}{Y_S * S_0} \quad (5-10)$$

met: S_0 = dichloormethaanconcentratie op $t=0$ (molDCM/l)
 N_0 = stikstofconcentratie op $t=0$ (molN/l)
 X = conversie

Met vergelijking 5-6 kan vervolgens het tijdstip worden bepaald waarvoor geldt: $t = t_{(N=0)}$. De biomassaconcentratie die tot $t_{N=0}$ is ontstaan wordt bepaald met vergelijking 4-1. Er volgt dan voor de maximale biomassaconcentratie:

$$X_{max} = X_0 * e^{\mu_{max} * t_{(N=0)}} \quad (5-11)$$

Met vergelijking 5-7, 5-9 en 5-11 kan na integratie de volgende uitdrukking worden gevonden voor de substraatafname.

randvoorwaarden: $t = t_{(N=0)} \Rightarrow X = X_{max}$
 $t = t_e \Rightarrow S = 0$

$$\frac{S}{S_0} = \frac{M * X_0 * e^{\mu_{max} * t_{(N=0)}}}{k_2 * S_0} * (e^{-k_2 * (t - t_{(N=0)})} - e^{-k_2 * (t_e - t_{(N=0)})}) \quad (5-12)$$

(afleiding zie bijlage B-5-4)

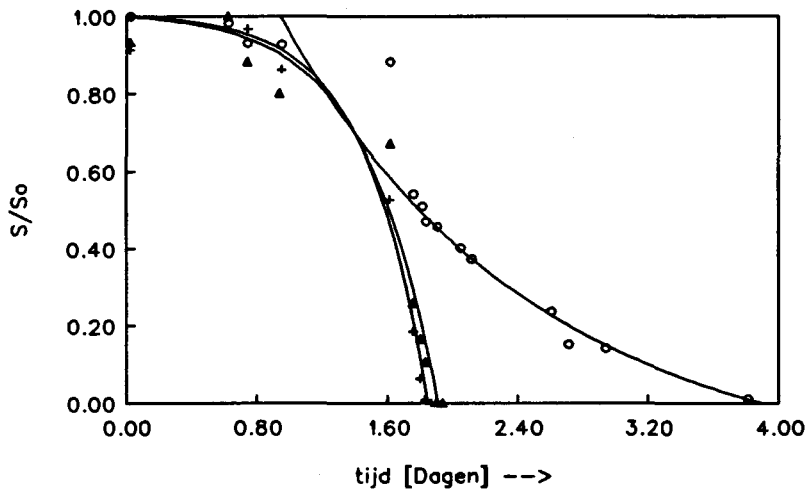
In werkelijkheid zal de maximale biomassaconcentratie door de invloed van de Monod-kinetiek op de groeisnelheid van de micro-organismen en door maintenance van micro-organismen op een later tijdstip en bij een lagere substraatconcentratie worden bereikt. De biomassaconcentratie die echter maximaal kan worden bereikt is gelijk, mits de substraatconcentratie niet limiterend gaat werken.

Voor de experimenten kan dit model als volgt worden toegepast:

als de stikstofconcentratie groter is dan nul dan geldt ongelimiteerde groei (vergelijking 5-6). De groeisnelheid voor alle experimenten is dan gelijk aan de groeisnelheid van het experiment met een stikstof-koolstof-verhouding van 0.215. ($\mu_{\max} = 2.63 \text{ dag}^{-1}$, $t_e = 1.85 \text{ dag}$).

Is alle stikstof verbruikt dan kan de substraatafname worden beschreven met vergelijking 5-12. De maintenance-coëfficiënt M en de deactiveringsconstante k_2 zijn per experiment de fit-parameters. De maximale microbiële groeisnelheid (μ_{\max}), de yield-coëfficiënt (0.17 gDS/gDCM) en de beginbiomassa-concentratie X_0 zijn constant. Bij het enten van de biomassa is er voor gezorgd dat 1ml bacterie-suspensie (opgekweekt op 1mM dichloormethaan), is toegevoegd in 100 ml vloeistof met 1mM dichloormethaan. Het monster is dan 1% met biomassa geënt. Er geldt dan $X_0/S_0 = 0.01$.

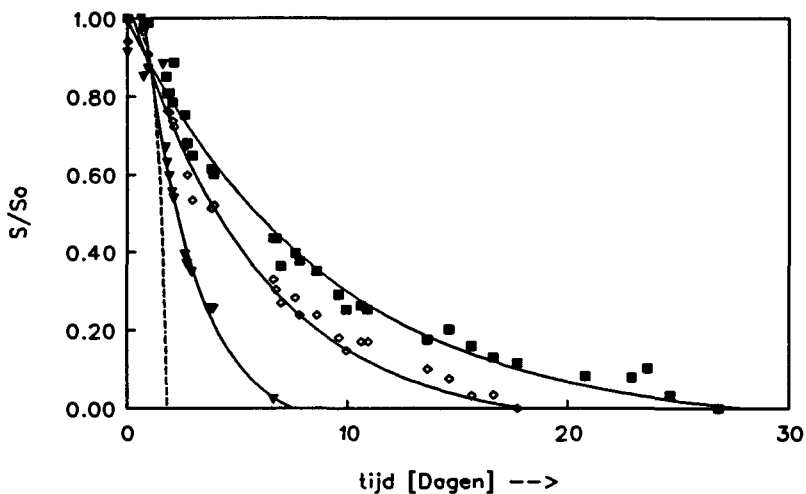
Als alle stikstof verbruikt is, wordt $(S/S_0)_{(N=0)}$ met vergelijking 5-10 berekend. Vervolgens is met vergelijking 5-6 $t=t_{(N=0)}$ berekend. De eindtijd t_e wordt afgeschat uit de meetresultaten. Figuur 5-7 en 5-8 tonen de gemeten en de berekende substraatconcentraties tegen de tijd.



+ : $N/C = 0.215$ Δ : $N/C = 0.094$ o : $N/C = 0.031$

Figuur 5-7:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd voor een reincultuur *Hyphomicrobium* GJ21 voor $N/C = 0.215$, 0.094 en 0.031 . Experimentele data en vergelijking 5-6 en 5-12.



∇ : $N/C = 0.021$ \diamond : $N/C = 0.015$ ■ : $N/C = 0.013$

Figuur 5-8:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd voor een reincultuur *Hyphomicrobium* GJ21 voor $N/C = 0.021$, 0.015 en 0.013 . Experimentele data en vergelijking 5-6 en 5-12

De substraatafname kan goed worden beschreven met vergelijking 5-12 als alle stikstof verbruikt is ($t > 2$). Als er nog stikstof aanwezig is in het systeem beschrijft dit model de substraatafname minder goed. De invloed van de Monod-kinetiek op groei is dan merkbaar. De volgende waarden zijn voor M en k_2 gevonden (zie tabel 5-2):

Tabel 5-2: Maintenance-coëfficiënt M en deactiveringsconstante k_2 bepaald met het twee-fasen-model voor een reincultuur *Hyphomicrobium* GJ21.

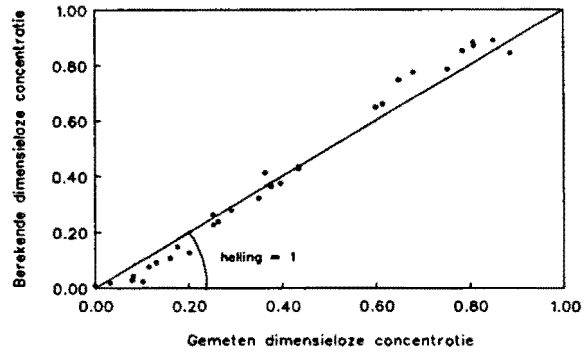
N/C	$\frac{S_{(N=0)} - S_0}{S_0}$	$t_{(N=0)}$ dag	t_e dag	M $\frac{gDCM}{gDS \cdot dag}$	k_2 dag ⁻¹
0.031	0.69	1.41	3.90	8.1	0.65
0.021	0.80	1.26	7.50	7.7	0.42
0.015	0.86	1.13	18.0	4.65	0.17
0.013	0.88	1.08	28.0	3.50	0.11

De optimale waarden zijn gevonden door twee fit-criteria aan te nemen.

- 1 Als geldt $t = t_{(N=0)}$, dan moeten vergelijking 5-6 en 5-12 aan elkaar gelijk zijn waarbij de optimale waarde voor de maintenance-coëfficiënt en de deactiveringsconstante worden ingevuld in vergelijking 5-12.
- 2 De concentraties berekend met vergelijking 5-12 moeten met de gemeten substraatconcentraties optimaal overeenkomen. In figuur 5-9 zijn deze waarden tegen elkaar uitgezet. Als de helling van de lijn in deze grafiek gelijk is aan 1 dan is de optimale combinatie tussen M en k_2 gevonden.

Figuur 5-9 :

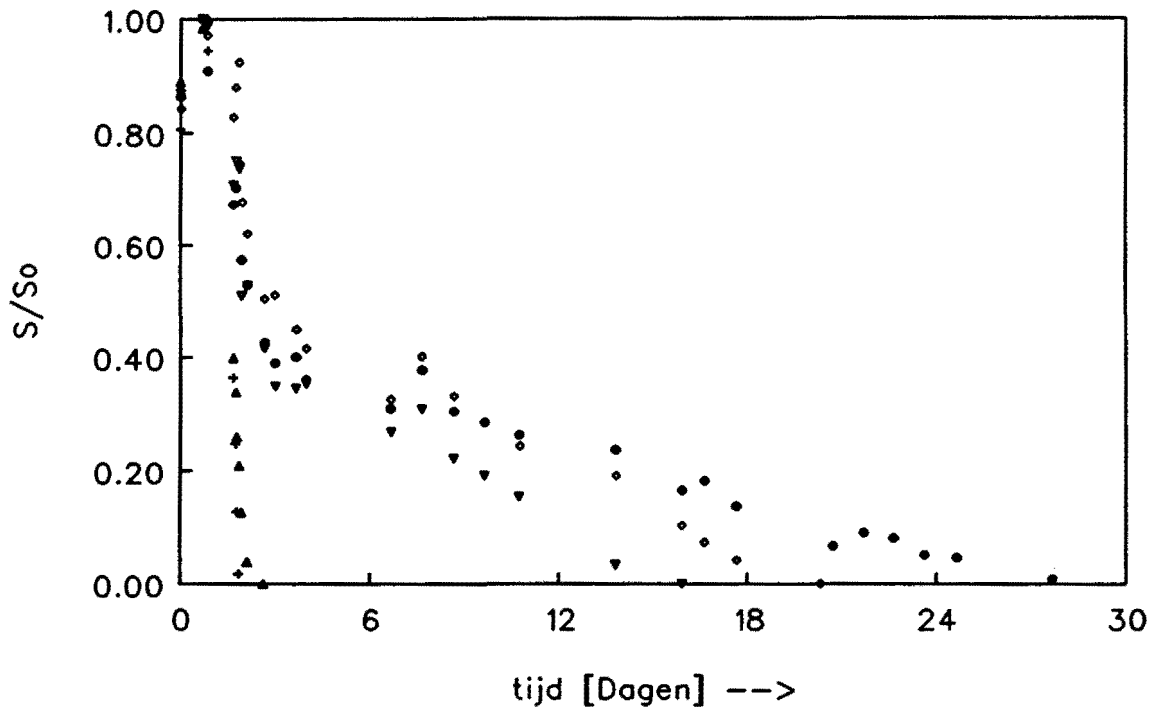
De berekende substraat-concentratie versus de gemeten substraat-concentratie voor het experiment met $N/C=0.013$



Het blijkt dat de deactiveringsconstante k_2 daalt bij afnemende stikstofconcentratie; verder blijkt ook de maintenance-coëfficiënt af te nemen.

De afname van k_2 en M bij dalende stikstofconcentratie kan worden verklaard door afname van activiteit van de micro-organismen aan te nemen. De micro-organismen zijn in staat de metabolismen gedurende het experiment aan te passen aan de veranderende omstandigheden. Dit proces wordt adaptatie genoemd. Hyphomicrobium is namelijk een oligotroof organisme dat in staat is onder gebrekkige voedingsomstandigheden te overleven [10,13,22].

De experimenten met de kolomcultuur *Hyphomicrobium* zijn op gelijke wijze verwerkt. In figuur 5-10 worden de gemeten dimensieloze substraatconcentraties uitgezet tegen de tijd.



+ : N/C = 0.215 ▼ : N/C = 0.021 ◇ : N/C = 0.010
 ▲ : N/C = 0.051 • : N/C = 0.015

Figuur 5-10:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd van een kolomcultuur *Hyphomicrobium* bij 5 verschillende stikstof-koolstof-verhoudingen bij $T=300$ K en $pH_{(t=0)}=7.6$.

Voor het experiment met $N/C=0.215$ geldt ongelimiteerde groei. Het verloop van de substraatconcentratie kan worden beschreven met vergelijking 5-6. Voor de constanten is gevonden:

$$\begin{aligned} \mu_{\max} &= 2.61 \text{ dag}^{-1} && \text{met een standaard deviatie van } 28\% \\ t_e &= 1.85 \text{ dag} && \text{met een standaard deviatie van } 2\% \end{aligned}$$

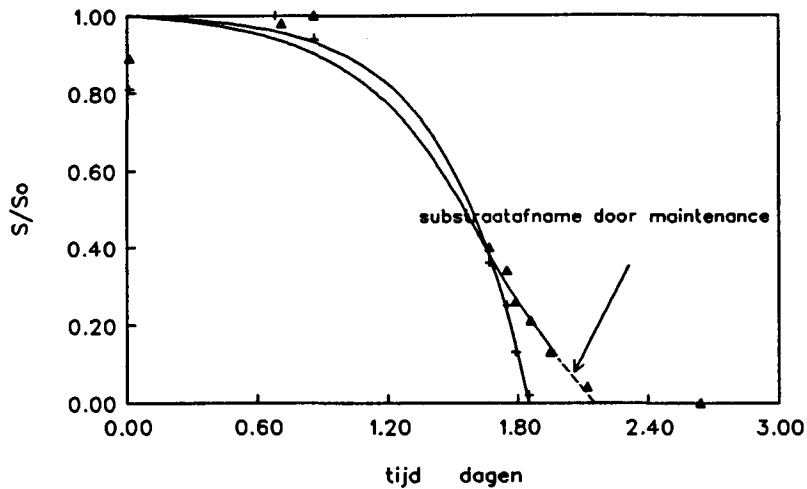
De substraatafname bij de experimenten met lagere stikstofconcentraties wordt goed beschreven met de vergelijkingen 5-3, 5-4 en 5-5 als $t < 2$ dagen.

In figuur 5-11 en 5-12 zijn de experimenteel bepaalde en de berekende dimensieloze concentraties uitgezet tegen de tijd. De gevonden waarden voor de Monod-constante K_M en de maintenance-coëfficiënt M zijn opgenomen in tabel 5-3.

Tabel 5-3: Monod-constante K_M en maintenance-coëfficiënt M voor een kolomcultuur *Hyphomicrobium*.

N/C molN/molC	K_M $\mu\text{molN/l}$	M gDCM/(gDS*dag)
0.051	5.6	9.6
0.021	5.6	7.2
0.015	5.6	9.6
0.010 *	11.1 *	7.2 *
gemiddelde waarde	5.6	8.9

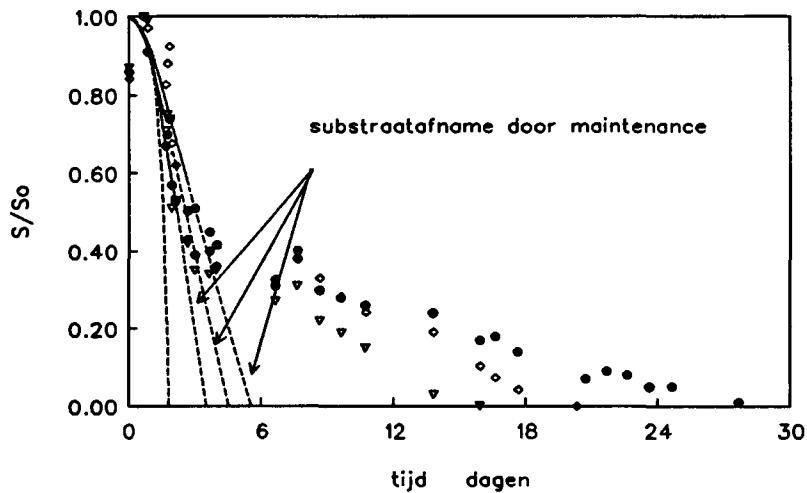
* Daar het verloop van de substraatconcentratie tegen de tijd voor het experiment $N/C=0.010$ een afwijkend gedrag vertoond, ten opzichte van de andere experimenten, worden de verkregen waarden niet in de bepaling van de gemiddelde Monod-constante en maintenance-coëfficiënt meegenomen.



+ : N/C = 0.215 ▲ : N/C = 0.051

Figuur 5-11:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd voor experimenten met N/C-verhouding van 0.215 en 0.051 voor een kolomcultuur Hyphomicrobium. Experimentele data en berekende waarden via vergelijking 5-3, 5-4 en 5-5.



▽ : N/C = 0.021 • : N/C = 0.015 ◇ : N/C = 0.010

Figuur 5-12:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd voor experimenten met een N/C-verhouding van 0.021, 0.015 en 0.010 voor een kolomcultuur Hyphomicrobium. Experimentele data en berekende waarden via vergelijking 5-3, 5-4 en 5-5.

Als alle stikstof verbruikt is wordt de substraatconcentratie beschreven met het twee-fasen-model. In figuur 5-13 en 5-14 worden de gemeten substraatconcentraties met de berekende waarden uitgezet tegen de tijd en vergeleken.

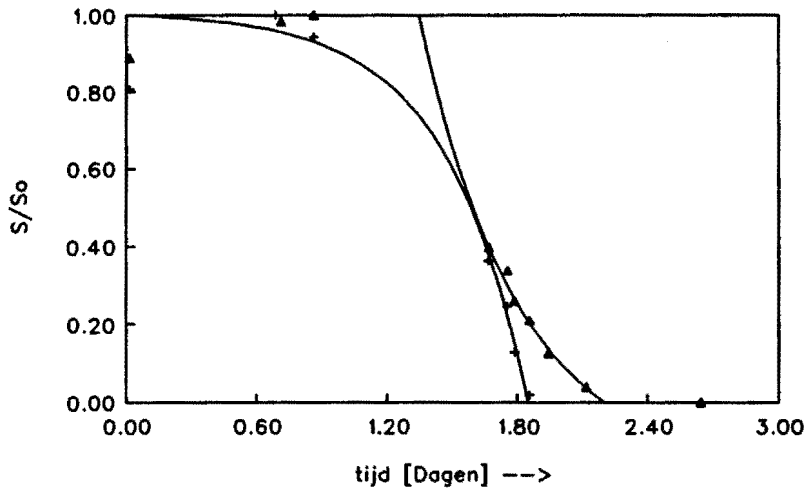
Het twee-fasen-model beschrijft de substraatafname goed als $N=0$. De overgang tussen groei en afsterving wordt door dit model minder goed beschreven.

In onderstaande tabel worden de gevonden constanten gegeven.
(tabel 5-4)

Tabel 5-4: De maintenace-coëfficiënt M en de deactiveringsconstante k_2 bepaald met het twee-fasen-model voor een kolomcultuur *Hyphomicrobium*.

N/C	$\frac{S_{(N=0)}}{S_0}$	$t_{(N=0)}$ dag	t_e dag	$M \frac{gDCM}{gDS \cdot dag}$	k_2 dag ⁻¹
0.051	0.49	1.59	2.20	13.60	2.20
0.021	0.80	1.25	18.0	5.90	0.33
0.015	0.86	1.12	28.0	6.25	0.23
0.010	0.90	1.00	20.0	8.10	0.21

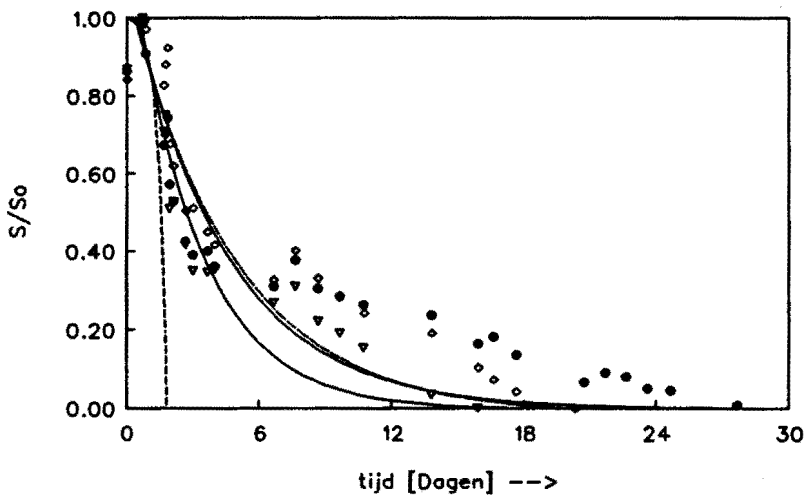
Ook in de beschrijving van de kolomcultuur dalen de maintenace-coëfficiënt M en de deactiveringsconstante k_2 bij afnemende stikstofconcentratie.



+ : $N/C = 0.215$ ▲ : $N/C = 0.051$

Figuur 5-13:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd voor een kolomcultuur *Hyphomicrobium* voor $N/C = 0.215$ en 0.051 . Experimentele data en vergelijking 5-6 en 5-12.



▽ : $N/C = 0.021$ • : $N/C = 0.015$ ◇ : $N/C = 0.010$

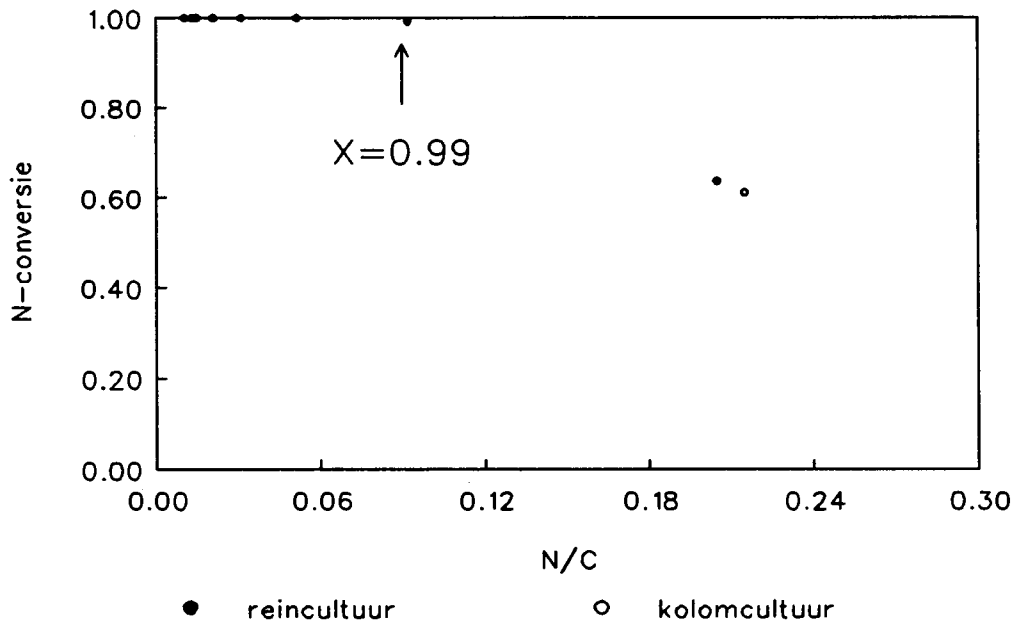
Figuur 5-14:

Dimensieloze substraatconcentratie tegen de tijd voor een kolomcultuur *Hyphomicrobium* voor $N/C = 0.021$, 0.015 en 0.010 . Experimentele data en vergelijking 5-6 en 5-12.

Bij grote N/C-verhoudingen zal geen groeilimitatie optreden door overmaat aan stikstof. De groeisnelheid is dan gelijk aan de maximale microbiële groeisnelheid. Dit blijkt overeen te komen met resultaten uit eerdere experimenten [8].

Het blijkt dat de Monod-constante K_m en de maintenance-coëfficiënt M bepaald, met vergelijking 5-3 5-4 en 5-5, voor beide cultures overeenkomen en dat de beschrijving van de substraatafname met dit model slechts voor de eerste 2 dagen mogelijk is. Het twee-fasen-model beschrijft voor beide cultures de substraatafname goed voor $t > 2$. Ook blijkt voor beide cultures dat de maintenance-coëfficiënt M en de deactiveringsconstante k_2 bepaald met het twee-fasen-model dalen bij afnemende stikstofconcentratie in het systeem.

Van de monsters zijn ook de ammoniumconcentraties in de suspensie bepaald nadat alle substraat is afgebroken. De stikstofconversie is uitgezet tegen de N/C-verhouding. Voor beide cultures zijn de gevonden conversies opgenomen in figuur 5-15.



Figuur 5-15:

Stikstof-conversie versus N/C-verhouding voor reincultuur GJ21 en kolomcultuur Hyphomicrobium.

Bij lage N/C-verhouding is de stikstof-conversie gelijk aan 1. Er treedt dan gelimiteerde groei op. Bij de $N/C = 0.094$ is de conversie gelijk aan 0.99. De substraatafbraaksnelheid lijkt dan optimaal te verlopen, hoewel de groeisnelheid iets schijnt te dalen. (zie figuur 5-16)

Figuur 5-16:

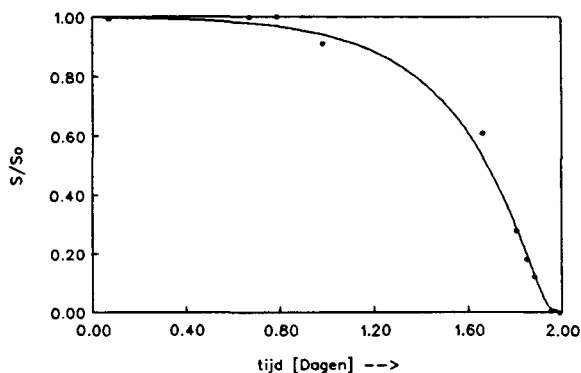
Groei-curve reincultuur

Hyphomicrobium GJ21

bij $N/C = 0.094$

$\mu_{\max} = 2.28 \text{ dag}^{-1}$ s.d. 20%

$t_e = 1.91 \text{ dag}$ s.d. 1%



De gevonden N/C -verhouding komt nagenoeg overeen met de theoretische N/C -verhouding in de biomassa ($N/C = 0.12$), die nodig is voor optimale groei. Er geldt namelijk voor de theoretische N/C -verhouding:

$$\frac{N_{(\text{ammonium})}}{C_{(\text{DCM})}} = \frac{N_{(\text{biomassa})}}{C_{(\text{biomassa})}} * \frac{Y_S \text{ (molB/molDCM)}}{Y_N \text{ (molB/molN)}} = 0.2 * \frac{0.6}{1} = 0.12 \quad (5-13)$$

Bij $N/C > 0.1$ is de ammoniumconversie kleiner dan 1 en treedt er geen groeibelemming op. De micro-organismen kunnen zich dan optimaal ontwikkelen

De N/C -verhouding die is toegepast in operationele biotricklingfilter ($4 \text{ g}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{l}$ tegen $1.5 \text{ g DCM}/\text{m}^3_{\text{kolomvolume}}$) lijkt geen belemmeringen op te leveren ten aanzien van ongelimiteerde groei van micro-organismen door stikstof.

5.4 Conclusies

Bij overmaat stikstof treedt geen groeilimitatie op en de aanwezige stikstof wordt niet helemaal gebruikt voor biomassa-productie.

Rond $N/C = 0.09$ is alle ammonium in oplossing verbruikt voor biomassa-productie en lijkt de groeisnelheid te dalen. Deze N/C-verhouding komt nagenoeg overeen met de verhouding die theoretisch minstens aanwezig moet zijn om optimaal biomassa te kunnen aanmaken.

Bij dalende N/C-verhouding zal Monod-kinetiek voor groei gaan gelden en tevens zal de invloed van maintenance merkbaar worden bij substraatafbraak. Het model van Pirt geldt dan.

Als alle stikstof verbruikt is, zal substraatafname worden veroorzaakt door maintenance. De substraatafnamesnelheid kan daarbij dalen door afsterving van micro-organismen.

Het twee-fasen-model geeft een redelijk goede beschrijving van de substraatafname. In de eerste fase treedt substraatafname op door groei van micro-organismen. In de tweede fase treedt substraatafname op veroorzaakt door maintenance van micro-organismen. De daling in activiteit van de suspensie wordt verklaard door afsterving van micro-organismen.

Zowel de maintenance-coëfficiënt M als de deactiveringsconstante k_2 , bepaald met het twee-fasen-model, dalen bij afnemende stikstofconcentratie. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door adaptatie van micro-organismen.

De reïncultuur GJ21 en de kolomcultuur *Hyphomicrobium* komen nagenoeg overeen in groeigedrag onder zowel stikstof gelimiteerde als ongelimiteerde condities. Eventuele infecties van de reïncultuur hebben blijkbaar weinig invloed op de groeikinetiek.

6 Algemene conclusies

De volgende conclusies kunnen uit dit onderzoek worden getrokken.

- * De groeikinetiek van het micro-organisme *Hyphomicrobium* bij dichloormethaan-afbraak kan goed worden beschreven door het Monod-model.
- * Voor de groei van het micro-organisme *Hyphomicrobium* op dichloormethaan in een operationeel biotricklingfilter mag nulde-orde groeikinetiek worden aangenomen.
- * Als limitatie van stikstof optreedt in het leefmilieu van de micro-organismen, mag maintenance niet worden verwaarloosd. Het model van Pirt beschrijft dan de substraatafname.
- * Bij afwezigheid van dichloormethaan en stikstof zullen actieve micro-organismen deactiveren volgens een eerste orde proces.
- * Bij langdurige afwezigheid van dichloormethaan zullen de micro-organismen vertraagd deactiveren. Dit wordt wellicht veroorzaakt door verborgen groei.
- * Met het twee-fasen-model kan de substraatafbraak door micro-organismen bij langdurige afwezigheid van stikstof goed worden beschreven.

- * Bij langdurige afwezigheid van stikstof zullen de micro-organismen hun metabolismen aanpassen aan de veranderde omstandigheden (adaptatie) waardoor de deactiveringsconstante en de maintenance-coëfficiënt, bepaald met het twee-fasen-model, in de tijd zullen afnemen.

- * Eventuele infecties van de Hyphomicrobium reïncultuur GJ21 hebben geen of weinig invloed op de microkinetiek van de micro-organismen.

7 Symbolenlijst

a	=	specifiek benat oppervlak	m^2/m^3
d	=	karakteristieke afstand tussen pakkingsdeeltjes	m
h	=	kolomhoogte	m
k_0	=	nulde orde reactiesnelheids- constante	$g/(m^3 \cdot h)$
k_2	=	deactiveringsconstante	dag^{-1}
m	=	verdelingscoëfficiënt	-
r_s	=	substraatafnamesnelheid	$molDCM/(l \cdot h)$
r_N	=	stikstofafnamesnelheid	$molN/(l \cdot h)$
t	=	tijd	h
$t_{(N=0)}$	=	tijd als $N=0$	h
t_e	=	eindtijd als $S=0$	h
v	=	substraatafbraaksnelheid	$molDCM/(l \cdot h)$
v_0	=	substraatafbraaksnelheid op $t=0$	$molDCM/(l \cdot h)$
v_{afname}	=	afnamesnelheid van de dikte van de niet actieve zone in een biolaag	m/h
v_g	=	gassnelheid in een biotrickling- filter	m/h
v_{groei}	=	groeisnelheid van de dikte van de actieve zone in een biolaag	m/h
v_l	=	vloeistofsnelheid in een biotricklingfilter	m/h
C	=	grensvlakconcentratie	$molDCM/l$
C_g	=	substraatconcentratie in de gasfase	$molDCM/l$
$C_{g(in)}$	=	ingangs-gasconcentratie van een biotricklingfilter	$gDCM/m^3$
C_l	=	substraatconcentratie in de vloeistoffase	$molDCM/l$
C_{NaCl}	=	natriumchloride-concentratie in een biotricklingfilter	$molNaCl/l$
D	=	diffusiecoëfficiënt	m/h
EC	=	eliminatie-capaciteit	$gDCM/h \cdot m^3_{kolom}$
EC_{max}	=	maximale eliminatie-capaciteit	$gDCM/h \cdot m^3_{kolom}$

K, K_w	=	constanten	
K_2	=	1 ^{ste} -orde Thiele-modulus	m^{-1}
K_3	=	reciproce Monod-constante	l/molDCM
K_N	=	Monod-constante voor stikstof	molN/l
K_{obs}	=	$(X_o * \mu_{max}) / (Y * S_o)$	
	=	gemeten reactiesnelheidsconstante	dag ⁻¹
K_s	=	Monod-constante voor substraat	molDCM/l
M	=	maintenance-constante	mol/(h*gDS)
N	=	stikstofconcentratie	molN/l
N_o	=	begin stikstofconcentratie	molN/l
N^*	=	substraatfluxsnelheid	mol/(m ² *h)
N_{max}^*	=	maximale substraatfluxsnelheid	mol/(m ² *h)
O.D.	=	optische dichtheid	-
Q_o	=	hoeveelheid toegevoegd substraat	molDCM
R	=	gasconstante	atm/(mol*K)
S	=	substraatconcentratie	molDCM/l
S_o	=	substraatconcentratie op t=0	molDCM/l
S_2	=	substraatconcentratie als N=0	molDCM/l
S_l	=	substraatconcentratie in de vloeistoffase	molDCM/l
$S_{min}(l)$	=	minimale substraatconcentratie in de vloeistoffase	molDCM/l
$S_{(N=0)}$	=	substraatconcentratie als N=0	molDCM/l
T	=	temperatuur	K
V_g	=	gasvolume	l
V_l	=	vloeistofvolume	l
V_{totaal}	=	$V_g + V_l$	l
X	=	biomassaconcentratie	gDS/l
X_{max}	=	maximale biomassaconcentratie	gDS/l
X_o	=	biomassaconcentratie op t=0	gDS/l
Y_s	=	yield-coëfficiënt voor substraat	gDS/molDCM
Y_s^*	=	yield-coëfficiënt voor substraat, aangepast voor maintenance	gDS/molDCM
Y_N	=	yield-coëfficiënt voor stikstof	gDS/molN
α	=	relatieve entconcentratie	-
β	=	relatieve maintenance-coëfficiënt	-
δ	=	biolaagdikte	m

δ_{ev}	=	evenwichtsdikte biolaag	m
λ	=	dikte van de actieve zone van de biolaag	m
λ'	=	golflengte	nm
μ	=	microbiële groeisnelheid	dag ⁻¹
μ_{max}	=	maximale microbiële groeisnelheid	dag ⁻¹
ρ_b	=	dichtheid biomassa	g/m ³
τ	=	minimale tijd waarin een biotrickling filter kan dichtgroeien	h
v_N	=	stoichiometrische koolstof-stikstof verhouding in de biomassa	-
Λ	=	effectiviteitsfactor	-

8 Literatuurlijst

- 1 Atkinson B., Davies I.J : The overall rate of substrate uptake (reaction) by microbial films; part I - a biological rate equation; Trans. Instn. Chem. Engrs. Vol 52,1974 (248-258)
- 2 Bruin de B. : De invloed van aceton op de biologische verwijdering van DCM in een biotricklingfilter; Eindhoven augustus 1991, afstudeerverslag TUE
- 3 Buck H.M., Ottengraf S.P.P. : Inleiding in de biotechnologie; diktaat TUE (nr 6739)
- 4 Diks R.M.M., Ottengraf S.P.P. : Verwijdering van toxische stoffen en recalcitrante componenten uit industriële afgassen m.b.v een Bio-Trickling-Filter ; Interim Rapportage (juni 1991)
- 5 Dokter T. : Terugwinning van Chloor-Fluor-Koolwaterstoffen (CFK's) en Fluor-Chloor-koolwaterstoffen (FCKW's); symposiumbundel: Recycling van chemische afvalstoffen, Winstgevend of pure noodzaak, Technologische studievereniging Jan Pieter Minckelers, Technische Universiteit Eindhoven 3 mei 1990
- 6 Gooijer M. : De ontwikkeling van een biolaag in een biotricklingfilter voor de afbraak van dichloormethaan. Eindhoven, november 1990 afstudeerverslag T.U.E.
- 7 Gielen D.J. : De invloed van NaCl op de afbraak van dichloormethaan in een Biotricklingfilter. Eindhoven, augustus 1990, afstudeerverslag TUE
- 8 Graumans. A. : Invloed van het stikstofaanbod op de afbraaksnelheid van dichloormethaan door Hyphomicrobium Sp. Eindhoven, februari 1990, afstudeerverslag H.L.O..

- 9 Hillmann P. : De microbiologische oxidatie van 1,2-dichloormethaan; Eindhoven, augustus 1989, afstudeerverslag T.U.E.
- 10 Koch A.L. : Microbial Growth in low concentrations of nutrients; Strategies of microbial life in extreme environments ed. M. Shilo pp. 261-279 Berlin: Dahlem konferenzen 1979
- 11 Laat de P.A.G. : De dynamische aspecten van de biologische oxidatie van dichloormethaan in een biotricklingfilter; Eindhoven, juni 1989, afstudeerverslag.
- 12 Monod J. : The growth of bacterial cultures; Annual review of microbiology 1949 pp.371-394
- 13 Morita R.Y. : Starvation-survival of heterotrophs in the marine environment; Advances in microbiol Ecology 6, 171-198 (1982).
- 14 Ottengraf S.P.P. : Inleiding tot de microbiologie; diktaat T.U.E. (nr 6600)
- 15 Postgate J.R., Hunter J.R. : The survival of starved bacteria; Journal of general microbiology (1962), 29, 233-263.
- 16 Rehm H.J., Reed G. : Biotechnology Volume 1: Microbial fundamentals. Weinheim (1981) ISBN 3-527-25763-2
- 17 Rehm H.J., Reed G. : Biotechnology Volume 8: Microbial degradation. Weinheim (1986) ISBN 3-527-25770-5

- 18 Rittmann B.E., McCarty P.L. : Model of steady-state-biofilm kinetics; Biotechnology and bioengineering, Vol. XXII, Pp 2343-2357 (1980)
- 19 Rittmann B.E., McCarty P.L. : Evaluation of steady-state-biofilm kinetics; Biotechnology and Bioengineering, Vol XXII, Pp. 2359-2373 (1980)
- 20 Roszak D.B., Colwell R.R. : Survival of bacteria in the natural environment; Microbiological Reviews, sept.1987, p 365-379
- 21 Slooff W. : Dichloormethaan; ontwerp basisdocument rapport nr. 758473002, RIVM juni 1987
- 22 Smidt M.P. : Oligotrofie, Leven in een leeg huis; Colloquium verslag mei 1991, Groningen.

B-1: Gebruikte apparatuur

Fotospectrometer	* LKB biochem Novaspec II
Gethermostreerde schudmachine	* Beun-de Ronde, 3528-1 microprocessor met koeling
Niet gethermostreerde schudmachine	* merk onbekend toerental 120 rpm
Gaschromatograaf	* Carlo Erba Strumentazione GC 6000 Vega series, ICM 6000 kolom : PEG30, 30% PEG op chromosor l=2.5m T _{injectie} : 180°C T _{detector} : 180°C T _{oven} : 160°C
Gasinjectiespuit	* Hamilton Co Reno Nevada gastight # 1825, 0.25ml
Vloeistofinjectiespuiten	* Scientific Glass engineering PTY-CTD, Victoria Australia, 5 µl, 10 µl, 25 µl, 100 µl * HSW Inaltera Syra, 10 ml
pH-meter	* Radiometer Kopenhagen, Acid-base analyser PHM71 * Radiometer Kopenhagen, titrator analyser TTTIC
pH-electrode	* Radiometer Kopenhagen GK250IC combined pH-electrode
Geleidbaarheidsmeter	* Philips PR 9501
Geleidbaarheidselectrode	* Philips conductieve cel PW 9550/60
Glasfilter	* Schleicher & Schuell No 6 Glasfaserrundfilter
SAS	* SAS Institute Inc. Cary. NC 27512.8000 USA; Proprietary software release 6.03

B-2 Samenstelling standaard Groningen-medium

Er wordt gebruik gemaakt van 3 stokoplossingen voor de bereiding van het Groningen-medium.

De samenstelling

Oplossing A: 100 ml (A)/1 Groningen-medium

in 2.5 l gedestilleerd water

34 g	KH_2PO_4	=>	1.36 g/l
66.7 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	=>	2.67 g/l

Oplossing B: 10 ml (B)/1

in 2.5 l gedestilleerd water

125 g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	=>	0.5 g/l
50 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	=>	0.2 g/l

Oplossing C: 1 ml (C)/1

in 2 l gedestilleerd water

5300 mg	CaCl_2	=>	2.65 mg/l
2000 mg	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	=>	1.00 mg/l
100 mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	=>	0.05 mg/l
100 mg	H_3BO_3	=>	0.05 mg/l
100 mg	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	=>	0.05 mg/l
2.5 mg	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	=>	0.0013 mg/l
30 mg	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	=>	0.015 mg/l
20 mg	$\text{N}_2\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	=>	0.010 mg/l

B-3 Samenstelling aangepast Groningen-medium

Er wordt gebruik gemaakt van 2 stokoplossingen voor de bereiding van de monsters.

De samenstellingen:

Aangepast Groningen-medium 100 ml/l => Groningen-medium

in 2.5 l gedestilleerd water

34	g	KH_2PO_4	=>	1.36 g/l
66.7	g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	=>	2.67 g/l
5.0	g	$\text{MgSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	=>	0.2 g/l
25	ml	stokoplossing C van standaard Groningen-medium		
		Samenstelling zie B-2		

Ammoniumsulfaat-stokoplossing

in 2.5 l gedestilleerd water

0.3387	g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	=>	0.14 g/l
			=>	1.03 mM

B-4 Afleiding twee-fasen-model

Deel 1 : voor $0 < t < t_{(N=0)}$:

Voor de substraatafbraaksnelheid geldt de Monod-vergelijking :

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y_S} * \frac{S}{K_S+S} * \frac{N}{K_N+N} * X + M * X \quad (5-3)$$

met :

- S = substraatconcentratie (molDCM/l)
- N = stikstofconcentratie (molN/l)
- μ_{\max} = maximale microbiële groeisnelheid (dag⁻¹)
- Y_S = yield-coëfficiënt (gds/mol)
- M = maintenance coefficient (mol/(gds*dag))
- t = tijd (dag)
- K_S = Monod-constante voor dichloormethaan (molDCM/l)
- K_N = Monod-constante voor stikstof (molN/l)

Als $K_S \ll S$ en $K_N \ll N$ dan kan vergelijking 5-3 vereenvoudigd worden tot:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y_S} * X + M * X \quad (B-4-1)$$

Voor de groeisnelheid van micro-organismen geldt :

$$\frac{dX}{dt} = \mu * X \quad (5-5)$$

Met X = biomassa concentratie (gDS/l)
 μ = microbiële groeisnelheid (dag⁻¹)

Na integratie volgt:

[randvoorwaarden : $t = 0 \Rightarrow X = X_0$]

met $\mu = \mu_{\max}$ als $K_S \ll S$ en $K_N \ll N$

$$X = X_0 * e^{(\mu_{\max} * t)} \quad (4-1)$$

Vergelijking 4-1 ingevuld in vergelijking 5-3 geeft dan:

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{\mu_{\max}}{Y_S} + M \right) * X_o * e^{(\mu_{\max} * t)} \quad (\text{B-4-2})$$

Na integratie volgt :

[randvoorwaarden : $t = 0 \Rightarrow S = S_o$]

$$S - S_o = - \left(\frac{\mu_{\max}}{Y_S} + M \right) * \frac{X_o}{\mu_{\max}} * (e^{(\mu_{\max} * t)} - 1) \quad (\text{B-4-3})$$

Dimensieloos uitgedrukt:

$$\frac{S}{S_o} = 1 - \alpha * \beta * (e^{(\mu_{\max} * t)} - 1) \quad (\text{B-4-4})$$

met: $\alpha =$ relatieve entconcentratie = $\frac{X_o}{Y_S * S_o}$
 $\beta =$ relatieve maintenance-coëfficiënt = $1 + \frac{M + Y_S}{\mu_{\max}}$

Als geldt: $t = t_e \Rightarrow S = 0$ dan volgt voor vergelijking B-4-5:

$$0 = 1 - \alpha * \beta * (e^{(\mu_{\max} * t_e)} - 1) \quad (\text{B-4-5})$$

dan volgt voor $\alpha * \beta$:

$$\frac{1}{(\alpha * \beta)} = e^{(\mu_{\max} * t_e)} - 1 \quad (\text{B-4-6})$$

Vergelijking B-4-5 kan dan worden geschreven als:

$$\frac{S}{S_o} = 1 - \frac{(e^{(\mu_{\max} * t)} - 1)}{(e^{(\mu_{\max} * t_e)} - 1)} \quad (\text{5-6})$$

Met vergelijking 5-6 kan eenvoudig de maximale groeisnelheid worden bepaald als de substraatafbraak tegen de tijd wordt gemeten.

Deel 2 : voor $t_{(N=0)} < t < t_e$:

Voor de substraatafbraak geldt nu :

$$-\frac{dS}{dt} = M * X \quad (5-7)$$

met M = maintenance-coëfficiënt bepaald bij twee-fasen-model ($gDCM/(gDS*h)$)

Omdat er geen groei optreedt valt de eerste term, ten opzichte van vergelijking 5-3, weg.

De groei gaat over in deactivering van micro-organismen.

$$-\frac{dX}{dt} = k_2 * X \quad (5-8)$$

met: k_2 = deactiveringsconstante (dag^{-1})

Na integratie volgt:

[randvoorwaarden : $t = t_{(N=0)} \Rightarrow X = X_{max}$]

$$X = X_{max} * e^{-k_2 * (t - t_{(N=0)})} \quad (5-9)$$

Met X_{max} = biomassa-concentratie op $t=t_{(N=0)}$ (gds/l)

Voor X_{max} kan worden geschreven:

$$X_{max} = X_0 * e^{(\mu_{max} * t_{(N=0)})} \quad (5-11)$$

Hierbij wordt aangenomen dat er voor $t_{(N=0)}$ slechts groei optreedt van bacteriën en na $t_{(N=0)}$ alleen afsterving.

Vergelijking 5-9 gaat dan over in:

$$X = X_0 * e^{(\mu_{max} * t_{(N=0)})} * e^{-k_2 * (t - t_{(N=0)})} \quad (B-4-7)$$

Voor de substraatafbraak kan dan worden geschreven:

$$-\frac{dS}{dt} = M \cdot X = M \cdot X_{\max} \cdot e^{-k_2(t-t_{(N=0)})} \quad (\text{B-4-8})$$

Na integratie volgt:

[randvoorwaarden : $t = t_{(N=0)} \Rightarrow S = S_{(N=0)}$]

$$S - S_{(N=0)} = \frac{M \cdot X_{\max}}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_{(N=0)})} - 1) + K \quad (\text{B-4-9})$$

Dimensieloos ziet deze vergelijking er als volgt uit:

$$\frac{S}{S_{(N=0)}} = 1 + \frac{M \cdot X_{\max}}{k_2 \cdot S_{(N=0)}} \cdot (e^{-k_2(t-t_{(N=0)})} - 1) + K^* \quad (\text{B-4-10})$$

Als $t = t_e$ geldt $S = 0$ volgt:

$$K^* = -\frac{X_{\max}}{k_2 \cdot S_{(N=0)}} \cdot (e^{-k_2(t-t_{(N=0)})} - 1) - 1 \quad (\text{B-4-11})$$

Dan volgt:

$$\frac{S}{S_{(N=0)}} = \frac{M \cdot X_{\max}}{k_2 \cdot S_{(N=0)}} \cdot (e^{-k_2(t-t_{(N=0)})} - e^{-k_2(t_e-t_{(N=0)})}) \quad (\text{B-4-12})$$

Voor $S_{(N=0)}$ kan worden geschreven:

$$S_{(N=0)} = S_o \cdot \left(1 - \frac{e^{-\mu_{\max} \cdot t_{(N=0)}} - 1}{e^{-\mu_{\max} \cdot t_e} - 1} \right) \quad (\text{B-4-13})$$

Dan volgt voor de substraatafbraak:

$$\frac{S}{S_o} = \frac{M \cdot X_o \cdot e^{\mu_{\max} \cdot t_{(N=0)}}}{k_2 \cdot S_o} \cdot (e^{-k_2(t-t_{(N=0)})} - e^{-k_2(t_e-t_{(N=0)})}) \quad (\text{5-12})$$