

EEN SIMULATIE MODEL VOOR DE DENITRIFICATIE VAN NO₃ TOT N₂

VIA DE INTERMEDIAIREN NO₂ EN N₂O

Jos Reijerink

Intern Rapport no. 15

Vakgroep Theoretische Teeltkunde
Landbouwhogeschool Wageningen

List of Internal Reports of Department of Theoretical Production Ecology:

No:

- 1 D. Barél, F. van Egmond, C. de Jonge, M.J.Frissel, M. Leistra, C.T. de Wit. 1969. Simulatie van de diffusie in lineaire, cilindrische en sferische systemen. Werkgroep: Simulatie van transport in grond en plant.
- 2 L. Evangelisti and R. van der Weert. 1971. A simulation model for transpiration of crops.
- 3 J.R. Lambert and F.W.T. Penning de Vries. 1973. Dynamics of water in the soil-plant-atmosphere system: a model named TROIKA.
- 4 M. Tollenaar. 1971. De fotosynthetische capaciteit.
- 4a J.N.M. Stricker. 1971. Berekening van de wortellengte per cm³ grond.
- 5 L Stroosnijder en H. van Keulen. 1972. Waterbeweging naar de plantenwortel.
- 6 Th.J.M. Blom and S.R. Troelstra. 1972. A simulation model of the combined transport of water and heat produced by a thermal gradient in porous media.
- 7a F.W.T. Penning de Vries and H.H. van Laar. 1972. Products and requirements of synthetic processes. Listing of the model and some test runs.
- 7b F.W.T. Penning de Vries and H.H. van Laar. 1973. Products, requirements and efficiency of biosynthesis. Listing of the model and some test runs.
- 8 M. Arbab. 1972. A CSMP-program for computing Thornthwaite's classification of climate.
- 9 P. A. Leffelaar. 1977. A theoretical approach to calculate the anaerobic volume fraction in aerated soil in view of denitrification.
- 10 L. van Loon and H. Wösten. 1979. A model to simulate evaporation of bare soils in arid regions.
- 11 C.J.T. Spitters. 1980. Simulating the vegetation dynamics in Sahelian pastures.
- 12 M. Buil. 1981. Een studie naar de invloed van een aantal diereigenschappen op de primaire en sekundaire productie in de Sahel.
- 13 D.J. Onstad. 1982. Application of dynamic programming techniques to optimize pest and disease control in winter wheat.
- 14 P. van de Sanden. 1982. Langgolvige hemelstraling te Niamey.

EEN SIMULATIE MODEL VOOR DE DENITRIFICATIE VAN NO₃ TOT N₂
VIA DE INTERMEDIAIREN NO₂ EN N₂O

Jos Reijerink

augustus 1985

6-maands doctoraal vak Theoretische Teeltkunde

Begeleider: Ir. P.A. Leffelaar

INHOUDSOPGAVE

1	INLEIDING	5
1.1	PROBLEEMSTELLING	5
1.2	DOEL VAN HET ONDERZOEK	6
2	LITERATUUR OVERZICHT	9
2.1	INLEIDING	9
2.2	HET DENITRIFICATIEPROCES	10
2.2.1	Denitrificerende Bacterien	10
2.2.2	Het Denitrificatie Pad	14
2.2.2.1	De Reduktie Van Nitraat Tot Nitriet	15
2.2.2.2	N ₂ O Produktie T.g.v. Denitrificatie	16
2.2.2.3	Chemodenitrificatie	17
2.2.2.4	N ₂ O Produktie T.g.v. Nitrificatie	18
2.3	DENITRIFICATIE KINETIEK	20
2.3.1	Nitraat Als Limiterende Factor Voor Denitrificatie	20
2.3.2	Nitraat En Koolstof Als Limiterende Factoren	23
2.3.3	Model Van Cho & Mills (1979)	26
2.4	CONCLUSIES	27
3	DENITRIFICATIE MODEL	29
3.1	INLEIDING	29
3.2	DE PIRT VERGELIJKING	31
3.3	DE MICHAELIS MENTEN VERGELIJKING	34
3.3.1	Een Groeibeperkende Factor	34
3.3.2	Competitieve Michaelis-Menten Vgl.	36
3.4	TOEPASSING VAN DE VERGELIJKINGEN IN HET SIMULATIEMODEL	41
3.4.1	Anaerobe Omstandigheden	41
3.4.1.1	De Berekening Van R In Vergelijking (3.19)	41
3.4.1.2	Groeisnelheid Van De Biomassa	44
3.4.2	Groei Van De Biomassa	44
3.5	DENITRIFICATIE MODEL	45

3.5.1	Inleiding	45
3.5.2	Model - Aeroob	47
3.5.2.1	Microbiële Groeisnelheid	48
3.5.2.2	O ₂ -verbruik En Gluconaat Verbruik	49
3.5.2.3	CO ₂ Produktiesnelheid	49
3.5.2.4	De Nitraatbalans	50
3.5.3	Model Anaeroob	52
3.5.4	Relatie Diagram	54
3.6	INITIELE WAARDEN EN PARAMETERWAARDEN	58
3.6.1	Initiele Waarden	58
3.6.2	Parameter Waarden	58
4	RESULTATEN	61
4.1	INLEIDING	61
4.2	RESULTATEN VAN DE STANDAARDSIMULATIE	62
4.2.1	Verloop Van De Hoeveelheid Biomassa	62
4.2.2	Concentratie Verloop Van De N Componenten	63
4.3	GEVOELIGHEIDS ANALYSE VOOR ENKELE PARAMETERS	65
4.3.1	Inleiding	65
4.3.2	De Gevoeligheid Van Het Model Voor TMPK	67
4.3.3	Gevoeligheid Voor IBIOCF	69
4.3.4	Gevoeligheid Van Het Model Voor De Initiele NO ₃ Conc.	69
4.3.5	Gevoeligheid Van Het Model Voor De Gluconaat Conc.	72
4.3.6	Conclusies	73
4.4	VERGELIJKING MET HET MODEL VAN BAAS	74
4.5	VERGELIJKING VAN SIMULATIE MET EXPERIMENT	76
4.5.1	Experimenten Van Cooper & Smith (1963)	77
4.5.1.1	Experimentele Resultaten	77
4.5.1.2	Simulatieresultaten	78
4.5.1.3	Conclusies	84
4.5.2	Experimenten Van Cho & Sakdinan (1978)	84
4.5.2.1	Experimentele Resultaten	84
4.5.2.2	Simulatie Resultaten	89
4.5.2.3	Conclusies	93
4.5.3	Experimenten Van Koike & Hattori (1975a)	93

5 CONCLUSIES EN DISCUSSIE 95

LITERATUUR 99

A COMPUTER PROGRAMMA VAN HET SIMULATIEMODEL

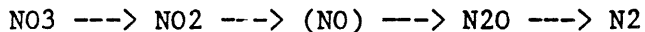
B FOR06.DAT FILES

C AFLEIDING VAN PARAMETER K2

SAMENVATTING

Een belangrijk deel (tot 30 %) van de stikstof gift aan gewassen kan verloren gaan t.g.v. denitrificatie. Tijdens dit onderzoek is een simulatie model opgesteld om inzicht te krijgen in het denitrificatie proces zodat door betere kennis van zaken meer gerichte maatregelen kunnen worden genomen om stikstof verliezen t.g.v. denitrificatie tegen te gaan.

Voor de groei en onderhoud van micro organismen is energie nodig, deze wordt verkregen via verbranding (dissimilatie) van organische stof. Hierbij komen elektronen vrij, die in de terminale ademhalingsketen worden opgenomen door zuurstof. Onder anaerobe omstandigheden is er echter geen zuurstof aanwezig en neemt bij denitrificerende bacterien NO_3 de rol van zuurstof over. NO_3 wordt hierbij gedenitrificeerd tot N_2 via een aantal denitrificatie stappen:



De rol van NO als obligaat intermediair tijdens de denitrificatie is omstreden en wordt daarom niet verder beschouwd.

Bij iedere denitrificatie stap worden elektronen opgenomen zodat naast NO_3 , ook NO_2 en N_2O als elektron acceptor optreden.

In het simulatie model is uitgegaan van een met waterverzadigd homogeen grondmonster, waarin strikt aerobe en facultatief anaerobe bacterien aanwezig zijn. Het grondmonster is een afgesloten systeem waarin geen aan- en afvoer van water, gassen en opgeloste stoffen plaatsvindt. Verder is als uitgangspunt genomen dat de stikstofbron uit NO_3 bestaat en de koolstofbron uit gluconaat. Enkele belangrijke aannamen in het model zijn:

- de relatieve groeisnelheid van de micro organismen kan volgens een enkele of een dubbele Michaelis-Menten vergelijking worden beschreven.
- het substraat verbruik en het elektron acceptor verbruik kan volgens de Pirt vergelijking worden beschreven.
- de mathematische formulering van de snelheden van de verschillende denitrificatie stappen is gebaseerd op competitieve Michaelis Menten kinetiek voor enzym gekatalyzeerde reacties.

Als de initiele zuurstof is uitgeput, wordt NO_3 gedenitrificeerd tot N_2 , waarbij tijdelijke ophoping van NO_2 en N_2O optreedt. Naast deze dissimilatie van NO_3 treedt er ook NO_3 assimilatie op, waarbij stikstof in celmateriaal wordt ingebouwd. In tegenstelling tot de facultatief anaerobe bacterien, stopt de groei van de strikt aerobe bacterien als de zuurstof is uitgeput omdat deze organismen niet kunnen overschakelen op NO_3 dissimilatie.

Het model is geverifieerd aan de hand van drie denitrificatie experimenten uit de literatuur. De eerste twee experimenten hebben betrekking op denitrificatie in een anaeroob grondmonster, in het derde experiment is gewerkt met een anaerobe batch cultuur van *Paracoccus denitrificans* (een denitrificerende bacterie soort).

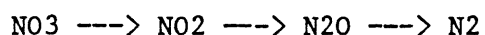
Het model blijkt de denitrificatie snelheid van NO_3 goed te simuleren. Er wordt wel accumulatie van NO_2 en N_2O gesimuleerd maar kwantitatief gezien wijken de gesimuleerde resultaten vrij sterk af van de experimentele resultaten. De modelresultaten geven aan dat de structuur van het model redelijk is. De parameterisatie laat echter nog te wensen over. Deze afwijkingen worden waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat de waarden van enkele biochemische parameters geschat moesten worden.

Voor een betere verificatie van het simulatie model is het daarom van belang de waarden van deze parameters, die een belangrijke rol spelen in het model, d.m.v. aanvullende experimenten nauwkeurig te bepalen. Verder wordt voorgesteld een denitrificatie experiment uit te voeren onder goed gedefinieerde condities (b.v. met een bekende hoeveelheid denitrificeerders). Hierdoor kunnen meer nauwkeurige experimentele resultaten worden verkregen dan tot nu toe aanwezig in de literatuur.

SUMMARY

An important portion of N-fertilizers (10-30 %) can be lost by denitrification. Therefore a simulation model has been developed to get a better understanding of the denitrification process.

The energy for growth and maintenance of micro organisms is obtained by dissimilation of organic matter with the result that electrons are liberated. Under aerobic conditions these electrons are taken up by oxygen through the terminal respiration chain. Under anaerobic conditions denitrifying bacteria use NO_3 as electron acceptor instead of oxygen. Nitrate is denitrified to N_2 via a number of denitrification steps:



In each step of this denitrification pathway electrons are taken up.

The simulation model describes a closed system in which no input or output of water, gases or dissolved materials can occur. The system represents a small layer in a soil aggregate which contains strict aerobic and facultative anaerobic bacteria. NO_3 and gluconate serve as nitrogen and carbon source respectively. Some important features of the model consist in:

- the relative growth rate of the micro organisms is described by a single (strict aerobes) or double (facultative anaerobes) Michaelis Menten equation.
- the substrate consumption rate and electron acceptor consumption is described by the Pirt equation.
- The mathematic formulation of the rates of the denitrification steps is based upon competitive Michaelis Menten kinetics.

The following processes are taken into account by the model. Assimilation of nitrate, mineralization of nitrate and gluconate, and substrate use due to maintenance and growth. The growth of the strict aerobic bacteria ceases if the oxygen source has been depleted. Then the facultative anaerobes denitrify NO_3 to N_2 resulting in temporarily accumulation of NO_2 and N_2O .

The model is verified by means of three denitrification experiments in literature. The denitrification rate of NO_3 is well

described by the simulation model. The accumulation of NO_2 and N_2O is simulated, however substantial deviations exist between the experimental and simulated results. These deviations are probably caused by the fact that some of the biochemical parameters (maximum relative growth parameter and maintenance coefficient) needed to be estimated. For improvement of the verification of the denitrification model, these parameters should be experimentally determined. It is furthermore suggested to set up a denitrification experiment under well defined conditions to obtain more accurate experimental results for verification than hitherto have been found in literature.

HOOFDSTUK 1

INLEIDING

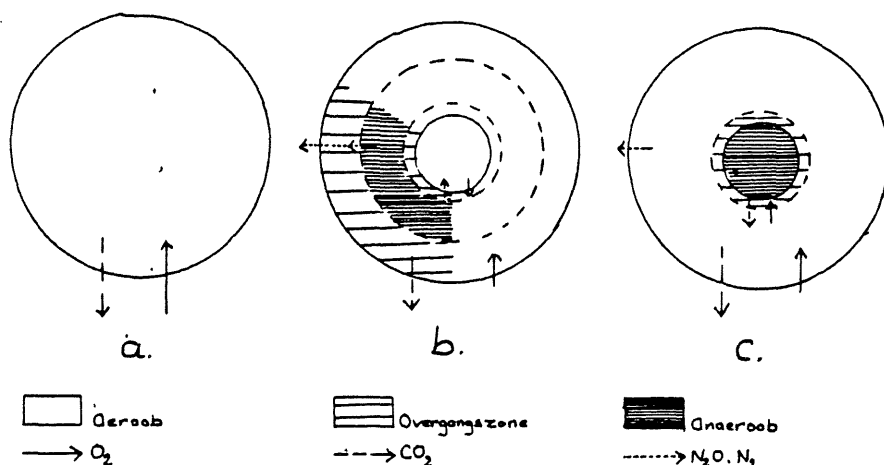
1.1 PROBLEEMSTELLING

Door denitrificatie kan een groot deel (10-30 %) van de stikstofgift voor gewassen verloren gaan (Allison, 1955, 1966). In verband hiermee is onderzoek naar het denitrificatie proces belangrijk omdat daarmee inzicht kan worden verkregen in het mechanisme van het denitrificatie proces en factoren die dit proces beïnvloeden. Hierdoor kunnen gerichte maatregelen worden getroffen om N-verlies via denitrificatie tegen te gaan.

Een belangrijk hulpmiddel bij de bestudering van denitrificatie is het opstellen van een simulatie model. Door modellering kunnen hiaten in de bestaande kennis worden opgespoord en kan het belang van de parameters die bij de denitrificatie een rol spelen, onderzocht worden. Tevens wordt het dan mogelijk om verder onderzoek gericht op te zetten.

1.2 DOEL VAN HET ONDERZOEK

Leffelaar (pers. med.) gaat experimenten uitvoeren waarin de denitrificatie van NO_3 in een bodemaggregaat wordt bestudeerd. Hierbij wordt uitgegaan van een cilindrisch grondmonster met een vochtspanning van $pF=3$. Op $t=0$ wordt een regenbui nagebootst door de buitenzijde van het monster in contact te brengen met water waarin NO_3 en een koolstofbron (gluconaat) zijn opgelost. Hierbij wordt het aggregaat slechts gedeeltelijk bevochtigd. De opgeloste stoffen bewegen door massastroming, onder invloed van de herverdeling van water, en diffusie in de richting van het centrum van het aggregaat. Figuur 1.1 laat enkele schematische zuurstof verdelingen zien zoals deze verwacht kunnen worden in veldaggregaten. Als de zuurstof consumptie snelheid niet groter is dan de snelheid waarmee zuurstof wordt aangevoerd, zullen er zich geen anaerobe condities ontwikkelen (figuur a). Direct na een regenbui zal voornamelijk de buitenste schil van het aggregaat worden bevochtigd. Hierin is de diffusie snelheid van zuurstof sterk belemmerd, resulterend in anaerobe condities waarbij denitrificatie van nitraat kan optreden. In het centrum van het aggregaat vindt nog steeds respiratie plaats totdat de zuurstof van de ingesloten lucht is geconsumeerd. Het grootste deel van het aggregaatvolume is dan anaeroob, maar de denitrificatie hoeft niet te zijn toegenomen omdat de nitraat voornamelijk is geconcentreerd in de vochtige schil. Daaropvolgende redistributie van water kan resulteren in een afname van het anaerobe aggregaat volume en daardoor een afnemende denitrificatie, als het vochtgehalte in de bevochtigde schil laag genoeg wordt om continue met gas gevulde porien te krijgen, waardoor snelle zuurstof diffusie in het aggregaat mogelijk wordt.



Figuur 1.1. Schematische zuurstof distributies in bodemaggregaten.

a. na een droge periode, b. kort na een regenbui, c. enige tijd na regenval. De lengte van de pijlen geven de relatieve grootte aan van molaire aanvoer of afvoer termen (Leffelaar, pers. med.).

De processen die zich in het bodem aggregaat gaan afspelen en van belang zijn bij de modellering van het denitrificatie proces zijn:

1. Consumptie van initieel aanwezige O_2 .
2. Consumptie van gluconaat waarbij CO_2 wordt geproduceerd.
3. Mineralisatie van endogene organische stof (dit is organische stof die oorspronkelijk in het grondmonster aanwezig is) en dode biomassa, waardoor extra C en N beschikbaar komt.
4. Dissimilatie van NO_3 waarbij NO_2 , N_2O en N_2 wordt gevormd.
5. Assimilatie van NO_3 .
6. Groei en afsterving van micro organismen.
7. Transport van water, O_2 , CO_2 , opgelost organische C, en NO_3 met zijn denitrificatie produkten NO_2 , N_2O en N_2 .

Voor een zo volledig en goed mogelijke simulatie van het denitrificatie experiment van Leffelaar moet met al deze processen rekening worden gehouden, en is het noodzakelijk het belang van de individuele processen voor de simulatie na te gaan.

Tijdens het onderzoek dat in dit verslag wordt besproken, is de

aandacht gevestigd op het microbiologische deel van het denitrificatie experiment (punten 1, 2, 3 (deels), 4, 5 en 6). Hierbij is het transport van water met daarin de opgeloste stoffen en de afbraak van endogene organische stof dus buiten beschouwing gelaten, omdat deze processen door andere doctoraalstudenten in een apart submodel worden gesimuleerd.

Het doel van dit onderzoek is het opstellen van een submodel waarin de denitrificatie van NO_3 tot N_2 via de intermediairen NO_2 en N_2O wordt gesimuleerd, en het evalueren van dit model m.b.v. denitrificatie experimenten uit de literatuur.

HOOFDSTUK 2

LITERATUUR OVERZICHT

2.1 INLEIDING

In het eerste deel van dit hoofdstuk wordt ingegaan op het denitrificatie proces. Hierbij wordt het zgn. denitrificatie pad besproken waarin NO_3 tot N_2 wordt gedenitrificeerd, dat de basis vormt van het simulatie model. In het tweede deel komt de denitrificatie kinetiek aan de orde. Er worden artikelen besproken waarin mathematische vergelijkingen voor de denitrificatie kinetiek getoetst zijn aan experimentele resultaten. Tenslotte worden de conclusies besproken die uit de bestudering van de literatuur naar voren zijn gekomen. Deze hebben een rol gespeeld bij opzet van het simulatie model.

omtrent het voorkomen van (partiele) denitrificeerders onmisbaar. Gemiddelde waarden uit de literatuur zijn nuttig om als eerste schatting te gebruiken. De verschillende waarden waaruit het gemiddelde wordt berekend kunnen echter zeer sterk variëren, afhankelijk van factoren zoals o.a. pH, vochtgehalte en temperatuur. Daarom is het voor een goede simulatie noodzakelijk dat de hoeveelheid denitrificeerders bepaald wordt in de grond waarvoor gesimuleerd wordt. Hierop wordt later bij de bespreking van de simulatie resultaten nog teruggekomen.

In de literatuur worden tal van denitrificatie experimenten beschreven. Deze kunnen onderscheiden worden in een groep waarin grond met denitrificerende bacteriën gebruikt wordt en een groep waarin gewerkt wordt met reinkultures van denitrificerende bacteriën. In dit onderzoek gaat de aandacht uit naar de eerstgenoemde groep.

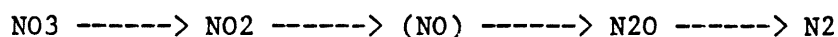
De belangrijkste factoren die het denitrificatie proces in de bodem beïnvloeden zijn: temperatuur, pH, vochtgehalte, soort en concentratie C-substraat, zuurstofgehalte en de concentratie en 'soort' stikstof (bijv. $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{N}_2\text{O-N}$, organische N). Denitrificatie experimenten met grond kunnen worden onderscheiden in een groep waarin metingen in het veld worden verricht en een groep waarbij de denitrificatie wordt gemeten aan een grondmonster in het laboratorium.

Met betrekking tot de eerstgenoemde groep experimenten wordt opgemerkt dat in het veld de totale denitrificatie verliezen van meststoffen moeilijk te bepalen zijn, omdat naast N-verlies door denitrificatie ook N door uitspoeling uit het bodemprofiel kan verdwijnen. Tevens moet rekening worden gehouden met de stikstof die zich in de grond bevindt voordat meststoffen zijn toegediend. Rolston (1981) vermeldt de resultaten van enkele onderzoeken waarin het denitrificatie verlies in het veld is gemeten, tabel 1.1 geeft hiervan een overzicht.

2.2 HET DENITRIFICATIEPROCES

2.2.1 Denitrificerende Bacterien

Voor groei en onderhoud van micro organismen is energie nodig, deze wordt verkregen via verbranding (dissimilatie) van organische stof. Hierbij komen elektronen vrij die in de terminale ademhalingsketen worden opgenomen door zuurstof. Onder anaerobe omstandigheden kan, bij denitrificerende bacterien, NO₃ de rol van zuurstof overnemen. NO₃ wordt hierbij gedenitrificeerd tot N₂ via een aantal tussenstappen:



Over de rol van NO als intermediair bestaat in de literatuur nog geen overeenstemming. Bij iedere stap van het pad wordt, althans bij de meeste micro organismen, ATP gevormd.

Alleen bacterien kunnen anaeroob ademen, en kunnen daardoor denitrificeren. Slechts bepaalde soorten kunnen NO₃ reduceren t/m N₂ en strikt genomen zijn alleen deze organismen denitrificeerders. Andere bacterien zijn slechts in staat een of meerdere stappen van het denitrificatie proces te katalyseren, deze worden partiele denitrificeerders genoemd (Ingraham, 1981). Het is mogelijk dat, door de combinatie van verschillende partiele denitrificeerders, het NO₃ volledig wordt gedenitrificeerd. Partiele denitrificatie treedt op vanwege het gebrek bij bepaalde organismen aan een of meerdere stikstof oxide reductases. Zo zijn er organismen die alleen nitraat tot nitriet kunnen reduceren omdat ze alleen het enzym nitraat reductase bezitten. Deze gelimiteerde dissimilatie van nitraat, soms nitraat respiratie genoemd, komt bij veel bacterie geslachten voor en kan ophoping van nitriet in de grond veroorzaken. Er zijn ook micro organismen die nitraat alleen kunnen reduceren tot N₂O, andere bacterien kunnen alleen het enzym nitriet reductase aanmaken waardoor ze alleen nitriet tot N₂ kunnen reduceren. Tenslotte zijn er organismen die alleen nitraat tot nitriet kunnen reduceren en NO tot N₂O, ze kunnen dus geen NO₂ en N₂O reduceren.

Tot dusver is er alleen in kwalitatieve zin gesproken over (partiele) denitrificatie. Voor het simuleren van het denitrificatie proces in de grond is de beschikking over kwantitatieve gegevens

=====		
N verlies door denitrificatie	Opmerkingen	Auteurs

% kg N/ (ha.jr)		

10-30 .--	Gebaseerd op N-balans studies uit de lit.	Allison (1955,1966)
-- 16	--	Hauck (1969)
22 --	Nauwkeurige experimenten door gebruik van N-15	Carlton (1976)
6-14 6-15	--	Jones et al. (1977)
-- 51 kg.ha-1	Gemeten in een periode van 4 mnd	Ryden et al. (1979)
2 --	--	Craswel & Martin (1975)

Tabel 1.1 Overzicht van gemeten N-verliezen in het
 veld door denitrificatie.

Hieruit blijkt dat de denitrificatie verliezen sterk variëren. Dit wordt veroorzaakt door het grote aantal factoren waarvan de denitrificatie snelheid afhankelijk is (temperatuur, vochtgehalte, pH, org. st. gehalte, etc.), die per veldexperiment sterk kunnen variëren.

De denitrificatie experimenten in het laboratorium worden in het algemeen als volgt uitgevoerd. Een erlenmeyer wordt gevuld met een

hoeveelheid vochtige grond of een grondsuspensie waaraan een KNO_3 of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ oplossing wordt toegevoegd. Vervolgens wordt de erlenmeyer gasdicht afgesloten waarbij de aanwezige lucht wordt vervangen door He of Ar gas om het systeem anaeroob te maken. Het denitrificatie proces wordt in de loop van de tijd gevolgd door op bepaalde tijdstippen gasmonsters te nemen om de concentraties NO , N_2O en N_2 te meten. NO_3 en NO_2 worden in het grondmonster bepaald via verschillende extraktie methoden.

Zoals reeds is vermeld, wordt het monster anaeroob gemaakt door de experimenten onder een He of Ar atmosfeer uit te voeren. Een andere manier om een anaerobe atmosfeer te creëren, kan bewerkstelligd worden door een laagje water op het grondmonster aan te brengen. Door dit waterlaagje kan slechts langzaam zuurstof diffunderen. Het grondmonster wordt na enkele tientallen uren anaeroob omdat de respiratie snelheid van O_2 groter is dan de diffusie snelheid. (Cho, 1982).

In tabel 1.2 is een overzicht gegeven van enkele experimenten waarin de denitrificatie snelheid in grondmonsters is gemeten in het laboratorium. Hieruit blijkt dat de omstandigheden waaronder de experimenten zijn uitgevoerd, sterk variëren. Verder varieert de denitrificatie snelheid, die hier wordt gedefinieerd als de hoeveelheid $\text{NO}_3\text{-N}$ die per tijdseenheid wordt gedenitrificeerd tot N_2O of N_2 ($\mu\text{g}/(\text{hr.g grond})$), van 0.1 tot 10 $\mu\text{g NO}_3\text{-N}/(\text{hr.g})$. Bij een bouwvoor dikte van 10 cm en een bulkdichtheid van de grond van 13000 kg/m^3 , komt dit overeen met 1300-130000 $\text{kg NO}_3\text{-N}/(\text{ha.jr})$. Uit vergelijking van deze hoeveelheid met de veldgegevens uit tabel 1.1, blijkt dat de denitrificatie snelheid gemeten in het laboratorium een factor 100-10000 (!) groter is. Dit komt doordat de groei condities voor de micro organismen optimaal zijn: zo is de temperatuur optimaal en zijn er voldoende voedingsstoffen aanwezig zodat de groei van de micro organismen exponentieel blijft gedurende het denitrificatie experiment. In het veld heersen veel minder optimale omstandigheden (Woldendorp, xx): bij lage temperaturen in de winter treedt er nauwelijks of geen denitrificatie op, en wordt de snelheid ervan meestal beperkt door een tekort aan koolstof en stikstof. Dit blijkt bijvoorbeeld uit de experimenten van Reddy et al. (1982), deze bepaalden de denitrificatie snelheid in 16 gronden en constateerden dat deze evenredig was met de concentratie van twee substraten: NO_3 en water oplosbare koolstof.

Auteur	Grondmonster Aant. gronden	Toevoegingen aan het grondmonster		Incubatie temperatuur	Atmosfeer/ systeem	Gemiddelde denitrificatie snelheid ug N/(g grond . hr)
		N03	C-bron			
		(ug N03-N/ g grond)				
Firestone et al. (1979)	Suspensie 3	0.5-20	--	25	He/ afgesloten met continue gasafvoer	0.5- 1.7
Cooper & Smith (1963)	Vochtig 7	?	alfalfa	25	He/ afgesloten	10 -40
Cho (1982)	Suspensie 1	40-150	--	20	lucht/ afgesloten	1.5- 2
Firestone & Tiedje (1979)	Suspensie 3	100	--	n.v.	He/ afgesloten	0.2- 1.3
Reddy et al. (1982)	Suspensie 8	40	--	30	N2/ afgesloten continue gasafvoer	0.4
Blackmer & Brenner (1978)	Vochtig 2	0-1000	--	30	He/ afgesloten	0.5- 3
Koskinen & Keeney (1982)	Vochtig 1	100	--	28	He/ afgesloten	0.6- 1.5
Cady & Bartholomew (1960)	Vochtig 1	266	alfalfa	n.v.	Ar/ afgesloten continue gascirculatie	0.4- 1
Wijler & Delwiche (1954)	Vochtig 1	182	alfalfa/ stro	25	N2/ afgesloten	0.4
Cho & Schmidt (1978)	Vochtig 1	100	--	20	lucht/ afgesloten	0.4

2.2.2 Het Denitrificatie Pad

In deze paragraaf wordt ingegaan op het denitrificatie pad zoals gegeven in paragraaf 2.2.1. Hierbij worden de factoren besproken die de accumulatie van de verschillende N-componenten beïnvloeden, zoals de pH, NO₃ concentratie en O₂ concentratie. Tevens wordt ingegaan op het belang van nitrificatie en chemodenitrificatie in de bodem, dit zijn processen waarbij ook NO₂, N₂O en N₂ wordt geproduceerd.

Het blijkt dat de meeste metingen uit de literatuur beperkt zijn tot de bepaling van de gasvormige produkten N₂O en N₂, dit komt o.a. vanwege de eenvoudige en snelle bepaling. Er kunnen gasmonsters genomen worden zonder dat het denitrificatie proces verstoord wordt, hetgeen in tegenstelling staat tot de bepaling van NO₃, NO₂ gehalten. In de literatuur is de aandacht veelal gevestigd op N₂O vanwege het gevaar dat dit gas oplevert voor de ozonlaag (Council for Agricultural Science & Technology, 1976).

2.2.2.1 De Reduktie Van Nitraat Tot Nitriet -

Cooper & Smith (1963) stelden in licht zure grond (pH 6) vast dat de reductie van nitraat de snelheids bepalende stap was in het denitrificatie proces terwijl in alkalische grond (pH 8) de reductie van nitriet snelheidsbepalend was.

Betlach & Tiedje (1981) voerden denitrificatie experimenten uit met reïncultures van *Flavobacterium* en *Pseudomonas fluorescens*. De auteurs konden de gemeten accumulatie van nitriet verklaren met een kinetisch model. Hiermee kon de hoeveelheid geaccumuleerd nitriet worden gesimuleerd. De snelheden van de nitraat- en nitrietreductie werden beschreven met een Michaelis-Menten vergelijking waarbij de maximum reductiesnelheid van NO₃ vijf keer zo groot was als die van NO₂.

Deze resultaten geven aan dat, bij dezelfde NO₃ en NO₂ concentratie, de elektronen opname snelheid van NO₃ groter is dan die van NO₂. Met dit verschil in 'concurrentie kracht' tussen NO₃ en NO₂ moet bij de modellering van het denitrificatie proces rekening worden

gehouden. In paragraaf 3.3 wordt hierop teruggekomen.

2.2.2.2 N₂O Produktie T.g.v. Denitrificatie -

Firestone et al. (1979) stelden tijdens denitrificatie experimenten vast dat de verhouding N₂O/N₂ toenam bij experimenten met aanwezigheid van een geringe hoeveelheid O₂ (0.01 atm.). Ze noemen een aantal mechanismen waarmee dit O₂-effect verklaard kan worden. Ten eerste: competitie van O₂ als electron acceptor, waardoor N₂O niet de kans krijgt om gereduceerd te worden, ten tweede preferente belemmering door O₂ van het enzym N₂O reductase en tenslotte een algemene vertraging van het denitrificatie proces, waardoor N₂O meer tijd heeft om van de actieve plekken weg te diffunderen.

Cho (1982) constateerde dat er geen N₂O werd geproduceerd als er O₂ in de grond aanwezig was. Uit zijn gegevens kan helaas niet worden afgeleid of er dan ook geen NO₂ wordt geproduceerd.

De reductie van N₂O naar N₂ wordt belemmerd door hoge NO₃ concentraties (Wijler & Delwiche, Cooper & Smith, 1963, Blackmer & Bremner, 1978, Firestone et al., 1979). Als mogelijke verklaring stellen Firestone et al. (1979) dat NO₃ t.o.v. N₂O preferent als elektron acceptor wordt gebruikt. Deze verklaring is acceptabel omdat bij de reductie van NO₃ naar N₂, 5 elektronen kunnen worden opgenomen per N-atoom, terwijl bij de reductie van N₂O naar N₂ slechts 1 elektron kan worden opgenomen. Hiermee is echter niet alles verklaard omdat niets bekend is over de snelheid waarmee beide N-componenten elektronen kunnen opnemen. Ook uit experimenten van Koskinen & Keeney (1982) blijkt dat N₂O een belangrijk denitrificatie produkt is totdat de hoeveelheid NO₃ geconsumeerd is, eerst dan wordt N₂O verder gereduceerd tot N₂. Ook Cooper & Smith (1963) vonden pas N₂ produktie als het meeste nitraat geconsumeerd was. Firestone et al. (1979) hebben experimenten uitgevoerd waaruit bleek dat nitriet een zeer grote invloed heeft op N₂O accumulatie. De invloed van nitraat was zeer klein vergeleken bij het effect van nitriet. De auteurs geven aan dat het mogelijk is dat in plaats van nitraat het produkt van nitraat (nitriet) de eigenlijke veroorzaker is van N₂O accumulatie.

Met betrekking tot het pH effect op de denitrificatie blijkt uit

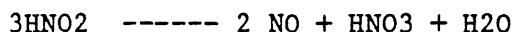
experimenten van Wijler & Delwiche (1954) dat bij zure gronden N₂O het belangrijkste eindprodukt is en bij alkalische grond N₂. Koskinen & Keeney (1982) stelden bij zure gronden vast dat N₂O een belangrijk tussenprodukt is in het denitrificatie proces terwijl bij alkalische gronden minder N₂O als tussenprodukt wordt gevormd.

In het denitrificatie model wordt geen rekening gehouden met een pH-effect, er wordt aangenomen dat de pH in de grond voldoende gebufferd wordt zodat gesimuleerd kan worden bij een constante pH. Uit reeds uitgevoerde experimenten blijkt de pH-KCl van grondmonsters uit Herveld en Lelystad resp. 6.9 en 7.5 te zijn en gedurende de denitrificatie experimenten konstant te blijven (Leffelaar, pers. med.).

2.2.2.3 Chemodenitrificatie -

Naast biologische denitrificatie, kan nitriet ook via chemische denitrificatie worden omgezet in gasvormige N-verbindingen. Voor chemische denitrificatie zijn verschillende mechanismen voorgesteld, zoals de zelfontleding van nitriet, de reactie van HNO₂ met amino verbindingen, ammonium en organische stof, en de reductie van nitriet door metaalionen (Chalk & Smith, 1983). De gasvormige produkten die hierbij ontstaan zijn NO, NO₂, N₂O, N₂ en CH₃ONO (methylnitriet). De omzetting van nitriet door chemodenitrificatie is echter alleen van belang bij gronden met een pH lager dan 5.5, bij een hogere pH is nitriet vrij stabiel. Dit blijkt uit de volgende literatuur referenties.

Wijler & Delwiche (1954) constateerden NO produktie in een anaerobe grond met een pH < 6, tevens vonden ze NO vorming in een neutrale grond met een laag vochtgehalte (vochtgevuuld porien volume < 10%). Volgens hen kan NO onder zure omstandigheden gevormd worden via een chemische reactie waarin microbiologisch gevormd NO₂ afgebroken wordt tot NO:



Cady & Bartholomew (1960) stelden geringe NO-produktie vast (5 % van de hoeveelheid toegevoegd NO₃) in een anaerobe, zure grond (pH=4.5); in een alkalische grond (pH=7.5) vond geen NO-vorming plaats. Uit hun experiment met een gesteriliseerde zure grond waaraan NaNO₂ was toegevoegd bleek dat de hoeveelheid geproduceerd NO evenredig was met de concentratie NO₂; in een gesteriliseerde alkalische grond vond geen NO produktie plaats. Deze resultaten duiden erop dat de vorming van NO een niet-biologische proces is en dat er een pH-afhankelijk evenwicht bestaat tussen NO₂ en NO. De auteurs concludeerden dat de produktie van NO het gevolg is van niet-biologische afbraak van HNO₂.

Bollag et al. (1973) stelden vast dat chemische nitriet afbraak overheerst onder zowel steriele als niet steriele condities bij lage pH in aerobe en anaerobe omstandigheden. In een neutrale en alkalische omgeving werd slechts weinig chemische afbraak van nitriet waargenomen. Verder constateerden ze dat tijdens de chemische afbraak van nitriet, NO en N₂O de belangrijkste geproduceerde gasen waren.

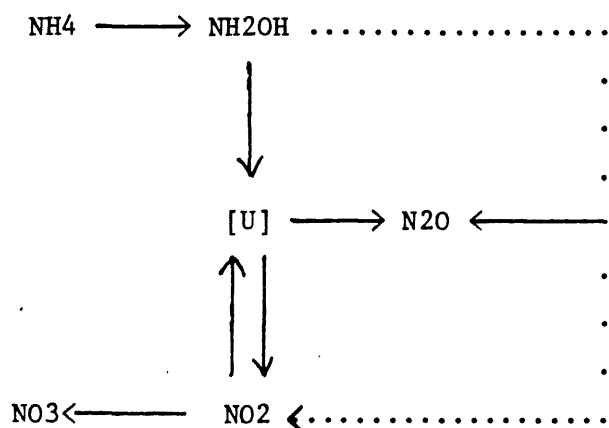
De omvang van de NO en NO₂ gasproduktie door chemodenitrificatie blijkt bij de verschillende onderzoeken in de literatuur sterk te variëren. Zo bedroeg bij Wijler & Delwiche (1954) de NO-produktie niet meer dan 1 % van de toegevoegde hoeveelheid NO₃, terwijl er bij Bollag et al. (1973) meer dan 50 % van de toegevoegde nitriet werd omgezet in NO en NO₂ gas. In gronden met een pH>6 blijkt chemo denitrificatie in de meeste experimenten verwaarloosbaar klein te zijn, zodat hiermee bij de modellering van het denitrificatie experiment van Leffelaar (pH van de grond is 7) geen rekening hoeft te worden gehouden.

2.2.2.4 N₂O Produktie T.g.v. Nitrificatie -

Onder nitrificatie wordt verstaan de biologische omzetting van stikstof in organische of anorganische componenten van een gereduceerde vorm naar een meer geoxideerde vorm (bijvoorbeeld de oxidatie van NH₄ naar NO₃).

Blackmer & Bremner (1981) hebben een reeks van nitrificatie experimenten uitgevoerd waaruit ze concludeerden dat tijdens nitrificatie N₂O vrij komt. Het mechanisme van de N₂O produktie dat

door deze auteurs is voorgesteld, is in het onderstaande schema weergegeven.



Schema van het nitrificatie proces, zoals is voorgesteld door Blackmer & Bremner (1981). Getrokken lijn: enzymatische reactie, gestippelde lijn: chemische reactie, U: niet geïdentificeerde component.

Het belang van de N₂O produktie t.g.v. nitrificatie is onderzocht door Freney et al. (1978). Deze vonden N₂O emissie onder aerobe omstandigheden bij gronden met een vochtgehalte variërend van luchtdroog tot veldcapaciteit. Uit de resultaten van experimenten met nitrificatie en denitrificatie inhibitors concludeerden ze dat onder aerobe omstandigheden de meeste N₂O geproduceerd wordt via oxidatie van NH₄ (nitrificatie), en dat onder anaerobe omstandigheden N₂O produktie voornamelijk plaatsvindt door denitrificatie van NO₃. Bij een toenemend vochtgehalte is de kans op anaerobe plekken in de grond groter zodat daardoor meer N₂O via denitrificatie geproduceerd kan worden. De auteurs concluderen dan ook dat het relatieve belang van beide processen m.b.t. de N₂O produktie, naast de hoeveelheid NO₃ en NH₄, afhangt van het vochtgehalte en zuurstofgehalte van de grond.

2.3 DENITRIFICATIE KINETIEK

In de literatuur is het denitrificatie proces in de bodem uitvoerig bestudeerd, waarbij de aandacht vooral is gevestigd op factoren die van invloed zijn op de denitrificatie snelheid (NO_3 afname) en de vorming van de denitrificatie produkten. Over de snelheid van de verschillende denitrificatie stappen in de reeks $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ is minder bekend.

De denitrificatie kinetiek wordt gewoonlijk bepaald door de snelheid te meten waarmee NO_3 uit de grond verdwijnt. De kinetiek van de daarop volgende denitrificatie stappen wordt meestal niet verder onderzocht. De denitrificatie van NO_3 is volgens sommige onderzoekers (o.a. Stanford et al., 1975) een 1ste-orde proces. Volgens anderen (o.a. Bowman & Focht, 1974) kan de denitrificatie kinetiek worden beschreven met een Michaelis Menten vergelijking, waarbij het een 1ste orde proces is bij lage NO_3 concentraties en een 0de orde proces bij hoge NO_3 concentraties.

In de volgende paragrafen wordt hierop nader ingegaan en worden enkele voorbeelden uit de literatuur aangehaald.

2.3.1 Nitraat Als Limiterende Factor Voor Denitrificatie

Als NO_3 in een beperkte hoeveelheid aanwezig is, bepaalt dit de snelheid van het denitrificatie proces. In dit geval kan de denitrificatie snelheid van NO_3 worden beschreven met de Michaelis Menten vergelijking (Bowman & Focht, 1974):

$$V = V_{\max} \cdot \frac{N03}{K_n + N03} \quad (2.1)$$

waarin: V = denitrificatie snelheid
 $(dNO_3/dt, \text{mol.l}^{-1}.\text{hr}^{-1})$
 V_{max} = max. denitrificatie snelh.
 $(\text{mol.l}^{-1}.\text{hr}^{-1})$
 NO_3 = NO_3 concentratie (mol.l^{-1})
 K_n = Michaelis-Menten constante
 (mol.l^{-1})

De Kn-waarde van NO₃ in grond varieert van 0.1E-3 tot 10E-3 mol/l, de Vmax-waarde ligt tussen 0.1 en 0.3 mol.l⁻¹ (Baas, 1984).

Bij hoge NO₃ concentraties (NO₃ >> K_n) reduceert de Michaelis-Menten vergelijking tot: $V = V_{max}$, waaruit volgt dat de denitrificatie snelheid onafhankelijk is van de NO₃ concentratie (0-orde kinetiek). Bij lage NO₃ concentraties (NO₃ << K_n) reduceert de Michaelis-Menten vergelijking tot $V = (V_{max}/K_n) \cdot NO_3$, waarbij de denitrificatie snelheid evenredig is met de NO₃ concentratie (1ste orde kinetiek). Uit het literatuur overzicht van Fillery (1981) blijkt dat het denitrificatie proces in de grond 1ste orde kinetiek volgt bij NO₃ concentraties lager dan 0.6E-3 mol/l, bij hogere concentraties blijkt het denitrificatie proces 0de orde kinetiek te volgen.

Ode-orde kinetiek is o.a. gemeten door Wijler & Delwiche (1954), deze stelden tijdens hun experimenten vast dat de denitrificatie snelheid onafhankelijk was van de initiele NO₃ concentratie. Dit komt doordat ze met NO₃ concentraties werkten die veel hoger lagen dan de Kn-waarde: 1.E-2 - 6.E-2 mol/l.

Stanford et al. (1975) bepaalden de denitrificatie snelheid (c.q. snelheid van NO₃-verlies) in 30 verschillende gronden, waarbij zich boven de grond een laagje water bevond met een NO₃ concentratie van 0.5 mol/l. De denitrificatie snelheid werd beïnvloed door de diffusie van NO₃ uit het bovenstaande waterlaagje naar het grondmonster. De auteurs stelden een afname van NO₃ vast waarvan de snelheid kon worden beschreven met een 1ste-orde vergelijking. Op grond van de hoge NO₃ concentratie zou verwacht worden dat de denitrificatie snelheid met een 0de-orde vergelijking kan worden beschreven. Dit is echter niet

het geval omdat de denitrificatie snelheid mogelijk bepaald wordt door het diffusie proces, waarvan de snelheid gegeven wordt door een 1ste-orde vergelijking (Wet van Fick).

Kohl et al. (1976) merken op dat, hoewel de denitrificatie via enzymmatische processen verloopt, dit nog niet hoeft te betekenen dat de denitrificatie dan ook volgens een Michaelis-Menten mechanisme verloopt. Ze illustreren dit aan de hand van de volgende denitrificatie reactie waarin de elektronen die vrijkomen bij de oxidatie van de C-bron via een elektronencarrier worden opgenomen door NO₃:



waarin: Box = geoxideerde elektroncarrier
 Bred = gereduceerde elektroncarrier
 Cox = geoxideerde C-bron
 Cred = gereduceerde C-bron
 Nred = gereduceerd NO₃

Deze reacties leiden tot de volgende niet-lineaire differentiaal vergelijkingen:

voor de oxidatie snelheid van de C-bron:

$$\begin{array}{c} d\text{Cred} \\ \text{-----} = -k1 \cdot \text{Box} \cdot \text{Cred} \\ dt \end{array} \quad (c)$$

en voor de denitrificatie snelheid van NO₃:

$$\begin{array}{c} d\text{NO}_3 \\ \text{-----} = -k2 \cdot \text{Bred} \cdot \text{NO}_3 \\ dt \end{array} \quad (d)$$

Deze set differentiaal vergelijkingen werd numeriek opgelost, waarbij gebruik werd gemaakt van de massabalansen van C, B en N; en

verondersteld werd dat de totale hoeveelheid elektroncarrier (Box+Bred) gedurende het denitrificatie proces constant bleef. Dit leverde de denitrificatie snelheid (dNO_3/dt) als functie van de tijd. Hierbij bleek dat bij een juiste keuze van k_1 , k_2 en (Box+Bred) de berekende curve niet afweek van de curve die met de Michaelis-Menten vergelijking was berekend.

De auteurs concluderen hieruit dat het beschrijven van denitrificatie gegevens met de Michaelis-Menten vergelijking nuttig is om parameterwaarden te vinden voor denitrificatie modellen. Een goede overeenkomst tussen meetwaarden en berekende waarden uit een mathematische vergelijking hoeft echter geen uitsluitsel te geven over het mechanisme van het denitrificatie proces.

2.3.2 Nitraat En Koolstof Als Limiterende Factoren

Als naast NO_3 ook de C-bron als groei limiterende factor optreedt, kan de denitrificatie snelheid worden beschreven met een dubbele Michaelis Menten vergelijking. Dit blijkt uit gegevens van Bowman & Focht (1974). Deze voerden denitrificatie experimenten uit met 2 gronden waarin ze de denitrificatie snelheid bepaalden aan de hand van het NO_3 verlies. Hierbij werden 125 ml flesjes, die gevuld waren met 50 g grond en 50 ml oplossing, anaeroob geïncubeerd bij 25 °C. De denitrificatie snelheid werd gemeten als functie van de NO_3 concentratie bij een constante initiele glucose concentratie en als functie van de glucose concentratie bij een constante initiele NO_3 concentratie. De auteurs gingen na of de denitrificatie snelheid met een dubbele Michaelis-Menten vergelijking kon worden beschreven:

$$V = V_{\max} \cdot C \cdot N / ((C+K_c) \cdot (N+K_n)) \quad (2.2)$$

waarin: V = denitrificatie snelheid
 (dN/dt, mol.l⁻¹.hr⁻¹)
 V_{max} = maximum denitrificatie snelh.
 (mol.l⁻¹.hr⁻¹)
 C, N = resp. C en N concentratie (mol.l⁻¹)
 K_c, K_n = resp. Michaelis-Menten
 constanten voor C en N (mol.l⁻¹)

Het bleek dat de snelheden van nitraatverlies voor de ene grond goed met een dubbele Michaelis Menten vergelijking konden worden beschreven. De K_m waarden voor glucose-C en NO₃-N waren resp. 0.5 g/l en 0.012 mol NO₃/l, deze waarden zijn in vergelijking tot die welke door Shah & Coulman (1978) in een grondextract zijn gemeten, zeer hoog: deze bepaalden voor resp. glucose-C en NO₃-N de waarden 1.1E-3 g/l en 1.4E-3 mol/l. Bij de andere grond verliepen de denitrificatie snelheden echter niet volgens een dubbele Michaelis Menten vergelijking omdat de initiele hoeveelheid NO₃ en glucose niet toereikend was om in de respectievelijke gevallen maximale denitrificatie snelheden te bereiken.

Reddy et al. (1982) bepaalden de C-mineralisatie snelheid en de denitrificatie snelheid van NO₃ in 9 minerale en 8 organische gronden. Uit hun resultaten bleek dat de C-mineralisatie met een 1ste-orde vergelijking kon worden beschreven:

$$\frac{dC}{dt} = -k_c \cdot C \quad (a)$$

waarin: C = C_{max}-CO₂ (ug C/ml)
 C_{max} = maximale hoeveelheid beschikbaar C
 (is bepaald aan de hand van de CO₂
 produktie van de grond na 15 dagen bij
 incubatie bij 30 C)
 CO₂ = hoeveelheid C dat verbruikt wordt
 tijdens de denitrificatie (ug C/ml)
 k_c = C-mineralisatie coefficient (dag⁻¹)

De denitrificatie snelheid werd beschreven als een gecombineerd 1ste-orde proces:

$$\frac{dN}{dt} = -k_n \cdot C \cdot N \quad (b)$$

waarin: N = NO_3 concentratie ($\mu\text{g N/ml}$)
 k_n = denitrificatie snelheids
 coefficient ($\text{dag}^{-1} \cdot (\mu\text{g C/ml})^{-1}$)

Substitutie van de geïntegreerde vorm van vergelijking (a) in vergelijking (b) levert:

$$\frac{dN}{dt} = -k_n \cdot N \cdot [C_{\text{max}} \cdot \exp(-k_c \cdot t)] \quad (c)$$

De parameters van deze vergelijking werden via een optimalisatie procedure gefit. Het bleek dat de gemeten denitrificatie snelheden in de verschillende gronden goed met deze vergelijking konden worden beschreven. De afwijking tussen de berekende en gemeten waarden bedroeg 5-10 %.

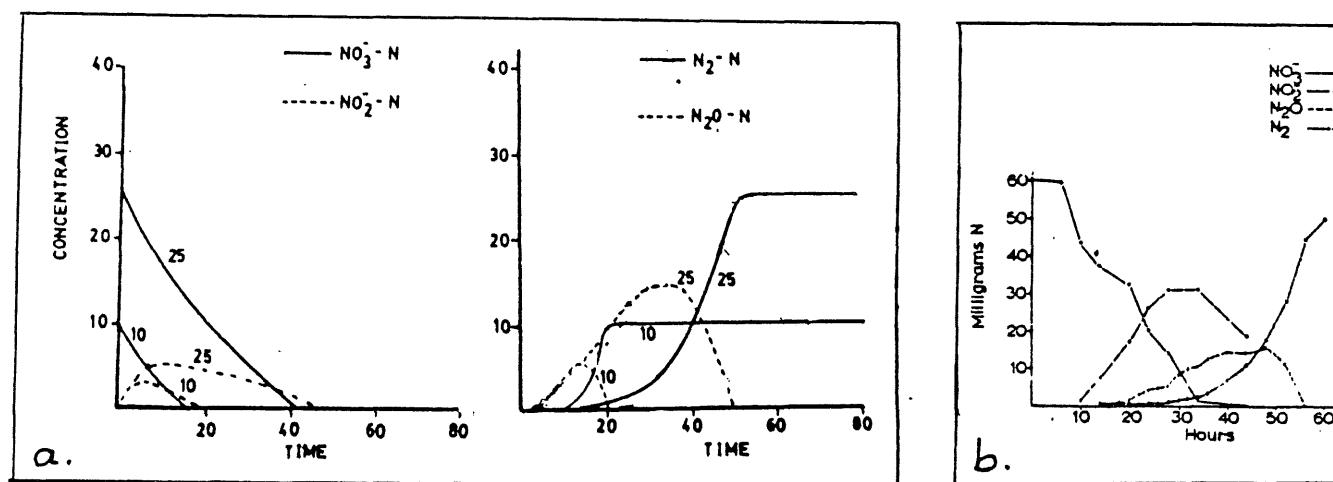
De auteurs gingen na of de denitrificatie snelheden in de verschillende gronden ook konden worden beschreven met een dubbele Michaelis-Menten vergelijking (vgl. 2.2). Het bleek dat ook met deze vergelijking de denitrificatie snelheden goed werden beschreven maar dat de range van de bijbehorende parameters zeer groot was. De K_n -waarden varieerden bijvoorbeeld van 0 tot 1.3 mol NO_3/l . Bij vergelijking hiervan met Michaelis-Menten constanten uit de literatuur komen de auteurs tot de conclusie dat de door hen gevonden waarden niet acceptabel zijn. De reden voor de grote range in de Michaelis-Menten parameters ligt in het feit dat de drie parameters V_{max} , K_c en K_n partieel gecorreleerd zijn. Dit betekent dat dezelfde curve berekend kan worden met meerdere van elkaar sterk verschillende sets van parameter waarden. De onderzoekers merken op dat uit hun resultaten niet moet worden geconcludeerd dat het Michaelis-Menten model niet geldig is voor het denitrificatie proces. Wel blijkt uit

hun studie dat de Michaelis-Menten constanten niet betrouwbaar bepaald kunnen worden bij lage C en N concentraties.

2.3.3 Model Van Cho & Mills (1979)

Cho & Mills (1979) beschouwden niet alleen de denitrificatie kinetiek van NO_3 maar ook die van de andere denitrificatie stappen in de reeks $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$. Ze stelden een model op voor de beschrijving van de kinetiek van de verschillende denitrificatie stappen, waarbij werd uitgegaan van de Michaelis-Menten vergelijking.

De auteurs vergeleken hun simulatie resultaten met de experimentele gegevens van Cooper & Smith (1963) en merken op dat de gesimuleerde resultaten sommige karakteristieken vertonen van deze gegevens, zie figuur 2.1.



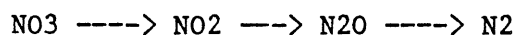
Figuur 2.1. a. Simulatie resultaten van Cho & Mills (1979) met initiele NO_3 conc. van resp. 10 en 25.
b. experimentele resultaten van Cooper & Smith (1963).
(Opm. In de figuur van Cho & Mills zijn voor de tijd en de concentratie geen eenheden gegeven.)

In beide gevallen wordt NO₃ omgezet in N₂ waarbij tijdelijke accumulatie optreedt van NO₂ en N₂O. Dit is door meerdere auteurs (Wijler & Delwiche, 1954; Cady & Bartholomew, 1960; en Cho & Sakdinar, 1978) gemeten.

2.4 CONCLUSIES

Uit het literatuur onderzoek worden de volgende conclusies getrokken.

+ De denitrificatie van NO₃ verloopt via de volgende reaktie reeks:



NO is waarschijnlijk een produkt van de chemische afbraak van NO₂ welke alleen van belang is voor gronden met een lage pH.

+ Bij gelijke NO₃ en NO₂ concentraties is de elektronen opname snelheid van NO₃ groter dan die van NO₂.

+ Het is niet duidelijk geworden bij welke O₂ concentratie(s) de verschillende denitrificatie stappen geremd of belemmerd worden.

+ De verhouding N₂O/N₂ tijdens het denitrificatie proces neemt toe bij hogere NO₃ concentraties.

+ De denitrificatie kinetiek van NO₃ kan worden beschreven met de Michaelis-Menten vergelijking met NO₃ als limiterende factor. Voor de gevallen waarin zowel C als N substraat limiterend zijn, kan de dubbele Michaelis-Menten vergelijking gebruikt worden.

Bij de opzet van het denitrificatie model is een reeds bestaand model verder uitgewerkt, waarbij de aandacht is gericht op het simuleren van het concentratie verloop van niet alleen NO₃, maar ook de andere N-componenten die bij het denitrificatie proces betrokken zijn: NO₂,

N₂O en N₂. Hiervoor komen de modellen van Betlach & Tiedje (1981) en van Cho & Mills (1979) in aanmerking omdat hiermee de NO₂ en N₂O accumulatie tijdens de denitrificatie van NO₃ kan worden gesimuleerd. Er is gekozen voor het model van Cho & Mills (1979) omdat hierin, i.t.t. het model van Betlach & Tiedje (1981), rekening is gehouden met de concurrentie tussen NO₃, NO₂ en N₂O om als elektron acceptor op te treden, waardoor dit model de realiteit meer benadert.

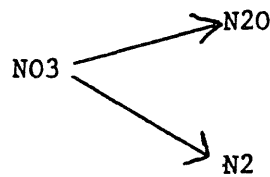
HOOFDSTUK 3

DENITRIFICATIE MODEL

3.1 INLEIDING

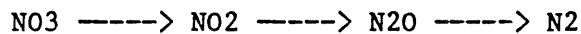
In dit hoofdstuk wordt het denitrificatie model besproken waarmee de denitrificatie van NO_3 tot N_2 via de intermediairen NO_2 en N_2O wordt gesimuleerd. Het model is gebaseerd op het werk van Baas (1984), waarbij het deel waarin de denitrificatie snelheid van NO_3 wordt berekend, nader is uitgewerkt.

In het model van Baas (1984) wordt de relatieve groeisnelheid van de microbiele biomassa berekend met een enkele (aerobe omstandigheden) en een dubbele (anaerobe omstandigheden) Michaelis-Menten vergelijking met als groeibeperkende factoren gluconaat, O_2 en NO_3 . Het elektron acceptor verbruik wordt berekend met de Pirt vergelijking. Verder wordt in zijn model aangenomen dat een vast deel van de NO_3 tot N_2O wordt gedissimileerd en het andere deel tot N_2 , schematisch als volgt weergegeven:



In het model ontbreekt de NO₂ stap en wordt impliciet verondersteld dat N₂O uit het systeem verdwijnt, waardoor dit niet als elektron acceptor kan fungeren.

De modellering van het denitrificatie proces zoals dat in dit hoofdstuk wordt beschreven is gebaseerd op het feit dat zowel NO₃ als NO₂ en N₂O als elektron acceptor optreden, via een aantal op elkaar volgende reductie reacties:



Bij iedere reductie stap worden elektronen opgenomen, afkomstig van de verbranding van C-bron. Dit betekent dat wanneer NO₃ is uitgeput, de micro organismen niet als gevolg van elektron acceptor gebrek af sterven omdat NO₂ en N₂O de functie van NO₃ kunnen overnemen. Er wordt verondersteld dat er NO₃ assimilatie optreedt onder aerobe en anaerobe omstandigheden; er vindt geen groei meer plaats als NO₃ is uitgeput.

In het denitrificatie model spelen twee vergelijkingen een belangrijke rol: de Michaelis-Menten vergelijking en de Pirt vergelijking. Met de eerstgenoemde vergelijking wordt de relatieve groeisnelheid van de micro organismen berekend met als groeibeperkende factoren voor de aerobe micro organismen gluconaat en O₂ en voor de facultatief anaerobe micro organismen gluconaat en NO₃, NO₂, N₂O. Met de Pirt vergelijking wordt het verbruik van substraat (gluconaat en electron acceptoren O₂, NO₃, NO₂ en N₂O) berekend. In de volgende paragraaf worden beide vergelijkingen besproken.

3.2 DE PIRT VERGELIJKING

Bij de groei van micro organismen wordt substraat gebruikt voor de synthese van nieuw celmateriaal (S)_g en voor het onderhoud van de cellen (S)_m. De groei opbrengst Y van het organisme welke gedefinieerd wordt als de hoeveelheid substraat vastgelegd in de biomassa per hoeveelheid substraat dat wordt verbruikt, wordt gegeven door de volgende vergelijking (Pirt, 1965):

$$Y = \frac{\Delta B}{(\Delta S)_g + (\Delta S)_m} \quad (3.1)$$

waarin: B = hoev. biomassa
(g C-biomassa/l)
 Y = groei opbrengst
(g C-biom./ (g S . l))

Als er geen substraat voor onderhoud nodig zou zijn, reduceert vergelijking (3.1) tot:

$$Y_{mx} = \frac{\Delta B}{(\Delta S)_g} \quad (3.2)$$

Y_{mx} wordt de werkelijke groeiopbrengst genoemd.

De substraat balans wordt gegeven door:

$$\begin{pmatrix} \text{totale substraat} \\ \text{consumptiesnelheid} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \text{substraat} \\ \text{consumptie snelheid} \\ \text{voor onderhoud} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \text{substraat} \\ \text{consumptie snelheid} \\ \text{voor groei} \end{pmatrix}$$

$$(dS/dt) = (dS/dt)_m + (dS/dt)_g \quad (3.3)$$

Als er vanuit wordt gegaan dat de biomassa exponentieel groeit, wordt de bruto groeisnelheid gegeven door de volgende vergelijking:

$$\left(\frac{dB}{dt}\right) = u \cdot B \quad (3.4)$$

waarin: $(dB/dt)b$ = bruto groeisnelheid
 (g C-biomassa.l⁻¹.hr⁻¹)
 u = relatieve groeisnelheid
 (hr⁻¹)

Met de substituties:

$$dS/dt = -u \cdot B/Y; (dS/dt)m = -m \cdot B \text{ en } (dS/dt)g = -u \cdot B/Y_{mx}$$

waarin m = onderhoudscoefficient

volgt uit (3.3):

$$\frac{1}{Y} = -\frac{m}{u} + \frac{1}{Y_{mx}} \quad (3.5)$$

of

$$\frac{dS}{dt} = -B \cdot \left(m + \frac{u}{Y_{mx}}\right) \quad (\text{Pirt vergelijking}) \quad (3.6)$$

Uit vergelijking (3.6) blijkt dat Y_{mx} de maximale celopbrengst is, dit is de opbrengst die bereikt zou worden als er geen substraat nodig zou zijn voor celonderhoud. Wanneer m en Y_{mx} constanten zijn levert de grafiek waarin $1/Y$ tegen $1/u$ is uitgezet, een rechte lijn op met helling m en intercept $1/Y_{mx}$. Uit het experimenteel gemeten verband tussen de relatieve groeisnelheid en de celopbrengst kunnen m en Y_{mx} bepaald worden.

In het simulatie model wordt de Pirt vergelijking gebruikt voor zowel C-substraat verbruik als voor het elektron acceptor verbruik (O₂ of NO₃, NO₂ en N₂O).

Naast groei van biomassa, vindt er ook afbraak plaats. De afbraak snelheid kan worden afgeleid uit de Pirt vergelijking. Als $(dS/dt)=0$ dan volgt uit deze vergelijking:

$$B.m = \frac{u.B}{Y_{mx}} = \frac{(dB/dt)_a}{Y_{mx}} \quad (3.7)$$

of

$$\left(\frac{dB}{dt} \right)_a = m * Y_{mx} * B = k * B \quad (3.7)$$

waarin: $(dB/dt)_a$ = afbraak- en omzettings snelheid
van koolstof
(g C-bio/(1.hr))
 k = relatieve celafbouwsnelheid (hr-1)

De relatieve celafbouw snelheid (k) wordt berekend met: $k = (m*Y_{mx})$, dit is de hoeveelheid celkoolstof die per gram celkoolstof per uur wordt omgezet t.g.v. onderhoud en afsterving van celmateriaal.

De netto groeisnelheid van de biomassa is het verschil tussen de bruto groeisnelheid (vgl. 3.4) en de afbraak- en omzettingssnelheid (vgl. 3.7):

$$\left(\frac{dB}{dt} \right)_n = u*B - (m*Y_{mx})*B \quad (3.8)$$

waarin: $(dB/dt)_n$ = netto groeisnelheid
(g C-bio/(1.hr))

3.3 DE MICHAELIS MENTEN VERGELIJKING

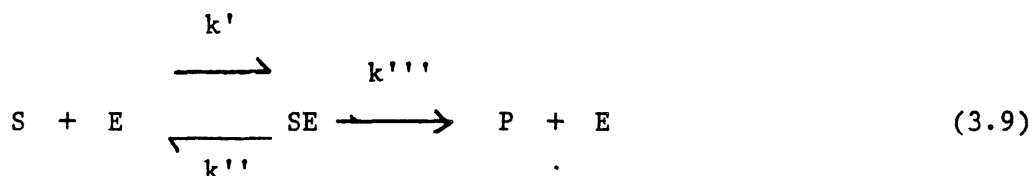
3.3.1 Een Groeibeperkende Factor

In de vorige paragraaf is vermeld dat de groeisnelheid verondersteld wordt evenredig te zijn met de hoeveelheid micro organismen:

$$(dB/dt) = u.B \quad (3.4)$$

De relatieve groeisnelheid u uit deze vergelijking wordt berekend met de Michaelis-Menten vergelijking waarvan hier de afleiding volgt.

Er wordt uitgegaan van de veronderstelling dat het substraat S via een enzymreactie wordt omgezet in een of ander celprodukt P . Deze reactie wordt als volgt weergegeven:



Voor het enzym substraat complex geldt:

$$(d[SE]/dt) = k' \cdot [S] \cdot [E] - k'' \cdot [SE] - k''' \cdot [SE]$$

Met de steady state benadering ($d[SE]/dt=0$) volgt hieruit dat:

$$[S] \cdot [E] / [SE] = (k'' + k''') / k' \quad (3.10)$$

Er wordt aangenomen dat de snelheid van de formatie van SE uit vrij enzym en substraat, gelijk is aan de snelheid van conversie van SE naar $E+P$. Dit betekent dat de concentratie $[SE]$, voor een relatief korte tijd tijdens de duur van de experimentele meting van de reactie snelheid, constant wordt verondersteld. Er geldt dus $d[SE]/dt=0$ (steady state benadering, zie Chang, 1977). Aan het steady state criterium wordt voldaan als de snelheid van de concentratie

verandering van een intermediair zeer klein is ten opzichte van die van de reactanten en produkten.

Voor de totale hoeveelheid enzym $[Et]$ geldt:

$$[Et] = [E] + [SE] \quad (3.11)$$

Expliciet schrijven van $[E]$ in (3.11), substitutie ervan in (3.10) en herrangschikking levert:

$$\frac{[ES]}{[Et]} = \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (3.12)$$

waarin: K_s = Michaelis-Menten constante
 $((k' + k'')/k')$ (mol.l⁻¹)

Voor de relatieve groeisnelheid u wordt aangenomen dat:
 $u = k''' [ES]$. De maximum relatieve groeisnelheid $u_{max} = k''' [Et]$ wordt alleen bereikt indien de totale hoeveelheid enzym is omgezet in ES-complex. Voor de volledigheid zou nog een vermenigvuldigingsfactor moeten worden toegevoegd met de dimensie (l.mol⁻¹) omdat u , u_{max} , en k''' de dimensie (s⁻¹) hebben en $[ES]$ en $[Et]$ de dimensie (mol.l⁻¹). Dit is hier echter niet gedaan omdat deze in vgl. (3.13) weer wegvalt. Hiermee volgt uit vergelijking (3.12):

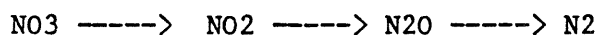
$$\frac{[ES]}{[Et]} = \frac{k''' [ES]}{k''' [Et]} = \frac{u}{u_{max}} = \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten vgl.}) \quad (3.13)$$

K_s is de substraat concentratie waarbij geldt: $u = 0.5 u_{max}$. De Michaelis-Menten vergelijking zoals die hier is afgeleid, geldt voor de situaties waarin de relatieve groeisnelheid van een micro organisme slechts afhankelijk is van de concentratie van een substraat. In het simulatiemodel wordt echter aangenomen dat twee substraten groeibeparend zijn, dit betreft de C-bron en de elektron acceptor. Onder aerobe omstandigheden zijn dit resp. koolstof en zuurstof en onder anaerobe omstandigheden koolstof en stikstof (NO₃, NO₂ en N₂O). In de volgende paragraaf wordt hierop nader ingegaan.

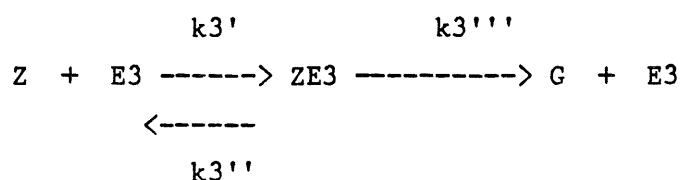
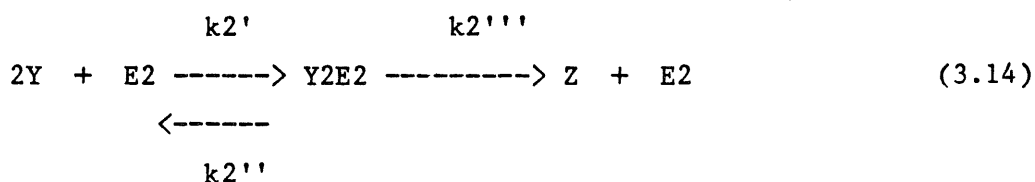
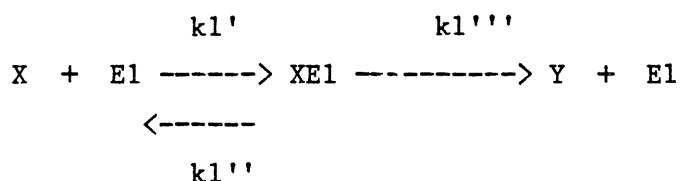
3.3.2 Competitieve Michaelis-Menten Vgl.

Onder anaerobe omstandigheden is stikstof (c.q. NO₃, NO₂ en N₂O) groeibeperkend omdat het in dit geval als elektronacceptor gaat fungeren. Hierbij wordt de situatie gecompliceerd omdat naast NO₃, ook NO₂ en N₂O als elektron acceptor in aanmerking komen. Het micro organisme kan dan uit een aantal N-elektron acceptoren kiezen, m.a.w. er wordt verondersteld dat er competitie is tussen de verschillende N-verbindingen om als elektron acceptor te fungeren. Voor dit geval is in het simulatie model gebruik gemaakt van het model van Cho & Mills (1979).

Deze hebben vergelijkingen afgeleid waarmee de kinetiek van de verschillende denitrificatiestappen kan worden berekend, hierbij maakten ze gebruik van een competitieve Michaelis-Menten formulering voor de denitrificatie reeks, zoals is gegeven door de volgende reactie vergelijkingen:



Ze gingen van de veronderstelling uit dat iedere denitrificatie stap volgens een enzymatische reactie verloopt:



De bijbehorende snelheidsvergelijkingen zijn:

$$d(X)/dt = -k_1'(X)(E_1) + k_1''(XE_1)$$

$$d(Y)/dt = k_1'''(XE_1) + 2k_2''(Y_2E_2) - 2k_2'(Y)^{**2}(E_2)$$

$$d(Z)/dt = k_2'''(Y_2E_2) + k_3''(ZE_3) - k_3'(Z)(E_3) \quad (3.15)$$

$$d(G)/dt = k_3'''(ZE_3)$$

Hierbij zijn X, Y, Z en G respectievelijk NO₃, NO₂, N₂O en N₂. E₁, E₂ en E₃ zijn de enzymen die zich combineren met respectievelijk NO₃, NO₂ en N₂O; XE₁, Y₂E₂ en ZE₃ zijn de resp. enzym-substraat complexen. Toepassing van de steady state benadering op de enzym substraat complexen, na het uitschrijven van de (d(XE)/dt), (d(Y₂E₂)/dt) en (d(ZE₃)/dt) vergelijkingen, (analoog aan de vergelijkingen (3.15)) resulteert in:

$$(XE_1) = \frac{k_1'}{k_1'' + k_1'''} (X)(E_1)$$

$$(Y_2E_2) = \frac{k_2'}{k_2'' + k_2'''} (Y)^{**2}(E_2) \quad (3.16)$$

$$(ZE_3) = \frac{k_3'}{k_3'' + k_3'''} (Z)(E_3)$$

Substitutie van vergelijking groep (3.16) in (3.15) geeft:

$$d(X)/dt = -k_1'''(XE_1)$$

$$d(Y)/dt = k_1'''(XE_1) - 2k_2'''(Y_2E_2) \quad (3.17)$$

$$d(Z)/dt = k_2'''(Y_2E_2) - k_3'''(ZE_3)$$

$$d(G)/dt = k_3'''(ZE3)$$

Vergelijkingen (3.17) vormen een algemene vorm van kinetische uitdrukkingen welke sequentiele reacties beschrijven die gekatalyseerd worden door drie onafhankelijke enzymen. De denitrificatie intensiteit R kan worden uitgedrukt als:

$$R = k_1'''(XE1) + k_2'''(Y2E2) + k_3'''(ZE3) \quad (3.18)$$

De fysische betekenis van R correspondeert met de produktie snelheid van de som van NO₂, N₂O en N₂ als resultaat van het reductie proces van hun voorgangers (resp. NO₃, NO₂ en N₂O).

De beperkende conditie gegeven door vergelijking (3.18), moet opgenomen worden in vergelijking (3.17). Dit wordt bewerkstelligd door vergelijking (3.17) te vermenigvuldigen met R en te delen door de rechterzijde van vergelijking (3.18):

$$\frac{d(X)}{dt} = \frac{-k_1(X)R}{\text{NOEM}}$$

$$\frac{d(Y)}{dt} = \frac{[k_1(X) - 2k_2(Y)**2]R}{\text{NOEM}} \quad (3.19)$$

$$\frac{d(Z)}{dt} = \frac{[k_2(Y)**2 - k_3(Z)]R}{\text{NOEM}}$$

$$\frac{d(G)}{dt} = \frac{k_3(Z)R}{\text{NOEM}}$$

waarin:

$$NOEM = k_1(X) + k_2(Y)^2 + k_3(Z)$$

$$\begin{aligned} k_1 &= \frac{k_1'k_1'''(E_1)}{k_1'' + k_1'''} \\ k_2 &= \frac{k_2'k_2'''(E_2)}{k_2'' + k_2'''} \\ k_3 &= \frac{k_3'k_3'''(E_3)}{k_3'' + k_3'''} \end{aligned} \quad (3.20)$$

De variabelen k_1 , k_2 en k_3 kunnen worden gezien als wegingsfactoren voor de competitie tussen de elektron acceptoren. De vergelijkingen hiervoor (vgl. 3.20) bevatten constanten en variabelen waarvan de waarden niet bekend zijn, en zijn daarom minder geschikt voor het simulatie model. Daarom worden deze zodanig herschreven dat vergelijkingen ontstaan met (herkenbare) Michaelis-Menten constanten. Hiertoe wordt voor k_1 (voor k_2 en k_3 is de afleiding analoog) uitgegaan van de volgende vergelijking (zie vgl. 3.13):

$$u_1 = k_1'''(XE_1) = (u_{max1} * X / (K_{s1} + X)) \quad (3.21)$$

$$u_{max1} = k_1'''[(XE_1) + (E_1)] \quad (3.22)$$

Het verschil van vergelijking (3.21) en (3.22) geeft:

$$\begin{aligned} k_1'''(E_1) &= u_{max1} - u_1 \\ " &= u_{max1} - (u_{max1} * X / (K_{s1} + X)) \end{aligned} \quad (3.23)$$

Onder dezelfde noemer brengen levert:

$$" = \frac{u_{max1} * K_{s1}}{K_{s1} + X}$$

$$K_{s1} + X$$

Substitutie van $K_s = ((k' + k'')/k')$, (zie vgl. 3.12), in vergelijking (3.20) levert:

$$k_1 = \frac{k_1' k_1'' (E_1)}{k_1' + k_1''} = \frac{k_1'' (E_1)}{K_{s1}} \quad (3.24)$$

Substitutie van vergelijking (3.23) in (3.24) geeft dan voor k_1 :

$$k_1 = \frac{u_{\max 1}}{K_{s1} + X} \quad (3.25)$$

Op analoge wijze wordt de vergelijking voor k_3 verkregen; de afleiding voor k_2 is gegeven in bijlage C.

$$k_2 = \frac{u_{\max 2}}{K_{s2} + (Y^{**2})} \quad (3.25)$$

$$k_3 = \frac{u_{\max 3}}{K_{s3} + Z}$$

Deze vergelijkingen zijn identiek aan de vergelijkingen (3.20) maar bevatten nu de bekende variabelen X, Y en Z en de Michaelis Menten constanten $u_{\max}$ en K_s .

Door numerieke integratie van vergelijking (3.19) kunnen op ieder tijdstip t de hoeveelheden NO_3 , NO_2 , N_2O en N_2 worden berekend.

Cho & Mills (1979) hebben dit voor verschillende beginconcentraties van NO_3 gedaan. Hierbij namen ze arbitraire, constante waarden aan voor k_1 , k_2 en k_3 , terwijl uit het voorgaande blijkt dat deze afhankelijk zijn van de concentraties van de individuele N-componenten. Aangezien ze verondersteld hadden dat de microbiele activiteit en dus ook de denitrificatie intensiteit R tijdens het denitrificatie proces constant bleef, konden ze ook voor R

een arbitraire waarde nemen. Helaas gaan ze in hun artikel niet in op de motivering van hun keuze voor deze constanten.

Uit hoofdstuk 2 bleek dat de tijdelijke accumulatie van NO₂ en N₂O tijdens de denitrificatie van NO₃ naar N₂, zoals o.a. is gemeten door Cooper & Smith (1963), ook wordt berekend met de vergelijkingen van Cho & Mills, ondanks het gebruik van constante k-waarden. In het simulatie model is toch gekozen voor het gebruik van variabele k-waarden (vgl 3.25), omdat dit een reelere benadering geeft van de competitie tussen de verschillende N-componenten. Bovendien wordt door de toepassing van vergelijking (3.25) voorkomen dat arbitraire waarden voor k₁, k₂ en k₃ moeten worden gekozen.

3.4 TOEPASSING VAN DE VERGELIJKINGEN IN HET SIMULATIEMODEL

3.4.1 Anaerobe Omstandigheden

3.4.1.1 De Berekening Van R In Vergelijking (3.19) -

Bij de afleiding van vergelijking (3.19) is uitgegaan van een constante microbiele aktiviteit. In de experimenten van Leffelaar treedt echter microbiele groei op, zodat de denitrificatie intensiteit tijdens het experiment toeneemt. Daarom wordt hier de vergelijking afgeleid die in het simulatie model gebruikt wordt om R als functie van de microbiele biomassa te berekenen.

De energie die vrijkomt bij de verbranding van organische stof wordt door de bacterien gebruikt voor hun groei en onderhoud. Bij deze verbranding komen elektronen vrij die via de ademhalingsketen worden opgenomen door een terminale elektronacceptor. Hiervoor wordt onder aerobe omstandigheden O₂ gebruikt. Onder anaerobe omstandigheden vindt denitrificatie plaats waarbij NO₃, NO₂ en N₂O als elektron acceptor fungeren. Hierbij is de denitrificatie intensiteit de som van de snelheden waarmee NO₃, NO₂ en N₂O worden verbruikt.

Als er geen groei van micro organismen optreedt, blijft de denitrificatie intensiteit tijdens het denitrificatie proces constant omdat er dan alleen N wordt gedissimileerd voor onderhoud van het

aanwezige celmateriaal. Bij microbiele groei echter wordt tevens een hoeveelheid N gedissimileerd om energie te leveren voor de synthese van nieuw celmateriaal. In dit geval neemt de denitrificatie intensiteit toe omdat zowel voor de groei als voor het onderhoud van de micro organismen steeds meer N wordt gedissimileerd.

Voor de berekening van de denitrificatie intensiteit R wordt uitgegaan van de Pirt vergelijking:

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{u.B}{Y_{mx}} - B.m \quad (3.6)$$

waarin: S = NO₃, NO₂ of N₂O

De eerste term van het rechter lid van deze vergelijking geeft de snelheid aan waarmee N-substraat (NO₃, NO₂ of N₂O) wordt gereduceerd t.g.v. microbiele groei. De tweede term geeft de snelheid aan waarmee N-substraat wordt verbruikt t.b.v. onderhoud.

De som van de reductiesnelheden van NO₃, NO₂ en N₂O t.g.v. microbiele groei wordt gegeven door:

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{u_{max1}.X}{K_{s1} + X} \frac{B}{Y_{mx1}} - \frac{u_{max2}.Y^{*2}}{K_{s2} + Y^{*2}} \frac{B}{Y_{mx2}} - \frac{u_{max3}.Z}{K_{s3} + Z} \frac{B}{Y_{mx3}} \quad (3.26)$$

waarin: Y_{mx} = maximale celopbrengst

X, Y en Z = resp. NO₃, NO₂ en N₂O

De variabelen met de indexen 1, 2 en 3 hebben betrekking op resp. NO₃, NO₂ en N₂O.

en de som van de reductiesnelheden t.g.v. onderhoud:

$$\frac{dS}{dt} = -(B.m1 + B.m2 + B.m3) \quad (3.27)$$

De som van vergelijking (3.26) en (3.27) levert de denitrificatie intensiteit R:

$$R = -\frac{dS}{dt}g + -\frac{dS}{dt}m \quad (3.28)$$

De netto reductie snelheid van een N-component wordt berekend uit de reductie snelheid van de voorgaande N-component en de reductie snelheid van de N-component zelf (vgl 3.19):

netto reductie snelheid van de N-comp.	reductie snelheid van de voorgaande N-comp.	reductie snelheid van de N-component
$\frac{d(X)}{dt}$	$=$	$\frac{-k_1(X)R}{NOEM}$
$\frac{d(Y)}{dt}$	$=$	$\frac{k_1(X)R}{NOEM} - \frac{[2k_2(Y)**2]R}{NOEM}$
$\frac{d(Z)}{dt}$	$=$	$\frac{[k_2(Y)**2]R}{NOEM} - \frac{k_3(Z)R}{NOEM}$

Zo wordt bijvoorbeeld de netto snelheid van NO2 (=Y) berekend uit het verschil tussen de reductie snelheid van NO3 (=X) en NO2.

3.4.1.2 Groeiselheid Van De Biomassa -

Voor de bruto groeiselheid van de biomassa onder anaerobe omstandigheden kan vergelijking (3.4) niet gebruikt worden omdat deze snelheid afhankelijk is van de reductie snelheden van NO₃, NO₂ en N₂O (vgl. 3.19). De bruto groeiselheid wordt daarom berekend met de vergelijking van de reductiesnelheid van de N-componenten uit bovenstaande tabel (3de kolom) en de celopbrengst coefficient (Y_{mx}). De groeiselheid wordt berekend met de bij de groei behorende fractie van de reductie snelheid:

$$\frac{dB}{dt} = \frac{(dS/dt)_{g,i}}{(dS/dt)_{g,i} + (dS/dt)_{m,i}} \cdot (dS/dt)_i \cdot Y_{mx,i} \quad (3.29)$$

waarin: i = N-component (NO₃, NO₂ of N₂O)

(dB/dt)_i = bruto groei snelheid op N-component i

(dS/dt)_i = reductie snelheid van N-comp. i

(dS/dt)_{g,i} = reductie snelheid van N-comp. i t.g.v. groei

(dS/dt)_{m,i} = reductie snelheid van N-comp. i t.g.v. onderhoud

Y_{mx,i} = celopbrengst coefficient van N-comp. i

3.4.2 Groei van de Biomassa en elektron acceptor verbruik onder aerobe omstandigheden

Voor de bruto groeiselheid van de aerobe en facultatief anaerobe biomassa onder aerobe omstandigheden wordt gebruik gemaakt van vergelijking (3.4).

Voor groei van de facultatief anaerobe biomassa onder aerobe omstandigheden wordt de relatieve groeiselheid beschreven door de

Michaelis Menten vergelijking met koolstof als groeibeperkende factor. Beneden een bepaald zuurstof gehalte wordt verondersteld dat de relatieve groeisnelheid lineair afneemt volgens een bepaalde reductie faktor.

Voor de groei van de strikt aerobe biomassa wordt aangenomen dat zowel koolstof als zuurstof als groeibeperkende factoren optreden; de relatieve groeisnelheid wordt hierbij beschreven met een dubbele Michaelis Menten vergelijking.

Het O₂-verbruik door de strikt aerobe en facultatief anaerobe biomassa wordt berekend met de Pirt vergelijking (vgl. 3.6).

In de onderstaande tabel zijn de in deze paragraaf besproken vergelijkingen die in het simulatiemodel gebruikt zijn voor aerobe en aerobe omstandigheden, naast elkaar gezet.

=====		
	Bruto Groei snelheid	Elektron acceptor verbruik

Aeroob	3.4	3.6
Anaeroob	3.29	3.19

3.5 DENITRIFICATIE MODEL

3.5.1 Inleiding

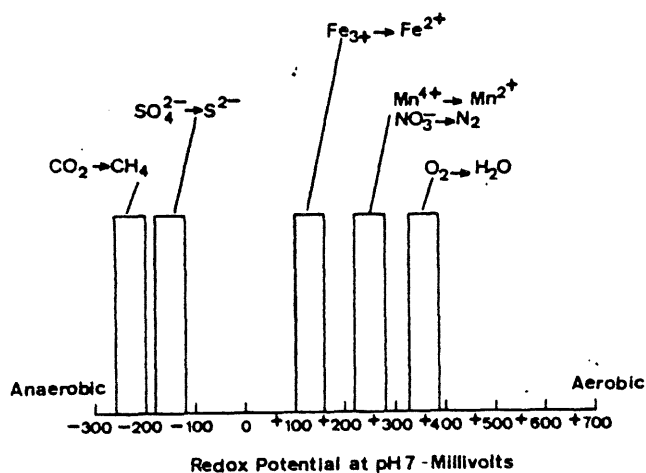
In het simulatie model wordt er vanuit gegaan dat het denitrificatieproces plaatsvindt in een afgesloten, homogeen bodemsysteem, waarin geen aan- en afvoer van gassen, water en opgeloste stoffen plaatsvindt. Dit heeft als consequentie dat N₂O blijvend beschikbaar is als elektron acceptor. In de beginsituatie is het systeem verzadigd met water waarin zuurstof, gluconaat en NO₃ zijn

opgelost. In de grond is een strikt aerobe en een fakultatieve anaerobe biomassa aanwezig.

In het bodemsysteem zullen zich de volgende microbiele processen gaan afspelen. Het gluconaat wordt door de strikt aerobe en facultatief anaerobe micro organismen voor een deel geassimileerd tot nieuw celmateriaal, een ander deel wordt gedissimileerd tot CO₂ en H₂O. Hierbij is als uitgangspunt genomen dat gluconaat volledig wordt ingebouwd of verbrand en dat er geen tussen producten worden gevormd. Zuurstof wordt als elektron acceptor gebruikt.

Als de zuurstof uitgeput raakt, zal de strikt aerobe biomassa niet verder kunnen groeien. Voor de facultatief anaerobe biomassa echter zal NO₃ de rol van O₂ gaan overnemen. Dit wordt dan gereduceerd tot NO₂ en vervolgens tot N₂O en N₂.

Veelal zijn in de grond ook andere verbindingen aanwezig die in aanmerking komen om als elektron acceptor te fungeren. Figuur 3.1 geeft de kritische redox potentialen waarbij verschillende redox systemen in de bodem worden gereduceerd.



Figuur 3.1. Kritische redoxpotentialen waarbij de verschillende redox systemen worden gereduceerd. (Uit: Nielson & MacDonald, 1980).

Hieruit blijkt dat onder aerobe omstandigheden (hoge redox

potentiaal), O_2 wordt gereduceerd tot H_2O . Als O_2 uitgeput raakt, daalt de redoxpotentiaal en komen NO_3 en $MN(IV)$ aan de beurt om gereduceerd te worden. Bij nog lagere potentialen worden $Fe(III)$ - en zwavel verbindingen gereduceerd. In het denitrificatie model wordt aangenomen dat alleen NO_3 , NO_2 en N_2O als elektron acceptor van belang zijn en dat de andere verbindingen in zulke lage concentraties voorkomen dat de reductie ervan verwaarloosbaar klein is.

Naast dissimilatie van NO_3 vindt ook assimilatie plaats. Hierbij wordt aangenomen dat alleen NO_3 als N-assimilatie bron kan fungeren en dat een deel van de geassimileerde stikstof vrij komt t.g.v. mineralisatie van dode biomassa. De microbiele groei stopt als gluconaat en/of nitraat is uitgeput. De N-mineralisatie snelheid uit organische stof van de grond is op nul gesteld omdat wordt aangenomen dat deze verwaarloosbaar klein is t.o.v. de afbraak snelheid van de dode biomassa.

In de volgende paragrafen wordt het denitrificatie model behandeld waarbij 3 situaties worden onderscheiden, t.w.: groei van de facultatief anaerobe biomassa onder aerobe omstandigheden (index 1) en anaerobe omstandigheden (index 2); en groei van de strikt aerobe biomassa (index 3). De vergelijkingen waarvan de micro biologische achtergronden zijn besproken in de vorige paragraaf, komen nogmaals aan de orde waarbij de aandacht is gevestigd op de vertaling ervan in model termen. Voor het CSMP III programma van het simulatie model wordt verwezen naar bijlage A; daarin is tevens een verklarende woordenlijst gegeven van de gebruikte symbolen.

3.5.2 Model - Aeroob

a. Index 1: Facultatief anaerobe biomassa (BIOCF)

In deze en de volgende paragrafen worden in enkele snelheidsvergelijkingen variabelen gebruikt waarvan de naam begint met de letter A. Deze variabelen hebben de waarde 0 als de integraalinhoud van de bijbehorende toestandsvariabele nul is. In de andere gevallen hebben ze de waarde 1. Met deze variabelen kunnen consumptiesnelheden op nul gezet worden als er een of andere component in het systeem is uitgeput. Als er bijvoorbeeld geen gluconaat meer

aanwezig is, moet de snelheid van gluconaatverbruik op nul gesteld worden om te voorkomen dat er negatieve hoeveelheden gluconaat worden berekend.

3.5.2.1 Microbiële Groeisnelheid -

In de beginsituatie is er zuurstof in het bodemsysteem aanwezig dat eerst gebruikt wordt voor de dissimilatie van gluconaat. Onder deze (aerobe) omstandigheden wordt van de veronderstelling uitgegaan dat de relatieve groeisnelheid van de facultatief anaerobe biomassa wordt beschreven met de Michaelis Menten vergelijking waarbij gluconaat de groeibeperkende factor is. De relatieve groeisnelheid is een functie van de temperatuur, deze functie wordt in de Michaelis-Menten vergelijking ingevoerd d.m.v. de temperatuur coefficient TMPK (zie paragraaf 3.6.2). Bovendien is de relatieve groeisnelheid een functie van het zuurstofgehalte, deze neemt onder een bepaald gehalte lineair af via de reductiefactor REDFO2. Deze faktor is nul bij zuurstof concentraties lager dan $1.E-6$ mol/l (zie Greenwood, 1961).

$$UO2(1) = [(UMXO2*GLUC)/(KGLUC+GLUC)] * TMPK * REDFO2$$

Voor de bruto groeisnelheid van de facultatief anaerobe biomassa onder aerobe omstandigheden geldt (zie vgl. 3.4):

$$RBIGG(1) = UO2(1) * BIOCF * AGLUC$$

Hier wordt gesproken over een bruto groeisnelheid omdat er naast de opbouw van nieuw celmateriaal ook celmateriaal wordt omgebouwd en afgebroken. Voor de snelheid van deze afbraak geldt (zie vgl. 3.7):

$$RBIGD(1) = -YMGC(1) * MGC(1) * BIOCF * REDFO2$$

Voor de netto groeisnelheid van de facultatief anaerobe biomassa onder aerobe omstandigheden geldt dan:

$$RBIOCF(1) = RBIGG(1) + RBIGD(1)$$

3.5.2.2 O₂-verbruik En Gluconaat Verbruik -

De snelheid van het zuurstof verbruik wordt berekend met de Pirtvergelijking (vgl. 3.6):

$$RO_2(1) = [(UO_2(1)/Y_{MXO_2}(1)) + MO_2(1)] * REDFO_2 * BIOCF * CONVF$$

De conversiefactor CONVF is ingevoerd om de zuurstof consumptie in mol O₂/(1.hr) uit te drukken. De zuurstof consumptiesnelheid is afhankelijk van de zuurstof concentratie via de faktor REDFO₂. Bij zuurstof concentraties lager dan 1.E-6 mol/l is deze faktor nul, waardoor in dit geval geen zuurstof meer wordt verbruikt en NO₃ in aanmerking komt om de functie van O₂ over te nemen, hierop wordt in de volgende paragraaf teruggekomen.

De snelheid van het gluconaat verbruik wordt ook m.b.v. de Pirt-vergelijking berekend:

$$RGLUC(1) = [(UO_2(1)/Y_{MGC}(1)) + MGC(1)] * BIOCF * REDFO_2 * AGLUC$$

3.5.2.3 CO₂ Produktiesnelheid -

De CO₂ produktiesnelheid wordt berekend uit de koolstofbalans omdat als uitgangspunt is genomen dat er volledige verbranding van gluconaat optreedt. Dit betekent dat de totale hoeveelheid C in het systeem bestaat uit de som van de ingebouwde C en CO₂. Op t=0 is de totale hoeveelheid C aanwezig in de vorm van gluconaat en initiele biomassa. Een deel van de gluconaat wordt gebruikt voor de opbouw van nieuw celmateriaal (BIOCF), het andere deel (BIGD) is betrokken bij

afbraak en ombouwprocessen. Een fraktie (1-FRCO2) hiervan komt terecht in dood celmateriaal:

$$RCBID(1) = -1. * (1. - FRCO2) * RBIGD(1)$$

Een deel (FRC) van de hoeveelheid koolstof uit het dode celmateriaal komt door mineralisatie weer beschikbaar voor de micro organismen:

$$RCMIN(1) = FRC * RCBID(1)$$

het andere deel (1.-FRC) is immobiel en komt op korte termijn niet meer beschikbaar.

$$RCINC(1) = (1. - FRC) * RCBID(1)$$

De produktie snelheid van CO2 wordt gegeven door het verschil tussen de consumptie snelheid van gluconaat en de produktie snelheid van C in levende en dode biomassa:

$$RCO2(1) = RGLUC(1) - RCBID(1) - RBIOCF(1)$$

3.5.2.4 De Nitraatbalans -

Zoals reeds eerder is vermeld, wordt een deel van de aanwezige nitraat gebruikt voor de inbouw in nieuw celmateriaal (NO3-assimilatie). De assimilatie snelheid van N wordt verondersteld evenredig te zijn met de netto groeisnelheid van de biomassa en het N-gehalte ervan:

$$RNO3A = (RBIOCF + RBIOCS) * NNBIO / (NCBIO * MC)$$

Tijdens het afsterven van de biomassa komt de geassimileerde stikstof in dode biomassa terecht:

$$RNBID(1) = -1 * NNBIO / (NCBIO * MC) * RBIGD(1)$$

Hiervan wordt een deel (FRN) gemineraliseerd:

$$RNMIN(1) = FRN * RNBID(1)$$

het andere deel komt niet meer beschikbaar op korte termijn:

$$RNINC(1) = (1.-FRN) * RNBID(1)$$

De snelheidsvergelijkingen worden m.b.v. de methode RKS of RECT geïntegreerd om de concentraties van de verschillende componenten op ieder gewenst tijdstip te berekenen.

b. Index 3: strikt aerobe biomassa

Alleen die vergelijkingen worden behandeld die specifiek voor de strikt aerobe biomassa gelden en zich onderscheiden van de vergelijkingen die in de vorige paragraaf zijn besproken.

Voor de relatieve groeisnelheid van de strikt aerobe biomassa geldt de dubbele Michaelis-Menten vergelijking met gluconaat en zuurstof als groeibeperkende factoren:

$$UO2(3) = ((UMXO2*GLUC*O2)/((KGLUC+GLUC)*(KO2+O2)))*TMPK$$

Onder een bepaalde zuurstof concentratie kunnen deze micro organismen niet overschakelen op de dissimilatie van NO3 waardoor de groei stopt. De snelheid van de O2 consumptie wordt berekend met Pirt vergelijking:

$$RO2(3) = (UO2(3)/YMXO2(2)+MO2(2)*AO2)*BIOCS*CONVF$$

3.5.3 Model Anaeroob

Index 2: Facultatief anaerobe biomassa

Onder anaerobe omstandigheden (O_2 concentratie $< 1.E-6$ mol/l) wordt verondersteld dat zowel de koolstof bron als de stikstofbron als groeibeperkende faktor optreden. De relatieve groeisnelheid op een N-component i (NO_3 , NO_2 of N_2O) wordt berekend met de dubbele Michaelis-Menten vergelijking:

$$u_{,i} = \frac{u_{max,i} * N_{,i}}{K_{s,i} + N_{,i}} * \frac{C}{K_c + C}$$

De bruto groeisnelheid van de biomassa zou nu berekend kunnen worden met de som van de relatieve groeisnelheden op de drie N-componenten. Uit paragraaf 3.3.2 bleek echter dat dit niet mogelijk is omdat ten eerste rekening moet worden gehouden met de reactie reeks waarin NO_3 via de intermediairen NO_2 en N_2O tot N_2 wordt gereduceerd, en ten tweede omdat er competitie plaats vindt tussen de N-componenten om als elektron acceptor op te treden.

In paragraaf 3.3.2 is uiteengezet hoe de denitrificatie snelheden van de N-componenten wordt berekend. Vergelijking (3.19) wordt als volgt in modelsymbolen weergegeven:

$$\begin{aligned} R_{NNO_3} &= (-K_1 * NO_3 * RTOT) / NOEM \\ R_{NNO_2} &= ((K_1 * NO_3 * ANO_3 - 2 * K_2 * NO_2 * ANO_2) * RTOT) / NOEM \\ R_{NN_2O} &= ((K_2 * NO_2 * ANO_2 - K_3 * N_2O * AN_2O) * RTOT) / NOEM \\ R_{NN_2} &= (K_3 * N_2O * AN_2O * RTOT) / NOEM \end{aligned}$$

RTOT is de som van de consumptie snelheden van de N-substraten t.g.v. microbiele groei (GR) en onderhoud (MR). De eerste snelheid wordt berekend met (zie ook vgl. 3.26):

$$\begin{aligned} UNO_3 &= (UMXNO_3 * NO_3 * GLUC * TMPK) / ((KNO_3 + NO_3) * (KGLUC + GLUC)) \\ UNO_2 &= (UMXNO_2 * GLUC * TMPK * (NO_2)^2) / ((KNO_2 + (NO_2)^2) * (KGLUC + GLUC)) \\ UN_2O &= (UMXN_2O * N_2O * GLUC * TMPK) / ((KN_2O + N_2O) * (KGLUC + GLUC)) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{GRN03} &= \text{UN03} * (\text{BIOCF} / \text{YMXN03}) * \text{CONVF} * \text{AGLUC} * \text{AN03} \\ \text{GRN02} &= \text{UN02} * (\text{BIOCF} / \text{YMXN02}) * \text{CONVF} * \text{AGLUC} * \text{AN02} \\ \text{GRN20} &= \text{UN20} * (\text{BIOCF} / \text{YMXN20}) * \text{CONVF} * \text{AGLUC} * \text{AN20} \end{aligned}$$

$$\text{GRN} = (\text{GRN03} + \text{GRN02} + \text{GRN20}) * (1. - \text{REDF02})$$

De factor $(1 - \text{REDF02})$ is geïntroduceerd omdat verondersteld wordt dat de relatieve groeisnelheden op de N-componenten lineair toenemen als de zuurstof concentratie afneemt (zie paragraaf 3.6.2).

De consumptiesnelheid van N-substraat t.g.v. onderhoud (MRN) wordt berekend volgens (zie ook vgl. 3.27):

$$\begin{aligned} \text{MRN03} &= \text{MN03} * \text{BIOCF} * \text{CONVF} * \text{AN03} \\ \text{MRN02} &= \text{MN02} * \text{BIOCF} * \text{CONVF} * \text{AN02} \\ \text{MRN20} &= \text{MN20} * \text{BIOCF} * \text{CONVF} * \text{AN20} \end{aligned}$$

$$\text{MRN} = (\text{MRN03} + \text{MRN02} + \text{MRN20}) * (1. - \text{REDF02})$$

Ook deze consumptie snelheid is afhankelijk van de zuurstof concentratie via de reductie faktor $(1. - \text{REDF02})$.

De denitrificatie intensiteit $\cdot R$ (model symbool RTOT) wordt berekend met (vgl. 3.28): $\text{RTOT} = \text{GRN} + \text{MRN}$.

De bruto groeisnelheid van de micro organismen wordt berekend met (zie ook vgl. 3.29):

$$\begin{aligned} \text{RBN03} &= (\text{GRN03} / (\text{GRN03} + \text{MRN03}) * \text{RN03} * \text{YMXN03}) / \text{CONVF} \\ \text{RBN02} &= (\text{GRN02} / (\text{GRN02} + \text{MRN02}) * \text{RN02} * \text{YMXN02}) / \text{CONVF} \\ \text{RBN20} &= (\text{GRN20} / (\text{GRN20} + \text{MRN20}) * \text{RN20} * \text{YMXN20}) / \text{CONVF} \end{aligned}$$

De totale bruto groeisnelheid op de N-componenten wordt berekend met:

$$\text{RBIGG}(2) = (\text{RBN03} + \text{RBN02} + \text{RBN20}) * \text{AN03} * (1. - \text{REDF02})$$

Analoog aan de vergelijkingen voor aerobe omstandigheden (paragraaf 3.5.2) geldt voor de celafbraak snelheid en de consumptie snelheid van gluconaat onder anaerobe omstandigheden resp.:

$$\text{RBIGD}(2) = -\text{YMGC}(2) * \text{MGC}(2) * \text{BIOCF} * (1. - \text{REDF02})$$

$$RGLUC(2) = [(UO2(2))/YMGC(2)) + MGC(2)]*BIOCF*(1.-REDFO2)*ANOEM*AGLUC$$

In het model wordt op ieder tijdstip de C en N balans bijgehouden ter controle van het programma:

$$NTOT = NO3 + NO2 + 2*N2O + 2*N2 + NO3A + NINC$$

$$CTOT = CO2 + GLUC + BIOCF + CINC + BIOCS$$

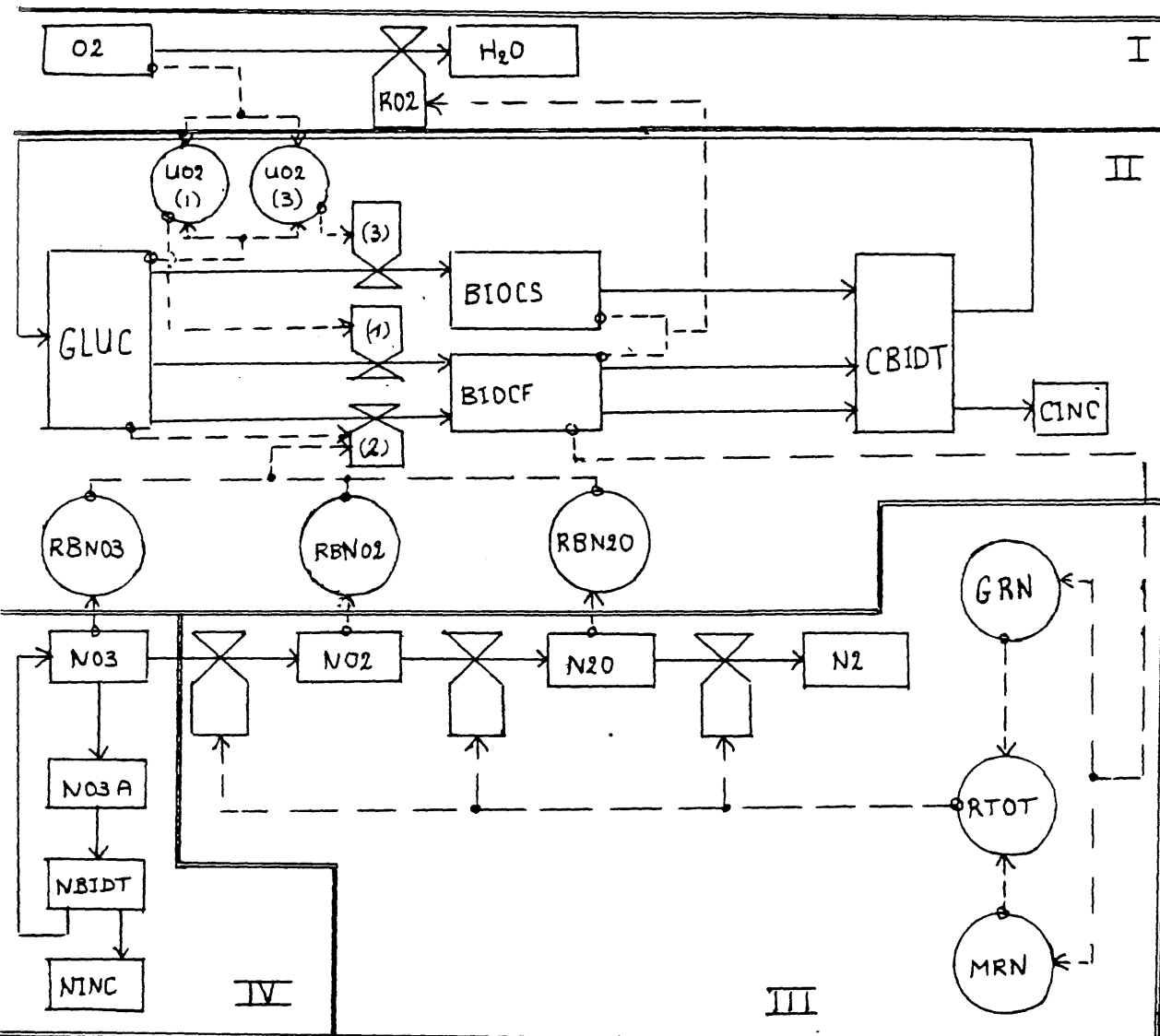
De waarden van NTOT en CTOT blijken gedurende de simulaties constant te blijven, dit geeft aan dat er geen rekenkundige fouten zijn gemaakt in het programma.

3.5.4 Relatie Diagram

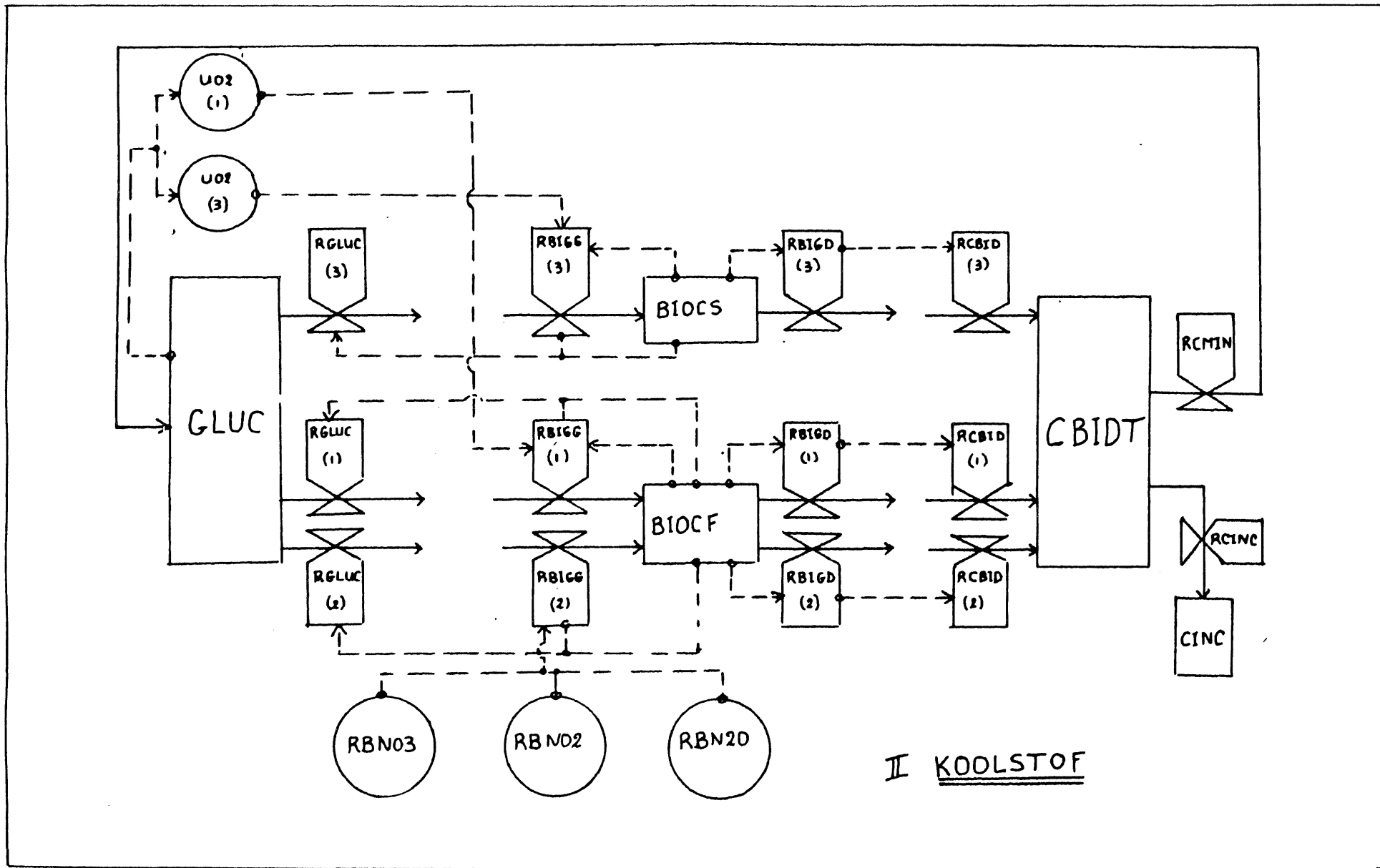
Figuur 3.2 geeft een vereenvoudigd relatie diagram van het denitrificatie model. In het diagram zijn vier blokken te onderscheiden: het zuurstofblok (I), het koolstof blok (II), het N-dissimilatieblok (III) en het N-assimilatie blok (IV). In de figuren 3.3 en 3.4 zijn deze blokken gedetailleerd weergegeven. De indexen (1) en (3) zijn onderscheiden voor respectievelijk de facultatief anaerobe en strikt aerobe biomassa onder aerobe omstandigheden. Index (2) heeft betrekking op de facultatief anaerobe biomassa onder anaerobe omstandigheden.

Onder aerobe omstandigheden wordt voor de verbranding van gluconaat zuurstof als elektronacceptor gebruikt zoals weergegeven in blok I. Hierbij zijn de relatieve groeisnelheden (UO2(1) en UO2(3)) afhankelijk van de zuurstofconcentratie en de gluconaat concentratie. Onder anaerobe omstandigheden vindt denitrificatie van nitraat plaats zoals is weergegeven in blok II en III. De bruto groeisnelheid van de facultatief anaerobe biomassa (RBIGG(2)) is hierbij afhankelijk van de gluconaat concentratie en -via RBN03, RBN02 en RBN20- van de NO3, NO2 en N2O concentraties. In blok IV zijn de assimilatie-, mineralisatie- en incorporatieprocessen van NO3 weergegeven.

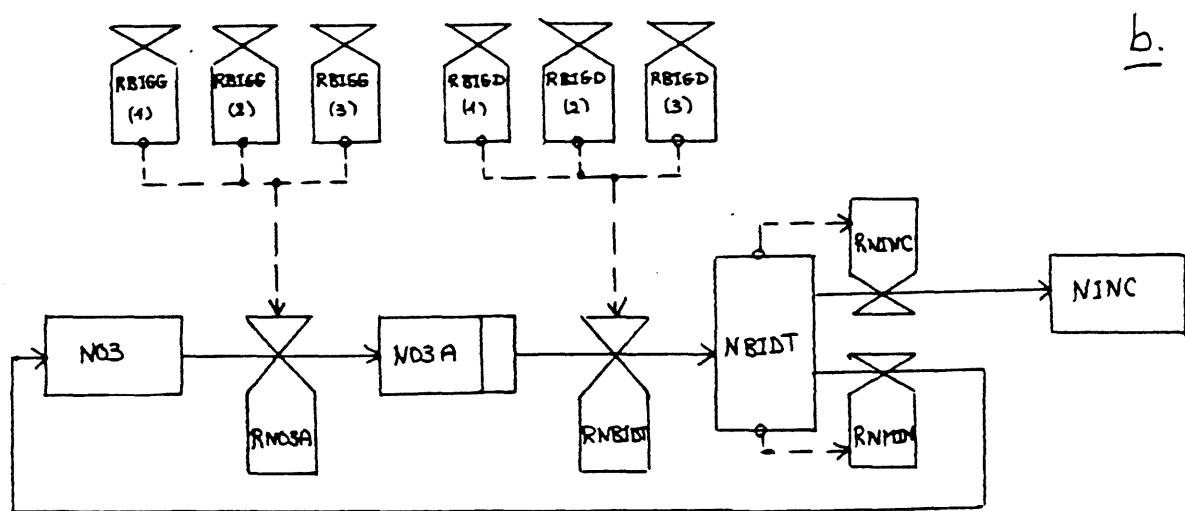
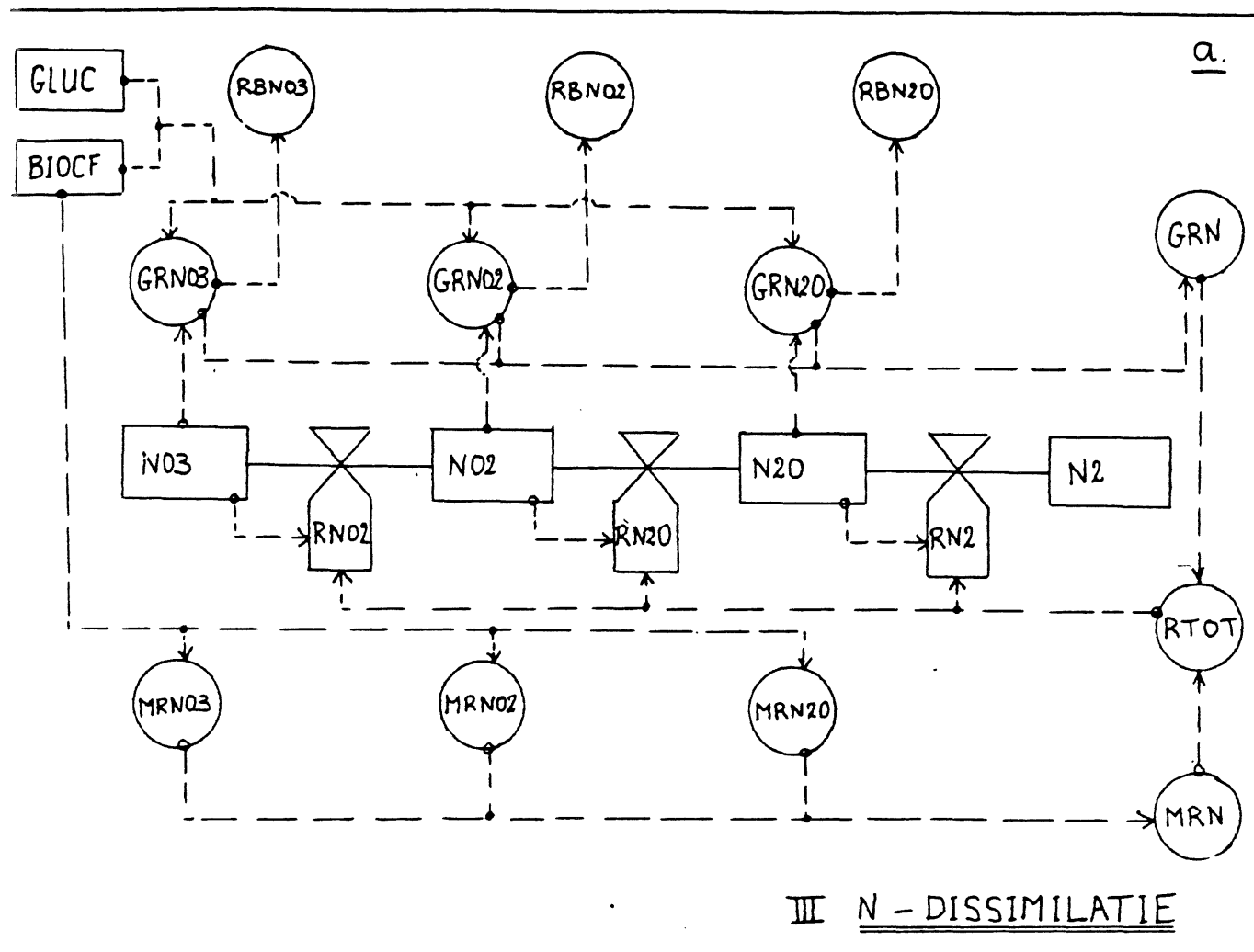
In de relatiediagrammen zijn constanten zoals K1, K2, K3, NNBIO, enz. weggelaten om de diagrammen overzichtelijk te houden. Om deze reden is ook de integraalinhoud CO2C weggelaten.



guur 3.2. Vereenvoudigd relatie diagram van het denitrificatie model.



Figuur 3.3. Relatie diagram van het koolstof blok.



Figuur 3.4.a. Relatie diagram van het N-dissimilatie blok.
b. Relatie diagram van het N-assimilatie blok.

3.6 INITIELE WAARDEN EN PARAMETERWAARDEN

3.6.1 Initiele Waarden

De waarden van de meeste parameters die in het denitrificatie model zijn gebruikt, zijn uit de literatuur verzameld door Baas (1984), deze worden hier in het kort behandeld.

Voor de waarden van IBIOCS en IBIOCF wordt resp. $1.E-2$ en $1.E-3$ gr C/liter bodemoplossing genomen. De initiele zuurstof concentratie in de bodemoplossing wordt berekend met de Wet van Henry, waarbij wordt aangenomen dat de concentratie zuurstof in de bodemoplossing in evenwicht is met de concentratie zuurstof in de atmosfeer (20%). Dit levert voor IO2 een waarde van $2.72E-4$ mol O2/liter.

De waarde van INO3A wordt berekend met het N-gehalte van de initiele aanwezige hoeveelheid biomassa. De initiele waarden INO2, IN2O, IN2, ICO2, ICMIN, ICINC, INMIN en ININC zijn op nul gesteld.

3.6.2 Parameter Waarden

De waarden van UMXN03 en MN03 zijn afkomstig uit de publikatie van van Versseveld et al. (1977). De bepaling ervan vond plaats in een chemostat cultuur (37 C) van Ps. denitrificans. De waarden van YMXN02, YMXN20, MN02 en MN20 zijn geschat uit het artikel van Koike & Hattori (1975b). In dit artikel worden de YMXN en de MN waarden voor groei op glutamaat van Ps. denitrificans gegeven (chemostat cultuur, 30 C). Hieruit blijkt dat de YMXN03 waarde voor groei op gluconaat een factor 0.8 kleiner is dan die voor groei op glutamaat, voor MN03 is deze factor 0.59. De waarden van YMXN02, YMXN20, MN02 en MN20 voor groei op gluconaat zijn geschat door hun glutamaat waarden met deze reductie factoren te vermenigvuldigen.

Tabel 3.1 geeft een overzicht van de waarden van de parameters van de Pirt vergelijking, voor de dimensies wordt verwezen naar bijlage A.

=====										
I										
N	C		O2		NO3		NO2		N2O	
D	-----		-----		-----		-----		-----	
E	YMAXC	MG	YMXO2	MO2	YMXNO3	MNO3	YMXNO2	MNO2	YMXN2O	MN2O
X										

1	77.8	11.E-5	43.4	67.E-5	--	--	--	--	--	--
2	79.7	27.E-5	--	--	25.2	7.7E-4	14.9	9.7E-4	7.8	16.E-4
3	96.0	60.E-5	40.0	10.E-5	--	--	--	--	--	--
=====										

Tabel 3.1. Parameter waarden van de strikt aerobe biomassa
(index 3) en de fac. an. biomassa onder anaerobe (index 2)
en aerobe (index 1) omstandigheden.

De maximale relatieve groeisnelheid onder aerobe omstandigheden bedraagt 0.4 hr⁻¹, deze is onder anaerobe omstandigheden met NO3 als elektron acceptor 0.25 hr⁻¹ (Baas, 1984). Voor de waarden KGLUC en KNO3 worden resp. 1.E-4 g C/liter en 1.E-3 mol NO3/liter gebruikt (Baas, 1984).

Uit de literatuur zijn geen gegevens gevonden m.b.t. Ks en umax waarden voor NO2 en N2O. Deze waarden zullen lager zijn dan die van NO3 omdat bij de reductie van NO3 tot N2 5 elektronen per N-atoom kunnen worden opgenomen, terwijl NO2 en N2O resp. slechts 3 en 1 elektronen worden opgenomen. Er wordt daarom aangenomen dat (UNO3 : UNO2 : UN2O) en (KNO3 : KNO2 : KN2O) zich verhouden als (5 : 3 : 1). Deze veronderstelling levert de volgende schattingen: UMXNO2 = 0.15 hr⁻¹, UMXN2O = 0.05 hr⁻¹; KNO2 = 0.6E-3 mol/l en KN2O = 0.2E-3 mol/l.

Voor de bruto samenstelling van de biomassa wordt de samenstelling van Pa. denitrificans genomen: C6 H10.8 N1.5 O2.9 (v. Versseveld & Stouthamer, 1978). Dit levert voor NCBIO, MBIO en NNBIO resp. 6., 150.2 en 1.5.

Voor de parameters FRN, FRC en FRCO2 zijn geen literatuurwaarden gevonden hiervoor zijn resp. de waarden 0.1, 0.6 en 0.5 aangenomen.

Voor de reductie faktor REDFO2 van de relatieve groeisnelheid als gevolg van zuurstofbeperking is een lineair traject gekozen, gebaseerd op literatuur gegevens waaruit blijkt dat denitrificatie optreedt bij O2-concentraties lager dan $1.E-4$ tot $1.E-6$ mol O2/liter (zie Baas, 1984).

REDFO2 = AFGEN (REDFTB,O2)

FUNCTION REDFTB = (0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1,1.)

Uit gegevens van van Veen (1977) blijkt dat de Q10-waarde voor u_{max} 1.6 tot 2.5 bedraagt. De parameter waarden in het model zijn bepaald bij een temperatuur van $37^{\circ}C$, terwijl wordt gesimuleerd bij $20^{\circ}C$. Als wordt uitgegaan van een Q10-waarde van 2.2, levert dit voor de temperatuur coefficient TMPK:

$$TMPK = \frac{20-37}{10} \log_{10} \left(\frac{2.2}{1} \right) = 0.27$$

HOOFDSTUK 4

RESULTATEN

4.1 INLEIDING

In dit hoofdstuk worden de resultaten besproken van de simulaties.

In paragraaf 4.2 worden allereerst de resultaten van een 'standaard' simulatie besproken. Deze simulatie is uitgevoerd voor omstandigheden waaronder de denitrificatie experimenten van Leffelaar in het laboratorium uitgevoerd gaan worden. Er is gesimuleerd met de volgende parameter waarden (de waarden van de overige parameters zijn reeds besproken in paragraaf 3.6).

IBIOCS	=	1.E-2	(g C/1)
IBIOCF	=	1.E-3	(g C/1)
IGLUC	=	1.5	(g C/1)
IO2	=	2.7E-4	(mol O2/1)
INO3	=	0.06	(mol NO3/1)
TMPK	=	0.27	(-)

In paragraaf 4.3 wordt ingegaan op de gevoeligheid van het model voor enkele parameters.

In paragraaf 4.5 worden de resultaten van het simulatie model

vergeleken met de resultaten van de denitrificatie experimenten van Cooper & Smith (1963), Cho & Sakdinan (1979) en Koike & Hattori (1975a).

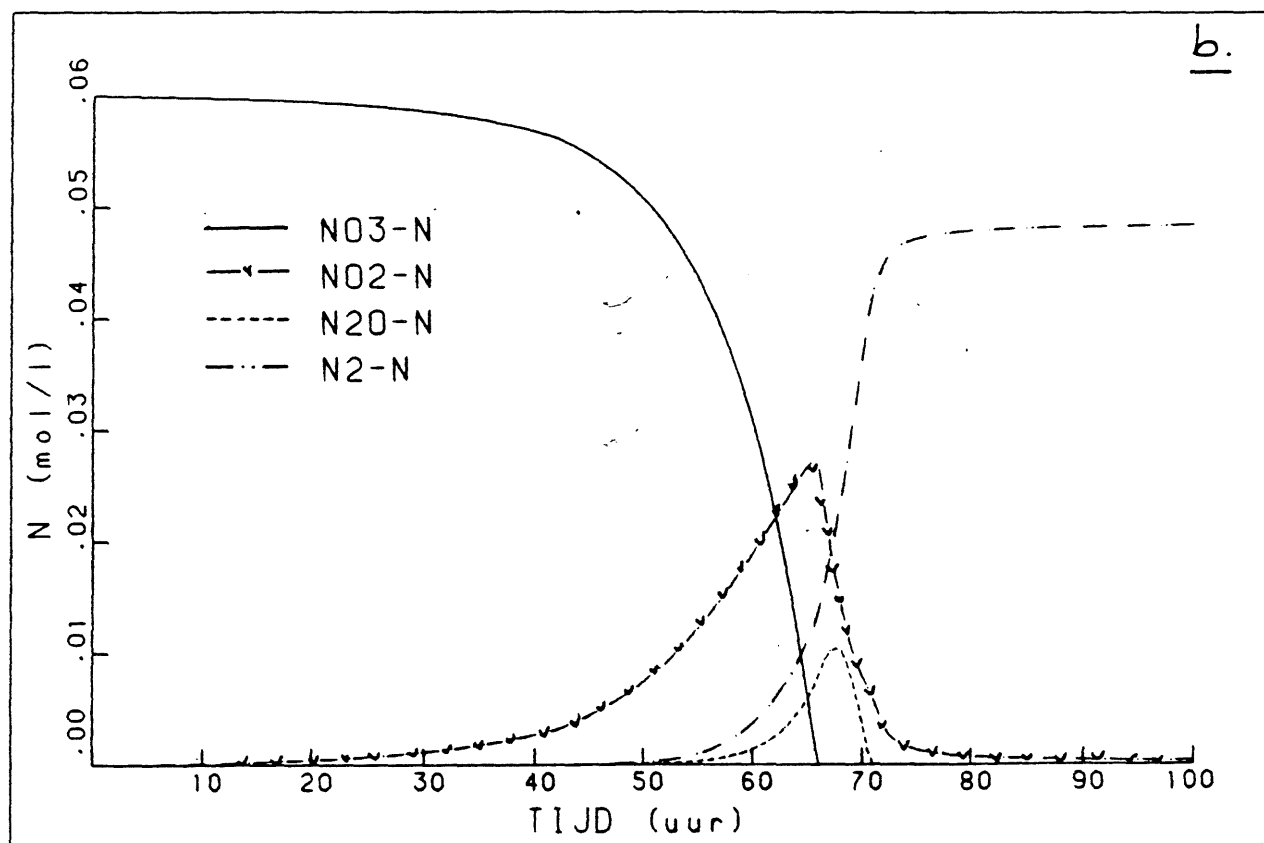
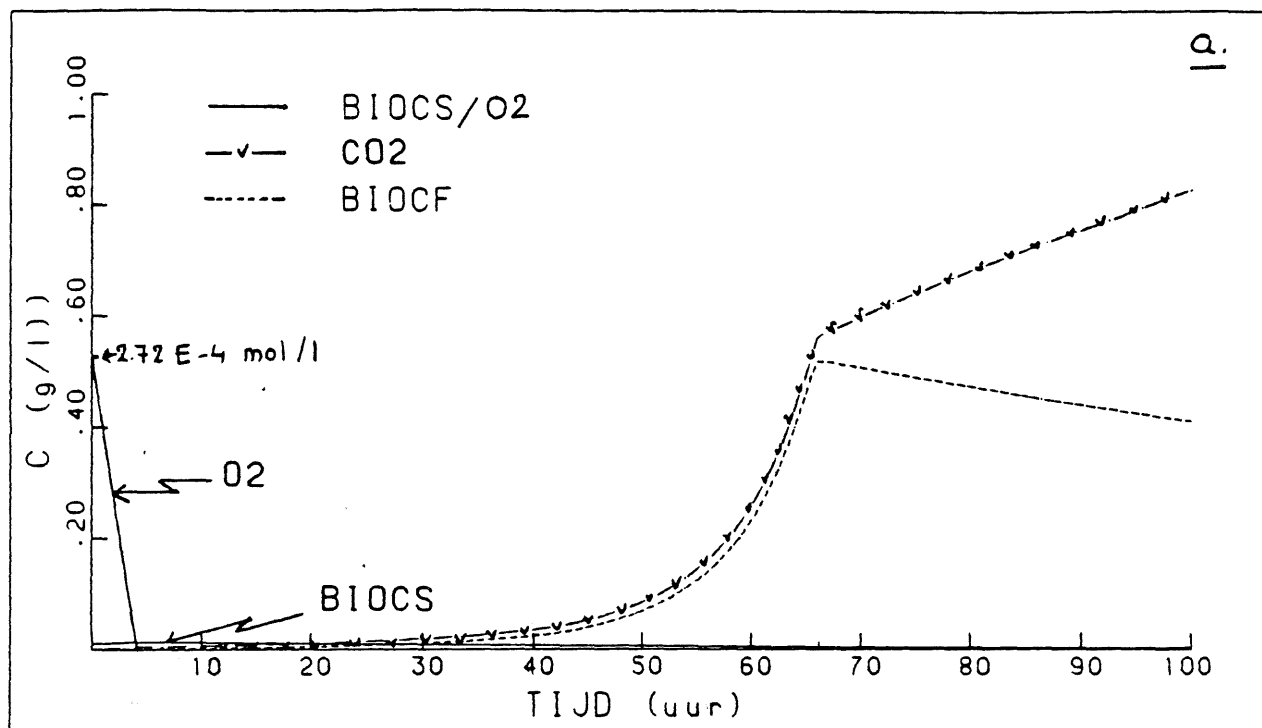
Voor alle simulaties die in dit hoofdstuk worden besproken, zijn de gebruikte parameter waarden en kwantitatieve gegevens van de verschillende variabelen (de FOR06.DAT files) gegeven in bijlage B.

4.2 RESULTATEN VAN DE STANDAARDSIMULATIE

4.2.1 Verloop Van De Hoeveelheid Biomassa

Figuur 4.1a geeft het verloop van de hoeveelheid strikt aerobe (BIOCS) en facultatief anaerobe (BIOCF) biomassa. Hieruit blijkt dat de hoeveelheid strikt aerobe biomassa nauwelijks toeneemt. Dit komt doordat de zuurstof reeds binnen 4 uur is uitgeput. Daarna neemt de hoeveelheid af omdat er dan alleen nog celmateriaal wordt afgebroken. De facultatief anaerobe biomassa groeit exponentieel tot 66 uur. Daarna vindt er geen groei meer plaats omdat alle NO_3 is verbruikt (zie ook fig. 4.1b). De groei van de bacterien wordt niet gelimiteerd door een tekort aan koolstof omdat op het eind van de simulatie (na 100 uur) er nog voldoende (0.24 g C/l) gluconaat in het systeem aanwezig is (zie bijlage B). De produktie snelheid van CO_2 neemt tot 66 uur exponentieel toe, deze is nauw gerelateerd aan de groei van de biomassa. Dit komt doordat bij de groei een deel van de verbruikte gluconaat in de vorm van CO_2 vrijkomt. Na dit tijdstip blijft de CO_2 produktie snelheid constant (hoeveelheid CO_2 neemt lineair toe) omdat er alleen nog CO_2 wordt geproduceerd t.g.v. onderhoud en afbraak van de biomassa.

4.2.2 Concentratie Verloop Van De N Componenten



Figuur 4.1. Resultaten van de standaardsimulatie.

Figuur 4.1b geeft het verloop van de concentraties NO₃, NO₂, N₂O en N₂. Hieruit blijkt dat de NO₃ concentratie exponentieel afneemt en na 66 uur tot nul gereduceerd is. Deze exponentiele afname wordt veroorzaakt door de exponentiele groei van de facultatief anaerobe biomassa, waarbij NO₃ verbruikt wordt t.b.v. assimilatie en dissimilatie. Na 20 uur wordt er NO₂ geaccumuleerd, waarvan de maximum concentratie op t=65 uur wordt bereikt. Daarna neemt de concentratie af omdat dan de omzettingssnelheid van NO₂ groter is dan zijn vormingssnelheid. Uit het verloop van de N₂O-kurve blijkt dat de vorming van N₂O trager verloopt dan de omzetting ervan in N₂. Dit komt doordat voor de vorming van een molecuul N₂O twee NO₂ molekulen nodig zijn, terwijl voor de vorming van N₂ slechts een molecuul N₂O nodig is. Na 68 uur neemt de concentratie N₂O af. De N₂ concentratie neemt exponentieel toe tot t=73 uur, daarna blijft deze constant omdat er dan geen dissimileerbare N-componenten meer in het systeem aanwezig zijn. Uit de hoeveelheid N₂ die uiteindelijk is gevormd, blijkt dat het grootste deel van de NO₃ is omgezet in N₂, het overige deel (17%) is verbruikt voor inbouw in celmateriaal (N-assimilatie).

In voorgaande paragrafen is reeds vermeld dat het denitrificatie proces via de reactie reeks NO₃---->NO₂---->N₂O---->N₂ verloopt. Hierbij zou men kunnen verwachten dat de vorming van de N-intermediairen sequentieel verloopt, d.w.z. dat de vorming van N₂O begint op het moment dat alle NO₃ is omgezet in NO₂, en dat de N₂-vorming begint op het tijdstip dat alle NO₂ is omgezet in N₂O. Uit figuur 4.1b blijkt echter dat de vorming van de verschillende N-intermediairen niet geheel sequentieel verloopt: de produktie van N₂O is reeds begonnen voordat de hoeveelheid NO₃ is uitgeput. Bovendien wordt er al N₂ geproduceerd terwijl er nog NO₃, NO₂ en N₂O in het systeem aanwezig zijn. Het niet-sequentiele verloop komt doordat de netto reductiesnelheid van een N-component bepaald wordt door het verschil tussen zijn vormingssnelheid (dit is reductie snelheid van zijn voorganger in de denitrificatie reeks) en omzettingssnelheid (dit is zijn eigen reductie snelheid). De reductie snelheden worden hierbij niet alleen bepaald door de concentratie waarin de N-componenten aanwezig zijn maar ook door een concentratie afhankelijke wegingsfactor (zie vgl. 3.19 en 3.20), waardoor er een complexe interactie bestaat tussen de concentratie van de N-component

en zijn netto reductie snelheid op een bepaald tijdstip.

In figuur 4.1c is het verloop van de hoeveelheid geassimileerd nitraat weergegeven, deze blijkt maximaal 17 % te bedragen van de totale hoeveelheid nitraat dat tijdens het denitrificatie proces verbruikt wordt. Na 66 uur neemt de hoeveelheid geassimileerd nitraat af t.g.v. afsterving van de biomassa (zie ook figuur 4.1a). Ook is het verloop weergegeven van de hoeveelheid gemineraliseerde stikstof uit dode biomassa (NMIN). Hieruit blijkt dat door mineralisatie maximaal slechts 0.5 % van de totale hoeveelheid verbruikte NO₃ weer tot beschikking komt voor de bacterien. Dit betekent dat de mineralisatie snelheid in relatie tot de omzettings snelheid van NO₃ te klein is om er voor te zorgen dat er via het mineralisatie proces een belangrijke hoeveelheid NO₃ wordt aangevoerd. Uit de NINC curve blijkt dat de hoeveelheid N die na 100 uur is vastgelegd in dood celmateriaal 5 % (=0.003/0.06) bedraagt van de totale hoeveelheid NO₃ die op dat moment verbruikt is.

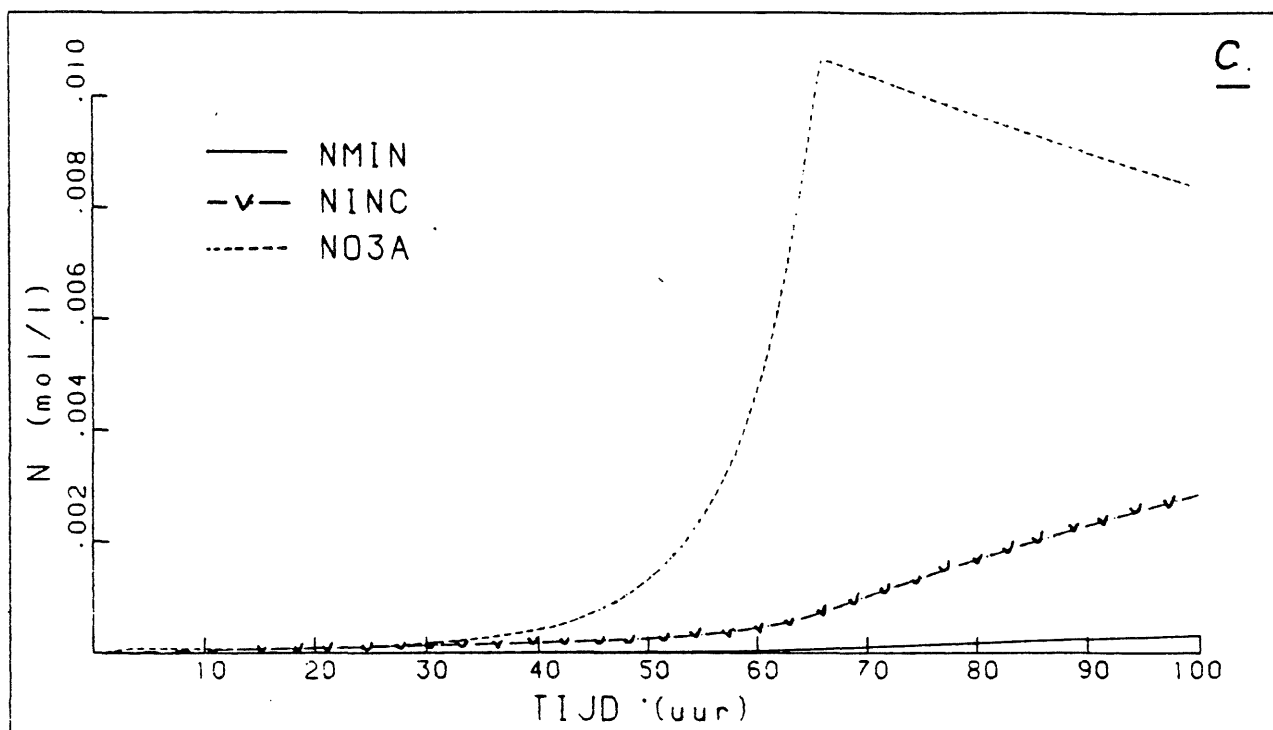
Op grond van deze feiten wordt geconcludeerd dat het grootste deel van de totale hoeveelheid verbruikte NO₃ op rekening komt van het dissimilatie proces, het andere deel wordt verbruikt bij de assimilatie. In vergelijking hiermee zijn de gemineraliseerde en geincorporeerde hoeveelheden NO₃ verwaarloosbaar klein.

4.3 GEVOELIGHEIDS ANALYSE VOOR ENKELE PARAMETERS

4.3.1 Inleiding

In deze paragraaf worden de resultaten besproken van een zgn. gevoeligheids analyse. Hierbij wordt de invloed bestudeerd van enkele parameter waarden op de uitkomsten van de simulatie. Deze gevoeligheids analyse is van belang omdat hieruit blijkt welke parameters tijdens experimenten nauwkeurig bepaald moeten worden. Parameters waarvoor het model niet gevoelig blijkt te zijn hoeven niet zo nauwkeurig bekend te zijn en kunnen eventueel geschat worden. Tevens wordt met een gevoeligheids analyse een inzicht verkregen in de werking van het simulatie model, waardoor de simulatie resultaten beter geïnterpreteerd kunnen worden.

De gevoeligheids analyse is uitgevoerd voor die parameters



Figuur 4.1. Resultaten van de standaardsimulatie.

waarvan, op grond van de resultaten van de standaard simulatie, verwacht werd dat deze een belangrijke invloed zouden uitoefenen op de simulatie resultaten. Hierbij zijn alleen die parameters in beschouwing genomen, waarvan de waarde onder veld of proefomstandigheden kunnen variëren. Zo is voor de parameters van de Michaelis Menten vergelijking en van de Pirt vergelijking geen gevoeligheids analyse uitgevoerd omdat deze van te voren, bij de opzet van het simulatie model, zijn vastgelegd. Ook voor IBIOCS is geen gevoeligheids analyse uitgevoerd omdat is gebleken dat deze nauwelijks invloed heeft op de simulatie resultaten. Deze overwegingen hebben geleid tot de keuze van de volgende parameters: TMPK, IBIOCF, INO3 en IGLUC.

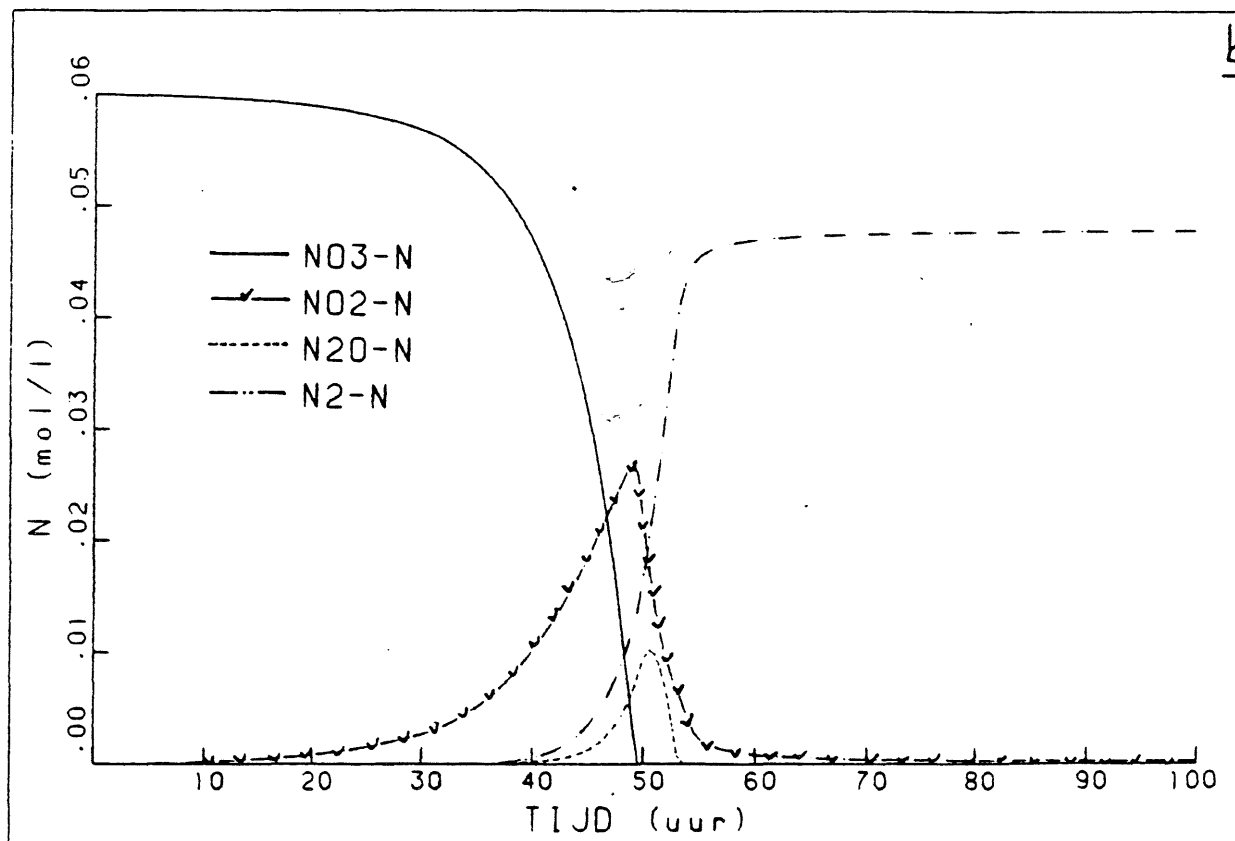
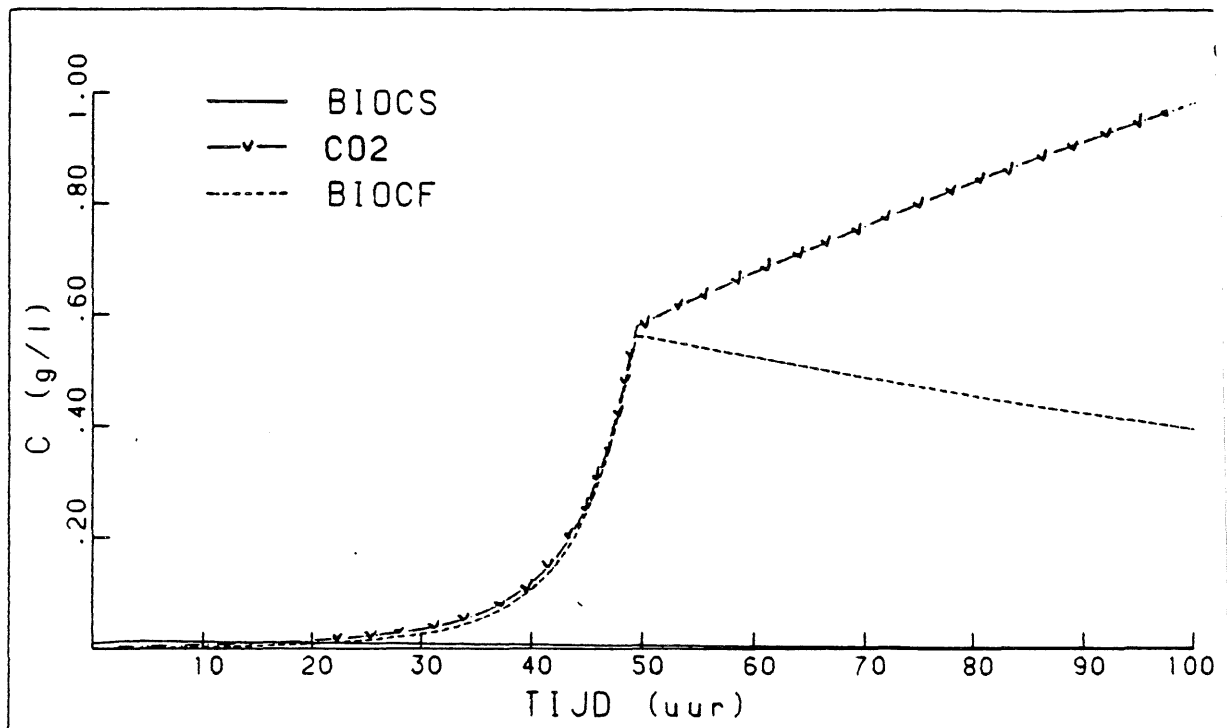
Bij de bespreking van de uitkomsten van de gevoeligheids analyse worden de resultaten steeds vergeleken met die van de standaard simulatie.

4.3.2 De Gevoeligheid Van Het Model Voor TMPK

Bij de groei van bacterien speelt de temperatuur een belangrijke rol. De optimum temperatuur voor de bacterien populatie in de grond ligt tussen 25 en 35 °C, bij temperaturen beneden en boven de optimum temperatuur wordt de groeisnelheid gereduceerd.

De temperatuurs afhankelijkheid van de groeisnelheid wordt in het model bepaald door de reductie factor TMPK. Deze is 1 bij het temperatuurs optimum van 37 °C en kleiner dan 1 bij andere temperaturen. Hier worden de resultaten besproken van de simulatie bij een temperatuur van 25 °C in relatie tot die van de standaard simulatie, waarbij de temperatuur 20 °C bedraagt.

De figuren 4.2a en 4.2b geven de gesimuleerde resultaten bij een temperatuur van 25 °C (TMPK=0.38). Hieruit blijkt dat binnen 49 uur de hoeveelheid NO3 is uitgeput. De hoeveelheid facultatief anaerobe biomassa bedraagt dan 0.56 g C/liter. Als deze resultaten worden vergeleken met die van de standaardsimulatie dan blijkt dat de biomassa bij 25 °C sneller groeit. De maximale hoeveelheid gevormde biomassa is bij 25 °C iets groter (0.56 g C/l) dan bij 20 °C (0.52 g C/l). Dit komt doordat de benodigde tijdsduur voor de vorming van de maximale hoeveelheid biomassa korter is. Hierdoor is er relatief



Figuur 4.2. Resultaten van de simulatie voor een temperatuur van 25°C.

minder NO₃ nodig voor onderhoudsprocessen en kan er dus meer NO₃ worden gebruikt voor de groei van de biomassa. In figuur 4.2b is het verloop weergegeven van de N-componenten. Hieruit blijkt dat de verschuiving van de kurven in de richting van kortere tijden aanzienlijk is. De piekbreedte van de NO₂ en N₂O kurven is afgenomen. Dit komt doordat door de hoge temperatuur coefficient, NO₃ sneller verbruikt wordt waardoor ook de vorming en omzetting van de intermediären van de denitrificatie reeks sneller verloopt. Tevens blijkt dat er minder N₂ wordt gevormd. Dit komt doordat er meer NO₃ is geassimileerd, zoals blijkt uit de grotere hoeveelheid gevormde biomassa.

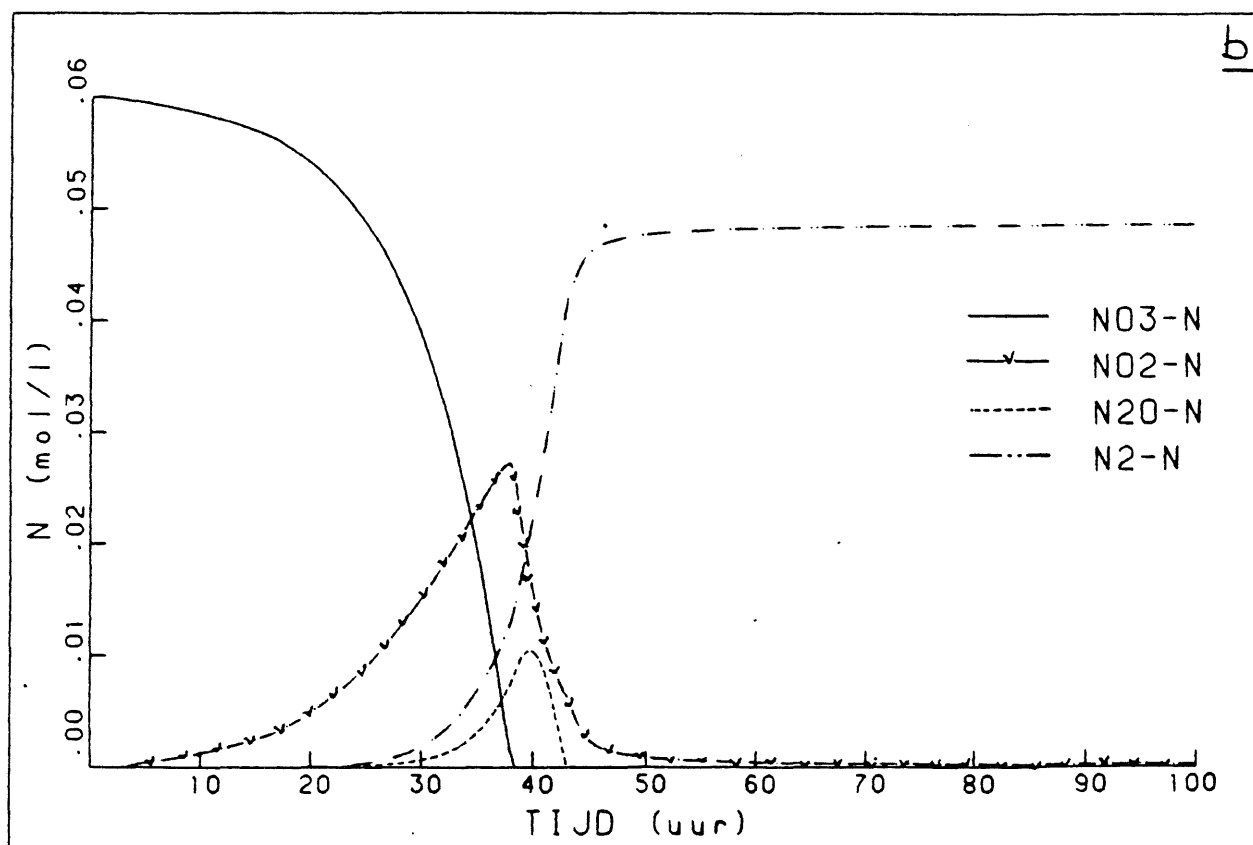
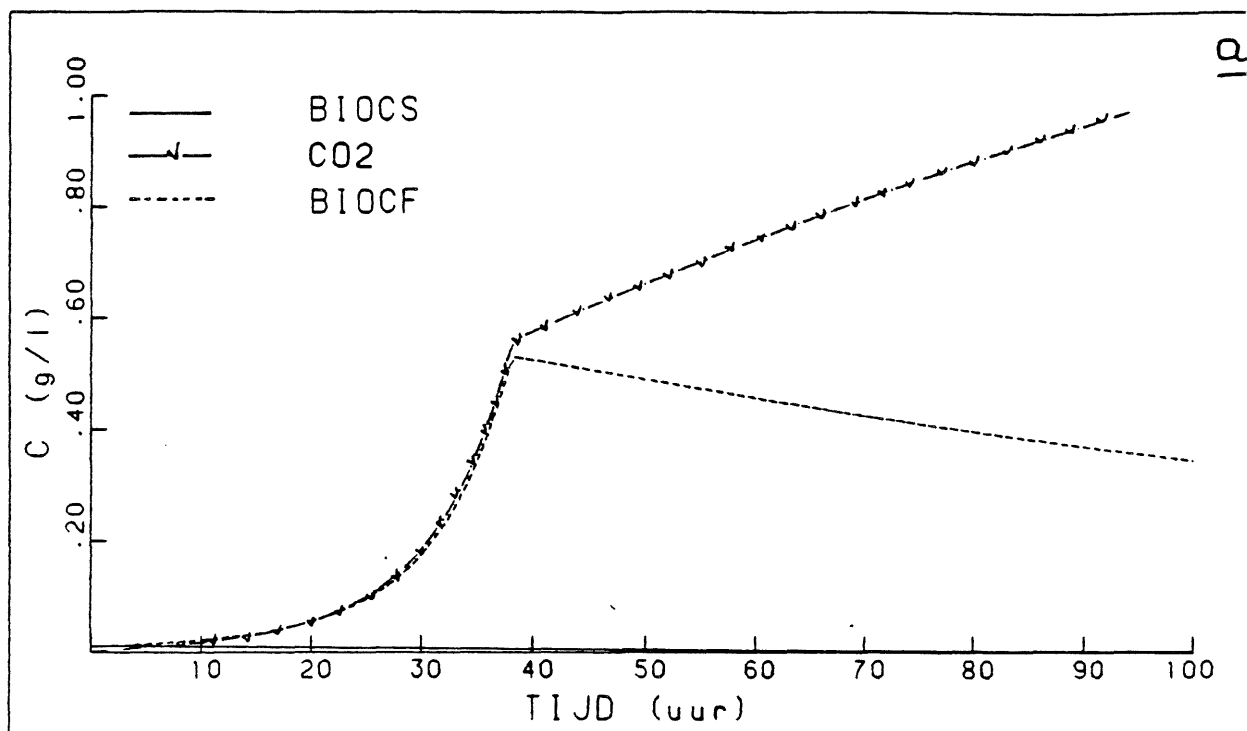
4.3.3 Gevoeligheid Voor IBIOCF

De figuren 4.3a en 4.3b geven de gesimuleerde resultaten voor de situatie waarin de initiele hoeveelheid facultatief anaerobe biomassa 0.01 g C/liter bedraagt, deze was in de standaard simulatie een factor 10 lager. Hieruit blijkt dat zowel de kurven van de biomassa als die van de N-componenten vrijwel identiek zijn aan die van de standaard simulatie, afgezien van een verschuiving op de tijd-as in de richting van kortere tijden. Deze verschuiving komt doordat de hoeveelheid biomassa sneller toeneemt t.g.v. de grotere initiele hoeveelheid. De maximale hoeveelheid gevormde biomassa blijft gelijk omdat deze alleen afhangt van de initiele hoeveelheid NO₃ welke in beide gevallen even groot is.

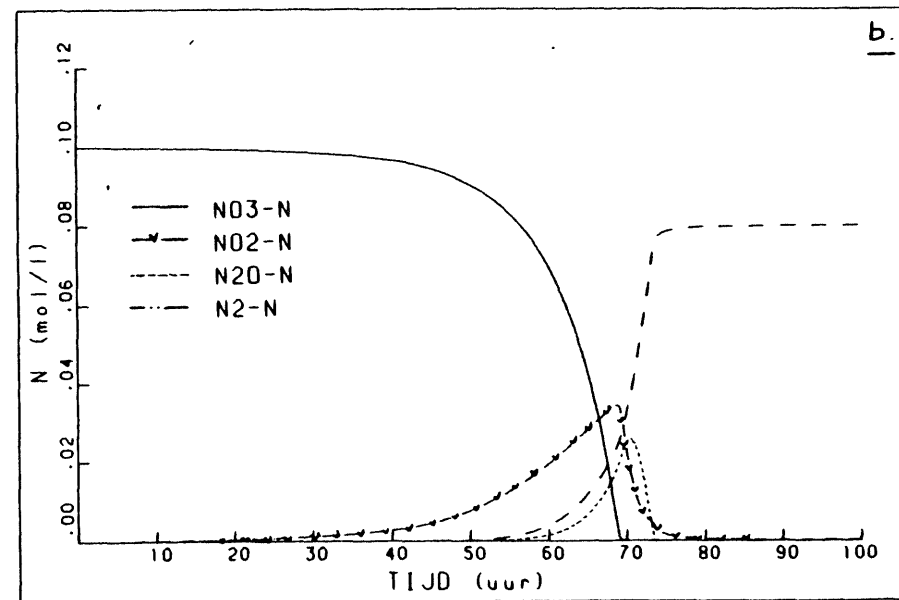
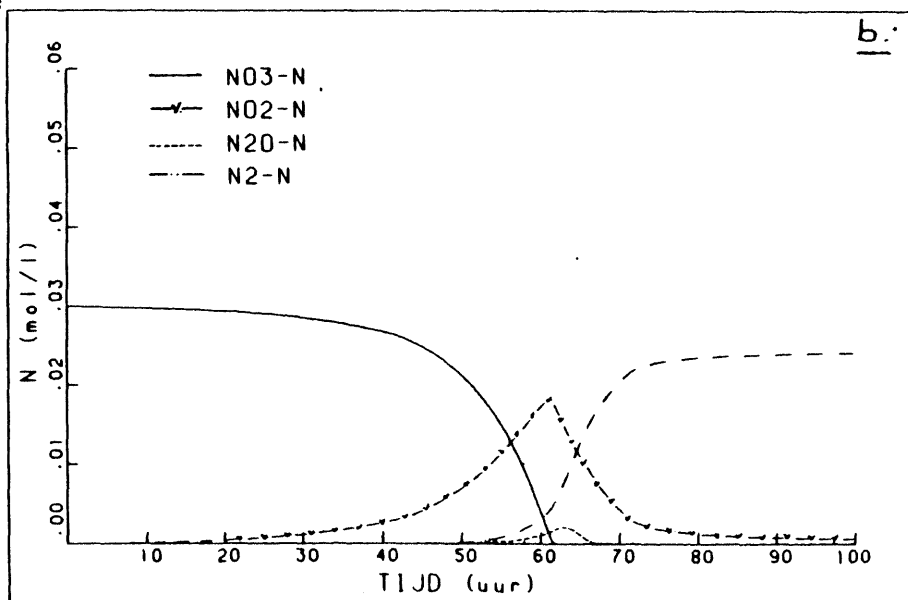
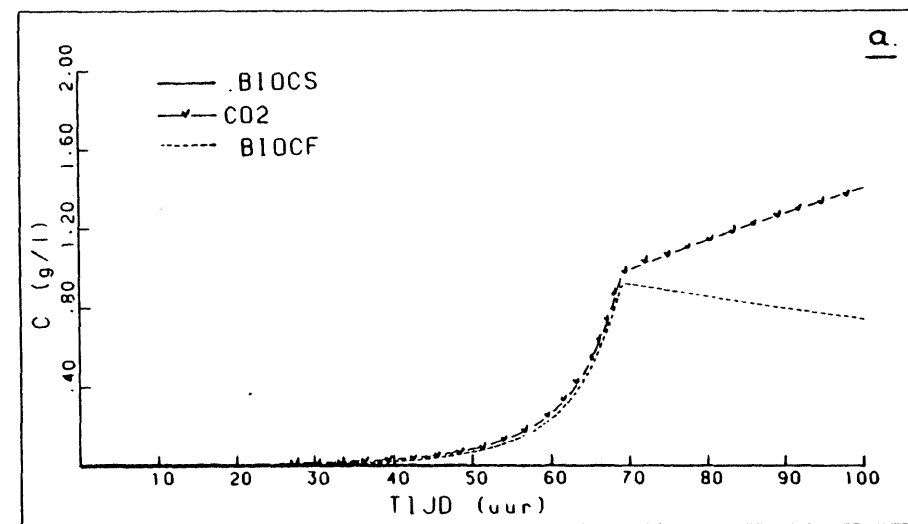
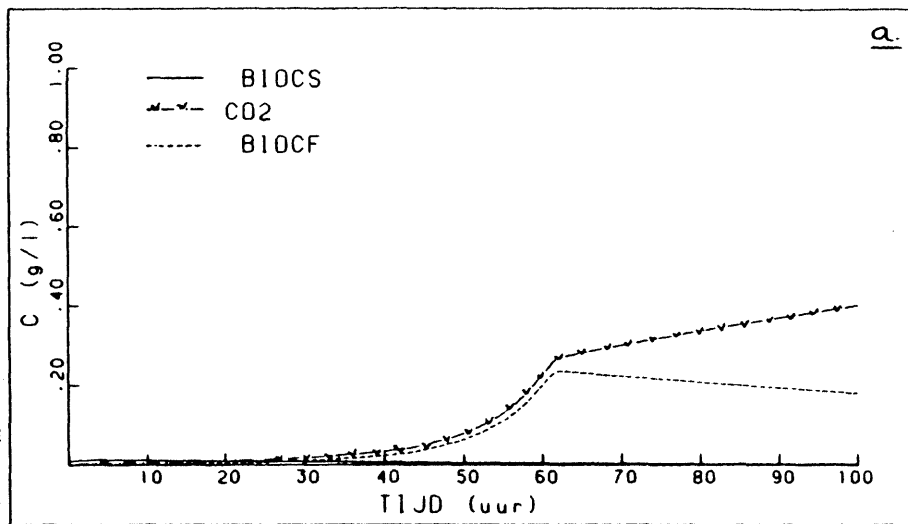
4.3.4 Gevoeligheid Van Het Model Voor De Initiele NO₃ Conc.

Bij hoge NO₃ concentraties wordt de reductie van N₂O tot N₂ belemmerd (zie hoofdstuk 2). Om na te gaan of het simulatie model dit effect van een variërende NO₃ concentratie voorspelt, zijn er simulaties uitgevoerd voor een lage en hoge initiele NO₃ concentratie: resp. 0.03 en 0.10 mol/l (figuur 4.4 en 4.5).

Figuur 4.4a geeft het resultaat van de simulatie met een lage NO₃ concentratie. Hieruit blijkt dat de maximale hoeveelheid gevormde



Figuur 4.3. Resultaten van de simulatie met IBIOCF = 0.01 g C/l.



Figuur 4.4. Resultaten van de simulatie met $INO_3 = 0.03$ mol/l.

Figuur 4.5. Resultaten van de simulatie met $INO_3 = 0.10$ mol/l.

biomassa kleiner is, dit komt doordat er minder NO_3 in het systeem aanwezig is. Verder blijkt dat, in relatie tot de standaard simulatie, de groeisnelheid van de biomassa nauwelijks beperkt wordt door de lagere NO_3 concentratie. Dit komt door de lage K_s -waarde van NO_3 (0.001 mol/l) waardoor de relatieve groeisnelheid op NO_3 gelijk blijft aan de maximale relatieve groeisnelheid (u_{max}), totdat de NO_3 concentratie gedaald is tot minimaal 0.01 mol/l . Bij lagere concentraties vindt pas een belangrijke reductie van de relatieve groeisnelheid plaats; uit figuur 4.4b blijkt dat dit pas het geval is na 58 uur.

In de figuren 4.4b en 4.5b (let op de verschillende schalen op de y-as) worden de kurven van de N-componenten getoond bij resp. een lage en hoge initiele NO_3 concentratie. Bij de simulatie met de hoge NO_3 concentratie is, i.p.v. 1.5 g C/l , een initiele gluconaat concentratie van 5 g C/l gebruikt om te voorkomen dat deze C-bron als groeibeperkende factor zou gaan optreden. De invloed van de initiele concentratie op het verloop van de gesimuleerde kurven van de N-componenten wordt in de volgende punten samengevat.

- Bij toenemende NO_3 concentraties neemt de verhouding (conc. NO_2 accumulatie/conc. N_2O accumulatie) af. Dit betekent dat er relatief meer N_2O wordt geaccumuleerd.

- De tijden waarop de NO_2 en N_2O maxima verschijnen, nemen toe bij toenemende NO_3 concentraties.

Uit het laatste punt blijkt dat het model de belemmering van de reductie van N_2O bij toenemende NO_3 concentraties kwalitatief voorspelt.

4.3.5 Gevoeligheid Van Het Model Voor De Gluconaat Conc.

Bij de voorgaande simulaties bleek de groei van de denitrificerende bacterien bepaald te zijn door de NO_3 concentratie in het systeem, hierbij was steeds voldoende gluconaat aanwezig zodat de groei niet gelimiteerd was door een tekort aan deze C-bron. In deze

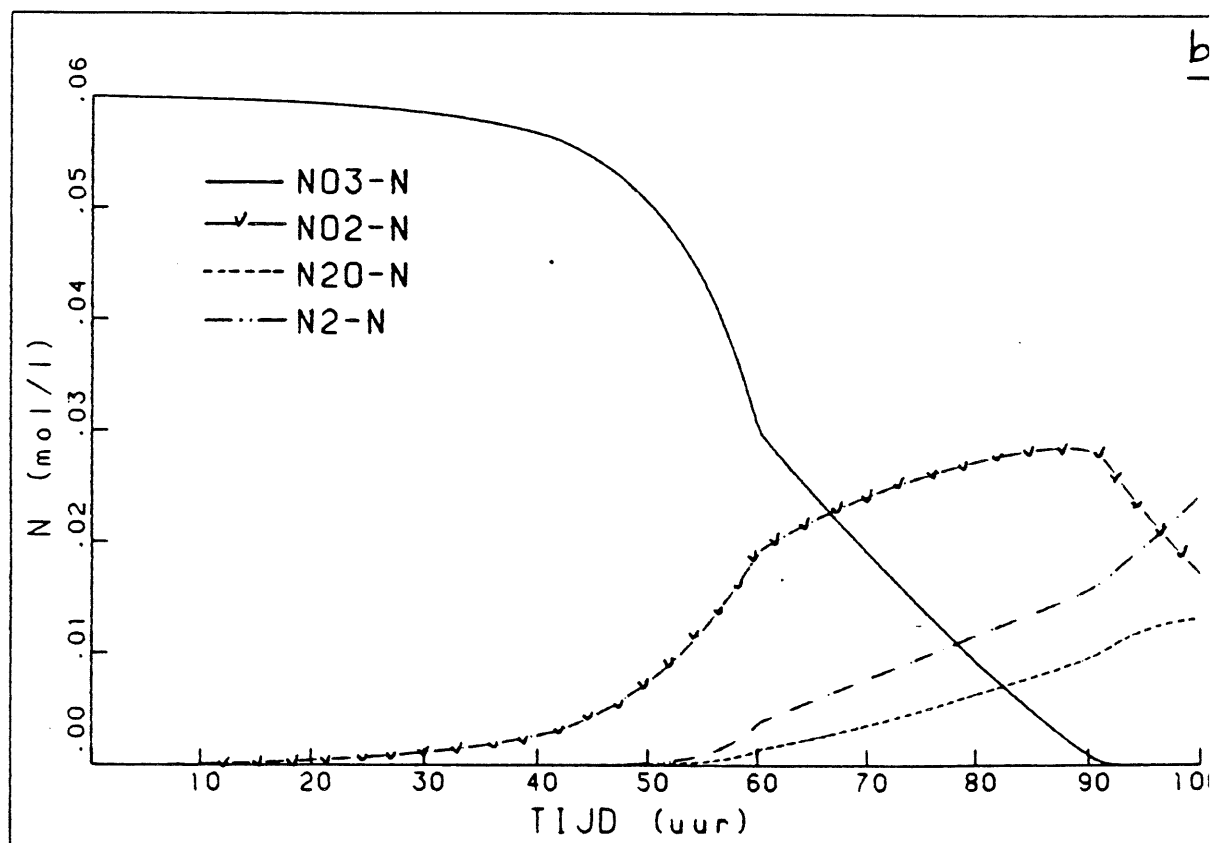
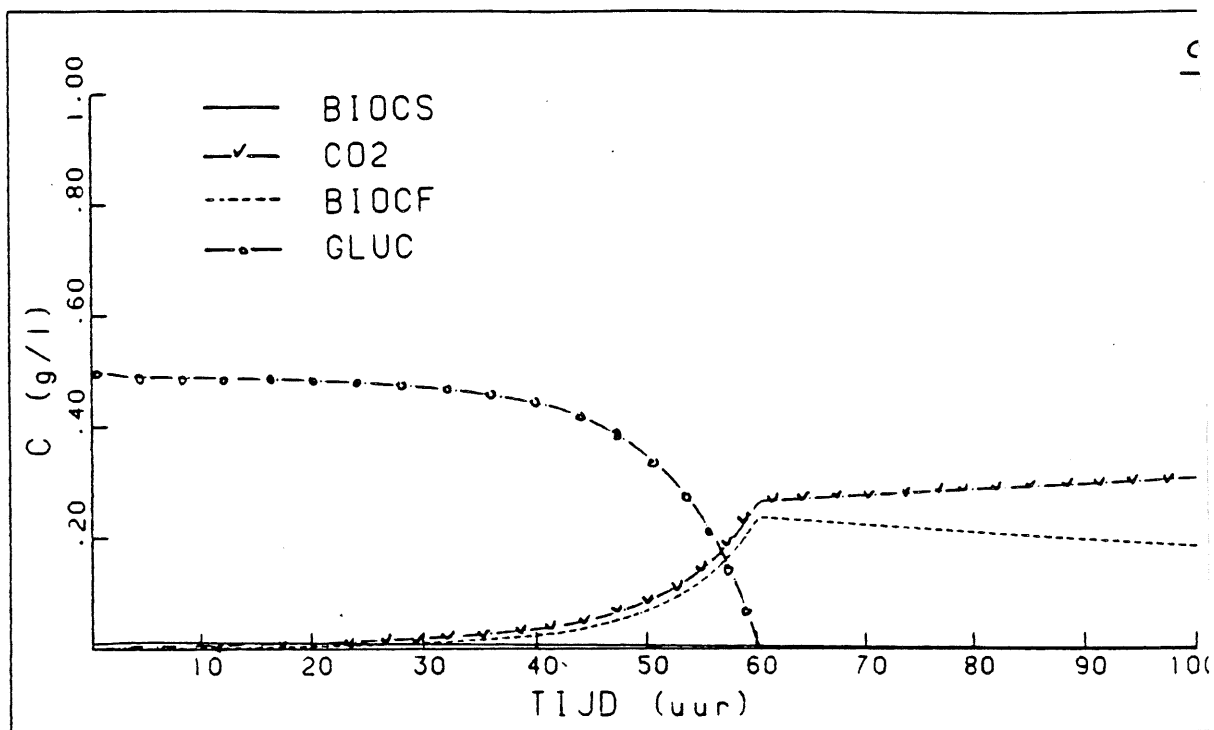
paragraaf worden de resultaten van de simulatie besproken waarin door een beperkte hoeveelheid gluconaat (0.5 g C/l) de groei op een gegeven moment gelimiteerd gaat worden.

De resultaten van deze simulatie zijn weergegeven in figuur 4.6a en 4.6b. Uit figuur 4.6a blijkt dat de gluconaat is uitgeput na 60 uur en dat tengevolge hiervan de groei van de biomassa stopt. Er wordt dan geen NO₃ meer geassimileerd waardoor de snelheid van de NO₃ omzetting na dit tijdstip langzamer gaat verlopen. Deze snelheid wordt steeds kleiner omdat de NO₃ die gedissimileerd wordt t.g.v. onderhoud, door de afnemende hoeveelheid biomassa steeds kleiner wordt. Hiermee hangt samen de in vergelijking tot de standaard simulatie langere tijdsduur die nodig is voor de totale omzetting van NO₃ in N₂.

4.3.6 Conclusies

Uit de gevoeligheids analyse van de parameters worden de volgende conclusies getrokken.

- De parameter IBIOCF heeft een belangrijke invloed op de tijden waarop de verschillende N-componenten verschijnen in het systeem. Verhoging van IBIOCF met een factor 10 resulteert in een verschuiving van de kurven naar 50 % kortere tijden.
- Verhoging van temperatuurs coefficient TMPK van 0.27 (20 C) naar 0.38 (25 C), resulteert in een verschuiving van de N-kurven naar 25 % kortere tijden.
- De relatieve hoeveelheden waarmee NO₂ en N₂O gevormd worden, wordt in sterke mate bepaald door de initiele NO₃ concentratie.
- De tijden waarop de NO₂ en N₂O maxima verschijnen, nemen bij toenemende NO₃ concentraties toe.



Figuur 4.6. Resultaten van de simulatie met IGLUC = 0.5 g C/l.

4.4 VERGELIJKING MET HET MODEL VAN BAAS

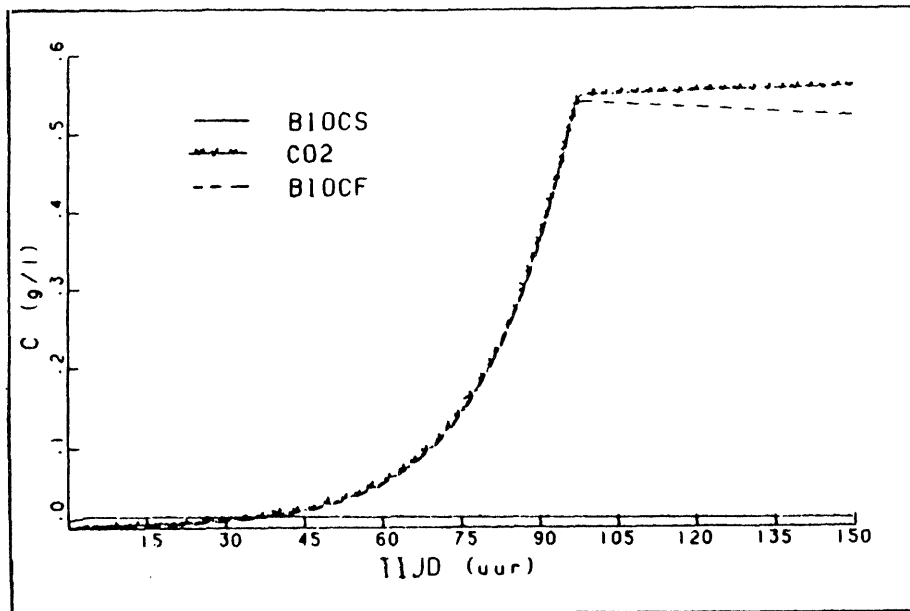
Zoals reeds eerder is vermeld, is bij het opstellen van het huidige denitrificatie model uitgegaan van het model van Baas (1984), waarbij het deel waarin de denitrificatie van NO_3 plaatsvindt nader is uitgewerkt. Beide modellen onderscheiden zich van elkaar op grond van het feit dat in het model van Baas alleen NO_3 elektronen kan opnemen terwijl in het model dat tijdens dit onderzoek is opgesteld, ook NO_2 en N_2O als elektronacceptor in aanmerking komen.

In deze paragraaf worden de simulatie resultaten van beide modellen voor een standaard simulatie met elkaar vergeleken (figuur 4.7). Hieruit blijkt dat de hoeveelheid biomassa die uiteindelijk gevormd is, nauwelijks afwijkt van die welke door het huidige model gesimuleerd is. Dit komt doordat deze bepaald wordt door de initiele NO_3 concentratie die in beide gevallen hetzelfde is (0.06 mol/l). De denitrificatie snelheid van NO_3 is in het model van Baas 30 % kleiner: NO_3 is na 96 uur uitgeput, in het huidige model is dit reeds na 65 uur het geval. Dit komt doordat in dit model de micro organismen alleen op NO_3 groeien, terwijl in het huidige model ook groei op NO_2 en N_2O optreedt. Verder is in het model van Baas de afbraaksnelheid van de biomassa kleiner omdat is verondersteld dat de afbraaksnelheid lineair afneemt als de relatieve groeisnelheid (u) lager is dan de maximale relatieve groeisnelheid (u_{max}). Deze reductie speelt alleen een rol als er netto afbraak van biomassa optreedt omdat dan de NO_3 concentratie tot nul is gereduceerd waarbij de reductie van de afbraaksnelheid maximaal is. In het huidige model is de afbraak snelheid onafhankelijk van de relatieve groeisnelheid gesteld omdat omtrent de reductie factoren voor de groeisnelheden op NO_3 , NO_2 en N_2O te weinig gegevens beschikbaar waren.

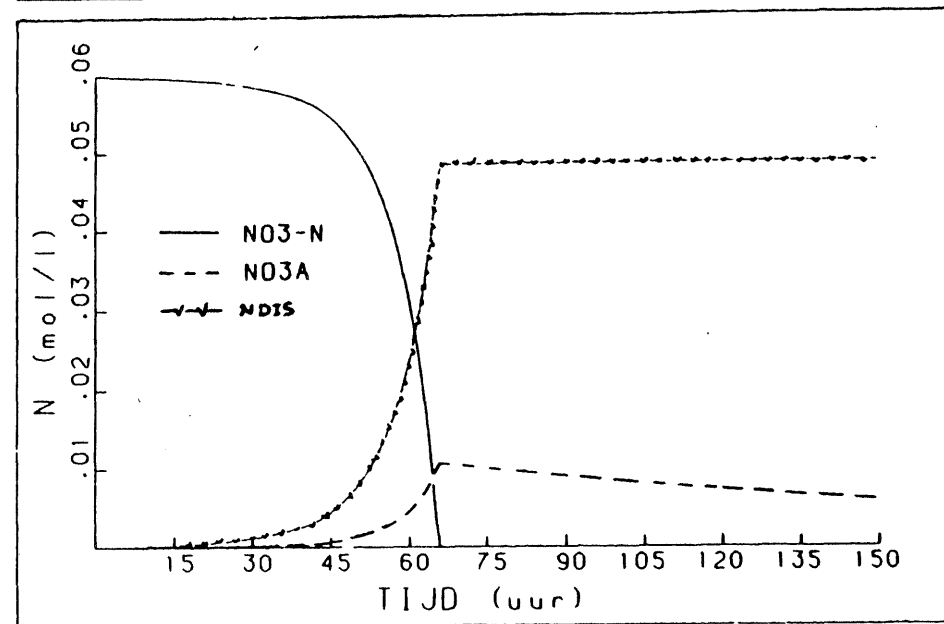
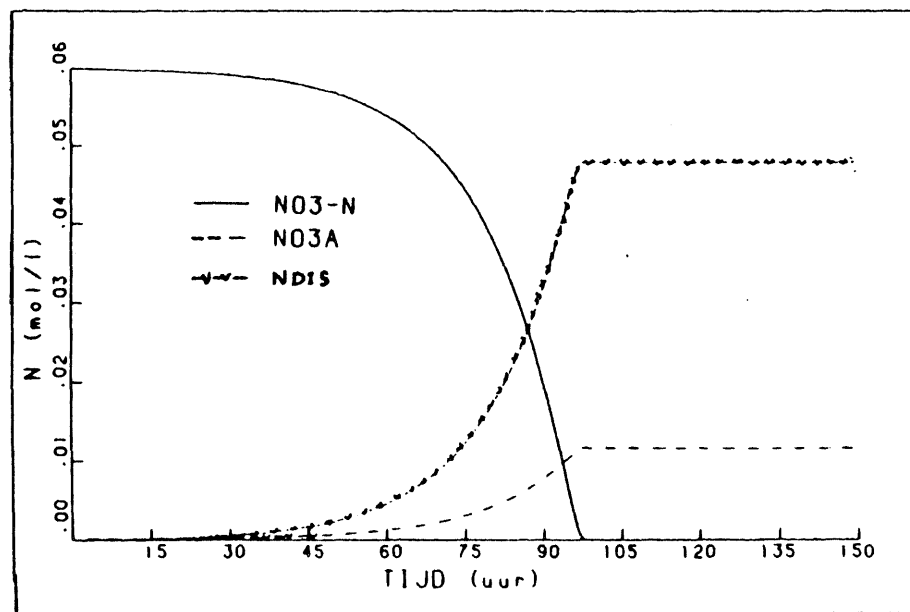
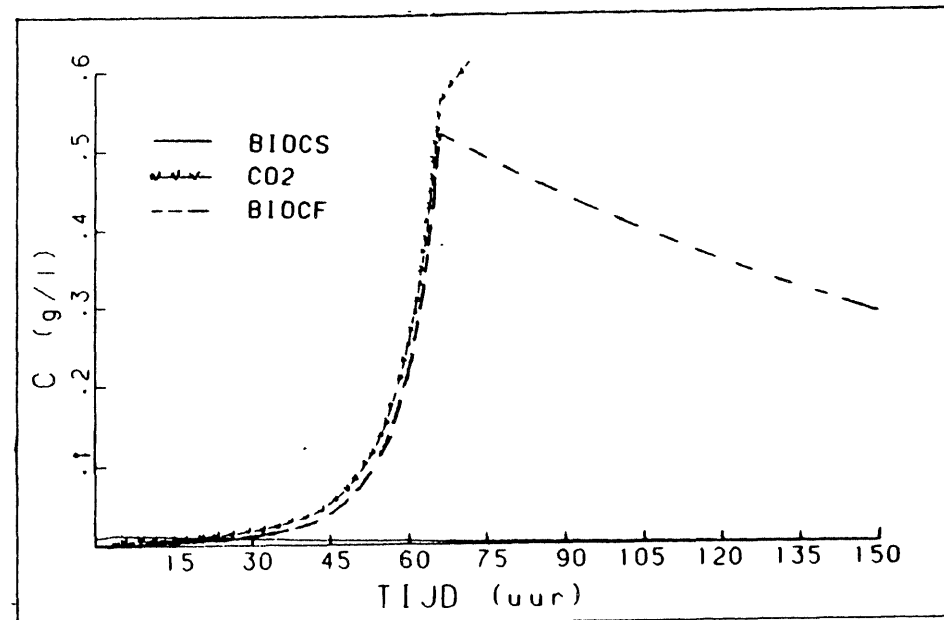
Zoals is te verwachten, is de groeisnelheid van de facultatief anaerobe biomassa in het huidige model groter dan in het model van Baas, aangezien naast NO_3 ook de intermediairen NO_2 en N_2O elektronen leveren. Door deze snellere groei wordt NO_3 sneller gedissimileerd.

4.5 VERGELIJKING VAN SIMULATIE MET EXPERIMENT

a. MODEL BAAS



b. HUIDIGE MODEL



Figuur 4.7. Resultaten van de standaardstimulatie met

4.5.1 Experimenten Van Cooper & Smith (1963)

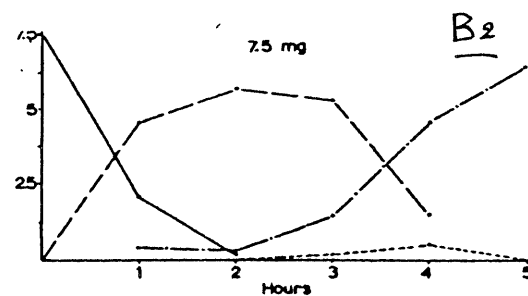
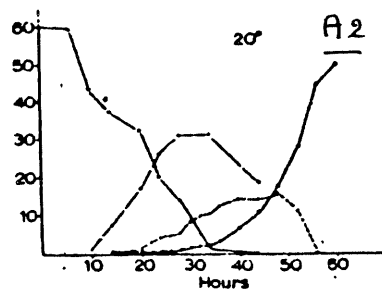
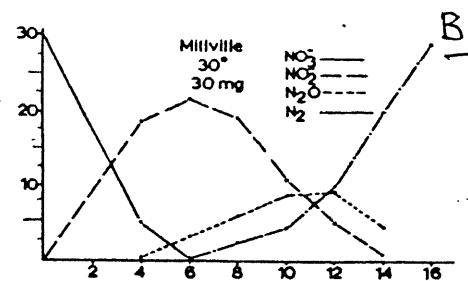
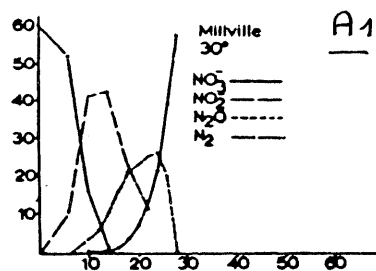
4.5.1.1 Experimentele Resultaten -

Cooper & Smith (1963) hebben denitrificatie experimenten uitgevoerd met 7 verschillende gronden. Hiervoor werd 200 g luchtdroge grond gemengd met 2 g alfalfa; vervolgens werd er water en KNO_3 oplossing aan toegevoegd om het vochtgehalte iets boven veldcapaciteit en het N-niveau op 300 ppm (= 60 mg $\text{NO}_3\text{-N}$ per 200 g grond) te brengen. De gronden werden anaeroob (He -atmosfeer) geïncubeerd in flesjes van 500 ml bij een temperatuur van 30 °C (exp. A1) en 20 °C (exp. A2). Op verschillende tijdstippen werden de concentraties NO_3 en NO_2 in de grond en de N_2O en N_2 concentratie in de atmosfeer boven het grondmonster bepaald.

In figuur 4.8a is het verloop van de hoeveelheid gevormde N-produkten weergegeven voor één grond (Millville loam). Hieruit blijkt dat de snelheid van NO_3 omzetting en de produktie van N_2 bij lagere temperaturen afneemt. Bovendien blijkt dat de breedte van de NO_2 en N_2O pieken toeneemt.

In een ander experiment werd de invloed van de NO_3 concentratie op het verloop van het denitrificatie proces bestudeerd. Er werden N hoeveelheden van 30 (exp. B1) en 7.5 mg (exp. B2) gebruikt. In figuur 4.8b is het verloop van de hoeveelheid gevormde N-componenten weergegeven. Uit deze figuur blijkt dat de overall snelheid van de denitrificatie van NO_3 tot N_2 niet wordt beïnvloed door de initiele NO_3 concentratie. De verhouding (max. N_2O concentratie/initiele NO_3 concentratie) blijkt echter wel afhankelijk te zijn: deze neemt af bij afnemende NO_3 concentraties. Dit komt doordat hoge NO_3 concentraties de reductie van N_2O belemmeren waardoor er ophoping van N_2O optreedt.

4.5.1.2 Simulatieresultaten -



Figuur 4.8a. Gemeten N-kurven bij resp. 30 en 20°C.
(Cooper & Smith, 1963).

Figuur 4.8b. Gemeten N-kurven met resp. initiele
 NO_3^- hoeveelheden van 30 en 7.5 mg.
(Cooper & Smith, 1963).

a. Inleiding

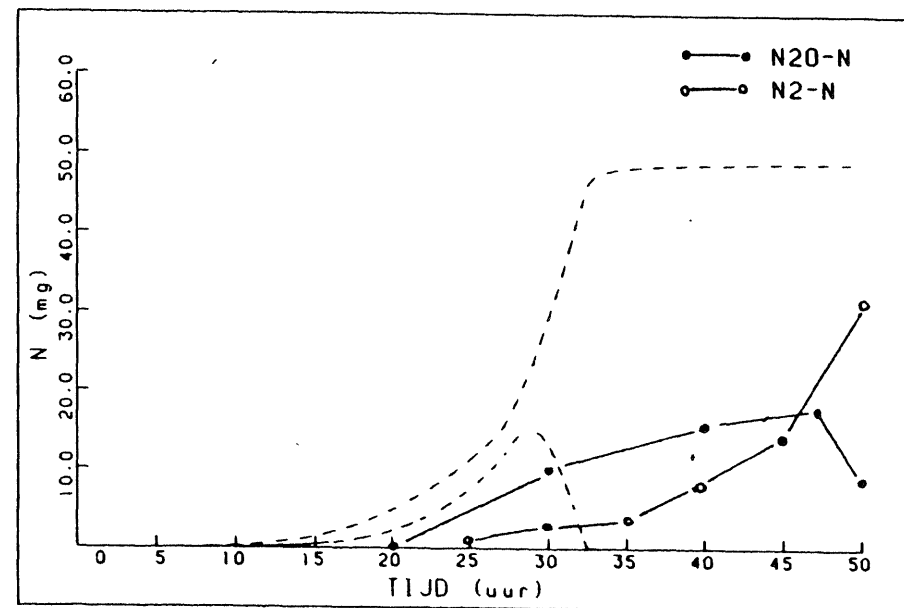
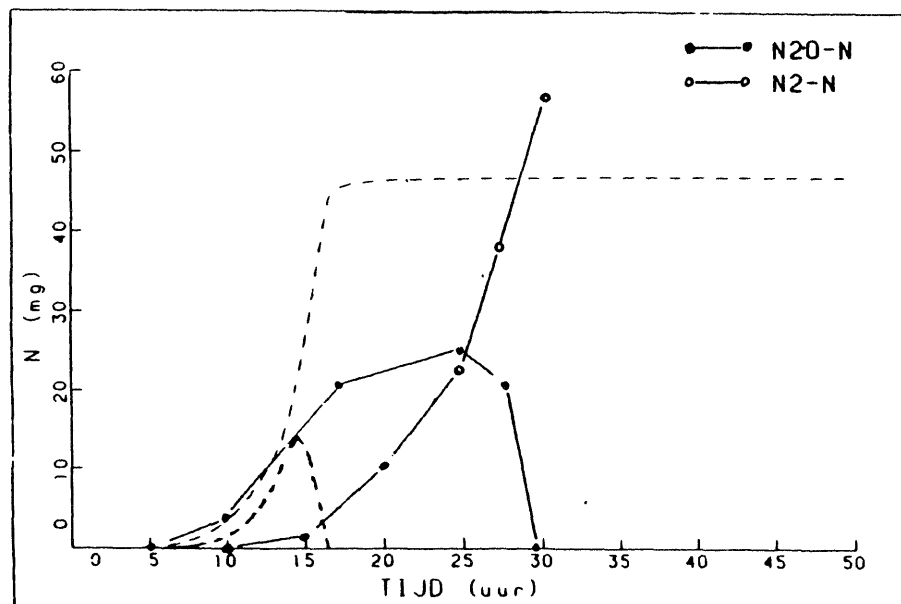
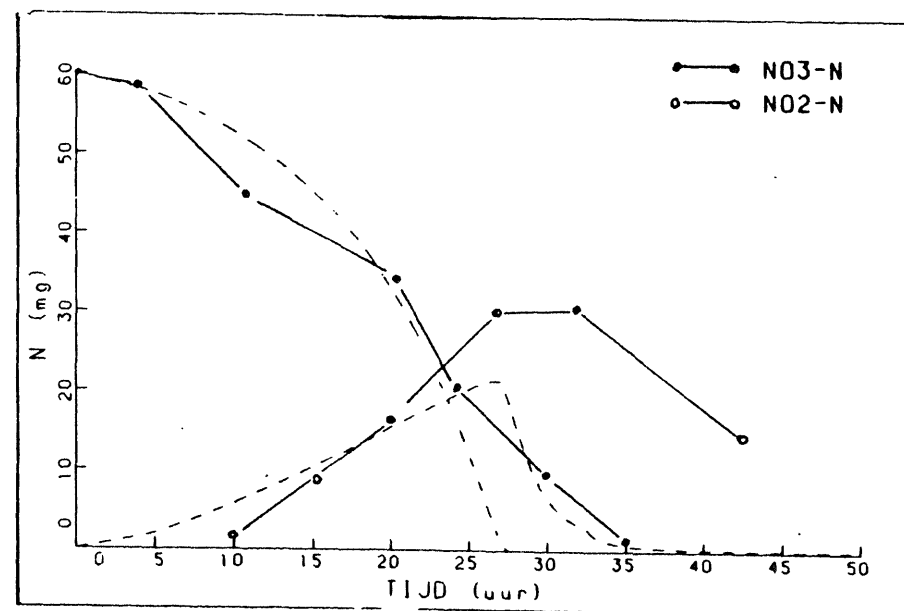
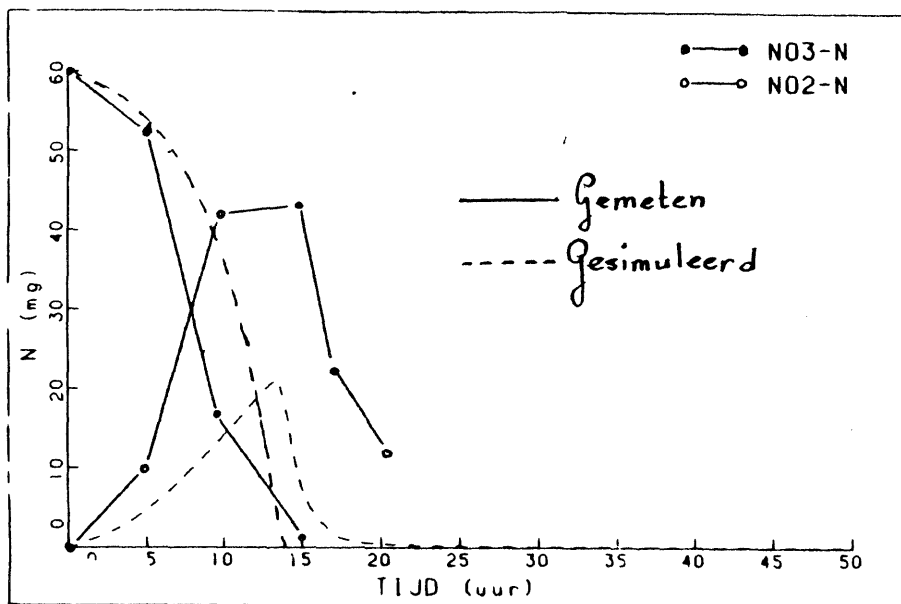
Bij de simulatie van de experimenten van Cooper & Smith (1963) zijn de parameter waarden genomen die gegeven zijn in paragraaf 3.6, met uitzondering van IO2 en IGLUC. De initiele zuurstof concentratie is op nul gesteld omdat de experimenten onder anaerobe omstandigheden zijn uitgevoerd. Verder hebben de onderzoekers tijdens hun experimenten een ruime hoeveelheid alfalfa aan de grond toegevoegd waardoor het niet waarschijnlijk is dat deze C-bron tijdens hun experimenten groei-limiterend heeft kunnen optreden. Daarom is de relatieve groeisnelheid in het simulatie model onafhankelijk van de gluconaat concentratie gesteld. Dit werd gerealiseerd door met een hoge initiele gluconaat concentratie (5 g C/l) te simuleren, waardoor de verhouding ($GLUC/(KGLUC+GLUC)$) in de Michaelis Menten vergelijking constant bleef.

De reductie factor TMPK (c.q. Q10) en de initiele hoeveelheid facultatief anaerobe biomassa (IBIOCF) waren voor de experimenten van Cooper & Smith niet van te voren bekend. Daarom zijn de waarden van deze twee parameters geoptimaliseerd aan de hand van experiment A1. Deze zijn hierbij zodanig gekozen dat de experimentele NO3 curve, op het oog gezien, zo goed mogelijk werd benaderd door de gesimuleerde NO3 curve. Deze geoptimaliseerde waarden zijn gebruikt voor de simulatie van de experimenten A2, B1 en B2 en staan vermeld in tabel 4.1 (pag. 84).

b. Resultaten

De optimalisatie geeft voor de reductie factor TMPK van experiment A1 (30 °C) 0.47, de bijbehorende Q10-waarde is (zie paragraaf 3.6.2): $Q10 = TMPK^{**}(-1/0.7) = 0.47^{**}(-1.43) = 2.9$. Deze Q10-waarde levert voor de simulatie van experiment A2 (20 °C) een TMPK-waarde van $2.9^{**}(-1.7) = 0.164$. (Opmerking: tijdens de simulatie is per abuis de waarde 0.196 i.p.v. 0.164 gebruikt, het blijkt echter dat de simulaties met beide TMPK waarden niet veel van elkaar af wijken.)

In figuur 4.9a en 4.9b zijn de experimentele en gesimuleerde resultaten weergegeven van experiment A1 en A2. Hieruit blijkt dat het verloop van de experimentele NO3 kurven bij de verschillende temperaturen goed benaderd wordt door de gesimuleerde kurven. Uit de gesimuleerde NO2 kurven blijkt dat de maximale hoeveelheid gevormd NO2 onderschat wordt. Verder wordt de piekbreedte van de N2O ophoping



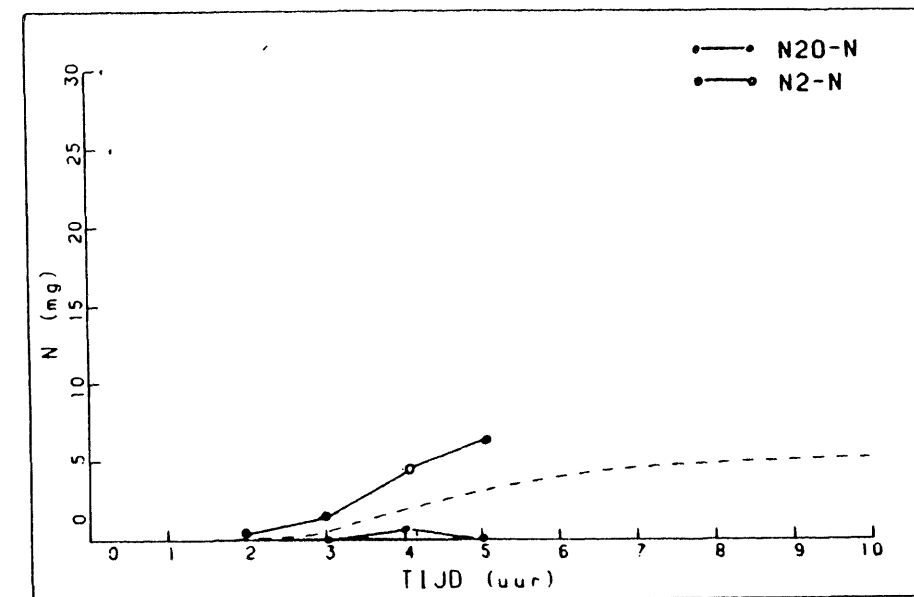
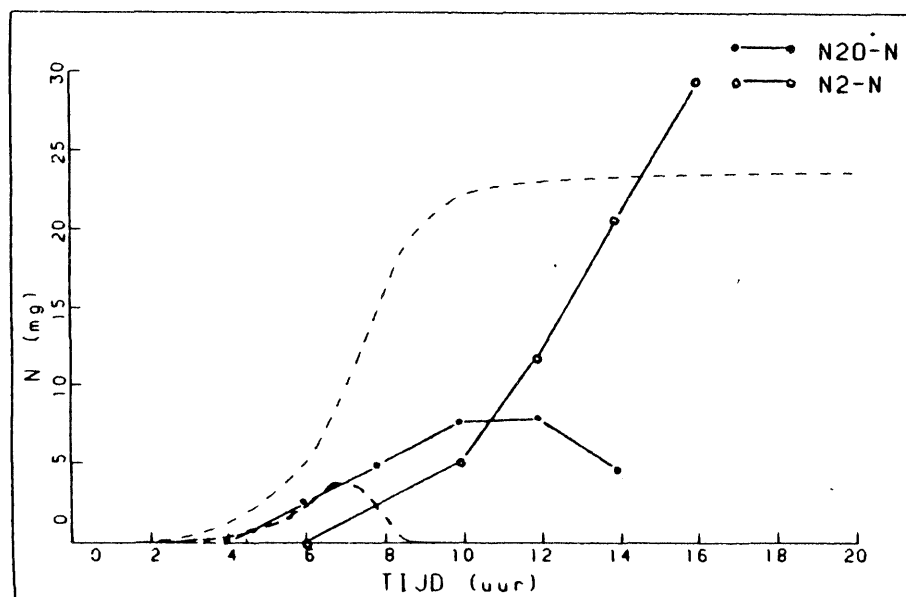
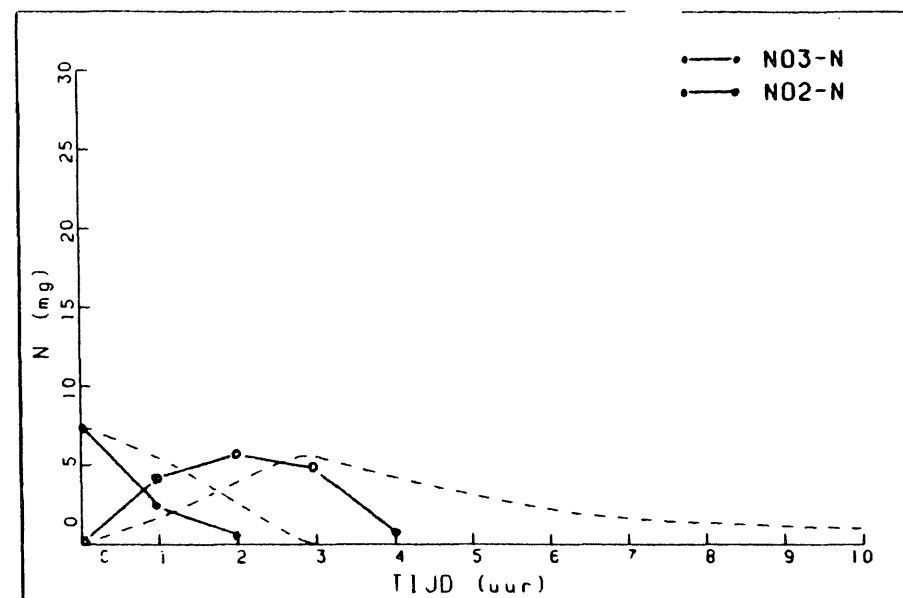
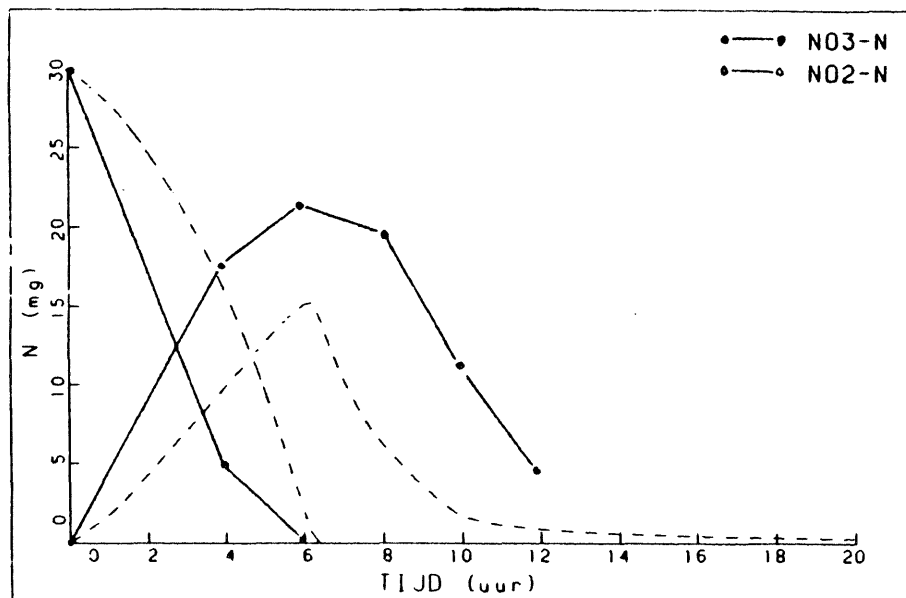
Figuur 4.9a. Gemeten en gesimuleerde N-kurven
bij 30°C .

Figuur 4.9b. Gemeten en gesimuleerde N-kurven
bij 30°C .

onderschat, en wordt de vorming van N₂O en N₂ op een te vroeg tijdstip gesimuleerd.

De gesimuleerde en experimentele resultaten voor verschillende initiele NO₃ concentraties (exp. B1 en B2) zijn gegeven in figuur 4.10a en 4.10b (let op de verschillende tijdschalen). Er is gesimuleerd met een TMPK-waarde van 0.47 omdat deze experimenten zijn uitgevoerd bij 30 °C. Uit de figuren blijkt dat ook bij de lage initiele NO₃ concentraties de experimentele NO₃ en N₂ kurven redelijk goed benaderd worden door de gesimuleerde kurven. De experimenteel gemeten N₂O maxima worden echter door de simulatie onderschat. De experimenteel gemeten reductie van de N₂O maxima t.g.v. een lagere initiele NO₃ concentratie wordt ook voorspeld door het simulatie model. De tijden waarop deze maxima worden bereikt, worden echter onderschat.

Tabel 4.1 geeft de hoeveelheden facultatief anaerobe biomassa (BIOCF) die berekend zijn tijdens de simulaties. Tevens is de hoeveelheid gluconaat (GLUC) gegeven die over is op het eind van de simulatie. Hieruit blijkt dat de hoeveelheid gluconaat steeds voldoende groot is geweest om te voorkomen dat dit als groei beperkende faktor zou optreden. De waarde van BIOCF (0.3-0.4) komen overeen met 2.5E9 - 6.E9 bacterien/g grond. Hierbij is aangenomen dat de dichtheid van het bacterie materiaal 0.5 g C/ml is en dat het vochtgehalte van de grond 0.3 gew. % bedraagt. Dit zijn realistische waarden zoals blijkt uit Janssen (1983) die vermeldt dat de gemiddelde hoeveelheid bacterien in de grond tussen de 1.E7 en 1.E10 per gram grond ligt.



Figuur 4.10a. Gemeten en gesimuleerde N-kurven voor een initiele hoeveelheid NO₃

Figuur 4.10b. Gemeten en gesimuleerde N-kurven voor een initiele hoeveelheid NO₃

Experiment		Simulatie				
		IBIOCF	BIOCF	IGLUC	GLUC	TMPK
		(g C/l)	(g C/l)	(g C/l)	(g C/l)	(--)
						Tijd
						(uur)
A1	60 mg					
	NO3-N	0.07	1.02	5.00	2.73	0.470
	30 °C					50
A2	60 mg					
	NO3-N	0.07	0.84	5.00	3.15	0.196
	20 °C					50
B1	30 mg					
	NO3-N	0.20	0.64	5.00	4.17	0.470
	30 °C					20
B2	7.5 mg					
	NO3-N	0.20	0.29	5.00	4.79	0.470
	30 °C					10

Tabel 4.1. Hoeveelheden gluconaat en fac. an. biomassa, initieel
(IGLUC en IBIOCF) en op eind van de simulatie
(GLUC en BIOCF).

Bij de simulaties van de experimenten B1 en B2 moest een andere hoeveelheid facultatief anaerobe biomassa worden gerekend (0.20 i.p.v. 0.07 g C/l). Dat ook werkelijk een verschil in initiele hoeveelheid biomassa tussen experimenten A en B heeft bestaan, kan als volgt verklaard worden. Tijdens de voorbereiding van de experimenten is luchtdroge grond door toevoeging van vocht op veldcapaciteit gebracht. Hierbij is het mogelijk dat er explosieve groei van biomassa heeft plaatsgevonden. Een klein verschil in de benodigde tijd om een

grondmonster te bevochtigen en door te spoelen met He-gas, kan daardoor leiden tot grote verschillen in de hoeveelheid initiele biomassa bij de start van de denitrificatie experimenten.

De Q10-waarde (3) is in vergelijking tot literatuurwaarden (1.6 - 2.5) vrij hoog.

4.5.1.3 Conclusies -

De benodigde tijdsduur voor de omzetting van NO₃ tijdens het denitrificatie proces wordt goed voorspeld door het model: de afwijking tussen de berekende en experimentele tijdsduur zijn niet groter dan 10 %. De tijd waarop alle gedissimileerde NO₃ is omgezet in N₂ wordt gemiddeld 30 % onderschat. De gemeten toename van de denitrificatie snelheid bij hogere temperaturen blijkt goed te worden voorspeld door het simulatie model, evenals de invloed van de initiele NO₃ concentratie op de maximale hoeveelheid gevormd N₂O.

Afwijkingen tussen de experimentele en gesimuleerde kurven blijken vooral op te treden bij de NO₂ kurven waarbij de grootte van de NO₂ maxima gemiddeld 30 % worden onderschat, en de N₂O kurven waarbij de tijden waarop de N₂O maxima worden bereikt, gemiddeld 50 % onderschat worden.

4.5.2 Experimenten Van Cho & Sakdinan (1978)

4.5.2.1 Experimentele Resultaten -

Cho & Sakdinan (1978) hebben denitrificatie experimenten uitgevoerd waarin ze, i.t.t. Cooper & Smith (1963), uitgingen van een initieel aeroob grondmonster. Er werden afsluitbare incubatie flesjes met een volume van 41.5 ml gebruikt, deze werden gevuld met 20 g luchtdroge grond die vooraf gemengd was met een N-15 gelabelde Ca(NO₃)₂ oplossing tot een vochtgehalte van 30 gew.% en een N-gehalte van 50, 100 of 200 ppm (resp. exp. 1, 2 en 3). Na verschillende

incubatie tijden bij 20 °C werden de NO₃ en NO₂ concentraties in de grond gemeten en de concentraties O₂, CO₂, N₂O en N₂ in de atmosfeer boven het grondmonster.

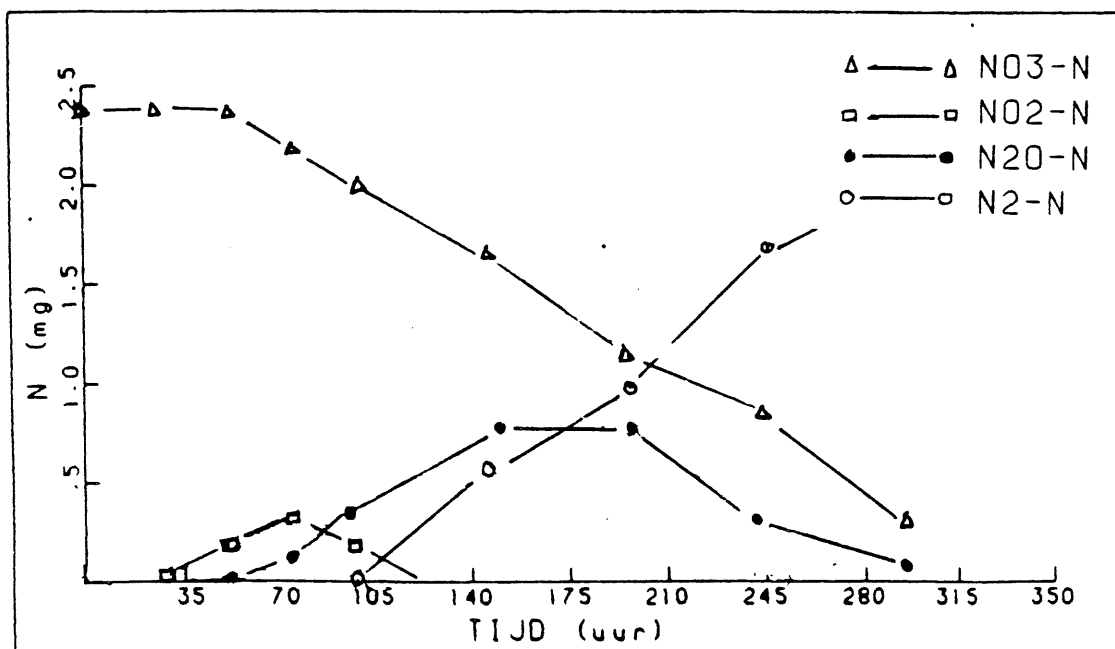
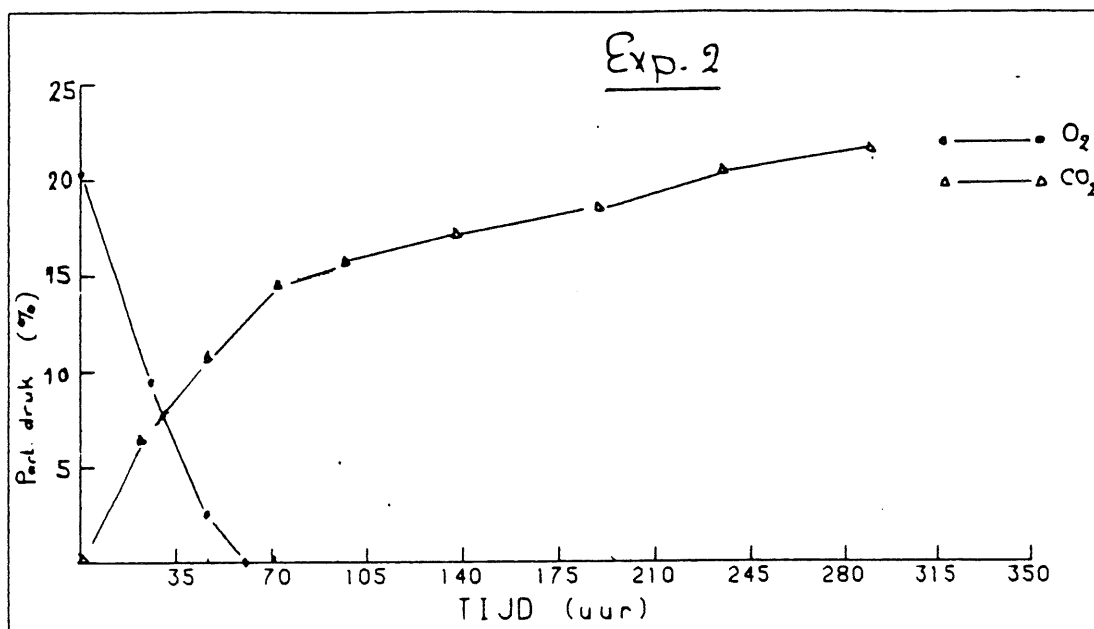
Figuur 4.11a geeft de resultaten van het experiment met 100 ppm NO₃-N. Deze figuur laat zien dat de zuurstof binnen 48 uur is verbruikt. De snelheid waarmee CO₂ wordt geproduceerd neemt langzaam af en wordt constant als alle zuurstof is verbruikt. Deze constante CO₂ produktie snelheid wijst erop dat de microbiele aktiviteit constant blijft tijdens de denitrificatie. Verder blijkt dat er reeds NO₂ wordt geproduceerd terwijl er nog O₂ in het systeem aanwezig is. Hiervoor kunnen twee verklaringen worden gegeven. Ten eerste is het mogelijk dat er onder een aerobe atmosfeer, anaerobe plekken in het grondmonster aanwezig zijn waar denitrificatie plaatsvindt. Ten tweede kan er NO₂ worden geproduceerd bij de nitrificatie van ammonium verbindingen. Een aanwijzing hiervoor is het feit dat na 48 uur de hoeveelheid gevormd NO₂ groter is dan de hoeveelheid NO₃ die is verdwenen (zie figuur 4.11a).

In figuur 4.11b en 4.11c zijn de resultaten gegeven van de experimenten met een initiele NO₃ concentratie van resp. 50 en 200 ppm. Hieruit blijkt dat, in vergelijking tot de experimentele resultaten van Cooper & Smith (1963), dezelfde effecten van de initiele NO₃ concentratie op het verloop van de N-kurven worden gevonden:

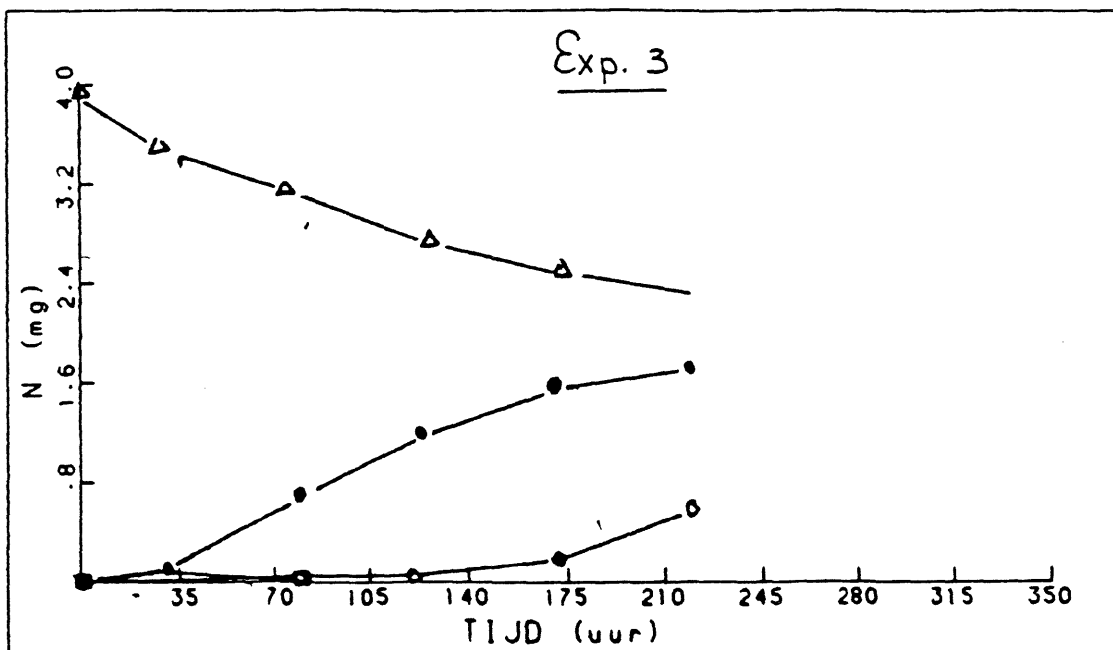
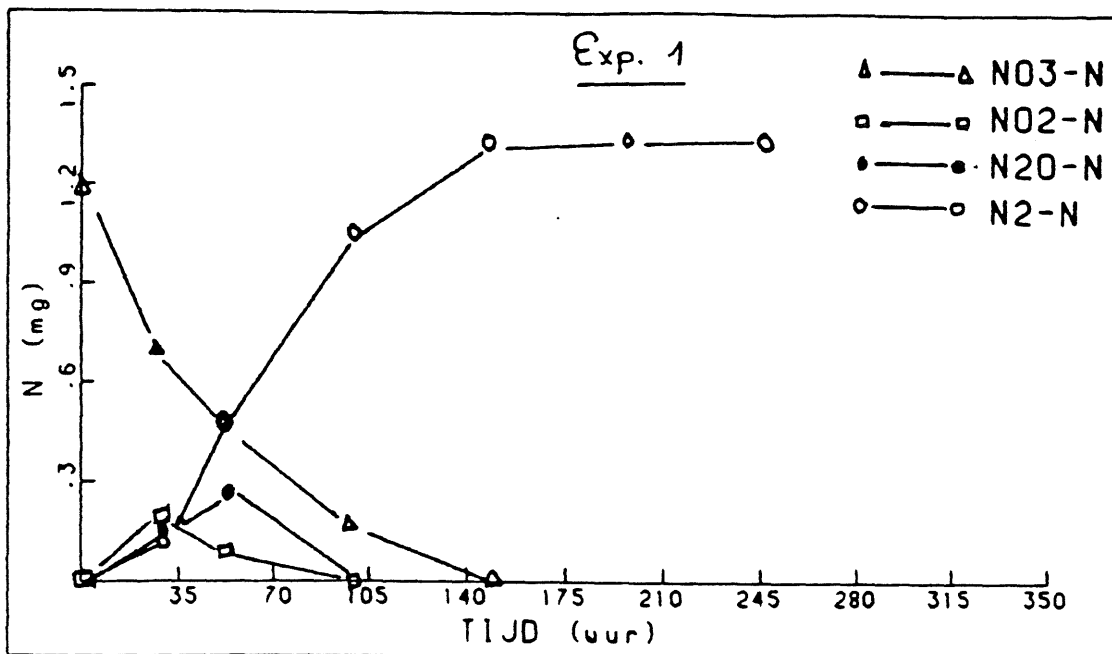
- De maximale hoeveelheid gevormd N₂O neemt toe bij een toenemende initiele NO₃ concentratie.
- De denitrificatie snelheid van NO₃ is onafhankelijk van de initiele NO₃ concentratie. Dit is mogelijk een gevolg van de van de lage KNO₃ waarde (1.E-3 mol/l) t.o.v. de NO₃ concentratie (0.01 - 0.04 mol/l) waarmee is gewerkt, waardoor de NO₃ denitrificatie snelheid alleen afhankelijk is van BIOCF.
- Bij een toenemende initiele NO₃ concentratie wordt de N₂-produktie vertraagd.

Als de experimentele resultaten van Cooper & Smith (1963) (fig. 4.8) worden vergeleken met die van Cho & Sakdinan (1978), dan vallen de volgende punten van verschil op.

- De benodigde tijdsduur voor de omzetting van de hoeveelheid toegevoegde NO₃ in N₂ is bij Cooper & Smith in de ordegrootte van



Figuur 4.11a. Experimentele O₂, CO₂ kurven en N-kurven voor initiele NO₃ concentratie van 100 ppm (exp. 2)



Figuur 4.11b en c. Experimentele N-kurven
voor initiële NO₃ concentraties van
50 en 200 ppm (exp. 1 en 3)

uren, terwijl die bij Cho & Sakdinan in de orde grootte van dagen is. Verder blijkt dat bij Cho & Sakdinan de N_2 produktie snelheid constant is terwijl die bij Cooper & Smith toeneemt met de tijd. Deze verschillende denitrificatie snelheden zijn een gevolg van het verschil in microbiele aktiviteit tussen beide gevallen: bij Cho & Sakdinan blijft deze constant tijdens het denitrificatie proces, terwijl die bij Cooper & Smith toeneemt. Deze laatste auteurs hebben nl. aan het begin van hun experimenten extra koolstof in de vorm van alfalfa aan de grond toegevoegd waardoor de microbiele populatie kon gaan groeien.

- In het begin van de experimenten van Cho & Sakdinan (1978) werd de denitrificatie van NO_3 de eerste 2 dagen belemmerd omdat er nog O_2 in het grondmonster aanwezig was, deze belemmering trad niet op bij Cooper & Smith omdat deze m.b.v. He -gas een anaerobe atmosfeer in hun grondmonsters hadden aangelegd. Om de experimentele resultaten met elkaar te vergelijken moeten de resultaten van Cho & Sakdinan in de tijd verschoven worden met 2 dagen.

- Van een min of meer sequentiele produktie van de verschillende N-componenten zoals die door Cooper & Smith is waargenomen, is bij Cho & Sakdinan geen sprake. Uit hun resultaten blijkt dat er nog steeds een ruime hoeveelheid NO_3 in het systeem aanwezig was terwijl er reeds N_2O en N_2 werd geproduceerd: de N_2O - en een deel van de N_2 -kurve liggen onder de NO_3 kurve. Dit houdt in dat NO_3 en N_2O tegelijkertijd als elektron acceptor optreden. Een oorzaak hiervoor is moeilijk aan te geven, het is mogelijk dat de reductie van NO_3 moeilijker verloopt dan de N_2O reductie omdat het aantal partiële denitrificeerders dat de reactie $NO_3 \rightarrow NO_2$ kan katalyseren kleiner is dan het aantal dat de reactie $NO_2 \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ kan katalyseren.

Verder is het mogelijk dat de grondmonsters in de experimenten van Cho & Sakdinan niet geheel anaeroob waren waardoor de N-componenten eerst naar de anaerobe plekken getransporteerd moesten worden, alvorens ze gereduceerd konden worden. Hierbij wordt de denitrificatie snelheid bepaald door de snelheid van het diffusie proces, deze is voor N_2O , die via de gasfase diffundeert, een factor $1.E4$ sneller dan de diffusie van NO_3 die via de waterfase diffundeert. Hierdoor kan NO_3 minder snel gereduceerd worden dan N_2O . Deze door diffusie bepaalde NO_3 reductiesnelheid heeft waarschijnlijk geen rol

gespeeld tijdens de experimenten van Cooper & Smith (1963) omdat hun grondmonsters volledig anaeroob waren.

Tenslotte kan de oorzaak gezocht worden in het feit dat Cho & Sakdinan gebruik maakten van wasflesjes waarin het grondlaagje vrij dik was (5-6 cm), waardoor de uitwisseling van N₂O tussen het grondmonster en de aangrenzende atmosfeer belemmerd werd. Dit had tot gevolg dat de meeste N₂O in het grondmonster bleef waardoor het snel verder gereduceerd kon worden. Dit is in de experimenten van Cooper & Smith minder waarschijnlijk omdat deze gebruik maakten van een erlenmeyer met daarin een dun grondlaagje (1.5 cm) waarbij N₂O gemakkelijk uit het grondmonster kon ontwijken.

4.5.2.2 Simulatie Resultaten -

a. Inleiding

Zoals reeds is besproken in de vorige paragraaf, stelden Cho & Sakdinan (1978) tijdens hun denitrificatie experimenten vast dat er reeds N₂O en N₂ werd geproduceerd voordat de hoeveelheid NO₃ was uitgeput. Uit de gevoeligheids analyse van het denitrificatie model blijkt dat dit denitrificatie patroon niet nauwkeurig gesimuleerd kan worden als alleen de parameters IBIOCF en TMPK geoptimaliseerd worden. Daarom is besloten om ook de UMXN waarden (UMXNO₃, UMXNO₂ en UMXN₂O) te optimaliseren. Deze parameters bepalen nl. via vergelijking (3.25) de accumulatie van een N-component:

$$K = \frac{UMXN}{KN + N} \quad (3.25)$$

waarin: K = K₁, K₂ of K₃

UMXN = UMXNO₃, UMXNO₂ of UMXN₂O

KN = KNO₃, KNO₂ of KNO₂O

N = NO₃, NO₂ of N₂O

Bij lagere K-waarden neemt de accumulatie van een N-component toe (zie

vergelijking 3.19, par. 3.3.2).

De waarden van IBIOCF en UMXN zijn bepaald aan de hand van experiment 2 (100 ppm), hierbij zijn de waarden zo gekozen dat de experimentele NO₃-kurve zo goed mogelijk werd benaderd door de gesimuleerde kurve. Met deze parameter waarden zijn vervolgens de experimenten 1 en 3 gesimuleerd. Voor TMPK is de waarde 0.196 genomen welke bepaald is met de experimenten van Cooper & Smith (zie vorige paragraaf). Alle experimenten werden gesimuleerd vanaf het tijdstip dat de zuurstof was uitgeput omdat voor een simulatie voor aerobe omstandigheden te weinig gegevens beschikbaar waren. In verband hiermee is de initiele hoeveelheid strikt aerobe biomassa (IBIOCS) op nul gesteld. De hoeveelheid facultatief anaerobe biomassa (BIOCF) is gedurende de simulatie constant gehouden door de groei- en afbraaksnelheden op nul te stellen. Verder is er gesimuleerd met een initiele gluconaat concentratie van 5 g C/l, zodat deze C-bron niet als groei beperkende factor is opgetreden.

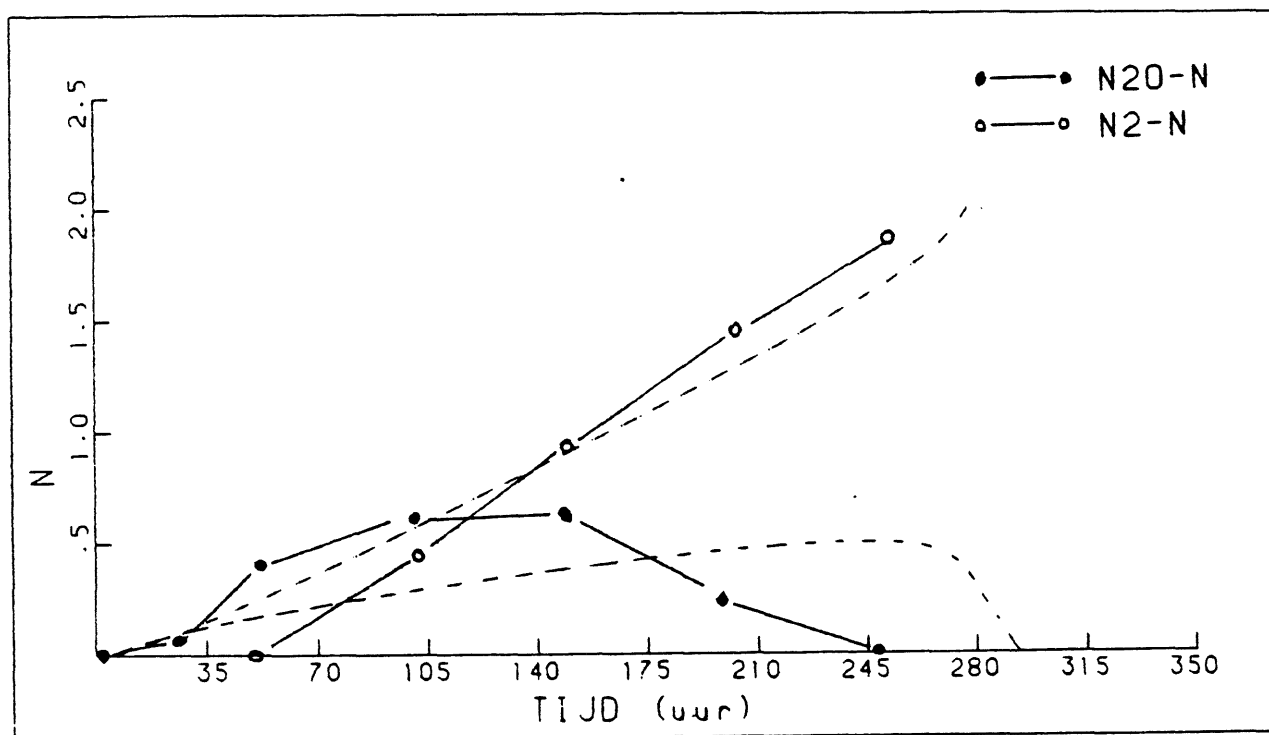
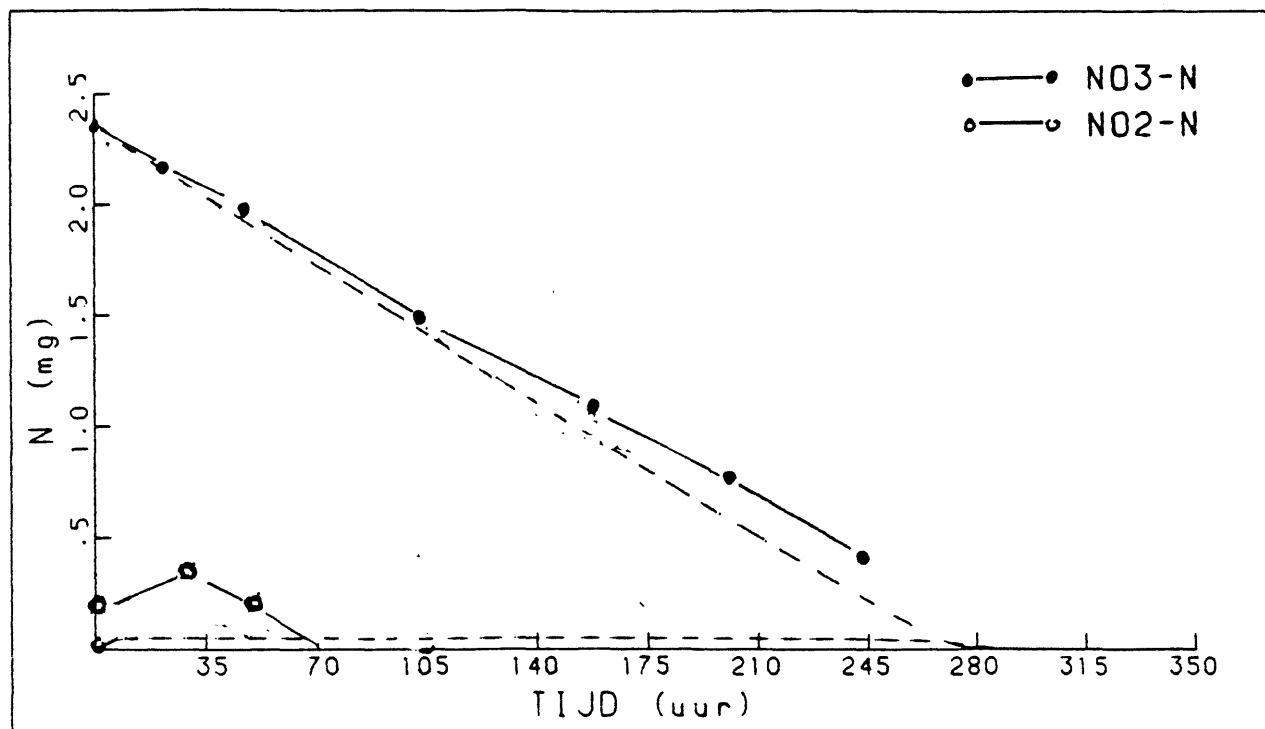
b. Resultaten

Aan de hand van experiment 2 zijn de volgende parameter waarden geoptimaliseerd:

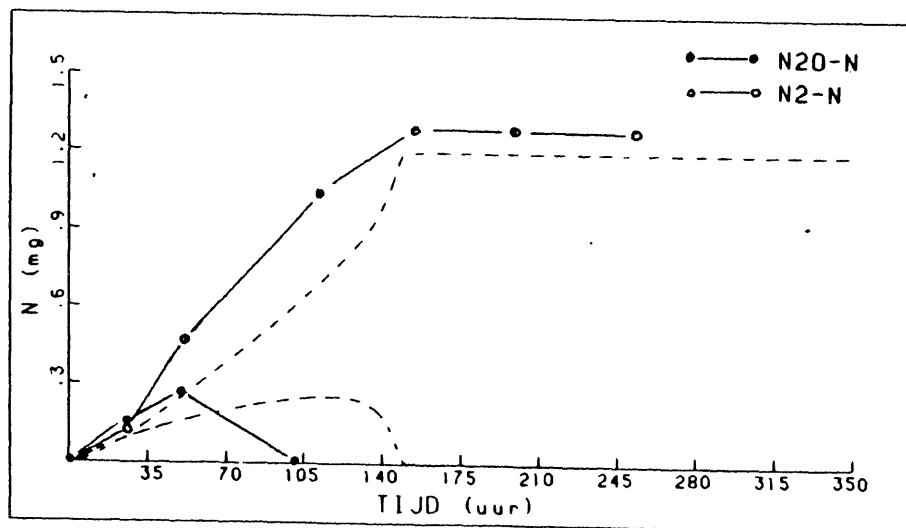
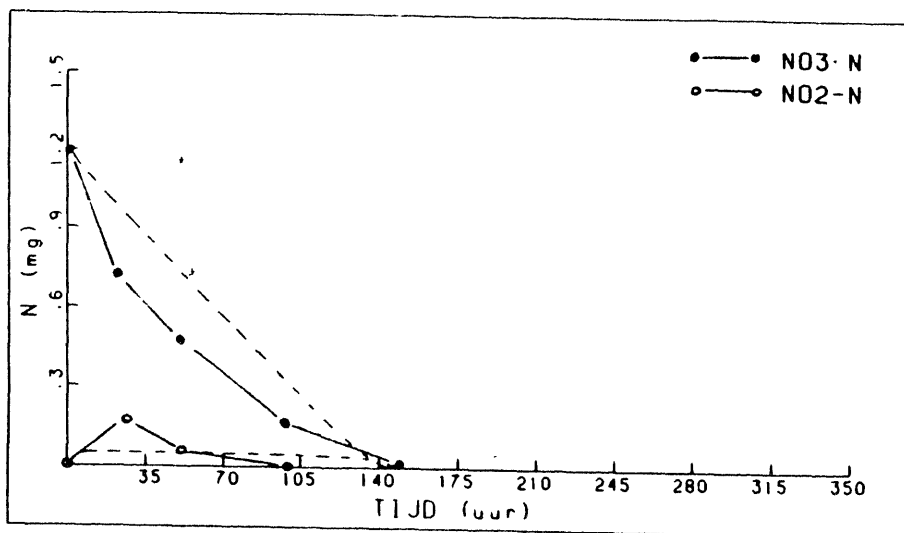
IBIOCS	=	0.0	(g C/l)
IBIOCF	=	0.025	(g C/l)
TMPK	=	0.196	(--)
UMXNO ₃	=	0.02	(hr ⁻¹)
UMXNO ₂	=	15.0	(hr ⁻¹)
UMXN ₂₀	=	0.008	(hr ⁻¹)

Figuur 4.12 geeft van dit experiment de experimentele en gesimuleerde resultaten. Hieruit blijkt dat de experimentele NO₃ en N₂ kurven redelijk goed worden benaderd door de gesimuleerde kurven. Dit geldt echter niet voor de NO₂ kurve: de accumulatie van NO₂ wordt onderschat en de breedte van de NO₂ piek wordt overschat. Verder wordt de maximale hoeveelheid N₂₀ die wordt geproduceerd wel goed benaderd, maar de tijd waarop deze N₂₀ accumulatie optreedt, wordt te laat gesimuleerd.

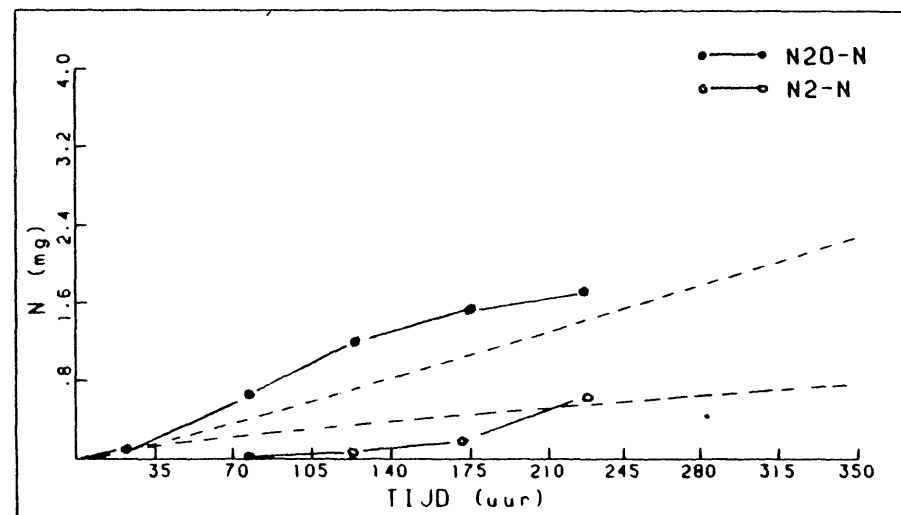
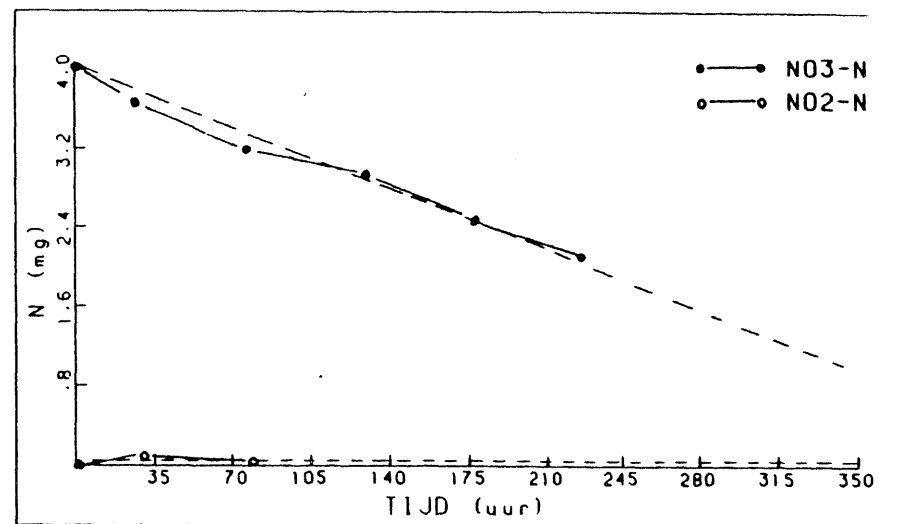
De experimentele en gesimuleerde resultaten bij NO₃ concentraties van 50 en 200 ppm (experiment 1 en 3) zijn gegeven in resp. figuur 4.13 en 4.14.



Figuur 4.12. Experimentele en gesimuleerde N-kurven voor een initiele NO₃ concentratie van 100 ppm.



Figuur 4.13. Experimentele en gesimuleerde N-kurven voor een initiele NO_3 concentratie 50 ppm.



Figuur 4.14. Experimentele en gesimuleerde N-kurven voor een initiele NO_3 concentratie van 200 ppm.

Uit de resultaten blijkt dat de NO₃ kurven weer goed worden benaderd door de gesimuleerde kurven. De vormingssnelheden van N₂ worden ook redelijk goed gesimuleerd. De berekende NO₂ en N₂O kurven wijken vrij sterk af van de experimentele kurven: evenals bij de simulatie van experiment 2 is de gesimuleerde NO₂ accumulatie te gering en wordt de N₂O accumulatie op een te laat tijdstip gesimuleerd.

4.5.2.3 Conclusies -

Bij de simulatie van de experimenten van Cho & Sakdinan (1978) is het voor een goede simulatie van de experimenten nodig om ook de UMXN waarden te optimaliseren. De experimentele NO₃ en N₂ kurven worden dan goed benaderd door de gesimuleerde kurven. De NO₂ en N₂O kurven worden echter minder goed gesimuleerd: de gemeten NO₂ accumulatie wordt onderschat en de accumulatie van N₂O wordt op een te laat tijdstip gesimuleerd.

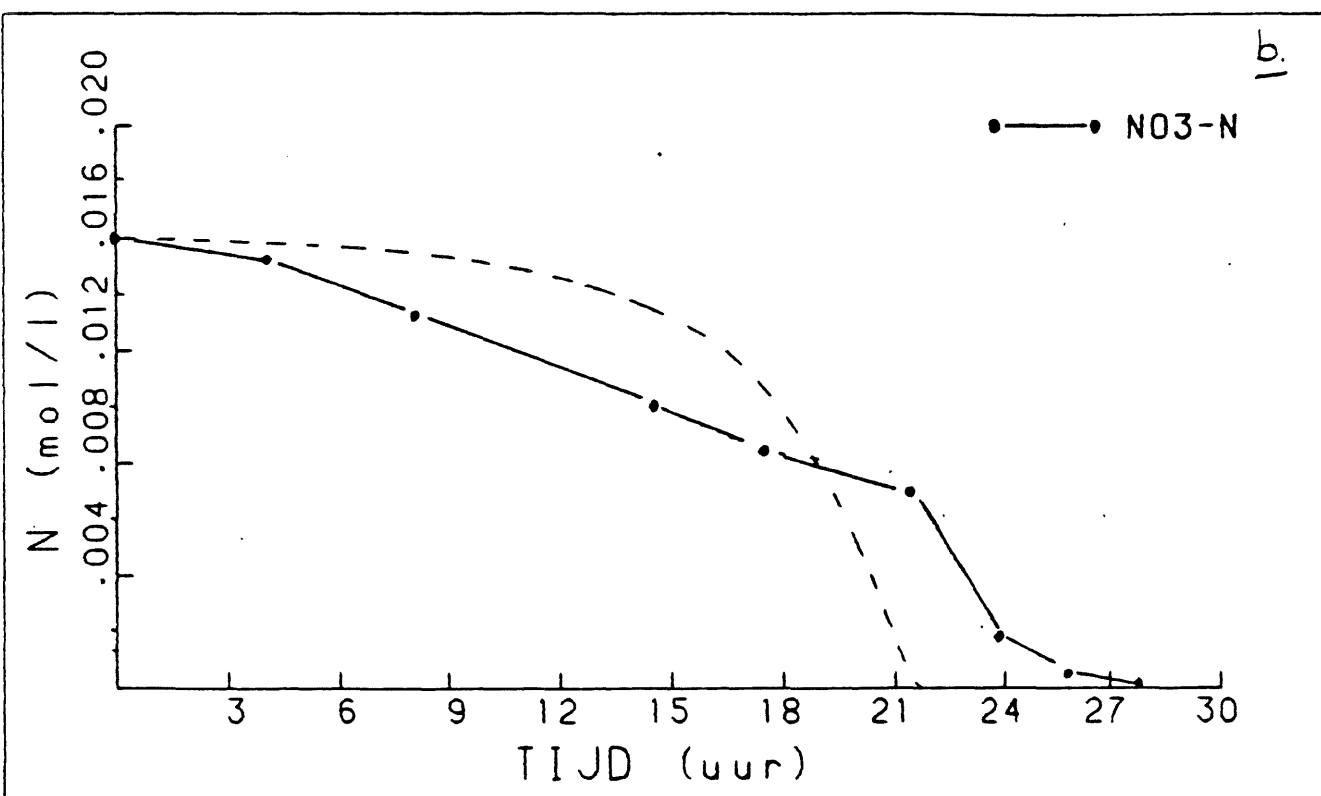
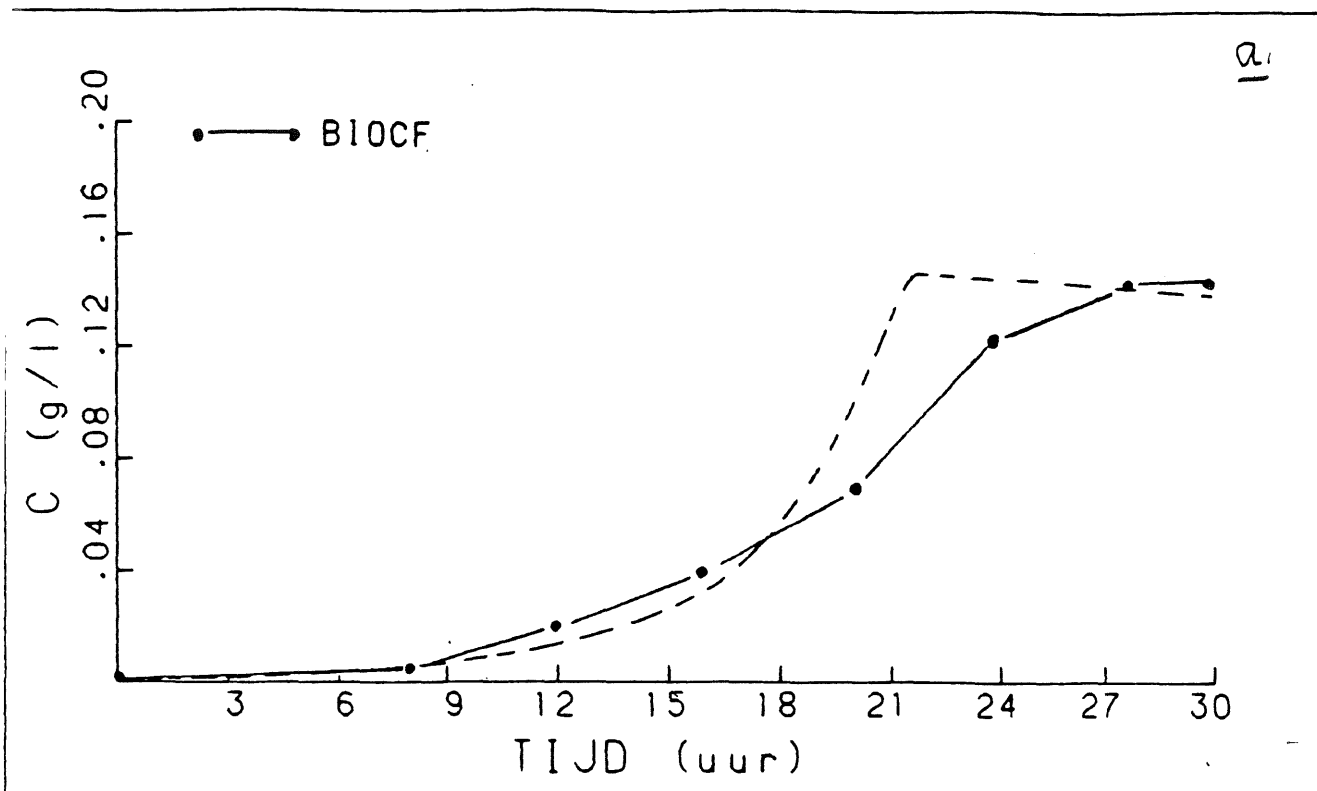
De waarden van UMXN₀₃, UMXN₀₂ en UMXN₂₀ zijn biochemisch onrealistisch. Dit komt doordat in het simulatie model geen rekening wordt gehouden met transport processen terwijl deze tijdens de experimenten van Cho & Sakdinan (1978) waarschijnlijk wel een rol spelen. Geconcludeerd wordt dat de experimenten minder geschikt zijn voor de verificatie van het simulatie model.

4.5.3 Experimenten Van Koike & Hattori (1975a)

Koike & Hattori (1975a) hebben een denitrificatie experiment uitgevoerd met een batch cultuur van *Pseudomonas denitrificans*. De proef werd uitgevoerd onder anaerobe omstandigheden bij een temperatuur van 35 °C. Het groei medium bestond uit: 0.015 mol/l glutamaat (C₅ H₈ O₄ N) en 0.016 mol/l NO₃. De initiele biomassa bedroeg ongeveer 2.E-3 g/l, dit komt overeen met 1.E-3 g C/l.

De parameters waarmee dit experiment gesimuleerd is, staan vermeld in bijlage B.

Figuur 4.15a geeft de experimentele en gesimuleerde resultaten met betrekking tot de hoeveelheid gevormde biomassa. Hieruit blijkt dat het berekende eindgewicht redelijk overeen komt met de experimentele waarde. De groeisnelheid van de biomassa wordt door de simulatie wat overschat, waardoor ook de consumptie snelheid van NO₃ wordt overschat, zie figuur 4.15b. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat de nitraat assimilatie tijdens het experiment verwaarloosd kan worden omdat hiervoor glutamaat-N gebruikt is. In het simulatie model daarentegen, wordt hiervoor de NO₃-bron benut, waardoor de NO₃ sneller verbruikt wordt.



Figuur 4.15. Experimentele en gesimuleerde resultaten van de experimenten van Koike & Hattori (1975a).

HOOFDSTUK 5

CONCLUSIES EN DISCUSSIE

Uit de evaluatie van het denitrificatie model is gebleken dat het denitrificatie patroon van NO₃ tot N₂ via de intermediairen NO₂ en N₂O kwalitatief goed beschreven wordt. In kwantitatief opzicht echter sluiten de simulatie resultaten minder goed aan bij de experimentele resultaten. De NO₃ kurve wordt in de meeste gevallen wel goed benaderd, dit geldt in wat mindere mate ook voor de N₂-kurve. De tijden waarop en de hoeveelheden waarmee de accumulaties van NO₂ en N₂O worden gesimuleerd, wijken in het merendeel van de gevallen sterk af (50-100 %).

Voor de afwijking van de gesimuleerde resultaten t.o.v. experimentele resultaten kunnen twee categorieën oorzaken worden aangewezen. De eerste categorie betreft afwijkingen t.g.v. een te sterke vereenvoudiging van processen die zich in werkelijkheid afspelen. Vereenvoudigingen in het simulatiemodel zijn echter wel noodzakelijk omdat anders geen bruikbaar simulatie model kan worden opgesteld. De tweede categorie betreft de oorzaken waarbij bepaalde parameters in het simulatie model niet voldoende nauwkeurig bepaald of geschat kunnen worden.

M.b.t. de eerste categorie zijn bij het opstellen van het model de volgende vereenvoudigingen aangenomen waarvan op grond van de

resultaten van het vorige hoofdstuk verwacht wordt dat deze een belangrijke oorzaak vormen voor de gevonden afwijkingen.

- Alle denitrificerende micro organismen kunnen NO₃ reduceren t/m N₂. Er wordt aangenomen dat er geen partiele denitrificeerders aanwezig zijn waardoor extra hoeveelheden NO₂ en N₂O kunnen worden geaccumuleerd.

- Er vindt geen mineralisatie van endogene organische stof plaats, zodat de koolstof en stikstof dat door de micro organismen wordt gebruikt, alleen afkomstig is van de toegevoegde nitraat en gluconaat.

- De aan- en afvoer van zowel opgeloste als gasvormige stoffen vindt onbelemmerd plaats (perfect gemengd systeem). Dit houdt o.a. in dat aangenomen wordt dat de snelheid waarmee nitraat wordt aangevoerd, gelijk is aan zijn denitrificatie snelheid, en dat het gevormde N₂O gas niet vervluchtigd, maar beschikbaar blijft om verder gedenitrificeerd te worden.

M.b.t. de tweede categorie oorzaken worden de volgende opmerkingen gemaakt.

- Bij de modellering is uitgegaan van parameter waarden die betrekking hebben op slechts een soort denitrificerend micro organisme: *Paracoccus denitrificans*. In de bodem komen veel meer soorten micro organismen voor die een rol spelen in het denitrificatie proces. Bij de simulatie van denitrificatie in de grond moeten de gebruikte parameter waarden dan ook gezien worden als gemiddelden van individuele waarden van de verschillende micro organismen. In bepaalde gevallen kunnen de individuele waarden sterk afwijken van die welke in dit model gebruikt zijn, wat leidt tot grote verschillen tussen de gesimuleerde en experimentele uitkomsten.

- Van de Michaelis Menten vergelijking zijn alleen de u_{max} en K_m -waarden van NO₃ bekend, voor NO₂ en N₂ zijn min of meer arbitraire waarden aangenomen met een verhouding ($u_{max}(NO_3) : u_{max}(NO_2) : u_{max}(N_2O) = (5:3:1)$). Deze veronderstelde verhouding hoeft niet juist te zijn.

- De reductie factor voor de temperatuur (TMPK) bepaalt de snelheid van de relatieve groei (u_{max}) op de verschillende N-componenten, deze is tijdens de simulatie van de denitrificatie experimenten bepaald via optimalisatie. Hierbij is aangenomen dat deze reductie factor voor alle relatieve groeisnelheden hetzelfde is. Bij de micro organismen is het echter goed mogelijk dat de reductie factor voor iedere u_{max} een andere waarde heeft. Hiermee kunnen o.a. afwijkingen tussen experiment en simulatie m.b.t. de breedte van de NO₂ en N₂O pieken, verklaard worden.

Verbeteringen van het simulatie model kunnen op de eerste plaats gerealiseerd worden door de waarden van de gebruikte parameters experimenteel te bepalen in het betreffende grondmonster i.p.v. in een continuculture. De waarden hebben zodoende betrekking op voor de grond meer realistische omstandigheden. Dit geldt in het bijzonder voor de parameters die in belangrijke mate de simulatie resultaten bepalen: de temperatuurs coefficient (TMPK) en de parameters van de Michaelis Menten vergelijking (UMXNO₃, UMXNO₂ en UMXN₂O) en van de Pirt vergelijking (YMXNO₃, YMXNO₂ EN YMXN₂O).

De parameter IBIOCF is tijdens dit onderzoek bepaald m.b.v. de simulatie resultaten, waarbij de waarde zo is gekozen (geoptimaliseerd) dat de experimentele resultaten zo goed mogelijk benaderd werden. Voor een betere simulatie is het nodig deze parameter experimenteel te bepalen, daarmee is dan ook een betere evaluatie van het model mogelijk.

Verder moet vastgesteld worden welke vereenvoudigingen tot grote afwijkingen kunnen leiden en op welke manier het model op deze punten verbeterd kan worden. In verband met het denitrificatie experiment van Leffelaar moet allereerst nader onderzocht worden of door mineralisatie van endogene organische stof belangrijke hoeveelheden stikstof en koolstof kunnen vrijkomen waarvan de denitrificeerders gebruik kunnen maken. Verder is simulatie van transport van gassen en opgeloste stoffen van belang, dit wordt reeds door anderen in een apart submodel gesimuleerd.

Voor een goede simulatie van het denitrificatie experiment van Leffelaar, is het noodzakelijk dat de bovengenoemde verbeteringen in het submodel dat in dit onderzoek is ontwikkeld, worden aangebracht. Integratie van dit submodel, tesamen met andere submodellen die momenteel ontwikkeld worden, kan dan leiden tot een realistische

simulatie van het denitrificatie proces.

Aanbevelingen voor verder onderzoek

Uit het vorige hoofdstuk bleek dat verificatie van het simulatie model met experimenten uit de literatuur moeilijk is. Dit komt doordat de experimentele resultaten grote verschillen laten zien tussen de verschillende auteurs, en dat de experimenten voor een andere doelstelling zijn opgezet dan voor de verificatie van een simulatie model.

Er wordt daarom voorgesteld experimenten uit te voeren die speciaal tot doel hebben het huidige simulatie model te verifiëren. Hierbij wordt gedacht aan experimenten met gesteriliseerde grond waarvan een bekende hoeveelheid denitrificerende bacteriën wordt toegevoegd.

Een ander probleem bij het gebruik van het huidige simulatie model vormen de parameters van de Michaelis Menten en de Pirt vergelijking. De waarden hiervan zijn niet bekend en moesten geschat worden. Vanwege de belangrijke rol die deze parameters spelen is een goede verificatie niet mogelijk zonder nauwkeurige waarden. Daarom verdient het de aanbeveling de waarden ervan via aanvullende experimenten te bepalen.

LITERATUUR

- Allison, F.E., 1955. The enigma of soil nitrogen balance sheets.
Adv. Agron. 7: 213-250.
- Allison, F.E., 1966. The fate of nitrogen applied to soils.
Adv. Agron. 18: 219-258.
- Baas, R., 1984. Een microbiologisch model van de denitrificatie.
Doctoraal verslag, Landbouwhogeschool Wageningen,
vakgroep Theoretische Teeltkunde.
- Betlach, M.R. and J.M. Tiedje, 1981. Kinetic explanation for
accumulation of nitrite, nitric oxide and nitrous oxide
during bacterial denitrification. Appl. and Environ.
Microbiol. 42: 1074-1084.
- Blackmer, A.M. and J.M. Bremner, 1978. Inhibitory effect of
nitrate on reduction of N_2O to N_2 by soil micro organisms.
Soil Biol. Biochem. 10: 187-191.
- Blackmer, A.M. and J.M. Bremner, 1981. Terrestrial nitrification
as a source of atmospheric nitrous oxide. Chapter 8 in:
Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide,
C.C. Delwiche (Ed.). John Wiley and Sons, New York, 286 pp.
- Bollag, J.M., S. Drzymala and L.T. Kardos, 1973. Biological versus
chemical nitrite decomposition in soil. Soil Sci. 116: 44-50.

- Bowman, R.A. and D.D. Focht, 1974. The influence of glucose and nitrate concentrations upon denitrification rates in sandy soil. *Soil Biol. Biochem.* 6: 297-301.
- Chalk, P.M. and C. J. Smith, 1983. Chemodenitrification. Chapter 3 in: *Developments in plant and soil science*, volume 9. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk publishers, The Hague, 317 pp.
- Cady, F.B. and W.V. Bartholomew, 1960. Sequential products of anaerobic denitrification in Norfolk soil material. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 24: 477-482.
- C.A.S.T. (Council for Agricultural Science and Technology), 1976. Effect of increased nitrogen fixation on stratospheric ozone, report no. 53, Iowa State University, Ames, IA.
- Chang, R., 1977. *Physical chemistry with applications to biological systems*. MacMillan publishing Co., Inc., New York, 538 pp.
- Cho, C.M., 1982. Oxygen consumption and denitrification kinetics in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 756-762.
- Cho, C.M. and J.G. Mills, 1979. Kinetic formulation of the denitrification processes in soil. *Can. J. Soil Sci.* 59: 249-257.
- Fillery, I.R.P. Biological denitrification. Chapter 2 in: *Developments in Plant & Soil Science*, vol. 9. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk publishers, The Hague, 317 pp.
- Firestone, M.K. and J.M. Tiedje, 1979. Temporal change in nitrous and dinitrogen from denitrification following onset of anaerobiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 673-679.
- Freney, J.R., O.T. Denmead and J.R. Simpson, 1978. Nitrous oxide emission from soils at low moisture contents. *Soil Biol. Biochem.* 11: 167-173.
- Greenwood, D.J., 1961. The effect of oxygen concentration on the decomposition of organic materials in soil. *Plant and soil* 14: 360-376.
- Ingraham, J.L., 1981. Chapter 3 in: *Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide*, C.C. Delwiche (Ed.) John Wiley and Sons, New York, 286 pp.
- Janssen, B.H., 1983. *Organische stof en bodemvruchtbaarheid*. Diktaat vakgroep Bodemkunde en Plantevoeding, Landbouwhogeschool Wageningen.
- Kohl, D.H., F. Vithayathil, P. Whitlow, G. Shearer and S.H. Chien, 1976. Denitrification kinetics in soils systems:

- the significance of good fits of data to mathematical forms.
Soil Sci. Soc. Am. J. 40: 249-253.
- Koike, I. and A. Hattori, 1975a. Growth yield of a denitrifying bacterium *Pseudomonas denitrificans*, under aerobic and denitrifying conditions. J. of Gen. Microbiol. 88: 1-10.
- Koike, I. and A. Hattori, 1975b. Energy yield of denitrification: an estimate from growth yield in continuous cultures of *Pseudomonas denitrificans* under nitrate, nitrite and nitrous oxide limited conditions. J. of Gen. Microbiol. 88: 11-19.
- Koskinen, W.C. and D.R. Keeney, 1982. Effect of pH on the rate of products of denitrification in a silt loam soil.
Soil Sci. Soc. Am. J. 46: 1165-1167.
- Payne, W.J., 1973. Reduction of nitrogenous oxides by micro organisms. Bacteriol. Rev. 37: 409-452.
- Pirt, S.J., 1965. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proc. Royal Soc. Ser. B. 163: 224-231.
- Reddy, K.R., P.S.C. Rao and R.E. Jessup, 1982. The effect of carbon mineralization on denitrification kinetics in mineral and organic soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 46: 62-68.
- Rolston, D.E., 1981. Nitrous oxide and nitrogen gas production in fertilizers loss. In: Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide, C.C. Delwiche (Ed.).
John Wiley and Sons, New York, 286 pp.
- Shah, D.B. and G.A. Coulman, 1978. Kinetics of nitrification and denitrification reactions. Biotech. and Bioen. 20: 43-72.
- Stanford, G., R.A. Vander Pol and S. Dzienia, 1975. Denitrification in relation to total and extractable soil carbon.
Soil Sci. Soc. Am. Proc. 39: 284-289.
- Veen, J.A. van, 1977. The behaviour of nitrogen in soil: a computer simulation model. Proefschrift Vrije Universiteit Amsterdam, ITAL Wageningen.
- Versseveld, H.W. van, E.M. Meyer and A.H. Stouthamer. Energy conservation during nitrate respiration in *Paracoccus denitrificans*. Arch. Microbiol. 112: 17-23.
- Versseveld, H.W. and A.H. Stouthamer, 1978. Growth yield and the efficiency of oxidative phosphorylation during autotrophic growth of *Paracoccus denitrificans* on methanol and formate.
Arch. Microbiol. 118: 21-26.
- Wijler, J. and C.C. Delwiche, 1954. Investigations on the

denitrifying process in soil. Plant and Soil 5: 155-169.

Woldendorp, J.W., 1981. Nutrients in the rhizosphere. Agricultural
Yield potentials in Continental Climates. Proc. 16th Coll. Int.
Potash Institute, Bern.

BIJLAGE A

COMPUTER PROGRAMMA VAN HET SIMULATIEMODEL

TITLE DENITRIFICATIE MODEL

```
*****
*
* AUTEUR: JOS REIJERINK
*
* DATUM: 20 AUGUSTUS 1985
*
* UITGANGSPUNT: Denitrificatie model van Baas (1984)
*
```

```
*****
```

```
/      INTEGER I
FIXED I
STORAGE YMAXG(3),YMGC(3),MG(3),RBIGD(3),RBIGG(3),RGLUC(3)
STORAGE MGC(3),UO2(3),MO2(3),YMXO2(3),RO2(3)
STORAGE RCBID(3),RNBID(3)
TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.27,TMP=20.
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
```

PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.

* Parameters Pirtvergelijking*

TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.

TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4

PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75

PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4

* Parameters Michaelis-Menten vergelijking*

PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05

PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3

PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6

* Initiele hoeveelheden*

INCON IBIOCF=1.E-3,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=1.5

INCON IO2=2.72E-4,INO2=0.,INO3=0.06,IN2O=0.,IN2=0.

INO3A=(IBIOCF+IBIOCS)*NNBIO/(NCBIO*MC)

CONVF=MBIO/(NCBIO*MC)

NOSORT

IF (GLUC.LE.1.E-5) THEN

AGLUC=0.

ELSE

AGLUC=1.

ENDIF

IF (O2.LE.0.) THEN

O2=0.

A0=0.

ELSE

A0=1.

ENDIF

IF (NO3.LE.1.E-5) THEN

```

      ANO3=0.
ELSE
      ANO3=1.
ENDIF
      IF (NO2.LE.1.E-5) THEN
            ANO2=0.
      ELSE
            ANO2=1.
      ENDIF
      IF (N2O.LE.1.E-5) THEN
            AN20=0.
      ELSE
            AN20=1.
      ENDIF

```

Reduktie functies

```

REDF02=AFGEN(REDFTB,02)

```

```

FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1.,1.)

```

```

REDTMP=AFGEN(TMPTB,TMP)

```

```

FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)

```

```

DO I=1,3

```

```

      YMGC(I)=YMAXG(I)*NCBIO/(NCSUG*MBIO)

```

```

      MGC(I)=MG(I)*NCSUG*MBIO/NCBIO*REDTMP

```

```

ENDDO

```

=====

*Berekening van de groeisnelheden van de strikt aerobe en facultatief

*anaerobe biomassa onder aerobe omstandigheden

```

UO2(1)=((UMX02*GLUC)/(KGLUC+GLUC))*TMPK*REDF02

```

```

UO2(3)=((UMX02*GLUC*O2)/((KGLUC+GLUC)*(KO2+O2)))*TMPK

```

```

RBIGG(1)=UO2(1)*BIOCF*AGLUC

```

```

RBIGG(3)=UO2(3)*BIOCS*AGLUC*AO

```

Snelheid van het zuurstof verbruik

$RO2(1) = (UO2(1) / YMXO2(1) + MO2(1)) * REDFO2 * BIOCF * CONV F$

$RO2(3) = (UO2(3) / YMXO2(3) + MO2(3) * AO) * BIOCS * CONV F$

$RO2T = RO2(1) + RO2(3)$

=====

*Groeisnelheid van de facultatief biomassa onder anaerobe

*omstandigheden.

$K1 = UMXNO3 / (KNO3 + NO3)$

$K2 = UMXNO2 / (KNO2 + (NO2) ** 2)$

$K3 = UMXN2O / (KN2O + N2O)$

$NOEM = K1 * NO3 + K2 * NO2 * NO2 + K3 * N2O$

IF (NOEM.LE.1.E-5) THEN

ANOEM=0.

ELSE

ANOEM=1.

ENDIF

FINISH NOEM=1.E-5

$UNO3 = (UMXNO3 * TMPK * NO3 * GLUC) / ((KNO3 + NO3) * (KGLUC + GLUC))$

$GRNO3 = UNO3 * (BIOCF / YMXNO3) * CONV F * AGLUC * ANO3$

$UNO2 = (UMXNO2 * TMPK * (NO2) ** 2 * GLUC) / ((KNO2 + (NO2) ** 2) * (KGLUC + GLUC))$

$GRNO2 = UNO2 * (BIOCF / YMXNO2) * CONV F * AGLUC * ANO2$

$UN2O = (UMXN2O * GLUC * TMPK * N2O) / ((KN2O + N2O) * (KGLUC + GLUC))$

$GRN2O = UN2O * (BIOCF / YMXN2O) * CONV F * AGLUC * AN2O$

$GRN = (GRNO3 + GRNO2 + GRN2O) * (1. - REDFO2)$

$MRNO3 = MNO3 * BIOCF * CONV F * ANO3$

$MRNO2 = MNO2 * BIOCF * CONV F * ANO2$

$MRN2O = MN2O * BIOCF * CONV F * AN2O$

$MRN = (MRNO3 + MRNO2 + MRN2O) * (1. - REDFO2)$

RTOT=GRN+MRN

RNN03=(-K1*NO3*RTOT*ANO3)/NOEM

RNN02=((K1*NO3*ANO3-2*K2*NO2*NO2*ANO2)*RTOT)/NOEM

RNN20=((K2*NO2*NO2*ANO2-K3*N20*AN20)*RTOT)/NOEM

RNN2=(K3*N20*AN20*RTOT)/NOEM

RNO3=(K1*NO3*RTOT*ANO3)/NOEM

RNO2=(2*K2*NO2*NO2*RTOT*ANO2)/NOEM

RN20=(K3*N20*RTOT*AN20)/NOEM

IF ((GRN03+MRN03).LE.0.) THEN

RBNO3=0.

ELSE

RBNO3=(GRN03/(GRN03+MRN03)*RNO3*YMXNO3)/CONVF

ENDIF

IF ((GRN02+MRN02).LE.0.) THEN

RBNO2=0.

ELSE

RBNO2=(GRN02/(GRN02+MRN02)*RNO2*YMXNO2)/CONVF

ENDIF

IF ((GRN20+MRN20).LE.0.) THEN

RBN20=0.

ELSE

RBN20=(GRN20/(GRN20+MRN20)*RN20*YMXN20)/CONVF

ENDIF

RBIGG(2)=(RBNO3+RBNO2+RBN20)*ANO3*(1.-REDF02)

=====

Afbraaksnelheid van de totale biomassa

RBIGD(1)=-YMGC(1)*MGC(1)*BIOCF*REDF02

```

RBIGD(2)=-YMGC(2)*MGC(2)*BIOCF*(1.-REDF02)
RBIGD(3)=-YMGC(3)*MGC(3)*BIOCS

```

Groeijsnelheid van de totale biomassa

```

RBIOCF=RBIGG(1)+RBIGG(2)+RBIGD(1)+RBIGD(2)
RBIOCS=RBIGG(3)+RBIGD(3)

```

Snelheid gluconaat verbruik

```

RGLUC(1)=((UO2(1)/YMGC(1))+MGC(1))*BIOCF*REDF02
RGLUC(2)=(RBIGG(2)/YMGC(2))+MGC(2)*BIOCF*ANOEM*(1.-REDF02)
RGLUC(3)=((UO2(3)/YMGC(3))+MGC(3))*BIOCS*AO
RGLUCT=(RGLUC(1)+RGLUC(2)+RGLUC(3))*AGLUC

```

Berekening van hoeveelheid C in dode biomassa

```

RCBID(1)=-1.*(1.-FRCO2)*RBIGD(1)
RCBID(2)=-1.*(1.-FRCO2)*RBIGD(2)
RCBID(3)=-1.*(1.-FRCO2)*RBIGD(3)
RCBIDT=RCBID(1)+RCBID(2)+RCBID(3)
RCMIN=FRC*RCBIDT
RCINC=(1.-FRC)*RCBIDT
RCO2=(RGLUCT-RCBIDT-RBIOCF-RBIOCS)

```

Productie snelheid van NO3 in dode biomassa

```

RNBID(1)=-1.*NNBIO/(NCBIO*MC)*RBIGD(1)
RNBID(2)=-1.*NNBIO/(NCBIO*MC)*RBIGD(2)
RNBID(3)=-1.*NNBIO/(NCBIO*MC)*RBIGD(3)
RNBIDT=RNBID(1)+RNBID(2)+RNBID(3)
RNMIN=FRN*RNBIDT
RNINC=(1.-FRN)*RNBIDT

```


Snelheid van nitraat assimilatie

$RNO3A = (RBIOCF + RBIOCS) * NNBIO / (NCBIO * MC)$

=====

*Berekening van de verschillende integraalinhouden

$GLUC = INTGRL(IGLUC, -RGLUCT + RCMIN)$

$CO2 = INTGRL(0., RCO2)$

$BIOCF = INTGRL(IBIOCF, RBIOCF)$

$BIOCS = INTGRL(IBIOCS, RBIOCS)$

$CBIDT = INTGRL(0., RCBIDT)$

$CMIN = INTGRL(0., RCMIN)$

$CINC = INTGRL(0., RCINC)$

$O2 = INTGRL(IO2, -RO2T)$

$NO3 = INTGRL(INO3, RNNO3 - RNO3A - RNBIDT + RNMIN)$

$NO2 = INTGRL(INO2, RNNO2)$

$N2O = INTGRL(IN2O, RNN2O)$

$N2 = INTGRL(IN2, RNN2)$

$N2O2 = 2 * N2O$

$N22 = 2 * N2$

$NO3A = INTGRL(INO3A, RNO3A)$

$NMIN = INTGRL(0., RNMIN)$

$NINC = INTGRL(0., RNINC)$

Omrekening naar mg N in het grondmonster

$NO3N = NO3 * GEW * GWPERC * MN$

$NO2N = NO2 * GEW * GWPERC * MN$

$N2ON = N2O * GEW * GWPERC * MN * 2.$

$N2N = N2 * GEW * GWPERC * MN * 2.$

Massabalans van stikstof en koolstof

NTOT=NO3+NO2+2*N2O+2*N2+NO3A+NINC

CTOT=CO2+GLUC+BIOCF+CINC+BIOCS

=====

METHOD RKS

TIMER FINTIM=100.,OUTDEL=0.5,DELT=0.1,PRDEL=10.

ABSERR NO3=1.E-5, GLUC=1.E-5

RELERR NO3=1.E-5, GLUC=1.E-5

Output sectie

*PRINT NTOT,CTOT

*OUTPUT NO3N,NO2N,N2ON,N2N

*PAGE NPLLOT=0.

OUTPUT NO3,NO2,N2O2,N22,O2

PAGE NPLLOT=0.

OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC

PAGE NPLLOT=0.

OUTPUT NMIN,NINC,NO3A

PAGE NPLLOT=0.

OUTPUT CMIN,CINC,CBIDT

PAGE NPLLOT=0.

END

STOP

ENDJOB

VERKLARENDE SYMBOLENLIJST

=====

AGLUC	: faktor voor nulstelling van de gluconaat consumptie snelheid (-)
AN20	: faktor voor nulstelling van de N20 consumptie snelheid (-)
ANO2	: idem, voor NO2
ANO3	: idem, voor NO3
ANOEM	: idem, voor NOEM
AO	: idem voor O2
BIOCF	: concentratie levende facultatief anaerobe biomassa (g C/liter bodemoplossing)
BIOCS	: concentratie levende strikt aerobe biomassa (g C/l)
CBIDT	: concentratie totale dode biomassa (g C/l)
CINC	: concentratie geincorporeerde koolstof (g C/l)
CMIN	: concentratie gemineraliseerde koolstof (g C/l)
CO2	: concentratie CO2-C (g C/l)
CONVF	: conversie factor (g biom/g C-biom)
CTOT	: concentratie totale koolstof in het systeem (g C/l)
FRC	: fractie van dode biomassa-C dat gemineraliseerd wordt (-)
FRCO2	: fractie van gluconaat dat wordt omgezet in CO2 (-)
FRN	: fractie van dode biomassa-N dat gemineraliseerd wordt (-)
GEW	: gewicht van het grondmonster (kg)
GLUC	: concentratie gluconaat-C (g C/l)
GRN	: consumptie snelheid van de N-comp. t.g.v. groei (mol.l-1.hr-1)
GRN20	: snelheid van N20-N verbruik t.g.v. groei (mol N20-N.l-1.hr-1)
GRN02	: idem, voor NO2
GRN03	: idem, voor NO3
GWPERC	: vochtgehalte (gew. %)
IBIOCF	: initiele concentratie facultatief anaerobe

biomassa (g C/l)
 IBI OCS : initiele concentratie strikt aerobe
 biomassa (g C/l)
 IGLUC : initiele gluconaat-C concentratie (g C/l)
 IN2 : initiele N₂-concentratie (mol N₂-N/l)
 IN20 : idem, (mol N₂O-N/l)
 INO2 : idem, (mol NO₂-N/l)
 INO3 : idem, (mol NO₃-N/l)
 INO3A : initiele concentratie geassimileerde N
 (mol N/l)
 IO2 : initiele zuurstof concentratie (mol O₂/l)
 K1 : wegingsfactor voor NO₃ (1.mol-1.hr-1)
 K2 : idem, voor NO₂ (1**2.hr-1.mol-2)
 K3 : idem, voor N₂O (1.mol-1.hr-1)
 KGLUC : Michaelis Menten constante voor gluconaat
 (g C/l)
 KN20 : idem, voor N₂O (mol N₂O-N/l)
 KN02 : idem, voor NO₂ (mol NO₂-N/l)
 KN03 : idem, voor NO₃ (mol NO₃-N/l)
 KO2 : idem, voor O₂ (mol O₂/l)
 MBIO : molgewicht biomassa (g biomassa/mol biomassa)
 MC : molgewicht kooldstof (g C/mol C)
 MG : molaire onderhoudscoefficient gluconaat
 (mol gluc/g biom/hr)
 MGC : onderhoudscoefficient (g C-gluc/g C-biom/hr)
 MN : molgewicht stikstof (g N/mol N)
 MN20 : onderhoudscoefficient bij groei op N₂O
 (mol N₂O-N/g bio/hr)
 MN02 : idem, (mol NO₂-N/g biom/hr)
 MN03 : idem, (mol NO₃-N/g biom/hr)
 MO2 : idem, (mol O₂/g biom/hr)
 MRN : consumptie snelheid van de N-comp. t.g.v.
 onderhoud (mol N-comp.1-1.hr-1)
 MRN20 : snelheid van N₂O-N verbruik t.g.v. onderhoud
 (mol N₂O-N/l-1.hr-1)
 MRN02 : idem, (mol NO₂-N.1-1.hr-1)
 MRN03 : idem, (mol NO₃-N.1-1.hr-1)
 N2 : concentratie N₂-N (mol/l)
 N22 : concentratie N₂ (mol/l)

N2N	: gewicht N2-N (mg)
N2O	: concentratie N2O-N (mol/l)
N2O2	: concentratie N2O (mol/l)
N2ON	: gewicht N2O-N (mg)
NCBIO	: koolstof gehalte in biomassa (mol C-biom/mol bio)
NCSUG	: koolstof gehalte gluconaat (mol C-gluc/mol gluc)
NINC	: concentratie geincorporeerd N (mol N/l)
NMIN	: concentratie gemineraliseerd N (mol N/l)
NNBIO	: stikstof gehalte in biomassa (mol N-bio/mol bio)
NO2	: concentratie NO2-N (mol/l)
NO2N	: gewicht NO2-N (mg)
NO3	: concentratie NO3-N (mol/l)
NO3A	: concentratie geassimileerd N (mol N/l)
NO3N	: gewicht NO3-N (mg)
NOEM	: noemer in vgl (3.19) (hr-1)
NTOT	: totale concentratie N in het syseem (mol/l)
O2	: concentratie O2 (mol/l)
RBIGD	: afbraaksnelheid van de biomassa (g C.1-1.hr-1)
RBIGG	: bruto groeisnelheid van de biomassa (g C.1-1.hr-1)
RBIOCF	: groeisnelheid van de facultatief anaerobe biomassa (g C.1-1.hr-1)
RBIOCS	: idem, van de strikt aerobe biomassa
RBN2O	: groeisnelheid van de facultatief anaerobe biomassa bij groei op N2O (g C.1-1.hr-1)
RBN02	: idem, bij groei op NO2
RBN03	: idem, bij groei op NO3
RCBIDT	: snelheid van vorming van dode biomassa (g C.1-1.hr-1)
RCINC	: incorporatie snelheid van koolstof (g C.1-1.hr-1)
RCMIN	: mineralisatie snelheid van koolstof (g C.1-1.hr-1)
RCO2	: produktie snelheid van CO2-C (g C.1-1.hr-1)
REDTMP	: reductie factor voor de temperatuur (-)
RGLUCT	: snelheid van gluconaat verbruik (g C-gluc.1-1.hr-1)
RN2O	: snelheid N2O verbruik (mol N2O-N.1-1.hr-1)
RNBIDT	: snelheid van de vorming van N in dode biomassa

(mol N.1-1.hr-1)
 RNINC : incorporatie snelheid van stikstof
 (mol N.1-1.hr-1)
 RNMIN : mineralisatie snelheid van stikstof
 (mol N.1-1.hr-1)
 RNN2 : netto snelheid N2-N verbruik (mol N2-N.1-1.hr-1)
 RNN20 : idem, (mol N20-N.1-1.hr-1)
 RNN02 : idem, (mol NO2-N.1-1.hr-1)
 RNN03 : idem, (mol NO3-N.1-1.hr-1)
 RNO2 : reductie snelheid van NO2-N (mol NO2-N.1-1.hr-1)
 RNO3 : idem, (mol NO3-N.1-1.hr-1)
 RNO3A : assimilatie snelheid van stikstof
 (mol N.1-1.hr-1)
 RO2T : snelheid O2 verbruik (mol O2.1-1.hr-1)
 RTOT : denitrificatie intensiteit
 (mol N-comp.1-1.hr-1)
 TMPK : temperatuurs coefficient voor de
 relatieve groeisnelheid (-)
 UMXN20 : maximale relatieve groeisnelheid bij groei
 op N20 (hr-1)
 UMXN02 : idem, voor NO2
 UMXN03 : idem, voor NO3
 UMX02 : idem, voor O2
 UN20 : relatieve groeisnelheid bij groei op N20
 (hr-1)
 UN02 : idem, voor NO2
 UN03 : idem, voor NO3
 U02 : idem, voor O2
 YMAXG : maximale molaire groei opbrengst
 (g biom/mol gluc)
 YMGC : maximale groei opbrengst (g C-biom/g C-gluc)
 YMX02 : maximale groei opbrengst bij groei op O2
 (g bio/mol O2)
 YMXN20 : idem, voor N20 (g bio/mol N20-N)
 YMXN02 : idem, voor NO2
 YMXN03 : idem, voor NO3

n.b.: 'N-comp.' = (NO3-N + NO2-N + N20-N), (mol/l)

BIJLAGE B

FOR06.DAT FILES

FIGUUR 4.1

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.27
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=1.E-3,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=1.5
INCON IO2=2.72E-4,INO2=0.,INO3=0.06,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RECT
TIMER FINTIM=100.,OUTDEL=0.5,DELT=0.004,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3,NO2,N2O2,N22
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMIN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RECT      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
  DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
  4.00000E-03 1.00000E-05 100.00      10.000      0.50000      0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME 100.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	100.000	NO3	4.638048E-06	6.000000E-02
NO2	0.000000E+00	2.725583E-02	N2O2	0.000000E+00	1.049251E-02
N22	0.000000E+00	4.843239E-02	BIOCS	2.257045E-03	1.364589E-02
CO2	0.000000E+00	0.827395	BIOCF	1.000000E-03	0.517694
GLUC	0.240706	1.50000	NMIN	0.000000E+00	3.161926E-04
NINC	0.000000E+00	2.845733E-03	NO3A	0.000000E+00	1.064424E-02

FIGUUR 4.2

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.38
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=1.E-3,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=1.5
INCON IO2=2.72E-4,INO2=0.,INO3=0.06,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RECT
TIMER FINTIM=100.,OUTDEL=0.5,DELT=0.004,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3,NO2,N2O2,N22
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMIN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RECT      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
  DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
  4.00000E-03 1.00000E-05 100.00      10.000      0.50000      0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME 100.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	100.000	NO3	5.069182E-06	6.000000E-02
NO2	0.000000E+00	2.696810E-02	N2O2	0.000000E+00	1.015114E-02
N22	0.000000E+00	4.784945E-02	BIOCS	2.261511E-03	1.393158E-02
CO2	0.000000E+00	0.982440	BIOCF	1.000000E-03	0.560953
GLUC	9.032951E-02	1.50000	NMIN	0.000000E+00	4.238340E-04
NINC	0.000000E+00	3.814506E-03	NO3A	0.000000E+00	1.157875E-02

FIGUUR 4.3

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.27
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=1.E-2,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=1.5
INCON IO2=2.72E-4,INO2=0.,INC3=0.06,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1.,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RECT
TIMER FINTIM=100.,OUTDEL=0.5,DELT=0.004,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3,N02,N2O2,N22
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMN,NINC,N03A
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RECT      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
4.00000E-03 1.00000E-05 100.00      10.000      0.50000      0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME      100.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	100.000	NO3	6.008480E-06	6.000000E-02
N02	0.000000E+00	2.726786E-02	N2O2	0.000000E+00	1.042938E-02
N22	0.000000E+00	4.866472E-02	BIOCS	1.928057E-03	1.198924E-02
CO2	0.000000E+00	1.00789	BIOCF	1.000000E-02	0.529440
GLUC	0.119969	1.50000	NMIN	0.000000E+00	4.711746E-04
NINC	0.000000E+00	4.240572E-03	N03A	0.000000E+00	1.074054E-02

FIGUUR 4.4

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.27
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=1.E-3,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=1.5
INCON IO2=2.72E-4,INO2=0.,INO3=0.03,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1.,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RECT
TIMER FINTIM=100.,OUTDEL=0.5,DELT=0.004,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3,N02,N2O2,N22
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMN,NINC,N03A
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RECT      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
4.00000E-03 1.00000E-05 100.00      10.000      0.50000      0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME      100.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	100.000	NO3	7.529092E-06	3.000000E-02
N02	0.000000E+00	1.816644E-02	N2O2	0.000000E+00	2.037388E-03
N22	0.000000E+00	2.419817E-02	BIOCS	2.257045E-03	1.364589E-02
CO2	0.000000E+00	0.401791	BIOCF	1.000000E-03	0.235354
GLUC	0.909373	1.50000	NMIN	0.000000E+00	1.740732E-04
NINC	0.000000E+00	1.566658E-03	N03A	0.000000E+00	4.769892E-03

FIGURE 4.5

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.27
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=1.E-3,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=5.
INCON IO2=2.72E-4,INO2=0.,INO3=0.1,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RECT
TIMER FINTIM=100.,OUTDEL=0.5,DELT=0.002,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3,N02,N2O2,N22
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMIN,NINC,N03A
PAGE NPLLOT=0.
END
)TIMER VARIABLES      RECT      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
  DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
  2.00000E-03 1.00000E-05 100.00      10.000      0.50000      0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME 100.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	100.000	NO3	6.630692E-06	0.100000
N02	0.000000E+00	3.410911E-02	N2O2	0.000000E+00	2.566626E-02
N22	0.000000E+00	7.992824E-02	BIOCS	2.257101E-03	1.364576E-02
CO2	0.000000E+00	1.40553	BIOCF	1.000000E-03	0.918964
GLUC	2.81188	5.00000	NMIN	0.000000E+00	4.970211E-04
NINC	0.000000E+00	4.473189E-03	N03A	0.000000E+00	1.899921E-02

FIGURE 4.6

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.27
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=1.E-3,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=0.5
INCON IO2=2.72E-4,INO2=0.,INO3=0.06,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RECT
TIMER FINTIM=100.,OUTDEL=0.5,DELT=0.004,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3,N02,N2O2,N22
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMIN,NINC,N03A
PAGE NPLLOT=0.
END
)TIMER VARIABLES      RECT      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
  DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
  4.00000E-03 1.00000E-05 100.00      10.000      0.50000      0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME 100.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	100.000	NO3	9.843254E-06	6.000000E-02
N02	0.000000E+00	2.860241E-02	N2O2	0.000000E+00	1.318585E-02
N22	0.000000E+00	2.426565E-02	BIOCS	2.257043E-03	1.364588E-02
CO2	0.000000E+00	0.307453	BIOCF	1.000000E-03	0.236334
GLUC	-3.117697E-05	0.500000	NMIN	0.000000E+00	1.777338E-04
NINC	0.000000E+00	1.599605E-03	N03A	0.000000E+00	4.793049E-03

FIGUUR 4.7a TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5

```

PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.27
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=1.E-3,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=1.5
INCON IO2=2.72E-4,INO2=0.,INO3=0.06,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1.1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RKS
TIMER FINTIM=150.,OUTDEL=0.5,DELT=0.1,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3,NDIS,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,CLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMIN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT CMIN,CINC,CBIDT
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RKS      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
0.10000    1.50000E-05  150.00    10.000    0.50000    0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME      150.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	150.000	NO3	1.667234E-06	6.000000E-02
NDIS	0.000000E+00	4.903400E-02	NO3A	0.000000E+00	1.064493E-02
BIOCS	8.861847E-04	1.367579E-02	CO2	0.000000E+00	1.11748
BIOCF	1.000000E-03	0.517718	GLUC	4.856418E-02	1.50000
NMIN	0.000000E+00	5.718621E-04	NINC	0.000000E+00	5.146759E-03
CMIN	0.000000E+00	8.234815E-02	CINC	0.000000E+00	5.489876E-02
CBIDT	0.000000E+00	0.137247			

FIGUUR 4.7b

```

TITLE DENITRIFIKATIE
TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5,...
YMAXS(1-3)=40.,35.,40.,MS(1-3)=48.E-5,4.E-5,1.E-4,...
MGO(1-3)=67.E-5,0.,1.E-4,MSO(1-3)=15.2E-4,0.,1.E-3,...
YMXGO(1-3)=43.36,0.,40.,YMXSO(1-3)=34.23,0.,40.
PARAM MGNO=72.E-5,MSNO=22.E-5,YMXGNO=25.16,YMXSNO=18.51,...
MUMAXO=.4,MUMAXN=.25,KGLUC=1.E-4,KSUCC=2.E-4,KO2=1.E-6,...
KNO=1.E-3,NCBIO=6.,NCSUG=6.,NCSUS=4.,MBIO=150.2,MC=12.,...
NNBIO=1.5,FRN=.1,FRCO2=.5,FRN2O=.3,TMP=20.,TMPK=.27,...
KRP=0
TIMER FINTIM=150.,OUTDEL=0.5,DELMIN=1.E-7,DELT=.5
METHOD RKSFX
INCON IBIOCS=1.E-2,IBIOCF=1.E-3,ISC=0.,ICO2C=0.,INA=0.,IND=0.,...
IO2=2.72E-4,INBIOD=0.,IGC=1.5,ICBIOD=0.,INMIN=0.,INO=.06
OUTPUT BIOCS,BIOCF,CO2C
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NO,NA,ND
PAGE NPLLOT=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1.1.)
FUNCTION REDFT=(0.,0.),(1.E-6,0.),(1.5E-3,1.),(1.1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FUNCTION TBMG1=(0.,0.1),(4,1.)
FUNCTION TBMG2=(0.,0.1),(25,1.)
FUNCTION TBMG3=(0.,0.1),(4,1.)
FUNCTION TBMS1=(0.,0.1),(4,1.)
FUNCTION TBMS2=(0.,0.1),(25,1.)
FUNCTION TBMS3=(0.,0.1),(4,1.)
FUNCTION TABLE=(0.,1.),(0.1,0.),(1.,0.)
END
OTIMER VARIABLES      RKSFX      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
0.50000    1.00000E-07  150.00    0.00000E+00  0.50000    0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME      150.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	150.000	BIOCS	1.000000E-02	1.443559E-02
BIOCF	1.000000E-03	0.539356	CO2C	0.000000E+00	0.558125
NO	0.000000E+00	6.000000E-02	NA	0.000000E+00	1.174827E-02
ND	0.000000E+00	4.786129E-02			

FIGUUR 4.9a

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.47
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE NO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=0.07,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=5.
INCON IO2=0.,INO2=0.,INO3=0.0932,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1.,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RKS
TIMER FINTIM=50.,OUTDEL=0.5,DELT=0.004,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3N,NO2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT N2ON,N2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMIN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RKS      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
4.00000E-03 5.00000E-06 50.000      10.000      0.50000      0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME      50.000

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	50.0000	NO3N	5.800858E-04	60.0208
NO2N	0.000000E+00	21.2358	N2ON	0.000000E+00	14.1954
N2N	0.000000E+00	46.9917	BIOCS	3.917455E-03	1.000000E-02
CO2	0.000000E+00	1.49393	BIOCF	7.000000E-02	1.02351
GLUC	2.73239	5.00000	NMIN	0.000000E+00	5.539366E-04
NINC	0.000000E+00	4.985430E-03	NO3A	0.000000E+00	1.981665E-02

FIGUUR 4.9b

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.196
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE NO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=0.07,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=5.
INCON IO2=0.,INO2=0.,INO3=0.0932,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1.,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RKS
TIMER FINTIM=50.,OUTDEL=0.5,DELT=0.004,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3N,NO2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT N2ON,N2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMIN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RKS      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
4.00000E-03 5.00000E-06 50.000      10.000      0.50000      0.50000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME      50.000

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	50.0000	NO3N	5.592025E-04	60.0208
NO2N	0.000000E+00	21.5294	N2ON	0.000000E+00	15.2119
N2N	0.000000E+00	48.9047	BIOCS	3.917455E-03	1.000000E-02
CO2	0.000000E+00	1.16342	BIOCF	7.000000E-02	0.844765
GLUC	3.15258	5.00000	NMIN	0.000000E+00	3.845662E-04
NINC	0.000000E+00	3.461096E-03	NO3A	0.000000E+00	1.605704E-02

FIGUUR 4.10a

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.47
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=0.2,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=5.
INCON IO2=0.,INO2=0.,INO3=0.0466,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RKS
TIMER FINTIM=20.,OUTDEL=0.2,DELT=0.004,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3N,NO2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT N2ON,N2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMIN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RKS      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
  DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
  4.00000E-03 2.00000E-06 20.000      10.000      0.20000      0.20000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME 20.000

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	20.0000	NO3N	8.736795E-04	30.0104
NO2N	0.000000E+00	15.1894	N2ON	0.000000E+00	3.75711
N2N	0.000000E+00	23.6761	BIOCS	6.873875E-03	1.000000E-02
CO2	0.000000E+00	0.582091	BIOCF	0.200000	0.639069
GLUC	4.02372	5.00000	NMIN	0.000000E+00	1.615589E-04
NINC	0.000000E+00	1.454030E-03	NO3A	0.000000E+00	9.123715E-03

FIGUUR 4.10b

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.47
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN2O=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN2O=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=.25,UMXNO2=0.15,UMXN2O=0.05
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN2O=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=0.2,IBIOCS=1.E-2,IGLUC=5.
INCON IO2=0.,INO2=0.,INO3=0.01165,IN2O=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RKS
TIMER FINTIM=10.,OUTDEL=0.1,DELT=0.004,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3N,NO2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT N2ON,N2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMIN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RKS      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
  DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
  4.00000E-03 1.00000E-06 10.000      10.000      0.10000      0.10000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME 10.000

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	10.0000	NO3N	2.908352E-03	7.50260
NO2N	0.000000E+00	5.57875	N2ON	0.000000E+00	0.120937
N2N	0.000000E+00	5.16762	BIOCS	8.290884E-03	1.000000E-02
CO2	0.000000E+00	0.132677	BIOCF	0.200000	0.292060
GLUC	4.78643	5.00000	NMIN	0.000000E+00	4.342155E-05
NINC	0.000000E+00	3.907940E-04	NO3A	0.000000E+00	1.906166E-03

FIGUUR 4.12

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.196
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.30,GEW=20.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN20=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN20=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.02,UMXNO2=15.,UMXN20=0.008
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN20=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=0.025,IBIOCS=0.0,IGLUC=5.
INCON IO2=0.0,INO2=0.,INO3=0.0282,IN20=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(0.1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RKS
TIMER FINTIM=350.,OUTDEL=1.,DELT=0.1,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3N,NO2N,N2ON,N2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT N2ON,N2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT CMIN,CINC,CBIDT
PAGE NPLLOT=0.
END

```

```

OTIMER VARIABLES      RKS      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
0.10000    3.50000E-05    350.00    10.000    1.0000    1.0000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME 350.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	350.000	NO3N	7.861259E-04	2.36880
NO2N	0.000000E+00	5.212615E-02	N2ON	0.000000E+00	0.501612
N2N	0.000000E+00	2.36598	BIOCS	0.000000E+00	0.000000E+00
CO2	0.000000E+00	0.115466	BIOCF	2.500000E-02	2.500000E-02
GLUC	4.88455	5.00000	NMIN	0.000000E+00	0.000000E+00
NINC	0.000000E+00	0.000000E+00	NO3A	0.000000E+00	0.000000E+00
CMIN	0.000000E+00	0.000000E+00	CINC	0.000000E+00	0.000000E+00
CBIDT	0.000000E+00	0.000000E+00			

FIGUUR 4.13

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.196
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.30,GEW=20.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN20=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN20=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.02,UMXNO2=15.,UMXN20=0.008
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN20=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=0.025,IBIOCS=0.0,IGLUC=5.
INCON IO2=0.0,INO2=0.,INO3=0.01428,IN20=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.),(1.E-6,0.),(5.E-5,1.),(0.1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.),(37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RKS
TIMER FINTIM=350.,OUTDEL=1.,DELT=0.1,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3N,NO2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT N2ON,N2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT CMIN,CINC,CBIDT
PAGE NPLLOT=0.
END

```

```

OTIMER VARIABLES      RKS      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
0.10000    3.50000E-05    350.00    10.000    1.0000    1.0000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME 350.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	350.000	NO3N	7.321318E-04	1.19952
NO2N	0.000000E+00	5.104766E-02	N2ON	0.000000E+00	0.255806
N2N	0.000000E+00	1.19718	BIOCS	0.000000E+00	0.000000E+00
CO2	0.000000E+00	0.115466	BIOCF	2.500000E-02	2.500000E-02
GLUC	4.88455	5.00000	NMIN	0.000000E+00	0.000000E+00
NINC	0.000000E+00	0.000000E+00	NO3A	0.000000E+00	0.000000E+00
CMIN	0.000000E+00	0.000000E+00	CINC	0.000000E+00	0.000000E+00
CBIDT	0.000000E+00	0.000000E+00			

FIGUUR 4.14

```

TABLE YMAXG(1-3)=77.82,79.74,96.,MG(1-3)=11.E-5,27.E-5,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=0.196
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.30,GEW=20.
TABLE YMXO2(1-3)=43.36,0.00,40.
TABLE MO2(1-3)=67.E-5,0.00,1.E-4
PARAM YMXNO3=25.2,YMXNO2=14.89,YMXN20=7.75
PARAM MNO3=7.7E-4,MNO2=9.73E-4,MN20=15.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.02,UMXNO2=15.,UMXN20=0.008
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN20=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=0.025,IBIOCS=0.0,IGLUC=5.
INCON IO2=0.0,INO2=0.,INO3=0.0484,IN20=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.), (1.E-6,0.), (5.E-5,1.), (.1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.), (37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RKS
TIMER FINTIM=350.,OUTDEL=1.,DELT=0.1,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3N,NO2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT N20N,N2N
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCS,CO2,BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT CMIN,CINC,CBIDT
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RKS      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
0.10000    3.50000E-05    350.00    10.000    1.0000    1.0000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME      350.00

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	350.000	NO3N	0.962868	4.06560
NO2N	0.000000E+00	5.256536E-02	N20N	0.000000E+00	0.771808
N2N	0.000000E+00	2.27991	BIOCS	0.000000E+00	0.000000E+00
CO2	0.000000E+00	0.115466	BIOCF	2.500000E-02	2.500000E-02
GLUC	4.88455	5.00000	NMIN	0.000000E+00	0.000000E+00
NINC	0.000000E+00	0.000000E+00	NO3A	0.000000E+00	0.000000E+00

FIGUUR 4.15

```

TITLE MET ORGANISCHE STOF AFBRAAK
TITLE VARIABLE K, HERZIEN
TABLE YMAXG(1-3)=77.82,42.5,96.,MG(1-3)=11.E-5,5.11E-4,60.E-5
PARAM NCBIO=6.,MBIO=150.2,NNBIO=1.5
PARAM TMP=20.,MC=12.,NCSUG=6.
PARAM TMPK=1.
PARAM FRN=0.1,FRC=0.6,FRCO2=0.5
PARAM MN=14.,GWPERC=0.23,GEW=200.
TABLE YMXGO2(1-2)=43.36,40.
PARAM YMXNO3=28.6,YMXNO2=16.9,YMXN20=8.8
TABLE MO2(1-2)=67.E-5,1.E-4
PARAM MNO3=13.E-4,MNO2=16.5E-4,MN20=26.8E-4
PARAM UMXO2=0.4,UMXNO3=0.20,UMXNO2=0.12,UMXN20=0.04
PARAM KNO3=1.E-3,KNO2=0.6E-3,KN20=0.2E-3
PARAM KGLUC=1.E-4,KO2=1.E-6
INCON IBIOCF=1.E-3,IBIOCS=0.0,IGLUC=0.9
INCON IO2=0.0,INO2=0.,INO3=0.016,IN20=0.,IN2=0.
FUNCTION REDFTB=(0.,0.), (1.E-6,0.), (5.E-5,1.), (.1,1.)
FUNCTION TMPTB=(11.8,0.), (37.,1.)
FINISH NOEM=1.E-5
METHOD RKS
TIMER FINTIM=30.,OUTDEL=0.1,DELT=0.1,PRDEL=10.
ABSERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
RELERR NO3=1.E-5,GLUC=1.E-5
OUTPUT NO3
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT BIOCF,GLUC
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT NMN,NINC,NO3A
PAGE NPLLOT=0.
OUTPUT CMIN,CINC,CBIDT
PAGE NPLLOT=0.
END
OTIMER VARIABLES      RKS      INTEGRATION      START TIME = 0.00000E+00
DELT      DELMIN      FINTIM      PRDEL      OUTDEL      DELMAX
0.10000    3.00000E-06    30.000    10.000    0.10000    0.10000
$$$ SIMULATION HALTED FOR FINISH CONDITION TIME      30.000

```

OUTPUT VARIABLE RANGES FOR ALL RUNS IN CASE

VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM	VARIABLE	MINIMUM	MAXIMUM
TIME	0.000000E+00	30.0000	NO3	7.412318E-06	1.600000E-02
BIOCF	1.000000E-03	0.146201	GLUC	0.330371	0.900000
NMIN	0.000000E+00	2.616882E-05	NINC	0.000000E+00	2.355193E-04
NO3A	0.000000E+00	3.025016E-03	CMIN	0.000000E+00	3.768309E-03
CINC	0.000000E+00	2.512206E-03	CBIDT	0.000000E+00	6.280516E-03

BIJLAGE C

AFLEIDING VAN PARAMETER K2

Vergelijking (3.16) geeft voor het enzym substraat complex van Y:

$$(Y2E2) = \frac{k2'}{k2'' + k2'''} \cdot (Y)**2 \cdot (E2) \quad (3.16)$$

Verder geldt voor de totale hoeveelheid enzym E2:

$$(E2t) = (E2) + (Y2E2) \quad (C1)$$

Expliciet schrijven van (E2) en substitutie ervan in vergelijking (3.16) levert naar herrangschikking:

$$\frac{(E2t)}{(Y2E2)} = \frac{Ks2 + (Y)**2}{(Y)**2} \quad (C2)$$

Analoog aan hetgeen vermeld is bij vergelijking (3.12),
volgt uit (C2):

$$\frac{u_2}{u_{\max 2}} = \frac{(Y)^{**2}}{K_{s2} + (Y)^{**2}} \quad (C3)$$

en:

$$u_2 = k_2'''(Y_2E_2) = u_{\max 2} * (Y)^{**2} / (K_{s2} + (Y)^{**2})$$

$$u_{\max 2} = k_2'''[(Y_2E_2) + (E_2)]$$

De verdere afleiding is analoog aan die op pagina 39 vanaf
vergelijking (3.22) en geeft:

$$k_2 = \frac{u_{\max 2}}{K_{s2} + (Y^{**2})} \quad \left(\begin{array}{l} \text{dimensie } K_{s2} : \frac{\text{mol}^2}{l^2} \\ \text{" } k_2 : \frac{l^2}{\text{mol}^2 \text{ hr}} \end{array} \right)$$

