First international conference on micro-organisms in activated sludge and biofilms



IR. J. KRUIT
HASKONING



DR. IR. M. VAN LOOSDRECHT
TU Delft

1. **Inleiding**
Op 27 en 28 september 1993 werd in Parijs een eerste internationale conferentie gehouden over micro-organismen in actief slib en biofilms. De intentie was informatie uit te wisselen tussen wetenschappers, ontwerpers, leveranciers en beheerders van rwzi's. Het doel was de kennis van de rol van micro-organismen in biologische zuiveringssystemen te verbeteren.

Dit met behulp van verbeterde sturingsprincipes op basis van wetenschappelijk gefundeerde grondslagen.

Circa 600 deelnemers uit de gehele wereld konden, als de uitgebreide Franse lunches dat toelieten, in totaal 30 presentaties aanhoren. Daarnaast konden in de vrije uurtjes zo'n 50 posters worden aanschouwd. De Nederlandse inbreng bestond uit 17 toehoorders, drie sprekers van het TNO, VU en HASKONING en een poster van de TUD.

De volgende onderwerpen werden behandeld:
a. karakterisering en kwantificering van biomassa;
b. onderzoek en modellering van het actief-slibproces;
c. scheiding van actief slib;
d. voorkomen van licht slib en schuim;
e. biodegradatie van xenobiotica;
f. populatie dynamica in biofilms.

2. **Karakterisering en kwantificering van biomassa**
In de morgensessie van de eerste dag passeerden enkele bekende, verbeterde en onbekende meetmethodes in hoog tempo de revue.
Uiteraard kwam er een aantal reeds bekende technieken aan bod zoals totaal-DNA-bepaling en MPN-tellingen. De bekende nadelen van deze technieken zijn nog steeds niet opgelost en er is dan ook behoefte aan nieuwe technieken. Hiervan zijn er twee onder de aandacht gebracht:
a. het gebruik van monoclonale antilichamen. Deze antilichamen binden zich alleen aan bacteriën waartegen ze zijn opgewekt (bijvoorbeeld *Nitrosomonas* of *Nocardia*). Door daarna een kleurstof aan het antilichaam te binden kunnen deze bacteriën direct in het slib worden geteld. Zo wordt geconstateerd dat in een schuimend slib 18% van de biomassa uit *Nocardia* bestaat. Nadeel van deze methode is dat er reincultures voorhanden moeten zijn. Dit is in veel gevallen, zoals bijvoorbeeld bij enkele draadvormers of defosfateerders niet het geval;
b. de zogenaamde Polymerase Chain Reactie (PCR) techniek maakt het mogelijk om 'eenvoudig' naar specifieke microbiële populaties te kijken, zonder de noodzaak om eerst over reincultures te beschikken. Er werd in dit verband een overzicht gegeven van de genetische classificatie van schuimvormende *Nocardia's*. Verder werd met behulp van kleurrijke dia's getoond hoe met deze techniek draadvormers in slib kunnen worden bekeken. Ook werd getoond dat al een kortstondige aëratie van slib met hoge substraatconcentraties tot een grote populatieverschuiving kan leiden. Dit onderstreept nogmaals de onbetrouwbaarheid van MPN-tellingen.

3. **Onderzoek en modellering van het actief-slibproces**
In de middagsessie werden drie verhalen gepresenteerd over de invloed van de influentsamenstelling op de activiteit van het actief-slib en twee verhalen over de competitie van diverse bacteriën en hogere organismen in het actief slib.

Met behulp van respiratie-experimenten is een onderzoek uitgevoerd naar de biodegradeerbaarheid van opgeloste en colloïdale fracties in stedelijk afvalwater. Door ultrafiltratie werden de fracties gescheiden. De colloïdale fractie verdween snel door fysische adsorptie maar biologische oxydatie trad na 5 h nog niet op. Van de opgeloste fractie was slechts 50% biodegradeerbaar.

In een biologische P- en N-verwijderende rwzi in Australië werd gedurende 1991 en 1992 een praktijkonderzoek uitgevoerd



De grootste draadvormer van Frankrijk.

naar het periodiek slecht functioneren van de biologische fosfaatverwijdering door het meten van de intracellulaire verdeling van P, K, Mg en Ca. Door grote fluctuaties in het Mg-gehalte in het influent door grondwaterinfiltratie in natte perioden bleek de fosfaatverwijdering toe te nemen. Dit kan ons inziens verklaard worden door chemische neerslagvorming.

In het kader van EUREKA-project heeft de universiteit van Lyngby (Denemarken) uitvoerig de invloed van de samenstelling van afvalwater op de denitrificatiesnelheid bestudeerd. Hoge snelheden worden verkregen door snel biodegradeerbaar materiaal (lagere vetzuren) maar door de vaak kleine hoeveelheid is de invloed op het gemiddelde denitrificatie resultaat gering. Belangrijk is dat bij toepassing van precipitatie niet alleen gesuspendeerd CZV, maar ook snel biodegradeerbaar materiaal wordt afgevangen. Hierdoor wordt de denitrificatiecapaciteit uiteraard verlaagd.

Uit laboratoriumonderzoek in Tsjechië bleek dat 'G'-bacteriën het defosfateringsproces kunnen verstoren. Als glucose of zetmeel in het influent aanwezig is, kunnen deze organismen in de anaërobe zone effectiever het substraat (glucose of vetzuren) opnemen ten koste van de defosfateerders. Ook als het influent alleen vetzuren bevat zouden deze 'G'-bacteriën soms in staat zijn de competitie van defosfateerders te winnen.

Doordat ze veel compactere vlokken vormen worden ze niet zo snel opgegeten door protozoën dan defosfateerders. Dit laatste zal hooguit in rwzi's met excessieve groei van protozoën tot problemen kunnen leiden.

Hierna was het de beurt aan mevrouw Ratsak (VU Amsterdam). In het kader van het rwzi 2000-programma werd een onderzoek uitgevoerd naar de verlaging van de slibproduktie in aërobe zuiveringssystemen met behulp van hogere predatoren, zoals ciliaten. Een biomassa reductie van 15-45% is mogelijk. De bevindingen werden ondersteund met een praktijkvoorbeeld van de rwzi Deventer.

Hier trad door introductie van preprecipitatie in de zomerperiode enkele weken nauwelijks secundaire slibproduktie op. In de discussie bleek vooral de lagere aanvoer en ruim voldoende zuurstofcapaciteit een rol te spelen. Ook werd gewezen op de noodzaak van de afweging van extra beluchtingskosten ten opzichte van slibverwerkingskosten.

4. **Slibkwaliteit en scheiding**

Vrijwel identiek aan diverse Nederlandse onderzoeken naar de slibkwaliteit (Eikelboom, TNO) zijn in de afgelopen jaren in diverse landen dergelijke onderzoeken uitgevoerd, waaronder Denemarken. In het eenjarig onderzoek zijn 38 rwzi's voornamelijk van het type Biodenitro- of Biodeniphosysteem gescreend op het voorkomen van draadvormers.
In het voorjaar had 35-45% van de rwzi's een slechte SVI (> 150 ml/g) en in het najaar circa 30%. Dominante draadvormers waren *Microthrix parvicella*, T0041 en T021N. De beste methode om de hoeveelheid draadvormers te volgen bleek de telmethode volgens Jenkins en niet de bekende draadvormersindex.

Verder bleek, dat in vergelijking met de behandeling van ruw afvalwater het slib bij voorbezinken afvalwater een hogere SVI heeft: 125 versus 145 ml/g. Wanneer alleen naar rwzi's met biologische P-verwijdering werd gekeken was het verschil nog groter, 105 versus 160 ml/g. Tussen rwzi's met chemische defosfatering werd geen verschil in SVI gevonden tussen simultane en preprecipitatie (140-150 ml/g). Tenslotte kwam ook hier weer naar voren dat propstroomreactoren een lagere SVI hebben dan compleet gemengde reactoren.

Tot slot van de eerste slopende dag werd voor de cocktailparty een praktijkvoorbeeld gegeven van een beluchte anoxische propstroomreactor. Waar anders kan dit voorkomen dan in de USA. Zelfs bij een slibleeftijd van 5,5 d werd bij een normaal voorbezonken influent met een stikstofgehalte van 40-50 mg/l een Ntotaaleffluentgehalte van 8 mg/l bereikt, maar er hoopte zich wel nitriet op in het effluent. Tijdens de champagne bleek alles, in relatie tot de hoge watertemperatuur van 25-30 °C, redelijk verklaarbaar.

5. **Voorkomen van licht slib en schuim**

De morgen begon met een overzichtsartikel van 25 jaar onderzoek naar het voorkomen van licht slib aan de universiteit van Praag. Alle factoren die de slibbezinking negatief beïnvloeden, zoals influentsamenstelling, procesconfiguraties, O_2-limitatie passeerden de revue. De implementatie van aërobe, anaërobe en anoxische selectoren werden theoretisch belicht en ondersteund met praktijkvoorbeelden. Er werd geconcludeerd dat geen algemene ontwerpparameters voor selectoren aanwezig zijn maar dat wel empirische technologische parameters kunnen worden aangedragen.

Hierna lanceerde Casey (Universiteit van Kaapstad) een nieuwe hypothese over het ontstaan van licht slib in P- en N-verwijderingssystemen. Hij postuleerde na laboratoriumonderzoek en een literatuuroverzicht dat vlokvormers nitraat denitrificeren tot stikstof, waarbij nitrietoxyde (NO) intracellulair accumuleert. NO remt vervolgens de zuurstof- en substraatconsumptie in de daaropvolgende aërobe zone. Draadvormers daarentegen, reduceren alleen nitraat tot nitriet en accumuleren dus geen NO. In de aërobe zone zouden zij dus een betere concurrentiepositie dan de vlokvormers hebben. Een selector zou voor carrousels dan geen positieve inbreng hebben.
Toevoeging van voldoende vetzuren op het eind van de aërobe zone of het begin van de anoxische zone zou de remming opheffen. Procesoplossingen worden aangedragen zoals een aërobe of anoxische reactor tussen de anoxische en aërobe zone met toevoeging van influent. Deze laatste procesconfiguratie is met succes uitgetest, alhoewel reproduktie van een goed resultaat nog niet mogelijk is gebleken.

In Engeland staat men een meer procedurele benadering van licht slib en schuimprobleem voor met als een van de sleutelfactoren het hydrofobe slibvlokoppervlak. Enkele methodes worden voorgesteld, zoals de schuimstabiliteitscoëfficiënt en totale lengte berekening van draadvormers. Foot claimde dat hij de juiste oplossingsfilosofie voor het lichtslibprobleem had, maar dat terwille van commerciële redenen dit niet gepresenteerd mocht worden. De privatisering van de Engelse waterschappen heeft duidelijk zijn beslag gekregen.

In een onderzoek naar het functioneren van selectoren op 12 rwzi's in Frankrijk bleek in 90% van de gevallen een structurele verlaging van de SVI op te treden. Opgemerkt moet worden dat in Frankrijk een SVI < 200 mg/l al goed is. Er was geen onderscheid tussen beluchte en onbeluchte selectoren. Het belangrijkste was een goede menging en *gelijktijdige* samenkomst van het afvalwater en retourslib.

Kruit (HASKONING) liet zien dat de influentsamenstelling belangrijk kan zijn voor de keuze van een onbeluchte of beluchte selector. Dit werd aangetoond door het succes van selectoren in diverse pilot-plant en praktijksituaties in het beheersgebied van de GTD, naast de procesconfiguratie te relateren aan de influentsamenstelling. Belangrijk hierbij is

de fractie snel afbreekbare CZV in het influent en het gedrag hiervan in de selector. Eén van de conclusies was dat bij normaal huishoudelijk afvalwater met een onbeluchte selector kan worden volstaan. In een lopend STOWA-onderzoek op 14 rwzi's in Nederland zullen enkele hypotheses worden getoetst.

In een evaluatie-onderzoek naar het voorkomen van schuim op 75% van het rwzi-bestand in Frankrijk bleek in 85% *Microthrix parvicella* de medeveroorzaker te zijn. De rest was toe te schrijven aan *Nocardia*. Slechts enkele factoren zijn belangrijk, zoals een hoge slibleeftijd, de aanwezigheid van skirts rond de verticale schacht van de puntbeluchters en het hydraulisch verval tussen de aëratietank en nabezinktank. Uit nader onderzoek blijkt ook de hoeveelheid vet in het influent en polymeer in de interne stromen bij te dragen tot het schuimprobleem.

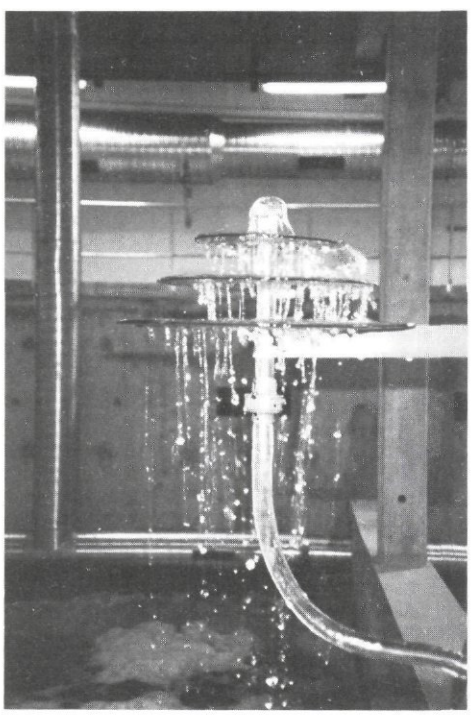
In Zuid-Italië kan door de temperatuur van het afvalwater de draadvormer *Thiothrix* zich massaal in de rwzi's ontwikkelen. Naar aanleiding hiervan is een onderzoek uitgevoerd naar het gedrag van deze draadvormer. Het blijkt dat *Thiothrix* zowel op acetaat en/of thiosulfaat onder autotrofe, heterotrofe en mixotrofe condities kan gedijen, waarbij ook nog eens polyhydroxyboterzuur kan worden opgeslagen.

Aan het eind van de licht slibsessie hield de heer Eikelboom (TNO) een pakkend samenvattend verhaal over de STOWA-onderzoeken 'Schuim en drijflaagvorming in carrousels', effect van P- en N-verwijdering op de slibbezinkingseigenschappen en het NVA-TCLS onderzoek 'Het functioneren van selectoren in Nederland'.

Hieruit werden de volgende conclusies getrokken:
1. er is duidelijk seizoensritme in het voorkomen van *M.parvicella*;
2. schuim wordt hoofdzakelijk door *M.parvicella* veroorzaakt;
3. *M.parvicella* en *Actinomyceten* beconcurreren elkaar;
4. *M.parvicella* groeit beter in carrousels;
5. *M.parvicella* groeit nog beter in carrousels met voorbezonken afvalwater;
6. de werking van selectoren om *M.parvicella* te controleren lijkt te verminderen bij het naderen van de ontwerpbelasting van een rwzi.

Deze conclusies sluiten goed aan bij de bevindingen in andere Europese landen.

6. **Biodegradatie van xenobiotica**
In de middagsessie werden twee onderwerpen gepresenteerd over de afbreekbaarheid van de industriële verbindingen chloorfenol en p-nitrofenol. In een SBR-systeem kon met een korte cyclus het chloorfenol goed worden afgebroken. Bij een langere cyclus ging de activiteit naar beneden door afbraak van de benodigde enzymen tijdens de slibmineralisatiefase van de biomassa.



De Franse slag van zuiveren.

Bij vergelijking van de afbraak van p-nitrofenol in een SBR- en continusysteem bleek het slib in de SBR veel ongevoeliger te zijn voor hoge concentraties. In feite bekende stof voor mensen die industrieel afvalwater moeten zuiveren.

8. **Populatie dynamica in biofilms**
Als voorproefje op het vervolg congres Biofilm Reactors, zelfde zaal, een dag later, werden vijf presentaties gegeven over dit onderwerp.

Allereerst was er een aantal bijdragen gericht op de analyse van de biofilm zelf. Naast een reeks van bekende methodes zoals eiwit- en polysaccharide-bepalingen, activiteitsmetingen en het gebruik van micro-elektrodes, werden resultaten van elektronentransport activiteitskleuringen getoond. Deze metingen onderstreepten nogmaals de heterogeniteit van biofilms, dit in tegenstelling tot de bestaande (1-dimensionale) modellen voor biofilmprocessen. De diffusieprocessen in de film kunnen goed worden voorspeld, de populatieverdeling levert echter grote problemen op. Tenslotte werd in een studie van de universiteit van Lund (Zweden) aangetoond dat *Nematoden* en *Rotiferen* ook in biofilmreactoren een grote invloed kunnen hebben. De 'vraatzucht' van deze organismen leidde in dit onderzoek tot 50% reductie in nitrificatie-activiteit.

7. **Slotbeschouwing**
Uit de presentaties bleek duidelijk dat de gedachten achter het IAWPRC-model ingang hebben gevonden. Er is veel aandacht voor influent en biomassa-karakterisering. Voor dit laatste werden MPN-tellingen duidelijk afgewezen terwijl genetische technieken een goede mogelijkheid lijken te bieden.

Het voorkomen van licht slib en schuim nam een dominante plaats in op het congres. In de afgelopen 25 jaar is zeer intensief onderzoek verricht naar het structureel voorkomen van licht slib. Na het isoleren van de diverse draadvormers, het vaststellen van de fysiologisch eigenschappen, het opstellen van het competitiemodel voor vlok- en draadvormers en het installeren van verschillende type selectoren in praktijk leek het probleem vrijwel voorbij te zijn. De implementatie van vergaande P- en N-maatregelen hebben echter roet in het eten gegooid.

Het blijkt dat vooral *M.parvicella* in de gematigde klimaten zich nog nadrukkelijker gaat manifesteren. Alhoewel er al veel onderzoek is verricht en er een aantal duidelijke conclusies te trekken zijn is de puzzel nog steeds niet opgelost. Een geheel nieuwe theorie over vorming in vlokvormers is zelfs naar voren gebracht. Al gestart onderzoek in binnen- en buitenland zal in de komende jaren het probleem definitief moeten tackelen. Als dit niet lukt zullen systemen zoals de oxydatiesloot en carrousel zware tijden tegemoet gaan. Tenslotte is er natuurlijk ook nog de Franse oplossing door alleen SVI > 200-250 ml/g als een probleem te beschouwen.

• • •