

Anaerobe zuivering van glucose bevattend water met separate zuurvormende en methaanvormende reaktoren

1. Inleiding

In het recente verleden werd in een aantal publikaties aandacht besteed aan de aerobe zuivering van verschillende typen organisch afvalwater. Gebleken is, dat de anaerobe afvalwaterbehandeling in veel gevallen grote voordelen kan bieden boven de conventionele aerobe zuiveringsmethoden [1 - 4].

Wanneer een volledige zuivering van het afvalwater verkregen wordt, ontstaat naast de gasvormige eindprodukten slechts een relatief geringe hoeveelheid biomassa, aan-

zonder dat de hoeveelheid methaanslib daardoor ook zou verminderen.

Voor de omzettingen binnen ieder deelproces zijn gespecialiseerde groepen van bacteriën verantwoordelijk, waarbij men zich voor kan stellen dat de produkten van de ene groep bacteriën als in een soort van 'voedselketen' op de andere worden overgedragen. Iedere groep van bacteriën stelt specifieke eisen aan substraat en milieu-factoren. Zo is van de groep bacteriën uit de methaanvormende fase bekend, dat zij slechts binnen een pH-gebied van 6 tot 8 actief zijn en onder de 30 °C sterk in hun activiteit geremd worden [10 - 12]. Van de bacteriën die de hydrolyse en zuurvorming tot stand brengen is nog weinig bekend; de methaanbacteriën groeien over het algemeen langzamer dan de zuurvormende bacteriën [13].

Enkele onderzoekers hebben in het verleden getracht de hydrolyse en zuurvorming enerzijds en de methaanvorming anderzijds gescheiden in twee in serie geschakelde reaktoren te laten verlopen [14, 15] of een scheiding via een dialysemembraan te realiseren [16], overigens met wisselend succes. De anaerobe zuivering in zo'n tweetraps proces kan een aantal voordelen opleveren boven het ééntrapsproces, waarbij alle processen in één reaktor verlopen [6]:

1. *Optimalisatie.* In twee reaktoren kunnen de optimale omstandigheden voor althans twee de van drie deelprocessen afzonderlijk worden ingesteld, waardoor het totale proces aanzienlijk sneller kan verlopen.

2. *Stabiliteit.* De beide processen kunnen afzonderlijk t.o.v. elkaar geregeld worden; hiermee kan o.m. verzuring van de methaan-reaktor (bijv. ten gevolge van een niet-optimale werking van de methaanbacteriën) voorkomen worden.

3. Indien de hoeveelheid zuurvormend slib te snel toeneemt kan dit gespuid worden,

2. Doel en opzet

Het laboratoriumonderzoek had tot doel inzicht te verkrijgen in de chemische en microbiologische aspecten van een tweetraps zuiveringsproces van suikerhoudend afvalwater, zoals bijv. was- en transportwater uit de suikerindustrie. In dit artikel worden de resultaten weergegeven van het eerste stadium van het onderzoek, waarin de procesbeheersing, de reproduceerbaarheid van de resultaten en een gedetailleerde beschrijving van het gehele proces het voornaamste doel vormden. Als koolstofbron voor de bacteriën diende glucose, zodat de hydrolysestap verder buiten beschouwing kon worden gelaten. Het gescheiden functioneren van de zuur- en de methaanvormende fase heeft nog als praktisch voordeel, dat de beide processen beter in detail bestudeerd kunnen worden dan voorheen in een gekombineerd proces mogelijk was. Met gebruikmaking van de in de microbiologie gangbare kontinu-kultuurtechniek van bacteriën is het mogelijk de procesomstandigheden nauwkeurig te definiëren. Men zorgt dat slechts één parameter de groei van bacteriën beperkt.

In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een mineraal medium met de koolstofbron glucose als beperkende factor en overige nutriënten zoals stikstof, fosfor en magnesium in overmaat. Omdat glucose optreedt als enige koolstof- en energiebron voor de bacteriën kan door deze zgn. koolstof-limitatie de groei van bacteriën nauwkeurig in de hand worden gehouden en is men er zeker van, dat de glucose kwantitatief door de bacteriën kan worden opgebruikt.

Door middel van koolstofbalansen werd het systeem zo volledig mogelijk gekarakteriseerd.

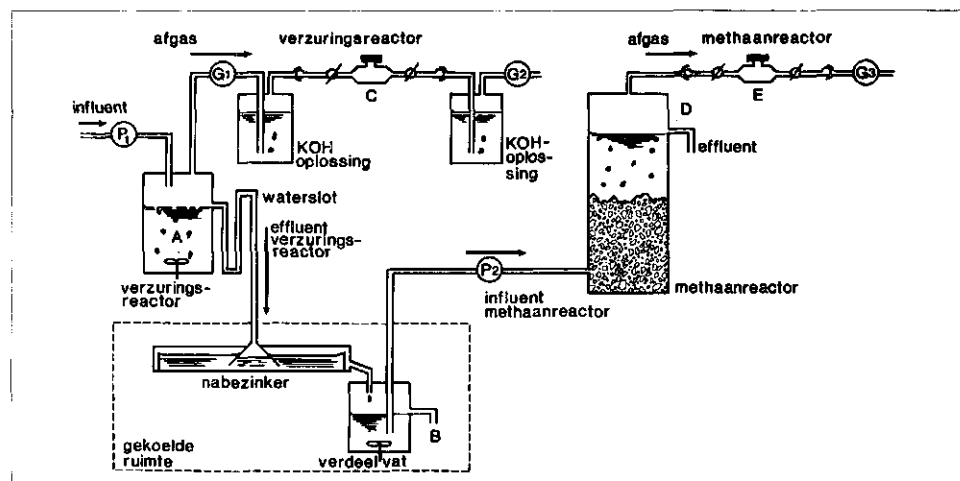
gezien onder anaerobe omstandigheden de energie, die beschikbaar is voor de groei van bacteriën gering is in vergelijking met die in het aerobe afbraakproces [5]. Momenteel wordt algemeen aangenomen dat de totale degradatie van organisch materiaal tot gas, onder anaerobe omstandigheden, globaal verloopt via drie elkaar opvolgende deelprocessen [6 - 9]:

1. *Hydrolyse.* Onder invloed van bacteriële exo-enzymen worden complexe moleculen gesplitst in kleinere moleculen, die door de bacterieel kunnen worden opgenomen.

2. *Zuurvorming.* Hydrolyseprodukten, zoals enkelvoudige suikers en aminozuren, worden door zuurvormende bacteriën omgezet in eenvoudige organische verbindingen, waarvan vluchtige vetzuren een belangrijk bestanddeel vormen.

3. *Methaanvorming.* De produkten van de zuurvormende fase worden verder afgebroken en uiteindelijk door methaanbacteriën in methaan en kooldioxide omgezet.

Afb. 1 - Principeschema van de gebruikte proefopstelling; voor verklaring zie tekst.



3. Materiaal en methoden

a. Proefopstelling

In afb. 1 is een prinsieschema van de gebruikte proefopstelling weergegeven.

Verzuring reactor

— Als verzuring reactor werd een C-30 Bioflo apparaat gebruikt (New Brunswick Scientific Co. Inc. New Jersey, USA), bestaande uit een gasdicht afgesloten glazen vat met een werkvolume van 400 ml, voorzien van regelapparatuur voor temperatuur, pH en roering. De omstandigheden in de reactor werden konstant gehouden op 30 °C, pH=5 (d.m.v. automatische titratie met een 2M NaOH-oplossing) en een roersnelheid van 250 o.p.m. Als influent werd een mineraal medium gebruikt voor het kweken van bacteriën onder koolstoflimitatie. Voor de samenstelling van dit medium wordt verder verwezen naar het artikel van Evans et al. [17]. De glucoseconcentratie in het medium was 1 %.

Omdat in de reactor volledige menging werd toegepast, was de hydraulische verblijftijd gelijk aan de slibverblijftijd en wel ongeveer 10 uur. De hoeveelheid gas, die tijdens het verzuringproces gevormd werd, werd gemeten d.m.v. een natte precisie-gasmeter G1 (meterfabriek, Dordrecht), vervolgens werd dit gas door een wasfles met een 30 % KOH-oplossing geleid om het CO₂ uit het afgas te absorberen; indien bij C nog CO₂ werd gevonden, werd de KOH-oplossing in de wasfles voor C verversd. Na passage van een tweede wasfles met KOH werd de hoeveelheid restgas met een gasmeter G2 gemeten. De aflezing van de gasmeters werd o.m. gecorrigeerd voor opgeloste stikstof en voor de partiële waterdampdruk. Monsternamen bij de verzuring reactor (A) geschiedde uit de inhoud van de reactor. In de tekening van de proefopstelling zijn de aansluitingen aan de reactor voor monsternamen, beënten, loogtoevoer, pH-elektrode e.d. niet weergegeven. Via een overloop en een waterslot werd het effluent afgevoerd. Het waterslot was noodzakelijk om te voorkomen dat gas via het effluentkanaal zou kunnen ontsnappen. Het effluent van de verzuring reactor werd in een nabezinker gevoerd om het in de verzuring reactor gevormde bacterieslib zoveel mogelijk te verwijderen. Deze nabezinker had een inhoud van ongeveer 1 liter en stond opgesteld in een koelkast (temp. 8 °C) om de biologische processen tijdens de nabezinking zoveel mogelijk te vertragen. Het effluent van de nabezinker werd via een verdeelvat door een pomp P2 in de methaanreactor gepompt.

Monsters van het influent van de methaanreactor (B) werden uit dit verdeelvat genomen; doordat de toevoersnelheid van pomp P1 op een iets hogere waarde was ingesteld dan die van P2, verzamelde zich in het verdeelvat op den duur een zeker overschot aan vloeistof.

Methaanreactor

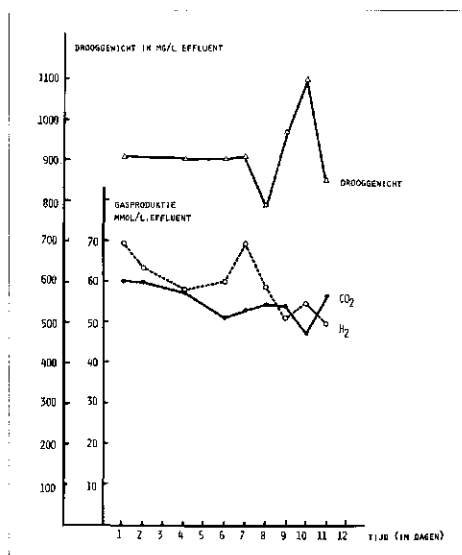
— Als methaanreactor werd een niet-geroerde plexiglazen up-flow reactor gebruikt. De reactor had een inhoud van ongeveer 4 liter en was voorzien van een verwarmingsmantel en een interne gas-slib-scheider met slibterugvoer in de reactor (niet in de tekening aangegeven). Het model van deze gas-slib-scheider was ontleend aan de proefinstallatie van de Centrale Suiker Mij. te Breda. De inhoud van de reactor werd op 30 °C gehouden; de hydraulische verblijftijd was ongeveer 112 uur. Effluentmonsters van de methaanreactor werden genomen uit de vloeistof boven in de reactor (D). Het in de methaanreactor gevormde gas werd via een gasmonsterbuisje E door een natte gasmeter G3 geleid. De verzuring reactor werd beënt met actief slib uit de afvalwaterzuiveringsinstallatie Amsterdam-Noord. De methaanreactor werd gevuld met ong. 2 liter anaeroob methaanslib, dat ons ter beschikking was gesteld door de CSM te Breda.

b. Analyses

Dagelijks werden de volgende analyses uitgevoerd.

— Drooggewicht van de monsters genomen bij A en B (afb. 1).

Afb. 2 - Verloop van het drooggewicht en de gasproductie in de verzuring reactor tijdens de proefperiode. De CO₂-productiewaarden zijn niet gecorrigeerd voor meetfouten (zie onder 'e', correctie van de gasmetingen).



De monsters werden afgecentrifugeerd (10 min., 5000 g), het sediment werd 1 x gewassen met gedestilleerd water en 24 uur gedroogd bij 92 °C.

— Samenstelling van gasmonsters bij C en E. De CO₂/CH₄-verhouding van de gasmonsters bij E werd gaschromatografisch bepaald (Porapak QS 80/100 mesh, 200 cm, ID=4 mm, kolomtemperatuur 23 °C) met een katharometrische detectie. Waterstof in de gasmonsters bij C kon gaschromatografisch worden aangetoond op dezelfde kolom met stikstof i.p.v. helium als dragergas.

De monsters die genomen werden voor de bepaling van de chemische samenstelling van het effluent van de verzuring reactor (A), influent methaanreactor (B) en effluent methaanreactor (D) werden afgecentrifugeerd (10 min, 4000) en vervolgens ingevroren (10 min, 4000 g).

De volgende analyses werden na afloop van de proefperiode uitgevoerd:

— Vluchtige vetzuren en ethanol werden gaschromatografisch bepaald in monsters opgenomen in 5 % mierzuur (Chromosorb 101, 80/100 mesh, 200 cm, kolomtemperatuur 170 °C) [18].

— Totaal organisch koolstof (TOC) en anorganisch koolstof werden bepaald op een Beckman Model 915A Total Organic Carbon Analyzer.

— De A-monsters werden gecontroleerd op glucose met behulp van Clinistix (Ames reagens strips No. 2844). Werd in deze monsters glucose gevonden, dan betekende dit dat de glucoseconsumptie in de verzuring reactor kleiner was dan de toevoer ervan en dat er dus geen evenwicht was bereikt tussen glucosetoevoer en -omzetting per tijdseenheid.

Met het begin van de periode van monsternamen werd gewacht tot geen glucose meer in de A-monsters kon worden aangetoond.

— Een aantal A-, B- en D-monsters werd gecontroleerd op de aanwezigheid van formiaat en lactaat. Voor de bepalingsmethoden van formiaat en lactaat wordt verwezen naar de literatuur [resp. 19 en 20].

4. Resultaten

a. De verzuring fase

De met het influent aan de verzuring reactor toegevoerde glucose bleek onder de ingestelde proefomstandigheden volledig te worden omgezet in vluchtige vetzuren, ethanol en biomassa en een aanzienlijke hoeveelheid gas.

Per liter toegevoegd influent (10 gram glucose) werd in de verzuring reactor gemiddeld 2,8 liter gas met een gemiddelde

samenstelling van 48 % kooldioxide en 52 % waterstof ontwikkeld (niet gecorrigeerd voor fouten in de gasmeting, zie 'e', correctie van de gasmetingen). De aanwezigheid van methaan kon niet worden aangetoond. In afb. 2 is het verloop van de gasproductie en het drooggewicht van het effluent over de experimentele periode grafisch weergegeven. Het droge materiaal bestond volledig uit bacteriemateriaal. De opbrengst aan bacteriën d.w.z.

$$Y_{\text{glucose}} = \frac{\text{gewicht van het gevormde bacteriemateriaal per volume eenheid}}{\text{gewicht van de omgezette glucose per volume eenheid}} \times 100 \%$$

was gemiddeld 9,1 %.

De concentratie van de vluchtige vetzuren in het effluent bedroeg gemiddeld ongeveer 4500 ppm, waarvan butyraat (gemiddeld 2500 ppm) en acetaat (gemiddeld 1600 ppm) de belangrijkste constituten waren. In afb. 3 is het verloop van de samenstelling van het effluent, uitgedrukt in mg koolstof/l

(ppm koolstof) over de proefperiode grafisch weergegeven. De lactaatconcentratie in het effluent was zeer laag of niet meetbaar en formiaat kon niet in het effluent worden aangetoond.

De analyseresultaten van de A-monsters zijn opgenomen in tabel Ia. De opbrengsten aan opgeloste organische verbindingen, die werden berekend door optelling van de in deze monsters gemeten hoeveelheden ethanol, acetaat, propionaat en butyraat

zijn telkens lager dan de gemeten TOC-waarden van de betreffende monsters. Gemiddeld werd van de 2491 ppm TOC slechts 92,6 % in de vorm van vluchtige vetzuren en ethanol teruggevonden. Het tekort aan organisch koolstof moet zijn veroorzaakt door één of meer niet nader geïdentificeerde verbindingen zoals hogere

alcoholen e.d. Naar de aanwezigheid van dergelijke verbindingen werd verder nog geen onderzoek ingesteld.

De balans van de verzuringsreaktor over de experimentele periode is uitgewerkt in tabel Ib. Per monster werd telkens één balans opgemaakt. (Opgemerkt moet worden dat er geen anorganisch koolstof in het effluent aanwezig was en dat er door de dosering van loog aan de reaktor, om de pH te handhaven, vrijwel geen koolstof werd toegevoegd. Het gebruikte influent bevatte behalve glucose 2 mM citraat per liter; de opgegeven waarde van 4030 ppm glucose-C in het influent is inclusief het toegevoegde citraat.)

De totale opbrengst aan organisch koolstof (gemiddeld 3569 ppm) verdeeld over gas, opgelost in effluent en bacteriemateriaal was gemiddeld 88,6 % van de 4030 ppm koolstof die in het influent aanwezig was. Voor de bespreking van deze resultaten zie onder 'e' (correctie van de gasmetingen).

TABEL Ia - Opgeloste verbindingen in het effluent van de verzuringsreaktor (A-monsters). De analyseresultaten zijn weergegeven in ppm koolstof (= mg koolstof gevormd per liter influent).

datum	ethanol	acetaat	propionaat	butyraat	opbrengst opgeloste producten ¹		% opbrengst ²
					TOC		
17/11	104	584	194	1459	2341	2398	97,6
18/11	90	596	175	1418	2279	2442	93,3
20/11	100	538	153	1264	2055	2245	91,5
22/11	86	588	154	1372	2200	2519	87,3
23/11	108	629	146	1442	2325	2572	90,4
24/11	115	629	176	1397	2317	2516	92,1
25/11	122	667	192	1455	2436	2590	94,1
26/11	168	672	255	1307	2402	2602	92,3
27/11	170	688	178	1366	2402	2534	94,8
gemiddeld ³	118±24	621±38	180±25	1387±52	2306±73	2491±87	92,6±4,4

¹ Opbrengst opgeloste producten berekend als de totale koolstofopbrengst van ethanol + acetaat + propionaat + butyraat.

² % opbrengst berekend volgens:
totale koolstofopbrengst als ethanol + acetaat + propionaat + butyraat per liter $\times 100 \%$ / TOC per liter

³ Achter de gemiddelde waarden is het 95 % betrouwbaarheidsinterval van deze waarden aangegeven.

TABEL Ib - Koolstofbalans van de verzuringsreaktor. De analyseresultaten zijn weergegeven in ppm koolstof (= mg koolstof gevormd per liter influent).

Input van de verzuringsreaktor: 4030 ppm koolstof.

Output van de verzuringsreaktor:

datum	TOC effluent	celmateriaal effluent ¹	CO ₂ -productie	totale opbrengst ²	% opbrengst ³
17/11	2398	414	725	3537	87,8
18/11	2442	—	722	—	—
20/11	2245	411	691	3347	83,1
22/11	2519	411	630	3560	88,3
23/11	2572	414	638	3624	89,9
24/11	2516	360	654	3521	87,4
25/11	2590	442	650	3682	91,4
26/11	2602	502	573	3677	91,2
27/11	2534	388	680	3602	89,4
gemiddeld ⁴	2491±87	418±35	663±37	3569±109	88,6±2,7

¹ Het koolstofgehalte van het bacteriemateriaal werd berekend als 45,5 % van het drooggewicht [21].

² Totale opbrengst berekend als TOC + koolstofopbrengst bacteriemateriaal + koolstofopbrengst CO₂.

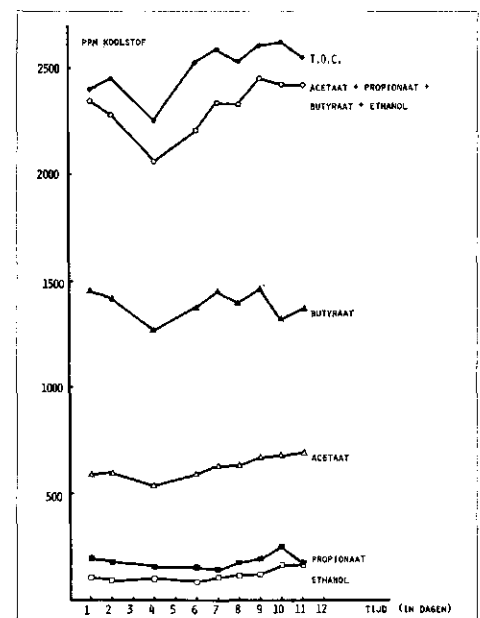
³ % opbrengst berekend volgens:
totale koolstofopbrengst als TOC + kooldioxide + bacteriemateriaal per liter $\times 100 \%$ / totaal koolstofgehalte van het influent per liter

⁴ Achter de gemiddelde waarden is het 95 % betrouwbaarheidsinterval van deze waarden aangegeven.

b. De slibafscheider - influent methaan-reaktor

Uit de analyseresultaten van de bij B genomen monsters bleek, dat het effluent van de verzuringsreaktor in de gekoelde slibafscheider niet essentieel van samenstelling was veranderd. De TOC-waarden van deze monsters zijn weergegeven in tabel IIa. Het drooggewicht van de B-monsters varieerde tussen 193 en 364 mg per liter in de vorm van gesuspenderd bacteriemateriaal. De slibafscheider werkte met een efficiency van gemiddeld 74 %.

Afb. 3 - Het verloop van de concentratie totaal organisch koolstof, vluchtige vetzuren en ethanol in het effluent van de verzuringsreaktor tijdens de proefperiode (ppm koolstof = mg koolstof per liter effluent).



c. De methaanvormende fase

Het bleek, dat het aan de methaanreaktor toegevoerde organisch materiaal, bestaande uit opgeloste organische verbindingen en gesuspenseerd bacteriemateriaal, in de methaanreaktor vrijwel volledig in andere produkten werd omgezet.

Per liter toegevoerd influent met een gemiddelde concentratie van 2500 ppm TOC, werd in de methaanreaktor gemiddeld 3,6 liter gas met een gemiddelde samenstelling van 83 % methaan en 17 % kooldioxide gevormd.

De pH van het effluent lag gedurende de gehele proefperiode tussen de 7,2 en 7,9. In het effluent konden geen opgeloste verbindingen als vluchtige vetzuren, formiaat, ethanol en lactaat worden aangetoond. Het TOC-gehalte van het effluent schom-

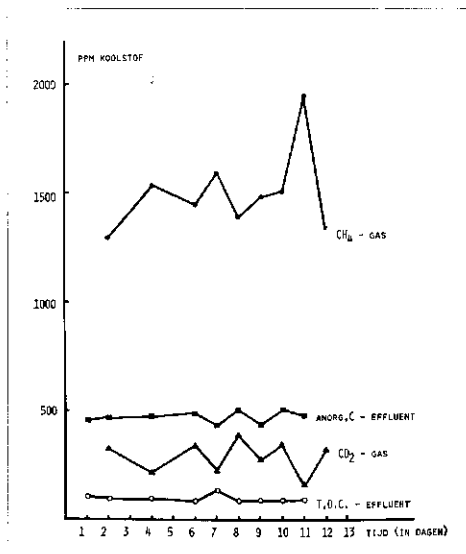
TABEL IIa - Influent van de methaanreaktor (B-monsters). De analysesresultaten zijn weergegeven in ppm koolstof (= mg koolstof per liter).

datum	TOC	Bacterie-materiaal ¹	TOC + bacterie-materiaal ¹
17/11	2457	105	2562
18/11	2368	—	—
20/11	2212	166	2378
22/11	2611	—	—
23/11	2504	109	2613
24/11	2557	88	2645
25/11	2611	88	2699
26/11	2469	91	2560
27/11	2637	110	2747
gemiddeld ²	2492±105	108±25	2601±128

¹ Het koolstofgehalte van het bacteriemateriaal werd berekend als 45,5 % van het drooggewicht [21].

² Achter de gemiddelde waarden is het 95 % betrouwbaarheidsinterval van deze waarden aangegeven.

Afb. 4 - Verdeling van organisch koolstof over effluent en gas na omzetting in de methaanreaktor (ppm koolstof = mg koolstof per liter effluent).



melde rond de 100 ppm. In afb. 4 is de verdeling van het omgezette koolstof over gas en effluent grafisch weergegeven. Het bleek, dat het in de reaktor gevormde kooldioxide wegens de vrij hoge pH van het effluent voor het grootste deel in opgeloste vorm in het effluent aanwezig bleef en in geringere mate als gas ontweek. In tabel IIb is de koolstofbalans van de methaanvormende fase weergegeven. De opbrengst aan organisch materiaal in gas en effluent bedroeg gemiddeld 92,7 %. Gemiddeld 3,9 % van de totale hoeveelheid organische stof, die aan de reaktor werd toegevoerd was nog in het effluent aanwezig.

d. Enkele microscopische waarnemingen

Door middel van verschillende incidentele waarnemingen is getracht een globaal inzicht te verkrijgen in de structuur en de samenstelling van verschillende soorten anaeroob slib.

Zuurvormend slib was wit tot grijs van kleur en bestond uit staafvormige bacteriën van variabele lengte. Wanneer het effluent van de verzuringsreaktor niet volledig zuurstofvrij was (bijv. wegens diffusie van zuurstof door toevoerslangen) werd in veel gevallen de aanwezigheid van gistcellen met een *Candida*-achtige morfologie ontdekt en in een enkel geval ook enkele protozoën. De aanwezigheid van gistcellen ging gepaard met een verhoogde ethanolproductie in de verzuringsreaktor (tot 1500 ppm). Later kon de ontwikkeling van gistcellen door het gebruik van gasdichte toevoerslangen vrijwel volledig worden voorkomen. Bij enkele andere experimenten waarbij interne slibterugvoer in de verzurings-

reaktor werd toegepast, ontstond een wit, korrelig slib dat zeer goed bezinkbaar was. (In een andere publikatie hopen wij uitgebreider op deze experimenten terug te komen). De slibkorrels ontstonden door aangroei van zuurvormende bacteriën en bereikten een maximale grootte van rijstkorrels. In afb. 5 is een opname afgedrukt van een fragment van zo'n zuurvormend-slibkorrel gemaakt met een scannende elektronen microscoop (SEM). In afb. 6 is een sterkere vergroting van dezelfde slibkorrel afgebeeld. Hoewel het oppervlak van niet-gefragmenteerde slibkorrels een vrij glad en massief aanzien vertoonde (niet afgebeeld), waren fragmenten van deze korrels zeer poreus en ruimtelijk van structuur. Opvallend is het voorkomen van lange bacteriefilamenten (de lange draden in afb. 6), dit in tegenstelling tot lichtmicroscopische preparaten van zuurvormend slib uit verzuringsreactoren die goed geroerd werden (geen slibterugvoer), waarin alleen afzonderlijke bacteriën werden waargenomen.

Wegens de poreuze inwendige structuur van de slibkorrels is het begrijpelijk dat het inwendige van de korrels zeer toegankelijk is voor opgeloste stoffen zoals glucose en de bacteriën in het centrum van de korrels ook actief bij het verzuringsproces betrokken zijn. Het methaanvormend slib, afkomstig uit de proefinstallatie van de Centrale Suiker Maatschappij was zwart van kleur, korrelig, goed bezinkbaar en rook bij aanzuren met 1 N zoutzuur naar zwavelwaterstof. De SEM-opnamen van dit methaanvormend slib (afb. 7 en 8) vertonen veel gelijkenis met die van het zuurvormend slib.

TABEL IIb - Koolstofbalans van de methaanreaktor. De analysesresultaten zijn weergegeven in ppm koolstof (= mg koolstof gevormd per liter influent).

datum	Input methaanreaktor			Output methaanreaktor				
	totaal koolstof-gehalte influent ¹	gas CO ₂	gas CH ₄	effluent anorganisch-C	effluent TOC	totale opbrengst ²	% opbrengst ³	% TOC-effluent ⁴
17/11	2562	—	—	451	104	—	—	4,1
18/11	—	324	1294	467	95	2180	—	—
20/11	2378	219	1532	478	94	2323	97,7	4,0
22/11	—	338	1443	492	85	2358	—	—
23/11	2613	230	1595	433	139	2397	91,7	5,3
24/11	2645	385	1389	507	90	2371	89,6	3,4
25/11	2699	271	1480	436	88	2275	84,3	3,3
26/11	2560	343	1503	502	87	2435	95,1	3,4
27/11	2747	157	1939	488	96	2680	97,6	3,5
29/11	—	324	1340	—	—	—	—	—
gemiddeld ⁵	2492±105	288±56	1502±146	473±21	98±13	2377±172	92,7±9,7	3,9±0,65

¹ Zie tabel IIa.

² Totale opbrengst berekend als totale koolstofopbrengst in gas en effluent.

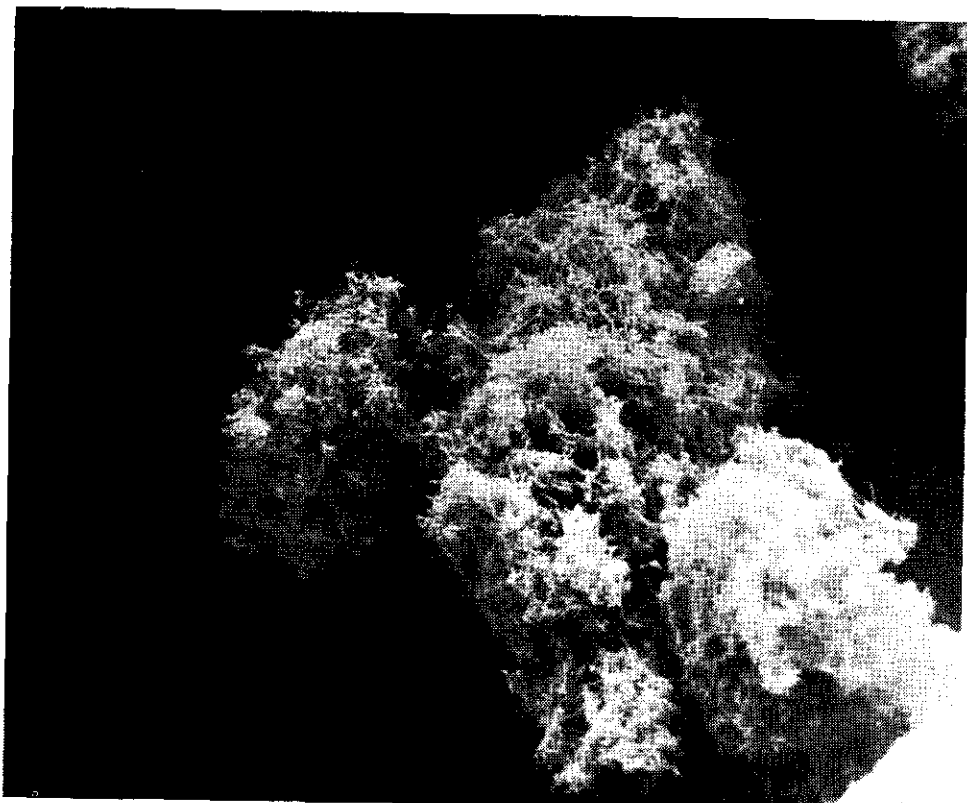
³ Berekend volgens:

$$\frac{\text{totale koolstofopbrengst in gas en effluent per liter}}{\text{totaal koolstofgehalte van het influent van de methaanreaktor per liter}} \times 100 \%$$

⁴ Berekend volgens:

$$\frac{\text{TOC in het effluent per liter}}{\text{totaal koolstofgehalte van het influent van de methaanreaktor per liter}} \times 100 \%$$

⁵ Achter de gemiddelde waarden is het 95 % betrouwbaarheidsinterval van deze waarden aangegeven.



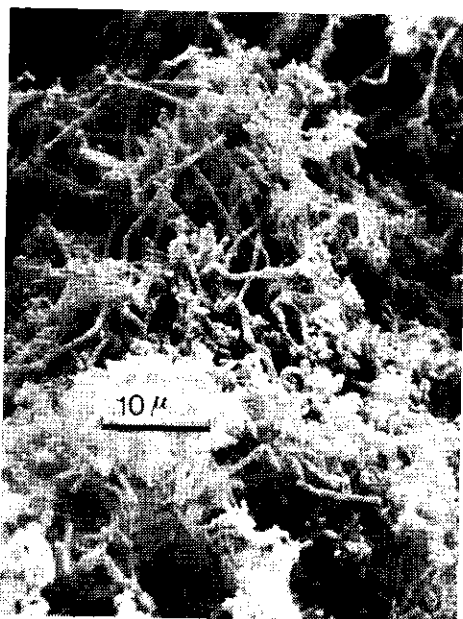
Afb. 5 - SEM-opname van een fragment van een zuurvormend-slibkorrel. Vergroting 750 x.

In afb. 7 is duidelijk te zien dat ook bij dit slib het oppervlak van de korrels glad lijkt, terwijl gefragmenteerde korrels een poreus en korrelig aanzien vertonen. In de detailopnamen van dit slib werden naast bacteriefilamenten ook veel afzonderlijke korte staafvormige bacteriën waargenomen

e. Correctie van de gasmetingen

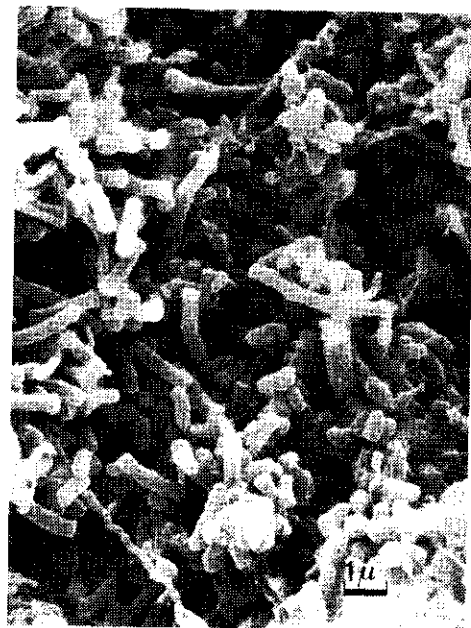
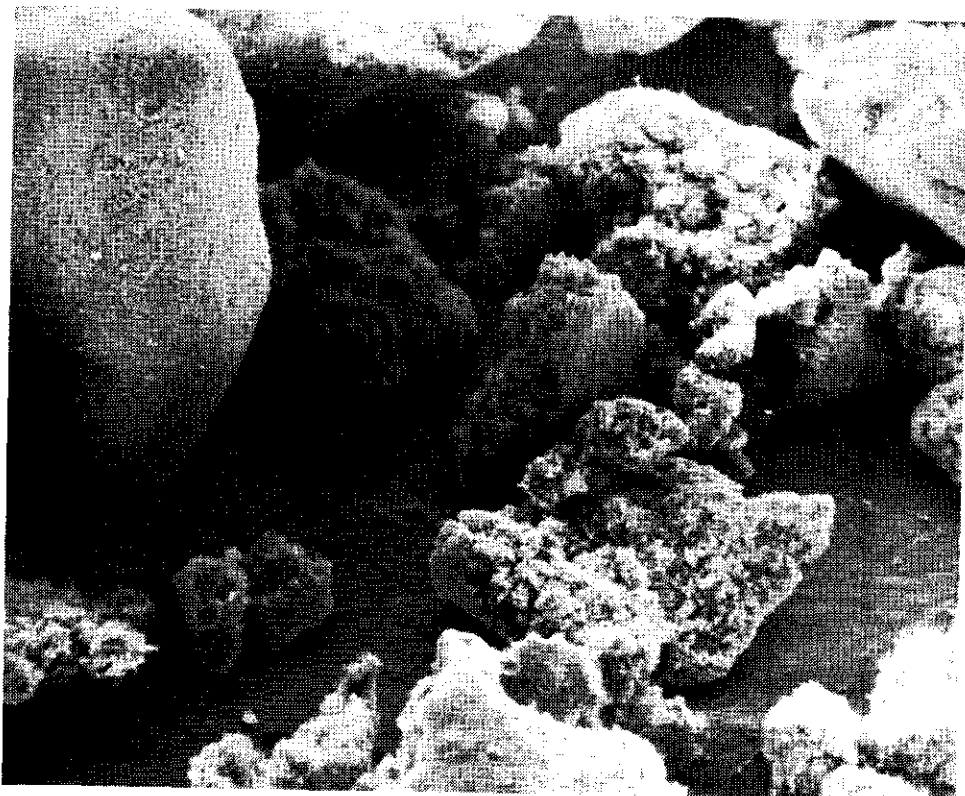
Bij het opmaken van de balans van de

Afb. 6 - SEM-opname van een zuurvormend-slibkorrel (detail). Vergroting 3000 x.



verzuringfase (tabel 1b) bleek dat slechts gemiddeld 88,6 % van het als glucose toegevoerde organisch koolstof terug was te vinden in de vorm van kooldioxide, TOC en celmateriaal in het effluent.

Afb. 7 - SEM-opname van methaanvormend slib. Vergroting 75 x.



Afb. 8 - SEM-opname van methaanvormende bacteriën. Vergroting 7500 x.

Op grond van de berekeningen van de opgeloste organische stoffen in het effluent van de verzuringsreaktor kon worden vastgesteld dat het verlies bij de gasvormige produkten moet zijn opgetreden. Tijdens calibratie van de gas-meetopstelling na afloop van de experimentele periode trad een defect, gelegen in de gasmeters aan het licht. Door tot nog toe onbekende oorzaak bleek bij doorleiden van een CO₂-

TABEL III - CO₂-productie, koolstofreductie en CO₂/H₂-productieverhouding in de verzurings-reaktor, gecorrigeerd CO₂-verlies (zie tekst).

Gemiddelde CO ₂ -productie:	1116 ± 116 ¹ ppm koolstof ²
Gemiddelde koolstofreductie t.g.v. CO ₂ -ontwikkeling ³ :	27,5 ± 2,9 %
Gemiddelde CO ₂ /H ₂ -productieverhouding ⁴ :	1,58 ± 0,23

¹ Achter de gemiddelde waarden is het 95 % betrouwbaarheidsinterval van deze waarden aangegeven.

² Mg koolstof gevormd per liter influent.

³ Berekend volgens:

$$\frac{\text{koolstofgehalte van het CO}_2 \text{ gevormd per liter}}{\text{totaal koolstofgehalte van het influent per liter}} \times 100 \%$$

⁴ Berekend volgens:

$$\frac{\text{mmol kooldioxide gevormd per liter}}{\text{mmol waterstof gevormd per liter}}$$

houdend gasmengsel door de door ons gebruikte gasmeters een gedeelte van het CO₂ in de gasmeters geabsorbeerd te worden, terwijl gassen als methaan en waterstof wel kwantitatief gemeten konden worden. Bij lage gasproducties van 150 ml per uur zoals in onze experimenten gebruikelijk, traden belangrijke CO₂-verliezen op. In tabel III is een overzicht gegeven van een aantal karakteristieke grootheden die betrekking hebben op de verzuringsfase, gecorrigeerd door de genoemde CO₂-verliezen.

5. Discussie

a. De verzuringsfase

Uit het voorgaande is gebleken, dat in het besproken tweetrapsysteem een vrijwel volledige zuivering optrad van het toegevoerde glucose. Uit het feit dat in de verzuringsreaktor geen methaan werd gevonden, mogen we afleiden dat de verzuringsfase daadwerkelijk van de methanogene fase gescheiden is geweest. De productie van waterstof door rein-kultures van anaerobe bacteriën is een bekend verschijnsel. Veel anaerobe bacteriesoorten w.o. *Escherichia coli* ontwikkelen waterstof en kooldioxide in een 1:1 verhouding door splitsing van formiaat volgens $\text{HCOOH} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$. Het formiaat is een belangrijk stofwisselingsproduct van deze bacteriën [22]. Blackwood en medewerkers [23] vonden productie van aanzienlijke hoeveelheden kooldioxide en waterstof bij *E.coli* en *E.aureus* wanneer deze bacteriën bij een pH van 6,2 gekweekt werden. De CO₂/H₂-productieverhouding varieerde tussen 1,17 en 1,31. Bij een pH van 7,8 trad vrijwel geen gasproductie meer op en werd een hoeveelheid formiaat gevormd die equivalent was aan de hoeveelheid CO₂ en waterstof die bij lage pH werd gevonden. In hoeverre de productie van waterstof in de verzuringsreaktor afhankelijk is van de pH wordt door ons momenteel onderzocht. Omdat zowel formiaat als waterstof belangrijke energiebron-

nen zijn voor methaanbacteriën [24, 25] zal door ons veel aandacht worden besteed aan het onderzoek naar de omstandigheden waaronder deze verbindingen tijdens de verzuringsfase gevormd worden en hun invloed op het verloop van methaanvorming. Hierbij zijn grootheden als belastingscapaciteit van de methaanreaktor en omzettingssnelheid van verschillende vluchtige vetzuren door de methaanvormende bacteriën belangrijke criteria voor optimalisatie van de methaanvormende fase.

De hoge concentratie butyraat in het effluent van de verzuringsreaktor is opvallend in vergelijking met de geringe hoeveelheden die doorgaans werden gevonden bij ééntrapsprocessen (processen waarbij zuurvorming zowel als methaanvorming in één reaktor plaatsvinden) [8, 26, 27]. De hoge butyraatproductie in de verzuringsreaktor kan in direct verband staan met de accumulatie van waterstof [28, 29]. Mahr [26] vond een hoge productie van lactaat tijdens een schokbelasting van anaeroob slib met glucose. Vorming van lactaat werd door ons uitsluitend waargenomen tijdens storingen in de voeding en/of plotselinge wijziging van de belasting van de verzuringsreaktor. Tot dusver zijn er geen aanwijzingen, dat lactaat tijdens regelmatig verlopende continu-verzuringsprocessen een rol van enige betekenis speelt.

b. De methaanvormende fase

In principe komt een gedeelte van het organisch koolstof, dat in de methaanreaktor in methaan en kooldioxide wordt omgezet ter beschikking van de methaanbacteriën voor de opbouw van celmateriaal. Zo zal ook tenminste een gedeelte van de gemiddeld 7,3 % koolstof, welke in de koolstofbalans ontbreekt (tabel IIb) gebruikt zijn voor de groei van methaanvormende bacteriën. De grote spreidingen in de metingen aan de methaanreaktor maken de berekening van de celopbrengst via een koolstofbalans als methode ongeschikt. Voorts is het (evenals bij de verzu-

ringsfase) niet onmogelijk, dat een gedeelte van het gasvormig kooldioxide bij de meting ervan verloren is gegaan.

6. Samenvatting

Een 1 % glucose-oplossing werd in een laboratoriumsysteem voor de anaerobe zuivering van afvalwater vrijwel volledig omgezet in bacteriemateriaal en gasvormige producten. De verzuringsfase en respectievelijk methaanvormingsfase vonden ieder afzonderlijk plaats in twee in serie geschakelde reaktoren.

In de verzuringsreaktor vond bij 30 °C, pH 5 en een verblijftijd van 10 uur een volledige omzetting van de toegevoerde glucose plaats.

De verzuring van het glucose resulteerde in de vorming van vluchtige vetzuren en ethanol en aanzienlijke hoeveelheden kooldioxide en waterstof in een verhouding van 1,6 : 1. Ruim een kwart van de hoeveelheid organisch koolstof in het influent werd tijdens de verzuring in kooldioxide omgezet.

Via een gekoelde slibafscheider werd het effluent van de verzuringsreaktor in een methaanreaktor gepompt. In de methaanreaktor werd bij 30 °C, een gemiddelde pH van 7,4 en een verblijftijd van ongeveer 100 uur de resterende hoeveelheid organisch koolstof voor gemiddeld 96 % in methaan, kooldioxide en celmateriaal omgezet. Methaan en kooldioyde werden in een onderlinge verhouding van ongeveer 2 : 1 gevormd.

Voor de totstandkoming van deze publikatie gaat onze dank uit naar mevr. A. v. Deursen voor haar hulp bij de uitvoering van verschillende analytische bepalingen, de heer C. Bakker van het Laboratorium voor Electronenmicroscopie voor het maken van de SEM-foto's en prof. dr. ir. C. Boelhouwer en ir. R. de Vletter voor het kritisch doornemen van het manuscript.

Literatuur

- Lettinga, G., Fohr, P. G. en Janssen, G. G. W. (1972). H₂O (5) nr. 22.
- Lettinga, G. en Velsen, A. F. M. van (1974). H₂O 14/74.
- Lettinga, G., Jansen, A. G. N. en Terpstra, P. (1975). H₂O (8) nr. 26.
- Lettinga, G., Sar, J. van der en Ben, J. van der (1976). H₂O (9) nr. 2.
- Hughes, D. E. en Wimpenny, J. W. T. (1969). Adv. Micr. Phys. 3, 197-232.
- Fohr, P. G. (1974). H₂O 22/74.
- Hobson, P. N. (1973). Process. Biochem. (GB). 12, 19.
- Chynoweth, D. P. en Mah, R. A. (1971). Adv. Chem. Ser. 105, pp. 41-54.
- Pine, M. J. (1971). Adv. Chem. Ser. 105, pp. 1-10.

10. Clark, R. H. en Speece, R. E. (1971) in: Jenkins, Adv. in Wat. Poll. Res., Vol. 1, II-27. Perg. Press. NY.
11. Kugelman, I. J. en Chin, K. K. (1971). Adv. Chem. Ser. 105, pp. 55-90.
12. Imhoff, K. en Müller, W. J. (1971) in: Disposal of Sewage, 2e druk, Butler & Tanner Ltd, Londen.
13. Andrews, F. J. en Graef, S. P. (1971). Adv. Chem. Ser. 105, pp. 126-162.
14. Ghosh, S., Conrad, J. R. en Klass, D. L. (1975). JWPCF, 47 (1), 30-43.
15. Keenan, J. D. (1975). Gas. Abstr. 31, 28.
16. Borchardt, J. A. (1971). Adv. Chem. Ser. 105, pp. 108-125.
17. Evans, C. G. T., Herbert, D., en Tempest, D. W. (1970). In: Methods in Microbiology, (Norris, J. R. en Ribbons, D. W., eds.), Ac. Press, Londen, N. Y. Vol. II, pp. 277-327.
18. Carlsson, J. (1973). Appl. Micr. 25, 2, pp. 287-289.
19. Lang, E. en Lang, H. (1972). Z. Anal. Chem. 260, 8-10.
20. Hohorst, H. J. (1962). In: Bermeyer, H. U.; Methoden der Enzymatischen Analyse. Verlag Chemie Weinheim (Weinheim), S. 266, 1. Auflage.
21. Tempest, D. W., Hunter, J. R. en Sykes, J. (1965). J. Gen. Micr., 39, 355-366.
22. Schlegel, H. G. (1975). Allgemeine Mikrobiologie. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
23. Blackwood, A. C., Neish, A. C. en Leidingham, G. A. (1956). J. Bact. 72, 497-499.
24. Pretorius, W. A. (1972). Wat. Res. 6, 1213.
25. Zeikus, J. G., Weimer, P. J., Nelson, D. R. en Daniels, L. (1975). Arch. Micr. 104, 129-134.
26. Mahr, I. (1969). Wat. Res. 3 507-517.
27. Andrews, J. F. en Pearson, E. A. (1965). Int. J. Air & Wat. Poll. 9, 439-461.
28. Rufener, W. H. en Wolin, M. J. (1968). Appl. Micr. 16, 1955.
29. Wolin, H. J. (1974). Am. J. of Clin. Nutr. 27 pp. 1320-1328.

