

Biodegradatie van koolwaterstoffen door actief slib

Bij de verwerking en het transport van minerale olie komen grote hoeveelheden terecht in het oppervlaktewater, waardoor de aquatische flora en fauna worden bedreigd. Kleine hoeveelheden minerale olie kunnen het oppervlaktewater tevens ongeschikt maken voor drinkwater i.v.m. vorming van reuk- en smaakstoffen. Een onderzoek naar de afbreekbaarheid van olie-komponenten en de factoren die daarbij een rol spelen, is daarom gewenst. Het hier beschreven onderzoek richt zich op het verloop van BOD-kurves van enige



DRS. H. H. J. BINTANJA
Laboratorium voor Chemische
Technologie van de Universiteit
van Amsterdam



PROF. DR. IR. C. BOEL-
HOUWER
Laboratorium voor Chemische
Technologie van de Universiteit
van Amsterdam

koolwaterstoffen. Vele typen koolwaterstoffen zijn ontvankelijk voor biodegradatie door verschillende micro-organismen. Fuhs [1] en Van der Linden [2] geven hiervan een samenvatting.

Onder de soorten, die koolwaterstoffen kunnen afbreken, vinden we vooral *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Actinomyces* en *Bacillus*soorten [3, 4, 5]. De afbraaksnelheid wordt beïnvloed door de structuur van de koolwaterstoffen die de minerale olie vormen [6]. Bovendien spelen de temperatuur, dispersie en de aanwezigheid van zuurstof en voedingszouten een belangrijke rol.

De slechte afbreekbaarheid van olie in zeewater moet voornamelijk worden toegeschreven aan het gemis van voldoende voedingszouten [7]. Er zijn echter weinig kwantitatieve gegevens bekend wat betreft de zuurstofverbruikende eigenschappen van olievervuild water.

Bij de degradatie van koolwaterstoffen ontstaan een groot aantal tussenproducten voordat uiteindelijk koolzuur gevormd wordt.

Voor de vorming van de opeenvolgende tussenproducten is zuurstof nodig, zodat derhalve de momentane zuurstofbehoefte een goede maat is voor het afbraakstadium van de desbetreffende koolwaterstof. Door de vorming van de tussenproducten is de koolwaterstofconcentratie op een bepaald tijdstip niet representatief voor de nog resterende organische vervuiling. Bovendien bleek uit separate experimenten

dat koolwaterstoffen in emulsievorm sterk aan het slib worden geabsorbeerd, waardoor een analyse van de nog aanwezige koolwaterstof moeilijk is. In tegenstelling tot de meeste in afvalwater voorkomende stoffen zijn koolwaterstoffen met veel koolstofatomen niet of nauwelijks oplosbaar in water [8].

Daar algemeen wordt aangenomen [6] dat de biodegradatie bij tridekaan en hogere alkanen aan het grensvlak water-alkaan plaatsvindt, zullen de omzettingen sneller verlopen naarmate de koolwaterstof inniger in contact wordt gebracht met water en micro-organismen.

De door ons gemeten BOD-kurves hebben betrekking op koolwaterstofemulsies met 4 gew. % natriumoleaat (berekend op koolwaterstof).

Natriumoleaat is een goed afbreekbare emulgator [7] en om die reden bij deze studie toegepast.

Experimenteel

Het BOD-verloop werd gevolgd met behulp van een volledig automatische apparatuur, naar het ontwerp van Bridié [9]. Voor een uitgebreide beschrijving van de apparatuur wordt naar de betreffende publikatie verwezen.

De temperatuur werd gehandhaafd op 30 °C. De BOD³⁰ is ca. 1,4 maal zo groot als de BOD²⁰, zodat in kortere tijd meer

informatie ter beschikking kan komen. In afb. 1 en 2 zijn de gemeten BOD-kurves getekend van glucose en caseïne in triplo. Deze twee stoffen worden beschouwd als goed afbreekbare organische koolstofverbindingen.

Als ent werd gebruik gemaakt van rioolslib, dat actief gehouden werd door intermitterende voeding met caseïne (entsoort A). De zuurstofbehoefte kan worden uitgedrukt als BOD/g substraat of BOD/TOD, waarbij de TOD de theoretische zuurstofbehoefte is bij een complete oxydatie van het substraat tot CO₂ en H₂O. De BOD₅/TOD bedraagt voor glucose gemiddeld 0,65 en voor caseïne eveneens 0,65.

Daar bij de biodegradatie een gedeelte van de organische stoffen omgezet wordt in celmateriaal, zal bij deze verhoudingen het substraat geheel of bijna geheel omgezet zijn. In de grafieken zijn duidelijk de zgn. plateaus van Busch te onderscheiden, die de BOD-kurve in twee delen opsplijst [10]. Volgens de theorie van Revelle ontstaat deze splitsing doordat de micro-organismen overgaan van substraatoxydatie en endogene ademhaling naar een situatie waarin alleen endogene ademhaling optreedt; dit is in het geval als de substraateliminatie voltooid is. Niet altijd is het optreden van het plateau van Busch even duidelijk waarneembaar. Dit kan het gevolg zijn van:

- de aanwezigheid van protozoën, wanneer de groeikurve van de bacteriën gevolgd wordt door de groeikurve van de protozoën;
- de aanwezigheid van verschillende substraatcomponenten, die na elkaar geëlimineerd worden (zgn. 'sequential uptake'). Bij complexe substraten is het echter ook mogelijk dat er meerdere buigpunten optreden, juist door het na elkaar geëlimineerd worden.

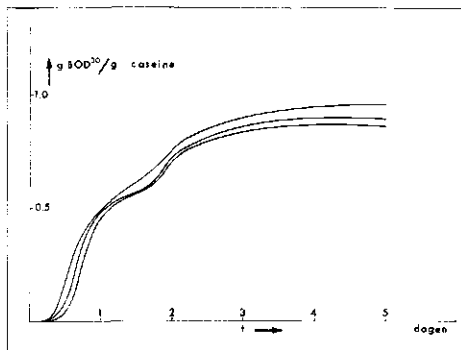
Afbraak van aromaten

In afb. 3 zijn de gemeten BOD-kurves van glucose, 1-methylnaphtaleen en tetraline [1, 2, 3, 4 tetrahydronaphtaleen) weergegeven.

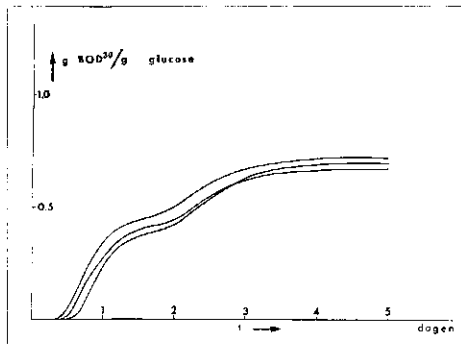
De beginconcentratie was in alle drie de gevallen 50 mg/l, terwijl eenzelfde hoeveelheid van de entsoort A werd toegevoegd. De metingen werden parallel uitgevoerd, zodat niet alleen de hoeveelheid toegevoegde ent, maar ook de activiteit van de ent hetzelfde was.

Glucose blijkt veel beter afbreekbaar te zijn dan de beide koolwaterstoffen. Na vijf dagen neemt de BOD/TOD verhouding bij glucose niet meer noemenswaardig toe (BOD₅/TOD = 0,61), terwijl de BOD₅/TOD voor 1-methylnaphtaleen en tetraline resp. 0,35 en 0,27 bedragen en de BOD₁₀/TOD 0,42 resp. 0,30.

Afb. 1 - BOD-verloop van glucose met entsoort A, concentratie substraat 50 mg/l.



Afb. 2 - BOD-verloop van caseïne met entsoort A, concentratie substraat 50 mg/l.



Zowel tetraline als 1-methylnaphtaleen vertonen een vrij grote lagfase. Dit kan er op duiden dat in de ent relatief weinig micro-organismen voor afbraak van de desbetreffende verbindingen beschikbaar waren, of dat de lagfase een gevolg is van een noodzakelijke adaptatieperiode van het slib; ook een combinatie van deze twee effecten is mogelijk.

Het plateau van Busch blijkt bij deze twee koolwaterstoffen geheel te ontbreken. Hoewel de lagfase in het geval van tetraline korter duurde dan in het geval van 1-methylnaphtaleen, bleek de zuurstofconsumptie bij laatstgenoemd koolwaterstof sneller te stijgen.

Misschien is het specifiek onverzadigde karakter van tetraline de oorzaak van deze minder snelle afbraak. De BOD-kurves van tetraline bij verschillende concentraties van het substraat tonen dat, naarmate de beginconcentratie aan tetraline hoger is, het substraat des te moeilijker door de micro-organismen is af te breken. Een evenredige vergroting van de hoeveelheid entmateriaal (concentratie 1,2 g drooggewicht slib/l), heeft daarbij geen invloed (afb. 4).

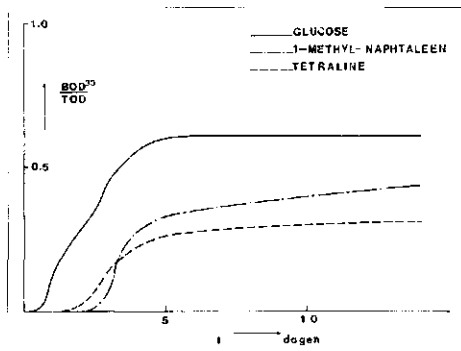
De toegevoegde hoeveelheid ent gaf bij het BOD-verloop bij 50 mg tetraline (= 100 mg/l) een zodanig grote eigen zuurstofbehoefte, dat de totale zuurstofbehoefte boven die van de theoretische mogelijke, gebaseerd op de totale oxydatie van tetraline, uitkwam. Bij 100 mg tetraline bleek de totale zuurstofbehoefte in absolute zin geringer dan die van 50 mg tetraline; een zeer sterke daling van de zuurstofbehoefte bleek bij een hoeveelheid van 200 mg tetraline (400 mg/l).

Hoge concentraties aan tetraline blijken dus sterk remmend op de biologische afbraak te werken; wellicht worden er tussenproducten gevormd, die de microbiologische oxydatie negatief beïnvloeden. Tevens bestaat de mogelijkheid dat het eigen substraat remmend werkt, zoals ook is aangetoond in het geval van fenol [9]. Eenzelfde concentratie-effekt werd ook bemerkt bij 1-methylnaphtaleen, hoewel deze remming minder sterk was dan in het geval van tetraline.

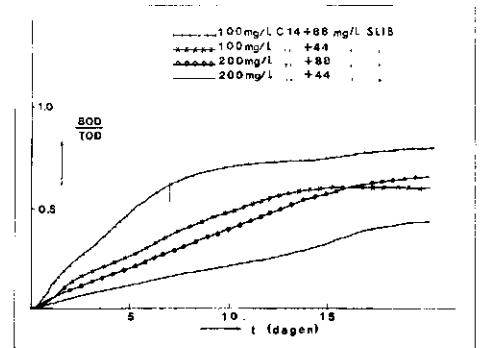
Vergelijken we de zuurstofbehoefte van de twee koolwaterstoffen met elkaar bij een concentratie van 100 mg/l (afb. 5), dan blijkt tetraline minder goed te worden afgebroken, terwijl een mengsel van 1-methylnaphtaleen (50 mg/l) en tetraline (50 mg/l) wel vergelijkbaar snel wordt afgebroken ten opzichte van 1-methylnaphtaleen in een concentratie van 100 mg/l.

Afbraak van n-alkanen

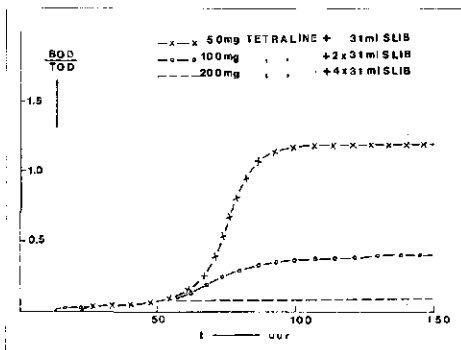
De afbraaksnelheid van organische componenten wordt beïnvloed door de hoeveelheid ent bij het starten van de BOD-meting.



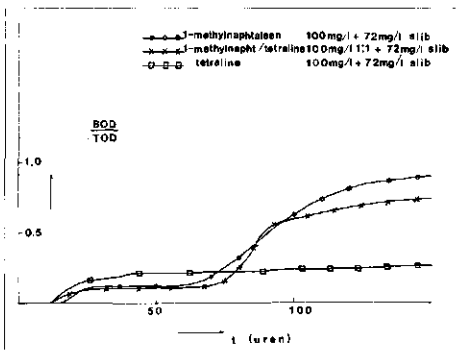
Afb. 3 - BOD-verloop van glucose, 1-methylnaphtaleen en tetraline met entsoort A, concentratie substraat 50 mg/l.



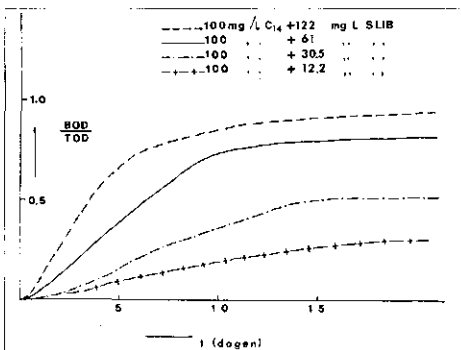
Afb. 7 - BOD-verloop van tetradekaan bij verschillende concentraties van substraat en ent B.



Afb. 4 - BOD-verloop van tetraline bij verschillende concentraties substraat en evenredige hoeveelheid van entsoort A.



Afb. 5 - BOD-verloop van tetraline en 1-methylnaphtaleen en een mengsel hiervan bij eenzelfde concentratie van ent A.

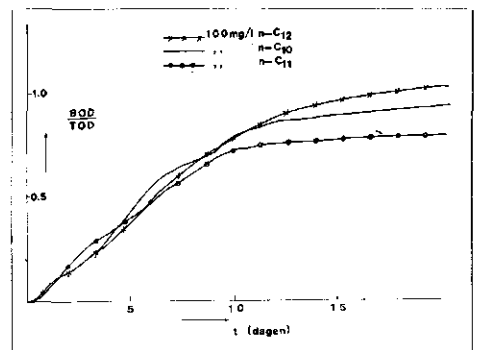


Afb. 6 - BOD-verloop van tetradekaan bij verschillende hoeveelheden ent B bij eenzelfde concentratie van het substraat.

Dit is duidelijk te zien in afb. 6, waar het BOD-verloop is nagegaan van tetradekaan (C₁₄) bij verschillende hoeveelheden ent. Niet alleen de hoeveelheid, maar ook de activiteit van de ent bleek van belang. Om enigszins reproduceerbare BOD-kurves te verkrijgen, werd besloten als ent vers actief slib te gebruiken van de waterzuiveringsinstallatie Amsterdam Noord (entsoort B), dit in tegenstelling tot ent A, waarbij de activiteit van het rioolslib op een zo goed mogelijk constant peil was gebracht door intermitterende voeding met een goed afbreekbaar substraat; entsoort A bleek overigens na verloop van tijd in aanzienlijke mate aan activiteit in te boeten.

De concentratie van het substraat bleek ook bij de n-alkanen een rol te spelen. In afb. 7 is bij het BOD-verloop van tetradekaan zowel het effect van de concentratie van het alkaan, als het effect van de concentratie van ent B aangegeven. Liu e.a. [11] toonden aan dat dekaan bij bepaalde substraatenzymverhoudingen remmend kan werken.

In afb. 8 is het BOD-verloop getekend van dodekaan, undekaan en dekaan bij een concentratie van 100 mg/l en een slibconcentratie van 74 mg/l, in afb. 9 van heptaan, oktaan en nonaan bij dezelfde kondities. Bij deze n-alkanen kregen we bij eenzelfde concentratie en fysiologische konditie van



Afb. 8 - BOD-verloop van de n-alkanen dodekaan, undekaan en dekaan, met een gelijke hoeveelheid ent B concentratie ent B 74 mg/l.

de ent dus duidelijk verschillende BOD_∞-waarden. Dit kan er op wijzen dat sommige alkanen niet geheel tot CO₂ en H₂O worden afgebroken of dat de hoeveelheid zuurstof, benodigd voor de afbraak, verschillend is, bijv. omdat in het ene geval meer biomassa wordt gevormd dan in het andere geval. In tabel I zijn de gemiddelde BOD_∞/TOD-waarden aangegeven voor de door ons onderzochte n-alkanen.

TABEL I - Gemiddelde totale zuurstofbehoefte in verhouding tot de theoretische zuurstofbehoefte bij n-alkanen bij een concentratie van 100 mg/l en een slibconcentratie van 74 mg/l.

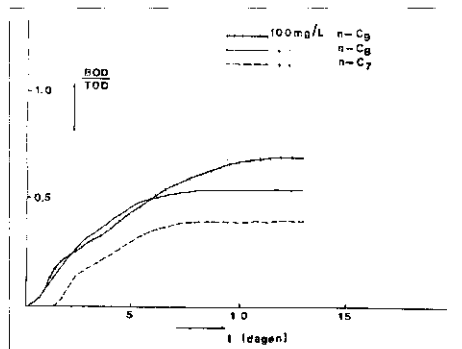
volgorde	alkaan	BOD _∞ /TOD
1	dodekaan	0,95
2	dekaan	0,91
3	tridekaan	0,87
4	hexadekaan	0,86
5	tetradekaan	0,83
6	nonaan	0,82
7	undekaan	0,78
8	oktaan	0,60
9	pentadekaan	0,56
10	heptaan	0,40

De BOD_∞-waarden in tabel I zijn niet gekorrigeerd voor de endogene ademhaling van de ent. Deze bedroeg uitgedrukt in BOD_∞/TOD de waarde 0,16.

Bij alle door ons onderzochte n-alkanen, behalve bij heptaan, bleek de zuurstofconsumptie vrij snel na het inzetten van de BOD-proef te beginnen. Hieruit is te konkluderen dat in het rioolslib mikro-organismen aanwezig zijn, die de alkanen kunnen afbreken (konstitutief systeem). De lage BOD_∞-waarden van oktaan en heptaan kunnen veroorzaakt worden doordat deze componenten niet geheel tot CO₂ en H₂O worden afgebroken. In het onderzoek van Gerhold [12] bleken deze alkanen zelfs toxisch te zijn.

Gerhold e.a. stelden een onderzoek in naar de afbreekbaarheid van alkanen door slib van verschillende zuiveringsinstallaties in de VS met behulp van de Warburg-methode. Dodekaan bleek bij hun experimenten het snelst te worden afgebroken; dit correspondeert met de hoge BOD_∞-waarde van dodekaan bij onze experimenten. Doch nonaan bleek in hun experimenten slecht te worden afgebroken, tevens bleek tetradekaan beter afbreekbaar dan dekaan. Opmerkelijk is de lage BOD_∞-waarde van pentadekaan in onze experimenten. Een onderzoek naar de afbreekbaarheid van alkanen met toevoeging van Anti Oil TS₅ als emulgator werd uitgevoerd door Hellmann [13]. Hierbij vond hij dat tetradekaan en hexadekaan het beste werden afgebroken. Zowel Hellmann als Gerhold verrichtten geen metingen aan pentadekaan, tridekaan en undekaan.

De metingen van Hellmann werden verricht met een niet-automatische BOD-methode.



Afb. 9 - BOD-verloop van de n-alkanen nonaan, oktaan en heptaan met een gelijke hoeveelheid ent B (74 mg/l).

Vertakte alkanen

In tabel II zijn de gemiddelde BOD_∞/TOD-waarden vermeld voor een aantal n-alkanen, vertakte alkanen en mengsels hiervan.

TABEL II - Gemeten BOD_∞/TOD waarden bij n-alkanen en vertakte alkanen en mengsels hiervan.

alkaan	BOD _∞ /TOD	concentratie mg/l
nonaan	0,82	100
nonaan + 2, 2, 5-trimethylhexaan	0,42	50/50
2, 2, 5-trimethylhexaan	0,18	100
oktaan	0,60	100
oktaan + 2, 2, 4-trimethylpentaan	0,33	50/50
2, 2, 4-trimethylpentaan	0,05	100

Uit deze gegevens blijkt dat de onderzochte vertakte alkanen door rioolslib niet of nauwelijks worden afgebroken.

De zuurstofconsumptie van 2, 2, 5-trimethylhexaan is bijna geheel terug te voeren op de endogene ademhaling. Het verschil tussen de BOD_∞/TOD-waarde van dit vertakte alkaan en de endogene ademhaling (= 0,16) is zo gering, dat dit binnen de nauwkeurigheid valt van de BOD-proeven.

Bij iso-oktaan blijkt het substraat zelfs een remmende werking te hebben op de endogene ademhaling van de ent. Ook de aanwezigheid van n-alkanen blijkt de afbraak van vertakte koolwaterstoffen geenszins gunstig te beïnvloeden; in de onderzochte mengsels van n-alkanen en iso-alkanen (zie tabel II) is de BOD_∞/TOD-waarde globaal evenredig met de alkaanconcentratie.

In de literatuur [2, 13] is het bekend dat bacteriën moeilijk vertakte alkanen kunnen afbreken. Ondanks de zeer heterogene samenstelling van de mikro-organismen in het rioolslib is het niet mogelijk gebleken de afbraak van vertakte alkanen door middel van BOD-proeven aan te tonen. Dit wordt bevestigd door Van der Linden e.a. [6] die er niet in slaagden een bacterie te isoleren, die iso-oktaan kon afbreken.

Konklusie

— De automatische BOD-apparaatuur is geschikt voor een onderzoek naar de biologische hardheid van diverse verbindingen, waarbij tevens de invloed van verschillende factoren, zoals de concentratie, kunnen worden onderzocht.

— Het BOD-verloop is afhankelijk van de hoeveelheid en activiteit van de gebruikte ent en de concentratie van het substraat.

— De meeste n-alkanen kunnen goed door rioolslib afgebroken worden; een uitzondering vormen heptaan, oktaan en pentadekaan.

— De door ons onderzochte aromaten 1-methylnaphtaleen en tetraline kunnen na een adaptiefase redelijk door rioolslib worden afgebroken wanneer de concentratie niet al te hoog is.

— Sterk vertakte alkanen worden niet of nauwelijks door rioolslib afgebroken.

Literatuur

1. Fuhs, G. W., Arch. f. Mikrobiologie 39 (1961) 374-422.
2. Linden, A. C. van der, Thijsse, G. J. E., Adv. Enzymol. 27 (1965) 469-547.
3. Shaposhnikov, V. N., Kozlova, E. I., Arkad'eva, Z. A. Mikrobiologiya 37 (1967) 511-517.
4. Bushnell, L. D., Haas, H. F., J. Bact. 41 (1941) 653-673.
5. Zobell, C. E., Bact. Rev. 20 (1946) 1-41.
6. Linden, A. C. van der, Ravenswaay Claasen, J. C. van, Chem. Weekbl. (1971) 17 september.
7. Bridié, A. L., Bos, J., J. Inst. Petr. 57 (1971) 270-277.
8. McAuliffe, C., J. Phys. Chem. 70 (1966) 1267-1275.
9. Bridié, A. L. A. M., Water Research 3 (1969) 157-165.
10. Mulder, K., H₂O 5 (1972) 74-79.
11. Liu, B., JWPCF 45 (1973) 232-239.
12. Gerhold, M. R., Malaney, G. W., JWPCF 38 (1966) 562-578.
13. Hellmann, H. von, Klein, K., Knöpp, H., Deutsche Gewässerk. Mitt. 10 (1966) 60-70.

