

CA 79-12

Enkele oriënterende experimenten ten
behoefte van de waterkwaliteit in het
nieuwe RIVO-zeewateraquarium.

R. van den Berg, B. Verboom

CA 79-12

Afdeling:

CHEMISCH ONDERZOEK

Rapport:

CA 79-12

Enkele oriënterende experimenten ten
behoefte van de waterkwaliteit in het
nieuwe RIVO-zeewateraquarium.

Auteur:

R. van den Berg, B. Verboom

Project:

2-7123
Toxiciteitsonderzoek

Projectleider:

Ir. R. van den Berg

Datum van verschijnen:

December 1979

Inhoud:

- I. Samenvatting
- II. Verdampingsexperiment
 - Inleiding
 - Moleculaire theorie van de verdamping
 - Gegevens van het te bouwen zeewateraquarium
 - Het modelsysteem
 - Meetmethode
 - Resultaten
 - Conclusie
- III. De stikstofcyclus in het zeewateraquarium
 - Inleiding
 - Nitrificatie en denitrificatie
 - Doel van het onderzoek
 - Materiaal en methoden
 - Resultaten
 - Conclusies en discussie
- IV. Referenties

**DIT RAPPORT MAG NIET GECITEERD WORDEN ZONDER TOESTEMMING VAN DE
DIRECTEUR VAN HET R.I.V.O.**

2292783

I - SAMENVATTING

Om de waterkwaliteit van het nieuwe RIVO-zeewateraquarium goed te kunnen beheersen zijn een tweetal onderzoeken gedaan naar belangrijke factoren: de verdamping van water uit het aquarium en de omzetting van stikstofverbindingen in het aquarium.

Door experimenten in een modelsysteem kon de hoeveelheid te suppleren water op ongeveer $0.4 \text{ m}^3/\text{dag}$ geschat worden, bij een totaal volume in het aquarium van 225 m^3 .

In open aquaria kon in eerste instantie alleen het verdwijnen van anorganische stikstof aangetoond worden. In een tweede fase werd denitrificatie in de zin van omzetting van anorganische stikstofverbindingen in moleculaire stikstof aangetoond in gesloten systemen. In deze gesloten systemen kon het denitrificatieproces dagelijks gevolgd worden. Denitrificatie en dus omzetting van nitraat zal bijzonder goed kunnen plaatsvinden in de reservoirs van het aquarium door een zandbodem van ongeveer 10 cm. aan te brengen.

II - VERDAMPINGSEXPERIMENT

Inleiding

In een open ruimte vindt vrijwel altijd verdamping van vloeistoffen plaats. Dit heeft in het geval van het zeewateraquarium tot gevolg dat bij de verdamping van water de gehalten van de opgeloste zouten toenemen. Om deze stijging in het zoutgehalte tegen te gaan moet er zoet water gesuppleerd worden. Over de hiervoor benodigde hoeveelheid water, zijn op basis van de literatuur slechts globale benaderingen mogelijk en daarom is een nader onderzoek uitgevoerd in een modelsysteem. Bij de uitvoering van het onderzoek is ernaar gestreefd de te verwachten toestand in het nieuwe zeewateraquarium zo goed mogelijk te benaderen.

Moleculaire theorie van de verdamping (3)

Bij verdamping van vloeistofmoleculen zijn twee factoren van belang: de onderlinge aantrekkingskrachten tussen de moleculen en de beweeglijkheid van de vloeistofmoleculen, die beïnvloed wordt door de temperatuur. Als de krachten ten gevolge van de beweeglijkheid de aantrekkingskrachten overwinnen vindt verdamping plaats. Omdat steeds vloeistofmoleculen met voldoende snelheid beschikbaar zijn, vindt verdamping altijd plaats, waarbij de verdampingssnelheid afhankelijk is van de mate van voorkomen van deze vloeistofmoleculen. Verdamping vindt, als er geen sprake is van koken, plaats aan het oppervlak, want alleen daar kan een molecuul zich ten gevolge van zijn beweeglijkheid aan de aantrekkingskrachten onttrekken.

Bij een groter oppervlak (met hetzelfde volume vloeistof) zal naar verhouding meer verdamping plaatsvinden. Wanneer de temperatuur verhoogd wordt, wordt de beweeglijkheid van de vloeistofmoleculen groter, terwijl de aantrekkingskrachten (o.a. door uitzetting) verminderen, waardoor meer moleculen ontsnappen en een snellere verdamping plaatsvindt.

De vloeistof verdampt tot een evenwicht is opgetreden in verdamping en condensatie (van damp naar vloeistof). Als dit evenwicht bereikt is (voornamelijk in een gesloten ruimte) vindt netto geen verdere verdamping meer plaats en is er sprake van een verzadigde damp. Treedt verversing van de bovenstaande verzadigde damp door onverzadigde damp op, dan kan netto weer vloeistof verdampen. De mate van luchtverversing speelt dus een belangrijke rol. Een andere factor die zeker van invloed is op de verdamping, maar die primair van wat minder belang is, is de zuiverheid van de vloeistof. Dit hangt samen met de dampdrukverlaging door de aanwezigheid van opgeloste stof moleculen in het vloeistofoppervlak. Bij de verdamping van zeewater speelt met name het zoutgehalte een (remmende) rol. Voor het ontwerpen van het modelsysteem zijn dus vooral van belang: de temperatuur-het relatieve oppervlak-de verzadigingsgraad van de lucht-de luchtverversing en, in mindere mate, het zoutgehalte.

Gegevens van het te bouwen zeewateraquarium (15)

Het nieuwe zeewateraquarium heeft een volume van 45 m^3 , waar nog voorraadkelders van totaal 180 m^3 bijkomen. Totaal is het volume dus 225 m^3 . De gemiddelde diepte in de voorraadkelders zal $1,40 \text{ m}$ bedragen, waaruit een wateroppervlakte van $\pm 161 \text{ m}^2$ berekend kan worden. De temperatuur zal meestal variëren tussen 10 en 14°C met een maximum van 16°C . Alle ruimten waar aquaria en voorraadkelders zijn, moeten geventileerd kunnen worden en voorzien zijn van een luchtafzuiginstallatie. De vochtigheid van de aquaria en voorraadkelders zal ongeveer 90% van de verzadigingswaarde bedragen en het zoutgehalte van het zeewater zal rond de 32 g/kg liggen.

Het modelsysteem

Omdat de verdamping in het te bouwen systeem nog niet te meten is, is voor het verkrijgen van een indicatie over de verdamping, een modelsysteem ontworpen. Primaire eis aan dit systeem was het gelijk zijn van het voor verdamping beschikbare relatieve oppervlak met dat in het nieuwe zeewateraquarium. Om aan deze eis te voldoen behoefde slechts de diepte van het cilindervormige modelsysteem gelijk gekozen te worden aan die van het zeewateraquarium, $1,40 \text{ m}$ (overeenkomende met $7,14 \text{ cm}^2/1$). Als modelsysteem werd een lange pijp van PVC met een doorsnede van 19 cm genomen, die tot $1,40 \text{ m}$ met water gevuld kon worden.

De experimenten zijn door het ontbreken van een rond 10°C geregelde kamer uitgevoerd bij temperaturen van gemiddeld 16°C en gemiddeld 0°C .

Bij het 16° -experiment bedroeg de luchtvochtigheid $\pm 75\%$; het 0° -experiment werd uitgevoerd in een koelcel met een vochtigheid van ongeveer 95% van de verzadigingswaarde.

Voor de experimenten werd gebruik gemaakt van zeewater, 70 km uit de kust verzameld, dat door verdunning met zoetwater op een zoutgehalte van 32 g/kg gebracht werd. Tenslotte werd de kolom voortdurend vanaf de bodem belucht door middel van een van boven ingevoerde slang en een luchtpomp.

Meetmethode

Bij het begin van het experiment werd de buis gevuld met water met het juiste zoutgehalte tot een waterniveau van $1,40 \text{ m}$, aangegeven door een aan de binnenkant geplakte peilschaal. Vanaf dat moment werd na willekeurige tijdsintervallen de hoeveelheid verdampt water afgemeten door de peilschaal af te lezen. Bij een verdamping van meer dan 5 cm werd de verdamping gemeten door met een peilstok de hoogte van het waterniveau vast te stellen.

Resultaten

In figuur 1 is de verdamping (in mm verdampt water) uitgezet tegen de tijd (in dagen) bij zowel 16° als 0°C . Bij het experiment van 16°C moet nog opgemerkt worden dat de beluchting pas vanaf de elfde dag optimaal was. Uit de figuur blijkt dat de verdamping bij beide temperaturen vrij constant is. Naarmate het oppervlak toeneemt ten opzichte van het volume, bij een dalend waterniveau mag een snellere verdamping verwacht worden. Het zoutgehalte neemt daarentegen toe, waardoor de verdamping afgeremd wordt. Waarschijnlijk heffen deze

verschijnselen elkaars effect op. In tabel I zijn de metingen weergegeven en omgerekend naar een verdamping per dag, waarmee een gemiddelde verdamping en daardoor een gemiddelde hoeveelheid toe te voegen zoet water berekend kan worden. Uit tabel I volgt dat voor het nieuwe zeewateraquarium van 225 m³ inhoud en 161 m² oppervlak bij een gemiddelde temperatuur van 16°C per dag 0,51 ± 0,05 m³ zoet water moet worden toegevoegd en bij een gemiddelde temperatuur van 0°C 0,21 ± 0,04 m³ om het verdampingsverlies te compenseren. Deze waarden komen goed overeen met de door de heer F. de Graaf van het "Artis" aquarium genoemde waarden van ongeveer 2 m³ per week voor 300 m³ zeewater (0,215 m³ per dag voor 225 m³ zeewater).

Het aanvullen van het verdampingsverlies met RIVO kraanwater heeft tot gevolg dat een aantal opgeloste stoffen extra worden toegevoegd. Het is dan de vraag in hoeverre de samenstelling van het zeewater beïnvloed wordt, uitgaande van de gemiddelde samenstelling van het RIVO kraanwater en van het zeewater (beide in tabel II vermeld) rekening houdende met de regelmatige verversing van het zeewater en van een suppletie met kraanwater van 0,4 m³ per dag. Als het zeewater één keer per jaar verversst zou worden, dan zou het bicarbonaat gehalte verdubbeld kunnen zijn. De stijging van het bicarbonaat gehalte blijkt in de praktijk te niet te worden gedaan, door de vorming van nitriet, zodat netto de waterkwaliteit slechts bevorderd wordt met gelijktijdige stabilisering van de pH. (Zie III. De stikstof cyclus in het zeewater-aquarium). Als meest kritische parameter resteert dan calcium. Bij een verversing van 1 keer per jaar neemt het calciumgehalte met ± 20% toe, en bij verversing van 1 keer per 10 jaar verdrievoudt het calciumgehalte, terwijl het kaliumgehalte en het chloridegehalte na 10 jaar pas met respectievelijk 7 en 4% zijn toegenomen.

Conclusie

Ten behoeve van het nieuwe RIVO-zeewateraquarium werd de verdamping van water in een modelsysteem onderzocht onder twee omstandigheden:

1. $t \pm 16^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_2\text{O} \pm 75\%$
2. $t \pm 0^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_2\text{O} \pm 95\%$

Deze omstandigheden moeten vergeleken worden met de praktische situatie in het zeewateraquarium. $t 10-14^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_2\text{O} \pm 90\%$.

Met de beide modelproeven blijkt een redelijke benadering van het praktijksysteem tot stand gebracht te zijn. In beide modelproeven werken de van de praktijk verschillende parameters tegengesteld op het verdampingsproces. Daarom kan de hoeveelheid te suppleren water goed geschat worden met behulp van de hoeveelheden water die verdampt zijn in de modelproeven: 3,2 respectievelijk 1,3 mm/dag. Betrokken op de afmetingen van het zeewateraquarium

betekent dit: respectievelijk 0,5 en 0,2 m³/dag. Door de lage temperatuur in proef 2 lijkt proef 1 de werkelijke toestand te benaderen en kan de hoeveelheid te suppleren water op ongeveer 0,4 m³/dag geschat worden.

Bij aanvulling met RIVO kraanwater moet rekening gehouden worden met een verhoging van het bicarbonaat en het calciumgehalte. Door verversing van het zeewater kan deze verhoging beperkt worden gehouden.

III - DE STIKSTOF CYCLUS IN HET ZEEWATERAQUARIUM

Inleiding

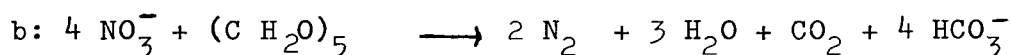
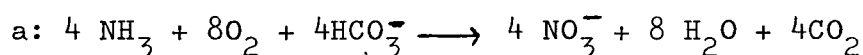
Om aquatische organismen te kunnen houden of kweken is het noodzakelijk dat de kwaliteit van het water, waarin zij leven, goed in de hand gehouden wordt. Vissen en andere aquatische organismen zetten aangeboden voedsel om in ammonium, ureum en organische stoffen, die uitgescheiden worden. Indien het water in het systeem recirculeert moeten deze stoffen aan het systeem onttrokken worden om vervuiling van het water, met uiteindelijk eventueel nadelige effecten, te voorkomen. Zo zijn bijvoorbeeld vrij ammoniak -waarvan de concentratie afhankelijk is van de hoeveelheid totaal ammonium, de temperatuur en de pH- en nitriet, dat een intermediair bij stikstof omzettingen is, al bij lage concentraties toxisch (respectievelijk 0.4 en 1.0 g/m³ N). Het verwijderen van deze stoffen kan op de meest efficiënte wijze geschieden als micro-organismen worden ingeschakeld. In het natuurlijk milieu zijn micro-organismen bij uitstek afbrekers van verontreinigende stoffen. Om deze reden wordt het water, na afvoer uit de aquaria, waar de verontreinigende stoffen zijn uitgescheiden, over biologische filters gevoerd. Deze biologische filters hebben een groot specifiek oppervlak, waardoor de micro-organismen zich in bijzonder hoge aantallen aan het filtermateriaal kunnen hechten. Omdat de biomassa op het filter veel hoger is dan in de waterfase worden de verontreinigende stoffen veel sneller afgebroken en omgezet in het filter. De afbraak van de uitgescheiden organische stoffen (en eventuele resten voedsel) vindt in het filter plaats door oxydatie met behulp van de aanwezige opgeloste zuurstof. Deze afbraak wordt verzorgd door heterotrofe micro-organismen, dat wil zeggen micro-organismen die organische stoffen gebruiken als bron van energie en als bron van koolstof voor de celopbouw. Afbraak van de organische stoffen leidt uiteindelijk tot kooldioxide, water, fosfaat, ammonium en resten organische stoffen. Ureum wordt in het filter gehydrolyseerd tot ammonium en kooldioxide.

Naast de oxydatie van organische stoffen vindt in het filter ook de oxydatie van ammonium naar nitraat, via nitriet plaats. Ook voor deze omzetting is zuurstof vereist. De waterstroom die door het filter gaat, moet dus voldoende zuurstof aanvoeren om de oxydatie van organische stoffen, ammonium en nitriet op gang te houden. Uiteindelijk zijn na biologische zuivering en mechanische reiniging (afvangen van deeltjes boven een bepaalde grootte) alleen fosfaat, nitraat en wat organische stoffen als "verontreinigers" over.

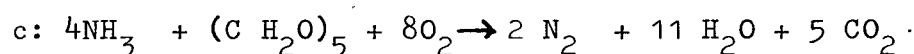
Nitraat en fosfaat samen kunnen, als de lichthoeveelheid niet beperkend is, aanleiding geven tot in het zeewateriaquarium ongewenste fytoplanktonbloei. Fosfaat kan gedeeltelijk verwijderd worden door opname in microben (als P-bron) en verder met magnesium en/of calciumcarbonaat (bijvoorbeeld in een schelpenfilter) gebonden worden, zodat een bepaalde concentratie (+ 6 g/m³ fosfaat) niet overschreden wordt.

Nitraat kan door verschillende microben als stikstofbron gebruikt worden, maar een effectieve verwijdering levert dat niet op. De beste manier om nitraat te verwijderen is gebruik te maken van

een nitraat reductie in een zuurstofarm of zuurstofloos milieu. Bij dit nitraat reductie proces wordt nitraat omgezet in celstikstof en ammonium, maar voornamelijk in moleculaire stikstof, dat kan ontsnappen naar de atmosfeer. Bij dit laatste proces, dat denitrificatie genoemd wordt, treedt een echte verwijdering uit het water op. Deze denitrificatie is juist zeer gewenst, omdat hierdoor tevens de pH van het water gestabiliseerd wordt. Bij de afbraak van organische stoffen, wordt kooldioxyde (CO₂) geproduceerd en ook bij de oxidatie van ammonium, waarbij bicarbonaat (HCO₃⁻) wordt verbruikt, ontstaat CO₂ (a). Deze processen veroorzaken een daling van de pH die na verloop van tijd niet meer met een schelpenfilter te corrigeren is. Bij denitrificatie worden echter op elk gevormd molecuul CO₂ vier moleculen HCO₃⁻ gevormd, met als resultaat een stabilisering van de pH (b).



De oxidatie van ammonium via de reacties a en b betekent tesamen een verwijdering van stikstof en kooldioxyde, die ontwijken naar de lucht (c).



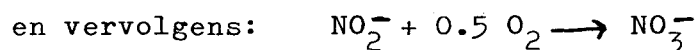
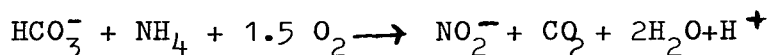
Nitrificatie en denitrificatie

- nitrificatie

Om de kwaliteit van het water te handhaven, is het zeer gewenst dat door de vissen uitgescheiden ammonium omgezet wordt in nitraat en dat dit op z'n beurt weer wordt omgezet in moleculaire stikstof.

Voor de eerste stap van het proces, de nitrificatie, kan bij het zeewateraquarium gebruik gemaakt worden van biologische filters, die na een startfase variërende van 1-2 maanden, een actieve nitrificerende bacterie-populatie opgebouwd hebben. Na een ophoping van ammonium en naderhand nitriet in de beginfase verdwijnen deze twee stoffen al spoedig en treedt netto alleen nog nitraat-vorming op (4,5). Zie figuur 2.

De reacties die hierbij optreden zijn:



Deze reacties worden door twee specifieke groepen organismen verzorgd: respectievelijk Nitrosomonas en Nitrobacter.

Het zijn chemo -autotrofe organismen die hun energie uit chemische omzettingen verkrijgen en CO₂ als koolstofbron gebruiken.

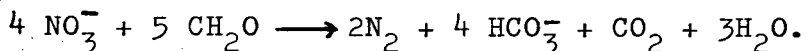
De nitrificatie snelheid is primair afhankelijk van de zuurstof en ammonium concentratie en het aantal nitrificerende organismen. Daarnaast spelen pH en temperatuur een rol. De minimaal vereiste hoeveelheid zuurstof bedraagt 1-2 g/m³. Het aantal nitrificerende organismen dat in aëroob sediment, en in aërobe filters voorkomt is veel groter dan het aantal in de waterfase

- denitrificatie

Als omzetting van nitraat niet optreedt wordt dit opgehoopt. In de praktijk blijkt dat dit niet het geval is. Na verloop van tijd stabiliseert de hoeveelheid nitraat zich op een niveau van 50-100 g/m³ NO₃⁻ - N. Dit wordt veroorzaakt door nitraat reductie in (praktisch) anaërobe gedeelten van het biologische filter, stukken waar de zuurstofgehalten erg laag geworden zijn ten gevolge van de verschillende oxidatie reacties en een toevallig slechte zuurstofvoorziening door het doorstromende zeewater. Voor de nitraat verwijdering bestaan drie mogelijkheden, waarvan denitrificatie tot moleculaire stikstof de voornaamste (30-100%) en de meest gewenste is. Een deel van de nitraat kan in ammonium (0-50%) of celstikstof (0-30%) worden omgezet (7,8).

Balderston en Sieburth (2) pasten denitrificatie van een verontreinigde zeewaterstroom toe in een kolom. Deze methode bleek erg goed te voldoen, maar om niet nogmaals de problemen van een kolom of bijvoorbeeld anaëroob filter te krijgen, wordt door de praktijk een andere oplossing aangedragen. Zowel in zoet als in zout water vindt denitrificatie plaats in het sediment. Men zou dus door het aanbrengen van een kleine laag (+ 10 cm) bodem in een aquarium of reservoir denitrificatie kunnen bevorderen. Het aanbrengen van een zandbodem heeft verder het voordeel van een verlaagde giftigheid van koper in zeewater (11).

Voor denitrificatie is in tegenstelling tot voor nitrificatie een koolstofbron (als elektronen donor) nodig. Bij denitrificatie in een aquarium kunnen als koolstofbron de uitscheidingsprodukten van vissen of de hieruit gevormde organische stoffen gebruikt worden. De totale denitrificatie reactie luidt als volgt:



De omzetting van nitraat tot moleculaire stikstof wordt door diverse, niet specifieke groepen van facultatief anaërobe microben verzorgd, bijvoorbeeld Pseudomonas denitrificans. Uit de reactie volgt dat theoretisch een koolstof-stikstof mol-verhouding van 1.25 vereist is. In de praktijk worden waarden van 2-3 gevonden (2,10). Uitgaande van de gemiddelde samenstelling van visvoer en uitscheidingsprodukten wordt een C/N verhouding van ongeveer 5 berekend. In principe is dus voldoende koolstof voor de denitrificatie reactie aanwezig.

De concentraties nitraat en organische stoffen bepalen samen met het aantal denitrificerende organismen primair de denitrificatie. Ook is de hoeveelheid aanwezig zuurstof van belang voor het wel of niet optreden van denitrificatie. Als meer dan ongeveer 1 g/m^3 zuurstof aanwezig is, treedt dit op als elektronenacceptor, omdat de meeste denitrificerende micro-organismen facultatief anaëroob zijn en treedt denitrificatie dus niet langer op. Secundaire factoren die de snelheid van de denitrificatie beïnvloeden zijn de pH en de temperatuur. Denitrificatiesnelheden die in de praktijk zijn vastgesteld lopen, afhankelijk van de temperatuur van $1-25 \text{ mmol/m}^2 \text{ dag N}$ (6,7,8,12,13).

Als storende factor bij het anaërobe denitrificatie proces kan, vooral bij uitputting van nitraat als elektronenacceptor-bron, sulfaat dat in grote hoeveelheden in zeewater aanwezig is, zich aanbieden als elektronen acceptor. Bij deze sulfaat reductie ontstaat waterstof sulfide (H_2S), dat stankoverlast en toxische effecten kan veroorzaken. Dit proces moet dus voorkomen worden.

Doel van het onderzoek

Het doel van de hier beschreven experimenten was na te gaan of in zout of zoetwaterreservoirs met een bodem van $\pm 10 \text{ cm}$ zand van diverse bronnen, denitrificatie zou optreden en daardoor informatie te verkrijgen over de praktische toepasbaarheid van zandbodems in het nieuwe zeewater-aquarium van het RIVO.

Materiaal en methoden

Experiment 1. In een 6-tal aquariumbakken met ieder een volume van ongeveer 0.035 m^3 werd per tweetal een bodem van $\pm 10 \text{ cm}$ aangebracht bestaande uit: 1. fijn zand, 2. grof zand en 3. middel-grof zand (wadbodem). De bodemmaterialen waren tevoren uitgewassen en gedroogd aan de lucht. Het oppervlak van de bodem was ongeveer 0.12 m^2 . Vervolgens werd geënt met 600 cm^3 faunarijke modderbodem uit een aquarium en tenslotte werd aan elke reeks bodemtypen $\pm 0.015 \text{ m}^3$ zout of zoet water toegevoegd. Het zoetwater was RIVO-leidingwater en het zeewater bestond uit water van het bestaande zeewateraquarium van het RIVO, aangevuld met gedemineraliseerd water tot een zoutgehalte van 32 g/kg was bereikt. Om voldoende zuurstof voor het nitrificatieproces beschikbaar te hebben werden de bakken constant belucht.

De aquariumbakken werden zoveel mogelijk in het donker gehouden, om fytoplanktonbloei te voorkomen, en zijn later zelfs geheel afgedekt met zwart plastic.

De incubatie temperatuur varieerde van $15-17^\circ\text{C}$.

Vanaf het tijdstip $t = 0$ werd afhankelijk van het verloop van de proef diverse keren koolstof- en stikstofverbindingen toegevoegd om de uitscheiding van organische stoffen en stikstofverbindingen na te bootsen. In tabel III is het schema van de doseringen weergegeven. Naast de anorganische stikstofverbindingen NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en KNO_3 werd $\pm 10\%$ van het totaal stikstofin de organische vorm van BrainHeart Infusion Solids toegevoegd. Deze laatste vorm van stikstof kon tijdens de proeven niet geanalyseerd worden, maar werd toegevoegd als component van het koolstofmedium (beschreven in tabel IV), dat ook in andere experimenten gebruikt wordt en representatief wordt geacht voor de samenstelling van organische stoffen in natuurlijk zeewater.

Van tijd tot tijd (gemiddeld om de drie dagen) werden watermonsters genomen en geanalyseerd op de volgende parameters: nitriet, nitraat, ammonium, organisch en anorganisch koolstof.

Experiment 2.

In een fles, met een totaal volume van $\pm 7 \text{ dm}^3$ werd een bodem met een actieve denitrificerende microben populatie uit het eerste experiment aangebracht van 1 dm^3 ($\sim 2 \text{ kg}$ nat gewicht). 4 dm^3 zeewater (met een zoutgehalte van 32 g/kg) werd toegevoegd en het vat werd luchtdicht afgesloten. Heliumgas werd doorgeborreld om het geheel anaëroob te maken. Vervolgens werd 3 g KNO_3 opgelost in 100 ml Cmedium toegevoegd en na $\pm 15 \text{ min.}$ werden $t = 0$ gas- en watermonsters genomen.

Het vat werd verder in het donker geïncubeerd bij een temperatuur van $\pm 20^\circ \text{C}$. Elke dag werden gas- en watermonsters genomen. De watermonsters werden met HCl gefixeerd. De gasmonsters werden op stikstof (N_2), zuurstof (O_2), stikstofmonoxide (NO) lachgas (N_2O), methaan (CH_4) en kooldioxide (CO_2), geanalyseerd en de watermonsters behalve op deze gassen ook op nitraat, nitriet, ammonium en anorganisch en organisch koolstof.

Experiment 3.

Om een schatting te krijgen van de "in-situ" denitrificatiesnelheid werd een proef in een modelsysteem van de watervoorraadkelders gedaan. Het modelsysteem staat beschreven in het eerste deel van dit verslag over de verdamping (pag. 4). Onderin de pijp werd een bodem met een actieve denitrificerende microbenpopulatie aangebracht afkomstig uit het eerste experiment. De pijp werd verder gevuld met zeewater (zoutgehalte 32 g/kg) tot een hoogte van $1,40 \text{ m}$. In de eerste fase van het experiment werd continu $100 \text{ cm}^3/\text{dag}$ toegevoerd van een oplossing van 2.29 kg/m^3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ met $0.1 \text{ m}^3/\text{m}^3$ C-medium (tabel IV). Dit kwam overeen met 48 mg/dag N en 175 mg/dag C . In de tweede fase werd continu $100 \text{ cm}^3/\text{dag}$ toegevoerd van een oplossing van 2.9 kg/m^3 KNO_3 met $0.1 \text{ m}^3/\text{m}^3$ C-medium, in het totaal overeenkomend met 40 mg/dag N en 175 mg/dag C .

Van tijd tot tijd werden watermonsters genomen en geanalyseerd op ammonium, nitraat, nitriet en organisch en anorganisch koolstof.

Analyses

Organisch en anorganisch koolstof werden bepaald met de Beckman Total Organic Carbon Analyser 915-A. Nitriet, nitraat en ammonium werden bepaald met de Hach-testkits, die gebaseerd zijn op colorimetrische analyses met gebruikmaking van een kleurenschijf. De nauwkeurigheid van al deze analyses is afhankelijk van de concentraties van de stoffen, maar ligt bij niet al te lage concentraties rond de 10%. Bij de laatste proef in een gesloten systeem (exp. 2) werden de nitraat- en nitrietconcentraties bepaald met behulp van de Technicon auto-analyzer via een kleurreactie van nitriet met sulfanilamide en N-1-naftylethyleendiamine in een zuur gebufferd milieu. Nitraat wordt bij deze methode eerst omgezet in nitriet door reductie in een Cd/Cu-kolom (1).

Af en toe werd de afwezigheid van H_2S gecontroleerd met behulp van een Hach test.

De andere gassen werden bepaald met behulp van een Packard Becker type 417 gaschromatograaf met TCD detector. De kolom voor de analyse van N_2 , O_2 , CH_4 en NO was een roestvrijstalen kolom, gepakt met Molesieves 5A, lengte 1 m, i.d. $1/8''$, kolomtemperatuur $40^\circ C$, gassnelheid 20 ml/min He (14). Voor de analyse van N_2O en CO_2 werd een roestvrijstalen kolom gepakt met Porapak Q 100-120 mesh gebruikt. Lengte 2m, i.d. $1/8''$, kolomtemperatuur $50^\circ C$, gassnelheid 15 ml/min He(9).

Resultaten

Experiment 1

Omdat nauwelijks verschil optrad tussen de verschillende bodemtypes, zijn de analyse resultaten van de zout en de zoetwaterbakken gemiddeld en als zodanig weergegeven in de figuren 3 t/m 5. De tijden waarop bepaalde doseringen geschieden zijn met pijlen voor C(koolstof) en N(stikstof) aangegeven.

In de figuren 3A en 3B is de aanloopfase weergegeven van zowel nitrificatie als denitrificatie. Na een periode van ongeveer 10 dagen in het zoete water en van ongeveer 20 dagen in het zeewater begon de ammoniumconcentratie af te nemen, duidend op een actieve nitrificerende microbenpopulatie. De nitrificatie vond in dit geval in de waterfase en misschien in de toplaag van het sediment plaats. Actieve nitrificatie betekende tevens een stijging in nitriet en nitraat concentraties. Bijzonder duidelijk was de snelle afname van organisch koolstof ten gevolge van de afbraak door aërobe organismen in de waterfase en in de aërobe delen van het sediment.

De juiste reden van het optreden van de hoge nitraat- en daardoor hoge totaal anorganisch stikstof pieken na ongeveer 1 maand is nog niet gevonden. Misschien is de produktie van nitraat uit organische stikstofverbindingen in het sediment hiervoor verantwoordelijk geweest.

Na 30 dagen begon de hoeveelheid totaal anorganisch stikstof af te nemen: nitrificatie en denitrificatie leken toen goed te lopen. De nitraatgehalten bleven tot zo'n 4 maanden na het begin van de experimenten hoog. Waarschijnlijk was de koolstofdosering in het begin te laag om de denitrificatie echt goed op gang te brengen. Na die tijd werden de nitraatgehalten steeds lager.

In het tweede deel van de experimenten werd veel vaker koolstof gedoseerd. Dit bleek aanleiding te geven tot een snellere afname van het totaal anorganisch stikstofgehalte (zie de figuren 4A, 4B, 5A en 5B).

Uit de doseringen van ammonium als enige stikstof bron bleek dat dit snel omgezet werd naar nitriet en nitraat, en ook het nitriet verdween vrij snel. De nitrificatie verliep dus goed. Aan het einde van de proef bleken de zuurstofgehalten in de bakken tussen 7 en 8 $g/m^3 O_2$ te liggen. Hetgeen ruim voldoende was voor een goede nitrificatie. De nitrificatiesnelheid kan geschat worden uit de maximale hellingen van de afname in de ammoniumconcentraties. Gemiddeld werd voor zowel zout als zoet water een waarde van $7 \pm 2 g/m^3 N$ per dag berekend. Niet als directe maat voor de denitrificatie, maar meer als globale indruk kan de denitrificatiesnelheid geschat worden aan de hand van de snelheid van het verdwijnen van het totaal anorganisch stikstof. Hierbij wordt aangenomen dat de opname als celstikstof te verlossen is. Denitrificatie vindt in het bovenste deel van de bodem plaats. De geschatte denitrificatiesnelheid moet daarom omgerekend worden van de waterfase naar het sediment en vervolgens naar het sedimentoppervlak. Voor de globale denitrificatiesnelheid werd voor zowel zoet als zeewater een waarde berekend van $40 \pm 20 mmol/m^2 dag N$.

Om na te gaan of sulfaatreductie opgetreden was en waterstofsulfide (H_2S) in de waterfase aanwezig was, werd een aantal keren het H_2S gehalte bepaald. H_2S kon nooit worden aangetoond.

Experiment 2

In het gesloten systeem werd de vorming van moleculaire stikstof aangetoond. Dit wordt in de figuren 6A en B geïllustreerd. Naast moleculaire stikstof kon de vorming van distikstofoxide en stikstofmonoxide aangetoond worden.

De stikstofbalans over de anorganische stikstofverbindingen bleek redelijk te kloppen (fig. 6A). De koolstofbalans bestaande uit kooldioxide in de gasfase en anorganisch en organisch koolstof in de waterfase klopt ook goed (fig. 6B).

Beide balansen zijn gecorrigeerd voor de monsternamen.

De produktie van CO_2 en de mineralisatie van organische stof begint direct, terwijl de denitrificatie wat later op gang komt.

Experiment 3

In de eerste fase van het derde experiment wees een langzame opbouw van het ammonium en het nitraatgehalte tesamen met een opbouw van het opgeloste organisch koolstof tot een stabiel laag gehalte op een mineralisatie van het toegevoegde organische materiaal. In de tweede fase trad een langzame afname van de hoeveelheid ammonium op ten gevolge van nitrificatie. De opgeloste organische koolstof gedroeg zich stabiel. Voor de nitraatgehalten werd een bijzonder variabel beeld verkregen. Van nitriet vond af en toe een accumulatie plaats, waarschijnlijk ten gevolge van actieve nitrificatie en denitrificatie.

Conclusies en discussie

Uit de gegevens van het eerste experiment kon direct geconcludeerd worden dat verschillen tussen de drie verschillende bodemtypen niet optraden. Na verloop van tijd bleek het verschil tussen zout en zoet water weg te vallen en waren de verkregen gegevens volkomen vergelijkbaar.

Na een startperiode van ongeveer 25 dagen was de nitrificatie goed op gang gekomen en bedroeg de snelheid $7 \text{ g/m}^3 \text{ dag N}$ ofwel 70 mg/dag N (als ook het sediment een rol gespeeld heeft in de nitrificatie). Bij de nitrificatie wordt nitriet als intermediair produkt gevormd. De aanwezigheid van nitriet kan echter gezien de toxiciteit beter worden voorkomen. Tijdens het experiment vond de dosering discontinu plaats terwijl onder normale omstandigheden een continue lage dosering plaatsvindt. Dit zal zeker een veel lager nitrietgehalte tot gevolg hebben. Verder trad de nitrificatie hier in de waterfase en de bovenste laag van het sediment op, terwijl deze bij het zeewater-aquarium voornamelijk in de biologische filters zal plaatsvinden. Hetgeen waarschijnlijk veel efficiënter zal geschieden omdat in het filter veel meer nitrificerende organismen aanwezig zijn. Pas na een vrij lange en gecompliceerde aanlooptijd van 3-4 maanden begon het anorganisch stikstof grotendeels te verdwijnen. Deze lange aanloopfase is waarschijnlijk te wijten geweest aan te lage koolstof-doseringen. De tweede fase van het onderzoek gaf bij meer koolstof-doseringen een sneller afname van het anorganisch

stikstof te zien. Nitraat dat geproduceerd werd door nitrificerende microben, werd ook weer omgezet. De totaal anorganisch stikstofcurve gaf steeds een afname van $100-150 \text{ g/m}^3 \text{ N}$ naar $< 10 \text{ g/m}^3$ te zien. De snelheid waarmee het totaal anorganisch stikstofgehalte afnam is genomen als maat voor de denitrificatie en kon op $40 \text{ mmol/m}^2\text{dag N}$ ofwel 5 mmol/dag N geschat worden. Deze waarde ligt iets boven de literatuurwaarden die van $1-25 \text{ mmol/m}^2 \text{ dag N}$ uiteenlopen (6,7,8,12,13), maar in dezelfde orde van grootte. Wellicht is dit een gevolg van hogere nitraatconcentraties, die een hogere denitrificatie snelheid veroorzaken en van de gemiddeld wat hogere temperatuur. Opmerkelijk is dat de verdwijnsnelheid van totaal stikstof gemiddeld gelijk is aan de nitrificatiesnelheid. De nitrificatie vormde in deze experimenten dus de snelheidsbeperkende stap waarbij gevormd nitraat vrijwel direct omgezet werd. Bij gebruik maken van efficiëntere nitrificatie in biologische filters zal de denitrificatie mogelijk ook sneller verlopen.

In de tweede fase van de experimenten, tijdens de proeven in gesloten vaten kon denitrificatie, in de betekenis van omzetting van nitraat in moleculaire stikstof aangetoon worden. Naast moleculaire stikstof werden distikstofoxide (N_2O) en stikstofmonoxide (NO) als intermediaire produkten aangetoond. De stikstof-en koolstofbalans kloppen beide redelijk. De mol verhouding organisch koolstof geconsumeerd tegen stikstof geproduceerd is ongeveer 1.2 overeenkomend met de theoretische waarde van 1.25 die volgt uit de volledige denitrificatie reactie. In de praktijk worden altijd hogere verhoudingen gevonden: 2-3 voor C/N(2,10). Het is mogelijk dat ook organisch materiaal in de bodem tijdens de experimenten een rol gespeeld heeft, maar dat is niet vastgesteld.

Tijdens de denitrificatie proeven van experimenten 1 en 2 kon geen waterstofsulfide in de waterfase worden aangetoond. Dit betekent niet dat sulfaatreductie niet opgetreden is, want het is mogelijk dat dieper in het bodemmateriaal gevormd H_2S in de top-lagen van het sediment en aan het oppervlak sediment-water weer geoxideerd is.

De nitraatgehalten van experiment 3 waren te variabel om hieruit "in situ" kinetiekgegevens te kunnen berekenen. Duidelijk werd wel dat nitrificatie optreedt in de waterfase, en dat de afbraak van organisch materiaal uitstekend verloopt. Nitriet accumulatie treedt slechts op bij het op gang komen van de nitrificatie en de denitrificatie.

De anorganisch stikstof gehalten blijken op den duur onder de totaal toegevoerde hoeveelheid N te blijven. Verwacht wordt dat omzetting van stikstof naar moleculaire stikstof of opname voor de celbouw dit veroorzaakt.

Denitrificatie in de zin van omzetting naar moleculaire stikstof kan in het zeewater aquarium plaatsvinden. Hiervoor is slechts een zandbodem van ongeveer 10 cm nodig. De bodem zal wel wat tijd nodig hebben om een actieve denitrificatie te bereiken. Een nadeel van de aanloopfase zou een wat te hoog oplopend nitrietgehalte kunnen zijn.

Open blijft de vraag hoe de kinetiek zal zijn van de denitrificatie onder de omstandigheden in de zeewater-aquarium voorraadkelders. De denitrificatie snelheid zal in de praktijk beslist lager zijn dan die gevonden werd in het eerste fase experiment, als gevolg van de lagere temperatuur, de lagere nitraatconcentraties en het relatief kleinere oppervlak.

Wat betreft de nitrificatie kan men aannemen dat deze in de biologische filters beter zal verlopen en niet langer de snelheidsbeperkende stap zal vormen zoals in de eerste fase experimenten het geval was.

IV - LIJST VAN GERAADPLEEGDE LITERATUUR

1. - F.A.J. Armstrong, C.R. Sterns en J.D.H. Strickland, 1967.
The measurement of upwelling and subsequent biological processes by means of the Technicon Auto Analyser and associated equipment. Deep Sea Res. 14 381-389.
2. - W.L. Balderston en J. McN. Sieburth, 1976.
Nitrate removal in closed-system aquaculture by columnar denitrification.
Appl. Env. Microb. 32(6), 808-818.
3. - A.N. Borghouts, 1970.
Warmteleer en Kinetische Gastheorie.
DUM NV Delft.
4. - M.T. Collins, J.B. Gratzek, E.B. Sholts jr., D.L. Dawe, L.M. Campbell en D.R. Senn, 1975.
Nitrification in an aquatic recirculating system.
J. Fish.Res. Board. Can. 32 (11), 2025-2031.
5. - K. Hirayama, 1974.
Water control by filtration in closed culture systems.
Aquaculture, 4(4), 369-385.
6. - J.F. van Kessel, 1976.
Influence of denitrification in aquatic sediments on the nitrogen content of natural waters.
Proefschrift LH Wageningen.
7. - I. Koike en A. Hattori, 1978.
Denitrification and ammonia formation in anaerobic coastal sediments.
Appl. Env. Microb. 35 (2), 278-282.
8. - I. Koike en A. Hattori, 1978.
Simultaneous determinations of nitrification and nitrate reduction in coastal sediments by a ¹⁵N Dilution technique.
Appl. Env. Microb. 35(5), 853-857.
9. - R. Mindrup, 1978.
The analysis of gases and light hydrocarbons by gas chromatography.
J. Chrom. Sci. 16, 380-389.
10. - W.J. Payne, 1973.
Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms.
Bact. Rev. 37(4), 409-452.
11. - C.E. Pesch, 1979.
Influence of three sediment types on copper toxicity to the polychaete Neanthes areanaceodontata.
Marine Biology, 52, 237-245.

12. - J. Sørensen, 1978.
Capacity for denitrification and reduction of nitrate to ammonia in a coastal marine sediment.
Appl. Env. Microb. 35(2), 301-305.
13. - J. Sørensen, 1978.
Denitrification rates in a marine sediment as measured by the acetylene inhibition technique.
Appl. Env. Microb. 36(1), 139-143.
14. - E. Sutter, 1971. Bestimmung von gelösten Sauerstoff und Stickstoff in Wasser mittels Gaschromatographie.
Schweiz. Zeitschr. für Hydrol. 33(1), 117-120.
15. - Programma van eisen voor zeewater aquaria installaties.
nr. 4/2.9.1976.

TABEL I - RESULTATEN VAN DE VERDAMPINGSEXPERIMENTEN.

1A. Temperatuur 15-17°C.

aantal dagen		stand mm		verdamping/dag
cumulatief	verschil	cumulatief	verschil	in mm/dag
0	0	0	0	
5	5	12	12	2,40 *
11	6	20	8	1,33 *
16	5	35	15	3,00
25	9	61	26	2,89
34	9	91	30	3,33
41	7	113	22	3,14
46	5	130	17	3,40
55	9	162	32	3,56
61	6	181	19	3,17
67	6	197	16	2,67
76	9	229	32	3,56
81	5	245	16	3,20

* niet meegenomen in berekening
gemiddelde verdamping

gemiddelde
verdamping =
3,19 ± 0,29 mm/dag.

1B. Temperatuur 0°C.

aantal dagen		stand mm		verdamping/dag
cumulatief	verschil	cumulatief	verschil	in mm/dag
0	0	0	0	
9	9	11	11	1.22
31	22	44	33	1.50
44	13	66	22	1.69
57	13	78	12	0.92
85	28	110	32	1.14
106	21	137	27	1.29
114	8	149	12	1.50

gemiddelde
verdamping =
1,32 ± 0,26 mm/dag.

TABEL II - GEMIDDELDE SAMENSTELLING VAN RIVO KRAANWATER EN ZEEWATER MET EEN ZOUTGEHALTE VAN 32 g/kg VOOR EEN AANTAL COMPONENTEN.

component	Concentraties in mg/l	
	RIVO-kraanwater	zeewater
Ca ²⁺	110	387
Mg ²⁺	10	1212
Na ⁺	60	10103
K ⁺	4	363
Cl ⁻	116	18167
SO ₄ ²⁻	12	2542
HCO ₃ ⁻	330	133

TABEL III - SCHEMA VAN DE DOSERINGEN TIJDENS DE STIKSTOF-CYLCUS PROEF MET DE AQUARIUMBAKKEN.
TOEGEVOEGD AAN ± 0,015 m³ WATER/BAK.

dag nr.	mg.C.	mg N-NO ₃ ⁻	mg N-NH ₄ ⁺
0	2625	340	750
53	2625		
94	2625	340	750
124	2625		
139	2625	340	750
145	2625		
153	2625		
168	2625		
195	2625	340	750
216	2625		
227	2625	340	750
238	2625		
242			795
250	2625		
255			795
280	2625	105	
298	2625	105	
304		1050	

TABEL IV - SAMENSTELLING VAN HET KOOLSTOF-MEDIUM DAT BIJ
DE DOSERINGEN GEBRUIKT WERD.

	kg/m ³
glucose	10.0
lactose	8.0
sucrose	6.0
xylose	5.0
inositol	1.0
Na-capronaat	1.0
Na-acetaat	1.0
citroenzuur	1.0
glycerol	0.2
glycol	0.1
Brain heart infusion solids	8.0
micromediumorganische stoffen	10 cm ³ met <u>±</u> 80 mg C.

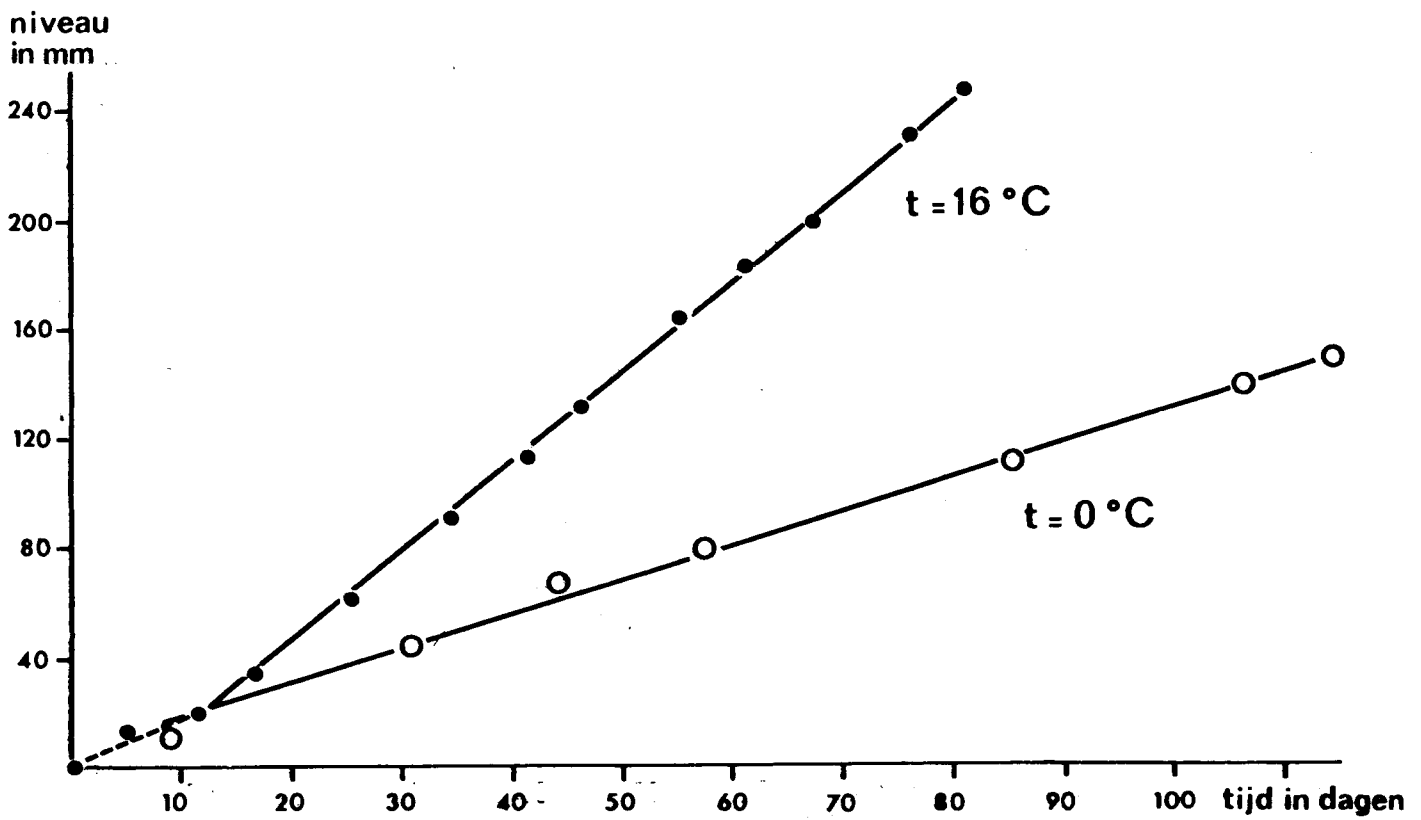


fig.1. Verdamping als functie van de tijd.

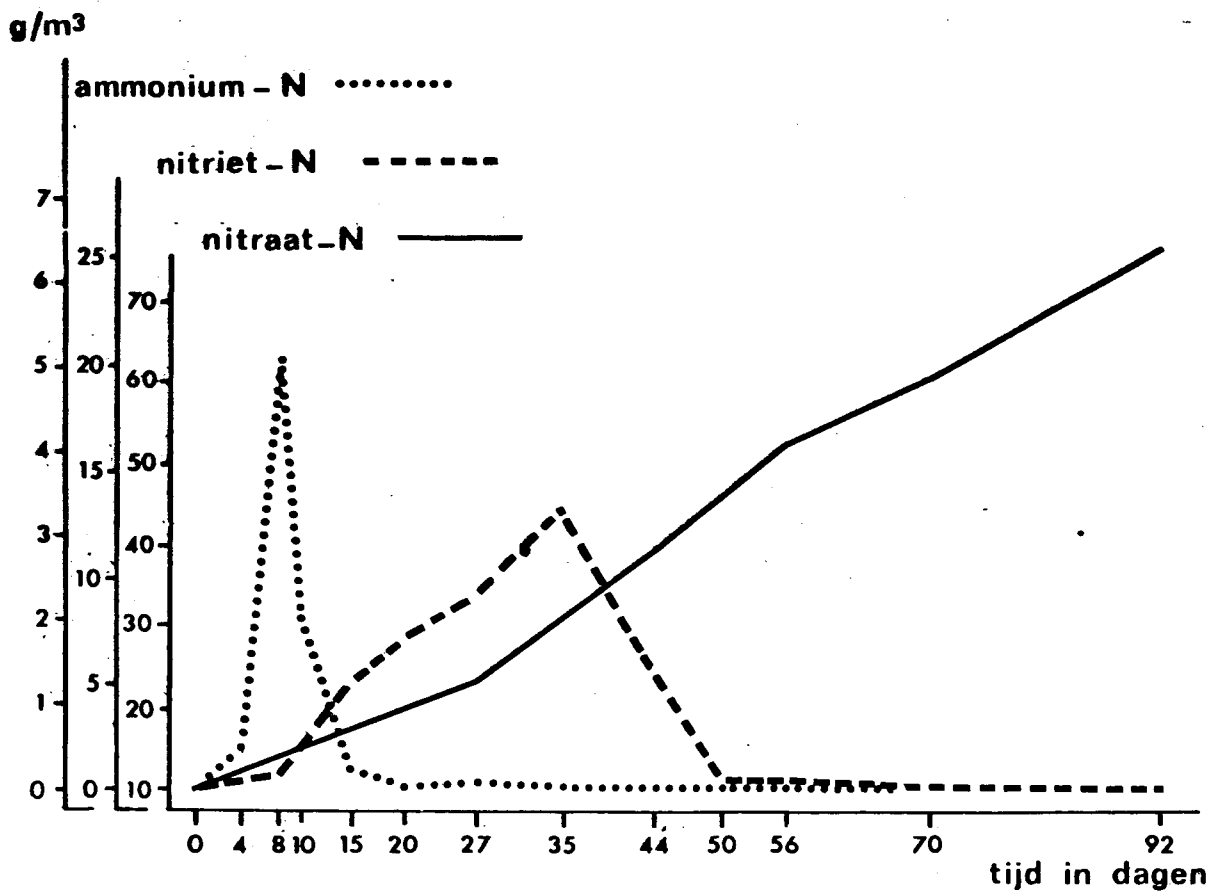


fig.2. Stikstof omzettingen in een biologisch filter (HIRAYAMA, 1974).

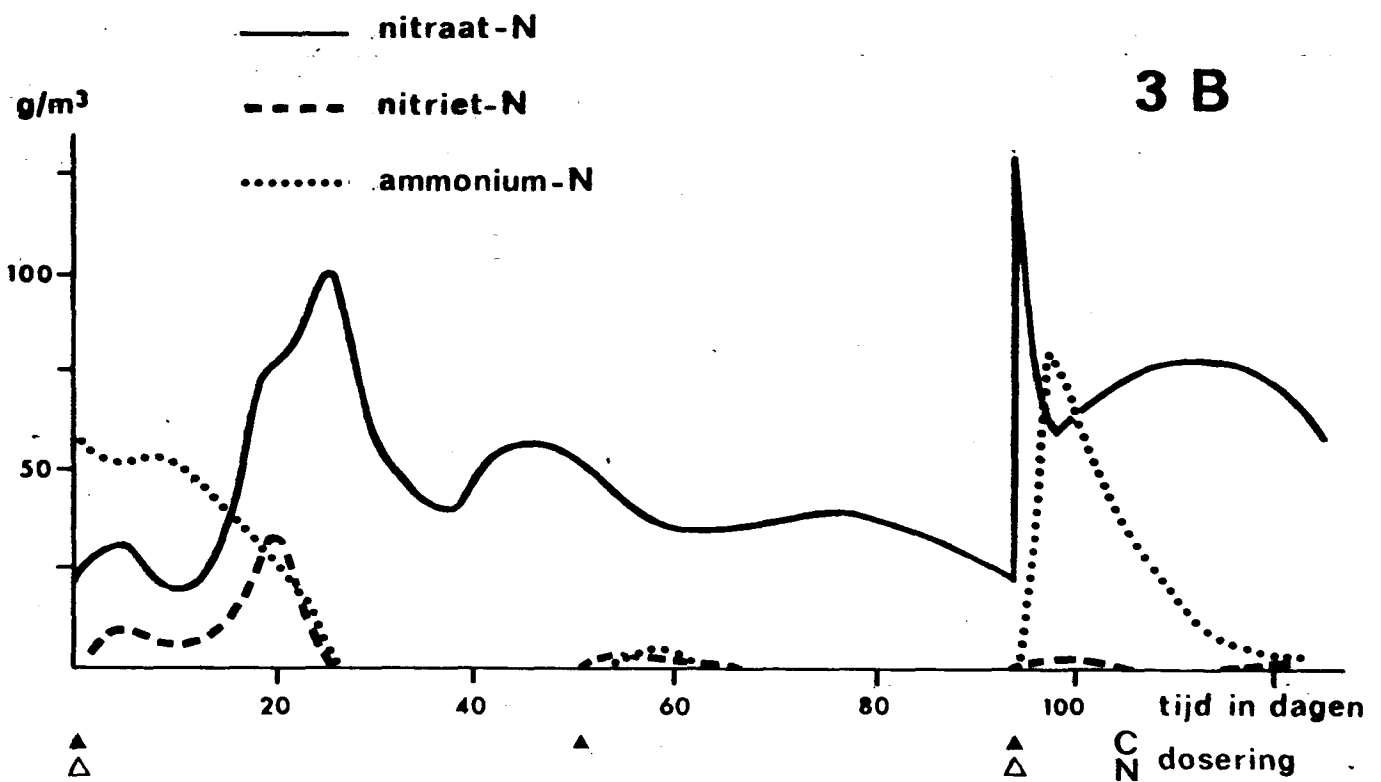
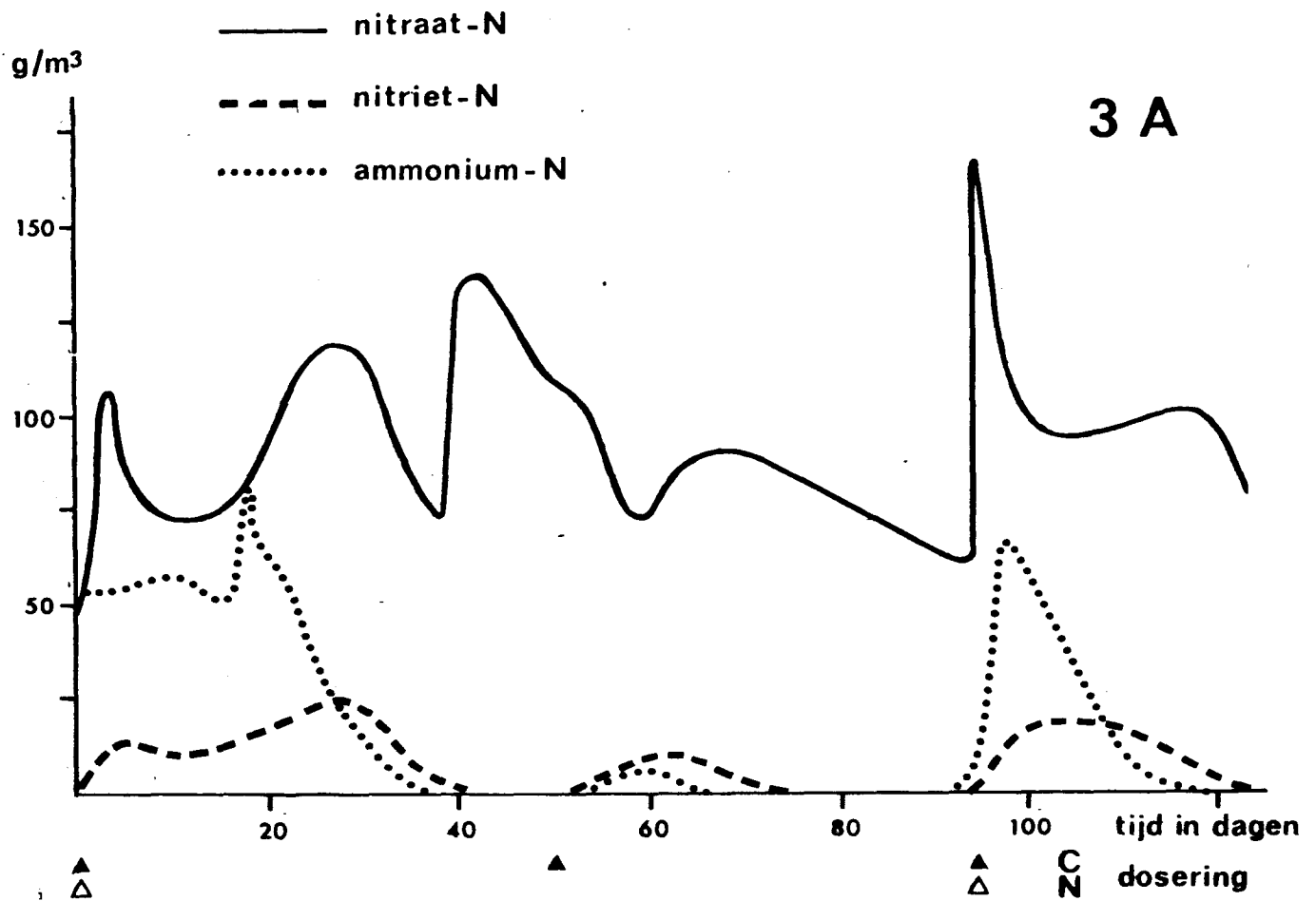


fig. 3, exp. 1, fase I. Gedrag van anorg. stikstof in een gedoseerd zeewater (3A) en zoetwater (3B) systeem.

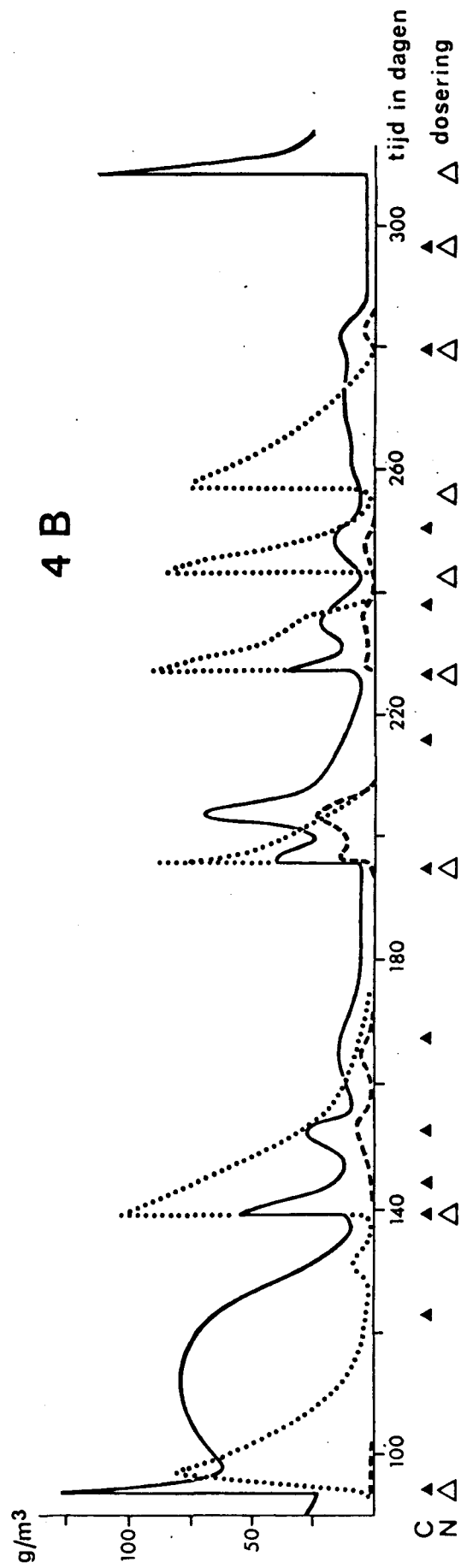
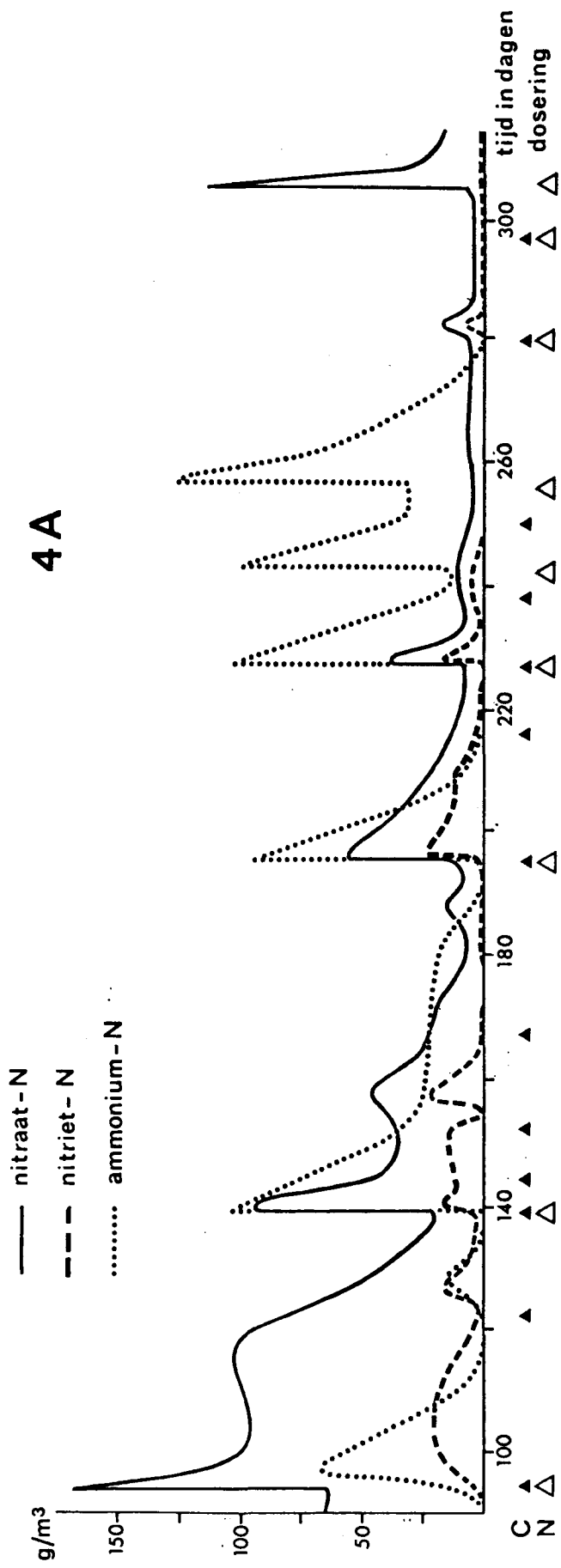


fig. 4, exp. 1, fase II. Gedrag van anorg. stikstof in een gedoseerd zeewater (4A) en zoetwater (4B) systeem.

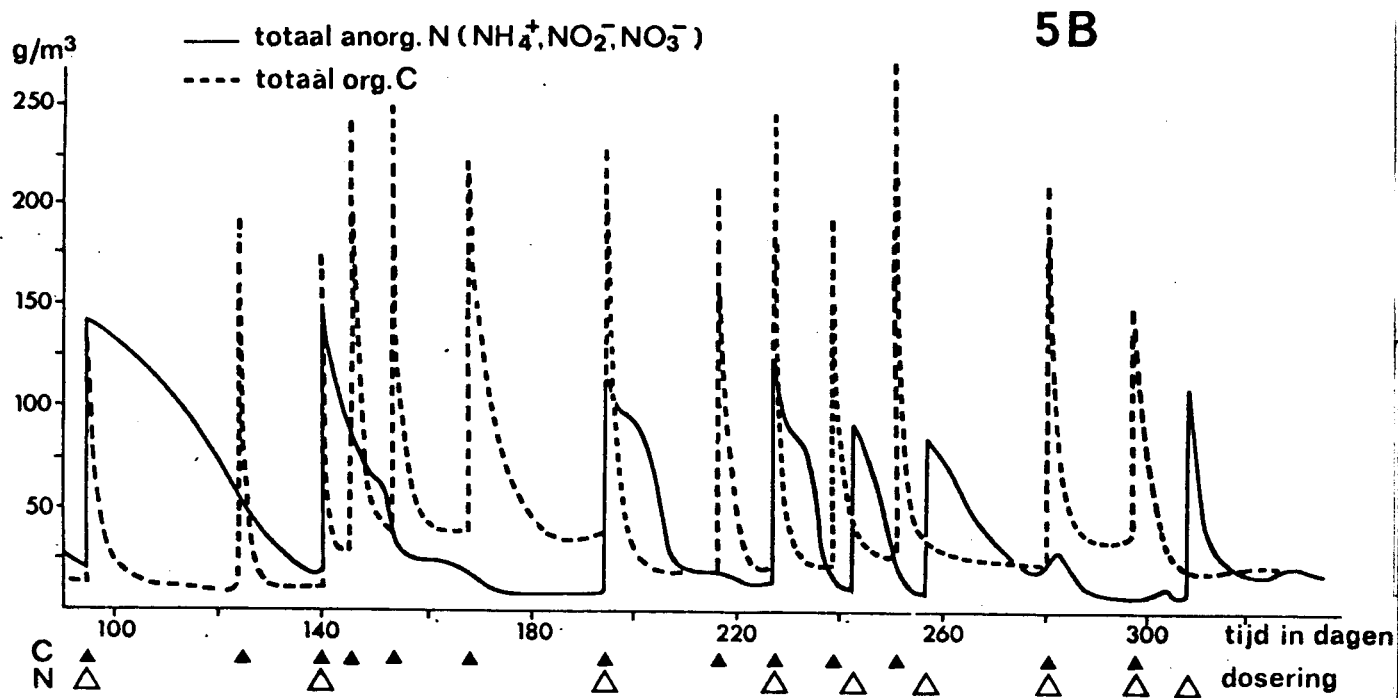
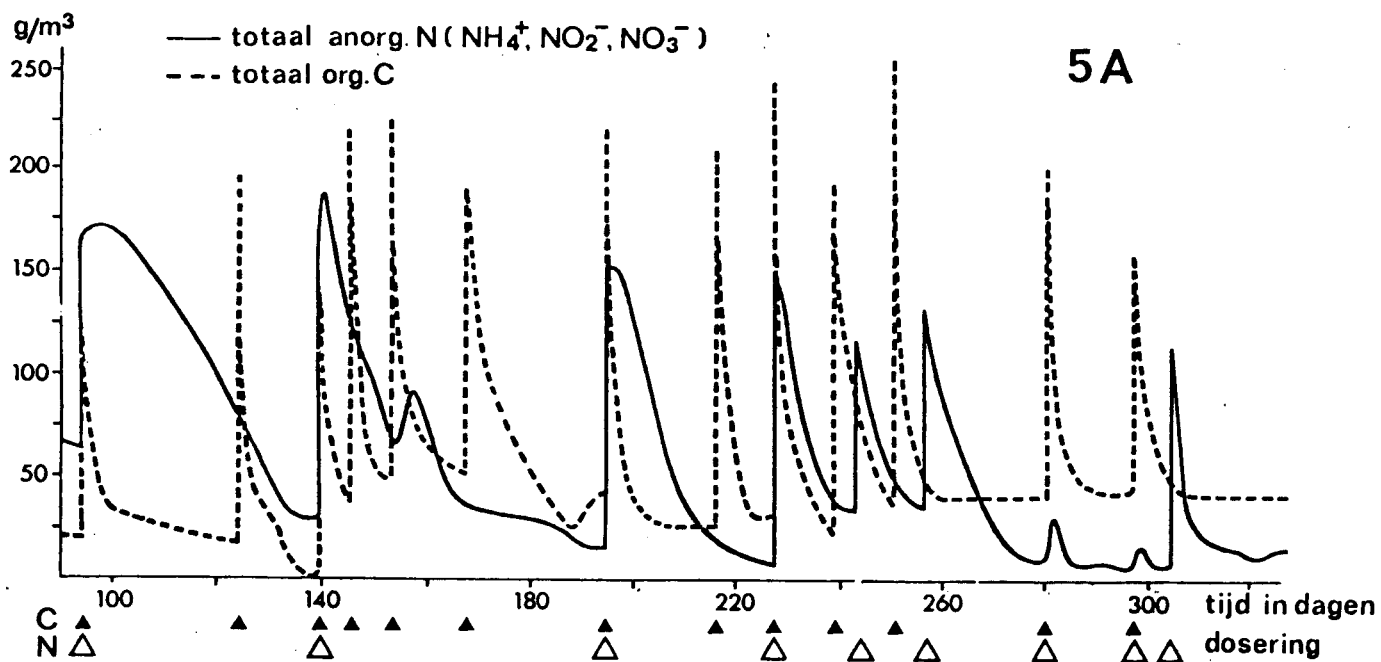


fig.5 exp. 1, fase II. Gedrag van totaal anorg. stikstof en organisch koolstof in een gedoseerd zeewater (5A) en zoetwater (5B) systeem.

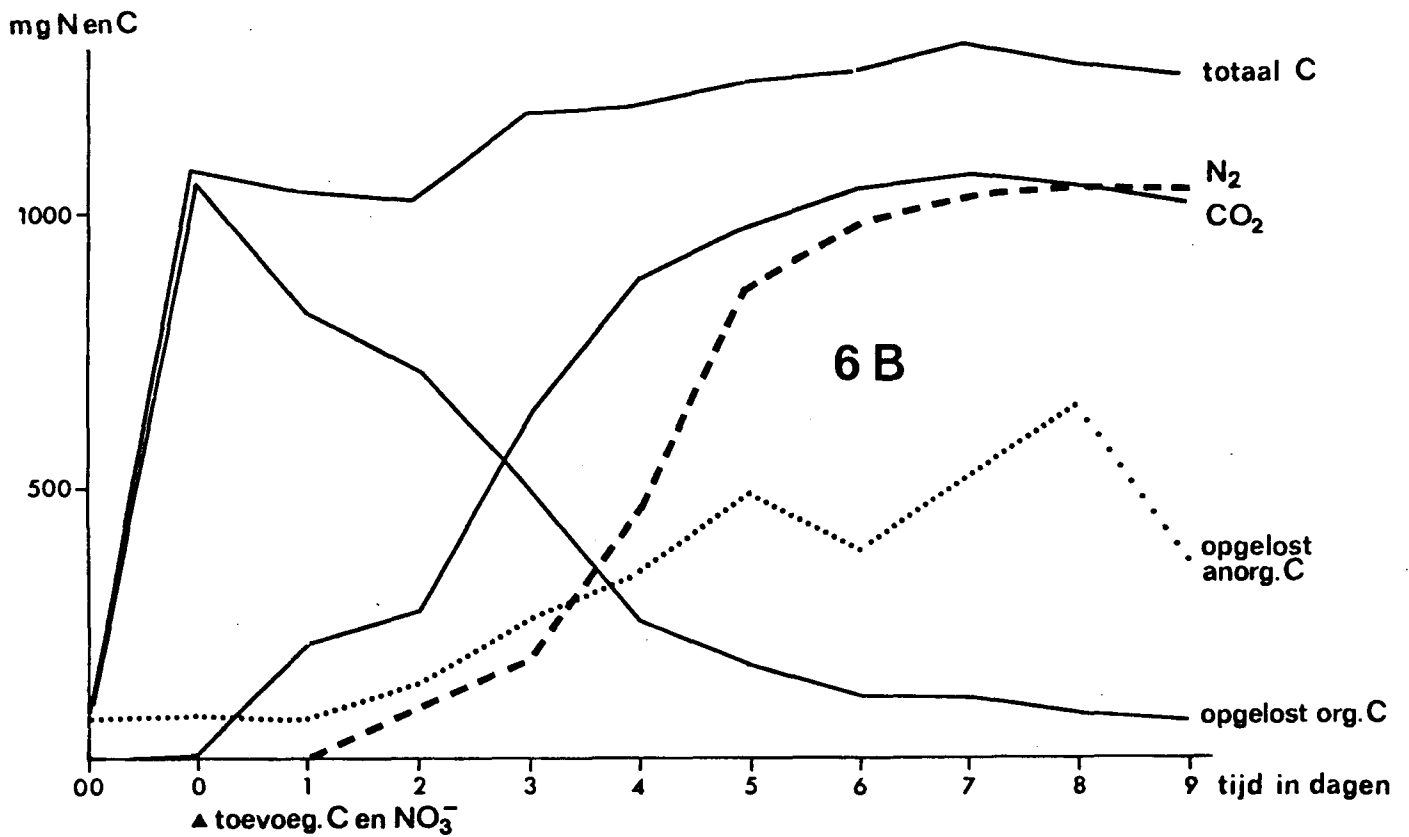
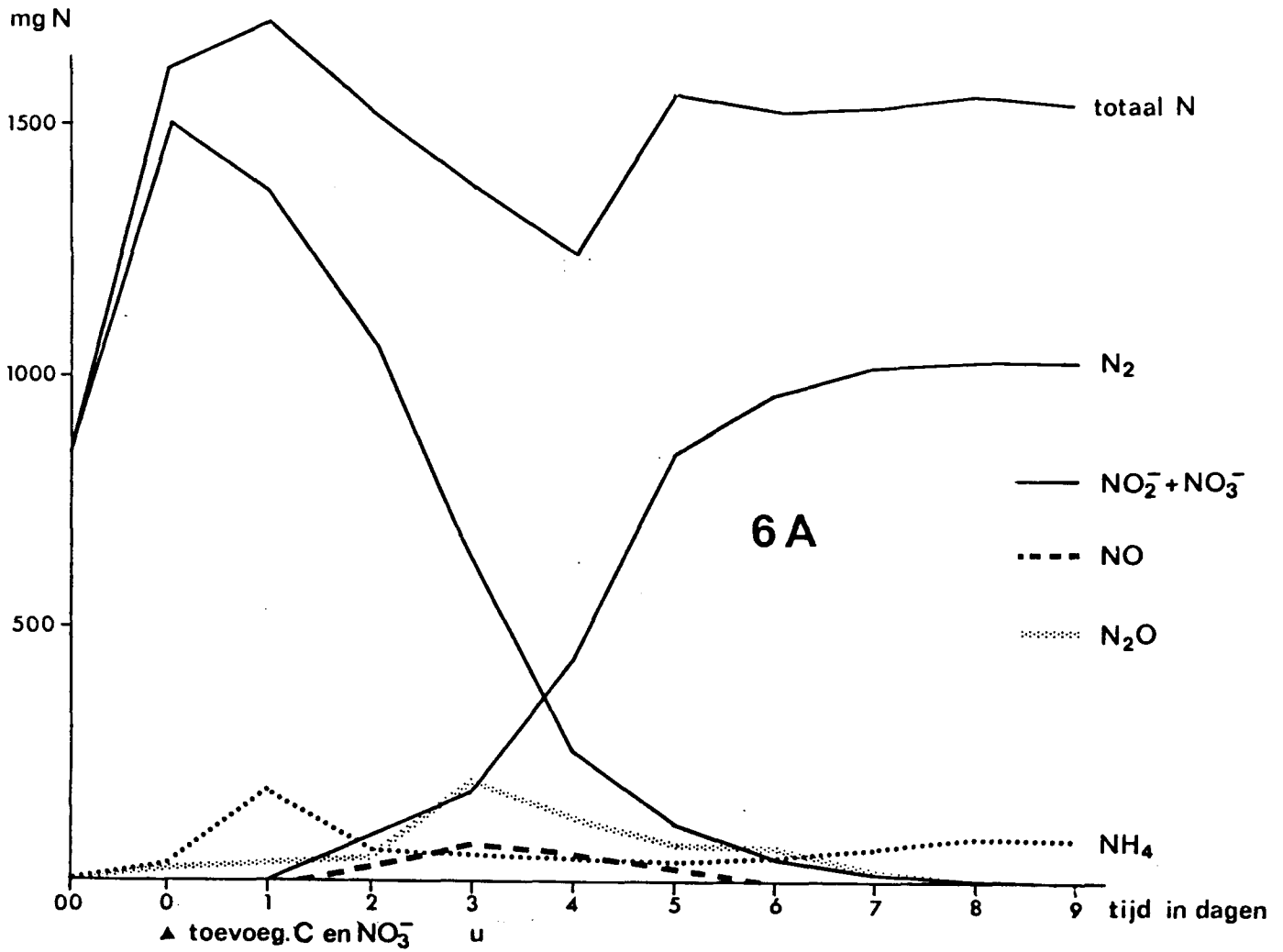


fig.6, exp.2. DENITRIFICATIE in een gesloten systeem, gedrag van anorg. stikstof (6A) en koolstof (6B) verbindingen.