

ad 9865
06 SEP 1982

Rapport nr. : MD-N&E 82/7
Opdracht nr.: 36420
Datum : 1982-08-16

HET GEBRUIK VAN DE CHEMOSTAAT
IN AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK

Ir J.F. de Kreuk



postbus 217
2600 AE delft

bezoekadres
schoemakerstraat 97

telex 38071 zptno
telefoon 015 - 56 93 30

Opdrachtgever:

Rijkswaterstaat
Directie Noordzee
Postbus 5807
2280 HV Rijswijk (ZH)

„Niets uit deze uitgave mag worden
vermenigdvuldigd en/of openbaar
gemaakt door middel van druk, foto-
copie, microfilm of op welke andere
wijze dan ook, zonder voorafgaande
toestemming van TNO.”

Indien dit rapport in opdracht werd
uitgebracht, wordt voor de rechten
en verplichtingen van opdracht-
gever en opdrachtnemer verwezen
naar de „Algemene Voorwaarden
voor Onderzoeks- en ontwikke-
lingsopdrachten aan TNO, 1979”
dan wel de desbetreffende terzake
tussen partijen gesloten overeen-
komst.

<u>INHOUD</u>	Blz.
SAMENVATTING	2
1. INLEIDING	3
2. DE CHEMOSTAAT	4
3. HET GEBRUIK VAN DE CHEMOSTAAT VOOR HET AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK	10
4. ONDERZOEK NAAR DE AFBRAAK VAN 4-CHLOORFENOL, 2,4-DICHLOORFENOL EN 4-NITROFENOL	13
4.1 Methode	13
4.2 Resultaten	14
4.2.1 4-Chloorfenol (4-CP)	14
4.2.2 2,4-Dichloorfenol (2,4-DCP)	15
4.2.3 4-Nitrofenol (4-NP)	16
5. CONCLUSIES	19
6. LIJST VAN GEBRUIKTE SYMBOLEN	20
7. LITERATUUR	21

SAMENVATTING

Parallel aan de zakkenproef met modelecosystemen (m.e.s.) experimenten (augustus/september 1980) werden chemostaatproeven uitgevoerd met de modelstoffen 4-chloorfenol (4-CP), 2,4-dichloorfenol (2,4-DCP) en 4-nitrofenol (4-NP). Er werden twee concentraties per stof getoetst (1 en 10 mg.l^{-1}). De chemostaten werden geënt met water uit de m.e.s. De afbraak van 4-CP verliep in de chemostaat even snel als in de m.e.s. De afbraak van 2,4-DCP kwam in de chemostaten pas na herenten op gang, terwijl 2,4-DCP al in de m.e.s. afbrak. De afbraak van 4-NP kwam in de chemostaat, evenals in het m.e.s., zeer langzaam op gang (concentratie 1 mg.l^{-1}).

Naast de beschrijving van de resultaten bevat het rapport een algemene beschouwing over het gebruik van de chemostaat.

1. INLEIDING

In het kader van het project "Noordzee en Estuaria" ten behoeve van Directie Noordzee van Rijkswaterstaat zijn enkele methoden onderzocht op hun bruikbaarheid voor de bepaling van de afbreekbaarheid van diverse (afval)stoffen.

De methoden zijn zo gekozen dat zij zoveel mogelijk zijn te vergelijken met het afbraakproces door micro-organismen in open zee. Gekozen werd o.a. voor een methode met een chemostaat. Deze werkt, afhankelijk van de toetsomstandigheden, bij lage concentraties te toetsen stof (substraat) en biomassa, zoals deze ook in zee voorkomen. Omdat de ontwikkeling van de methode bij dit onderzoek centraal heeft gestaan zal achtereenvolgens op de volgende onderwerpen worden ingegaan:

- De theoretische achtergronden van de chemostaat.
- De bruikbaarheid van de chemostaat als model voor een microbiologisch ecosysteem.
- Het uitvoeren van toetsen met een chemostaat.
- Het onderzoek met modelstoffen (chloorfenolen).

2. DE CHEMOSTAAT

Voor een theoretische beschouwing van de kinetiek van de microbiologische processen in de chemostaat dient deze eerst te worden gedefinieerd.

Een chemostaat is een vat, waarvan de inhoud door roeren homogeen wordt gehouden. Aan dit vat wordt een constante stroom voedingsoplossing toegevoegd (influent) en weer afgevoerd (effluent). De voedingsoplossing bevat de noodzakelijke nutriënten zoals stikstof en fosfor en de te onderzoeken stof (het substraat). De concentraties zijn zo gekozen, dat het substraat de beperkende factor is voor de groei van de aanwezige micro-organismen.

Aan het begin van de proef wordt een gemengde (wilde) micro-flora in de chemostaat gebracht. Bij dit onderzoek was deze afkomstig uit de m.e.s. Er treedt daarna een selectie op van dié organismen, die onder de aangeboden condities kunnen groeien en die bij het bereiken van een stationaire toestand allen in eenzelfde fysiologische conditie zijn. De aanvoer van nutriënten en substraat en de groei van de micro-organismen zijn daarbij in evenwicht met de omzetting en/of de afvoer van deze componenten.

Uitgaande van het hierboven geschetste systeem is de volgende wiskundige beschouwing voor de chemostaat opgesteld (Monod, 1950 en Herbert, 1961). De toename van de biomassa in een chemostaat is het verschil tussen de groei van de micro-organismen en de afname door uitspoeling.

$$\text{Ergo: toename biomassa} = \text{groei} - \text{uitspoeling} \quad (1)$$

In een "actief" groeiende cultuur verdubbelt de biomassa zich iedere generatietijd (τ), hetgeen als volgt kan worden weergegeven:

$$2 \log \frac{X_t}{X_0} = k t \quad (2)$$

($\tau = 1/k$: tijd tussen twee delingen).

Voor de beschouwing van de chemostaat is het nodig van een differentiaal-vergelijking uit te gaan

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3)$$

Hierbij is de toename van de biomassa (dX) in een kort tijdsbestek (dt)

evenredig met de biomassa en een snelheidsconstante μ , die het aantal verdubbelingen per tijdseenheid aangeeft; de groeisnelheid gedurende deze periode wordt constant verondersteld. Integratie van (3) geeft de vergelijking voor logarithmische groei:

$$X_t = e^{\mu t} X_0 \quad \text{of} \quad \text{Ln} \frac{X_t}{X_0} = \mu t \quad (4)$$

Monod vond, dat de groeisnelheid afhangt van de concentratie van het substraat (S). Het substraat is hierbij de enige energiebron en dus de beperkende factor voor de groei.

De volgende vergelijking "paste" op zijn resultaten

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (5)$$

Dit betekent, dat bij lage substraatconcentraties de groeisnelheid toeneemt met de toename van de substraatconcentratie tot deze bij hoge concentraties afvlakt en de maximale groeisnelheid (μ_{\max}) benadert. De affiniteitsconstante K_s geeft de substraatconcentratie aan, waarbij de groeisnelheid juist gelijk is aan de helft van de maximale groeisnelheid.

De afleiding van een formule voor de uitspoeling van een niet groeiende cultuur van micro-organismen uit een homogeen gemengd vat (chemostaat) verloopt analoog aan die voor de groei.

De differentiaalvergelijking die dit beschrijft luidt:

$$- \frac{dX}{dt} = DX \quad (6)$$

Hierbij is de afname evenredig met de verdunningssnelheid (D) en de biomassaconcentratie (X). De verdunningssnelheid geeft weer hoe vaak het medium per uur wordt ververs.

De gemiddelde verblijftijd is gelijk aan $1/D$ uur en wordt bepaald door het quotiënt van het vloeistofvolume (V) in de chemostaat en het mediumdebiet (Q)

$$\frac{1}{D} = \frac{V}{Q} \quad (7)$$

Door de vergelijkingen (3) en (6) in te vullen in de biomassa-balans (1) wordt de volgende vergelijking verkregen:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX$$

of

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X \quad (8)$$

Substitutie van (5) in (8) levert

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} - D X \quad (9)$$

De biomassa die voor omzetting uit een bepaalde hoeveelheid substraat kan ontstaan, de z.g. yieldfactor Y, is vrijwel onafhankelijk van de proefomstandigheden en wordt als volgt gedefinieerd:

$$Y = \frac{\text{gewicht van de gevormde bacteriën}}{\text{gewicht van het gebruikte substraat}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (10)$$

of

$$\frac{dX_t}{dt} = -Y \frac{dS}{dt}$$

Evenals voor de biomassa kan ook een balans voor het substraat worden opgesteld:

$$\text{concentratieverandering} = \text{invoer} - \text{uitvoer} - \text{omzetting}$$

of

$$\frac{dS}{dt} = D S_o - DS - \frac{1}{Y} \frac{dX_t}{dt} \quad (11)$$

Na substitutie van (3) en (5) volgt hieruit:

$$\frac{dS}{dt} = D S_o - DS - \frac{X}{Y} \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (12)$$

Wanneer zich in een chemostaat een stationaire toestand heeft ingesteld zijn biomassa en substraatconcentratie constant gevonden $\frac{dS}{dt}$ en $\frac{dX}{dt} = 0$.

Uit (8) volgt dat dan verdunningssnelheid en groeisnelheid aan elkaar gelijk zijn ($\mu = D$),

of

$$\mu = \mu_{\max} \frac{\bar{S}}{K_s + \bar{S}} = D \quad (13)$$

en uit (12):

$$D (S_0 - \bar{s}) = \frac{\bar{x}}{Y} \mu_{\max} \frac{\bar{s}}{K_s + \bar{s}}$$

of

$$\bar{x} = Y (S_0 - \bar{s}) \quad (14)$$

In bovenstaande beschouwing is geen rekening gehouden met substraatverbruik i.v.m. de onderhoudsenergie van de micro-organismen. De energiestroom, die nodig is voor het in stand houden van de micro-organismen vermindert de yield (opbrengst). Bij lage groeisnelheden is dit effect in relatieve zin het grootst. De yieldfactor is dus geen constante voor het systeem (Stouthamer en Bettenhausen, 1973), maar is evenredig met de groeisnelheid, die in een chemostaat wordt bepaald door de verdunningssnelheid (13). Hierdoor neemt de biomassa in de chemostaat bij gelijkblijvend substraat van gebruik ook af met een afnemende verdunningssnelheid. Voor stoffen met een lage yieldfactor kan dit inhouden, dat de groei dan vrijwel stopt.

Uit (13) blijkt, dat in de stationaire toestand de substraatconcentratie \bar{s} onafhankelijk is van S_0 , de mate van afbreekbaarheid van de stof en van de concentratie in het medium, maar uitsluitend wordt bepaald door de verdunningssnelheid voor een gegeven microbiologisch systeem.

Hierdoor is het afbraakpercentage $[(S_0 - \bar{s})/S_0] \times 100$ in een chemostaat alleen geen maat voor de afbraak, maar kan alleen worden gebruikt voor het weer-geven van het verloop van de afbraak als functie van de tijd.

Wanneer wordt verwacht dat een stof giftig is voor micro-organismen en in de beginfase van een experiment reeds aanleiding kan geven tot verlies van de micro-organismen kan deze eigenschap van chemostaten worden gebruikt. Hiertoe wordt het experiment met een lage concentratie van de te toetsen stof in het medium (bijv. 1 mg.l^{-1}) gestart. Na verloop van tijd (bijv. 8 maal de gemiddelde verblijftijd) wordt deze concentratie verhoogd. Dit proces kan worden herhaald tot een goed analyseerbaar concentratieverschil tussen ingevoerd medium en chemostaatinhoud is verkregen.

Het selectieproces van de afbraakorganismen is in een chemostaat anders dan in een statische cultuur. De uitgesproken specificiteit van een micro-organisme voor een gegeven substraat, dat het selectieproces in een statische cultuur beheerst, is bij een continucultuur niet essentieel. Bij een continucultuur zijn vooral substraatconcentratie en verdunningssnelheid bepalend, waarbij de continue verdunning van, somtijds giftige, metabolieten een voordeel kan zijn (Janasch, 1965).

Onder de gegeven condities zal het snelst groeiende organisme gaan overheersen; er zal echter geen volledige monocultuur ontstaan. Wanneer meerdere organismen voor de afbraak verantwoordelijk zijn kan heradaptatie van de cultuur optreden en kan een systeem ontstaan waarin de afbraak volledig verloopt. Een complicerende factor bij kinetische beschouwingen voor de chemostaat is de wandgroei (Pawlowsky et al., 1973).

Bij de uitgevoerde afbraakexperimenten bleek wandgroei vooral op te treden bij lage groei. De biomassa in suspensie was dan gering. Waarschijnlijk wordt wandgroei onder deze omstandigheden gestimuleerd door het relatief grote aandeel van het substraatgebruik voor onderhoudsenergie, waardoor een (te) langzame groei optreedt t.o.v. verdunningssnelheid van gesuspenderde micro-organismen (Sykes, 1976).

3. HET GEBRUIK VAN DE CHEMOSTAAT VOOR HET AFBREEKBAARHEIDSONDERZOEK

Chemostaatproeven zijn vrij bewerkelijk in vergelijking met substraatafname-toetsen ("die-away" toetsen) in schudkolven.

Redenen om te kiezen voor het gebruik van een chemostaat kunnen bijv. zijn:

- Wanneer grote monster volumina (liters) nodig zijn voor (meestal biologische) analyse (toxiciteitstoetsen). Een voordeel hiervan is, dat een éénmalige toxiciteitstoets met influent en effluent een goed beeld geeft van de afbraak, wanneer de "steady state" is bereikt. Dit resultaat moet dan nog wél worden gecontroleerd m.b.v. eenvoudige methoden als TOC (total organic carbon) of HPLC. Bij een substraatafnametoets zouden meerdere toxiciteitstoetsen moeten worden uitgevoerd, omdat hierbij het verloop van de afbraak in de tijd moet worden vastgesteld (zie rapport MD-N&E 82/9 voor een nadere beschouwing over deze functionele analyse).
- Wanneer de te toetsen stof in de aanvangsfase giftig blijkt voor micro-organismen zou het afval zo ver moeten worden verdund, dat vaak analytische problemen ontstaan bij statische toetsen. In de chemostaat wordt dan met een lage concentratie afval in het medium begonnen en wordt de concentratie geleidelijk voorhoogd tot een analyseerbaar verschil tussen in- en effluent ontstaat.
- Wanneer voor de onderlinge vergelijking van de afbreekbaarheid van afvallen en/of stoffen kinetische parameters moeten worden bepaald. Uit metingen van de stationaire substraatconcentratie (\bar{s}) bij verschillende doorstroomsnelheden kunnen K_s en μ_{\max} worden berekend met formule (13). Indien ook de biomassaconcentratie wordt bepaald geeft dit ook inzicht in de "yieldfactor" (4).

Bij de theorie, waarmee deze formules zijn afgeleid, is uitgegaan van eenvoudige substraten in combinatie met reinculturen (Herbert, 1961 en Monod, 1950).

Wanneer met afvallen (mengsubstraten) en gemengde cultures wordt gewerkt, moet rekening worden gehouden met verschuivingen in de getalsverhoudingen tussen verschillende soorten micro-organismen bij variabele doorstroomsnelheden. Dit kan in bepaalde gevallen de berekening van kinetische parameters onmogelijk maken.

Bij het onderhavige onderzoek werden steeds chemostaten gebruikt als beschreven in § 3.5.5. van het "Toetsenboek", 1977. De uitrusting, zoals pH controle apparatuur, werd gekozen aan de hand van de aard van het te onderzoeken probleem.

Bij het inzetten van een chemostaatproef werd de chemostaat gevuld met entmateriaal, bijv. Schevenings zeewater, waarna het medium (zeewater met nutriënten en substraat) hieraan werd toegevoegd.

Dit betekent, dat de beginconcentratie aan substraat (S_0) nul is en dat deze (S) volgens een e-macht oploopt:

$$\ln \frac{S_0 - S}{S_0} = - \frac{Q}{V} t$$

In figuur 1 is de "inspoel-kromme" gegeven, voor het geval er geen afbraak optreedt.

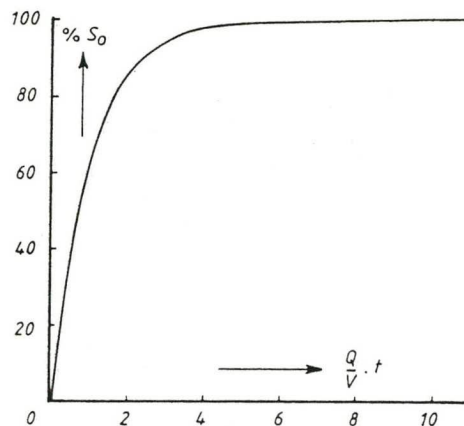


Fig. 1 De concentratie S in een chemostaat (uitgedrukt in % S_0) als functie van de hoeveelheid aangevoerd medium (gegeven als aantal malen de chemostaatinhoud).

Wanneer een volume van 5-maal de inhoud van de chemostaat ($5 \times V$) is doorgespoeld, is de concentratie in de chemostaat al meer dan 99 % van die in het medium.

Het uitspoelen van de ent volgt eenzelfde verloop. Wanneer $10 \times V$ is doorgespoeld is de ent ongeveer 10.000 maal verdund.

Wanneer geen groei optreedt (maar wel sterfte) heeft het geen zin het experiment voort te zetten zonder opnieuw te enten of het experiment opnieuw te starten.

Zoals al eerder werd aangegeven bestaan er duidelijke verschillen tussen de selectie processen in statische (gesloten) en continu (open) cultures (Janasch, 1967 en Harder et al., 1977).

In gesloten systemen worden organismen geselecteerd op substraatspecificiteit en maximale groeisnelheid, omdat de initiële substraatconcentratie relatief hoog is.

In open cultures is, naast de concentratie (S) en de verdunningssnelheid (D), de groeikromme bepalend voor de selectie.

In figuur 2 zijn enkele voorbeelden gegeven van mogelijke groeikrommen.

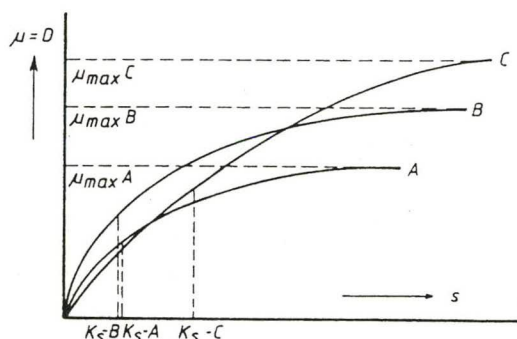


Fig. 2 Enkele voorbeelden van mogelijke groeikrommen van micro-organismen ($\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} = D$)

Onder de proefcondities zoals deze bij chemostaatafbraakproeven worden ingesteld (lage D en S), zullen die organismen worden geselecteerd, die de steilste groeikromme hebben bij lage D (organisme B in fig. 2). Pas bij een hoge D zal organisme C gaan overheersen. Organisme A wordt niet geselecteerd in aanwezigheid van B.

D moet dus zo constant mogelijk worden gehouden, omdat variaties van D populatieschommelingen kunnen veroorzaken en dus wisselingen in het afbreekbaarheidsresultaat.

"Steady state" condities zullen zich meestal binnen 10 x de gemiddelde verblijftijd hebben ingesteld. Voor de bepaling hiervan dient een geschikte analytische methode te worden gekozen. Hierbij moet er rekening mee worden gehouden, dat micro-organismen ook weer metabole produkten kunnen uitscheiden, waarvan de concentratie bij lage groeisnelheden (en dus lage D) evenredig zijn met de influent concentratie aan afbreekbaar materiaal (Sykes, 1976). Met name bij TOC-bepalingen (opgeloste organische koolstof) kan dit leiden tot een onderschatting van de afbreekbaarheid. Ondersteuning met een specifieke analyse van de te onderzoeken component (GC of HPLC) zijn daarom ook meestal nodig.

4. ONDERZOEK NAAR DE AFBRAAK VAN 4-CHLOORFENOL, 2,4-DICHLOORFENOL EN 4-NITROFENOL

Gechloreerde fenolen zijn steeds als modelstoffen gebruikt in afbreekbaarheidsonderzoek in het kader van het project Toxiciteit en Persistentie. Rapport CL 79/107^a en CL 81/34 geven een overzicht van de bereikte resultaten. Vooral 81/34: "Milieutoxicologisch onderzoek van gechloreerde fenolen" gaat uitgebreid in op zowel afbraak in bodem als in zoet en zout water. Bij de in dit rapport beschreven experimenten, uitgevoerd in het kader van onderzoek naar de relatie tussen de resultaten van laboratoriumproeven en die van omzettingen in de praktijk (zie MD-N&E 82/1) is ook 4-nitrofenol als modelstof gebruikt. Van deze stof is bekend, dat deze in laboratoriumtoetsen, door zijn toxiciteit voor micro-organismen, problemen kan opleveren.

4.1 METHODE

De experimenten werden uitgevoerd volgens § 3.5.5. van het "Toetsenboek". Er werden parallel zes chemostaten ingezet (twee per modelstof). Voor iedere modelstof werden twee influentconcentraties gebruikt (1 en 10 mg stof per liter). De gemiddelde verblijftijd werd op 100 uur ingesteld ($D = 0,01 \text{ h}^{-1}$). Als medium werd steriel gefiltreerd zeewater uit de Ooster Schelde gebruikt, dat werd verrijkt met 15 mg NH_4NO_3 en 1,5 mg K_2HPO_4 per liter. Voor het experiment met de laagste 4-chloorfenolconcentratie werd entmateriaal gebruikt uit ~~de~~ overeenkomstige m.e.s. te Den Helder (met de laagste 4-chloorfenolconcentratie, zie MD-N&E 82/1). Voor de overige concentraties en stoffen werd dezelfde procedure gevolgd. Bij de start van de experimenten was de incubatietemperatuur 16,5 °C (temperatuur m.e.s.). Drie maal per week werden monsters genomen voor DOC- en HPLC-analyses; de biomassa-analyses werden d.m.v. ATP-bepalingen en tellingen op platen uitgevoerd. De DOC-bepalingen leverden geen bruikbare informatie op, door de achtergrond DOC van het zeewater. De pH van het effluent werd regelmatig gecontroleerd. Deze bleek steeds tussen 8,0 en 8,3 te liggen. In de chemostaten met 4-chloorfenol en 4-nitrofenol werd ook het effect van het verhogen van D op de afbraak nagegaan.

4.2 RESULTATEN

Voor de overzichtelijkheid worden de resultaten per modelstof gegeven.

4.2.1 4-Chloorfenol (4-CP)

De afbraak van 4-chloorfenol verliep snel. Op dag 3 van het experiment met 1 mg.l^{-1} was de effluentconcentratie tot beneden de HPLC-detectiegrens gedaald ($0,01 \text{ mg.l}^{-1}$). Bij de toets met 10 mg.l^{-1} 4-CP duurde het 4 dagen tot deze detectiegrens werd bereikt.

Bij een stapsgewijze verkoeling van de gemiddelde verblijftijd van 100 via 50, 25 en 12 tot 6 uur trad geen uitspoeling van de cultuur op. Ook een verdere verlaging van 6 naar 3 uur gemiddelde verblijftijd voor de proef met $10 \text{ mg.4-CP.l}^{-1}$ had geen effect op de afbraak. Aangezien in de chemostaat een duidelijke wandgroei waarneembaar was, werd nagegaan of hierdoor de ongevoeligheid voor uitspoelen kon worden verklaard.

Hiertoe werd de inhoud van de chemostaat overgebracht in een kolf en werd de chemostaat direct daarna gevuld met vers medium. Hieraan werd zoveel 4-CP toegevoegd, dat de concentratie gelijk werd aan die van het oorspronkelijke influent.

Het verloop van de concentratie werd m.b.v. HPLC over een periode van 24 h gevolgd (zie fig. 3a en fig. 3b).

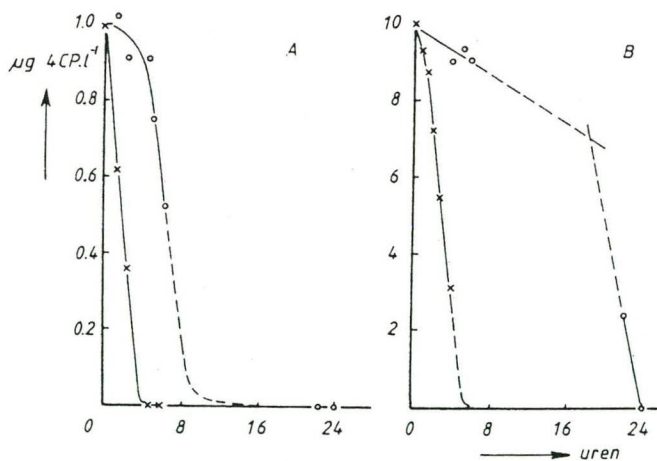


Fig. 3 Verloop van de concentratie in de "wandgroeiproef".

○: concentraties in chemostaat
x: concentratie in de kolf

A proef met 1 mg 4-CP per liter medium
B proef met 10 mg 4-CP per liter medium

Uit de resultaten blijkt, dat door de geadapteerbaarheid van de cultuur aan de wand van de chemostaat, in beide gevallen (A en B) zonder enige adaptatietijd, 4-CP werd afgebroken. Met slechts een korte adaptatietijd werd 4-CP in geval A wél afgebroken. Bij B duurde de adaptatie veel langer (ongeveer 18 uur). In geval B is het moment van het begin van de snelle afbraak niet gemeten, maar kan door extrapolatie worden geschat. Dit betekent, dat bij een gemiddelde verblijftijd van 6 uur ($D = 0,16 \text{ h}^{-1}$) de cultuur niet, maar bij 3 uur ($D = 0,33 \text{ h}^{-1}$) wel grotendeels is uitgespoeld.

De afbraak werd in dat geval veroorzaakt door wandgroei.

De tellingen van 4-CP resistente bacteriën lieten een toename in de eerste dagen van de proef zien, die parallel liep met de afbraak van 4-CP (2×10^3 tot 2×10^4 organismen per ml). Dit niveau bleef met enige schommelingen gedurende de proef gehandhaafd.

De schommelingen in de ATP-bepalingen waren aanzienlijk. Een gemiddeld niveau voor de proef met $1 \text{ mg } 4\text{-CP.l}^{-1}$ was $2 \times 10^5 \text{ fg.ml}^{-1}$ en voor die met $10 \text{ mg } 4\text{-CP.l}^{-1}$ $2 \times 10^6 \text{ fg.ml}^{-1}$. Hierin komt de koppeling tussen substraatverbruik en biomassaproductie goed naar voren.

Het effect van uitspoelen was tot en met $D = 0,16 \text{ h}^{-1}$ niet waarneembaar.

4.2.2 2,4-Dichloorfenol (2,4-DCP)

Op basis van het inoculum (ent) uit de m.e.s. proef werd geen duidelijke afbraak van 2,4-DCP gevonden. In de chemostaat met $1 \text{ mg } 2,4\text{-DCP.l}^{-1}$ in het influent, bleef de effluentconcentratie op $0,5 - 0,6 \text{ mg.l}^{-1}$ "steken". Bij de 10 mg.l^{-1} proef werd uiteindelijk in- en effluentconcentratie aan elkaar gelijk.

Nadat de chemostaten waren geënt uit een positieve substraatafnametoets (MD-N&E 82/1) vond volledige afbraak plaats na enkele dagen.

Een proef analoog aan de "wandgroeiproef" met 4-CP bevestigde dit resultaat. Voor zowel de chemostaatwandgroei als voor de chemostaatinhoud waren adaptatietijden nodig van ca 24 uur. Dit betekent, dat het systeem niet goed was aangepast aan de afbraak van 2,4-DCP. Dit resultaat werd niet verwacht, omdat uit resultaten van eerder uitgevoerde experimenten (MD-N&E 79/8) bleek, dat 2,4-DCP in het m.e.s. afbrak.

De telling van 2,4-DCP resistente bacteriën met telplaten laten een toename van het aantal bacteriën zien gedurende de eerste 16 dagen van de chemostaatproef (ca 4 maal de gemiddelde verblijftijd). Daarna treedt een geleidelijke afname op tot het niveau dat aanwezig was aan het begin van de proef.

Het verloop voor beide chemostaten was identiek. Het aantal 2,4-DCP kolonie was als volgt:

- 2×10^3 kolonie vormende eenheden aan het begin van de proef
- 2×10^6 kolonie vormende eenheden na ongeveer 16 dagen
- 7×10^3 kolonie vermende eenheden aan het eind van de proef.

Het verloop van de ATP-gehalten in de chemostaat geeft eenzelfde beeld.

Hier werden de hoogste waarden na ca 10 dagen gevonden. Na het enten werd een duidelijk ATP-toename in de chemostaat met 10 mg.l^{-1} 2,4-DCP gevonden (van 2×10^5 tot $1 \times 10^6 \text{ fg.ml}^{-1}$).

Ook wanneer het aangeboden substraat niet wordt afgebroken treedt enige groei op van micro-organismen. In natuurlijk zeewater zijn n.l. enige milligrammen organische stof per liter aanwezig, die voor een deel kunnen worden omgezet. Dit verklaart de "rest ATP" van $2 \times 10^5 \text{ fg.ml}^{-1}$ en de enkele duizenden op telplaten groeiende organismen.

4.2.3 4-Nitrofenol (4-NP)

Bij 4-NP trad een duidelijk verschil in het verloop van de afbraak op tussen de chemostaten met 1 en 10 mg.l^{-1} in het influent (zie fig. 4).

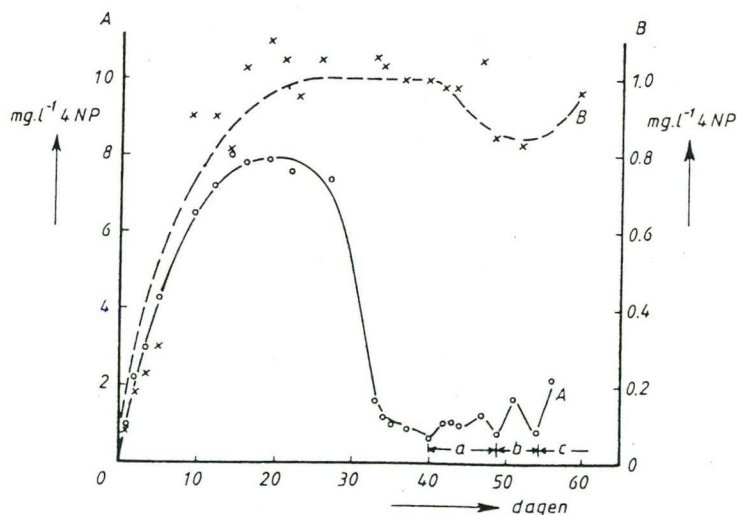


Fig. 4 Het verloop van de 4-NP concentratie in het effluent van de chemostaten.

A: proef met $10 \text{ mg 4-NP.l}^{-1}$; B: proef met 1 mg 4-CP.l^{-1} .

- a. gemiddelde verblijftijd van 100 naar 50 uur (D van 0,01 → 0,02)
- b. gemiddelde verblijftijd van 50 naar 25 uur (D van 0,02 → 0,04)
- c. gemiddelde verblijftijd van 25 naar 12 uur (D van 0,04 → 0,085)
- d. chemostaat geënt.

Beide chemostaten vertoonden een in verhouding identiek concentratieverloop aan het begin van de proef. Na ongeveer 4 maal de gemiddelde verblijftijd hadden de 4-NP concentraties in de chemostaten hun maximale waarden bereikt. Na dat moment startte een meetbare afbraak in de chemostaat met $1 \text{ mg } 4\text{-NP.l}^{-1}$. Vermoedelijk ten gevolge van de toxiciteit van 4-NP kwam de afbraak in de chemostaat met 10 mg.l^{-1} op gang.

Op dag 40 werd deze geënt met medium uit de chemostaat waarin wel afbraak optrad (B), waarna zich slechts een tijdelijke daling van de concentratie voordeed.

Een stapsgewijze verhoging van de doorstroomsnelheid voor de 1 mg.l^{-1} chemostaat tot een gemiddelde verblijftijd van 25 uur werd bereikt ($D = 0,04 \text{ h}^{-1}$) had geen uitgesproken effect op de afbraak (zie fig. 4).

Het effect van wandgroei (zie § 4.2.1) op de afbraak van 4-NP liet zien, dat de afbraakcapaciteit was verdeeld over de wandgroei en de groei in suspensie (zie fig. 5).

Dit verklaart mede het ontstaan van de instabiliteit na de verhoging van D . Wel nam de instabiliteit van het systeem toe, hetgeen blijkt uit de toenemende spreiding in de substraatconcentraties in het effluent van de chemostaat.

Bij een verdere verhoging van de doorstroomsnelheid ($D = 0,085$) werd de afbraak wel beïnvloed.

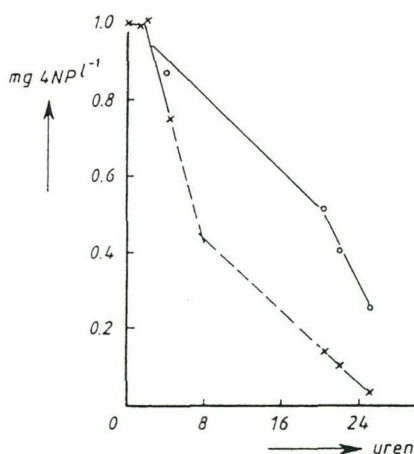


Fig. 5 Verloop van de 4-NP concentratie in de wandgroeiproef.

concentratie in de chemostaat

concentratie in de kolf

geëxtrapoleerd verloop van de afbraak uit de meetpunten.

Eenzelfde instabiliteit werd gedurende het gehele experiment waargenomen bij de proef met $10 \text{ mg } 4\text{-NP.l}^{-1}$.

Uit het verloop van de bacterie-tellingen en de ATP-bepalingen werd weinig extra informatie verkregen. Het aantal kolonievormende eenheden per ml was onveranderd laag (tot $1 - 2 \times 10^3$).

Na een toename aan het begin van de proef nam het ATP-gehalte in de chemostaten gestaag af. Bij de chemostaat met 1 mg.l^{-1} 4-NP werd deze afname onderbroken bij het begin van de afbraak.

De instabiliteit bij het verhogen van de doorstroomsnelheid kwam ook tot uitdrukking in de ATP-gehalten.

5. CONCLUSIES

Uit de resultaten van het onderzoek alsmede uit de gepresenteerde beschouwing kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

1. De chemostaat is een bruikbaar instrument voor het uitvoeren van afbreekbaarheidsonderzoek.
2. Gezien de bewerkelijkheid zal het gebruik beperkt blijven tot die gevallen, waarin grote monsters nodig zijn voor analyse, of waar de (biologische) analyse - door zijn omvang - slechts éénmaal na het bereiken van een "steady state" kan worden uitgevoerd.
3. De resultaten zijn te vergelijken met die van praktijkproeven, waarbij herenten, wat in de praktijk vanzelf gebeurt, na een periode van 6 maal de gemiddelde verblijftijd moet plaatsvinden, wanneer de afbraak is uitgebleven.
4. Bij lage doorstroomsnelheden ontstaat wandgroei, die de kinetiek sterk beïnvloed.
5. Biomassa-bepalingen zijn van belang voor de begripvorming van afbraakprocessen. Ter onderlinge vergelijking (bevestiging) moeten hiervoor meerdere bepalingsmethoden naast elkaar worden gebruikt. Karakterisering van het dominante organisme is nodig, wanneer bijv. het effect van verandering van de doorstroomsnelheid wordt nagegaan.

6. LIJST VAN GEBRUIKTE SYMBOLEN

D	: verdunningssnelheidsconstante (h^{-1})
K	: exponentiële groeisnelheidsconstante (aantal verdubbelingen per tijdseenheid) (h^{-1})
K_s	: affiniteitsconstante ($mg.l^{-1}$)
μ	: specifieke groeisnelheidsconstante
μ_{max}	: specifieke groeisnelheidsconstante bij de maximale groeisnelheid
Q	: medium debiet ($l.h^{-1}$)
S	: substraatconcentratie ($mg.l^{-1}$)
S_0	: substraatconcentratie in de invoer ($mg.l^{-1}$)
\bar{s}	: substraatconcentratie in de stationaire toestand
t	: tijd (uren)
τ	: generatietijd
V	: vloeistofvolume in de chemostaat (l)
X	: biomassa (aantal micro-organismen ml^{-1})
X_0	: biomassa op tijdstip 0
X_t	: biomassa op tijdstip t
\bar{x}	: biomassaconcentratie in de stationaire toestand
Y	: opbrengstfactor

7. LITERATUUR

Harder, W., J.G. Keunen and A. Matia (1977).

A review, Microbial selection in continuous culture.

Journal of Applied Bacteriology 43, 1-24.

Herbert, D. (1961).

In: Continuous culture of micro-organisms.

Society of Chemical Industry, p. 21. London.

Janasch, H.W. (1965).

Continuous culture in microbial ecology.

Laboratory practice 14, 1162-1167.

Janasch, H.W. (1967).

Enrichments of aquatic bacteria in continuous culture.

Archiv für Miluobiologie 59, 165-173.

Monod, J. (1950).

Le technique de culture continue. Théorie et applications.

Ann. Inst. Pasteur 79, 390-410.

Pawlowsky, U., J.A. Howell and C.T. Chi (1973).

Mixed culture biooxidation of phenol III. Existence of multiple steady states in continuous culture with wall growth.

Biotechnology and bioengineering XV, 905-916.

Stouthamer, A.H. en C. Beltenhausen (1973).

Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms.

Biochimica et Biophysica Acta 301, 53-70.

Sykes, R. (1976).

Microbial product formation and variable yield.

Journal WPCF 48 (8), 2046-2054.

"Toetsenboek"

De bepaling van potentiële milieueffecten, in het water van chemica-liën en afvalwater: afbreekbaarheid, toxiciteit en bioaccumulatie.

Centraal Laboratorium TNO, Delft, 1977.

C 1163