

MONITOREN VAN DE ANAEROBE VERGISTING D.M.V. HET F₄₂₀ CO- ENZYM IN METHANOGENESE

Aantal woorden: <31.184>

Cindy Law

Stamnummer: 01301781

Promotoren: Prof. Dr. Ir. Nico Boon & Dr. Ir. Jo De Vrieze

Tutor: Ir. Ruben Props

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de richting

Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

Academiejaar: 2017 – 2018

AUTEURSRECHTEN

“De auteur en de promotor geven de toelating deze scriptie voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de scriptie te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze scriptie.”

“The author and the promotor give the permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using the results from this thesis.”

Gent, juni 2018

De promotoren,
Prof. Dr. Ir. Nico Boon
Dr. Ir. Jo De Vrieze

De auteur,
Cindy Law

DANKWOORD

Met zeer veel trots kan ik zeggen dat mijn thesis goed en vlot verlopen is tijdens het voorbije academiejaar aan het Center for Microbial Ecology and Technology (CMET). Dit vlotte verloop kon uiteraard niet tot stand zijn gekomen zonder de hulp van mijn promotoren en tutor.

Jo De Vrieze, ik ben u heel erg dankbaar voor alle kostbare tijd en hulp die u mij verleend heeft. U stond telkens klaar om mij te helpen, wanneer ik u nodig had. Zonder u zou mijn labo werk nooit zo vlot kunnen verlopen zijn. Hierbij heb ik ook zeer veel theoretisch als praktisch vaardigheden bijgeleerd over anaerobe vergisting. Bedankt voor het nalezen en verbeteren van de schrijffouten, hierdoor was het mogelijk om mijn thesis tot een goed einde te kunnen brengen.

Ruben Props, ik zou u graag willen bedanken voor de hulp die u mij verleend heeft bij het gebruik van de flow cytometer. Ondanks dat u het heel druk had, stond u toch altijd met open armen voor mij klaar. Het gebruik van de flow cytometer zou nooit zo vlot zijn verlopen, zonder de hulp die ik van u kreeg. Hierbij wou ik u eveneens bedanken om mijn thesis na te lezen en te verbeteren.

Uiteraard wil ik professor Boon heel erg bedanken, voor zijn kritisch zicht en doordachte ideeën bij het verwerken van de data als de geniale ingevingen omtrent het praktisch werk.

Hierbij zou ik ook graag alle CMET medewerkers willen bedanken voor het vlotte verloop en voor de hulp die ik van jullie heb gekregen, zowel in het labo als de tips voor de presentaties. Greet Van De Velde, graag wil ik u bedanken voor het meten van mijn kation IC stalen. Tim Lacoere, wil ik graag bedanken voor het meten van mijn VVZ stalen.

Als laatste zou ik heel graag mijn ouders en broer willen bedanken voor alle steun die ze mij gaven. Ondanks al die jaren zijn mijn ouders blijven in mij geloven en stonden ze steeds voor mij klaar.

Ik ben jullie allen zeer dankbaar!

SAMENVATTING

Anaerobe vergisting vormt een mogelijk antwoord op de water-energie nexus problematiek. Dit probleem komt neer op het feit dat het zuiveren van water energie kost en dat energie ook water kost. Om dit te vermijden, kan anaerobe vergisting gebruikt worden, hieruit kan groene energie verkregen worden. Het probleem aan anaerobe vergisting is dat dit zeer gevoelig is voor proces falen. Om dit proces falen te voorkomen, wordt hier de methanogene gemeenschap gemonitord door gebruik te maken van het F_{420} co-enzym. Dit co-enzym komt enkel voor in de methanogene archaea. Wanneer er zich een daling voordoet in het aantal cellen met het co-enzym F_{420} , zou dit op proces falen kunnen wijzen. Het zou ook interessant zijn, mocht de effectieve activiteit aan biogasproductie van de methanogene archaea hiermee bepaald kunnen worden. Dit laatste zou optimalisatie van het proces toelaten. In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van twee UASB reactoren, en werden deze eerst onder steady state gelopen, waarna als stress factor, natriumchloride werd toegevoegd in het influent van één van de reactoren. Het F_{420} co-enzym werd gemeten door middel van de flow cytometer. Uit de resultaten bleek dat de microbiële gemeenschap onvoldoende stabiel was om additie van Na^+ te ondergaan. Hierdoor werden er sterke fluctuaties bekomen in de gemeten parameters. Het aantal cellen met het co-enzym dat in het effluent aanwezig was, werd niet beïnvloed door additie van Na^+ . Uit dit onderzoek kon besloten worden dat de flow cytometer gebruikt kon worden voor de detectie van het aantal cellen met het F_{420} co-enzym, maar dat deze niet onmiddellijk gebruikt kon worden voor de detectie van de methanogene biogasproductie.

ABSTRACT

Anaerobic digestion provides a potential answer to the water-energy nexus problem. The water-energy nexus refers to the fact that the treatment of water needs energy, but energy also needs water. To prevent this problem, anaerobic digestion can be a solution, because it produces energy-rich biogas. A problem that appears in anaerobic digestion is that it may easily lead to process failure. To prevent process failure, the F_{420} co-enzyme can be used to monitor the methanogenic community, as it only appears in the methanogenic archaea. If a drop appears in the number of cells containing this F_{420} co-enzyme, it means that there will be a process failure. It would also be interesting to follow the activity of the biogas production, because if the methanogenic activity is known, the process could be optimized. To approach these research questions, two UASB reactors were operated. Both of them were run under steady state condition after which sodium chloride was added to the influent of one reactor. This co-enzyme was measured by flow cytometer. The results show that the microbial community was not stable enough for addition of Na^+ . Because of this, there were strong fluctuations in the measured variables. The number of cells containing this co-enzyme were not affected by the addition of Na^+ . The conclusion of this research is that the flow cytometer could be used for the detection of the F_{420} co-enzymes, but that it could not be used for measuring directly the methanogenic biogas production.

INHOUDSOPGAVE

AUTEURSRECHTEN	I
DANKWOORD	II
SAMENVATTING	III
ABSTRACT	IV
INHOUDSOPGAVE	1
AFKORTINGEN	5
FIGUREN	6
TABELLEN	9
INTRODUCTIE	10
1. Hernieuwbare energie <i>via</i> anaerobe vergisting	10
2. Procentuele energiewinning/gebruik	11
LITERATUURSTUDIE	12
1. Anaerobe vergisting	12
1.1 Inleiding	12
1.2 Functie	13
1.3 Soorten afvalstromen	14
1.3.1 Agrarische afvalstromen	14
1.3.2 Industriële afvalstromen	15
1.4 Toepassingen	16
2. Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor	17
2.1 Functie	17
2.2 Opvolging van de reactor	20
2.2.1 pH	20
2.2.2 Temperatuur	20
2.2.2.1 Mesofiel	21
2.2.2.2 Thermofiel	21
2.2.2.3 Mesofiel vs. Thermofiel	21
2.2.3 Vluchtige vetzuren	22
2.2.4 Inhiberende componenten	22

2.2.4.1	Ammonium.....	22
2.2.4.2	Sulfide.....	23
2.2.4.3	Lange keten vetzuren	23
2.2.4.4	Zware metalen	23
2.2.4.5	Saliniteit	25
2.3	Microbiële gemeenschap	26
3.	F ₄₂₀ co-enzym	27
3.1	Inleiding	27
3.2	Detectie	28
3.2.1	Spectrofluorometer	28
3.2.2	Spectrofotometer	29
3.2.3	Dunne laag elektroforese.....	29
3.2.4	Flowcytometrie	29
3.3	Toepassingen	31
	DOELSTELLING.....	32
	MATERIAAL EN METHODE.....	33
1.	Experimentele toenadering	33
2.	Proefopzet	33
2.1	Experimentele opstelling.....	33
2.2	Influent.....	35
2.3	Analyses	36
2.3.1	Totale gesuspendeerde vaste stof en vluchtige gesuspendeerde vaste stof	36
2.3.2	Totale droge stof en totale vluchtige stof.....	37
2.3.3	Kjeldahl stikstof.....	37
2.3.4	Total ammoniakale stikstof	38
2.3.5	pH.....	38
2.3.6	Chemische zuurstofverbruik	38
2.3.7	Biogas	38
2.3.8	Vluchtige vetzuren	39
2.3.9	Kationen	39
2.4	Biochemische potentiaal test	40
2.5	Flowcytometrie.....	41

2.6	Statistiek	41
RESULTATEN	42
1.	Karakteriseren van het inoculum en melasse	42
1.1	Kjeldahl en totale ammoniakale stikstof	42
1.2	Totale gesuspendeerde vaste stof, vluchtige gesuspendeerde vaste stof, totale gesuspendeerde stof, vluchtige gesuspendeerde stof, chemische zuurstof vraag	43
2.	Karakteristieken van de reactoren.....	44
2.1	pH.....	44
2.2	Hydraulische retentie tijd.....	45
3.	Biogas	46
3.1	Volumetrische methaanproductie.....	46
3.2	Methaanopbrengst.....	47
4.	Effluent samenstelling.....	48
4.1	Totale gesuspendeerde vaste stof en vluchtige gesuspendeerde vaste stof	48
4.2	Vluchtige vetzuren	50
4.3	Kationen	51
5.	Biochemische potentiaal test	53
6.	Flowcytometrische monitoring.....	55
6.1	Methode ontwikkeling	55
6.2	Toepassing	59
6.2.1	Percentage aan cellen met het F ₄₂₀ co-enzym	59
6.2.2	Aantal cellen met het F ₄₂₀ co-enzym	60
7.	Statistische testen.....	62
7.1	Boxplot	62
7.2	Correlatie	64
7.3	Testen	64
DISCUSSIE	66
1.	Additie van Na ⁺ heeft geen sterke invloed op de pH waarde.....	66
2.	De volumetrische productie en de methaanopbrengst worden beïnvloed door additie van Na ⁺	67
3.	Het TSS en VSS gehalte zal door additie van Na ⁺ en degranulatie stijgen.....	72
4.	Door NaCl toevoeging zal de calcium concentratie in het effluent moeten stijgen	74

5. Flowcytometrie kan gebruikt worden voor de detectie van het co-enzym maar niet voor de detectie van de biogasproductie.....	74
6. Additie van NaCl zorgt voor een lagere uitspoeling in het aantal cellen met het F ₄₂₀ co-enzym.....	75
7. De dikte van het slibbed heeft invloed op de uitspoeling van de methanogene archaea	76
8. Toekomstige onderzoeken dat uitgevoerd kan worden	77
8.1 Optimalisatie van de huidige onderzoek	77
8.2 Toekomstige onderzoeksmogelijkheden	77
BESLUIT	79
REFERENTIE.....	81
BIJLAGE A: FLOW CYTOMETER	I
1. Methode ontwikkeling	I
BIJLAGE B: BOXPLOT	I
BIJLAGE C: STATISTISCHE TESTEN	I
1. Statistische test voor vraag 1	I
2. Statistische test voor vraag 2.....	II

AFKORTINGEN

BMP	Biochemische methaan potentiaal
CHP	Combined heat and power
CZV	Chemische zuurstofverbruik
EPS	Extracellulaire polymerische substantie
HRT	Hydraulische verblijftijd
IC	Ionenuitwisseling chromatografie
IEA	International energy agency
LCFA	Lange keten verzuren
SAO	Syntrofe acetaat oxidatie
SAOB	Syntrofe acetaat oxiderende bacteriën
SCFA	Korte keten vetzuren
SG	SYBR® Green I
SRB	Sulfaat reducerende bacteriën
STP	Standaard temperatuur en druk
TAN	Totale ammoniakale stikstof
TKN	Kjeldahl stikstof
TS	Totale droge stof
TSS	Totaal gesuspendeerde vaste stof
VS	Totale vluchtige stof
VSS	Vluchtige gesuspendeerde vaste stof
VVZ	Vluchtige vetzuren

FIGUREN

Figuur 1: Schematische weergave van het water-energie nexus (aangepast naar Nederlands) (Chowdhury and El-Shorbagy 2013).....	11
Figuur 2: Schematische voorstelling van een duurzame cyclus vertrekkende vanuit dierlijke meststof en organisch materiaal (aangepast naar Nederlands) (Holm-Nielsen et al. 2009). .	12
Figuur 3: Proces van anaerobe vergisting (aangepast naar Nederlands) (Appels et al. 2008).	13
Figuur 4: Schematische weergave van een UASB reactor (aangepast naar Nederlands) (Gupta and Gupta 2005).	17
Figuur 5: Aanwezige micro-organismen in een granulaire slibkorrel.	19
Figuur 6: Structuur van het F ₄₂₀ co-enzym, (A) vertoont de geoxideerde vorm, fluorescente vorm en (B) vertoont de gereduceerde vorm van het co-enzym, de niet fluorescente vorm (Ashby et al. 2001).	28
Figuur 7: Schematische weergaven van een flow cytometer (aangepast naar Nederlands) (Brown and Wittwer 2000).	30
Figuur 8: Experimentele opstelling, de linkse reactor is reactor 1, de rechtse reactor stelt reactor 2 voor.	34
Figuur 9: Opbouw gasteller (Van Meerbergen 2011).	35
Figuur 10: Schematische weergave van de BMP test.	40
Figuur 11: pH verloop van reactor 1 en 2 doorheen het hele proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 1.	45
Figuur 12: Hydraulische retentie tijd van beide reactoren doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 2.	46
Figuur 13: Volumetrische productie van reactor 1 en 2 doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 1.	47
Figuur 14: Methaanopbrengst van reactor 1 en 2 doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 2.	48
Figuur 15: Totale gesuspendeerde vaste stof in het effluent van reactor 1 en 2 doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 13.	49
Figuur 16: Vluchtige gesuspendeerde vaste stof in effluent van beide reactoren doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 13.	49
Figuur 17: De totale VVZ wordt hier voor zowel reactor 1 als 2 weergegeven. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 1.	50

Figuur 18: Natrium concentratie in beide reactoren over het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 13.....	51
Figuur 19: Calcium concentratie in beide reactoren over het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 13.....	52
Figuur 20: Ammonium concentratie in beide reactoren over het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na ⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 13.	53
Figuur 21: Methaanopbrengst van de biochemische potentiaal test, in vijfvoud uitgevoerd, waarbij staal 1 onvoldoende representatief was.	54
Figuur 22: Hoeveelheid geproduceerde biogas/g VS voor 4 stalen. In vijfvoud uitgevoerd, waarbij staal 1 onvoldoende representatief was.	54
Figuur 23: Negatieve controle voor de totale cel populatie voor een slibstaal uit reactor 1 en reactor 2. De blauwe gate duidt de regio aan waar cellulaire events werden verwacht.	56
Figuur 24: Positieve controle voor de totale cel populatie in de gate voor reactor 1 en reactor 2 van het slibstaal. In de blauwe gate werden de verwachte events weergegeven.	57
Figuur 25: Negatieve controle voor de bepaling van het F ₄₂₀ co-enzym voor reactor 1 en reactor 2, gebruik makend van het slibstaal. De oranje gate duidt de regio aan waar autofluorescente events werden verwacht.	57
Figuur 26: Positieve controle voor de bepaling van het F ₄₂₀ co-enzym voor reactor 1 en reactor 2, gebruik makend van het slibstaal. In de oranje gate werden de verwachte events weergegeven.....	58
Figuur 27: Het percentage aan actieve methanogene archaea in het effluent t.o.v. het totaal aantal microbiële cellen in functie van het aantal dagen voor reactor 1 en 2. De getallen binnen in de grafiek stellen de hoeveelheid Na ⁺ voor: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 14.....	59
Figuur 28: Het percentage aan actieve methanogene archaea in het slibstaal t.o.v. het totaal aantal microbiële cellen in functie van het aantal dagen voor reactor 1 en 2. De getallen binnen in de grafiek stellen de hoeveelheid Na ⁺ voor: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 14.....	60
Figuur 29: Aantal cellen met het F ₄₂₀ co-enzym in het effluent van reactor 1 en 2 t.o.v. het aantal dagen voor reactor 1 en 2. De getallen binnen in de grafiek stellen de hoeveelheid Na ⁺ voor: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 14.	61
Figuur 30: Aantal cellen met het F ₄₂₀ co-enzym in het slibstaal van reactor 1 en 2 t.o.v. het aantal dagen voor reactor 1 en 2. De getallen binnen in de grafiek stellen de hoeveelheid Na ⁺ voor: 1 = 1 g Na ⁺ , 2 = 5 g Na ⁺ , 3 = 10 g Na ⁺ , 4 = 15 g Na ⁺ , 5 = 20 g Na ⁺ . Metingen startten vanaf week 14.	62
Figuur 31: Boxplot van het aantal cellen met het F ₄₂₀ co-enzym in reactor 1 en 2, waarbij reactor 1 is opgesplitst in voor en na additie van Na ⁺ , terwijl reactor 2 doorheen het hele proces onder steady state gelopen werd.....	63

Figuur 32: Boxplot van het aantal cellen/mL met het F₄₂₀ co-enzym van voor en na additie van Na⁺ voor reactor 1.63

Figuur 33: Densiteit plot van de negatieve controle voor de bepaling van de gate voor het F₄₂₀ co-enzym, van reactor 1 en 2, gebruik makend van het slibstaal. De oranje gate duidt de regio aan waar autofluorescente events werden verwacht. I

Figuur 34: Densiteit plot van de methanogene archaea populatie van reactor 1 en 2, van het slibstaal. De oranje gate duidt de regio aan waar autofluorescente events aanwezig waren. . I

Figuur 35: Boxplot van reactor 2, voor het aantal cellen/mL met het co-enzym. I

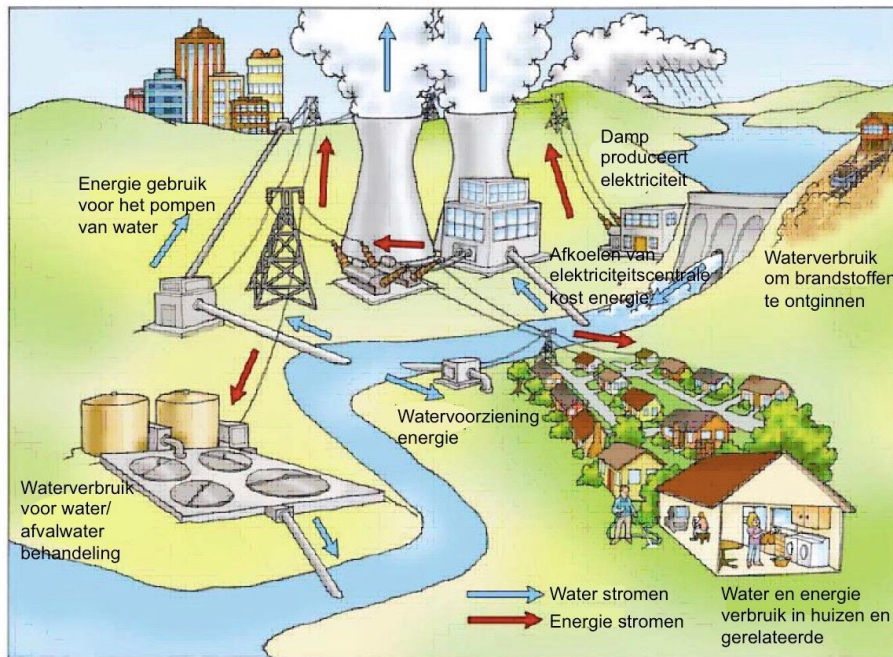
TABELLEN

Tabel 1: Overzicht van de theoretische samenstelling in functie van de tijd, van het influent voor beide reactoren.....	35
Tabel 2: De theoretische hoeveelheid ingepompte influent in de reactoren in functie van de tijd, met de bijhorende theoretische HRT.....	36
Tabel 3: De gemiddelden van de TKN en TAN waarden met de bijhorende standaarddeviatie van melasse en slib.....	43
Tabel 4: Overzicht van de gemiddelde TSS en VSS waarden met de bijhorende standaarddeviatie van het slib en inhoud van de reactor	44
Tabel 5: Overzicht van de gemiddelde TS en VS gehalte met de bijhorende standaarddeviatie van de melasse.	44
Tabel 6: Correlatie tabel tussen het aantal cellen met het F ₄₂₀ co-enzym en de volumetrische productie van reactor 1 en 2.....	64
Tabel 7: Parametrische en niet-parametrische testen voor vraag 1 met de gestelde hypothese. Met de voorwaarden voor de parametrische test.	I
Tabel 8: Parametrische testen en voorwaarden voor vraag 2 met de gestelde hypothese.....	II

INTRODUCTIE

1. Hernieuwbare energie via anaerobe vergisting

Het verkrijgen, leveren en afvoeren van water kost energie. Productie van zuiver water vereist evenzeer energie en dit kan verwoord worden in de zogenaamde “water-energie nexus” (Figuur 1)(Cunha et al. 2017, Siddiqi and Anadon 2011). Dit komt neer op het feit dat water kan gezuiverd worden, maar dit zuiveren van water kost eveneens energie. Hierbij is het gewenst om de verbruikte energie terug te winnen. Maar langs de andere kant kost energie verbruik, ook veel water. Dit betekent dat het minimaliseren van het ene zorgt voor het maximaliseren van het andere en omgekeerd. Op dergelijke manier is optimalisatie van de energie terugwinning en waterzuivering niet mogelijk (Cunha et al. 2017). Er zal dus enkel een stijgende energie gebruik zijn, maar een daling van de hoeveelheid vers/proper water (Siddiqi and Anadon 2011). Water wordt vaak hoofdzakelijk als medium gebruikt voor het verwijderen van vervuilingen, zoals in de voedingsindustrie rekening houdend met het feit dat water een hernieuwbare bron is die opnieuw kan gebruikt worden (Mo and Zhang 2013, Villarroel Walker et al. 2014). Voor de zuivering van water worden er allerhanden chemicaliën en andere componenten toegevoegd die nodig zijn voor de verwijdering van de onzuiverheden. Deze toegevoegde producten dienen later terug verwijderd te worden. Dit alles kost opnieuw energie. Daarom dient dit vermeden te worden, en wordt er naar alternatieven gezocht om het gebruik van water te beperken. De huidige gebruikte waterzuiveringssysteem dat gebruikt wordt is het actuele slibstelsysteem, maar deze verbruikt zeer veel energie, dit komt opnieuw neer op het “water-energie nexus”. Om dit te vermijden biedt anaerobe vergisting een oplossing. Anaerobe vergisting is echter in staat om een deel van deze energie te herwinnen. Hieraan gekoppeld ontstaat een ander probleem, namelijk dat de alternatieve oplossingen mogelijks zorgen voor de productie van broeikasgassen. Dit laatste is evenmin gewenst (Villarroel Walker et al. 2014). Broeikasgassen zorgen voor globale opwarming en dit veroorzaakt klimaatveranderingen. Het heeft ook een ernstige impact op de ecosystemen, fauna en ook op het leven van de mens (Appels et al. 2011). Er dient dus op een duurzame manier gewerkt te worden, waarbij de energie die nodig is voor dit alles op een hernieuwbare manier verkregen kan worden. Een oplossing hiervoor is anaerobe vergisting. Het biogas geproduceerd door de anaerobe vergisting kan als groene energie gebruikt worden.



Figuur 1: Schematische weergave van het water-energie nexus (aangepast naar Nederlands) (Chowdhury and El-Shorbagy 2013).

2. Procentuele energiewinning/gebruik

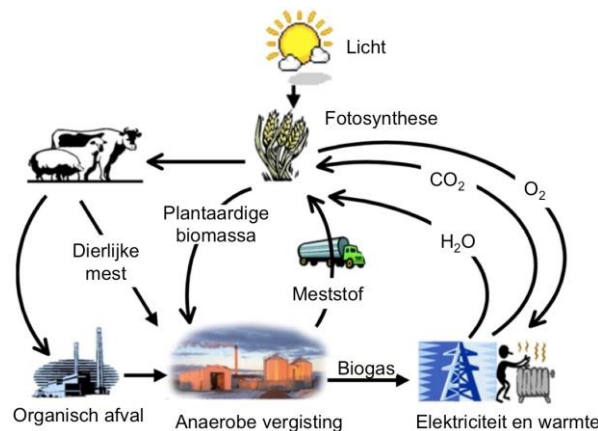
Volgens het International Energy Agency (IEA) telt fossiele brandstof voor 81% mee tot de hoeveelheid primaire energie die over de hele wereld gebruikt wordt, terwijl hernieuwbare energie slechts 13% bijdraagt. De overige 6% is afkomstig van andere bronnen van energie, zoals nucleaire energie (IEA 2016). Er wordt al een jaarlijkse groei van 2,5% waargenomen in het gebruik van hernieuwbare energie tegenover het verbruik van de fossiele brandstof (Appels et al. 2011). Het procentuele aandeel aan hernieuwbare energie in de totale energieverbruik dient echter te stijgen. Het uiteindelijke verbruikte percentage van fossiele brandstof tegenover hernieuwbare energie dient veranderd te worden. Het Europese beleid heeft besloten dat tegen 2020, 20% van het totale energiegebruik afkomstig moet zijn van hernieuwbare energiesystemen, zoals anaerobe vergisting, waarbij een groot deel van de grondstoffen voor de vorming van hernieuwbare energie afkomstig zal zijn van de landbouw en bosbouw. In de toekomst zal 25% van alle bio-energie afkomstig zijn van biogas dat verkregen wordt uit organisch materiaal, zoals dierlijke mest, gewassen, en voederafval (Holm-Nielsen et al. 2009). Afhankelijk van het type organische afvalstroom dat binnen gaat in de anaerobe vergister, verschilt de samenstelling van het biogas dat geproduceerd wordt lichtjes. Het biogas bestaat, globaal genomen, voor 60 vol% uit CH_4 , 38% uit CO_2 en 2% uit andere gassen (Franke-Whittle et al. 2014). Deze overige 2% bestaat voor het grootste aandeel uit H_2S (Lu et al. 2015).

LITERATUURSTUDIE

1. Anaerobe vergisting

1.1 Inleiding

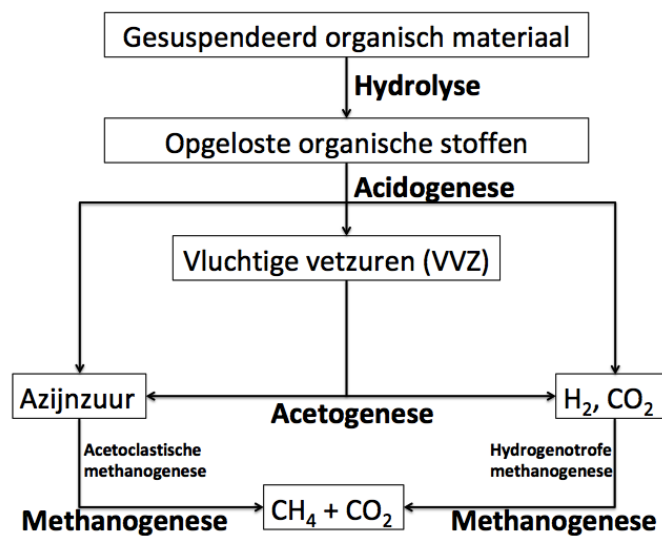
Anaerobe vergisting wordt gebruikt om organische afvalstromen te behandelen (Figuur 2). Dit proces houdt in dat organisch materiaal wordt afgebroken door micro-organismen onder strik anaerobe omstandigheden. Hieruit ontstaat biogas en microbiële biomassa (Chen et al. 2008). Verschillende soorten organische afvalstromen kunnen gebruikt worden voor de productie van biogas, zoals agrarische- en industriële afvalstromen maar eveneens deze afkomstig uit de voedingsindustrie (Chen et al. 2008, Holm-Nielsen et al. 2009). Er dient onder dergelijke condities gewerkt te worden, omdat de micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor de vorming van methaan enkel onder anaerobe omstandigheden werken. Het gevormde biogas is een bron van hernieuwbare energie. Zo kan er op een duurzame manier gewerkt worden, waarbij afval nuttig kan gebruikt worden. Op deze wijze wordt er minder gebruik gemaakt van fossiele brandstof. Anaerobe vergisting laat bovendien een reductie toe van vervuiling afkomstig van de landbouw en industriële activiteiten, door de stabilisatie van organisch afval (Chen et al. 2008). Dit proces heeft naast de laatstgenoemde pluspunt nog andere belangrijke voordelen, zoals, een daling van de hoeveelheid afvalslib in vergelijking met aerobe behandeling; de gebruikte energie kan gedeeltelijk terug gewonnen worden; een vermindering van de aanwezige pathogenen in het substraat; lage slibproductie; lage energie vereiste (Appels et al. 2008, Chen et al. 2008). Toch zijn er enkele nadelen aan dit proces en vaak faalt het proces door verschillende inhiberende factoren. Een factor wordt als inhiberend beschouwd wanneer deze een negatieve invloed heeft op de aanwezige micro-organismen, zoals inhibitie op de groei. Een moeilijkheid die ook bestaat bij de opzet van het proces, is dat er een delicaat evenwicht bestaat tussen de twee groepen micro-organismen, met name de zuur producerende bacteriën en de methanogene archaea. Dit laatste kan tot een onstabiel proces leiden (Chen et al. 2008). De efficiëntie van het proces is afhankelijk van de activiteit van de microbiële samenstelling om organisch materiaal om te zetten in CO₂ en CH₄ (Appels et al. 2008).



Figuur 2: Schematische voorstelling van een duurzame cyclus vertrekkende vanuit dierlijke meststof en organisch materiaal (aangepast naar Nederlands) (Holm-Nielsen et al. 2009).

1.2 Functie

Anaerobe vergisting is een proces dat verschillende biologische activiteiten bevat (Zaher et al. 2004). Deze kunnen ingedeeld worden in vier verschillende fasen (Figuur 3). Het proces begint met de hydrolyse van onoplosbare componenten in het organische materiaal (Franke-Whittle et al. 2014, Gavala et al. 2003). Deze bevatten macromoleculen, zoals eiwitten, koolhydraten en vetten. Hydrolyse zorgt ervoor dat deze componenten omgezet worden naar oplosbare organische componenten (Appels et al. 2008). Hierbij ondergaan de organische polymeren een biologische decompositie, waarbij uit de polymeren monomeren en dimeren gevormd worden (Gavala et al. 2003). Deze zorgen dus voor het ontstaan van aminozuren, suikers en vetzuren. Hierna volgt acidogenese of fermentatieve stap. In deze stap worden de in de voorgaande stappen geproduceerde componenten omgezet tot hogere organische zuren, alcoholen, ketonen, acetaat, H_2 en CO_2 . Deze componenten worden in de acetogene stap omgezet tot azijnzuur, H_2 en CO_2 (Zaher et al. 2004). Deze stap wordt gecontroleerd door de partiële druk van H_2 (Appels et al. 2008). Zowel de acidogenen als acetogenen produceren CO_2 en H_2 bij de afbraak van vluchtige vetzuren (VVZ) (Zaher et al. 2004). De producten bekomen in de acetogene stap worden gebruikt door de methanogenen om biogas te produceren. Deze methanogenen zijn echter geen bacteriën maar behoren tot het domein van de archaea (Demirel and Scherer 2008). Biogas bestaat gemiddelde gezien uit volgende componenten: 60% CH_4 , 38% CO_2 en 2% andere gassen, doch hierop zit veel variatie. Deze laatste stap is de essentiële stap in de productie van biogas (Franke-Whittle et al. 2014).



Figuur 3: Proces van anaerobe vergisting (aangepast naar Nederlands) (Appels et al. 2008).

De methanogenese wordt vaak ook de snelheidsbepalende stap genoemd, alhoewel vaak ook de hydrolyse stap de snelheidsbepalende stap genoemd wordt, hetgeen vooral het geval is wanneer de organische afvalstroom een hoge concentratie aan niet-opgeloste organische stof bevat (Gavala et al. 2003). De methanogene archaea kunnen ingedeeld worden in twee groepen, namelijk de acetoclastische en hydrogenotrofe methanogenen. Beide groepen hebben een verschillende functie gedurende de vergisting. Hierbij zullen de

acetoclastische methanogenen enkel VVZ in de acetaat vorm gebruiken en daarbij wordt methaan en CO₂ geproduceerd, terwijl hydrogenotrofe methanogenen CO₂ en H₂ zullen gebruiken voor de productie van CH₄ (Zaher, C Bouvier et al. 2004). De CO₂ wordt door de hydrogenotrofen gebruikt als elektronenacceptor, terwijl H₂ als elektronendonor wordt gebruikt (Appels et al. 2008). Hierbij zijn de methanogene archaea veel gevoeliger dan de acetogene en acidogene bacteriën, wat tot een probleem kan leiden. Dit heeft als gevolg dat de methanogenen veel sneller geïnhibeerd zullen worden onder invloed van toxische componenten en ongunstige omstandigheden. Eveneens kunnen ze bij een te hoge organische belasting niet met de voorgaande stappen op punt blijven. Op deze manier beginnen de VVZ te accumuleren, terwijl een deel van de CO₂ gebruikt wordt voor de productie van methaan en het andere deel als gas blijft. Het gevolg hiervan is dat de pH daalt en hierdoor zullen de microbiële activiteiten stoppen en stopt de productie van biogas. Een andere oorzaak waarbij de productie van biogas stopt, is de relatie tussen de twee methanogene groepen. Wanneer de hydrogenotrofe vorm geïnhibeerd wordt, dan zal H₂ zich beginnen opbouwen tot op een niveau dat eveneens de acetogene groep geïnhibeerd wordt. Dit laatste heeft tot gevolg dat er minder acetaat vrijkomt in de andere vorm. Hierdoor zullen zowel acetaat als andere VVZ accumuleren in de reactor (Zaher et al. 2004). Een achteruitgang van de reactor kan ontstaan wanneer er een onevenwicht ontstaat tussen de bacteriën en de archaea, wat uiteindelijk leidt tot een verandering in de hoeveelheid CH₄ die gevormd wordt (Demirel and Yenigün 2002).

1.3 Soorten afvalstromen

Er kunnen verschillende soorten afvalstromen behandeld worden *via* anaerobe vergisting, gaande van agrarische tot petrochemische afvalstromen. De microbiële afbraak van elk van deze stromen verloopt echter niet overal even makkelijk. De problemen die optreden bij de afbraak is variërend en afhankelijk van de afkomstige sector. Anaerobe vergisting wordt het vaakst toegepast in agrarische- en industriële afvalstromen, maar het wordt ook gebruikt voor de behandeling van stedelijke afvalwaters (Chen et al. 2008).

1.3.1 *Agrarische afvalstromen*

Onder agrarische afvalstromen behoort dierlijke afval afkomstig van vee en pluimvee maar ook andere afvalstromen, zoals het sap afkomstig van ingekuild veevoeder, de voeding, strooisel en ook dierlijke mest. Dergelijke afvalstromen zijn diffuse bronnen die kunnen bijdragen tot de vervuiling van oppervlaktewater. Een probleem van dusdanige afvalstromen is dat deze een hoge concentratie aan totale ammoniakale stikstof (TAN) bevat, maar tevens eiwitten en ureum. Uit deze componenten kan op eenvoudige manier ammoniak vrijgesteld worden. Ammoniak vormt in dit hele verhaal een probleem, aangezien dit zorgt voor een ongewenste inhibitie aan de aanwezige micro-organismen. Sommige additieven die aan het voedsel van dieren toegevoegd worden, zoals antibiotica (Chen et al. 2008). Dergelijke componenten worden aan het voedsel toegevoegd om te voorkomen dat de dieren ziek worden of infecties oplopen. De aanwezigheid van dergelijke antibiotica kan echter inhibitie veroorzaken in de anaerobe vergisting (Lallai et al. 2002).

Doordat de antibiotica door de dieren worden opgenomen, zal deze samen uitgescheiden worden met de uitwerpselen. Dit laatste wordt gebruikt als organische afvalstroom, waardoor op dergelijke manier deze inhibitie kan veroorzaken (Chen et al. 2008).

1.3.2 *Industriële afvalstromen*

Industriële afvalstromen hebben een brede range qua samenstelling. Deze zijn eveneens afkomstig uit zeer diverse sectoren, zoals voedings-, papier en pulp-, textiel- en petrochemische raffinaderijen industrie. De samenstelling van deze stromen is zeer variërend (Chen et al. 2008).

Het afval afkomstig van de voedingsindustrie is zeer rijk aan organisch materiaal en is dus optimaal voor anaerobe vergisting. Een nadeel dat hierbij komt kijken is het feit dat er verschillende andere componenten aanwezig zijn die dus ook inhibitie kunnen veroorzaken. Dergelijke componenten die inhibitie veroorzaken zijn sterk verschillend, afhankelijk van het type voedingsindustrie waarvan het afkomstig is. Hierbij zal bijvoorbeeld voor het behandelen van afvalwater afkomstig van de vis- en schaaldier verwerkende industrie de inhibitie veroorzaakt worden door de aanwezige hoge concentratie van kationen en anionen, hoofdzakelijk Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} . Afvalwater afkomstig van de zuivelindustrie bevatten een hoge concentratie vetten, eiwitten en koolhydraten. In dit laatste geval speelt vooral de vetten een probleem, door de afbraak van de vetten ontstaat er lange keten vetzuren (LCFA) (Chen et al. 2008).

De pulp en papier industrie heeft verschillende hoogwaardige afvalstromen die belangrijke problemen veroorzaken in het milieuopzicht. Zo'n afvalstromen zijn zeer geschikt voor anaerobe vergisting, maar bevatten inhiberende stoffen zoals sulfiden, tannines en harszuren (Chen et al. 2008).

Afvalstromen afkomstig van de textiel industrie zijn echter problematischer dan de andere afvalstromen. Doordat in de textiel industrie er zeer veel chemicaliën gebruikt worden zullen de op deze manier bekomen stromen vooral chemisch zeer complex zijn. Door de chemische complexiteit van de uitgevoerde activiteiten, zal de op deze manier bekomen afvalwater tot problemen resulteren bij het behandelen (Chen et al. 2008). Het bekomen afvalwater is vooral afkomstig van de volgende activiteiten: wassen, bleken van natuurlijke vezels, kleuren en de laatste product afwerkende stappen. Waarbij in de laatste stap de hulpstoffen en product afwerkende stoffen worden toegevoegd (C. Vandevivere et al. 1998).

Als laatste kan het afvalwater afkomstig zijn van de petrochemische industrie behandeld worden door anaerobe vergisting. In dit afval zijn er toxische en inhiberende componenten aanwezig zoals zuren, alcoholen, aldehyden en esters. Maar door de aanwezigheid van OH-groepen kan de toxiciteit van deze componenten gereduceerd worden (Chen et al. 2008).

1.4 Toepassingen

Het geproduceerde biogas heeft tal van toepassingen. Vertrekkende vanuit groene energie als gebruik van elektriciteit, warmte, gaande tot injectie in natuurlijke gasnetten. Afhankelijk van de toepassingen dient het biogas in sommige gevallen een verdere behandeling te ondergaan. Als basis dient het biogas gekoeld, gedraineerd en uitgedroogd te worden direct na de productie. Het is noodzakelijk dat het biogas zo min mogelijk H₂S bevat, deze kunnen immers schade veroorzaken bij de verbranding (Holm-Nielsen et al. 2009). De limiet voor de aanwezigheid van H₂S betreft 250 – 400 ppm (Zamalloa et al. 2012). Het geproduceerde biogas kan gebruikt worden in toepassingen waarbij er gebruik gemaakt wordt van aardgas (Appels et al. 2008).

Biogas kan gebruikt worden om warmte en of stoom te produceren, evenals voor de productie van elektriciteit. Biogas wordt het meest gebruikt voor elektriciteitsproductie gekoppeld met energie- en warmteproductie, dit wordt meestal uitgedrukt als een “combined heat and power (CHP)” systeem. Het biogas kan ook aangewend worden als brandstof voor brandstofcellen die in de toekomst beschouwd worden als kleinschalige elektriciteitscentrales. Dit laatste heeft als voordeel dat er zeer hoge efficiënties en lage emissies bereikt kan worden (Appels et al. 2008, Demirel and Scherer 2008, Holm-Nielsen et al. 2009). De uitgestoten CO₂ is hetzelfde maar biogas veroorzaakt een korte omloop van CO₂ emissie. Hiermee wordt bedoeld dat het gevormde CO₂ afkomstig is van een hernieuwbare bron, waarbij dit terug verwijderd kan worden. Waardoor dit een vorm van lage emissie veroorzaakt. Mits kleine aanpassing van de lucht/gas ratio van de conventionele gasbranders kan biogas gebruikt worden (Appels et al. 2008, Holm-Nielsen et al. 2009).

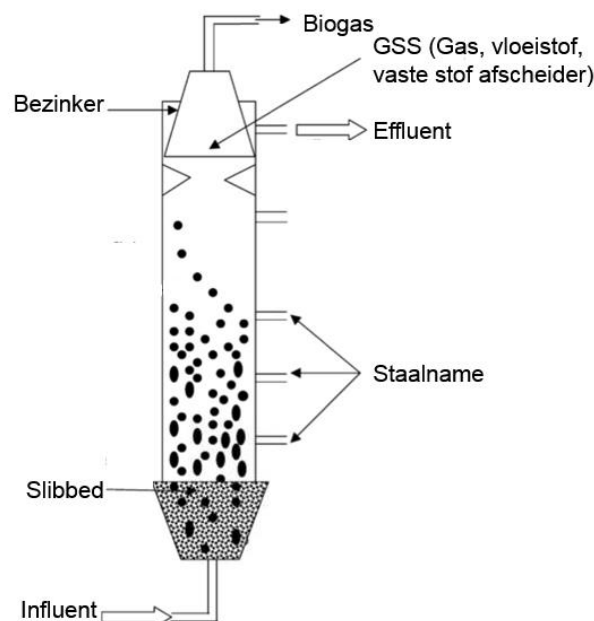
Verdere behandeling van het biogas is vereist wanneer het gebruikt wordt als voertuigbrandstof of als het geïnjecteerd wordt in natuurlijke gasnetten. Voor het laatst genoemde is het nodig om de bekomen biogas op een zodanige manier te behandelen dat de kwaliteit ervan gelijk wordt aan natuurlijke gassen (Appels et al. 2008, Holm-Nielsen et al. 2009). Hierbij dient de CH₄ concentratie van het biogas te stijgen tot 98-99%, door zoveel mogelijk CO₂ te verwijderen. Het is eveneens zeer belangrijk om de aanwezige H₂S voor >99% te verwijderen, doordat dit corrosie van de leidingen kan veroorzaken (Muñoz et al. 2015).

Daarnaast heeft toepassing van biogas afkomstig van dierlijke mest twee doelen: enerzijds voor de productie van biogas en anderzijds om een gefermenteerd substraat te bekomen. Het gefermenteerde substraat wordt vaak digestaat genoemd en kan in de landbouw gebruikt worden als meststof. Verdere behandeling van het digestaat laat toe om meer geconcentreerde kunstmest of vezel producten te bekomen (Holm-Nielsen et al. 2009).

2. Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor

2.1 Functie

Upflow anaerobic sludge blanket staat voor UASB, dit type reactor wordt het vaakst gebruikt voor anaerobe vergisting op labo schaal, een schematische voorstelling is weergegeven in Figuur 4 (Fukuzaki et al. 1991). Anaerobe vergisting werd ongeveer een eeuw geleden geïntroduceerd. Maar deze techniek werd in het begin nog niet toegepast. Het werd initieel ook slechts in beperkte mate gebruikt als secundaire behandeling, waarbij de klassieke vergisting de hoofdrol innam als biologische afbraakproces, voor de stabilisatie van het organisch afval zodat het chemische zuurstofverbruik (CZV) afgebroken wordt (Lettinga et al. 1980, Seghezze et al. 1998). Het echte gebruik van deze techniek kwam pas op gang wanneer de UASB reactoren in de jaren 70 ontwikkeld werden. De voorgeschiedenis van de UASB reactor werd in de zogenaamde “anaerobe contact proces” gevonden. Een gelijkaardig systeem dat biolytische reactoren heet, werd in 1910 gebruikt. De UASB reactoren zijn reactoren die aan een hoge snelheid gelopen worden (Seghezze et al. 1998). Tegenwoordig worden deze reactoren wijdverspreid gebruikt voor de behandeling van verschillende soorten afvalwaters (Seghezze, Zeeman et al. 1998), hoofdzakelijk om industriële afvalwaters te behandelen (Gagliano et al. 2017). Deze technologie wordt ook gebruikt om een snelle detoxificatie en afbraak van stikstof houdende aromaten, alkylfenolen en azo kleurstoffen in welbepaalde omstandigheden te bekomen (Cortinas et al. 2006, Tan et al. 1999).



Figuur 4: Schematische weergave van een UASB reactor (aangepast naar Nederlands) (Gupta and Gupta 2005).

Deze reactor is opgebouwd uit twee delen, namelijk een cilindrisch gedeelte dat het onderste gedeelte voorstelt en een gas-vloeistof-vast afscheider dat het bovenste gedeelte vormt. De temperatuur waarbij de vergisting plaatsvindt, wordt constant gehouden, afhankelijk van het type vergisting dat uitgevoerd wordt (Lu et al. 2015). Wat dergelijke reactoren zo succesvol maken is het in de bodem aanwezige dichte slibbed. Dit bed wordt

echter gevormd door de accumulatie van de binnenstromende vaste stof en bacteriële groei. Het is in dit bed dat alle biologische afbraakprocessen doorgaan (Seghezze et al. 1998). Hoe groter de granulen, hoe groter de bezinkingssnelheid. Deze zijn voornamelijk onderaan in het slibbed aanwezig. Hoe kleiner de granulen, hoe lager de bezinkingssnelheid en deze zijn vooral middenin en bovenaan het slibbed terug te vinden (Gupta and Gupta 2005).

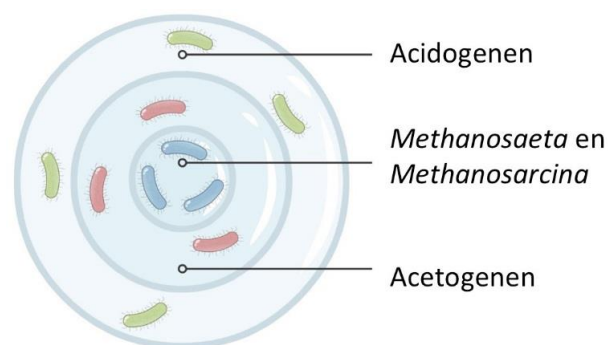
Onder welbepaalde condities kunnen de aanwezige organismen op een natuurlijk wijze met elkaar aggregeren tot flocculanten of granulen (Seghezze et al. 1998). De granulen aggregeren meestal tot een grootte van 0,5 tot 3 mm (Gagliano et al. 2017). Er is wel een verschil bij het gebruik van granulen of flocculanten in een UASB reactor. De granulaire slibvorm heeft meerdere voordelen dan de flocculante vorm. In de granulaire vorm zitten de organismen goed georganiseerd, daarnaast is afscheiding van dergelijke granulen mogelijk in het effluent. Het betreft ook een hogere retentietijd van de vaste stof, doordat deze betere bezinkingseigenschappen bevatten. Eveneens kunnen met dergelijke slibvormen afvalwaters gebruikt worden met een hoge concentratie aan organische componenten, nog hoger dan wat een aerob proces aan kan (Ghangrekar et al. 2005, Seghezze et al. 1998). Naast de microbiële samenstelling van de granulen, zijn er ook divalente kationen, zoals calcium, in het slib aanwezig. Deze kationen spelen een cruciale rol in de aggregatie van de micro-organismen. De kationen vormen bindingen met de negatief geladen oppervlakte van de bacteriën en met de extracellulaire polymerische substantie (EPS). Granulen die aangevuld worden met calcium zijn meer resistent aan afschuifkrachten dan granulen zonder calcium. Door een te hoge concentratie van monovalente zouten (Na^+ en K^+) kan de stevigheid van granulen gereduceerd worden, waardoor biomassa uit de reactor wordt weggewassen. Calcium heeft dus een positieve invloed op de sterkte van de granulen (Gagliano et al. 2017).

Het slib kan eveneens floteren en dit wordt veroorzaakt door een overmaat aan polysachariden in de extracellulaire polymerische substantie en deze zijn negatief geladen (Ismail et al. 2010). De flotatie wordt veroorzaakt door het feit dat er biogas in de granulen zitten. Doordat de granulen aan elkaar klitten, worden er vlokken gevormd waarin biogas aanwezig is, dit is de oorzaak van flotatie. De EPS zelf is echter noodzakelijk voor de granule vorming van het slib (Creamer et al. 2010, Sheng et al. 2010). Het EPS wordt gesecreteerd door micro-organismen en deze bevatten hoofdzakelijk eiwitten, polysachariden waarbij weinig lipiden in aanwezig zijn, humuszuren en heteropolymeren zoals glycoproteïnen (Ismail et al. 2010, Lu et al. 2015). Deze zijn belangrijk voor het behouden van de integriteit en de stabiliteit of ruimtelijk ordening van de granulen (Liu et al. 2004). Er kunnen gelnetwerken op het oppervlak van de granulen gevormd worden, door de EPS. Deze dragen bij tot meer microbiële adhesie door middel van chemische binding of fysische verknoping. Op deze manier wordt de accumulatie van biomassa vergemakkelijkt en de granulatie van slib versterkt (Lu et al. 2015).

Dit alles toont aan dat granulatie van slib zorgt voor het reduceren van wash-out van de granulen, waardoor de reactor stabiliteit kan behouden blijven. Omvangrijke microbiële aggregaten met een hoge specifieke oppervlak zouden veel makkelijker aan biogas en schuim hangen. Doordat de aggregaten zo'n hoge specifieke oppervlak bevatten zullen ze daar makkelijker aanhangen. Hierdoor verlaagt de zwaartekracht van de korrels, wat leidt tot het drijven van de korrels (Lu et al. 2015). Turbulentie ontstaat door het binnenstromende influent en het gevormde biogas. Dit geeft als voordeel dat er een goed contact gemaakt wordt tussen het afvalwater en het aanwezige biomassa (Seghezze et al. 1998).

Granulaire slib heeft meestal een holle elliptische vorm met veel gaten en barsten aan het oppervlak. Dit zorgt ervoor dat het gevormde biogas vrijgesteld kan worden. Sterke en gezonde granulen met een hoge sedimentatie snelheid zijn voordelig om tot een succesvolle operationele UASB reactor te komen, omdat er geen wash-out van de biomassa mag zijn (Gagliano et al. 2017).

De granulen van boven naar onder in de reactor verschillen lichtjes. Filamenteuze archaea bacteriën bevinden zich in de top en midden. De cellen hiervan vormen een compacte en intacte microstructuur doordat ze dicht bij elkaar geassocieerd of ingesloten zijn in het slib matrix. In het centrum zijn zowel staafvormige als bolvormige archaea aanwezig, deze behoren tot de *Methanosaeta* en *Methanosarcina*, daarrond zitten acetogenen, waarbij op zijn beurt daarrond acidogenen zitten (Figuur 5) (Grotenhuis et al. 1991, Gupta and Gupta 2005, Nizami and Murphy 2011, Tindall 2008). Deze zijn vooral aanwezig op het oppervlak van de granulen of inwendig, waarbij tussenin de organismen veel microporiën zijn waargenomen die mogelijks veroorzaakt werd door de emissie van biogas. Hoe hoger de organische belasting in de feed, hoe meer *Methanosarcina* aanwezig in de granulen (Kalyuzhnyi et al. 1996).



Figuur 5: Aanwezige micro-organismen in een granulaire slibkorrel.

Enkele voordelen bij het gebruik van een UASB reactor:

- De granulatie van de biologische vaste stof bepaalt hoe succesvol de opstart van het proces is (Ghangrekar et al. 2005).
- Er is minder reactor volume en plaats nodig, waarbij er eveneens een hogere graad aan energie geproduceerd wordt in de vorm als biogas (Seghezze et al. 1998).

Een nadeel hierbij is wel dat het bekomen effluent een verdere (aerobe) behandeling nodig heeft om het resterende organische materiaal, nutriënten en pathogenen te verwijderen (Seghezze et al. 1998).

2.2 Opvolging van de reactor

De stabiele omgeving (e.g., pH, temperatuur en VVZ) van de reactor is vanzelfsprekend zeer belangrijk om een zo efficiënt en hoog mogelijke biogas productie te verkrijgen. Met opvolging van de reactor wordt concreter bedoeld, de toestand waarin de micro-organismen zich bevinden binnenin de reactor. Om zo een optimaal mogelijke werking van de UASB reactor te bekomen, dienen hiervoor verschillende parameters opgevolgd te worden. Een wijziging van een van de parameters kan echter leiden tot de inhibitie van de aanwezige micro-organismen.

2.2.1 *pH*

De pH is één van de factoren die gebruikt kan worden om de conditie van de micro-organismen binnenin de reactor op te volgen. Het is zeer belangrijk om deze parameter goed in de ogen te houden. Elke groep micro-organisme heeft zijn eigen optimale pH. De methanogene archaea zijn het meest gevoelig tegen pH veranderingen, waarbij deze een optimale werking hebben bij een pH tussen de 6,5 – 7,2. Terwijl de fermentatieve bacteriën minder gevoelig zijn tegen pH wijzigingen, deze hebben een bredere range van pH waarbinnen ze kunnen werken (Appels et al. 2008). Tot de fermentatieve bacteriën behoren de acetogene en acidogene bacteriën. De meest optimale pH waaronder gewerkt wordt om een zo hoog mogelijke biogas productie te verkrijgen, ligt tussen 6,5 – 7,5 (Liu et al. 2008). De bicarbonaten aanwezig in de reactoren hebben echter een bufferende werking en zorgen op deze manier voor het behouden van de optimale pH. Dit bicarbonaat wordt zowel geproduceerd als verbruikt in de verschillende processen van anaerobe vergisting. Bicarbonaat blijft behouden in het systeem door CO₂ productie (Zaher et al. 2004).

2.2.2 *Temperatuur*

Niet alleen de pH kan gebruikt worden om de reactor op te volgen, maar eveneens de temperatuur. De temperatuur heeft een invloed op de groei en het metabolisme van de aanwezige micro-organismen. In dit geval zijn het de acetoclastische methanogenen die het meest gevoelig zijn aan een stijgende temperatuur. Het is belangrijk om een constante temperatuur tijdens de vergisting aan te houden. Fluctuaties in de temperatuur hebben in het algemeen het meeste invloed op de methanogene archaea, alhoewel hoge temperaturen een positieve invloed hebben op de oplosbaarheid van organisch materiaal. Hierbij zal ook de biologische en chemische reactie verbeterd worden en zullen ook meer pathogenen afgedood worden, maar er zijn ook enkele nadelen verbonden aan het werken op hoge temperaturen, zoals een stijging in vrije ammoniak, wat inhibitie tot gevolg zal hebben. Een goede control van de temperatuur is dus zeer belangrijk wanneer er gewerkt wordt in mesofiele of thermofiele condities (Appels et al. 2008).

2.2.2.1 Mesofiel

Reactoren die onder mesofiele condities lopen bevatten een temperatuur tussen de 30°C en 38°C (Appels et al. 2008). In het algemeen worden de meeste reactoren ingesteld op mesofiele temperaturen.

2.2.2.2 Thermofiel

Reactoren kunnen eveneens op thermofiele temperaturen gelopen worden, gaande van 50°C tot 57°C. Dergelijke temperaturen zijn optimaal voor thermofiele micro-organismen (Appels et al. 2008).

2.2.2.3 Mesofiel vs. Thermofiel

Er zijn verscheidene voordelen bij het gebruik van thermofiele reactoren. Het gebruik van dergelijke reactoren heeft tot gevolg dat er een snellere groei zal zijn van de micro-organismen (De Vrieze et al. 2016). Dit veroorzaakt niet enkel een versnelde groei, maar ook de omzetting van organisch materiaal zal sneller verlopen dan bij de mesofiele reactoren. Door het feit dat bij een stijgende temperatuur de biochemische reacties sneller zal verlopen (Appels et al. 2008), kan de omzetting met twee- of zelfs drievoud verhoogd worden, dit is uiteraard afhankelijk van het substraattype (De Vrieze et al. 2016).

Een verhoogde omzetting ontstaat door een stijgende hydrolyse. Dit alles heeft tot gevolg dat er een toegenomen biogas productie mogelijk is aan een lagere hydraulische verblijftijd (HRT) (De Vrieze et al. 2016). Werken bij thermofiele temperaturen zal ook leiden tot een stijging in de reductie van vaste stof, verbeterde ontwatering en destructie van pathogenen aanwezig in het substraat (Appels et al. 2008). Ze zijn ook meer bestand tegen zwaar belaste organische afvalstromen (Kim et al. 2002).

Een groot nadeel aan thermofiele vergisting is echter dat de kwaliteit van het effluent van thermofiele reactoren lager is dan van de mesofiele reactoren. Het effluent van thermofiele vergisting bevat namelijk een hogere concentratie aan oplosbare CZV (De Vrieze et al. 2016). Dit alles wordt veroorzaakt doordat het proces minder stabiel kan lopen. Thermofiele condities vereisen een hogere energie input, doordat dergelijke reactoren bij hogere temperatuur werken, vereisen deze dus meer energie input. Er ontstaat vaak ook een sterke onaangename geur bij thermofiele vergisting (Appels et al. 2008). De onaangename geur ontstaat doordat er meer vrije ammoniak aanwezig is bij thermofiele slib. Deze sterkere geur ontstaat door het meer vrijstellen van H₂S en ammoniak. Een grotere vrijstelling van deze laatste wordt veroorzaakt door een betere afbraak van de aanwezige eiwitten (Gebreyesus and Jenicek 2016). Substraten met een hoge concentratie aan stikstof leiden ook tot snellere inhibitie van de methanogene archaea. Door de hogere temperatuur zal er een stijgende concentratie aan vrije ammoniak optreden (De Vrieze et al. 2016).

2.2.3 *Vluchtige vetzuren*

Vluchtige vetzuren (VVZ) vormen de meest belangrijke intermediären in anaerobe vergisting. Hieruit kan de stabiliteit van het systeem bepaald worden. De VVZ worden zowel geproduceerd als verbruikt in het proces, net zoals bicarbonaten. Vluchtige vetzuren bufferen het systeem naar lagere pH waarden, dit is echter niet gewenst (Zaher et al. 2004). De vetzuren worden gedegradeerd door protonen reducerende acetogenen in associatie met de waterstof verbruikende methanogene archaea. De productie van VVZ kan toxisch zijn voor de micro-organismen, vooral de methanogene archaea (Appels et al. 2008). Deze vetzuren worden geproduceerd door de acetogene en acidogene bacteriën (Ahring 1995). Een stijgende concentratie aan VVZ ontstaat door accumulatie, dat veroorzaakt wordt door een onstabiele anaerobe vergisting, dat op zijn beurt teweeggebracht wordt door een schommelende temperatuur, organische overbelasting, toxische componenten, etc. Wanneer dit zich voordoet, zijn de methanogenen niet in staat om snel genoeg waterstof te verbruiken en VVZ te verwijderen. Het gevolg hiervan is een ophoping van deze vetzuren en dit kan leiden tot verzuring van de reactor. Dit heeft tot gevolg dat de pH zal dalen tot een waarde zo laag waarbij hydrolyse/acetogenese geïnhibeerd wordt. De pH verlaging resulteert in toxische omstandigheden, waarbij toxiciteit ontstaat doordat VVZ niet afgebroken wordt (Appels et al. 2008, Franke-Whittle et al. 2014). Dit niet-gedissoceerde vorm van vrije vetzuren kan vrij doorheen de celmembraan migreren en intracellulair dissociëren, wat tot een pH daling en een verstoring van de homeostase kan leiden (Appels et al. 2008).

2.2.4 *Inhiberende componenten*

Er bestaan verschillende componenten die inhibitie kunnen veroorzaken van de aanwezige micro-organismen. Het meest gevoelige aan inhibitie zijn de methanogene archaea. Hieronder worden enkele inhiberende factoren beschreven. Buiten de besproken factoren zijn er nog zeer veel andere factoren die tot inhibitie kunnen leiden, zoals chlorofenolen en gehalogeneerde alifaten (Appels et al. 2008).

2.2.4.1 *Ammonium*

Inhibitie kan veroorzaakt worden wanneer afvalwaters met hoge concentraties aan TAN behandeld wordt. Stikstof is een inhiberende component voor alle aanwezige micro-organismen. De TAN bestaat uit vrije ammoniak en ammonium. Hierbij is vrije ammoniak het meest toxisch voor de organismen, doordat dit vrij doorheen de membraan van micro-organismen kan bewegen. Dit passief transport veroorzaakt een onevenwicht van de protonen en of een natrium deficiëntie (Chen et al. 2008). Een stijgende pH resulteert in een stijgende toxiciteit van de aanwezige vrije ammoniak. Er zijn drie parameters die een invloed hebben op de hoeveelheid vrije ammoniak, namelijk TAN, pH en temperatuur (Appels et al. 2008).

2.2.4.2 Sulfide

Sulfaat komt hoofdzakelijk veel voor in industriële afvalwaters, maar het komt ook voor in andere soorten afvalwaterstromen. In anaerobe reactoren wordt sulfaat door de sulfaat reducerende bacteriën (SRB) gereduceerd tot sulfide. Deze omzetting wordt veroorzaakt door twee soorten SRB namelijk de complete en niet complete oxideerders. De niet complete oxideerders oxideren de componenten zoals lactaat om tot acetaat en CO₂. De complete oxideerders zet acetaat om tot CO₂ en HCO₃⁻. Er zijn twee processen die tot inhibitie kunnen leiden. Primaire inhibitie vindt plaats door competitie tussen de SRB voor de organische en anorganische componenten, deze onderdrukken de methaanproductie. Secundaire inhibitie is het gevolg van de toxiciteit van sulfide aan verschillende bacteriële groepen (Appels et al. 2008, Chen et al. 2008). Daarnaast is er nog een tertiaire inhibitie, dit ontstaat wanneer er grote hoeveelheden sulfiden aanwezig zijn. Door de aanwezigheid van de grote hoeveelheid sulfiden, zal dit zorgen voor het neerslaan van de belangrijke potentiële elementen zoals ijzer (Chávez Fuentes et al. 2016, Park and T Novak 2013). Op deze manier ontstaat er een limitatie van nutriënten. Methanogenen hebben namelijk veel ijzer nodig, dit is essentieel voor de groei van de micro-organismen. Doordat deze een belangrijke component vormt voor vele enzymen dat betrokken zijn bij de metabolische pathways van de micro-organismen (A Jackson-Moss and R Duncan 1990). Door het neerslaan van deze laatste met sulfiden, zal er een limitatie aan ijzer zijn voor de methanogenen, waardoor deze zullen inhiberen.

2.2.4.3 Lange keten vetzuren

Lange keten vetzuren (LCFA) kunnen eveneens inhibitie veroorzaken. Deze ontstaan gedurende de degradatie van vetten en lipiden, waarna ze verder gereduceerd worden tot acetaat en waterstof door β -oxidatie van de protonen reducerende acetogenen. Enkel gram positieve bacteriën worden door de aanwezigheid van LCFA's bij lage concentratie geïnhibeerd, dit geldt niet voor de gram negatieve bacteriën. De LCFA zijn toxisch door het feit dat deze geadsorbeerd worden op de celwand en celmembraan. Hierdoor interfereren deze met het transport en/of met de beschermende functie van de cel. Door de aanwezigheid van een laagje LCFA op het slib, kan dit flotatie veroorzaken en leidt dit tot het uitspoelen van het slib (Appels et al. 2008, Chen et al. 2008).

2.2.4.4 Zware metalen

De primaire bronnen voor zware metalen zijn industriële afvalwaters, maar ook afvalwater dat afkomstig is van steden draagt tot 50% bij aan de totale hoeveelheid metalen in rioleringswater. Afvalwaters van industriële afkomst bevatten zink, koper, chroom, nikkel, cadmium en lood.

Metalen afkomstig van huishoudelijke afvalwater zijn grotendeels aanwezig in het afvalwater door de volgende activiteiten:

- Het uitlogen van loodgieters materialen (Appels et al. 2008).
- Waaronder koper en lood; van daken en goten met koper en zink en galvanisch materiaal (Appels et al. 2008).
- Het gebruik van detergents en waspoeders dat cadmium, zink en koper bevat (Appels et al. 2008).
- Het gebruik van verzorgingsproducten dat zink bevatten (Appels et al. 2008).

Vele enzymen en co-enzymen hebben een lage concentratie aan dergelijke metalen nodig voor de activatie om de activiteit te kunnen uitvoeren. Wanneer deze in grote concentraties voorkomen, kunnen deze tot inhibitie leiden en een toxisch effect hebben op de micro-organismen. Ze zijn toxisch voor de micro-organismen omdat deze zware metalen een chemische binding kunnen aangaan met de enzymen en een daaropvolgend de enzymstructuur vernietigen (Appels et al. 2008).

IJzer kan mogelijks ook als een zwaar metaal beschouwd worden, zeker wanneer het in hoge concentraties voorkomt. (Jackson-Moss and Duncan 1990). IJzer is echter een belangrijk sporenelement voor de groei van de micro-organismen en moet soms toegevoegd worden aan substraten die weinig ijzer bevatten (Jackson-Moss and Duncan 1990, Ofverstrom et al. 2011, Weiland 2010). IJzer als sporenelement dient in hogere concentratie aanwezig te zijn tegenover de andere sporelementen (Weiland 2010). Een concentratie van 1 tot 10 mg/L is reeds voldoende (Bischoff 2009). IJzer vormt een belangrijke component voor vele enzymen in verscheidene pathways van de aanwezige micro-organismen, betrokken in het vergistingsproces (Jackson-Moss and Duncan 1990). Methanogenen hebben specifieke groei vereisten voor ijzer (Patel et al. 1978). Een concentratie van 300 tot 450 mg/L Fe^{2+} zorgt voor een verbeterde granulatie proces, terwijl een concentratie lager dan 300 mg/L weinig effect vertoont op de granulatie van het slib (Mudhoo and Kumar 2013, Yu et al. 2000). Toevoeging van FeCl_3 onder de inhibitie concentratie geeft eveneens andere voordelen, deze zal namelijk voor een sterke afbraak van de LCFA zorgen (Wang et al. 2017a). Bij een te hoge Fe^{2+} concentratie zal het ijzer zich accumuleren binnenin de granulen, waardoor dit een algemene reductie van de activiteit van de micro-organismen kan veroorzaken (Mudhoo and Kumar 2013, Wang et al. 2017a).

IJzer wordt ook gebruikt voor het verwijderen van opgeloste fosfor onder de vorm van fosfaat, het voorkomen van struviet vorming en voor de reductie van H_2S in de biogas (Ofverstrom et al. 2011). Een stijgende concentratie aan ijzer leidt tot een daling in de oplosbaarheid van PO_4^{3-} als dit neerslaat als $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$.

2.2.4.5 Saliniteit

Zoutstress is een belangrijke factor die veel problemen kan veroorzaken, betreffende de directe inhibitie van de micro-organismen en de structuur van de granulen. Het zijn de methanogene archaea die zeer gevoelig zijn aan saliniteit fluctuaties (Gagliano et al. 2017). Hoge zoutconcentraties in afvalwaters worden vooral bekomen uit de voedingsindustrie (Chen et al. 2008). Het gevolg hiervan is dat de productie van methaan geïnhibeerd wordt. Lage gehalten aan NaCl verbeteren de hydrolyse en verzuring, maar zorgt voor inhibitie van de methanogene stap (Zhao et al. 2017), vermoedelijk doordat de lage concentraties aan natrium een belangrijke rol speelt in de vorming van ATP of oxidatie van NADP (Appels et al. 2008). Hierdoor zal er een daling in biogas productie plaatsvinden en kan dit in extreme gevallen leiden tot het falen van de anaerobe vergisting. Natrium is een essentieel element voor de synthese van de cellen, groei en metabolisme van micro-organismen betrokken in anaerobe systemen. Een lage concentratie aan Na⁺ verbetert de activiteit van de enzymen, behoudt een correcte balans van de biofilm en het zorgt ook voor de regulatie van de osmotische druk bij de microbiële groei. Een te hoge concentratie aan zout leidt niet enkel tot een sterk verminderde biogas productie, maar heeft ook een invloed op de productie van waterstof. Een te hoge concentratie leidt tot een verandering in het metabolisme van micro-organismen, dit verbetert de productie van melkzuur, terwijl de productie van butyraat belemmerd wordt. Korte keten vetzuren (SCFA) zijn belangrijke intermediären in het anaerobe vergistingsproces. De hoeveelheid zout heeft ook een invloed op de productie van SCFA's (Zhao et al. 2017).

Mesofiele reactoren vertonen meestal een hogere resistentie tegen saliniteit dan de thermofiele reactoren. Dit is toe te schrijven aan het feit dat mesofiele slib zich sneller kan aanpassen aan hogere saliniteit dan thermofiele slib (Chen et al. 2008).

In UASB reactoren zijn de micro-organismen geaggregeerd en worden ze bij elkaar gehouden in een granulaire biofilm. Hoge concentraties aan natrium kunnen op de aggregatie een negatief effect veroorzaken en hierdoor de procesprestatie beïnvloeden. Een oplossing om de negatieve effecten van natrium te overkomen op de aggregatie van micro-organismen tijdens de biofilm vorming is door het toevoegen van calcium. Door een te hoge concentratie aan natrium, zullen de calcium ionen in de granulen uitspoelen, waardoor dit resulteert in een verzwakte granule. Hierdoor zal de stevigheid van de granulen verminderen. De biomassa zal op die manier uit de reactor worden weggewassen, maar door toevoegen van calcium kan dit voorkomen worden (Gagliano et al. 2017).

2.3 Microbiële gemeenschap

Afhankelijk van de organische afvalstroom verandert de microbiële samenstelling van de anaerobe vergisting (Ziganshin et al. 2013). Om het effect van de verschillende afvalstromen op de microbiële samenstelling te bepalen wordt er gebruik gemaakt van sequentie analyse van de micro-organismen. Hierbij wordt er meestal gebruik gemaakt van de 16S rRNA van de bacteriën (Zhang et al. 2014). De hydrolyse wordt uitgevoerd door bacteriën en fungi, terwijl de acidogene stap door acidogene bacteriën wordt uitgevoerd en de acetogenese door acetogene bacteriën (Zaher, C Bouvier et al. 2004). De methanogene archaea of methanogenen zorgen voor de methanogene stap (Hendrickson and Leigh 2008). De eerste drie fasen worden door verschillende bacteriële consortia uitgevoerd, terwijl de laatste stap wordt uitgevoerd door gespecialiseerde groepen, met name de methanogene archaea (Ziganshin et al. 2013).

De hoofdzakelijke bacteriën die voorkomen in anaerobe vergisting behoren tot de klasse van de Clostridia en het fylum van de Bacteroidetes, Firmicutes en Proteobacteria (De Vrieze et al. 2015b, Ziganshin et al. 2013). Bacteriën tot de Bacteroidetes worden vaak teruggevonden in anaerobe slib en in reactoren waarbij planten biomassa worden behandeld (Ziganshin et al. 2013). Waarbij de archaea gemeenschap vooral gedomineerd wordt door de methanogene archaea. De archaea gemeenschap wordt hoofdzakelijk gedomineerd door de methanogene Euryarchaeota en die bevat de ordes van Methanomicrobiales en Methanosarcinales. De hydrogenotrofe Methanomicrobiales zijn verwant met de Methanosarcinales orde en die bevat acetoclastische, methylootrofe en mixotrofe methanogenen. Binnenin de Methanomicrobiales zijn de volgende genera aanwezig: *Methanocelleus*, *Methanocorpusculum* en *Methanospirillum*, waarbij *Methanocelleus* het dominante genus is. De Methanosarcinales omvatten de volgende representatieve genera: *Methanosarcina*, *Methanosaeta* en *Methanomethylovorans*, met de *Methanosarcina* en *Methanosaeta* die het meest talrijk voorkomen (Ziganshin et al. 2013).

Methaan vorming vanuit acetaat kan *via* twee manieren bekomen worden. Enerzijds, de meest voorkomende techniek, betreft de acetoclastische methanogenen. Deze zorgt voor de afbraak van acetaat voor de vorming van methaan. Anderzijds kan er gebruik gemaakt worden van syntrofe acetaat oxidatie (SAO). Dit techniek bevat fermentatie van acetaat tot waterstof en koolstofdioxide, dat veroorzaakt wordt door syntrofe acetaat oxiderende bacteriën (SAOB). Waarbij waterstof gebruikt wordt door de methanogenen, waarna deze zorgt voor reductie van koolstofdioxide tot methaan (Westerholm et al. 2011).

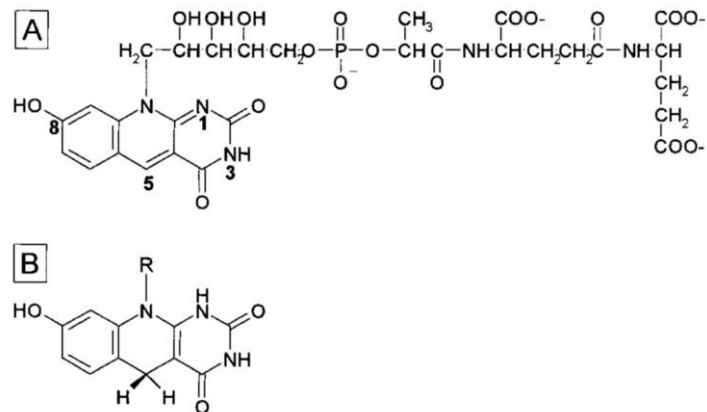
Clostridia zijn strikt anaeroob en is de meest voorkomende bacteriële klasse. Deze bacteriën spelen zowel in de hydrolyse als in de acetogenese en acidogenese een belangrijke rol en zijn eveneens betrokken bij de syntrofe acetaat oxidatie (Ziganshin et al. 2013). Syntrofie vindt plaats wanneer energie limitatie ontstaat, hierdoor zal de samenwerking tussen twee micro-organismen plaatsvinden. Dit laatste is belangrijk voor

het behouden van de microbiële activiteit, omdat de micro-organismen afzonderlijk niet in staat zijn om deze activiteit te behouden (De Vrieze et al. 2015b). De meest gekende SAOB behoren bijna allemaal tot de Clostridia. Hierbij waren vooral *Clostridium thermocellum* en *Clostridium stercoarium* geïdentificeerd als de belangrijkste organismen in de hydrolyse van planten biomassa. *Clostridium thermopalmarium* wordt hoofdzakelijk teruggevonden in de boterzuur productie bij de behandeling van afvalwater (Ziganshin et al. 2013). Een verandering in de samenstelling van de SAOB wordt veroorzaakt door een stijgende niveau aan ammoniak (Westerholm et al. 2011).

3. F₄₂₀ co-enzym

3.1 Inleiding

Het F₄₂₀ co-enzym (Figuur 6) is een hybride drager die teruggevonden kan worden in archaea en in hoge G+C gram positieve bacteriën, zoals *Streptomyces* en *Mycobacterium*. Dit co-enzym is essentieel voor de energie metabolisme van methanogene archaea (Forouhar et al. 2008). Er bestaat een grote diversiteit aan methanogene archaea die een belangrijke rol spelen in de anaerobe vergisting in de methanogenese, waarbij de omzetting van waterstof en andere intermediären naar methaan plaatsvindt. Hierbij zullen de hydrogenotrofe methanogenen, waterstof gebruiken voor de reductie van CO₂ naar methaan, maar ze kunnen eveneens formaat en andere alcoholen met een laag moleculaire gewicht gebruiken (Hendrickson and Leigh 2008). De FMN 5-deazaflavine analoog is een F₄₂₀ co-enzym (Whitmore et al. 1986). Dit F₄₂₀ co-enzym komt voor in bijna alle methanogene archaea (Hendrickson and Leigh 2008). Het co-enzym wordt enkel teruggevonden in de methanogenen bij anaerobe vergisting. Het speelt daarin een sleutel rol in het metabolisme als een elektronen drager in zowel de anabole als katabole redoxreacties (Dolfing and Mulder 1985). Het speelt een belangrijke rol in het metabolisme op drie verschillende manieren: (1) als een primaire elektronenacceptor van waterstof of formaat van hydrogenase of formaat hydrogenase; (2) als een elektronendonor van twee belangrijke reacties waarbij CO₂ ingebouwd wordt in de koolstof synthese van cellen, namelijk de pyruvaat dehydrogenase en de α-ketoglutamaat dehydrogenase; (3) als een rechtstreekse elektronendonor van het methylco-enzym M reductase systeem, wat de finale stap van methanogenese voorstelt (Vogels et al. 1982). Het heeft een essentiële rol als elektronendonor in de stap van methanogenese waarbij methylenetetrahydrodomethanopterin gereduceerd wordt. Dit dient voor de reductie van CO₂ naar CH₄, waarbij gedurende de methanogenese vanuit H₂ en CO₂, de F₄₂₀H₂ ontwikkeld zal worden, door de F₄₂₀ reducerende hydrogenase. Het CH₄ vereist de gereduceerde vorm van F₄₂₀ (F₄₂₀H₂). Dit laatste stelt een intermediaire elektronendonor voor (Hendrickson and Leigh 2008), maar het komt voor als elektronenacceptor in de formiaat waterstof lyase systeem van M. reductase in de finale stap van de methanogenese (Vogels et al. 1982).



Figuur 6: Structuur van het F₄₂₀ co-enzym, (A) vertoont de geoxideerde vorm, fluorescente vorm en (B) vertoont de gereduceerde vorm van het co-enzym, de niet fluorescente vorm (Ashby et al. 2001).

Er zijn echter verschillende soorten F₄₂₀ co-enzymen bekend en deze bevatten allemaal een 7,8-dimethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavine chromofloor met een verlengde zijketen dat een melk- en glutaminezuur residu omvat (Dolfing and Mulder 1985). De triviale naam van F₄₂₀ is ontstaan doordat het absorptie maximum van de geoxideerde vorm plaatsvindt bij 420 nm. Deze molecuule vertoont een blauw-groene fluorescentie bij 470 nm. Deze fluorescentie wordt ook door andere onderzoekers gebruikt voor de identificatie van methanogene archaea (Ashby et al. 2001). Het F₄₂₀ co-enzym wordt niet enkel gebruikt om de aanwezigheid van methanogenen aan te tonen en het speelt niet enkel een cruciale rol in de methanogenese, maar het wordt ook in biosynthese van antibiotica en DNA herstel gebruikt (Frouhar et al. 2008).

3.2 Detectie

Er bestaan verschillende mogelijkheden voor de detectie van het F₄₂₀ co-enzym. Voor deze detectie is het vaak noodzakelijk om eerst een extractie uit te voeren van het F₄₂₀ co-enzym in de te onderzoeken cellen, voordat de detectie kan plaatsvinden.

3.2.1 Spectrofluorometer

Bij het gebruik van een spectrofluorometer als onderzoekstool kunnen de meeste spectrofluorometer metingen plaatsvinden voor zowel de fluorescentie excitatie als emissie spectra (Britton and Legallais 1967). Een emissie spectrum is de verdeling van de golflengtes die bekomen wordt door de emissie te meten bij een enkelvoudige constante excitatie golflengte. Een excitatie spectrum is net het tegenovergestelde, dit spectrum is afhankelijk van de emissie-intensiteit die gemeten wordt bij een enkelvoudige emissie golflengte. De bekomen spectra kunnen weergegeven worden op een schaal op basis van de golflengte of golfgetal (Lakowicz 1999). Wanneer dit wordt gebruikt voor de detectie van het co-enzym, dient er eerst een extractie te gebeuren van de cellen. In het supernatans zit het F₄₂₀ co-enzym, hierbij dient de bekomen supernatans eerst op pH gebracht te worden (Dolfing and Mulder 1985). Daarna wordt het bekomen supernatans op een kolom gebracht van een ionenuitwisselaar. De kolom wordt geëluëerd en op deze manier blijven

de co-enzymen op de kolom. Alle andere componenten worden verwijderd van de kolom. Daarna wordt de kolom opnieuw gewassen met een buffer, en de bekomen vloeistof na wassing bevat de co-enzymen. Met deze bekomen vloeistof kunnen de fluorescentie metingen uitgevoerd worden om het F_{420} gehalte te bepalen (Ashby et al. 2001).

3.2.2 Spectrofotometer

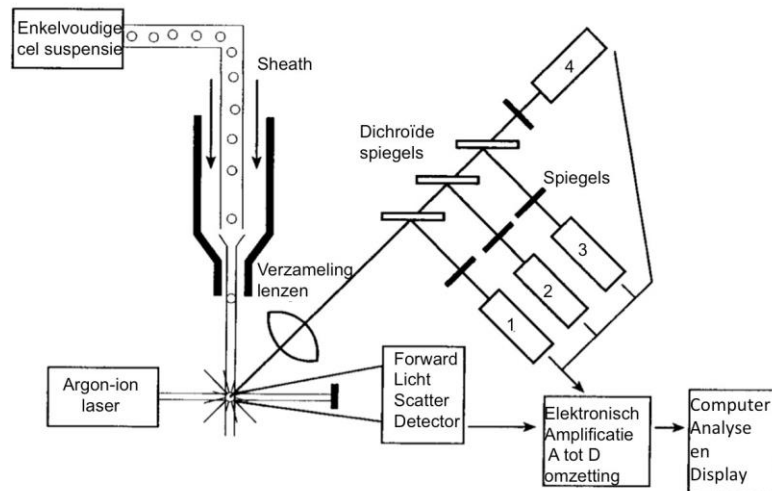
Wanneer een spectrofotometer gebruikt wordt als detectie voor het F_{420} co-enzym, wordt de absorbantie gemeten. De excitatie vindt plaats bij 420 nm, terwijl de emissie plaatsvindt bij 470 nm (van Beelen et al. 1983). Hiervoor dient net als bij een spectrofluorometer extractie van de te onderzoeken cellen uitgevoerd te worden, waarvan het bekomen supernatans op pH dient gesteld te worden. Deze pH aanpassing zorgt ervoor dat het supernatans op de juiste pH wordt gebracht. Hierdoor kan er een onderscheid gemaakt worden tussen de gewenste en ongewenste componenten. De bekomen extractie wordt aan een kolom gebracht, waarbij de componenten worden gescheiden. De kolom wordt gewassen met een buffer. De bekomen vloeistof na het wassen bevat de co-enzymen, waarna het absorbantie spectrum wordt gemeten van 350 tot 450 nm (Whitmore et al. 1986).

3.2.3 Dunne laag elektroforese

Als detectiemethode kan ook dunne laag elektroforese gebruikt worden. Hierbij worden dunne platen gebruikt voor elektroforese (Cheeseman et al. 1972). Deze techniek wordt meestal toegepast wanneer er meerdere componenten worden onderzocht en de zichtbare UV spectra van de verschillende componenten gelijkaardig zijn (Eirich et al. 1979).

3.2.4 Flowcytometrie

Flowcytometrie kan ook gebruikt worden voor de detectie van het co-enzym F_{420} . In Figuur 7 is een schematische voorstelling van een flowcytometrie weergegeven. Deze techniek laat een snelle en objectieve vergelijking tussen de microbiële gemeenschap toe, gebaseerd op de cellulaire kenmerken van enkel cellen binnenin dergelijke gemeenschappen (De Roy et al. 2012). Het meet de optische en fluorescente karakteristieken van cellen (of andere delen die nuclei, micro-organismen, chromosoom preparaten of latex beads bevatten) (Brown and Wittwer 2000). Flowcytometrie kan gebruikt worden om het totaal aantal bacteriële cellen te bepalen (De Roy et al. 2012). Fysieke eigenschappen zoals grootte en interne complexiteit kunnen van welbepaalde cel populaties bepaald worden (Brown and Wittwer 2000).



Figuur 7: Schematische weergaven van een flow cytometer (aangepast naar Nederlands) (Brown and Wittwer 2000).

Er is ook een brede range van fluorescente kleurstoffen beschikbaar voor het analyseren van verschillende bacteriële kenmerken (De Roy et al. 2012). Deze binden of intercaleren met verschillende cellulaire componenten, zoals DNA of RNA. Bovendien kunnen antilichamen geconjugeerd worden met fluorescente kleurstoffen en op deze manier binden met specifieke proteïnen op de celmembraan of binnenin de cellen. Wanneer gemarkeerde cellen langs een lichtbron passeren, zullen de fluorescente moleculen exciteren naar een hogere energieniveau. Dit hogere energieniveau is echter niet stabiel, waardoor deze terugkeren naar het oorspronkelijke energieniveau. Bij de terugkeer wordt er door de fluorochromen energie vrijgesteld onder de vorm van licht. Het vrijgestelde licht heeft een hogere golflengte maar een lagere energie hoeveelheid. Door gebruik van verschillende fluorochromen, met elk een gelijkaardige excitatie golflengte en verschillende emissie golflengtes, kunnen op deze manier verschillende cellen simultaan gemeten worden (Brown and Wittwer 2000). Het voordeel bij het gebruik van deze techniek is dat het een korte analysetijd heeft, voor welbepaalde samples kan de analysetijd zelfs onder de 20 min vallen (De Roy et al. 2012).

Binnenin een flowcytometrie zijn de cellen in suspensie. Deze worden in een stroom meegetrokken die gecreëerd wordt door de omliggende omhulsel van isotonische vloeistof die op zijn beurt een laminaire stroom veroorzaakt. Dit alles laat de passage van individuele cellen toe door een punt, waarbij dit punt de verschillende cellen indeelt. Op dit punt wordt er een straal monochromatisch licht doorgelaten dat de cellen doorsnijdt. Dit monochromatisch licht is meestal afkomstig van een laser. Geëmitteerde licht straalt in alle richtingen uit en dit wordt door een lens opgevangen, waarna het verzamelde licht door verschillende filters en dichroïde spiegels gaat, dat zorgt voor het afzonderen van de verschillende golflengtes. Het lichtsignaal wordt gedetecteerd door een tube die zorgt voor het vermeerderen van de fotonen en digitaliseert het voor computer analyse. De bekomen resultaten worden meestal teruggegeven in een histogram of een twee-dimensioneel punten diagram (Brown and Wittwer 2000).

3.3 Toepassingen

Het F_{420} co-enzym komt enkel voor in methanogene archaea in anaeroob slib. Doordat dit co-enzym enkel voorkomt in de methanogene archaea, kan hierdoor de activiteit van deze methanogenen bepaald worden (Dolfing and Mulder 1985). Hierdoor kan de activiteit van de methanogenen in verschillende omgevingen bepaald worden (Whitmore et al. 1986). Het autofluorescent F_{420} co-enzym kan ook gebruikt worden als autofluorescente marker in de voedselveiligheid, voor de detectie van fecale contaminatie. De methanogene archaea komen namelijk voor in de darm van dieren, vanwege de anaerobe omgeving. Humane voedsel pathogenen komen mogelijks voor in feces van de veestapel, hierdoor kunnen karkassen van dieren tijdens het slachten gecontamineerd worden. Fecale contaminatie kan eveneens optreden tijdens de productie van het vlees. Wanneer autofluorescentie van dit co-enzym optreedt, wijst dit op fecale contaminatie van het voedselproduct (Ashby et al. 2001). Er kan nagegaan worden of het F_{420} co-enzym eveneens kan aangewend worden om de activiteit van de methanogenen te bepalen in anaerobe vergisting. Dit zou uitgevoerd kunnen worden om het proces beter op te volgen en op dergelijke manier een betere en meer rechtstreekse inschatting en controle te krijgen over het proces.

DOELSTELLING

Het eerste deel van dit onderzoek focuste zich vooral op de detectie van het F_{420} co-enzym, dat enkel aanwezig is in de methanogene archaea in een vergister, met behulp van de flow cytometer. Optimalisatie van de gebruikte detectiemethode was hierbij een cruciaal aspect. Het tweede deel betrof het onderzoeken of deze flowcytometrie methode kon gebruikt worden om een verandering in de methanogene gemeenschap te detecteren. Het F_{420} co-enzym in deze micro-organismen is autofluorescent en speelt een centrale rol in de productie van biogas. De gestelde hypothese hierbij was dat mogelijke veranderingen in het F_{420} co-enzym profiel konden optreden in de omstandigheden die konden leiden tot inhibitie van de methanogenen. Doordat het co-enzym enkel voorkwam in de methanogene archaea, kon een wijziging in het F_{420} co-enzym profiel een aanwijzing geven dat er ongewenste omstandigheden zich voordeed in de reactor. Door deze aanwijzing van mogelijks veranderende condities binnenin de reactor, kan er tijdig ingegrepen worden. Op die manier kan de voortgang van de ongewenste omstandigheden voorkomen worden en kan inhibitie van de cruciale micro-organismen vermeden worden.

De gestelde onderzoeksvragen omtrent de detectie en optimalisatie van het F_{420} co-enzym en het gebruik van de flow cytometer voor de detectie van de methanogene gemeenschap werd benaderd door gebruik te maken van twee UASB reactoren. Deze werden eerst onder steady state conditie gelopen, waarna zout als stress factor voor de microbiële gemeenschap werd toegepast in één van de reactoren, terwijl de andere als controle werd gebruikt. Hierbij werd er gebruik gemaakt van het zout natriumchloride.

Het afvalwater dat de reactoren binnenging om te zuiveren was een verdunde melasse afvalstroom. Er werd voor melasse gekozen omdat dit een hoog gehalte aan organische stof bevatte. Deze bevatte hoofdzakelijk suiker. Het behandelen van melasse afvalstromen wordt in de toekomst eveneens steeds belangrijker, het bekomen van melasse afvalstromen wordt steeds groter.

Verschillende analyses werden uitgevoerd op het effluent van beide reactoren, in functie van tijd, en werden met elkaar vergeleken. Voor de analyses met de flow cytometer werd zowel het effluent als het granulair slib in de UASB reactor gebruikt. Dit slibstaal diende als positieve controle, zodat er met zekerheid kon gezegd worden dat er wel degelijk methanogene archaea aanwezig waren in de reactor. Dit staal diende tevens ter bevestiging dat hetgeen dat gemeten werd door de geoptimaliseerde methode van de flow cytometer wel degelijk de aanwezige methanogene archaea in de reactoren waren.

Lambrecht et al. (2017) hadden reeds een eerste aanzet gedaan naar de detectie van het co-enzym F_{420} . Voor de beantwoording van de eerste vraag, werd er gebaseerd op deze methode. Hierbij vond er een optimalisatie plaats van deze methode van Lambrecht et al. (2017) met de flow cytometer om dan vervolgens de tweede onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden.

MATERIAAL EN METHODE

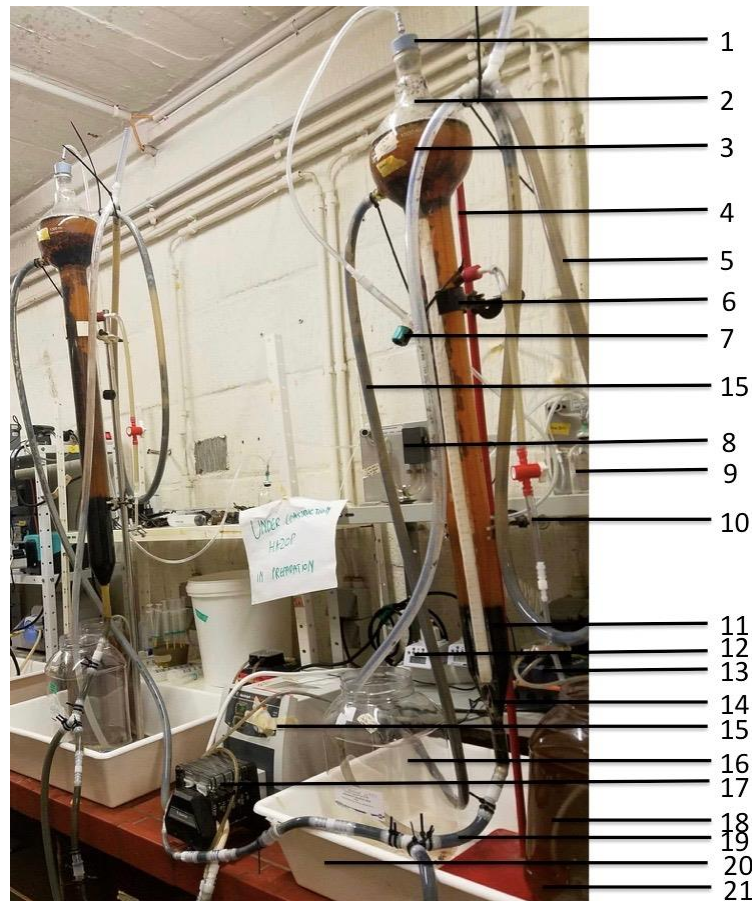
1. Experimentele toenadering

Het onderzoek werd in twee fasen uitgevoerd. In de eerste fase van het experiment werden twee reactoren onder steady state gelopen. Deze twee reactoren werden in parallel naast elkaar gelopen om de reproduceerbaarheid van beide reactoren te valideren. Op deze manier kon in fase 2 de ene reactor als control dienen, terwijl in de andere reactor zoutstress werd toegepast. Op hetzelfde moment werd ook het effluent van de UASBs vergeleken met het slib uit de reactor.

2. Proefopzet

2.1 Experimentele opstelling

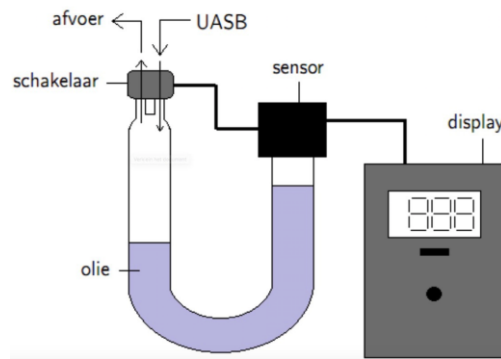
Bij de experimentele opzet (Figuur 8) werd er gebruik gemaakt van twee UASB reactoren, met een inhoud van 2 L. Eenzelfde opstelling werd toegepast voor beide reactoren. De reactor (2) werd geïnoculeerd met anaeroob slib (11), onderaan de reactor bevond zich een knikker (14) die het verlies van slib voorkwam. Op basis van twee kleppen (6) werd de reactor aan een statief (4) vastgehangen. Deze werd in een bak (20) geplaatst, zodat wanneer dit zou overlopen, er kon voorkomen worden dat de omliggende omgeving nat werd. De reactoren werden *via* tubing (19) verbonden met één peristaltische pomp (Heidolph instrument, pumpdrive 5001, Schwabach, Duitsland), die diende voor recirculatie van het slib. De verbinding tussen de tubing en de pomp gebeurde door middel van “cassetten” (17) die aangesloten werden op de pomp. Elke reactor was verbonden met een pomp (Prominente pomp, Heidelberg, Duitsland) (13) en deze pompen diende voor het inpompen van het influent in de reactor. De momenten waarop het influent werd ingepompt, werd vastgelegd met behulp van timers (12). De timers werden ingesteld op de tijdstippen waarop de influent diende ingepompt te worden. De reactoren werden bovenaan voorzien van een rubberen stop (1) en in deze stop zat een naald en was *via* een connector verbonden met de tubing. Het geproduceerde biogas werd bovenaan de reactor *via* tubing naar de penicilline flesjes (9) geleid, waarna deze het gas *via* tubing naar de gasteller (8) gebracht werd. Na de telling werd het aanwezige biogas *via* tubing veilig verwijderd naar een afzuigstelsel. Het influent werd vanuit het vat (21) *via* een influent tubing (18) met de Prominente pomp onderaan de reactor gebracht. Hierna werd langs boven het bekomen effluent *via* een effluent tubing (3) verwijderd en opgevangen in een effluent vat (16). Het loop systeem (5) zorgde ervoor dat geen lucht binnenin de reactor kon dringen en dit gelde eveneens voor (10), dit bestond uit een drieweg kanaal met tubing en een klem om zuurstof intrusie in de reactor te voorkomen. Dit was nodig om voortdurend onder anaerobe conditie te blijven. Gasstalen voor de analyse werd *via* een spuit genomen uit (7).



Figuur 8: Experimentele opstelling, de linkse reactor is reactor 1, de rechtse reactor stelt reactor 2 voor.

De inoculatie van het slib in de reactor werd uitgevoerd op basis van het bekomen VSS gehalte van het slib. Dit bedroeg 34,20 g/L, hierbij was de gewenste concentratie in de reactor 5,00 g VSS/L. Om dit te bekomen diende er een inoculatie van 300,00 g slib bekomen te worden. Het slib werd tweemaal geïnoculeerd in beide reactoren. Bij de eerste inoculatie werd 300,0 g granulair slib geïnoculeerd. Door de hevige uitspoeling van de slibkorrels in beide reactoren, was een grote hoeveelheid van het slib verloren gegaan (ongeveer 200,0 g). Hierdoor werden de reactoren gestopt over een periode van 9 dagen (tussen de theoretische dag 39 en dag 40, bij de resultaten). De uitspoeling zorgde voor een tweede inoculatie van beide reactoren, met 300,0 g granulair slib. Door de sterke aanhoudende uitspoeling van reactor 1, werd hierdoor een derde inoculatie teweeggebracht voor reactor 1, opnieuw met 300,0 g granulair slib.

De hoeveelheid geproduceerde gas werd bepaald met een huisgemaakte (Universiteit Gent, Figuur 9) gasteller. Dit gebeurde door in een U-vormige buis ongeveer 15 mL minerale olie toe te voegen, waarna het gas dat binnenkwam langs de ene kant, de olie omhoog duwde langs de andere kant tot deze een detector bereikte. Bij het bereiken van de detector gaf deze een klik en werd het binnenkomende gas weggelaten. Op deze manier werd door het gekende volume gas in de buis en het aantal klikken de hoeveelheid geproduceerd biogas bepaald.



Figuur 9: Opbouw gasteller (Van Meerbergen 2011).

2.2 Influent

Het influent bestond uit melasse, hierbij werd er verschil gemaakt tussen melasse van batch 1 en 2. Dit bevatte respectievelijk onverdund 454,28 g CZV/kg en 429,53 g CZV/kg. Zoals in de doelstelling was weergegeven, bestond het onderzoek uit twee fasen. In de eerste fase werden beide reactoren onder steady state gelopen, waarbij een CZV gehalte van 10 g CZV/L in het influent beoogd werd. Hierbij werd begonnen aan een organische belasting van 1 g CZV/L/dag, waarna deze steeds na één week opgedreven werd tot 5 g CZV/L/dag (Tabel 1). Het opdrijven gebeurde door het aanpassen van de hoeveelheid ingepompte influent en dit werd verhoogd van 200 mL/dag naar 1000 mL/dag, waarbij er in stappen van 200 mL werd gewerkt. Aangezien de melasse 454,28 g CZV/kg en 429,53 g CZV/kg bevatte, werd 22,02 g melasse opgelost in 1 L H₂O om een finale concentratie van 10,00 g CZV/L te verkrijgen. Hierbij werd op maandag en donderdag vers influent aangemaakt voor 3 en 4 dagen. Naarmate de organische belasting van het influent veranderden, ging eveneens de hydraulische retentie tijd veranderen, dit ging dalen met een stijgende organische belasting (Tabel 2). In de tweede fase van het onderzoek werd in het influent van één van de reactoren (reactor 1) zout toegevoegd, waardoor de micro-organismen in deze reactor geïnhibeerd werden. Hierbij werd er vertrokken vanuit 1 g Na⁺, dit stemde overeen met 12,7 g NaCl/L. Hierbij werd deze naarmate de tijd opgedreven (Tabel 1). De andere reactor bleef onder dezelfde omstandigheden als in fase 1 van het onderzoek opereren.

Tabel 1: Overzicht van de theoretische samenstelling in functie van de tijd, van het influent voor beide reactoren.

Tijd (weken)	Organische belasting (g CZV/L)	Na ⁺ additie (g Na ⁺ /L)
1	1,00	/
2	2,00	/
3	3,00	/
4	4,00	/
5 tot 19	5,00	/
20	5,00	1
21 tot 22	5,00	5
23	5,00	10
24	5,00	15

25	5,00	20
----	------	----

Tabel 2: De theoretische hoeveelheid ingepompte influent in de reactoren in functie van de tijd, met de bijhorende theoretische HRT.

Tijd (weken)	Theoretisch ingepompte influent (mL/dag)	Theoretische HRT (dagen)
1	200	5
2	400	4
3	600	3
4	800	2
5 tot 25	1000	1

2.3 Analyses

Er werden verschillende analyses op de melasse en slib uitgevoerd om deze uitgebreid te karakteriseren. Telkens bij het verversen van de voeding, werden enkele analyses uitgevoerd op beide reactoren. Deze analyses waren noodzakelijk, aangezien deze toelieten om de operationele condities (e.g., pH, VVZ en biogas samenstelling) van de reactoren te bepalen. De onderstaande procedures werden telkens voor één staal besproken, de andere stalen ondergingen exact dezelfde procedure.

2.3.1 Totale gesuspendeerde vaste stof en vluchtige gesuspendeerde vaste stof

Het totale gesuspendeerde vaste stof (TSS) en vluchtige gesuspendeerde vaste stof (VSS) werden bepaald voor het staal. Het TSS bepaalde de totale hoeveelheid zwevende stof die afgescheiden kon worden uit de waterfase door centrifugatie of filtratie, terwijl het VSS de hoeveelheid organisch materiaal aanwezig in het staal bepaalde. Eerst werd een kroes genomen en werd deze in de droogoven (Memmert, Schwabach, Duitsland) geplaatst gedurende 1 uur. Daarna werd deze overgebracht in de dessicator, gedurende 10 min, zodat de kroes voldoende droog was, waarna het gewicht van de kroes bepaald werd (A). Het staal werd in een Falcon tube of een andere tube gebracht, de hoeveelheden over de verschillende tubes moesten gelijkaardig zijn, deze mochten maximaal 0,20 g van elkaar verschillen. Deze tubes werden in de centrifuge (Thermo Science, Sorval RC6+ Centrifuge, Waltham, Amerika) geplaatst, bij 17 090 G gedurende 10 min, waarna het supernatans verwijderd werd. Er werd gedestilleerd water toegevoegd aan de tube om de pellet te wassen, waarbij opnieuw het evenwicht tussen de Falcons gelijkaardig moest zijn, deze werden opnieuw gecentrifugeerd aan dezelfde condities. Hierna werd opnieuw het supernatans verwijderd. Het overige staal in de tube werd kwantitatief in de kroes overgebracht. De gevulde kroes werd opnieuw in de droogoven geplaatst, temperatuur tussen 105°C á 110°C, minimale incubatietijd was 12 uur. Daarna werd het gedroogd in de dessicator gedurende 1 uur, waarna het gewicht opnieuw bepaald werd (B). De kroes werd dan overgebracht naar een moffeloven (Nabertherm, GmbH, Lilienthal, Duitsland) bij een temperatuur van 550°C, gedurende 1,50 uur. Opnieuw werd het daarna afgekoeld in dessicator en het gewicht bepaald (C).

De onderstaande formules werden gebruikt voor de bepaling van de hoeveelheid TSS en VSS:

$$\frac{TSS}{L} = \frac{(B - A) \times 10^6}{\text{volume staal (mL)}}$$

$$\frac{VSS}{L} = \frac{(B - C) \times 10^6}{\text{volume staal (mL)}}$$

2.3.2 Totale droge stof en totale vluchtige stof

Het totale droge stof (TS) en totale vluchtige stof (VS) werd van het staal bepaald. Het TS bepaald namelijk het totale droge stof gehalte dat aanwezig was in het staal, zowel de organische als de anorganische fractie. Het VS bepaalde de organische fractie die aanwezig was in het staal.

Voor de bepaling van het TS en VS gehalte werd er op eenzelfde manier tewerk gegaan als voor de bepaling van TSS en VSS. Met het verschil dat hier geen centrifugatie stap van de stalen nodig was.

De onderstaande formules werden gebruikt voor de bepaling van het percentage aan TS en VS:

$$TS (\%) = \frac{C - A}{B - A} \times 100$$

$$VS (\%) = \frac{C - D}{B - A} \times 100$$

2.3.3 Kjeldahl stikstof

De Kjeldahl stikstof (TKN) omvatte enkel organische stikstof en totale ammoniakale stikstof (TAN). Vooraleer de eigenlijke metingen konden uitgevoerd worden, diende eerst een gepaste verdunning gemaakt te worden. Waarbij er max 6,00 mg N/Kjeldahl tube mocht aanwezig zijn. Ondertussen kon het destructie blok (Velp Scientifica, DKL heating digester, Usmate (MB), Italië) opgewarmd worden tot een temperatuur van 150°C. Er werden twee blanco's gebruikt, deze bevatten 20 mL gedestilleerd H₂O en onderging dezelfde procedure als de stalen, met het verschil dat deze geen stikstof bevatten. Uit de kolf van de verdunde stalen werd 2 mL oplossing genomen en werd deze in een Kjeldahl tube overgebracht, waaraan ongeveer 18 mL gedestilleerd H₂O werd toegevoegd om de randen van de tube te spoelen. Hieraan werd 10 mL zwavelzuur en een Kjeldahl tablet toegevoegd. De Kjeldahl tablet bevatte 5,00 g K₂SO₄, 0,50 g CuSO₄ * 5 H₂O/tablet. Deze tube werd dan naar het voorverwarmde destructie blok gebracht. Door deze destructie stap werden alle aanwezige N omgezet naar ammonia. Het ventilatiesysteem werd gekoppeld aan de tube in de trekkast voor de afvoer van mogelijks zure dampen. Daarna werd de temperatuur verhoogd tot 400°C, en deze temperatuur werd aangehouden gedurende 2 uur, totdat het een doorzichtig blauwe kleur gaf aan de oplossing. Waarna dit afgekoeld werd, en 10 tot 20 mL gedeïoniseerd water werd toegevoegd, om de kristallen op te lossen en om het vast worden van het staal te voorkomen. Waarna de eigenlijke destillatie kon plaatsvinden. Vooraleer de destillatie van de stalen uitgevoerd kon worden met het destillatie toestel (Gerhardt, Vadopest 30S, Königswinter, Duitsland), diende deze eerst 3x gereinigd te worden met gedestilleerd water. Voor de destillatie van de uiteindelijke staal werd hiervoor eerst 20 mL van een boorzuur indicator, bevatte een pH van 5,3, aan de tube toegevoegd. Dit laatste stap diende als overdestillatie van de gevormde ammonia,

om dit in de gasfase te brengen, waarbij NaOH toegevoegd werd en opgevangen werd in boorzuur. De pH van het boorzuur ging stijgen door de opgevangde ammonia, waarna deze oplossing getitreerd werd met HCl door een automatische titratie systeem (Metrohm, 719S Titero, Herisau, Zwitserland), om de hoeveelheid aanwezige NH₃ na te gaan. Tijdens de titratie zou er in de oplossing geroerd worden door de 728 Stirrer.

2.3.4 Total ammoniakale stikstof

Om de organische stikstof te bepalen van een welbepaald staal, diende hiervoor ook de TAN bepaald te worden. Hiervoor werd het staal in de Kjeldahl tube gebracht. Hierna werd op eenzelfde manier te werk gegaan als bij de Kjeldahl stikstof bepaling, met het verschil dat MgO in elke tube toegevoegd werd in plaats van NaOH om de pH te verhogen voor de destillatie.

2.3.5 pH

De pH werd met een Consort C5010 pH probe bepaald. Bij de start van de week werd de probe steeds gekalibreerd, hiervoor werd op het toestel op CAL gedrukt waarbij de pH van de buffer aangegeven werd door het toestel. De pH probe werd dan in de gevraagde pH buffer ondergedompeld. Dit werd voor drie verschillende pH waarden uitgevoerd, respectievelijk pH 4,0; 7,0 en 9,0. Waarna het toestel na deze drie pH metingen gekalibreerd werd.

2.3.6 Chemische zuurstofverbruik

Het chemische zuurstofverbruik bepaalde de hoeveelheid oxideerbaar organisch materiaal in een welbepaald staal.

Voor de bepaling van het CZV gehalte van het staal, diende vaak eerst een 2x, 50x of 100x verdunning gemaakt te worden afhankelijk van de onderzochte staal. Dit verdunde staal werd dan toegevoegd aan de Nanocolor tubes (Machery-Nagel, Düren, Duitsland) met een concentratierange van 10000 – 15000 mg O₂/L, waarna deze opgewarmd werd tot 148°C en deze temperatuur werd aangehouden gedurende 2 uur. Na opwarming werd het staal uit de heat blok genomen en geschud, waarna het gedurende 30 min afkoelde. Na afkoeling werd het CZV gehalte bepaald, door spectrofotometrische metingen, via de Nanocolor 500D fotometer (Machery-Nagel, Nanocolor 500D, Düren, Duitsland).

2.3.7 Biogas

De hoeveelheid geproduceerde biogas werd bepaald met de gasteller. De samenstelling van het geproduceerde biogas werd eveneens bepaald. De bepaling van de hoeveelheid CH₄, CO₂ en H₂S gebeurde *via* het compact GC instrument (Global analyser solutions, Interscience, Compact GC, Louvain-la-Neuve, België). De analyse van dergelijke componenten, bestond uit drie methoden. Waarbij elk methoden specifiek voor één van de drie componenten mat. De eerste methode mat CH₄, N₂O en H₂. De tweede bedroeg CO₂, N₂ en O₂. Waarbij de laatste H₂S bevatte. Hiervoor werden telkens gasstalen genomen *via*

een spuit, waarna deze spuit op een rubberen stop geplaatst werd om menging met de lucht te voorkomen. Er werd ongeveer 3 mL gas in de compact GC gebracht voor analyse van de samenstelling van het gas.

De compact GC was voorzien van twee kanalen, elk met een eigen thermal conductivity detector (TCD detector). Het eerste kanaal bevatte twee kanalen, maar het toestel behandelde dit als één kanaal. Het was voorzien van een prekolom en een kolom, dit was respectievelijk een Molsieve 5A en Porabond Q. Met dit kanaal kon CH₄, N₂ en O₂ bepaald worden. Het tweede kanaal bevatte eveneens een prekolom en een kolom, dat respectievelijk een Molsieve 5A en Porabond Q bevatten voor het eerste kolom en twee keer een R1-Q S-bond bevatte voor het tweede kanaal. Dit laatste werd gebruikt om de CO₂, N₂O en H₂S te meten. De detectielimiet bedroeg 100 ppm.

2.3.8 *Vluchtige vetzuren*

De hoeveelheid aanwezige vetzuren werden bepaald aan de hand van de diëthyletherextractie. Een staal van 2 mL werd overgebracht in een vers buisje en hieraan werd 0,500 mL 50% H₂SO₄ toegevoegd om alle vetzuren om te zetten naar hun geprotoneerde vorm, waarna 0,40 g NaCl werd toegevoegd. Daarna werd 0,400 mL interne standaard toegevoegd. Deze laatste bevatte 1,5 mL 2-methyl capronzuur in 200 mL 0,05 M NaOH. Vervolgens werd diëthylether toegevoegd voor de eigenlijke extractie van de vetzuren naar de etherfase. Het buisje werd daarna afgesloten en gedurende 2 min geroteerd. Hierna volgde een centrifugatie (Hereaus, Labofuge 400, Waltham, Amerika) stap gedurende 3 min bij 1008 G. De bekomen ether laag in het buisje werd dan overgebracht naar een GC vial, waarna *via* de GC de samenstelling van het VVZ bepaald werd.

Hiervoor werd er gebruik gemaakt van de GC-2014 met een FID detector (Shimuda) met een automatische stalen systeem. Er werd 1 µL staal geïnjecteerd in de GC, waarna de temperatuur steeg van 110°C tot 160°C, aan een snelheid van 6°C/min. Het toestel gebruikte stikstofgas als draaggas. De temperatuur van de injector en detector bedroeg respectievelijk 200°C en 220°C. De detectielimiet van acetaat bedroeg 30 mg/L, van propionaat 10 mg/L en van de andere vluchtige vetzuren 2 mg/L.

2.3.9 *Kationen*

De concentraties van de kationen (Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) werden bepaald van de stalen. Het doel hiervan was vooral om de hoeveelheid aanwezige zouten te bepalen. De bepaling van dergelijke kationen werd uitgevoerd m.b.v. ionenuitwisseling chromatografie (IC). Hiervoor werden de stalen van 10 mL eerst gecentrifugeerd (Thermo Science, Sorval RC6+ Centrifuge, Waltham, Amerika) bij 17 090 G gedurende 10 min. Waarna het bekomen supernatans werd gefilterd met een 0,20 µm filter. Hiervan werd 0,5 mL van genomen, waarna 9,5 mL MQ water werd toegevoegd, dit gaf een 50x verdunning. Afhankelijk van het staal kon deze ook 100x verdund worden. Deze verdunning was nodig

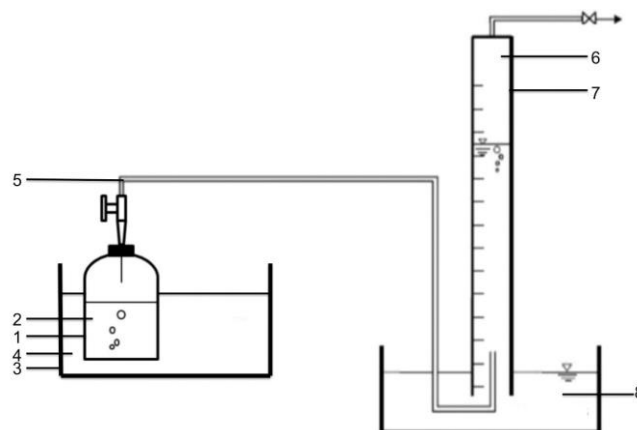
doordat het toestel slechts binnen een concentratie van 2 – 100 mg/L kon meten voor de kationen.

De bekomen stalen werden gemeten met een kation IC toestel (Metrohm, IC 761 (Cations), Herisau, Zwitserland). Dit toestel bevatte een silica gel met carboxyl groepen, en werd gebruikt om de kationen te scheiden van elkaar. Na deze scheiding werden de kationen gekwantificeerd op basis van de conductiviteit, door gebruik te maken van een kalibratie curve.

2.4 Biochemische potentiaal test

De biochemische methaan potentiaal test (BMP) zorgde voor een betrouwbare schatting van de hoeveelheid methaan, dat potentieel kon verkregen worden uit organisch afval (De Vrieze et al. 2015a).

In Figuur 10 is een schematische weergave van de opstelling weergegeven. Bij het uitvoeren van deze test, werd gebruik gemaakt van zowel een positieve als negatieve controle, dit werd in vijfvoud uitgevoerd. Hierbij werd gebruik gemaakt van penicilline flesjes (1), de positieve controle (2) bestond uit inoculum, melasse en water. De negatieve controle (2) was hetzelfde maar bevatte geen melasse. Deze flesjes werden dan afgesloten. Dit werd overgebracht naar een warm waterbad (3) (Grant, GLS Aqua 18 Plus, Shepreth, Engeland) dat een temperatuur van 37°C bevatte. Het warm waterbad bevatte een functie dat zorgde voor het schudden van de stalen in het bad, om een goede continue menging van de stalen te bekomen. Dit bad werd gevuld met gedestilleerd water (4) tot een hoogte dat ongeveer gelijk was aan het mengsel in de penicilline flesjes. Om de geproduceerde hoeveelheid biogas (6) te kunnen bepalen werden deze penicilline flesjes *via* tubing aangesloten aan gaskolommen (7), met een volume van 200 mL. Deze kolommen werden eveneens van boven afgesloten met een rubberen stop, zodat het gas niet verloren kon gaan. Deze buizen werden gevuld met HCl (8), pH lager dan 4,3. Deze buizen werden eveneens onderaan ondergedompeld met dezelfde oplossing. Deze zure oplossing voorkwam het oplossen van CO₂.



Figuur 10: Schematische weergave van de BMP test.

2.5 Flowcytometrie

Om de hoeveelheid aanwezige methanogenen *via* het F_{420} co-enzym te bepalen, werd gebruik gemaakt van flowcytometrie. De volgende stappen werden toegepast, zowel voor het slibstaal als het effluent staal. Hierbij werden eerst beide stalen gesoniceerd in het sonicatiebad (Bandelin sonorex, RK 510, Berlijn, Duitsland), waarbij dit gevuld werd met gedeïoniseerd water, gedurende 2 min, zodat alle samples, gelijkmatig waren, en dus beter konden vergeleken worden met elkaar. De stalen werden daarna gefiltreerd door een 20 μm (BD Biosciences, 20 μm Syringe Filcons Non Sterile, België) filter, hierbij werd Evian water ook gefilterd met een 0,22 μm filter. Vervolgens werd van de stalen een verdunningsreeks gemaakt van respectievelijk 10x, 100x en 1000x verdunning en na elke verdunningsstap bevond zich een vortex stap. Aan elk van de tube werd er 1 vol% van SYBR[®] Green I toegevoegd (SG, nucleïnezuur kleurstof, 100x geconcentreerd in 0,22 μm filter DMSO, Invitrogen), waarna geïncubeerd werd bij 37°C, gedurende 20 min. Het SYBR[®] Green I absorbeerde blauw licht ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$) en emitteerde groen licht ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$). Daarna werd de 100x en 1000x verdunning van het slibstaal gemeten als positieve controle en werd van het effluent staal de 100x verdunning gemeten, met de FACSVerse[™] flow cytometer (BD Biosciences, FACSVerse[™] België). Hierbij werden er $1,0 \times 10^5$ tot $5,0 \times 10^5$ cellen geteld. Op dergelijke manier kon bepaald worden hoeveel van de gehele populatie van micro-organismen wel degelijk het F_{420} co-enzym bevatte, dus m.a.w. hoeveel methanogenen er aanwezig waren. Dit instrument was voorzien van negen fluorescentie detectoren (FITC detector: $527 \pm 32 \text{ nm}$, PE-Cy7 detector: $783 \pm 56 \text{ nm}$, V450 detector: $488 \pm 15 \text{ nm}$, PE detector: $586 \pm 42 \text{ nm}$, PerCP-Cy5.5 detector: $700 \pm 54 \text{ nm}$, APC detector: $660 \pm 10 \text{ nm}$, AOC-CY 7 detector: $783 \pm 56 \text{ nm}$, V500 detector: $528 \pm 45 \text{ nm}$ en SSC detector: $488 \pm 45 \text{ nm}$), een scatter detector en een blauwe 20 mW 488 nm laser, een rode 40 mW 640 nm laser en een violet 40 mW 405 nm laser.

2.6 Statistiek

Er werden eveneens statistische testen uitgevoerd op de bekomen data met het programma SPSS Statistics 25. Hierbij werd de correlatie bepaald tussen het F_{420} co-enzymen gehalte en de volumetrische productie, waarbij eerst een normaliteitstest, met Shapiro-Wilk, werd uitgevoerd ter controle of de parametrische Pearson correlatie test kon gebruikt worden. De data werden niet normaal verdeeld, hierdoor werd de niet-parametrische Spearman's Rank test uitgevoerd. Er werden eveneens enkele testen uitgevoerd op het aantal gedetecteerde cellen met het F_{420} co-enzym, waarbij eerst de voorwaarden werden nagegaan namelijk onafhankelijke observaties, normaliteit (Shapiro-Wilk) en homoscedasticiteit (Levene's test) van de data om de parametrische test, Two sample t-test, uit te voeren. Indien deze niet voldeden, werden de alternatieve niet-parametrische test, Mann Whitney U-test, uitgevoerd. Hierbij werden de bekomen P-waarden van de testen vergeleken met een $\alpha=0,05$.

RESULTATEN

Bij het bekijken van de resultaten van de pH, volumetrische productie, methaanopbrengst en vluchtige vetzuren dient er in het achterhoofd gehouden te worden dat er ongewenste ijzer inhibitie optrad in het begin bij het lopen van de reactoren. De start van deze inhibitie was ongekend, maar de oorsprong van de inhibitie werd wel op dag 60 ontdekt, hierbij werd het metalen stukje onmiddellijk verwijderd. Er werd een tweede inoculatie uitgevoerd tussen dag 39 en 40 doordat er hevige uitspoeling optrad van het slib in beide reactoren, zonder dat de reden gekend was van dit hevige uitspoeling. Tussen dag 39 en 40 werden de reactor stilgelegd, en deze stond stil voor een periode van 9 dagen, maar hiermee werd geen rekening gehouden bij het verwerken van de resultaten. Zelfs bij hetilstaan had reactor 1 een aanhoudende sterke uitspoeling van het slib. Hierdoor vond er een derde inoculatie plaats voor reactor 1. Pas op dag 60 werd de reden van de aanhoudende uitspoeling duidelijk (veel minder sterk als daarvoor door de inoculatie) en pas vanaf dan werd het metalen stukje dat gebonden werd aan het influent tube verwijderd. Doordat er onbewust ijzer inhibitie optrad al van in het begin, betekent dit dat het bekomen van een steady state conditie nog langer zou duren dan wanneer er geen inhibitie optrad.

1. Karakteriseren van het inoculum en melasse

In dit gedeelte worden de karakteristieken van het inoculum en de melasse weergegeven. Hierbij werd er een verschil gemaakt tussen de melasse van batch 1 en 2. Het verschil tussen deze twee laatste was echter beperkt. Beide melasses kwamen van éénzelfde oorspronkelijke bron, namelijk aardappel nutrolase van het Nederlandse bedrijf AVEBE. Deze werden in afzonderlijke bidons gehouden. Doordat de ene bidon na gebruik in het eerste semester leeg was, werd er overgeschakeld naar het andere bidon, batch 1 en 2, respectievelijk.

1.1 Kjeldahl en totale ammoniakale stikstof

De Kjeldahl stikstof bevatte zowel de organische stikstof als de totale ammoniakale stikstof. De TAN gaf de stikstof weer die voorkwam onder de vorm van ammoniak. De TKN werd enkel bepaald voor de melasse van batch 1, terwijl de TAN bepaald werd voor zowel het slib als de melasse van batch 1. De reden waarom de TKN niet bepaald werd van het slib was omdat de organische stikstof die aanwezig was in de biomassa niet vrijgesteld werd, deze biomassa werd enkel gebruikt om de stikstof aanwezig in de melasse om te zetten. Hierbij werd het TAN van het inoculum op twee manieren bepaald, enerzijds door titratie en anderzijds door de kation IC. De reden hiervoor was doordat de bekomen resultaten bij titratie niet voldoende betrouwbaar waren, hierdoor werd deze nogmaals bepaald door kation IC. De TKN en TAN van de melasse van batch 2 werden nooit bepaald, doordat beide melasse gelijkaardig waren in CZV gehalte, werd van hier uit gegaan dat de TKN ook gelijkaardig zou zijn.

In Tabel 3 zijn de bekomen gemiddelde waarden met standaarddeviatie weergegeven. Hierbij was het duidelijk dat de TKN waarde van melasse veel groter was dan de TAN waarde. Dit was vanzelfsprekend, doordat TAN een deel uit maakt van de TKN waarde. Hieruit kon afgeleid worden dat de hoeveelheid stikstof aanwezig in melasse onder de ammoniak vorm slechts beperkt was.

Tabel 3: De gemiddelden van de TKN en TAN waarden met de bijhorende standaarddeviatie van melasse en slib.

		TKN (g N/L)	TAN (g N/L)
Melasse (batch 1)	Titratie	28,05 ± 2,28	1,43 ± 0,04
Inoculum	Kation IC	/	0,46 ± 0,01

1.2 Totale gesuspendeerde vaste stof, vluchtige gesuspendeerde vaste stof, totale gesuspendeerde stof, vluchtige gesuspendeerde stof, chemische zuurstof vraag

De totale gesuspendeerde en vluchtige gesuspendeerde vaste stof werd bepaald van het slibstaal. De totale en vluchtige gesuspendeerde stof van de melasse werd eveneens bepaald. Het TSS bepaalde de hoeveelheid aanwezige zwevende organische en anorganische stof in het slib. Het VSS werd gebruikt om de hoeveelheid biomassa te bepalen. Het TS en VS werden enkel bepaald van de melasse van batch 2. TS bepaalde de totale hoeveelheid organische en anorganische stof. Het VS bepaalde de hoeveelheid organische stof dat aanwezig was in de melasse. Het CZV gehalte van de melasse van batch 1 en 2 werd eveneens bepaald. Het CZV mat de hoeveelheid zuurstof die nodig was om de aanwezige organische materiaal in het afvalwater te oxideren. Hierbij werd eveneens het TSS en VSS gehalte bepaald van de biomassa aanwezig in beide reactoren (effluent samen met het slibbed), dit werd bekomen na afbraak van de opstelling. Bij het nemen van deze laatste stalen, werd er onderscheid gemaakt in de inhoud die rechtstreeks werd opgevangen en inhoud die niet rechtstreeks uit de reactor te krijgen was, waardoor de overige inhoud met het uitgaande effluent werd gespoeld. Deze bepaling werd telkens in drievoud uitgevoerd, de weergegeven waarden stellen het gemiddelde voor. Hierbij werden enkel de stalen die rechtstreeks uit de reactor kwamen beschouwd.

In Tabel 4 kunnen de gemiddelde TSS en VSS waarden met de bijhorende standaarddeviatie van het slib teruggevonden worden. Hierbij was het duidelijk dat het TSS gehalte groter was dan het VSS, dit is logisch doordat VSS een deel uitmaakte van het TSS. Hierbij was het TSS en VSS gehalte van het inoculum groter dan deze van de inhoud van de reactor, dit kwam omdat dit laatste een mengsel was van zowel inoculum als effluent, terwijl het staal van het inoculum, puur en alleen inoculum bevatte.

Tabel 4: Overzicht van de gemiddelde TSS en VSS waarden met de bijhorende standaarddeviatie van het slib en inhoud van de reactor

	Inoculum	Inoculum met effluent	
		Reactor 1	Reactor 2
		Oorspronkelijk	Oorspronkelijk
TSS (g TSS/L staal)	37,29 ± 4,98	4,67 ± 1,27	4,68 ± 0,61
VSS (g VSS/L staal)	34,23 ± 4,33	3,98 ± 1,02	3,98 ± 0,45

In Tabel 5 kunnen de gemiddelde TS, VS en CZV waarden met de bijhorende standaarddeviatie van de melasse teruggevonden worden. Hierbij werd enkel het TS en VS waarden weergegeven van batch 2, doordat de bekomen waarden voor batch 1 onbetrouwbaar waren. Het TS gehalte was hoger dan het VS gehalte, dit is logisch doordat het VS deel uitmaakt van het TS. Wanneer het VS met het CZV vergeleken wordt, kan er een licht verschil opgewerkt worden. Dit kwam doordat beide methodes een andere techniek vereisten, waardoor op dergelijke manier de experimentele variatie een grotere invloed had op de bekomen waarden. Er was eveneens een verschil in het CZV gehalte tussen batch 1 en 2.

Tabel 5: Overzicht van de gemiddelde TS en VS gehalte met de bijhorende standaarddeviatie van de melasse.

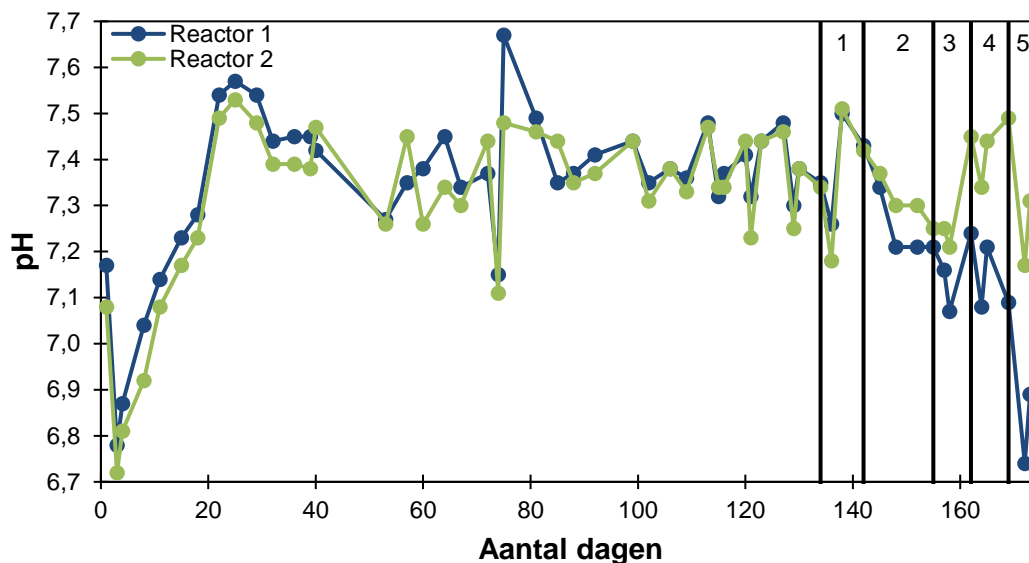
	Melasse	
	Batch 1	Batch 2
TS (g/kg)	/	534,70 ± 1,45
VS (g/kg)	/	344,53 ± 3,81
CZV (g CZV/kg)	454,28	429,53

2. Karakteristieken van de reactoren

In dit gedeelte worden de gemeten parameters weergegeven van de UASB reactoren. Zowel de hydraulische retentie tijd voor de reactor als de pH waaraan microbiële gemeenschap binnenin de reactoren gewerkt werden. Hierbij werd er geen verschil gemaakt tussen de melasse van batch 1 en 2.

2.1 pH

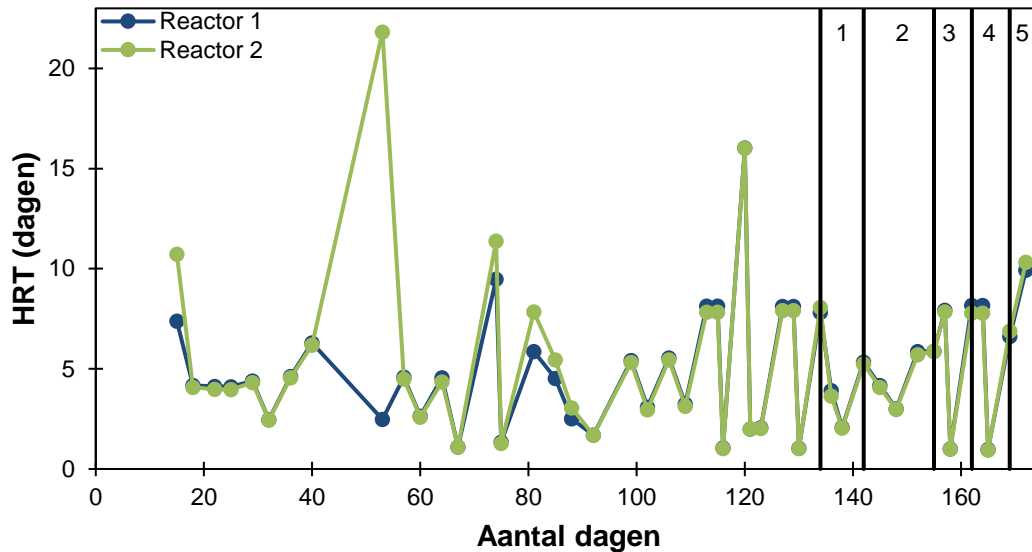
De optimale pH waarbij micro-organismen konden werken in een anaerobe vergister lag tussen de 6,5 – 7,5. In Figuur 11 kan het verloop van de pH teruggevonden worden doorheen het hele proces. De pH was stabiel doorheen het proces, lag binnenin de optimale range voor de werking van de micro-organismen. In het begin kon er een lichte daling waargenomen worden. De pH-waarde van beide reactoren was sterk gelijkaardig voor de Na⁺ additie. Rond dag 145 begonnen de waarden lichtjes van elkaar te verschillen. Er was ook een sterke daling in de voorlaatste punt. De dalingen die aanwezig waren vanaf een Na⁺ additie van 10 g Na⁺ kon veroorzaakt worden doordat op dat moment de reactoren werden geopend voor pH metingen en staalnames, tussen de dagen waar het influent niet verversd werd. De trends van beide reactoren bleven echter steeds gelijkaardig.



Figuur 11: pH verloop van reactor 1 en 2 doorheen het hele proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na^+ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen startten vanaf week 1.

2.2 Hydraulische retentie tijd

De hydraulische retentie tijd stelde de verblijftijd van het influent binnenin de reactor voor. Theoretisch werd er gestart met een HRT van 5 dagen, waarbij er geëindigd werd met een HRT van 1 dag. In Figuur 12 kan de praktische HRT teruggevonden worden. De HRT waarden verschilden sterk met de theoretische gewenste waarden, dit kwam doordat in de praktijk er variaties zijn in de pompen, doordat deze niet constant exact hetzelfde inpompen. De waarden voor beide reactoren was sterk gelijkaardig, doorheen het proces. Rond dag 50 was er een sterke piek terug te vinden. Dit kwam doordat er slechts 500 mL influent in de reactor was ingepompt in 4 dagen tijd. Ook al was er een additie van Na^+ in de ene reactor, de bekomen waarden voor beide reactoren bleven hetzelfde. Dit is logisch, ongeacht er wel of geen Na^+ werd toegevoegd, had dit geen invloed op de verblijftijd van het influent in de reactor.

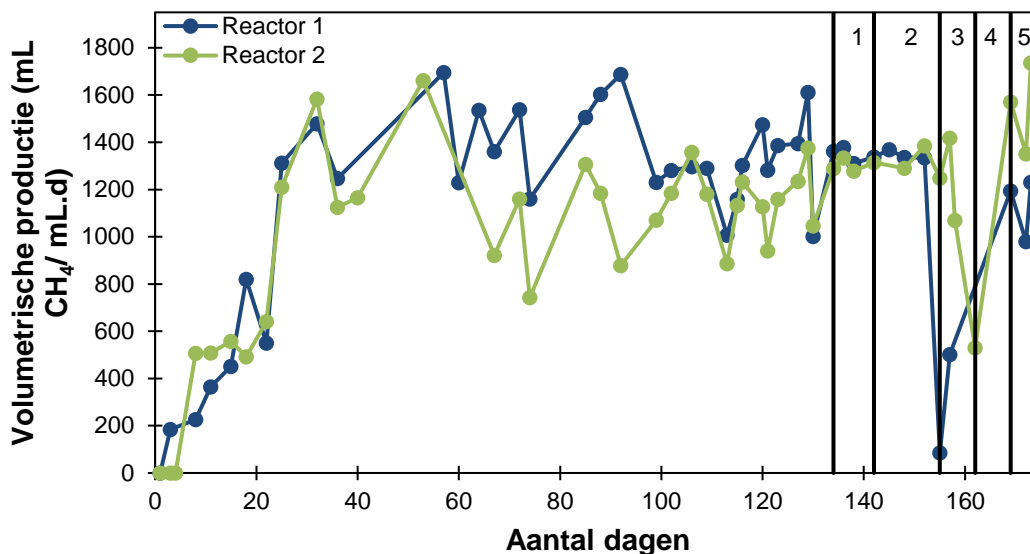


Figuur 12: Hydraulische retentie tijd van beide reactoren doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na^+ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen startten vanaf week 2.

3. Biogas

3.1 Volumetrische methaanproductie

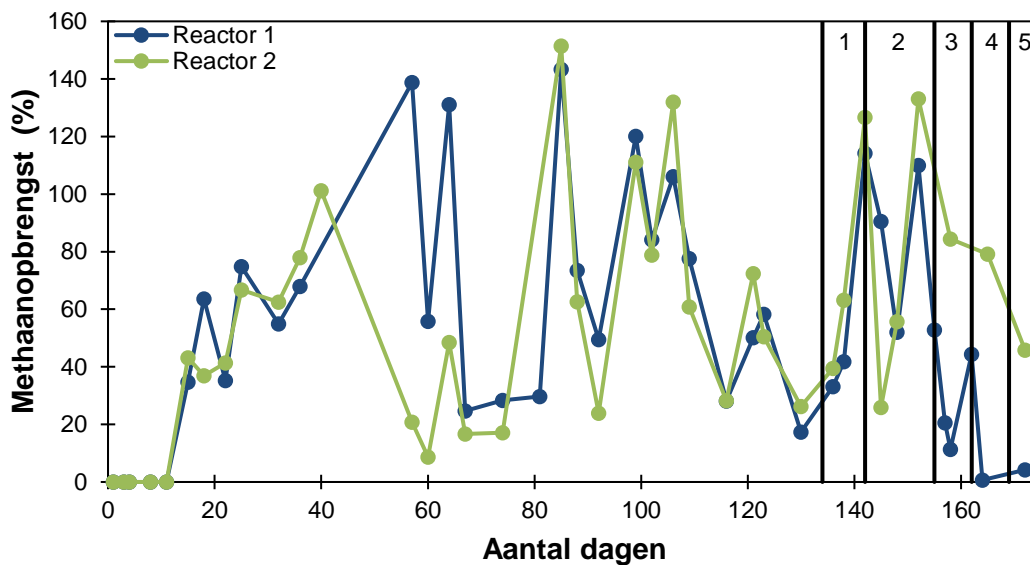
De volumetrische methaanproductie gaf weer hoeveel energie eruit de anaerobe vergisting kon gehaald worden. Dit gaf eveneens de activiteit weer van de methanogene archaea. De volumetrische productie die te zien is in Figuur 13 varieerde zeer sterk doorheen het proces voor beide reactoren. De activiteit van de micro-organismen varieerde sterk en zeker wanneer de micro-organismen zich moesten aanpassen aan de omstandigheden. De eerste daling die te zien was van reactor 2 rond dag 20 werd veroorzaakt doordat de reactor geen influent had ingepompt, doordat het buisje niet diep genoeg in het influent vat zat. De daaropvolgende stijging in productie van beide reactoren kan verklaard worden door een stijgende hoeveelheid organische stof die ingepompt werd in beide reactoren met een dalende HRT. Rond dag 50 werd de sterke daling in reactor 2 veroorzaakt door enerzijds het inpompen van slechts 500 mL influent over de 4 dagen en anderzijds door een gaslek. De volgende stijging werd teweeggebracht door de reactoren over een langere tijd te laten lopen, zonder de reactoren te storen door staalnames. De fluctuaties in het begin werden ook veroorzaakt door gaslekken. Startende vanuit dag 64 verliep de trend van beide reactoren gelijkaardig, waarbij vanaf dag 110 de trends van beide reactoren gelijkaardig waren. Er was een sterke gelijkenis te zien tussen de twee reactoren bij een Na^+ additie van 1 g Na^+ en 5 g Na^+ . Daarna verliep de trend van beide reactoren gelijkaardig, maar de volumetrische productie was verschillend voor beide reactoren. Reactor 1 had een lagere productie dan reactor 2, dit werd veroorzaakt door een voldoende hoge additie van Na^+ . De waarden in de grafieken zijn namelijk de waarden bij standaard temperatuur en druk (STP).



Figuur 13: Volumetrische productie van reactor 1 en 2 doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na⁺, 2 = 5 g Na⁺, 3 = 10 g Na⁺, 4 = 15 g Na⁺, 5 = 20 g Na⁺. Metingen startten vanaf week 1.

3.2 Methaanopbrengst

De methaanopbrengst aan biogas gaf weer hoe efficiënt de omzetting naar biogas kon plaatsvinden. In Figuur 14 wordt de methaanopbrengst door beide reactoren weergegeven. Wat direct opviel was, dat er een methaanopbrengst van meer dan 100% bekomen werd, dit kwam doordat de werkelijke hoeveelheid geproduceerde gas groter was dan de theoretisch verwachte hoeveelheid geproduceerde gas met de overeenkomstige organische belasting (Weiland 2010). De gemiddelde methaanopbrengst van reactor 1 bedroeg $60,7 \pm 38,8 \%$, terwijl reactor 2 een gemiddelde methaanopbrengst had van $62,3 \pm 38,3 \%$. Micro-organismen dienden zich aan te passen aan de nieuwe omstandigheden, de variatie was te wijten aan de temporele fluctuatie in de microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999). Rond de periode van dag 40 tot dag 60 was de periode waar er zich een sterke fluctuatie voordeed. Net als bij de volumetrische productie, verliep de trend rond dag 85 gelijkaardig voor beide reactoren. Rond dag 150 was de toegevoegde concentratie aan Na⁺ pas voldoende om een onderscheid in methaanopbrengst te maken tussen reactor 1 en 2. Reactor 1 had duidelijk een verschillend verloop in methaanopbrengst tegenover reactor 2. De fluctuatie in reactor 1 vanaf dag 150, werd veroorzaakt doordat het toegevoegde Na⁺ concentratie invloed had op de methanogene archaea. Deze invloed resulteerde zich in een daling. Door additie van een nog hogere concentratie aan Na⁺, 15 g Na⁺/L, op dag 162, werden de methanogene archaea opnieuw beïnvloedt, wat resulteerde in een daling. De fluctuaties doorheen het proces werden ook veroorzaakt door een variërende CZV gehalte in het influent.



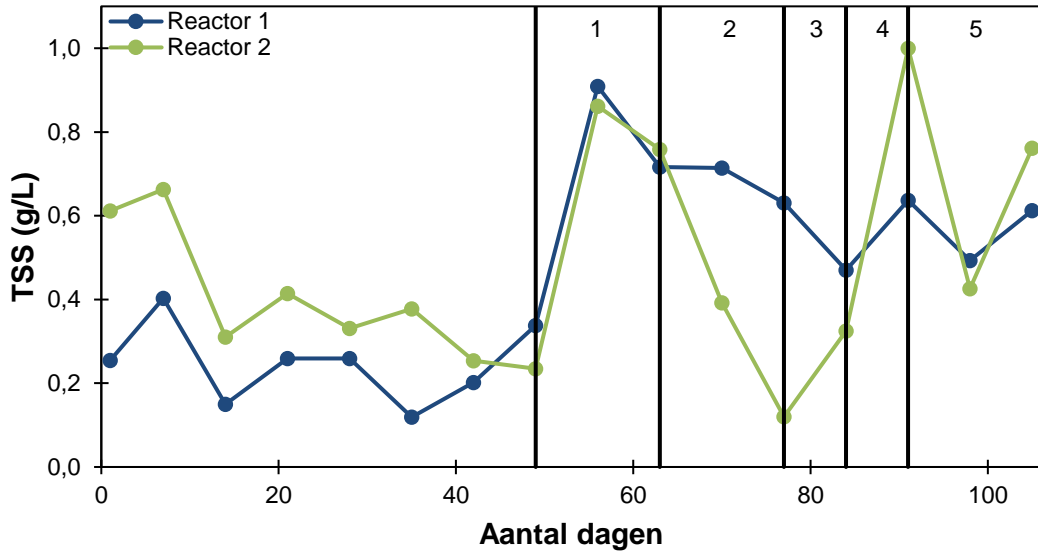
Figuur 14: Methaanopbrengst van reactor 1 en 2 doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na^+ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen startten vanaf week 2.

4. Effluent samenstelling

4.1 Totale gesuspendeerde vaste stof en vluchtige gesuspendeerde vaste stof

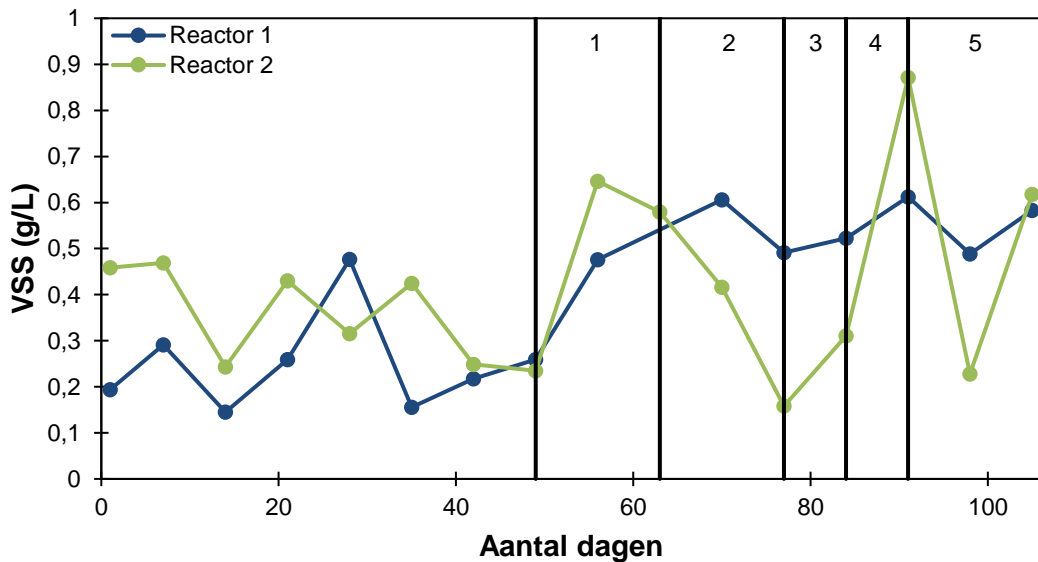
Het totale gesuspendeerde vaste stof in het effluent gaf weer hoeveel organische en anorganische zwevende stof er aanwezig was. Terwijl het vluchtige gesuspendeerde vaste stof bepaalde hoeveel organische zwevende stof, biomassa, er aanwezig was in het effluent. Dit laatste bepaalde hoeveel biomassa er werd uitgespoeld.

In Figuur 15 kan het totale gesuspendeerde vaste stof in het effluent van beide reactoren teruggevonden worden. Tot aan de additie van 1 g Na^+ , verliep de uitspoeling van zwevende stof gelijkmatig voor beide reactoren. Startende vanuit een concentratie van 5 g Na^+/L , verliep het TSS gehalte in het effluent verschillend voor beide reactoren, hierbij hadden beide reactoren ook een verschillende trend. Op dag 80 was er een sterke daling in het TSS gehalte van reactor 2. Een sterke stijging in TSS voor reactor 2 was waar te nemen rond dag 90. Er was een daling in TSS gehalte van reactor 1, startende rond dag 56, nadat de micro-organismen een invloed ondervonden van de Na^+ additie. De daling werd sterker naarmate een hogere Na^+ concentratie werd toegevoegd.



Figuur 15: Totale gesuspendeerde vaste stof in het effluent van reactor 1 en 2 doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na^+ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen startten vanaf week 13.

In Figuur 16 kan het vluchtige gesuspendeerde vaste stof die aanwezig was in het effluent teruggevonden worden. De uitspoeling aan biomassa was voor beide reactoren groter na additie van Na^+ dan voor additie van Na^+ . Voor reactor 1 stabiliseerde de uitspoel van biomassa zich na additie van Na^+ , terwijl in reactor 2 een sterke fluctuatie aanwezig was in de uitspoel van biomassa, waarbij geen additie van Na^+ had plaatsgevonden. Er was een sterke daling en stijging aanwezig tussen de periode van 80 – 90 dagen.

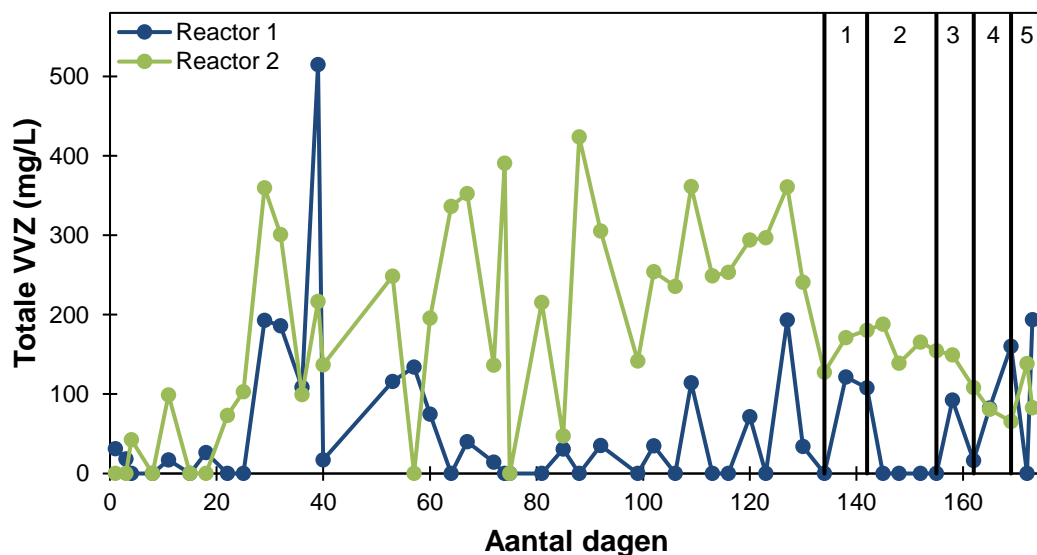


Figuur 16: Vluchtige gesuspendeerde vaste stof in effluent van beide reactoren doorheen het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na^+ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen startten vanaf week 13.

4.2 Vluchtige vetzuren

Vluchtige vetzuren waren ongewenst door de micro-organismen, doordat deze inhibitie konden veroorzaken vooral aan de methanogene archaea. Zolang de concentratie van elke vluchtige vetzuur lager was dan 500 mg/L, veroorzaakte dit geen inhibitie van de micro-organismen (Dogan et al. 2005). De aanwezigheid van deze VVZ had invloed op de stabiliteit en werking van de micro-organismen.

In Figuur 17 kan de grafiek teruggevonden worden die de totale hoeveelheid VVZ, voor elke reactor weergeeft. Hierbij was het duidelijk dat reactor 2 meer vluchtige vetzuren produceerde dan reactor 1, zowel voor als na additie van Na^+ . De sterke piek van reactor 1 op dag 40 kon veroorzaakt worden door metaal inhibitie. Rond die periode werd een stuk metaal aan het influent tube gebonden aan beide reactoren, dit gaf zeer sterk metaal af aan het influent, waardoor op deze manier er ongewenste condities ontstonden in de reactoren. Hierdoor trad er een sterke uitspoeling op van het slib uit beide reactoren, waardoor beide reactoren opnieuw geïnoculeerd werden. De aanhoudende uitspoeling in reactor 1 vereiste een derde inoculatie. De inoculatie zorgde voor het herstel van de micro-organismen in reactor 1. Reactor 2 had geen derde inoculatie gekregen, zoals reactor 1, doordat na de tweede inoculatie de uitspoeling in reactor 2 minder sterk was. Hierdoor hadden de micro-organismen in reactor 2 nooit een volledig herstel gehad als reactor 1. Additie van Na^+ had geen invloed gehad op de productie van VVZ. Doordat reactor 2 meer vetzuren produceerde, kan dit de oorzaak zijn voor minder actieve micro-organismen, waardoor reactor 2 een lagere volumetrische productie in biogas vertoonde.

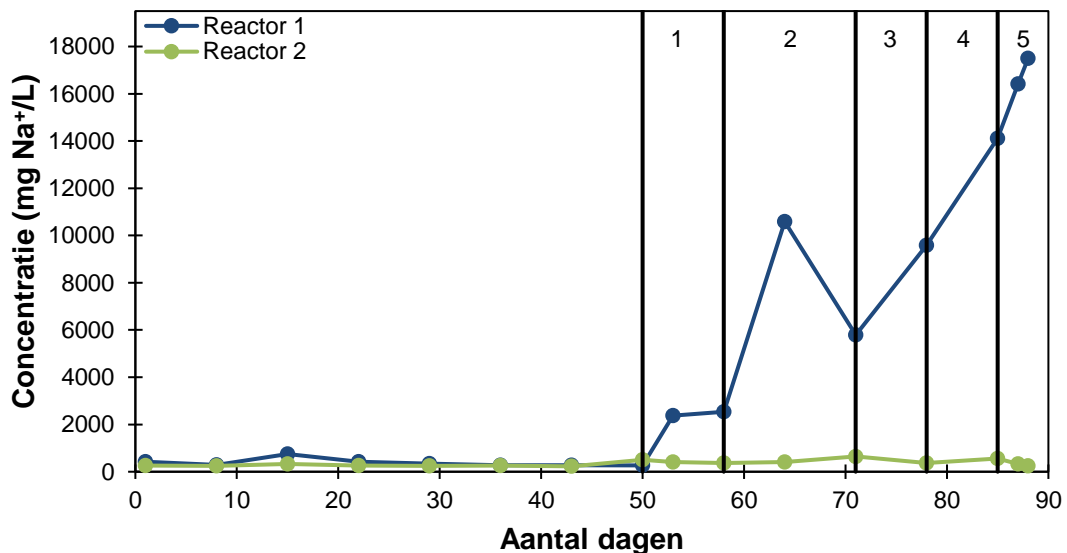


Figuur 17: De totale VVZ wordt hier voor zowel reactor 1 als 2 weergegeven. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na^+ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen startten vanaf week 1.

4.3 Kationen

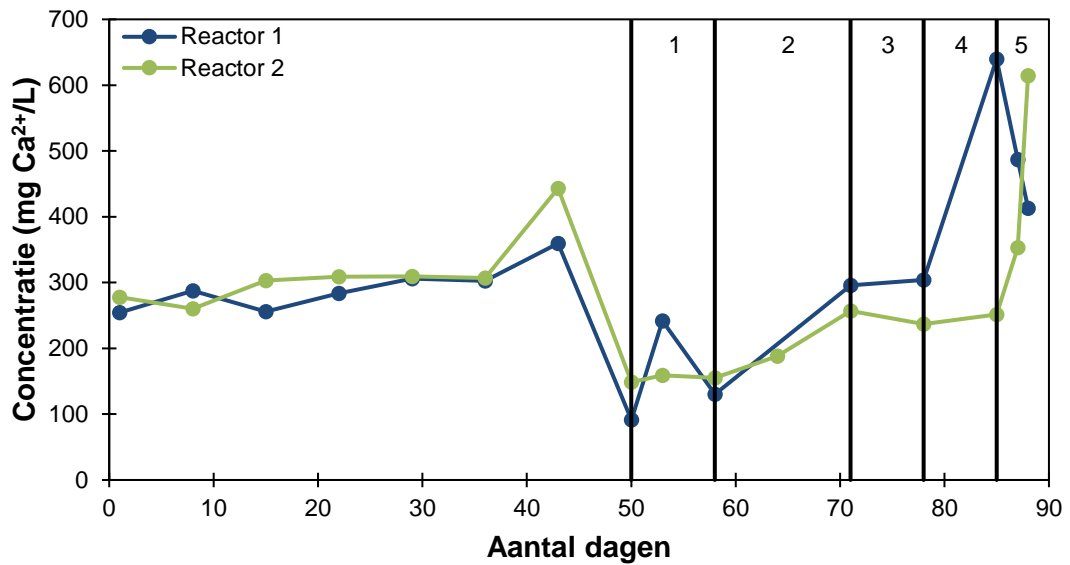
De kationen concentratie werd gemeten zodat dit kon aantonen, dat het proces falen wel degelijk door de verhoogde concentratie aan Na^+ werd veroorzaakt en niet door andere stress factoren.

In Figuur 18 kan de natrium concentratie van beide reactoren teruggevonden worden. Hierbij was er een duidelijke stijging in Na^+ concentratie in reactor 1, bij de start van de additie van Na^+ , terwijl de Na^+ concentratie in reactor 2 doorheen het hele proces stabiel bleef. Reactor 2 diende als controle/vergelijking voor reactor 1. Hierbij was het duidelijk dat reactor 2 een stabiele Na^+ concentratie bevatte van 353 ± 125 mg/L. De Na^+ concentratie in reactor 1 weergegeven in de grafiek, kwam bijna exact overeen met de hoeveelheid toegevoegde Na^+ . In de grafiek was deze concentratie steeds lager, doordat een deel van het Na^+ opgenomen werd door de micro-organismen in de reactor.



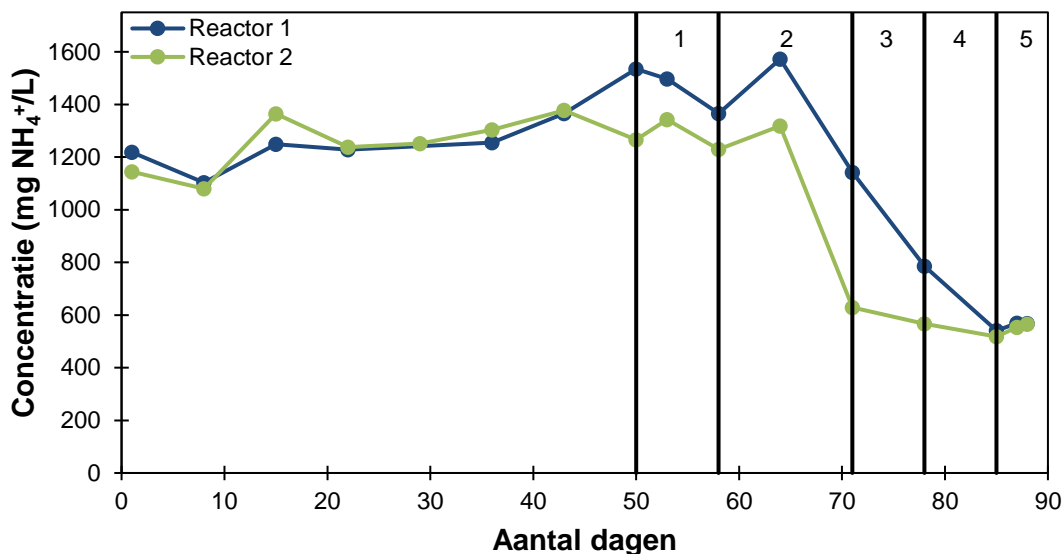
Figuur 18: Natrium concentratie in beide reactoren over het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na^+ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen startten vanaf week 13.

In Figuur 19 wordt de calcium concentratie in beide reactoren weergegeven. In het begin verliep de calcium concentratie in beide reactoren gelijkaardig en stabiel. Voor additie van Na^+ werd er een daling waargenomen, waarna er een stijging in calcium na additie van Na^+ plaatsvond in beide reactoren.



Figuur 19: Calcium concentratie in beide reactoren over het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na⁺, 2 = 5 g Na⁺, 3 = 10 g Na⁺, 4 = 15 g Na⁺, 5 = 20 g Na⁺. Metingen startten vanaf week 13.

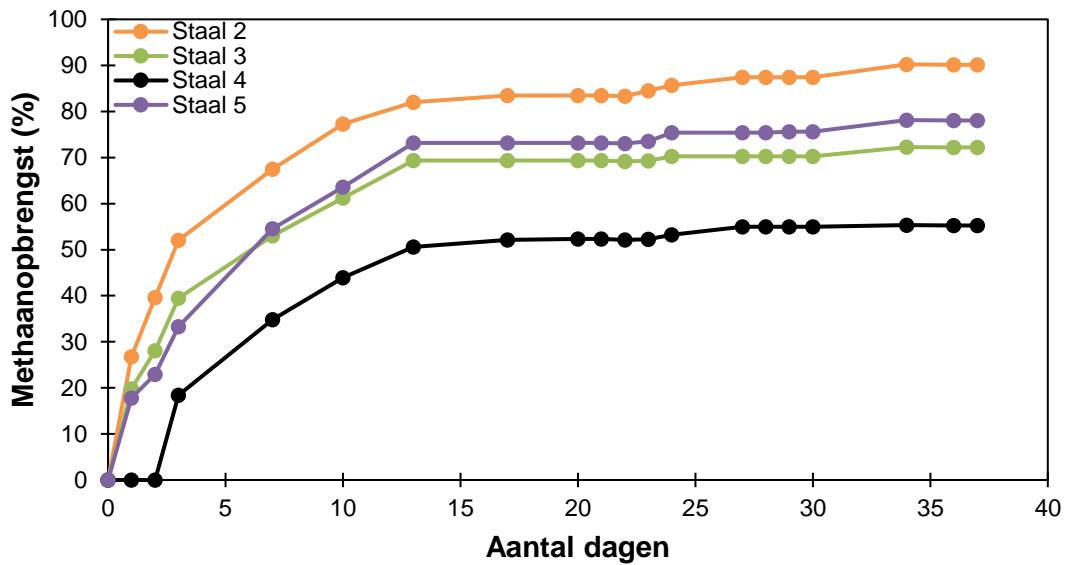
In Figuur 20 wordt de ammonium concentratie weergegeven van reactor 1 en 2. Dit was eveneens een zeer belangrijke kation om te bepalen, doordat op deze manier kon gecontroleerd worden of de ammonium concentratie niet te hoog was. Een te hoge ammonium concentratie was toxisch voor de micro-organismen, waarbij de micro-organismen hierdoor zouden geïnhibereerd worden. Zoals in de figuur te zien was, was de concentratie aan ammonium voldoende laag, om toxiciteit door ammonium te voorkomen. De concentratie was voor de additie van Na⁺ stabiel voor beide reactoren. Na de additie van Na⁺ daalde de ammonium concentratie voor beide reactoren sterk tot deze op het einde van het proces opnieuw begon te stabiliseren. De achterliggende reden voor deze daling kan niet verklaard worden.



Figuur 20: Ammonium concentratie in beide reactoren over het proces. De getallen binnen in de grafiek stellen de fases voor waarin Na⁺ werd toegevoegd: 1 = 1 g Na⁺, 2 = 5 g Na⁺, 3 = 10 g Na⁺, 4 = 15 g Na⁺, 5 = 20 g Na⁺. Metingen startten vanaf week 13.

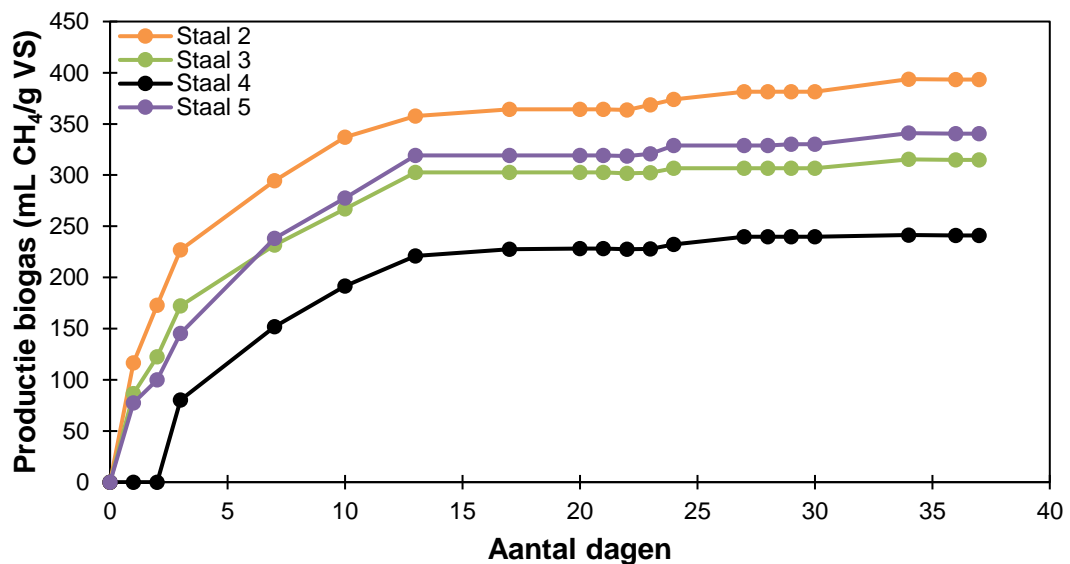
5. Biochemische potentiaal test

In Figuur 21 is de biochemische potentiaal terug te vinden van vier identieke stalen melasse. Deze test werd in vijfvoud uitgevoerd, staal 1 was echter verwijderd, doordat dit incorrect was. Deze BMP test werd uitgevoerd met de melasse van batch 2, de BMP bepaling van de melasse van batch 1 werd al eerder uitgevoerd in het paper van De Vrieze et al. (2015). De methaanopbrengst van de BMP test uitgevoerd door De Vrieze et al. (2015) met melasse van batch 1 was $79,7 \pm 4,0$ %. Hierbij werd wel een andere type inoculum gebruikt, maar uit het onderzoek van De Vrieze et al. (2015) kon besloten worden dat het type inoculum geen invloed had. Zoals op Figuur 21 te zien, begon de gasproductie rond dag 14 zich te stabiliseren. Daarna verliep de productie van het gas stabiel. Verschillen in de stalen kunnen verklaard worden, door experimentele variatie en door variatie in werking van de micro-organismen. In sommige stalen kon er net meer of minder granulair slib aanwezig zijn, waardoor op deze manier er meer of minder gasproductie was. Staal 4 had een latere start in gasproductie, door experimentele fouten, dit had namelijk een verkeerde tubing gekregen tijdens de experimentele opzet. De methaanopbrengst van de UASB reactor 1 en 2 bereikten, $60,7\% \pm 38,8\%$ en $62,3 \pm 38,3\%$ respectievelijk. Staal 2 had een methaanopbrengst van bijna 90%, terwijl staal 4 een veel lagere methaanopbrengst had. Dit laatste kan verklaard worden door de temporele fluctuatie in de microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999). De gemiddelde methaanopbrengst van de BMP test voor deze vier stalen bedroeg $73,9 \pm 14,5$ %. Deze gemiddelde werd berekend van de laatste datapunt, omdat dit het finale bekomen methaanopbrengst gaf.



Figuur 21: Methaanopbrengst van de biochemische potentiaal test, in vijfvoud uitgevoerd, waarbij staal 1 onvoldoende representatief was.

In Figuur 22 is de hoeveelheid geproduceerde methaan/g VS weergegeven. De volgorde van de stalen in dit grafiek stemmen overeen met de volgorde van de vorige figuur. Dit is logisch, doordat methaanopbrengst weergeeft hoe efficiënt de omzetting naar biogas verloopt. Hoe efficiënter de omzetting, hoe sneller de omzetting plaatsvond, en dus hoe meer productie van biogas er kon gevonden worden. De productie van biogas stabiliseerde zich eveneens rond dag 14. De productie aan methaan verliep stabiel voor al de beschouwde stalen.



Figuur 22: Hoeveelheid geproduceerde biogas/g VS voor 4 stalen. In vijfvoud uitgevoerd, waarbij staal 1 onvoldoende representatief was.

6. Flowcytometrische monitoring

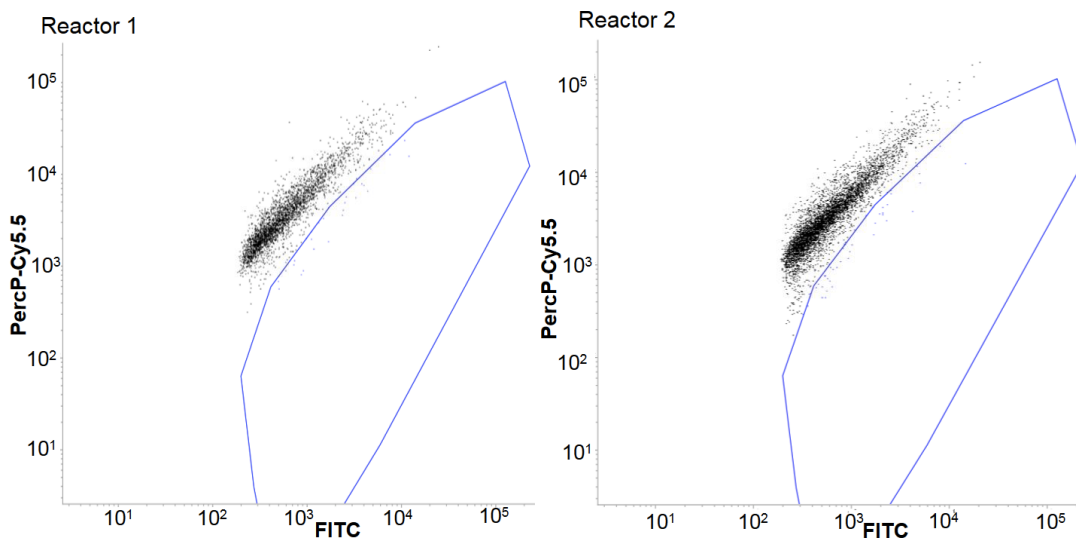
Flowcytometrie werd gebruikt om de aanwezige cellen in de reactor te identificeren en te kwantificeren, zowel voor de totale cel populatie als het aantal actieve methanogene archaea die aanwezig waren in de reactoren. Hiervoor werd telkens 3 mL effluent als slibstaal (floterende slib) uit de reactor genomen, de stalen voor de methode ontwikkeling werden 100x verdund. Het slibstaal werd gebruikt als positieve controle om de effectieve methanogene populatie na te gaan. De gebruikte methode in dit onderzoek baseerde zich op de methode van Lambrecht et al. (2017). De resultaten van deze detectie worden hieronder weergegeven.

6.1 Methode ontwikkeling

Voor de detectie van het totale aantal cellen werd gebruik gemaakt van een SYBR Green I fluorochroom. SYBR® Green I intercaleert met dsDNA, werd fluorescent na excitatie bij 488 nm (blauwe laser), hetgeen gedetecteerd kon worden op FITC en PerCP-Cy5.5 detectoren. Deze golflengtes werden eveneens gebruikt voor de grafische weergave van de cellen, waarbij PerCP-Cy5.5 in functie staat van FITC. Door gebruik te maken van de violet laser (405 nm) kon hierdoor de autofluorescentie van de methanogene archaea bepaald worden, F_{420} co-enzym. Hiervoor werd er gebruik gemaakt van de V450 en FSC detectoren voor de bepaling van deze cellen. Deze twee kanalen werden opnieuw ten opzichte van elkaar uitgezet in een grafiek en gebruikt om instrument- en matrixinferentie te verwijderen. Tijdens het meten kunnen (an)organische partikels door middel van autofluorescentie of scatter signalen gedetecteerd worden. Om een duidelijk onderscheid te maken tussen dergelijke interferentie en de gemeten micro-organismen, werden hiervoor gates getrokken. Dit werd uitgevoerd door middel van een “gating strategie”, waarbij de grenzen van de toegelaten parameterwaarden door de gebruiker ingesteld werden. Bij het maken van de gates voor zowel de totale cel populatie als de meting van het F_{420} co-enzym werd gebruik gemaakt van de methode van Lambrecht et al. (2017). Voor de detectie van de totale cel populatie en de methanogene populatie werd er enkel gebruik gemaakt van het slibstaal. Het slibstaal werd bekomen door floterende slib dat bovenop het effluent binnenin de reactor floteerde te nemen.

Voor het bepalen van de gate van de totale cel populatie, werd gebruik gemaakt van de positieve en negatieve stalen. De bekomen gates zijn weergegeven in Figuur 23. Deze figuur stelde eveneens de negatieve controle voor van de totale cel populatie die aanwezig was in de reactoren. De negatieve controle bevatte stalen die niet gestained werden met SG, de positieve stalen werden wel gestained. De events buiten de gates (in het zwart) stelde de (an)organische ruis voor. Zoals verwacht werd er buiten de (an)organische ruis niets anders gedetecteerd. Doordat de cellen niet gestained werden, konden de cellen niet fluoresceren. De detectoren die gebruikt werd om de totale cel populatie te meten waren de FITC en PerCP-Cy5.5 detectoren. Beide detectoren waren niet in staat om de autofluorescentie van het F_{420} co-enzym te meten. Op dergelijke manier kon er met

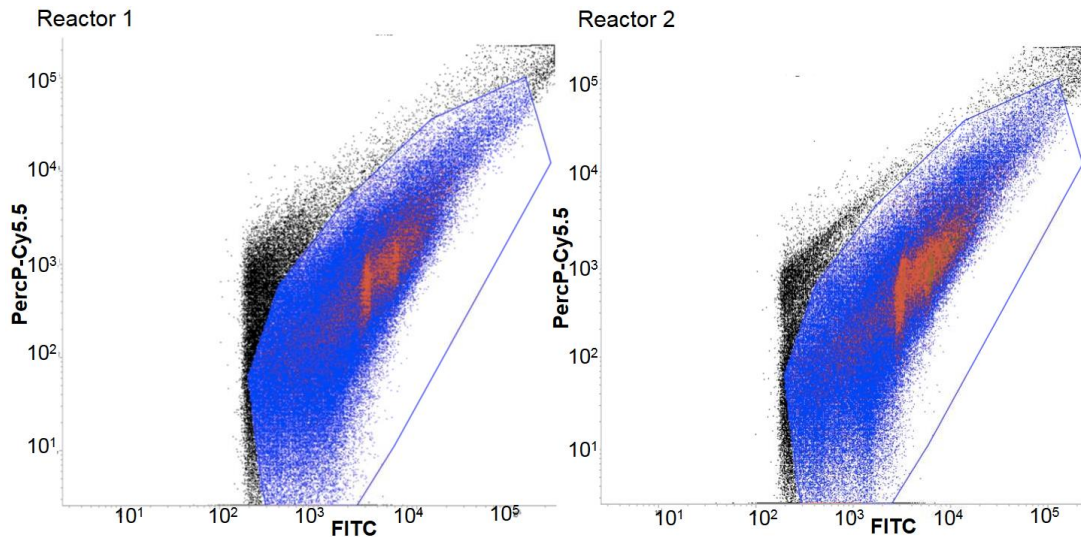
zekerheid gezegd worden dat hetgeen gedetecteerd werd de (an)organische ruis voorstelde.



Figuur 23: Negatieve controle voor de totale cel populatie voor een slibstaal uit reactor 1 en reactor 2. De blauwe gate duidt de regio aan waar cellulaire events werden verwacht.

In Figuur 24 is de totale cel populatie weergegeven in de gate. De events in het midden (in het oranje) van de gate stellen de methanogene populatie voor die aanwezig was tegenover alle cellen. Dit kon afgeleid worden, doordat er met behulp van de V450 en FSC detectoren de autofluorescente populatie al reeds bepaald werd (Figuur 25 en Figuur 26), wanneer er gekeken werd naar de ingestelde karakteristieken van de methode voor de bepaling van de autofluorescente populatie. Dit werd toegepast op de totale cel populatie en hieruit kon afgeleid worden dat de methanogene archaea in het midden van de gate zouden gelokaliseerd worden. De events buiten de gate (in het zwarte) stelde eveneens de (an)organische ruis voor.

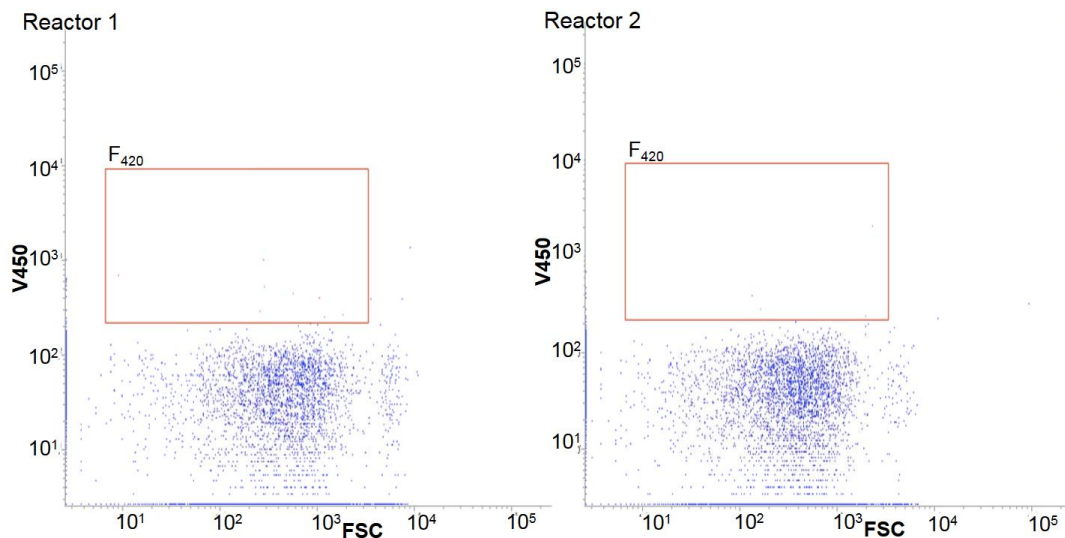
Doordat er in Figuur 23 de (an)organische ruis bepaald werd, kon op basis hiervan en door het meten van de gestainde negatieve staal, de gate getrokken worden. Figuur 24 is het resultaat van de negatieve controle die wel gestainde werd, positieve staal. Door gebruik te maken van deze twee figuren, kon de gate getrokken worden. Doordat het (an)organische ruis gekend was, kon hieruit besloten worden dat hetgeen gemeten werd in Figuur 24 voor het gestainde staal, de totale cel populatie voorstelde.



Figuur 24: Positieve controle voor de totale cel populatie in de gate voor reactor 1 en reactor 2 van het slibstaal. In de blauwe gate werden de verwachte events weergegeven.

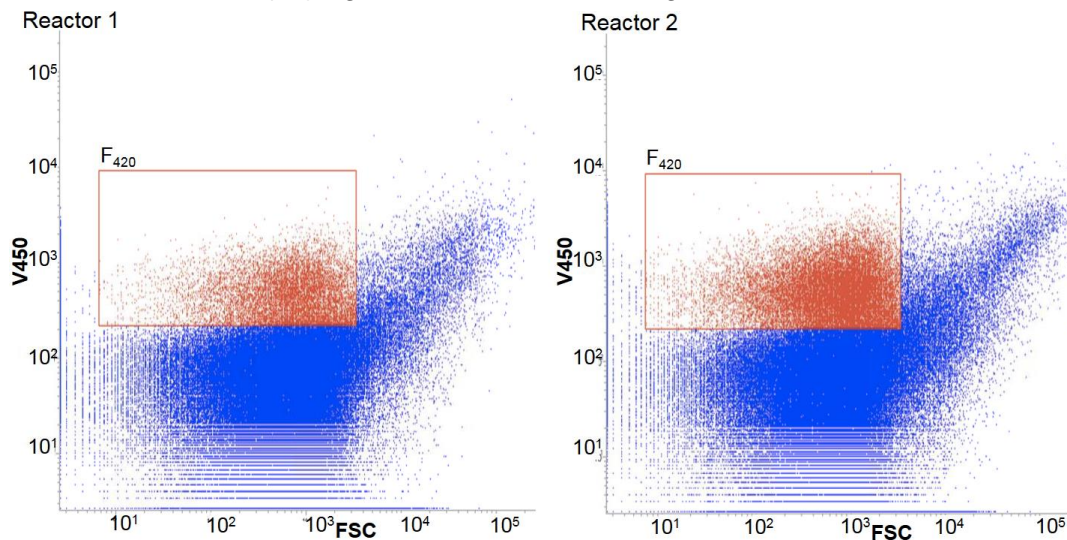
De methanogene populatie werd bepaald aan de hand van de autofluorescente F_{420} co-enzym, hierbij werden welbepaalde instellingen van Lambrecht et al. (2017) gebruikt. Voor de bepaling van deze populatie werden de gates opgesteld aan de hand van de positieve en negatieve controle.

Figuur 25 stelt de negatieve controle voor van het F_{420} co-enzym. Dit werd bekomen door het positieve staal van Figuur 24 door een $0,22 \mu\text{m}$ filter te brengen, deze filtratie stap zorgde ervoor dat een groot deel van alle aanwezige micro-organismen verwijderd werden uit het positieve staal. Na meting werd Figuur 25 bekomen, hierbij stellen de events onder de gate (in het blauw) zowel een deel van de micro-organismen voor die geen methanogene archaea waren, als de (an)organische ruis.



Figuur 25: Negatieve controle voor de bepaling van het F_{420} co-enzym voor reactor 1 en reactor 2, gebruik makend van het slibstaal. De oranje gate duidt de regio aan waar autofluorescente events werden verwacht.

Het positieve staal uit Figuur 24 werd eveneens gebruikt om de F_{420} co-enzymen te detecteren. Hierbij werd het staal niet gefilterd, zodat alle micro-organismen in het staal aanwezig bleven. Het positieve staal werd gemeten met de bekomen instellingen van Figuur 25. Het resultaat van deze meting is te zien in Figuur 26. Hierbij stellen de events in de gate (in het oranje) de methanogene populatie voor, terwijl de rechtste events (de blauw "staart") de andere aanwezige cellen voorstellen. De events onder de gate (in het blauw) stellen zowel een deel van de micro-organismen voor die geen methanogene archaea waren, als de (an)organische ruis, zoals in Figuur 25.



Figuur 26: Positieve controle voor de bepaling van het F_{420} co-enzym voor reactor 1 en reactor 2, gebruik makend van het slibstaal. In de oranje gate werden de verwachte events weergegeven.

De gate voor de bepaling van de methanogene cellen werd niet enkel getrokken op basis van Figuur 25 en Figuur 26, hierbij werd eveneens gebruik gemaakt van Figuur 33 en Figuur 34 die zich bevinden in bijlage A. Deze twee figuren stellen de dichtheidsplots voor, hierop was duidelijk een scheiding te zien tussen de gemeten (an)organische ruis en de gemeten cellen. Net als de gate voor de totale cel populatie, kon op basis van de negatieve controle die gebruikt werd voor de bepaling van het F_{420} co-enzym, geconcludeerd worden dat de events onder de gate de (an)organische ruis en de andere aanwezige micro-organismen voorstelde. Hierdoor kon eruit afgeleid worden dat alle andere signalen in de positieve controle ofwel de methanogene cellen voorstelden ofwel alle andere aanwezige micro-organismen. Om onderscheid te maken tussen deze twee laatste cellen werd er gebruik gemaakt van de werkwijze van Lambrecht et al. (2017).

De totale hoeveelheid events die gedetecteerd werd, bij de bepaling van de autofluorescente populatie (Figuur 26) waren veel minder in aantal, tegenover de totale hoeveelheid events die waargenomen werden bij de bepaling van de totale cel populatie (Figuur 24). Dit kwam doordat er bij de bepaling van de autofluorescente populatie enkel specifiek gericht werd op de detectie van de autofluorescente cellen. Hierdoor werd een groot deel van de andere aanwezige cellen niet gedetecteerd, waardoor dit een veel kleiner aantal events gaf.

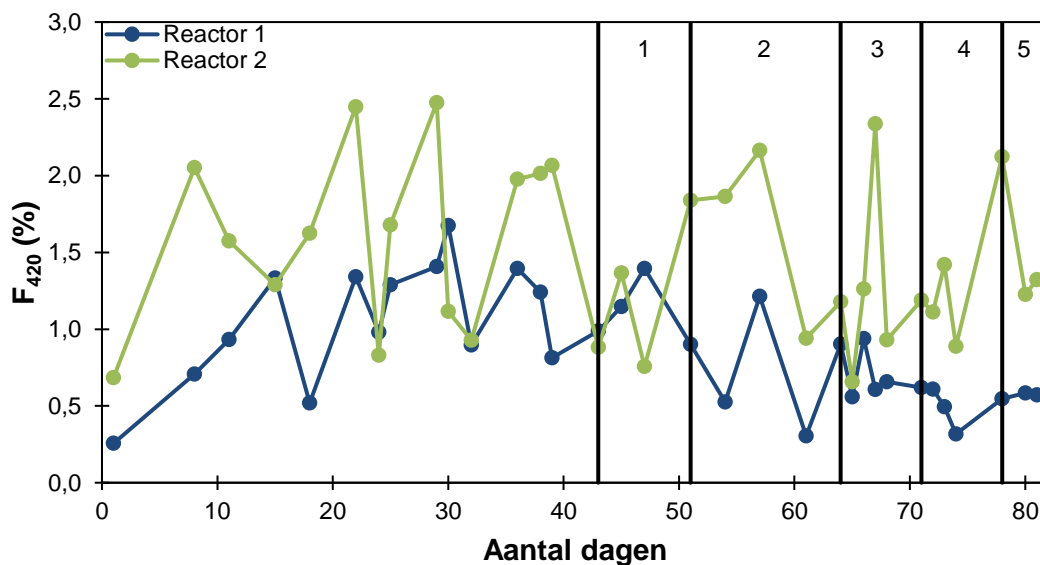
6.2 Toepassing

De bekomen waarden van de gates voor de twee UASB reactoren worden hieronder verwerkt, waarbij deze in grafieken worden weergegeven. Voor het effluent staal en het slibstaal werden telkens het 100x verdunde staal gebruikt, in de grafieken werd hiervoor gecorrigeerd.

6.2.1 Percentage aan cellen met het F_{420} co-enzym

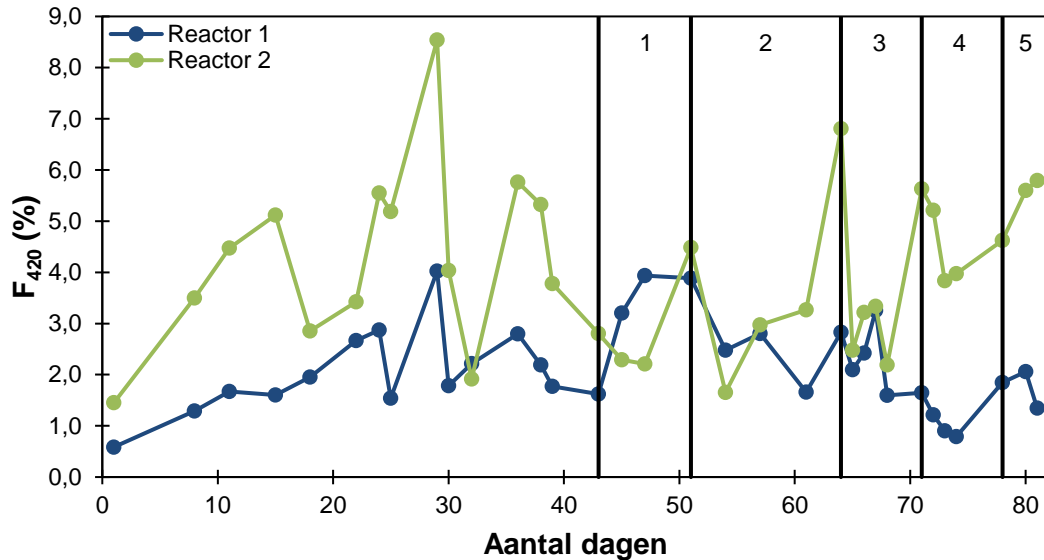
Het percentage aan cellen met het F_{420} co-enzym was interessant om te beschouwen, doordat op deze manier kon geweten worden hoeveel methanogene cellen met het F_{420} co-enzym er aanwezig waren tegenover het totaal aantal cellen.

In Figuur 27 wordt het percentage bekomen aan actieve methanogene cellen in het effluent uitgezet in functie van het aantal dagen. Beide reactoren werden initieel onder steady state conditie gelopen, waarbij startende rond dag 40 additie van Na^+ plaatsvond in het influent van reactor 1. Na^+ zorgde echter voor inhibitie van de methanogene archaea. Hierdoor werd er verwacht dat dit zou resulteren in een daling van het aantal actieve methanogene cellen. Zoals op de figuur te zien, had reactor 2 duidelijk een hoger percentage aan cellen met het F_{420} co-enzym, doorheen het hele proces. Dit betekent dat reactor 2 meer uitspoeling had aan actieve methanogene archaea dan reactor 1. Pas rond dag 65 start er een effectieve daling in het percentage aan cellen met het co-enzym. Dit kon doordat de concentratie pas vanaf 10 g Na^+ /L voldoende hoog was om inhibitie en degranulatie van het slib te veroorzaken. Er waren eveneens fluctuaties aanwezig in het percentage aan cellen met het co-enzym.



Figuur 27: Het percentage aan actieve methanogene archaea in het effluent t.o.v. het totaal aantal microbiële cellen in functie van het aantal dagen voor reactor 1 en 2. De getallen binnen in de grafiek stellen de hoeveelheid Na^+ voor: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen starten vanaf week 14.

In Figuur 28 wordt het percentage bekomen aan actieve methanogene cellen in het slibstaal uitgezet in functie van het aantal dagen. Aangezien in het effluent het percentage aan cellen met het co-enzym hoger lag in reactor 2 dan reactor 1, was het vanzelfsprekend dat dit ook het geval zou zijn in het slibstaal. Het percentage aan cellen dat het F_{420} co-enzym bevatte, lag voor het slibstaal veel hoger dan voor het effluent staal. Dit was ook normaal, doordat het slibstaal grotendeels bestond uit slib en dus ook dener was, waardoor meer methanogene archaea voorkwamen.

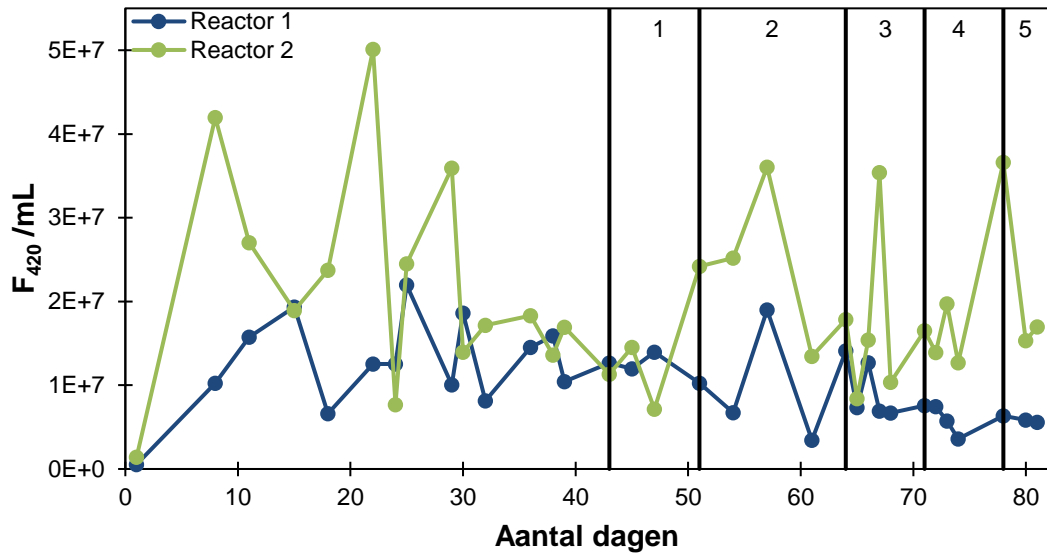


Figuur 28: Het percentage aan actieve methanogene archaea in het slibstaal t.o.v. het totaal aantal microbiële cellen in functie van het aantal dagen voor reactor 1 en 2. De getallen binnen in de grafiek stellen de hoeveelheid Na^+ voor: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen startten vanaf week 14.

6.2.2 Aantal cellen met het F_{420} co-enzym

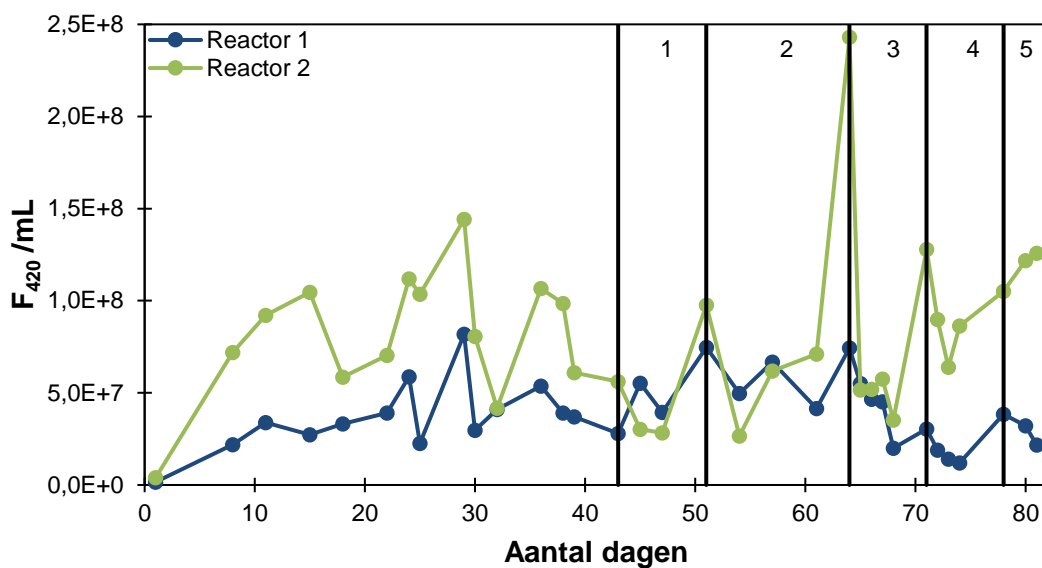
De hoeveelheid cellen met het F_{420} co-enzym werd eveneens in beschouwing genomen. Deze data konden gebruikt worden voor het bepalen van een correlatie tussen de hoeveelheid cellen met het F_{420} co-enzym en de volumetrische gasproductie. Hieruit kon geconcludeerd worden of de flow cytometer kon gebruikt worden voor de bepaling van methanogene activiteit in de reactoren. Het was eveneens interessant om het aantal uitgedrukt per volume te weten, zodat er bepaald kon worden hoeveel cellen met het co-enzym er aanwezig waren per volume-eenheid effluent.

In Figuur 29 wordt de grafiek weergegeven met het aantal cellen/mL die het co-enzym bevatte, dat zich in het effluent bevond van beide reactoren in functie van de tijd. Net als het percentage aan cellen met het co-enzym, was het aantal cellen met het co-enzym in reactor 2 eveneens hoger dan reactor 1. De trend van zowel het percentage als het aantal cellen met het F_{420} co-enzym verliep gelijkaardig. Dit was echter logisch doordat beiden de cellen met het co-enzym uitdrukten maar op verschillende verhoudingen.



Figuur 29: Aantal cellen met het F_{420} co-enzym in het effluent van reactor 1 en 2 t.o.v. het aantal dagen voor reactor 1 en 2. De getallen binnen in de grafiek stellen de hoeveelheid Na^+ voor: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen starten vanaf week 14.

In Figuur 30 wordt de grafiek weergegeven van het aantal cellen/mL met het co-enzym, in het slibstaal van beide reactoren in functie van de tijd. In tegenstelling tot het percentage aan cellen met het co-enzym, was het verschil in aantal cellen met het co-enzym tussen reactor 1 en reactor 2 veel minder groot, waarbij de trend van beide reactoren gelijkaardig waren. Dit kwam doordat het slib van de reactor afkomstig is van éénzelfde bron. Het aantal cellen met het co-enzym was in het slibstaal een factor 10 hoger dan in het effluent staal. Dit laatste is ook logisch, doordat de concentratie aan methanogenen in het slib hoger was dan in het effluent.



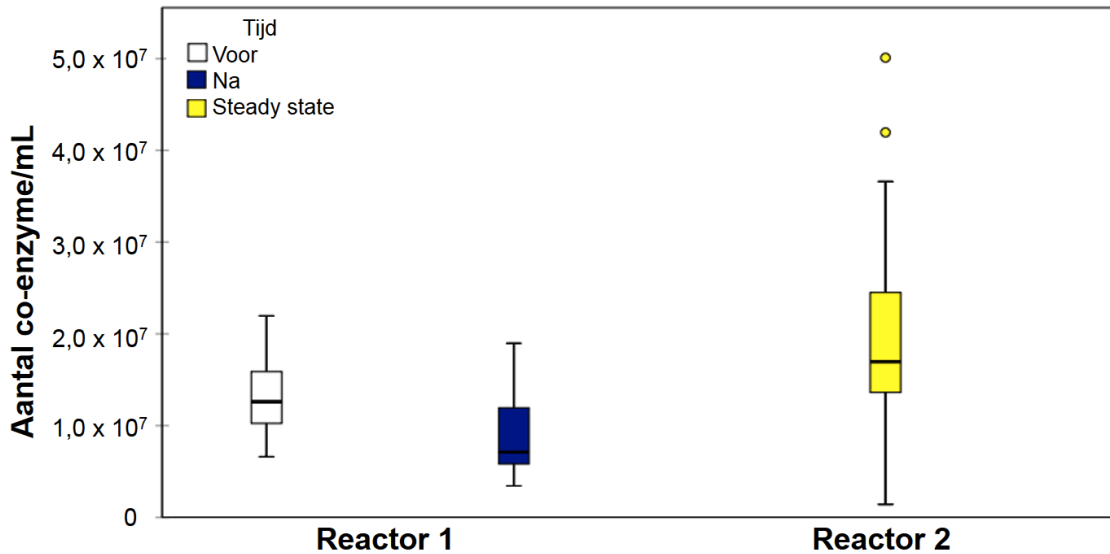
Figuur 30: Aantal cellen met het F_{420} co-enzym in het slibstaal van reactor 1 en 2 t.o.v. het aantal dagen voor reactor 1 en 2. De getallen binnen in de grafiek stellen de hoeveelheid Na^+ voor: 1 = 1 g Na^+ , 2 = 5 g Na^+ , 3 = 10 g Na^+ , 4 = 15 g Na^+ , 5 = 20 g Na^+ . Metingen startten vanaf week 14.

7. Statistische testen

7.1 Boxplot

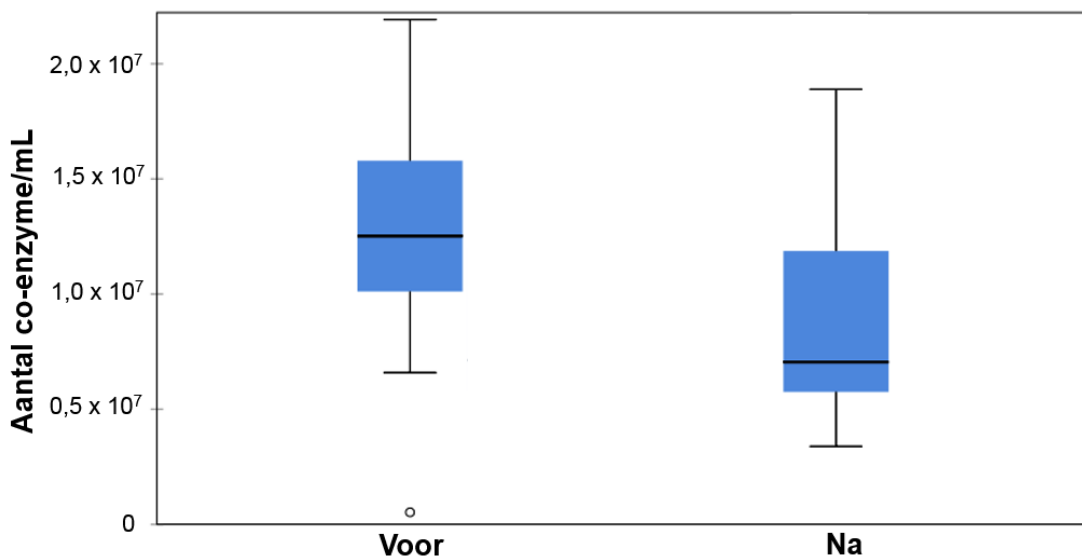
Er werd een boxplot gemaakt van het aantal cellen met het F_{420} co-enzym van reactor 1 voor zowel voor als na de Na^+ additie samen met het geheel aantal cellen met het co-enzym van reactor 2 doorheen het hele proces. Hierop kon het verschil tussen beide reactoren, evenals het verschil tussen voor en na additie van Na^+ in reactor 1 gezien worden. Op deze manier kon er bepaald worden hoeveel cellen er het co-enzym bevatte, wat het minimaal en maximaal aantal cellen waren met het co-enzym, kon zijn over de gemeten periode.

In Figuur 31 wordt de boxplot weergegeven met een overzicht van het aantal cellen met het co-enzym. Hierin was reactor 1 opgesplitst in data voor en na additie van Na^+ , terwijl reactor 2 onder steady state werd gelopen doorheen het gehele proces. Hierbij was het duidelijk dat reactor 2 veel meer cellen bevatte met het F_{420} co-enzym dan reactor 1 voor zowel voor als na additie van Na^+ . In deze figuur kan gezien worden dat het aantal cellen met het F_{420} co-enzym in reactor 1 voor additie van Na^+ hoger lag dan na additie van Na^+ . Voor een verdere visualisatie van het verschil tussen voor en na additie van Na^+ in reactor 1, werd hiervoor Figuur 32 gemaakt. Hierbij was er in reactor 2 twee verschillende uitschieters in dit figuur. Hierbij was de bovenste een extreme uitschieters dat meer dan 3x de interkwantiel afstand van reactor 2 had. De tweede uitschieter lag het dichtste bij de boxplot deze lag tussen de 1,5 – 3x interkwantiel afstand van reactor 2.



Figuur 31: Boxplot van het aantal cellen met het F_{420} co-enzym in reactor 1 en 2, waarbij reactor 1 is opgesplitst in voor en na additie van Na^+ , terwijl reactor 2 doorheen het hele proces onder steady state gelopen werd.

In Figuur 32 is de boxplot weergegeven van reactor 1, waarbij er verschil gemaakt werd tussen voor en na additie van Na^+ . De boxplot voor reactor 2, met het aantal cellen dat het co-enzym bevatte, kan teruggevonden worden in Bijlage B, Figuur 35. Hierbij was het duidelijk dat het aantal cellen met het co-enzym voor additie van Na^+ groter was dan na additie van Na^+ . Het minimaal aantal cellen met het co-enzym voor additie van Na^+ komt ongeveer overeen met de mediaan van het aantal cellen met het F_{420} co-enzym na additie van Na^+ . Hierbij lag er slechts één datapunt 1,5 – 3x onder de interkwantiel afstand van het minimum aantal. Het aantal cellen met het co-enzym voor de additie van Na^+ lag tussen de $7,5 \times 10^6 - 2,0 \times 10^7$ /mL, terwijl dit na additie van Na^+ $2,5 \times 10^6 - 1,8 \times 10^7$ /mL bedroeg



Figuur 32: Boxplot van het aantal cellen/mL met het F_{420} co-enzym van voor en na additie van Na^+ voor reactor 1.

7.2 Correlatie

Om een antwoord te vinden op de vraag of de flow cytometer kon gebruikt worden om de methanogene activiteit te detecteren, diende hiervoor een correlatie test uitgevoerd te worden tussen het aantal cellen met het F_{420} co-enzym en de volumetrische productie. De volumetrische productie gaf weer hoe actief de micro-organismen waren in de reactor. Als er een correlatie was tussen deze twee parameters, zou dit zeggen dat de flow cytometer kon gebruikt worden voor de bepaling van de methanogene activiteit in de reactor.

In Tabel 6 kan de correlatie tussen de volumetrische productie en het aantal cellen met het co-enzym van beide reactoren teruggevonden worden. Hierbij werd de Spearman's Rank correlatie gebruikt, doordat de datapunten van reactor 1 en 2 niet voldeden aan de voorwaarden om een Pearson correlatie test uit te voeren. Het was duidelijk dat er geen significante correlatie aanwezig was tussen de volumetrische productie en het aantal cellen met het co-enzym voor zowel reactor 1 als 2, als voor en na additie van Na^+ voor reactor 1.

De gestelde hypothesen voor deze test waren:

- H_0 : Er was geen correlatie tussen de twee parameters.
- H_1 : Er was wel een correlatie tussen de twee parameters.

De H_0 hypothese werd aanvaard als de P-waarde groter was dan $\alpha=0,05$.

Tabel 6: Correlatie tabel tussen het aantal cellen met het F_{420} co-enzym en de volumetrische productie van reactor 1 en 2.

	Reactor 1		Reactor 2
	Voor NaCl	Na NaCl	
Spearman's rho	-0,089	-0,033	-0,213
P-waarde	0,376	0,455	0,134
Correlatie	Geen	Geen	Geen

7.3 Testen

Hierbij werden enkele testen uitgevoerd op de datapunten van het aantal cellen met het F_{420} co-enzym voor zowel reactor 1 als 2.

De eerste gestelde vraag was: "Waren de aantal cellen met het F_{420} co-enzym voor reactor 1 en 2 gelijk aan elkaar voor de additie van Na^+ ?". In bijlage C kan Tabel 7 teruggevonden worden met de bijhorende uitgevoerde testen voor deze vraag. Hierbij werden eerst de voorwaarden van de Two sample t-test nagegaan. Deze voorwaarden werden niet voldaan. Hierdoor werd de niet-parametrische Mann Whitney U-test uitgevoerd. Hierbij stelde de U-toets de toetsingsgrootte of schatter voor van de Mann Whitney U-test. Uit deze laatste test werd de H_1 hypothese aanvaard. Hieruit kon besloten worden dat het aantal cellen met het F_{420} co-enzym tussen reactor 1 en 2 verschillend was.

De tweede vraag die gesteld werd, was: "Had additie van Na^+ in reactor 1 invloed op het aantal cellen met het co-enzym?". In bijlage C kan Tabel 8 teruggevonden worden met de bijhorende uitgevoerde testen voor deze vraag. Hierbij werden eerst de vooropgestelde voorwaarden nagegaan om de Two sample t-test uit te voeren. Hierbij werd aan alle vooropgestelde voorwaarden voldaan om de parametrische Two sample t-test uit te voeren. Uit deze laatste test kon besloten worden dat de H_1 hypothese aanvaard werd. Dit betekent dat het aantal cellen met het F_{420} co-enzym voor en na additie van Na^+ verschillend waren voor reactor 1. Dit wijst erop dat additie van Na^+ een invloed had op het aantal cellen met het co-enzym. Het aantal cellen met het F_{420} co-enzym was voor additie hoger dan na additie van Na^+ .

DISCUSSIE

1. Additie van Na⁺ heeft geen sterke invloed op de pH waarde

De optimale pH waarrond micro-organismen kunnen werken ligt tussen de 6,5 – 7,5, zoals beschreven in 2.2.1 (Liu et al. 2008). De pH daling in het begin werd veroorzaakt doordat de microbiële gemeenschap zich aan de nieuwe omstandigheden moest aanpassen, dit was het moment waarop voor de eerste keer influent aan de micro-organismen werd geïntroduceerd. De fluctuaties die aanwezig waren doorheen het hele proces, lag aan de temporele fluctuatie in de microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999).

Uit de pH metingen bleek dat de pH binnen de optimale range bleef doorheen het hele proces. Dit wilt niet zeggen dat additie van Na⁺ geen invloed had op de pH. Na additie van Na⁺ was er een lichte daling in pH, maar deze bleef binnen de optimale range (Rinzema et al. 1988). Door additie van Na⁺ was er wel een verschil in pH waarden ontstaan tussen beide reactoren, doordat de micro-organismen binnenin de reactor wel beïnvloed werd door de additie van Na⁺. Het is normaal dat de pH niet sterk beïnvloed wordt door additie van Na⁺. Zelfs bij een concentratie van 20 g Na⁺/L, leidde dit niet tot een sterke daling van de pH, doordat de bacteriën nog steeds optimaal konden functioneren, waarbij dit voor de methanogene archaea wel een sterke inhibitie veroorzaakt (Wang et al. 2017b). Zoals beschreven in 2.2.4.5, zorgt additie van Na⁺ voor een verbeterde hydrolyse en verzuring, met als gevolg een opstapeling van VVZ. Het herstel van de pH dat telkens waargenomen wordt, kon door de bufferende werking van melasse veroorzaakt worden (Moharrery 2007).

De aanhoudende daling startende van dag 138 tot dag 145 in reactor 1, kan als volgt verklaard worden. Doordat er tussen die periode, 5 g Na⁺ werd toegevoegd, was dit een voldoende hoge concentratie om accumulatie in VVZ te veroorzaken. De pH van dag 148 werd aangehouden, doordat de geaccumuleerde VVZ niet volledig verbruikt kon worden door de methanogene archaea. De daaropvolgende daling werd veroorzaakt door het verhogen van de toegevoegde Na⁺ concentratie (literatuurstudie, 2.2.3). Een additie van Na⁺ van 20 g Na⁺ was zeer hoog ten opzichte van wat de methanogene aan kunnen. Dit is de oorzaak voor de sterkere daling in pH tegenover de lagere concentraties in additie van Na⁺. Een concentratie van 350 mg Na⁺/L veroorzaakt een optimale groei conditie, terwijl een concentratie tussen 3,5 – 5,5 g Na⁺/L een inhiberend effect veroorzaakt (Appels et al. 2008, Rinzema et al. 1988).

Reactor 2 bevatte eveneens pH fluctuaties in de periode waar additie van Na⁺ plaatsvond in reactor 1. Dit kon veroorzaakt worden doordat de pH gemeten werd op dagen waar het influent niet ververst werd waren. Bij het meten van de pH op dergelijke momenten, waren de bekomen waarden opvallend lager dan deze gemeten tegenover de vaste momenten. De vaste momenten zijn de dagen waarop het influent ververst werd. Alle aanwezige dalen die te zien zijn in beide reactoren, sinds de additie van Na⁺ in reactor 1, waren de

momenten waarop enkel de pH gemeten werd zonder het influent te verversen. De gemeten pH op de “abnormale” momenten had een duidelijke afwijking tegenover wanneer de pH dat gemeten werd bij het verversen van het influent. Dit verklaart de aanwezige daling. Doordat de reactoren op “abnormale” momenten werd geopend, leidde dit tot een verstoring van de micro-organismen. Dit leidde tot een kleine afwijking van de steady state conditie die de micro-organismen gewoon waren. Het openen van de reactoren op momenten dat de micro-organismen het niet gewoon waren, had een verstoring van de steady state conditie tot gevolg. Dit laatste kan eveneens de oorzaak zijn in fluctuaties voor reactor 1. Fluctuaties werd ook veroorzaakt door de aanwezige temporele fluctuatie in de microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999).

Er kan finaal geconcludeerd worden dat additie van Na^+ niet veel invloed heeft op de pH, doordat Na^+ geen grote invloed heeft op de substraat consumptie van de bacteriën in de acidogene fase. Dit betekent dat de bacteriën in de acidogene fase, niet sterk door Na^+ beïnvloed kan worden. De methanogene archaea worden echter wel sterk beïnvloed door additie van Na^+ (Wang et al. 2017b). Doordat het melasse eveneens een bufferend vermogen uitoefende, dempte dit de sterke fluctuaties die konden ontstaan. Melasse zorgt echter voor een verhoogde pH (Moharrery 2007). Terwijl de geaccumuleerde zuren de pH net zouden verlagen. Deze twee laatsten zorgen net voor het neutraliseren van de pH. De invloed van additie op Na^+ op de pH werd eveneens niet ondervonden door Rinzema et al. (1988).

2. De volumetrische productie en de methaanopbrengst worden beïnvloed door additie van Na^+

De volumetrische productie is ook een maat die weergeeft hoe actief de micro-organismen zijn. Hoe meer biogas geproduceerd door de micro-organismen, hoe actiever de microbiële gemeenschap is (Wang et al. 2017b) (literatuurstudie 2.2). Zowel de volumetrische productie als methaanopbrengst fluctueren sterk doorheen het hele proces. Dit betekent dat de reactoren nog niet voldoende steady state waren.

In het algemeen worden de fluctuaties in zowel de volumetrische productie als methaanopbrengst veroorzaakt doordat het micro-organismen zijn die tewerk gaan, hetgeen gepaard gaat met natuurlijke temporele variaties (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999). Micro-organismen zijn sterk onderhevig aan variatie binnen de heersende conditie (literatuurstudie, deel 2). Hierbij zijn het de methanogene archaea die het snelst beïnvloed worden (Zaher et al. 2004). Het zijn eveneens deze archaea die hoofdzakelijk in staan voor de productie van methaan. De acetoclastische methanogene, *Methanosaeta*, speelt de meest dominante rol in de productie van methaan (Ozuolmez et al. 2015). Volgens Kim et al. (2013) zou door additie van Na^+ , er een verschuiving moeten ontstaan van de acetoclastische methanogenen naar de hydrogenotrofe methanogene. Dit laatste zorgt voor vrijstelling van VVZ. Hierbij had Wang et al. (2017b) ondervonden dat de verschuiving bij een te hoge concentratie aan Na^+ kon geïnhibeerd

worden. Wanneer de hydrogenotrofe methanogene geïnhibeerd zouden worden, zal er een stijging zijn in CO₂ concentratie en een daling in CH₄ waargenomen worden. Hierbij zijn de hydrogenotrofe archaea meer resistent tegen Na⁺ dan de acetoclastische methanogene. De hydrogenotrofe archaea kunnen functioneren tot een Na⁺ concentratie van 24,08 g/L, terwijl de acetoclastische methanogene zeer ernstig geïnhibeerd worden op een Na⁺ concentratie van 20,15 g/L (Zhang et al. 2017b). Een concentratie van 230 mg Na⁺/L was optimaal voor de groei van de acetoclastische methanogenen (Rinzema et al. 1988).

Bij de volumetrische productie vertoonde dag 110 een meer stabiele trend tussen beide reactoren, doordat de micro-organismen al beter waren aangepast aan de omstandigheden. Na additie van Na⁺ vond een stabilisatie plaats bij een concentratie van 1 en 5 g Na⁺/L. Dit kan enerzijds verklaard worden door het feit dat reactor 1 bijna een dubbel zo groot slibbed had dan reactor 2. Reactor 1 had een veel grotere slibbed dan reactor 2, doordat er in reactor 1 werd bij geïnoculeerd. Inoculatie vond plaats doordat het slib van reactor 1 sterk uitspoelde door de ijzer inhibitie. De uitspoeling was voor reactor 1 veel groter dan voor reactor 2. Hierdoor had reactor 1 een grotere slibbed, wat betekent dat de aanwezige micro-organismen in reactor 1 veel meer in competitie moesten gaan voor het vrijgestelde substraat, dan in reactor 2. Dit betekent dat, door de beperkte beschikbaarheid van het substraat, niet alle micro-organismen actief kunnen zijn. Hierdoor zullen dus minder micro-organismen actief zijn in vergelijking met de totale hoeveelheid aanwezige micro-organismen in reactor 1, door additie van Na⁺ wordt een deel van de micro-organismen geïnhibeerd waardoor er minder micro-organismen met elkaar in competitie moeten gaan en is er dus “meer” substraat aanwezig voor de overige niet geïnhibeerde micro-organismen. De verhouding van de hoeveelheid micro-organismen en beschikbaar substraat op dat moment was dan gelijkaardig als de omstandigheden in reactor 2, waardoor beide reactoren een gelijkaardige productie hadden. Anderzijds kan dit verklaard worden doordat een verhoogde productie aan CH₄ kan bekomen worden door additie van Na⁺, tot een concentratie van 5 g Na⁺/L. In dit onderzoek veroorzaakte dit een stabiele productie tegenover de periode waar geen additie van Na⁺ plaatsvond.

De micro-organismen bleven tot aan het begin van de 10 g Na⁺ toevoeging even actief in reactor 1 als in reactor 2. De concentratie van 10 g Na⁺/L was hoog genoeg om de micro-organismen een verandering van de heersende omstandigheden te laten ondergaan. Dit resulteerde in een daling en een verschil in de volumetrische productie tussen beide reactoren. Een steeds hogere zoutconcentratie werd toegevoegd in reactor 1, wat leidde tot een grotere inhibitie, minder actieve methanogenen en minder methaanproductie. Ook al zou een concentratie hoger dan 5 g Na⁺/L tot een reductie in CO₂ productie kunnen leiden, dit was hier niet het geval. Dit bewijst dat de additie van Na⁺ geen negatieve invloed had op de acidogene bacteriën. In tegenstelling tot de methanogene archaea zal een additie van Na⁺ tot 20 g Na⁺/L geen effect hebben op de acidogene bacteriën, maar zal

deze ongehinderd verder het organisch materiaal kunnen metaboliseren (Zhang et al. 2017a).

De stijging die te zien was in de volumetrische productie vanaf dag 155 in reactor 1, zou niet mogelijk mogen zijn door de stijgende Na^+ concentratie, doordat een matige inhibitie van de methanogene archaea start bij een concentratie tussen de 3,5 – 5,5 g Na^+/L , waarbij een concentratie boven de 8,8 g Na^+/L sterke inhibitie zou veroorzaken (Appels et al. 2008). Hierbij is het mogelijk dat de micro-organismen zich kunnen aanpassen aan dergelijke condities. Deze aanpassing aan de hoge concentratie aan Na^+ heeft eveneens zijn limieten. Aanpassing vindt enkel plaats wanneer de micro-organismen voldoende lang worden blootgesteld aan deze conditie (Appels et al. 2008, Wang et al. 2017b, Zhang et al. 2017b). Dit is hier niet het geval, dus aanpassing op zo'n korte periode is eveneens onmogelijk.

Volgens Figuur 13 is de productie aan biogas zowel voor als na additie van Na^+ gelijk. Dit is echter tegenstrijdig met de verklaring van Wang et al. (2017). Wang et al. (2017) verklaart dat de methanogene archaea sterk geïnhibeerd zullen worden bij een concentratie groter dan 5,00 g Na^+/L , wat leidt tot een daling in volumetrische productie. Dit laatste kan verklaard worden, doordat reactor 1 een zodanige grote slibbed had, dat een deel van de methanogene archaea geïnhibeerd werd, maar dat het overige deel nog steeds heel actief was, om de productie als voor additie van Na^+ aan te houden, doordat er net voldoende of overmaat aan substraat aanwezig was tegenover de overige actieve methanogene archaea. Tabel 3

Het was duidelijk dat in welbepaalde gevallen de methaanopbrengst hoger was dan 100%. Dit werd veroorzaakt door de temporele fluctuatie in de microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999). De gemiddelde methaanopbrengst was wel gelijkaardig zoals deze gegeven in 1.2.

De sterke fluctuaties dat in methaanopbrengst te zien is in het begin, werd veroorzaakt doordat de reactoren onvoldoende stabiel liepen en door de ongewenste ijzer inhibitie. De reactoren in dit onderzoeken werden theoretisch over meer dan 100 dagen steady state gelopen. Hierbij dient er rekening gehouden te worden met het feit dat de steady state conditie voor minder dan 85 dagen werd aangehouden. Hiervoor zijn er enkele redenen. De eerste oorzaak hiervan was doordat de reactoren in de periode van dag 39 tot 40 stilgelegd werden. De tijd waarbij beide reactoren stil lagen (tussen de theoretische 39 en 40 dagen) was een periode van 9 dagen, waarbij hiermee geen rekening gehouden werd in het verwerken van de resultaten. Er werd geen rekening gehouden doordat de reactoren stilstonden, hierdoor werd er niets geproduceerd, waardoor gedurende deze periode dus geen enkele datapunt bekomen werd. Er werd eveneens geen stalen genomen in die periode. Doordat er hevige uitspoel optrad, zonder dat de reden van deze hevige uitspoel gekend was, vond er in deze periode een tweede inoculatie plaats in beide reactoren. Door

de aanhoudende sterke uitspoeling van reactor 1, vond er zelfs een derde inoculatie plaats voor reactor 1 (op de dag dat de reactoren weer werden aangezet). Daarna werden de reactoren terug op dag 40 gestart, hierbij bleef de uitspoeling aanwezig, maar was deze veel minder sterk als daarvoor door de uitgevoerde inoculatie. Pas rond dag 60 was de oorsprong van het sterke uitspoel gekend, dit kwam door ongewenste ijzer inhibitie (literatuurstudie 2.2.4.5). Er werd namelijk een metalen stukje gebonden aan het influent tube, rond dag 20, zodat het influent tube voldoende gewicht had om onderaan in het influent vat te blijven. In het begin gaf dit geen ijzer af, maar naarmate de tijd begon het wel sterk ijzer af te geven. In het begin was er slechts kleine concentraties aan ijzer afgegeven, wat bevorderend was voor de microbiële gemeenschap. Naarmate de tijd verliep, was de afgegeven ijzer concentratie steeds sterker, waardoor er onbewust inhibitie optrad in de periode van 40 tot 60 dagen. Hierdoor was herstel nodig van de micro-organismen. Dit herstel had tijd nodig, waardoor het bekomen van een steady state hierdoor nog langer was. Daarnaast werden de reactoren gestopt (op dag 85) over een periode van ongeveer 2 maanden lang. Doordat de reactoren over zo'n lange periode gestopt werden, was de voorgaande op gang komende steady state verloren gegaan. Hierdoor moesten de reactoren na het stoppen van 2 maand opnieuw tot steady state gebracht worden, wat betekent dat deze opnieuw over een periode van 100 dagen moesten gelopen worden aan een constante conditie. Dit werd niet gedaan, hierbij werd na het lopen van 50 dagen onder steady state conditie, de heersende condities gewijzigd, waardoor er dus nooit echte steady state werd bereikt voor de additie van Na^+ .

De methaanopbrengst voor beide reactoren fluctueerden zeer sterk doorheen het hele proces. Rond de periode van dag 40 tot dag 60, was er sterke fluctuatie waar te nemen. Dit kan verklaard worden doordat er een metalen stuk aan het influent tubing werd vastgehangen. Dit gaf zeer veel ijzer af aan het influent, waardoor deze voor ongewenste condities in de reactor zorgde (literatuurstudie, 2.2.4.4). De hoeveelheid ijzer die werd vrijgesteld werd niet bepaald, maar het veroorzaakte wel een zwarte kleur in het influent, op de plaats waar het metalen stuk zich bevond. Dit is de oorzaak van de sterke fluctuatie in deze periode. Zoals vermeld in 2.2.4.4, heeft ijzer een invloed op de biogas productie, waardoor dit een daling veroorzaakte in de volumetrische productie rond de periode van 40 tot 60 dagen. De invloed van het ijzer is sterker te zien in de methaanopbrengst dan in de volumetrische productie. Dit betekent dat de gehele bacteriële gemeenschap niet veel invloed had ondervonden en dat vooral de methanogene archaea een invloed had ondervonden. Doordat de opbrengst lager was, wijst dit op een veel lagere efficiëntie in de vorming van methaan. In deze periode werd er ook een zeer sterke uitspoeling van het slib waargenomen.

De stijging van dag 60 tot 64 vond plaats doordat op dag 60 het metalen stukje verwijderd was van het influent tube. Hierbij was dit nog steeds geen verklaring voor deze stijging, doordat er nog steeds ijzer aanwezig was in de reactor zelf. Wanneer er voor dezelfde periode gekeken wordt naar de VVZ productie, dan kan er eveneens een stijging

waargenomen worden. Dit betekent dat de methanogenen niet optimaal actief waren, waarbij er een daling zou verwacht worden. Een oorzaak hiervan kan zijn door de aanwezige temporele fluctuatie in microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999). De daling van dag 64 tot 67 was doordat er nog voldoende ijzer aanwezig was in de reactoren om een daling te veroorzaken. Wanneer dit opnieuw vergeleken wordt met de VVZ productie, voor dezelfde periode. Kon er eveneens een sterke daling in VVZ productie opgemerkt worden, hieruit zou er afgeleid worden dat de methanogene archaea actief zijn. Dit laatste is echter niet het geval, wanneer er naar de methaanopbrengst gekeken wordt. Naast ijzer inhibitie kon dit ook veroorzaakt worden door de temporele fluctuatie in de microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999).

De aanhoudende lage methaanopbrengst in de periode van dag 67 tot dag 81 was doordat de micro-organismen die onderhevig waren aan het voorgaande ingepompte ijzer zich moesten herstellen. De sterke stijging in methaanopbrengst na dag 81 werd veroorzaakt doordat de micro-organismen wel hersteld waren en dus een optimale werking konden verrichten. De trend van de methaanopbrengst was sinds dag 81 gelijkaardig voor beide reactoren. Dit is een sterke aanwijzing dat de micro-organismen hersteld waren naar de oorspronkelijke steady state conditie. De stijging is sterker voor reactor 1 dan 2, wat betekent dat reactor 2 nog niet volledig hersteld was.

In tegenstelling tot de volumetrische productie begint het verschil in methaanopbrengst zich voor te doen op het moment dat er 5 g Na⁺ werd toegevoegd. De daling is voor beide reactoren te zien. Dit wil niet zeggen dat de oorzaak van de daling voor beide reactoren hetzelfde was. De daling in reactor 1 kon veroorzaakt worden door Na⁺ additie, wat betekent dat de methanogene archaea beïnvloed werden door de toegevoegde Na⁺, waardoor deze minder efficiënt methaan konden produceren. Het kan ook zijn dat de daling van reactor 1 dezelfde oorzaak had als reactor 2. Dit laatste kan te wijten zijn aan de variatie van de heersende omstandigheden, doordat de microbiële gemeenschap voor additie van Na⁺ nog niet in steady state was. De micro-organismen waren nog niet volledig geadapteerd aan de heersende conditie die gelopen werd onder steady state. Doordat de micro-organismen hieraan nog niet volledig aangepast waren, zal een continue variërende influent samenstelling (door additie van Na⁺) voor nog sterkere fluctuaties zorgen.

In de periode van dag 40 tot dag 81 had reactor 1 een beduidende grotere methaanopbrengst dan reactor 2. Dit komt doordat het slibbed van reactor 1 bijna dubbel zo groot was dan reactor 2. In de periode waar inhibitie van ijzer plaatsvond, had een dubbel zo grote slibbed duidelijke voordelen. Doordat er meer micro-organismen/methanogene archaea aanwezig waren en dus ook meer actieve methanogene archaea over na inhibitie tegenover reactor 2.

3. Het TSS en VSS gehalte zal door additie van Na⁺ en degranulatie stijgen

De grafieken van de totale en vluchtige gesuspendeerde vaste stof hebben in het algemeen dezelfde trend.

In het begin van de Na⁺ additie verliep de uitspoeling aan organische en anorganische zwevende stof (TSS) in het effluent gelijkaardig tussen beide reactoren. Doordat de concentratie van Na⁺ verwaarloosbaar was tegenover de hoeveelheid aanwezige micro-organismen. Vanaf een concentratie van 5 g Na⁺/L was de concentratie genoeg om een verschil te veroorzaken. Door toevoeging van een voldoende hoge Na⁺ concentratie zou degranulatie van het granulaire slib verwacht worden, waardoor meer uitspoeling van zwevende stof zou bekomen worden. De reden waarom reactor 1 na 5 g Na⁺/L meer uitspoeling vertoonde, was doordat de methanogene archaea voor de eerste keer werd blootgesteld aan zo'n hoge concentratie Na⁺ dat inhibitie kon veroorzaken. Zoals eerder vermeld treedt inhibitie van de methanogene archaea op bij een Na⁺ concentratie van 3,5 – 5,5 g Na⁺/L (Appels et al. 2008). De sterke daling voor reactor 2 op dag 80 kwam doordat er op die dag minder VVZ werd geproduceerd, wat betekent dat reactor 2 stabiel was en dat de microbiële gemeenschap optimaal zou moeten werken. Doordat de microbiële gemeenschap optimaal werkte, betekent dit dat er een optimale verwijdering was in organisch materiaal. Dit laatste veroorzaakte de sterke daling in TSS gehalte in het effluent, doordat het VSS deel uitmaakt van het TSS. Door de stabiliteit was er dus niet veel uitspoeling aan biomassa. Wanneer er gekeken wordt naar de volumetrische productie voor dezelfde periode, dan kan er een lichte daling in productie gezien worden. Dit laatste stemt echter bijna volledig overeen met de redenering die gemaakt kon worden vertrekkende van de productie aan VVZ (literatuurstudie, 1.2). Door de lichte daling in volumetrische productie wees dit erop dat de micro-organismen niet volledig optimaal konden werken. De werking van de micro-organismen was wel voldoende om een daling in TSS gehalte te veroorzaken. Doordat de verwijdering van het organisch materiaal aanwezig in het influent voldoende was om een daling in TSS gehalte te veroorzaken. Door voldoende verwijdering van het organisch materiaal in het influent resulteerde dit in een lage VSS gehalte in het effluent, en dus een lage TSS gehalte. De sterke stijging op dag 90 voor reactor 2, werd veroorzaakt doordat er een lage productie van VVZ plaatsvond. Door de lage productie aan VVZ, veroorzaakte dit een betere werking van de microbiële gemeenschap, waardoor de micro-organismen beter konden werken. Wanneer er opnieuw vergeleken wordt met de hiermee corresponderende volumetrische productie, kon hieruit afgeleid worden dat er een stijgende productie plaatsvond. Dit laatste gaf aan dat de micro-organismen weer optimaal konden functioneren door de sterke piek in de volumetrische productie, doch blijkt dit niet volledig optimaal te zijn. Desondanks dat er lage waarden VVZ geproduceerd werd trad hier toch uitspoeling op van de micro-organismen, wat in een stijging van TSS resulteerde (literatuurstudie, 2.2.4). Dit laatste kan veroorzaakt worden door de temporele fluctuaties in de microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999). De daling in reactor 1 na additie van Na⁺ hangt af van de hoeveelheid VSS. Deze twee vertonen echter een gelijkaardige trend, voor beide

reactoren, doordat VSS een deel van TSS uitmaakt. De enige reden dat er variatie tussen TSS en VSS kan ontstaan is door de anorganische fractie.

Het VSS gehalte in het effluent van beide reactoren was voor de additie van Na^+ laag tegenover na de additie van Na^+ . De sterke fluctuatie in de periode tussen de 80 en 90 dagen van reactor 2 werd veroorzaakt door de geproduceerde VVZ (literatuurstudie, 1.2). Deze VVZ werden geproduceerd door het wel of niet actief zijn van de microbiële gemeenschap. Net als bij het TSS was er op dag 80 minder VVZ productie, doordat de microbiële gemeenschap actief was. Hierdoor was er ook niet veel uitspoeling van de biomassa, terwijl op dag 90 er relatief veel VSS was in reactor 2 tegenover de andere perioden. Op dag 90 werd minder VVZ geproduceerd, toch is dit niet de oorzaak van de sterke stijging in VSS. Deze verklaring kan ook bevestigd worden door naar de overeenkomstige periode bij de volumetrische productie te kijken. De sterke stijging in VSS kon veroorzaakt worden door de temporele fluctuatie in de microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999). Het dal op dag 80 stemt overeen met de corresponderende lichte dal in de volumetrische productie, wat betekend dat de methanogene archaea minder actief waren. Dezelfde redenering kan gemaakt worden voor dag 90. De stijging in VSS in het effluent van reactor 1 kan verklaard worden door de additie van Na^+ . De Na^+ zou zorgen voor de degranulatie van het granulair slib, hierdoor zouden er micro-organismen vrij komen, waardoor er een verhoogde uitspoeling wordt verwacht (Gagliano et al. 2017). De verhoogde uitspoeling wordt niet verwacht bij een additie van 5 g Na^+ . Een stabilisatie wordt verwacht bij een concentratie van 5 g Na^+/L . Dit laatste is mogelijk en wordt verklaard door Wang et al. (2017b). Een Na^+ concentratie tot 5 g Na^+ , kan namelijk de productie aan CH_4 verbeteren (Wang et al. 2017b), wat betekent dat de micro-organismen actiever zijn. Een verhoogde productie kan enkel bekomen worden als de micro-organismen stabiel genoeg zijn. Bij een additie van Na^+ hoger dan 5 g Na^+/L , wordt er een sterke uitspoeling verwacht, doordat de methanogene archaea sterk geïnhibeerd worden (Appels et al. 2008). Inhibitie resulteert echter in het loskomen van micro-organismen uit de granulen en deze kunnen dus uitgespoeld worden. Dit laatste verwachte resultaat werd niet waargenomen. Dit kan als volgt verklaard worden. Door de additie van Na^+ werden de methanogene archaea geïnhibeerd, maar bleven de bacteriën nog actief zonder enige invloed van de additie van Na^+ . Dit laatste wordt bevestigd door de productie van VVZ tijdens de periode waar additie van Na^+ plaatsvond. Inhibitie van enkel methanogene archaea kon geen sterke of opvallende degranulatie van het granulair slib veroorzaken, hierdoor trad er geen sterke uitspoeling op gedurende deze periode. Dit laatste kon bevestigd worden door naar de gemeten Ca^{2+} concentratie te kijken (Figuur 19). Wanneer er naar Figuur 19 gekeken wordt voor de corresponderende periode waar additie van Na^+ plaatsvond, kon er geen sterke uitspoeling aan Ca^{2+} waargenomen worden. De lage uitspoeling aan Ca^{2+} wijst erop dat de degranulatie van het granulair slib niet sterk plaatsvond (Gagliano et al. 2017). Een andere verklaring voor de mogelijks stabiele VSS in de periode waar additie van Na^+ plaatsvond, die hoger was dan 5 g Na^+/L , is doordat een groot deel van de uitgespoelde micro-organismen al reeds uit de reactor

verwijderd waren. Waarbij de overige uitgespoelde hoeveelheid micro-organismen in de reactor zeer laag was (hierbij werden de stalen maar wekelijks één keer genomen, door de sterke uitspoeling gedurende 1 week tijd, kon hierdoor wel het grootste deel volledig uit de reactor verwijderd worden).

4. Door NaCl toevoeging zal de calcium concentratie in het effluent moeten stijgen

Natriumchloride is een stress factor voor de micro-organismen. Doordat natriumchloride splitst in Na^+ en Cl^- , zal natrium calcium vervangen in de granulen. Het granulair slib bevat namelijk calcium om de structuur te behouden. Doordat Na^+ het Ca^{2+} in het slib zou vervangen, zou hierdoor Ca^{2+} vrijgesteld kunnen worden (literatuurstudie, 2.2.4.5).

De vrijstelling van Ca^{2+} gebeurt niet met een 1 op 1 verhouding met Na^+ . Natrium is een éénwaardig atoom, terwijl calcium een tweewaardig atoom is, wat betekent dat er twee Na^+ atomen nodig zijn om één Ca^{2+} atoom te vervangen. De Ca^{2+} concentratie zou dus minder sterk moeten stijgen dan de toegevoegde Na^+ concentratie. In Figuur 19 is een stijging in Ca^{2+} concentratie te zien in beide reactoren. Dit geeft echter een dubbelzinnig beeld. Enerzijds kan de stijging in Ca^{2+} concentratie in reactor 1 degelijk veroorzaakt worden door de additie van Na^+ . Anderzijds kan de stijging in Ca^{2+} concentratie puur veroorzaakt worden door de micro-organismen zelf, doordat de Ca^{2+} concentratie ook stijgt in reactor 2. Een derde mogelijkheid voor de stijging aan de Ca^{2+} concentratie in beide reactoren is door melasse zelf. Melasse heeft van oorsprong ook vrij veel Ca^{2+} . De laatste mogelijke oorzaak is dat K^+ zorgt voor de vrijstelling van Ca^{2+} , deze vrijstelling gebeurt onafhankelijk van Na^+ (literatuurstudie, 2.1).

Hierbij werd de hoeveelheid aanwezige ammoniak eveneens nagegaan. Dit werd als controle uitgevoerd om aan te tonen dat het falen van het proces volledig veroorzaakt werd door additie van Na^+ en niet door ammoniak (literatuurstudie, 2.2.4.5). Een andere bevestiging dat inhibitie niet veroorzaakt werd door ammoniak, is de productie van VVZ. Inhibitie van ammoniak leidt tot een stijging in VVZ en heeft een pH daling tot gevolg (Angelidaki and Ahring 1993, Weiland 2010). Doordat de geproduceerde VVZ onder de grenzen lagen van 500 mg VVZ/L, wijst dit er nogmaals op dat ammoniak het falen van reactor 1 niet veroorzaakt had.

5. Flowcytometrie kan gebruikt worden voor de detectie van het co-enzym maar niet voor de detectie van de biogasproductie

Uit de methode ontwikkeling kon bewezen worden dat de detectie van het F_{420} co-enzym mogelijk was met de flow cytometer, door eerst de cellen te staineren met SYBR Green®. De bepaling van de biogasproductie met behulp van de flow cytometer is echter niet mogelijk. Dit werd bewezen met een correlatie test. De volumetrische productie is een indicator voor de methanogene activiteit. Als er een correlatie was tussen deze twee

parameters, betekent dit dat de flow cytometer kan gebruikt worden voor de bepaling van de biogasproductie. Een positieve correlatie zou betekenen dat een stijgende volumetrische productie zou resulteren in een stijgende methanogene activiteit, terwijl een negatieve correlatie zou betekenen dat een stijgende volumetrische productie resulteert in een dalende methanogene activiteit, en omgekeerd. Uit de correlatie testen kon er bepaald worden dat er geen correlatie zich bevindt tussen deze twee parameters, wat betekent dat de flow cytometer niet kan gebruikt worden voor de bepaling van de activiteit van de biogasproductie.

De fluctuaties kunnen eveneens liggen aan de natuurlijke temporele variatie in microbiële proces performantie (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999). De werking van de micro-organismen varieert ook door het niet volledig steady state lopen van de reactoren. Hierbij zijn de fluctuaties voor reactor 2 groter dan deze voor reactor 1. Hieruit kan er eveneens afgeleid worden dat beide reactoren nog niet voldoende stabiel waren voor de Na^+ additie.

6. Additie van NaCl zorgt voor een lagere uitspoeling in het aantal cellen met het F_{420} co-enzym

Additie van natriumchloride zorgt voor twee mogelijke gevolgen, enerzijds zorgt dit voor de degranulatie van het granulair slib en anderzijds zorgt dit voor de inhibitie van de micro-organismen, dit is dus een dubbel effect conditie (Appels et al. 2008, Wang et al. 2017b, Zhang et al. 2017b) (literatuurstudie, 2.2.4.5).

Enerzijds kan verwacht worden dat door degranulatie er meer micro-organismen vrij zouden komen. Doordat degranulatie veroorzaakt wordt door het vervangen van Ca^{2+} atomen door Na^+ atomen. Degranulatie wordt dus niet veroorzaakt door het inactief worden van de methanogene archaea. Dit leidt dus tot een hogere uitspoeling van micro-organismen en dus een hogere uitspoeling aan actieve methanogene archaea in het effluent. Een hogere uitspoeling aan methanogene archaea betekent een hoger aantal cellen met het F_{420} co-enzym dat gedetecteerd kan worden met de flow cytometer. Dus wordt er een stijgende hoeveelheid aan de F_{420} positieve cellen verwacht.

Anderzijds veroorzaakt de additie van Na^+ eveneens inhibitie van de micro-organismen. Dit betekent dat de micro-organismen binnenin het granulair slib worden geïnhibeerd en hierdoor niet meer kunnen functioneren. Als eerste worden de methanogene archaea geïnhibeerd, deze zijn ook het meeste gevoelig. Doordat ze geïnhibeerd worden, zijn deze dus niet meer actief en kunnen deze ook niet meer gedetecteerd worden, wat leidt tot een daling van het aantal cellen met het F_{420} co-enzym dat mogelijks gedetecteerd kan worden.

Uit Figuur 27 kan er een daling in het aantal cellen met het co-enzym afgeleid worden na additie van Na^+ . Uit Figuur 19 kan er geen sterke stijging in Ca^{2+} gezien worden, wat betekent dat er geen of weinig degranulatie plaatsvond. Dit wil dus zeggen dat inhibitie de

degranulatie overtreft, wat betekent dat de inhibitie eerder en sneller zal plaatsvinden vooraleer de degranulatie van het granulair slib optreedt. Hierbij is er ook een stijging in Figuur 27 te zien in het aantal uitgespoelde cellen met het co-enzym na een daling rond dag 75. Deze daling in reactor 1 kan verklaard worden, doordat er in die periode productie was van VVZ en dit zorgde voor de inhibitie van de methanogene archaea. Een inhibitie van deze archaea leidt tot een verminderde hoeveelheid actieve methanogene cellen, en dus een verminderde hoeveelheid cellen met het co-enzym. De productie aan verhoogde VVZ wordt veroorzaakt door additie van Na^+ .

Inhibitie zorgt ervoor dat de micro-organismen niet meer functioneel worden. Degranulatie zorgt ervoor dat het granulaire slibkorrel een meer open structuur krijgt. De open structuur heeft tot gevolg dat het slib meer in contact komt met het gas. Hierdoor kan het gas sneller tussen deze openingen zitten, waardoor het slib dus gaat floteren (literatuurstudie 2.2.4.5). Bij de positieve staalname kon er opgemerkt worden dat na additie van Na^+ , er steeds minder floterende granulair slib aanwezig was. Desondanks dat er minder granulair slib aanwezig was, waren er ook minder methanogene archaea aanwezig dan voor de additie van Na^+ , wat leidde tot een lager aantal cellen met het F_{420} co-enzym. Dit bevestigt nogmaals dat inhibitie sneller plaatsvond dan degranulatie van het granulair slib, maar het kon ook veroorzaakt worden doordat al het floterende slib rechtstreeks uit de reactor werd verwijderd. Met rechtstreekse verwijdering wordt bedoeld, dat door de te grote hoeveelheid floterende slib aanwezig was, dat deze onmiddellijke uitspoeling uit de reactor veroorzaakte. De rechtstreekse verwijdering van de grote hoeveelheid slib kan ook de oorzaak zijn voor het bekomen van een stabiel VSS gehalte in het effluent, in reactor 1.

7. De dikte van het slibbed heeft invloed op de uitspoeling van de methanogene archaea

Reactor 1 heeft een bijna dubbel zo grote slibbed dan reactor 2. Hierdoor zal het aantal micro-organismen aanwezig in reactor 1 bijna dubbel zo hoog zijn dan reactor 2. Het vrijgestelde substraat door het influent voor beide reactoren waren gelijk. Dit betekent dat de micro-organismen in reactor 1 veel meer met elkaar onderling in competitie moesten treden om substraat te verkrijgen. Hierdoor zullen de micro-organismen die niet of onvoldoende substraat kregen, niet of onvoldoende actief zijn, terwijl de micro-organismen in reactor 2 veel minder of niet in competitie moeten gaan voor het aanwezige substraat. Dit zorgde ervoor dat er relatief meer micro-organismen actief waren in reactor 2 dan in reactor 1. Het absolute aantal actieve micro-organismen was voor beide reactoren gelijkaardig, hetgeen zich vertaalt in de gelijke volumetrische productie in beide reactoren.

Doordat er relatief gezien meer micro-organismen actief waren in reactor 2 dan in 1, kon hieruit afgeleid worden dat er meer methanogene archaea actief waren, wat betekent dat er veel meer cellen met het F_{420} co-enzym aanwezig waren in reactor 2 dan 1. Dit kon de oorzaak zijn waarom reactor 2 een grotere uitspoeling had in het F_{420} co-enzym dan reactor 1, in het effluent. De sterkere uitspoeling in reactor 2 kon ook veroorzaakt worden door de

voorgaande ijzer inhibitie dat zich nog steeds niet volledig had hersteld. De sterke fluctuatie in uitspoeling kon ook gerelateerd worden aan de temporele variatie van de micro-organismen (De Vrieze et al. 2013, Fernandez et al. 1999). Fluctuatie werden door de micro-organismen veroorzaakt, doordat deze nog niet voldoende steady liepen. Doordat deze al niet steady liepen bij een constante influent samenstelling, zullen deze zeker geen continue productie geven bij een variërende influent samenstelling, doordat de micro-organismen zich telkens opnieuw moest aanpassen.

8. Toekomstige onderzoeken dat uitgevoerd kan worden

8.1 Optimalisatie van de huidige onderzoek

Voor verder onderzoek kunnen in de toekomst de reactoren over een lagere periode steady state gelopen worden, waardoor de fluctuaties die in dit onderzoek optraden al vermeden kunnen worden. Door een meer steady state microbiële samenstelling kan hieruit de bekomen data ook duidelijker zijn, terwijl hier de pieken en dalen regelmatig dubbelzinnige betekenissen konden hebben. Doordat de pieken als dalen zowel in reactor 1 als 2 soms voorkwamen, was het niet exact duidelijk wat de achterliggende oorzaak was van deze fluctuatie.

Een hogere Na^+ concentratie toevoegen zou ook mogelijk zijn. Door naar een hogere Na^+ concentratie te gaan, kan er enerzijds bepaald worden wat de maximale Na^+ concentratie is dat de bacteriën aan kunnen. Anderzijds kan er bepaald worden bij welke zout concentratie er sterke degranulatie optreedt.

Niet enkel het lopen van de reactoren kan geoptimaliseerd worden, de gebruikte methode voor de flowcytometrische monitoring kan eveneens geoptimaliseerd worden. De optimalisatie geldt niet enkel voor de methode ontwikkeling, maar eveneens bij de preparatie van de stalen. Hierbij kan er voor een andere manier dan sonificatie geopteerd worden, waarbij de cellen sterker opengebrouwen kunnen worden en dus meer co-enzymen zouden vrijstellen.

8.2 Toekomstige onderzoeksmogelijkheden

Een vervolg op dit onderzoek is de rechtstreekse additie van Na^+ in de reactoren. In plaats van *via* het influent Na^+ introductie in de reactoren te bekomen. Rechtstreekse blootstelling van Na^+ aan de micro-organismen kan een sneller effect hebben naar inhibitie toe en of inhibitie optreedt bij een even hoge zout concentraties als in het influent.

Naast natriumchloride kon er ook geopteerd worden voor de additie van een ander zout, zoals kaliumchloride, ammoniumchloride of een combinatie van deze zouten, om het effect van verschillende zouten na te gaan.

In de toekomst kan er eerst ook bepaald worden hoeveel methanogene archaea er in totaal aanwezig zijn in de reactor. Waarbij eveneens bepaald wordt, hoeveel van deze methanogene archaea het F₄₂₀ co-enzym bevatten. Hierdoor kan bepaald worden hoeveel cellen met het F₄₂₀ co-enzym uitspoelen tegenover de totale hoeveelheid cellen met het F₄₂₀ co-enzym. De bepaling van de methanogene archaea kan eventueel met behulp van qPCR.

Er kan ook eerst een pure cultuur van methanogene archaea bekomen worden. Dit kan door de slibkorrels eerst te beschadigen. Daarna worden de bekomen micro-organismen uitgeplaat op een medium. Het gebruikte medium dient specifiek te zijn voor de groei van de methanogene archaea. Op die bekomen methanogene archaea wordt dan het aantal co-enzymen bepaald per populatie. Hierdoor kan er bepaald worden hoeveel co-enzymen er globaal aanwezig zijn in een pure cultuur. Dan kan dit vergeleken worden met het aantal dat in het slib aanwezig is.

In plaats de daling van het co-enzym na te gaan, kan er ook geprobeerd worden om de anaerobe vergisting te optimaliseren. Hiermee wordt bedoeld om zoveel mogelijk parameters te optimaliseren. Na optimalisatie kan er gekeken worden naar het aantal cellen met het co-enzym *via* de flowcytometrische bepaling. Dit laatste kan als bevestiging dienen op dit onderzoek of dat de flow cytometer een verandering van het aantal cellen met het co-enzym kan detecteren of niet. Het verschil met dit onderzoek is dat er hier door optimalisatie geen uitspoel en degranulatie van het granulair slib kan ontstaan. Dit laatste is al een parameter minder dat fluctuerende en dubbelzinnige verklaring voor de resultaten kan geven. Door optimalisatie zou verwacht worden dat de methanogene archaea continu optimaal actief zou zijn en dus ook een aanhoudende of stijgende hoeveelheid cellen met F₄₂₀ co-enzym. Door dit te combineren met de qPCR kan dit rechtstreekse bevestiging geven of dat flowcytometrische metingen mogelijk zijn.

BESLUIT

Uit dit onderzoek kan geconcludeerd worden dat het proces onvoldoende steady state genoeg was om variatie, *i.e.*, de toevoeging van NaCl, in het systeem te brengen vooraleer de microbiële gemeenschap stabiel was. Aanwijzingen dat het proces onvoldoende steady state was, kunnen teruggevonden worden in de volumetrische productie, methaanopbrengst en TSS en VSS in het effluent. Dit komt doordat de micro-organismen binnenin het systeem nog niet volledig aangepast waren aan de stabiele heersende condities (influent samenstelling, temperatuur, pH). Hierbij dient er in het achterhoofd gehouden te worden dat theoretisch gezien de reactoren wel 100 dagen onder steady state gelopen werd, maar dit niet het geval was in de praktijk. Doordat deze tweemaal middenin de steady state periode stilgelegd waren, waarna, na een periode van 2 maand, deze opnieuw opgestart werden en dit over 50 dagen steady state gelopen werd. Desondanks dat het systeem onvoldoende steady state was, werd toch additie van Na⁺ toegepast. De additie van Na⁺ werd in stijgende lijnen toegepast. Ter controle dat het falen van het proces wel degelijk veroorzaakt werd door additie van Na⁺ en niet door andere factoren, werden hiervoor de kationen concentraties en de vluchtige vetzuren bepaald.

De pH vertoonde slechts lichte fluctuaties doorheen het hele proces. Zelfs door additie van Na⁺ veroorzaakte dit slechts een lichte fluctuatie. Additie van Na⁺ heeft geen sterke accumulatie van VVZ veroorzaakt, waardoor dit geen inhibitie kon veroorzaken van het anaerobe vergistingsproces. Dit is dan ook de verklaring waarom er geen sterke daling in pH aanwezig was doorheen het proces. Uit de volumetrische productie kan bepaald worden hoeveel energie uit de anaerobe vergisting gehaald kan worden. Hieruit blijkt dat een concentratie lager dan 5 g Na⁺/L de volumetrische productie aan biogas mogelijks kan verbeteren. Terwijl de productie bij een 5 g Na⁺/L verbeterd wordt, zal in tegendeel de methaanopbrengst door additie van Na⁺ dalen. Dit wijst erop dat de methanogene archaea sterk beïnvloed wordt door Na⁺. De methaanopbrengst geeft weer hoe efficiënt de omzetting naar methaan kan gebeuren door de micro-organismen. In tegenstelling tot de pH, konden in de volumetrische productie en methaanopbrengst wel duidelijke veranderingen opgemerkt worden.

Het TSS en VSS gehalte bepalen hoe de samenstelling van het effluent is na anaerobe zuivering van het influent. Door combinatie van de geproduceerde VVZ en volumetrische productie, kon er bepaald worden of de micro-organismen in bepaalde periodes al dan niet actief waren, wat leidde tot de bijhorende volumetrische productie en VVZ productie. De uitspoeling van biomassa werd gestabiliseerd waar er additie van Na⁺ plaatsvond, terwijl dit niet het geval was voor de reactor waar geen additie van Na⁺ plaatsvond. Dit was echter onverwacht, daar net het omgekeerde zou verwacht worden. Additie van Na⁺ gaf een duidelijk verschil in TSS en VSS gehalte in het effluent, vergeleken met voor additie van Na⁺, voor beide reactoren. De achterliggende reden in het verschil van deze resultaten voor reactor 1 werd veroorzaakt door additie van Na⁺, terwijl de oorzaak van reactor 2 ligt aan de functionaliteit van de micro-organismen.

De flow cytometer kan gebruikt worden voor de detectie van het F_{420} co-enzym. Dit is mogelijk doordat hiervoor een specifieke methode werd ontwikkeld en geoptimaliseerd. Opvolging van de biogasproductie door middel van de flow cytometer is echter niet mogelijk. Dit kon geconcludeerd worden uit de correlatie test tussen de volumetrische productie en het aantal gemeten cellen met het F_{420} co-enzym door de flow cytometer. Doordat er een statistische test werd uitgevoerd op de invloed van Na^+ op het aantal cellen met het co-enzym (Tabel 8), kan hieruit besloten worden dat Na^+ additie geen invloed heeft op de concentratie aan cellen met het F_{420} co-enzym. Uit de bekomen resultaten van de flow cytometer kan er eveneens een sterke fluctuatie in het aantal gemeten cellen met het co-enzym gezien worden, zowel voor het effluent als slibstaal. De fluctuatie voor reactor 1 voor additie van Na^+ werd veroorzaakt doordat de micro-organismen zich nog aan het aanpassen waren aan de heersende steady state omstandigheden, terwijl na additie van Na^+ de daling veroorzaakt werd door Na^+ .

Finaal kan besloten worden dat de flow cytometer een potentieel heeft voor het meten van het F_{420} co-enzym, maar deze kan niet gebruikt worden voor de bepaling van de biogasproductie. De flow cytometer kan nog steeds gebruikt worden voor het meten van de cellen met het co-enzym, niet voor de bepaling van de biogasproductie, maar mogelijks voor een andere doeleinden. Een voorbeeld hiervan is de detectie van contaminatie van de door de mens geconsumeerde voedingsmiddelen, door micro-organismen die het co-enzym bevatten. De flow cytometer laat een snelle detectie toe van het F_{420} co-enzym.

REFERENTIE

- A Jackson-Moss, C. and R Duncan, J. (1990) The effect of iron on anaerobic digestion.
- Ahring, B.K. (1995) Methanogenesis in thermophilic biogas reactors. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67(1), 91-102.
- Angelidaki, I. and Ahring, B. (1993) Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia.
- Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J. and Dewil, R. (2008) Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* 34(6), 755-781.
- Appels, L., Lauwers, J., Degreè, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., Van Impe, J. and Dewil, R. (2011) Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15(9), 4295-4301.
- Ashby, K.D., Casey, T.A., Rasmussen, M.A. and Petrich, J.W. (2001) Steady-State and Time-Resolved Spectroscopy of F420 Extracted from Methanogen Cells and Its Utility as a Marker for Fecal Contamination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(3), 1123-1127.
- Bischoff, M. (2009) Erkenntnisse beim Einsatz von Zusatz- und Hilfsstoffen sowie von Spurenelementen in Biogasanlagen.
- Britton, C. and Legallais, V.A. (1967) Spectrofluorometer, Google Patents.
- Brown, M. and Wittwer, C. (2000) Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 46(8), 1221.
- C. Vandevivere, P., Bianchi, R. and Verstraete, W. (1998) Review: Treatment and Reuse of Wastewater from the Textile Wet-Processing Industry: Review of Emerging Technologies.
- Chávez Fuentes, J.J., Hutnan, M., Sedmák, P., Zakhar, R. and Czölderova, M. (2016) Sulphide inhibition and its mitigation in the anaerobic digestion of residual fermentation biomass from the production of cystine.
- Cheeseman, P., Toms-Wood, A. and Wolfe, R.S. (1972) Isolation and Properties of a Fluorescent Compound, Factor(420), from Methanobacterium Strain M.o.H. *Journal of Bacteriology* 112(1), 527-531.
- Chen, Y., Cheng, J.J. and Creamer, K.S. (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99(10), 4044-4064.
- Chowdhury, R.K. and El-Shorbagy, W. (2013) Informatics, Logistics and Governance in Water Treatment Processes.
- Cortinas, I., Field, J.A., Kopplin, M., Garbarino, J.R., Gandolfi, A.J. and Sierra-Alvarez, R. (2006) Anaerobic Biotransformation of Roxarsone and Related N-Substituted Phenylarsonic Acids. *Environmental Science & Technology* 40(9), 2951-2957.
- Creamer, K.S., Chen, Y., Williams, C.M. and Cheng, J.J. (2010) Stable thermophilic anaerobic digestion of dissolved air flotation (DAF) sludge by co-digestion with swine manure. *Bioresource Technology* 101(9), 3020-3024.
- Cunha, A., Silva, E., Pereira, F., Briga-Sá, A. and Pereira, S. (2017) From water to energy: low cost water & energy consumptions readings. *Procedia Computer Science* 121, 960-967.
- De Roy, K., Clement, L., Thas, O., Wang, Y. and Boon, N. (2012) Flow cytometry for fast microbial community fingerprinting. *Water Research* 46(3), 907-919.
- De Vrieze, J., Raport, L., Willems, B., Verbrugge, S., Volcke, E., Meers, E., Angenent, L. and Boon, N. (2015a) Inoculum selection influences the biochemical methane potential of agro-industrial substrates.
- De Vrieze, J., Saunders, A.M., He, Y., Fang, J., Nielsen, P.H., Verstraete, W. and Boon, N. (2015b) Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. *Water Research* 75, 312-323.
- De Vrieze, J., Smet, D., Klok, J., Colsen, J., Angenent, L.T. and Vlaeminck, S.E. (2016) Thermophilic sludge digestion improves energy balance and nutrient recovery potential in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 218(Supplement C), 1237-1245.
- De Vrieze, J., Verstraete, W. and Boon, N. (2013) Repeated pulse feeding induces functional stability in anaerobic digestion. *Microbial Biotechnology* 6(4), 414-424.

Demirel, B. and Scherer, P. (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7(2), 173-190.

Demirel, B. and Yenigün, O. (2002) Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 77(7), 743-755.

Dogan, T., Ince, O., Oz, N.A. and Ince, B.K. (2005) Inhibition of Volatile Fatty Acid Production in Granular Sludge from a UASB Reactor. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 40(3), 633-644.

Dolfing, J. and Mulder, J.-W. (1985) Comparison of Methane Production Rate and Coenzyme F(420) Content of Methanogenic Consortia in Anaerobic Granular Sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 49(5), 1142-1145.

Eirich, L.D., Vogels, G.D. and Wolfe, R.S. (1979) Distribution of coenzyme F420 and properties of its hydrolytic fragments. *Journal of Bacteriology* 140(1), 20-27.

Fernandez, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C. and Tiedje, J. (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Appl Environ Microbiol* 65(8), 3697-3704.

Forouhar, F., Abashidze, M., Xu, H., Grochowski, L.L., Seetharaman, J., Hussain, M., Kuzin, A., Chen, Y., Zhou, W., Xiao, R., Acton, T.B., Montelione, G.T., Galinier, A., White, R.H. and Tong, L. (2008) Molecular Insights into the Biosynthesis of the F(420) Coenzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 283(17), 11832-11840.

Franke-Whittle, I.H., Walter, A., Ebner, C. and Insam, H. (2014) Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste Management* 34(11), 2080-2089.

Fukuzaki, S., Nishio, N., Sakurai, H. and Nagai, S. (1991) Characteristics of methanogenic granules grown on propionate in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71(1), 50-57.

Gagliano, M.C., Ismail, S.B., Stams, A.J.M., Plugge, C.M., Temmink, H. and Van Lier, J.B. (2017) Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity. *Water Research* 121(Supplement C), 61-71.

Gavala, H.N., Yenal, U., Skiadas, I.V., Westermann, P. and Ahring, B.K. (2003) Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. *Water Research* 37(19), 4561-4572.

Gebreeyessus, G.D. and Jenicek, P. (2016) Thermophilic versus Mesophilic Anaerobic Digestion of Sewage Sludge: A Comparative Review. *Bioengineering* 3(2), 15.

Ghangrekar, M.M., Asolekar, S.R. and Joshi, S.G. (2005) Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. *Water Research* 39(6), 1123-1133.

Grotenhuis, J.T., Smit, M., Plugge, C.M., Xu, Y.S., van Lammeren, A.A., Stams, A.J. and Zehnder, A.J. (1991) Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 57(7), 1942-1949.

Gupta, S.K. and Gupta, S.K. (2005) Morphological study of the granules in UASB and hybrid reactors. *Clean Technologies and Environmental Policy* 7(3), 203-212.

Hendrickson, E.L. and Leigh, J.A. (2008) Roles of Coenzyme F(420)-Reducing Hydrogenases and Hydrogen- and F(420)-Dependent Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenases in Reduction of F(420) and Production of Hydrogen during Methanogenesis. *Journal of Bacteriology* 190(14), 4818-4821.

Holm-Nielsen, J.B., Al Seadi, T. and Oleskowicz-Popiel, P. (2009) The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology* 100(22), 5478-5484.

IEA (2016) IEA data shows global energy production and consumption continue to rise.

Ismail, S.B., de La Parra, C.J., Temmink, H. and van Lier, J.B. (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors operated under high salinity conditions. *Water Research* 44(6), 1909-1917.

- Jackson-Moss, C.A. and Duncan, J.R. (1990) The effect of iron on anaerobic digestion. *Biotechnology Letters* 12(2), 149-154.
- Kalyuzhnyi, S.V., Sklyar, V.I., Davlyatshina, M.A., Parshina, S.N., Simankova, M.V., Kostrikina, N.A. and Nozhevnikova, A.N. (1996) Organic removal and microbiological features of UASB-reactor under various organic loading rates. *Bioresource Technology* 55(1), 47-54.
- Kim, M., Ahn, Y.-H. and Speece, R.E. (2002) Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. *Water Research* 36(17), 4369-4385.
- Lakowicz, J.R. (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Lakowicz, J.R. (ed), pp. 25-61, Springer US, Boston, MA.
- Lallai, A., Mura, G. and Onnis, N. (2002) The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry. *Bioresource Technology* 82(2), 205-208.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., W. de Hobma, S., de Zeeuw, W.J. and Klapwijk, A. (1980) Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment.
- Liu, C.-f., Yuan, X.-z., Zeng, G.-m., Li, W.-w. and Li, J. (2008) Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Bioresource Technology* 99(4), 882-888.
- Liu, Y.-Q., Liu, Y. and Tay, J.-H. (2004) The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(2), 143-148.
- Lu, X., Zhen, G., Estrada, A.L., Chen, M., Ni, J., Hojo, T., Kubota, K. and Li, Y.-Y. (2015) Operation performance and granule characterization of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating wastewater with starch as the sole carbon source. *Bioresource Technology* 180(Supplement C), 264-273.
- Mo, W. and Zhang, Q. (2013) Energy–nutrients–water nexus: Integrated resource recovery in municipal wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Management* 127(Supplement C), 255-267.
- Moharrery, A. (2007) The Determination of Buffering Capacity of Some Ruminant's Feedstuffs and their Cumulative Effects on TMR Ration.
- Mudhoo, A. and Kumar, S. (2013) Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass.
- Muñoz, R., Meier, L., Diaz, I. and Jeison, D. (2015) A review on the state-of-the-art of physical/chemical and biological technologies for biogas upgrading. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 14(4), 727-759.
- Nizami, A.-S. and Murphy, J.D. (2011) Optimizing the Operation of a Two-Phase Anaerobic Digestion System Digesting Grass Silage. *Environmental Science & Technology* 45(17), 7561-7569.
- Ofverstrom, S., Dauknyš, R. and Sapkaitė, I. (2011) The Effect of Iron Salt on Anaerobic Digestion and Phosphate Release to Sludge Liquor. 3(5), 123-126.
- Ozuolmez, D., Na, H., Lever, M.A., Kjeldsen, K.U., Jørgensen, B.B. and Plugge, C.M. (2015) Methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria co-cultured on acetate: teamwork or coexistence? *Frontiers in Microbiology* 6, 492.
- Park, C.M. and T Novak, J. (2013) The effect of direct addition of iron(III) on anaerobic digestion efficiency and odor causing compounds.
- Patel, G.B., Khan, A.W. and Roth, L.A. (1978) Optimum Levels of Sulphate and Iron for the Cultivation of Pure Cultures of Methanogens in Synthetic Media*. *Journal of Applied Bacteriology* 45(3), 347-356.
- Rinzema, A., van Lier, J. and Lettinga, G. (1988) Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from a UASB reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 10(1), 24-32.
- Seghezzi, L., Zeeman, G., van Lier, J.B., Hamelers, H.V.M. and Lettinga, G. (1998) A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology* 65(3), 175-190.
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q. and Li, X.-Y. (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances* 28(6), 882-894.

Siddiqi, A. and Anadon, L.D. (2011) The water–energy nexus in Middle East and North Africa. *Energy Policy* 39(8), 4529-4540.

Tan, N.C.G., Prenafeta-Boldú, F.X., Opsteeg, J.L., Lettinga, G. and Field, J.A. (1999) Biodegradation of azo dyes in cocultures of anaerobic granular sludge with aerobic aromatic amine degrading enrichment cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(6), 865-871.

Tindall, B.J. (2008) Rejection of the genus name *Methanothrix* with the species *Methanothrix soehngeni* Huser et al. 1983 and transfer of *Methanothrix thermophila* Kamagata et al. 1992 to the genus *Methanosaeta* as *Methanosaeta thermophila* comb. nov. Opinion 75. *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 7), 1753-1754.

van Beelen, P., Dijkstra, A.C. and Vogels, G.D. (1983) Quantitation of coenzyme F420 in methanogenic sludge by the use of reversed-phase high-performance liquid chromatography and a fluorescence detector. *European journal of applied microbiology and biotechnology* 18(1), 67-69.

Van Meerbergen, J. (2011) *Microbiële strategieën voor sturing van bio-energieproductie in anaerobe systemen*, Gent

Villarreal Walker, R., Beck, M.B., Hall, J.W., Dawson, R. and Heidrich, O. (2014) The energy-water-food nexus: Strategic analysis of technologies for transforming the urban metabolism.

Vogels, G.D., Keltjens, J.T., Hutten, T.J. and Van Der Drift, C. (1982) Coenzymes of Methanogenic Bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* 3(2), 258-264.

Wang, J., Fang, H., Jia, H., Yang, G., Gao, F. and Liu, W. (2017a) Effect of zero-valent iron and trivalent iron on UASB rapid start-up.

Wang, S., Hou, X. and Su, H. (2017b) Exploration of the relationship between biogas production and microbial community under high salinity conditions. *Scientific Reports* 7, 1149.

Weiland, P. (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(4), 849-860.

Westerholm, M., Dolfing, J., Sherry, A., Gray, N.D., Head, I.M. and Schnürer, A. (2011) Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environmental Microbiology Reports* 3(4), 500-505.

Whitmore, T.N., Etheridge, S.P., Stafford, D.A., Leroff, U.E.A. and Hughes, D. (1986) The evaluation of anaerobic digester performance by coenzyme F420 analysis. *Biomass* 9(1), 29-35.

Yu, H.-Q., Fang, H. and Tay, J.-H. (2000) Effects of Fe²⁺ on sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors.

Zaher, U., C Bouvier, J., Steyer, J.P. and Vanrolleghem, P. (2004) Titrimetric monitoring of anaerobic digestion: VFA, alkalinities and more.

Zamalloa, C., De Vrieze, J., Boon, N. and Verstraete, W. (2012) Anaerobic digestibility of marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in a lab-scale anaerobic membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(2), 859-869.

Zhang, W., Werner, J.J., Agler, M.T. and Angenent, L.T. (2014) Substrate type drives variation in reactor microbiomes of anaerobic digesters. *Bioresource Technology* 151, 397-401.

Zhang, Y., Alam, M.A., Kong, X., Wang, Z., Li, L., Sun, Y. and Yuan, Z. (2017a) Effect of salinity on the microbial community and performance on anaerobic digestion of marine macroalgae. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 92(9), 2392-2399.

Zhang, Y., Li, L., Kong, X., Zhen, F., Wang, Z., Sun, Y., Dong, P. and Lv, P. (2017b) Inhibition Effect of Sodium Concentrations on the Anaerobic Digestion Performance of *Sargassum* Species. *Energy & Fuels* 31(7), 7101-7109.

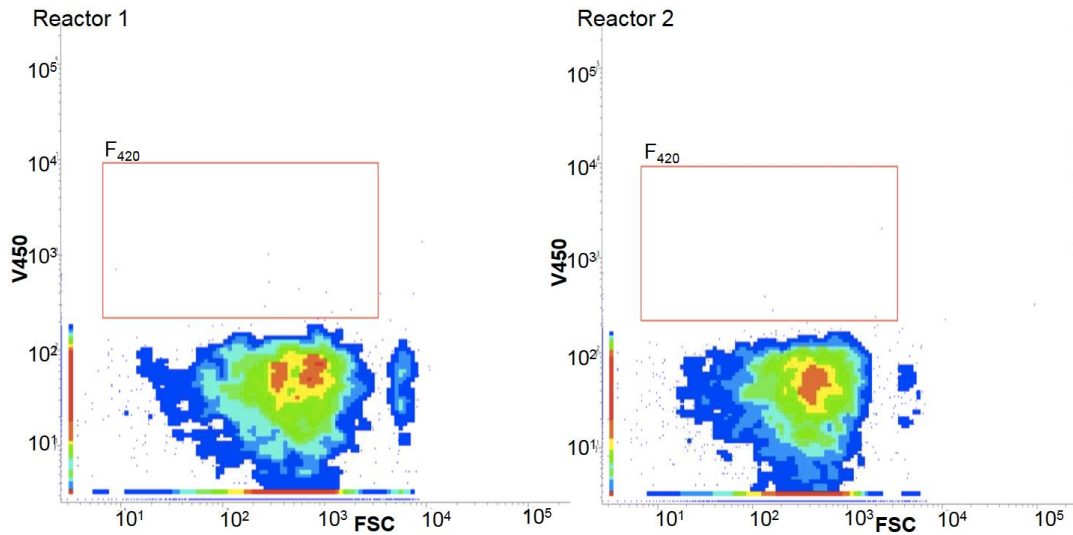
Zhao, J., Liu, Y., Wang, D., Chen, F., Li, X., Zeng, G. and Yang, Q. (2017) Potential impact of salinity on methane production from food waste anaerobic digestion. *Waste Management* 67(Supplement C), 308-314.

Ziganshin, A.M., Liebetrau, J., Pröter, J. and Kleinsteuber, S. (2013) Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(11), 5161-5174.

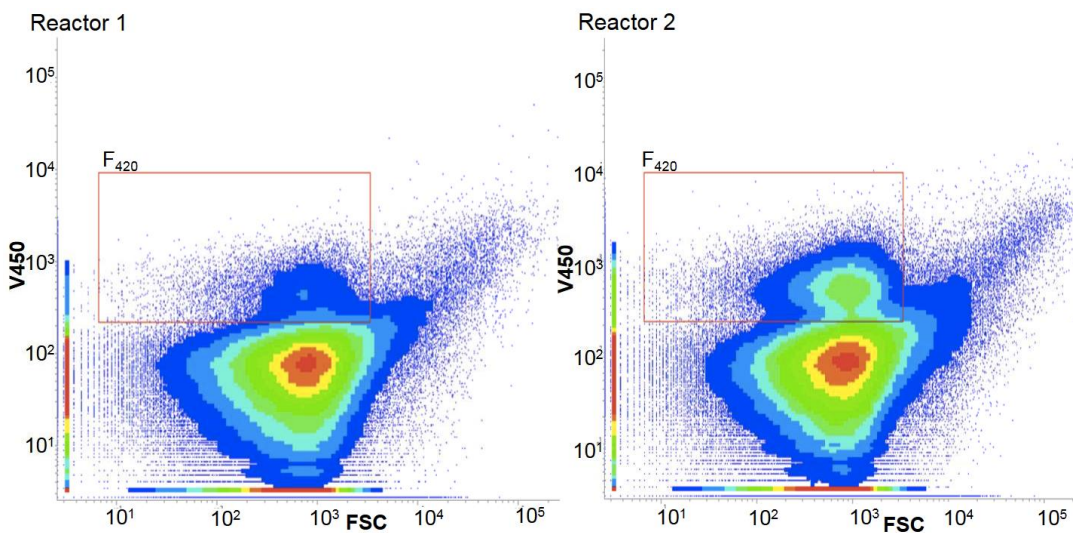
BIJLAGE A: FLOW CYTOMETER

1. Methodie ontwikkeling

In Figuur 33 en Figuur 34 kunnen de dichtheidsplots teruggevonden worden. Deze figuren stemmen overeen met Figuur 25 en Figuur 26. Op basis van deze vier figuren kon er met zekerheid besloten worden dat het oranje gate de F_{420} co-enzymen mat.



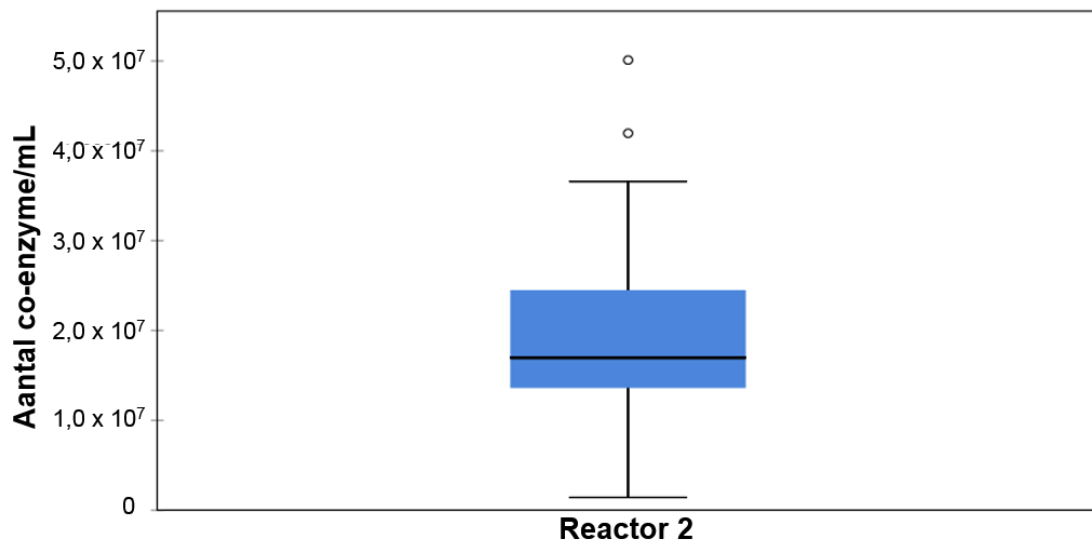
Figuur 33: Dichtheidsplot van de negatieve controle voor de bepaling van de gate voor het F_{420} co-enzym, van reactor 1 en 2, gebruik makend van het slibstaal. De oranje gate duidt de regio aan waar autofluorescente events werden verwacht.



Figuur 34: Dichtheidsplot van de methanogene archaea populatie van reactor 1 en 2, van het slibstaal. De oranje gate duidt de regio aan waar autofluorescente events aanwezig waren.

BIJLAGE B: BOXPLOT

In Figuur 35 kan het aantal cellen/mL met het co-enzym teruggevonden worden voor reactor 2. In deze boxplot lag er één datapunt meer dan 3x buiten het interkwantiel, terwijl de andere datapunt 1,5 – 3x onder het interkwantiel lagen. Het aantal cellen/mL met het F₄₂₀ co-enzym voor reactor 2 lag tussen $5,0 \times 10^6$ – $3,5 \times 10^7$ /mL.



Figuur 35: Boxplot van reactor 2, voor het aantal cellen/mL met het co-enzym.

BIJLAGE C: STATISTISCHE TESTEN

1. Statistische test voor vraag 1

In Tabel 7 kunnen de uitgevoerde testen teruggevonden worden voor vraag 1: “Waren het aantal cellen met het F_{420} co-enzym voor reactor 1 en 2 gelijk aan elkaar voor de additie van Na^+ ?”. Uit de Mann Whitney U-test test werd besloten om de H_1 hypothese te aanvaarden. Hieruit kon besloten worden dat aantal cellen met het F_{420} co-enzym tussen reactor 1 en 2 verschillend was.

Tabel 7: Parametrische en niet-parametrische testen voor vraag 1 met de gestelde hypothese. Met de voorwaarden voor de parametrische test.

Parametrische test: Two sample t-test		
Hypothese: $H_0: \mu(\text{reactor 1}) = \mu(\text{reactor 2})$ $H_1: \mu(\text{reactor 1}) \neq \mu(\text{reactor 2})$		
Voorwaarden:	1) Onafhankelijke observaties	Voldaan
	2) Normaliteit	H_0 : variabelen normaal verdeeld H_1 : variabelen niet normaal verdeeld Shapiro-Wilk: $0,004 < \alpha=0,05$ Niet voldaan
	3) Homosedasticiteit	$H_0: \sigma(\text{reactor 1}) = \sigma(\text{reactor 2})$ $H_1: \sigma(\text{reactor 1}) \neq \sigma(\text{reactor 2})$ Levene's Test for Equality of Variances: F: 6,826 P-waarde: $0,007 < \alpha=0,05$ Niet voldaan
Besluit: De voorwaarden zijn niet voldaan, hiervoor dient de alternatieve test uitgevoerd te worden.		
Niet-parametrische test: Mann Whitney U-test		
Hypothese: $H_0: M(\text{reactor 1}) = M(\text{reactor 2})$ $H_1: M(\text{reactor 1}) \neq M(\text{reactor 2})$		
U-toets: 59,000		
P-waarde: $0,013 < \alpha=0,05 \rightarrow$ Aanvaarden van de H_1 hypothese		
Besluit: De H_0 hypothese kan verworpen worden, het aantal cellen met het co-enzym tussen reactor 1 en 2 is verschillend, waarbij deze bij reactor 2 hoger ligt dan bij reactor 1.		

2. Statistische test voor vraag 2

In Tabel 8 kunnen de uitgevoerde testen teruggevonden worden voor vraag 2: “Had additie van Na⁺ in reactor 1 invloed op het aantal cellen met het co-enzym?”. Uit deze parametrische test kon besloten worden dat de H₁ hypothese aanvaard werd. Dit betekent dat het aantal cellen met het F₄₂₀ co-enzym voor en na additie van Na⁺ verschillend waren voor reactor 1. Het aantal cellen met het F₄₂₀ co-enzym was voor additie hoger dan na additie van Na⁺.

Tabel 8: Parametrische testen en voorwaarden voor vraag 2 met de gestelde hypothese.

Parametrische test: Two sample t-test		
Hypothese: H ₀ : $\mu(\text{reactor 1, voor}) = \mu(\text{reactor 1, na})$ H ₁ : $\mu(\text{reactor 1, voor}) \neq \mu(\text{reactor 1, na})$		
Voorwaarden:	1) Onafhankelijke observaties	Voldaan
	2) Normaliteit	H ₀ : variabelen normaal verdeeld H ₁ : variabelen niet normaal verdeeld Shapiro-Wilk: 0,768 > $\alpha=0,05$ Voldaan
	3) Homosedasticiteit	H ₀ : $\sigma(\text{reactor 1,voor}) = \sigma(\text{reactor 1, na})$ H ₁ : $\sigma(\text{reactor 1,voor}) \neq \sigma(\text{reactor 1, na})$ Levene's Test for Equality of Variances: F: 0,047 P-waarde: 0,830 > $\alpha=0,05$ Voldaan
t-toets: -2,060		
P-waarde: 0,025 < $\alpha=0,05$ → Aanvaarden van H ₁ hypothese		
Besluit: De H ₀ hypothese kan verworpen worden, het aantal cellen met het co-enzym voor en na additie van Na ⁺ van reactor 1 is verschillend.		